



Fakulta zemědělská  
a technologická  
Faculty of Agriculture  
and Technology

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

# JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

## FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra genetiky a biotechnologií

### Disertační práce

Lentiviry malých přežvýkavců – analýza prevalence onemocnění a distribuce genotypů SRLV v chovech ovcí a koz v ČR

Autorka práce: Ing. Kateřina Vernerová

Školitel: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

České Budějovice 2022

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou disertační práci „Lentiviry malých přežvýkavců – analýza prevalence onemocnění a distribuce genotypů SRLV v chovech ovcí a koz v ČR" jsem vypracovala samostatně s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů uvedených v seznamu, jenž je součástí této práce. Dále prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své disertační práce elektronickou cestou ve veřejně přístupné sekci databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách. Jako autorka uvedené disertační práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Českých Budějovicích dne 31. 7. 2022

Kateřina Vernerová

# Lentiviry malých přežvýkavců – analýza prevalence onemocnění a distribuce genotypů SRLV v chovech ovcí a koz v ČR

## Abstrakt

Maedi-visna u ovcí a artritida a encefalitida u koz jsou celosvětově rozšířená, progresivní zánětlivá onemocnění způsobená retroviry, které patří do skupiny lentivirů malých přežvýkavců (SRLV). U postižených zvířat způsobují celoživotní infekce, které se vyznačují pomalou progresí až do zjevného onemocnění a končí vždy letálně. Cílem této práce bylo zjistit prevalenci onemocnění SRLV v ČR, pomocí fylogenetické analýzy zmapovat genotypové zastoupení SRLV a analyzovat *TMEM154*, jakožto vybraný kandidátní marker rezistence proti SRLV u ovcí a koz. Celkem bylo odebráno 3410 vzorků krve ovcí a koz z 21 stád. Zjištěná sérologická prevalence maedi visna u ovcí byla 19,9 % (556/2801) a séroprevalence artritidy a encefalidity u koz byla 14,1 % (86/609). Všechna séropozitivní zvířata byla testována metodou nested polymerase chain reaction (nPCR) na přítomnost provirové DNA. Fylogenetická analýza identifikovala genotyp SRLV v 77 sekvencích, z nichž 60 vzorků ovcí a koz bylo genotypu A a 17 vzorků ovcí patřilo genotypu B. Zatímco všechny sekvence genotypu B byly klasifikovány jako subtyp B2, skupina izolátů genotypu A vykazovala vyšší variabilitu a byly příbuzné se subtypy A2 a A3. Dále bylo náhodně vybráno 40 séropozitivních vzorků a 50 séronegativních vzorků ovcí a koz cílem navrhnout metodiku pro LAMP diagnostiku SRLV u ovcí a koz. Séronegativita byla jednoznačně potvrzena metodou LAMP u všech vzorků, séropozitivní vzorky byly potvrzeny ve 31 případech ze 40 u ovcí i koz. Ke genotypizaci *TMEM154* bylo náhodně vybráno 605 vzorků ovcí a 60 vzorků koz. Nejvíce séropozitivních zvířat bylo heterozygotních EK (61 %), homozygotních EE bylo 58 % a homozygotních KK bylo 45 %. U ovcí byly identifikovány všechny tři genotypy, zatímco všechny kozy byly homozygotní o genotypu EE.

**Klíčová slova:** maedi-visna, artritida a encefalitida koz, nPCR, LAMP, genotypizace

# **Small ruminant lentiviruses – analysis of disease prevalence and distribution of SRLV genotypes in sheep and goat farms in the Czech Republic**

## **Abstract**

Maedi-visna in sheep, and arthritis and encephalitis in goats, are globally widespread and progressive inflammatory diseases caused by retroviruses belonging to the small ruminant lentivirus (SRLV) group. They cause lifelong infections in affected animals, characterised by slow progression to overt disease and are always fatal. The aim of this study was to determine the prevalence of SRLV disease in the Czech Republic, to map the genotypic representation of SRLV using phylogenetic analysis, and to analyse TMEM154 as a selected candidate marker of SRLV resistance in sheep and goats. A total of 3 410 sheep and goat blood samples were collected from 21 flocks. The seroprevalence of maedi-visna in sheep was found to be 19.9% (556/2801), and the seroprevalence of arthritis and encephalitis in goats was 14.1% (86/609). All seropositive animals were tested by nested polymerase chain reaction (nPCR) for the presence of proviral DNA. Phylogenetic analysis identified the SRLV genotype in 77 sequences, of which 60 sheep and goat samples were genotype A and 17 sheep samples were genotype B. While all genotype B sequences were classified as subtype B2, the group of genotype A isolates showed higher variability and were related to subtypes A2 and A3. In addition, 40 seropositive and 50 seronegative sheep and goat samples were randomly selected to design a methodology for LAMP (loop-mediated isothermal amplification) diagnosis of SRLV in sheep and goats. Seronegativity was clearly confirmed by the LAMP method in all samples, and seropositivity was confirmed in 31 out of 40 cases in both sheep and goats. 605 sheep and 60 goat samples were randomly selected for TMEM154 genotyping. Most seropositive animals were heterozygous EK (61%), 58% were homozygous EE, and 45% were homozygous KK. In sheep, all 3 genotypes were identified, while all goats were homozygous EE.

**Keywords:** maedi-visna, goat arthritis and encephalitis, nPCR, LAMP, genotyping



# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Literární rešerše.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Taxonomie lentivirů.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2</b>	<b>Stavba viru.....</b>	<b>12</b>
2.2.1	Virion.....	12
2.2.2	Genom.....	13
2.2.2.1	Gen <i>gag</i> .....	14
2.2.2.2	Gen <i>pol</i> .....	15
2.2.2.3	Gen <i>env</i> .....	17
2.2.2.4	Doplňkové regulační geny.....	18
2.2.3	Životní cyklus viru.....	21
2.2.3.1	Vstup viru.....	21
2.2.3.2	Reverzní transkripce.....	22
2.2.3.3	Integrace.....	23
2.2.3.4	Enkapsidace a sestavení virové částice.....	24
2.2.4	Tropismus.....	25
<b>2.3</b>	<b>Historie onemocnění.....</b>	<b>27</b>
<b>2.4</b>	<b>Definice, popis, onemocnění.....</b>	<b>28</b>
2.4.1	Přenos.....	30
2.4.1.1	Mezidruhový přenos.....	30
2.4.2	Klasifikace lentivirů malých přežvýkavců.....	31
2.4.3	Příznaky onemocnění.....	32
<b>2.5</b>	<b>Lentiviry malých přežvýkavců a odezva hostitele.....</b>	<b>35</b>
<b>2.6</b>	<b>Rezistence.....</b>	<b>39</b>
2.6.1	<i>TMEM154</i> .....	40
2.6.2	<i>ZNF331</i> .....	42
<b>2.7</b>	<b>Diagnostické metody.....</b>	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>Cíle práce.....</b>	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>Komentáře k publikovaným výsledkům.....</b>	<b>45</b>
<b>5</b>	<b>Publikace.....</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>148</b>
<b>7</b>	<b>Seznam zkratk.....</b>	<b>150</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>153</b>

# 1 Úvod

Maedi-visna (MV) ovcí a artritida a encefalitida koz (CAE) a jsou perzistentní onemocnění způsobená blízce příbuznými viry ze skupiny lentivirů malých přežvýkavců (SRLV). Byl zaznamenán i mezidruhový přenos či koinfekce. Onemocnění jsou charakterizována celoživotním přetrváváním kauzálního agens v hostitelských monocytech a makrofázích a proměnlivou délkou doby mezi infekcí a indukcí sérologicky detekovatelné antivirové protilátkové odpovědi. Většina infikovaných zvířat nevykazuje klinické příznaky onemocnění, ale zůstává trvale infikována a je schopna přenášet virus. Přenos probíhá nejčastěji laktogenní a kapénkovou cestou. U určitého procenta se klinická choroba vyvine v jednom nebo několika cílových orgánech, přičemž nejčastěji jsou to plíce, klouby, vemenó či nervový systém. Existuje mnoho faktorů ovlivňujících patogenezi onemocnění, např. věk, plemeno, cesta expozice, možné sekundární infekce či podmínky chovu, nicméně onemocnění má vždy letální průběh. Vzhledem k celosvětovému výskytu onemocnění SRLV a jeho nezanedbatelnému socioekonomickému dopadu na mezinárodní obchod se zvířaty a jejich produkty, zařadila Světová organizace pro zdraví zvířat CAE a MV na seznam oznamovatelných chorob suchozemských a vodních živočichů. Ekonomické ztráty jsou způsobeny především sníženou fertilitou, nižší hmotností mláďat po porodu i po odstavu, sníženou laktací a přímými ztrátami v důsledku abortů, úhynu či nucené porážky. Kritickým parametrem pro kontrolu a eradikaci onemocnění je rychlá, včasná a přesná diagnostika SRLV. Většina současných kontrolních a eradikačních programů je založena na detekci protilátek proti viru a případné konfirmaci průkazem provirové DNA (kyselina deoxyribonukleová). Hlavním nedostatkem kontrolních a eradikačních programů je skutečnost, že výše zmíněné diagnostické metody jsou limitovány především intermitentní protilátkovou odezvou, dlouhou sérokonverzí a antigenní heterogenitou. V případě průkazu provirové DNA je limitujícím faktorem virová genetická heterogenita a nedostatek spolehlivých univerzálních primerů či nízká virová zátěž. Výše uvedené diagnostické metody mohou dokonce občas poskytovat opačné výsledky, což s výše zmíněnými nevýhodami jednotlivých metod může vést k diagnostickým selháním a mnoho infikovaných zvířat zůstává nediodagnostikovanými přenašeči viru. Proti infekcím SRLV neexistuje vakcína ani léčba. Snížení ekonomických ztrát v důsledku rozvinutí onemocnění s klinickými příznaky lze podpořit kvalitním managementem, včetně selektivního šlechtění s využitím genetických markerů. U některých plemen byla prokázána vyšší rezistence, či naopak vyšší vnímavost k infekci SRLV. Tyto meziplemenné rozdíly v prevalenci a koncentraci proviru naznačují

silný genetický základ pro náchylnost k infekci SRLV. S využitím celogenomové asociační studie bylo identifikováno několik lokusů asociovaných s odolností malých přežvýkavců vůči lentivirovým infekcím, přičemž nejvíc nadějí je vkládáno do transmembránového proteinu 154 u ovcí. K účinné eradikaci onemocnění se jako nejefektivnější jeví využití kombinace genetické selekce s metodami časně a precizní diagnostiky SRLV. K dosažení optimálních výsledků je třeba dalších studií v oblasti geneticky podmíněné rezistence a imunogenetiky hostitele, dále pak v genetice viru a významná je i otázka vývoje preciznějších diagnostických metod.

## 2 Literární rešerše

### 2.1 Taxonomie lentivirů

Podle aktuálního zařazení Mezinárodního výboru pro virologickou taxonomii (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV), patří rod *Lentivirus* do čeledi *Retroviridae*, podčeledi *Orthoretrovirinae* a zahrnuje 10 druhů (tab. 1): *Bovine immunodeficiency virus* (BIV), *Jembrana disease virus* (JDV), *Caprine arthritis encephalitis virus* (CAEV), *Maedi-visna virus* (MVV), *Equine infectious anemia virus* (EIAV), *Feline immunodeficiency virus* (FIV), *Puma lentivirus* (PLV), *Human immunodeficiency virus - 1* (HIV-1), *Human immunodeficiency virus - 2* (HIV-2), *Simian immunodeficiency virus* (SIV) (ICTV, 2021).

Retroviry jsou dle Baltimorovy klasifikace řazeny do skupiny VI, mezi viry s jednořetězcovým RNA genomem s pozitivní polaritou (+ssRNA; positive-sense single-stranded Ribonucleic acid). Ve svém replikačním cyklu mají meziprodukt DNA (deoxyribonucleic acid), tzn. že se jedná o viry s reverzní transkriptázou (Expasy, 2019).

Tab. 1: Druhy rodu *Lentivirus* (ICTV, 2021)

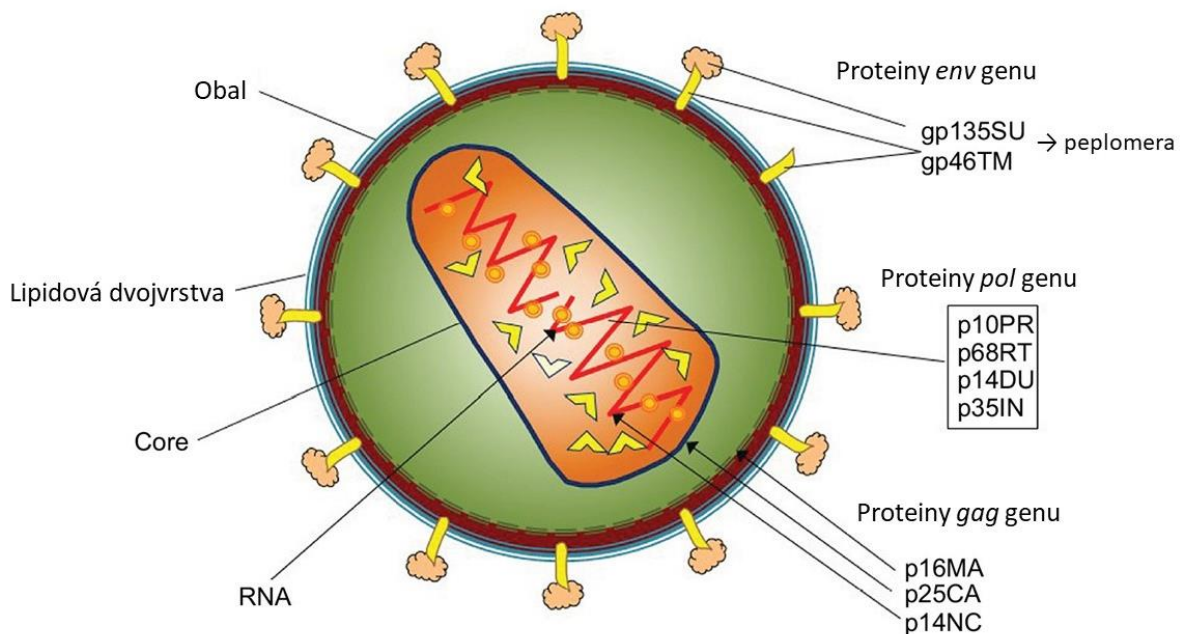
Skupina	Název viru	Zkratka	GenBank	Délka (nt)	Gen (počet)	Hostitel
Bovine	<i>Bovine immunodeficiency v.</i>	BIV	NC_001413	8482	5	<i>Bos taurus</i>
	<i>Jembrana disease virus</i>	JDV	NC_001654.1	7732	8	<i>Bos taurus</i>
Equine	<i>Equine infectious anemia v.</i>	EIAV	NC_001450	8359	4	<i>Equus caballus</i>
Feline	<i>Feline immunodeficiency v.</i>	FIV	NC_001482	9474	6	<i>Felis silvestris</i>
	<i>Puma lentivirus</i>	PLV	NC_038669.1	9100	4	další kočkovité šelmy
Primate	<i>Human immunodeficiency v. - 1</i>	HIV-1	NC_001802	9181	10	<i>Homo sapiens</i>
	<i>Human immunodeficiency v. - 2</i>	HIV-2	NC_001722	10359	9	<i>Homo sapiens</i>
	<i>Simian immunodeficiency v.</i>	SIV	NC_001549	9623	6	izolován u více než 40 druhů primátů
	<i>Simian immunodeficiency v. SIV-mnd 2</i>	SIV-mnd 2	NC_004455	9518	8	
Caprine /ovine	<i>Caprine arthritis encephalitis v.</i>	CAEV	NC_001463	9189	6	<i>Ovis aries</i>
	<i>Maedi-visna v.</i>	MVV	NC_001452	9202	6	<i>Capra hircus</i>

## 2.2 Stavba viru

Virion MVV a CAEV je obalený, sférický až mírně pleomorfní, s průměrem 80–120 nm a skládá se z jádra a obalu (obr. 1), přičemž je složen z 65 % z proteinů, ze 35 % lipidů a 1-2 % tvoří RNA (Vogt, 1997). Nukleokapsida s komplexní symetrií přímo obaluje genom viru. Z fosfolipidového obalu pocházejícího z plazmatické membrány hostitelské buňky vyčnívají na povrch glykoproteinové výčnělky peplomer proteiny (spike proteins). Genom je tvořen dvěma identickými nesegmentovanými molekulami jednořetězcové RNA (Nováková et al., 2016).

### 2.2.1 Virion

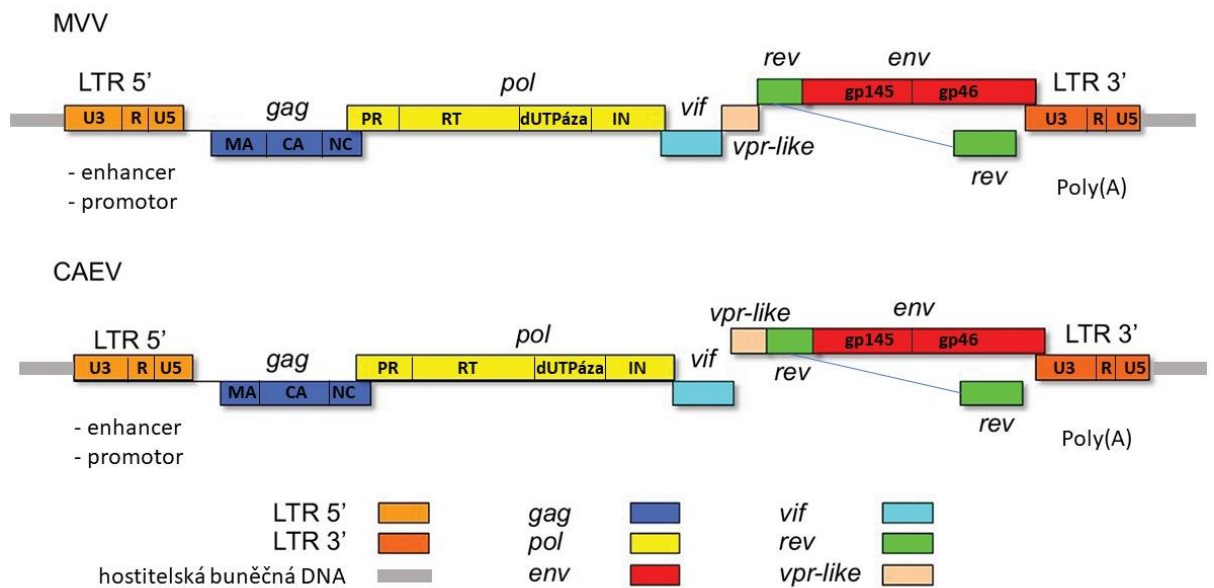
Obal je formován membránovou dvojrůstvou složenou z buněčných fosfolipidů hostitelské buňky, mezi které jsou inkorporovány glykoproteiny (kódované v genomu viru): transmembránové glykoproteiny, na které jsou pomocí nekovalentních interakcí navázány povrchové glykoproteiny ve formě glykoproteinových peplomer. Spike proteiny jsou zodpovědné za vazbu na receptory hostitelské buňky. Jádro neboli nukleokapsid je proteinová schránka tvaru komolého kužele, obsahující stejně jako ostatní retroviry dvě lineární molekuly virové +ssRNA a enzymy nezbytné pro replikaci viru (Blacklaws, 2009; Gomez-Lucia et al., 2018).



Obr. 1: Schéma virové částice SRLV (Blacklaws, 2009) - upraveno

## 2.2.2 Genom

Diploidní RNA genom lentivirů malých přežvýkavců (small ruminant lentivirus; SRLV) je dlouhý 9 202 nukleotidů u MVV a 9 189 nukleotidů u CAEV. Na základě sekvenování různých kmenů a molekulárních klonů byly determinovány tři strukturální geny běžné u replikace schopných retrovirů: *gag* (group-specific antigen), *pol* (polymerase) a *env*



Obr. 2: Schematické znázornění distribuce genů v provirových genomech MVV a CAEV. Pod konkrétním LTR jsou vyznačeny obsažené sekvence důležité pro transkripci (enhancer – zesilovač, promotor, polyadenylační signál – poly(A) konec) (Gomez-Lucia et al., 2018) – upraveno

(envelope) (v pořadí 5'-*gag-pol-env*-3'). Tři konzervované otevřené čtecí rámce (open reading frame; ORF) nacházející se mezi geny *pol* a *env* byly přiřazeny třem doplňkovým regulačním genům: *vif* (virion infectivity factor), *vpr-like* (viral protein R) neboli *tat* (transactivator protein) a *rev* (regulator of expression of virion proteins), přičemž funkce genových produktů byly odvozeny přímým studiem MVV a CAEV a také porovnáním s HIV a ostatními druhy lentivirů (Villet et al., 2003). Stejně jako u ostatních retrovirů, ohraničují provirovou DNA SRLV dlouhé terminální repetice (long terminal repeat, LTR) obsahující promotorové prvky (*cis* elementy) potřebné pro transkripci, integraci a polyadenylaci virové RNA. Dlouhé terminální repetice jsou rozděleny do 3 funkčních oblastí: U3 (unique 3' region) oblast je odvozena od sekvence jedinečné pro 3' konec RNA, R (repeat) je odvozena od sekvence opakující se na obou koncích RNA a U5 (unique 5' region) je odvozena od sekvence

jedinečné pro 5' konec RNA. Velikosti těchto tří elementů se mezi retroviry značně liší, přičemž velikost U3 u lentivirů dosahuje přibližně 450 nukleotidů, R 100 nukleotidů a U5 80 nukleotidů. Dlouhé terminální repetice hrají také důležitou roli v buněčném tropismu, patogenезi a při replikaci SRLV (obr. 2) (Agnarsdottir et al., 2000; Gomez-Lucia et al., 2014, 2018; Vogt, 1997).

### 2.2.2.1 Gen *gag*

Gen *gag* kóduje prekurzor strukturálních proteinů viru *gag* (Pr55gag). Ten je následně zpracován na proteiny p16MA, p25CA a p14NC (Vigne et al., 1982). Sekvence těchto proteinů v genu *gag* je konzervována u všech retrovirů. Funkcí těchto vnitřních strukturálních glykoproteinů je především ochrana provirové DNA.

Největší a nejhojněji se vyskytující glykoprotein je kapsidový protein (p25CA). Ve zralém virionu tvoří hydrofobní jádro virionu (tzv. core), které obaluje genomový komplex RNA/nukleokapsid (UniProt, 2022a). Je syntetizován ve velkém množství a v organismu hostitele vyvolává silnou protilátkovou odpověď během infekce, což je dobře využitelné pro diagnostické testy založené na metodě ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Zhao et al., 2021). Jako součást polyproteinu hraje Gag významnou roli v procesu skládání virové kapsidy a jejím zrání. Kapsidový protein se skládá z N-terminální (tzv. core) domény důležité pro zrání virionu a C-terminální (tzv. dimerizační) domény, která zprostředkovává vzájemné interakce mezi Gag molekulami (Andrésdóttir, 2018; Strnad et al., 2003).

N-terminální doména Gag je tvořena proteinem matrixu p16MA. Ve virionu je lokalizovaný mezi virovou membránou a kapsidovým proteinem viru a ve zralém virionu pokrývá spodní stranu lipidového obalu viru. Dodává virionu stabilitu a tuhost. Zajišťuje spojení mezi kapsidou a obalem (směřuje polyproteinový Gag prekurzor na místo skládání kapsidy) a je zodpovědný za zprostředkování vazby Gag prekurzoru s buněčnou plazmatickou membránou vedoucí k získávání faktorů virových i hostitelských (Andrésdóttir, 2018; Bell & Lever, 2013; Olech & Kužmak, 2020).

Protein nukleokapsidy (p14NC) obaluje a chrání virovou genomovou nesestříhanou dimerní RNA (guide RNA; gRNA) (Molae et al., 2020; Pepin et al., 1998; Shah et al., 2004a). Obsahuje dvě domény se zinkovými prsty (Cys-X(2)-Cys-X(4)-His-X(4)-Cys) (CCHC motiv), z nichž každá váže jeden zinečnatý iont a mezi retroviry jsou vysoce konzervované (Morcock et al., 2000). Zinkové prsty pak selektivně vážou RNA pomnoženého viru pro enkapsidaci do nového virionu. Působí jako chaperon nukleové kyseliny, který se

podílí na přeskupení sekundární struktury nukleové kyseliny během reverzní transkripce gRNA (Massa et al., 2021; UniProt, 2022b). Zatímco zinkové prsty jsou lokalizovány v centrální globulární oblasti, N- a C-terminální domény jsou relativně volné, bez globulární struktury (South & Summers, 1993; Strnad et al., 2003).

#### 2.2.2.2 Gen *pol*

Gen *pol* kóduje enzymy, které se podílejí na replikaci a integraci DNA: reverzní transkriptázu (RT) s aktivitou ribonukleázy H (RNáza H), proteázu (PR), deoxyuridin 5'-trifosfát nukleotidohydrolázu (dUTPáza) a integrázu (IN) (Blacklaws, 2009).

Klíčovým enzymem retrovirů je reverzní transkriptáza, RNA-dependentní DNA polymeráza, která umožňuje transkripci virové RNA do provirové cDNA (complementary DNA). Jedná se o heterodimer, který vykazuje aktivitu RNázy H (Blacklaws, 2009). Reverzní transkriptáza je multifunkční enzym, který v cytoplazmě převádí genomovou virovou dimerní RNA na dsDNA (double-stranded DNA) krátce po vstupu viru do buňky. Tento enzym vykazuje aktivitu DNA polymerázy, která může kopírovat templát DNA nebo RNA (templát i primer; pouze dNTPs – deoxyribonukleosidtrifosfáty mohou být inkorporovány) i aktivitu RNázy H, jež štěpí vlákno RNA pouze ve formě heteroduplexu RNA/DNA nebo RNA/RNA v částečně procesivním 3'→5' endonukleázovém režimu a produkuje krátké oligonukleotidy s 5'-fosfátem, 3'-OH. Konverze virové genomové RNA na dsDNA vyžaduje mnoho kroků: tRNA<sup>Lys1,2</sup> (transferová RNA s lysinem na pozici 1 a 2) je komplementární a váže se na vazebné místo pro primer (primer binding site; PBS) umístěné na 5' konci virové RNA; RT používá 3' konec primeru – tRNA k provedení krátkého kola syntézy RNA-dependentní -ssDNA. Čtení pokračuje oblastí U5 a končí po opakovaném výskytu oblasti R, která je přítomna na obou koncích virové RNA. Část heteroduplexu RNA/DNA je štěpena RNázou H, což vede ke vzniku ssDNA/tRNA primer. Výše zmíněná ssDNA/tRNA hybridizuje s identickou R oblastí umístěnou na 3' konci virové RNA. Reverzní transkriptáza používá 3' konec této nově syntetizované krátké ssDNA k provedení syntézy celého templátu RNA-dependentní -DNA. RNáza H štěpí templát RNA s výjimkou polypurinového traktu (PPT) umístěného na 5' konci genomu. Není jasné, zda aktivity polymerázy i RNázy H probíhají současně. Aktivita RNázy H pravděpodobně může probíhat jak v závislosti na polymeráze (RNA naštěpená na malé fragmenty stejnou RT provádějící syntézu DNA), tak v režimu nezávislém na polymeráze (štěpení zbývajících fragmentů RNA volnými RT). Dále pak RT provádí DNA řízenou syntézu +DNA pomocí PPT, které nebyly odstraněny RNázou H jako



primery a teprve poté jsou PPT a tRNA primery odstraněny RNázou H. Vazebná místa pro primer na 3' a 5' koncích ssDNA hybridizují za vzniku meziprojektu – cirkulární dsDNA. Virová RT má dislokázovou aktivitu a reverzní transkripce končí syntézou lineární dsDNA kopie virového genomu s tupými konci, která na obou koncích obsahuje LTR (Cavalieri et al., 2018; UniProt, 2022b).

Retrovirová proteáza – retropepsin hraje klíčovou roli při zpracování primárního translačního produktu a zrání virové částice; zprostředkovává proteolytické štěpení polyproteinových prekurzorů gag a gag-pol během nebo krátce po uvolnění virionu z plazmatické membrány, což způsobuje výrazné morfologické změny vedoucí k přeměně nezralé částice na infekční virus (Konvalinka et al., 2015). Štěpení probíhají na přesně definovaných místech jako uspořádaná, postupná kaskáda za vzniku cílových proteinů. Tento proces se nazývá maturace a dosahuje maximální aktivity během pučícího procesu těsně před uvolněním částic z buňky (UniProt, 2022c). Sekvenování PR odhalilo podobnosti s enzymy z rodiny aspartátových proteináz, u kterých dva zbytky kyseliny asparagové (každý umístěný ve vysoce konzervovaném motivu Asp-Thr/Ser-Gly) aktivují molekulu vody k hydrolýze cílové peptidové vazby. Porovnání sekvencí retrovirových genomů ukázalo, že tento konzervovaný motiv je kódován ve všech známých retrovirech (Barrett et al., 2012; Mótyán et al., 2020; Vogt, 1997).

V genomu lentivirů je gen kódující enzym dUTPáza umístěn v čtecím rámci *pol* mezi oblastmi kódujícími RNázu H a integrázu. Tato enzymová aktivita byla identifikována pouze u FIV, EIAV, CAEV a MVV. Zdá se, že aktivita dUTPázy snižuje frekvenci mutací G (guanin) za A (adenin). V případě CAEV se viry s deficitem dUTPázy *in vitro* replikují pomaleji v makrofázích a *in vivo* vykazují mírné oslabení patogenity. Naproti tomu se ukázalo, že MVV s nedostatkem dUTPázy je stejně patogenní *in vivo* jako virus divokého typu (Eltahir, 2011; Gudmundsdóttir et al., 2010; Pepin et al., 1998; Pétursson et al., 1998; Reina et al., 2009a; Reina et al., 2006).

V každém virionu je s virovou RNA asociována reverzní transkriptáza a integráza. Po reverzní transkripci provirus migruje k jádru hostitelské buňky a genom provirové dvouřetězcové DNA s tupými konci je integrován do DNA hostitelské buňky mechanismem zprostředkovaným IN. Tento protein štěpí oba 3'-terminální konce virové DNA po vysoce konzervovaném dinukleotidu CA a odstraňuje dva terminální nukleotidy. Tato místně specifická štěpicí reakce, označovaná také jako 3' endonukleázová reakce, vede ke vzniku 3'-OH skupiny na obou koncích lineární virové DNA. Předpokládá se, že k tomu dochází v preintegračním komplexu před vstupem do jádra, kde probíhá následná inkorporace.

V jedнокrokové transesterifikační reakci IN katalyzuje nukleofilní atak 3'-OH skupin zpracované virové DNA k přerušení fosfodiesterových vazeb v hostitelské DNA a současně spojuje virovou a hostitelskou DNA dohromady. Tato koordinovaná reakce se označuje jako integrace DNA (Berger et al., 2001; Bushman et al., 1990; Pepin et al., 1998).

### 2.2.2.3 Gen *env*

Gen *env* kóduje dva typy proteinů v obalu virové částice: povrchové a transmembránové glykoproteiny. Stejně jako u jiných retrovirů je glykoprotein syntetizován jako prekurzorový protein (gp160) a následně štěpen proteázou hostitelské buňky na dvě podjednotky: povrchový glykoprotein (surface glycoprotein; SU – gp135SU) a transmembránový glykoprotein (transmembrane glycoprotein; TM – gp46TM). Povrchový protein obsahuje domény, které jsou rozpoznávány buněčnými receptory. Váže virus na hostitelskou buňku vazbou na její receptor. Tato interakce spouští refolding TM proteinu a předpokládá se, že aktivuje jeho fúzogenní potenciál demaskováním jeho fúzního peptidu. Transmembránový glykoprotein zprostředkovává fúzi, ke které dochází na plazmatické membráně hostitelské buňky (UniProt, 2022d). Povrchový protein stimuluje produkci protilátek a je geneticky variabilní, takže modifikace v povrchových glykoproteinech určují antigenní variabilitu různých izolátů (Gomez-Lucia et al., 2018; Olech & Kuźmak, 2020).

Transmembránový protein působí jako virový fúzní protein třídy I. Je ukotven v lipidové dvojvrstvě virového obalu a má fúzní kapacitu lipidových membrán (umožňuje fúzi mezi virovým obalem a membránou hostitelské buňky). Na SU protein je navázán nekovalentní vazbou. Podle současného modelu má protein minimálně 3 konformační stavy: nativní stav před fúzí, přechodný stav před vytvořením vlásenky a stav vlásenky po fúzi. Během fúze virové a buněčné membrány zaujmou N-terminální coiled-coil domény (heptadové repetice) motiv „trimer-of-hairpins“, která umožní umístění fúzního peptidu do těsné blízkosti C-terminální oblasti ektodomény (UniProt, 2022d). Vzhledem k tomu, že je fúzní peptid vložen do buněčné membrány a transmembránový segment je ukotven ve virové membráně, předpokládá se, že tvorba motivu trimer-of-hairpins usnadňuje apozici a následnou fúzi virových a buněčných membrán. Fúze membrán vede k distribuci nukleokapsidu do cytoplazmy (Malashkevich et al., 2001). Transmembránový glykoprotein je mnohem konzervativnější a je proto využitelný v ELISA testech (Bertoni et al., 1994; Gomez-Lucia et al., 2018; Rosati et al., 1995).

Glykoproteiny obalu lentivirů mají mnoho důležitých biologických funkcí a obsahují epitopy odpovědné jak za indukci neutralizujících protilátek, tak za interakci viru s receptorem hostitelské buňky (Pepin et al., 1998). Během sestavování viru je komplex SU/TM začleněn jako heterotrimerní hroty (peplomery) do lipidové dvojvrstvy vznikajících virionů (Checkley et al., 2011).

#### 2.2.2.4 Doplnkové regulační geny

Umístění doplnkových regulačních genů koliduje v různých čtecích rámcích s oblastmi *pol* a *env* (obr. 2). Obsahují především informace pro syntézu proteinů regulujících virovou replikaci (tab. 2). Jedná se o tyto geny:

- *vif*, jehož produkt je nezbytný k infekčnosti viru, je důležitým faktorem boje proti obranným mechanismům buňky hostitele – inhibuje inkorporaci cytidin deaminázy do virionu, a tak brání degradaci nové cDNA či záměně G za A (Franzdóttir et al., 2016; Pepin et al., 1998; Zhang et al., 2014). Gen *vif* kóduje protein 29 kDa (230 aa, amino acids), který u přirozeně infikovaných zvířat indukuje slabou imunitní odpověď (lze detekovat pomocí metody Western blot). Tento protein není homologní s cysteinovou proteázou jako celek, ale obsahuje motiv, který je homologní s cysteinovou proteázou a je translatován během pozdních stádií replikace viru. Výzkumy využívající CAEV a HIV naznačují, že *vif* hraje klíčovou roli v pozdních fázích životního cyklu viru, tj. během morfogeneze nukleoproteinového jádra viru. Gen *vif* je nezbytný pro infekčnost SRLV, přičemž protein Vif – evolučně získaný faktor virové infekčnosti chrání virový genom před uzavřenými mutagenními aktivitami. Jedním z významných vnitřních antivirových faktorů omezujících virovou replikaci v hostiteli a potenciálně blokujících mezidruhový přenos viru, je APOBEC3 (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3). Proteiny APOBEC3 jsou inkorporovány do nascentních virionů SRLV, kde je v důsledku tohoto zvýšena chybovost RT a dochází ke vzniku hypermutací vkládáním G za A do nově syntetizovaných virových genomů, což vede k ukončení replikace viru. Aby se eliminoval antivirový účinek proteinů APOBEC3, Vif tyto antivirové proteiny exprimované v buňkách produkujících virus degraduje ubiquitin-proteazomovou cestou (ubiquitin proteasome pathway; UPP) (Conticello et al., 2003; Desimmie et al., 2014; Gomez-Lucia, 2021; Knecht et al., 2021; Kosugi et al., 2021; Kristbjörnsdóttir et al., 2004; Pepin et al., 1998; Refsland et al., 2010; Refsland & Harris, 2013; Sheehy et al., 2003; UniProt, 2022e; Xu et al., 2004).

• *vpr-like (tat)* (1,7 kb mRNA – messenger RNA) kóduje protein 10 kDa (94 aa u ovcí, 87 aa u koz), který byl poprvé popsán pro svou roli při stimulaci genové exprese řízené virovým promotorem umístěným na 5' LTR. Historicky byl Tat považován za ekvivalent proteinu Tat jiných lentivirů, jelikož mu byl přisuzován trans-aktivační účinek. Zatímco Tat proteiny jsou u HIV, SIV, BIV či EIAV nezbytné pro účinnou replikaci viru a silně transaktivují své LTR po vazbě na sekvenci TAR (trans-activating response element), MVV, CAEV a FIV sekvenci TAR nemají a protein „Tat“ SRLV se později ukázal jako velmi slabý transaktivátor (Barros et al., 2005; Sargan & Bennet, 1989; Villet et al., 2003). Nedávné studie prokazující začlenění tohoto proteinu do virových částic a jeho schopnost zprostředkovat zastavení buněčného cyklu ve fázi G2/M vedly k závěru, že protein Tat by u SRLV bylo lepší považovat za protein podobný proteinu Vpr lentivirů primátů (Vpr-like) (Thormar, 2005). Protein Vpr-like indukuje zástavu buněčného cyklu při přechodu G2 na mitózu připojením adaptéru DCAF1 Cul4A (Ddb1–cullin4-associated-factor 1) ubikvitin ligázy k zatím neidentifikovanému cílovému proteinu hostitelské buňky asociovanému se zástavou G2 fáze. Zastavení buněčného cyklu vytváří příznivé prostředí pro maximalizaci exprese a produkce viru. Protein kódovaný tímto genem zprostředkovává akumulaci virové mRNA prostřednictvím vazebných míst v oblasti U3 LTRs AP-1 (activator protein-1, aktivátorový protein-1) a AP-4 (activator protein-4, aktivátorový protein-4) nebo vazbou na transkripční buněčné faktory c-Fos a c-Jun (Morse et al., 1999). Protein obsahuje doménu bohatou na leucin, jež je pravděpodobně zodpovědná za cílení proteinu na místa AP-1 ve virovém LTR. Aktivátorový protein 1 a AP-4 se podílejí na latenci (Duverger et al., 2013; Imai & Okamoto, 2006). Samotný protein ze SRLV může přispívat k virové patogenezi indukci folikulárních lymfoproliferativních poruch v různých orgánech. Působení VPR-like proteinu může být zprostředkováno stimulací buněčných genů, jako jsou geny pro cytokiny. Může však přispět k úspěšné interakci mezi virem a hostitelem „získáním“ nebo modulací buněčných faktorů podílejících se na zahájení transkripce během procesu dozrávání monocytů na makrofágy, což vede ke zvýšené expresi genů viru *in vivo*. Kromě toho může přítomnost nebo nepřítomnost sekvencí AP-1 nebo podobných AP-1 alespoň částečně vysvětlit rozdíly v tropismu mezi různými izoláty MVV, jako jsou EV1 (britský izolát) a SA-OMVV (jihoafrický izolát) oproti K1514 (islandský izolát) (Gomez-Lucia, 2021; Pepin et al., 1998). Při sledování virů CAE s odstraněným genem bylo zjištěno, že tento gen není nezbytný pro replikaci viru – delece genu vedla pouze k mírnému účinku na replikaci *in vitro* i *in vivo*. Protein Vpr-Like se také podílí se na apoptóze (Guenzel et al., 2014). Vpr-like protein je začleněn do virionu, což ukazuje na roli v raných krocích replikace viru. Dále je součástí

komplexu reverzní transkripce (reverse transcription complex; RTC) a také preintegračního komplexu (pre-integration complex; PIC) a je lokalizován v jádře (Andrésdóttir, 2018; Rea-Boutros et al., 2009; UniProt, 2022f; Villet et al., 2003).

- *rev* se podílí na regulaci virové exprese, reguluje transport, zpracování a translaci mRNA viru. Produktem genu *rev* je protein 19 kDa (167 aa) odvozený z mRNA 1,4 kb, s „coiled-coil“ doménou. Gen *rev* obsahuje čtyři exony: vedoucí segment (exon 1), nepřeložená část (exon 2) a dva translované exony 3 a 4. Rev je regulační fosfoprotein lokalizovaný v jádře a jadérku infikované buňky, exprimovaný časně v infekčním cyklu, který hraje hlavní roli v transportu nesestříhané nebo neúplně sestříhané virové pre-mRNA (pozdní transkripty) z jádra do cytoplazmy infikovaných buněk. Tyto pre-mRNA nesou rozpoznávací sekvenci zvanou Rev responzivní element (rev responsive element; RRE) umístěnou v genu *env*, který není přítomen v plně sestřížených virových mRNA (časné transkripty). Rev protein obsahuje jaderný lokalizační signál (nuclear localization signal; NLS), který umožňuje proteinu procházet jadernou membránou a vykonává svou regulační roli právě prostřednictvím RRE (který je schopen vázat RNA prostřednictvím RNA vazebného místa). Tato funkce je nezbytná, protože většina virových proteinů je překládána z nesestříhaných nebo částečně sestříhaných pre-mRNA, které nemohou opustit jádro cestou používanou plně zpracovanými buněčnými mRNA. Motiv vázající RNA se váže na RRE přítomný v neúplně sestřížených virových pre-mRNA. Tato oblast také obsahuje NLS, která zprostředkovává jadernou lokalizaci. Tyto překrývající se funkce zabraňují nežádoucímu návratu Rev vázaného na RRE do jádra. Jakmile se Rev naváže na RRE, NLS se „zamaskuje“, zatímco jaderný exportní signál (nuclear export signal; NES) zůstane přístupný (Andrésdóttir, 2018; Gomez-Lucia, 2021; Pepin et al., 1998; Vigne et al., 1987). Základní role Rev je ilustrována místně cílenou mutagenézí ve 4. exonu: ukázalo se, že Rev-mutagenizovaný virus je neinfekční (Gomez-Lucia, 2021; Pepin et al., 1998; UniProt, 2022g).

Tab. 2.: Geny SRLV a základní funkce kódovaných proteinů

ORF		produkt	funkce
<i>gag</i>	prekurzor Gag p55 štěpen na:	p16MA	matrix-stabilita virionu, spojení kapsidy s obalem
		p25CA	kapsid-hydrofobní jádro („core“)
		p14NC	nukleokapsid-obklopuje a chrání RNA
		p10PR	proteináza-proteolýza Gag/Pol a Gag k produkci strukturálních proteinů
<i>pol</i>	prekurzor Gag/Pol štěpen na:	p68RT	reverzní transkriptáza: RNA dependentní DNA polymeráza, DNA dependentní DNA pol., Rnáza H
		p14DU	dUtpáza-snižuje začlenění dUTP a tím mutaci A na G
		p35IN	integráza-integrace provirové DNA do genomu hostitele
<i>env</i>	prekurzor Env gp135 štěpen na:	gp135SU	povrchový glykoprotein-vazba viru na buněčný receptor hostitele
		gp46TM	transmembránový glykoprotein – fúzní protein
<i>vif</i>			inhibuje inkorporaci cytidindeamináz do virionu brání degradaci DNA a mutaci G na A.
<i>rev</i>			transport nesestříhané nebo neúplně sestříhané virové pre-mRNA z jádra do cytoplazmy infikovaných buněk
<i>vpr-like (tat)</i>			zastavuje buněčný cyklus v G2 fázi

### 2.2.3 Životní cyklus viru

Kompletní životní cyklus lentivirů, vstupem do buňky počínaje a uvolněním nových virových částic konče, zahrnuje sled několika na sebe navazujících fází: adsorpce na vnímavou buňku, průnik virionu do buňky (penetrace) – jako výsledek fúze virové a buněčné membrány. Následuje rozbalení virionu (ztráta kapsidy a virového obalu) a uvolnění nukleové kyseliny a komplexu reverzní transkripce, vytvoření preintegračního komplexu, replikace virového genomu, transkripce, translace, vznik nového virionu (maturace – zrání) a nakonec uvolnění nových virionů z buňky hostitele. Jednotlivé fáze jsou regulovány jak virovými, tak buněčnými proteiny (Bukrinskaya, 2007).

#### 2.2.3.1 Vstup viru

Stejně jako jiné obalené viry vstupují SRLV do hostitelské buňky prostřednictvím interakce glykosylovaného povrchového proteinu, konkrétně gp135SU s buněčným

receptorem/receptory, což umožňuje fúzi viru s membránou cílové buňky (Sánchez et al., 2002). V případě SRLV bylo zkoumáno několik kandidátních receptorových proteinů, nicméně poslední výzkumy naznačují, že dominantní roli pravděpodobně sehrává buněčný manózoový receptor CD206 (lecitinový endocytický receptor typu C, exprimovaný na makrofázích a dendritických buňkách), který rozpoznává manosylované zbytky ve virovém proteinu Env. Po navázání viru na receptor hostitelské buňky dochází ke spuštění fúzogenního potenciálu gp46TM, virová a buněčná membrána fúzí a virus vstupuje do buňky (Bruett et al., 2000; Crespo et al., 2011; Hovden & Sommerfelt, 2002; Ramírez et al., 2013).

### 2.2.3.2 Reverzní transkripce

Po fúzi virového obalu s membránou hostitelské buňky se virové jádro uvolní do cytosolu, dojde k disociaci kapsidového proteinu a degradaci jádra (Auewarakul et al., 2005; McDonald et al., 2002) a následné formaci RTC (Narayan & Young, 2004). Kompletní RTC obsahuje genomovou virovou RNA asociovanou s nukleokapsidovým proteinem, buněčný primer tRNA, enzymy RT, INT, PR, Vpr-like a p16MA (Briggs et al., 2003; Bukrinskaya, 2007; Fassati & Goff, 2001). Jakmile je RTC v cytoplazmě a virus má přístup k nukleotidům hostitelské buňky, je zahájena reverzní transkripce virového genomu (Vogt, 1997). Syntéza DNA začíná ve specifické oblasti blízko 5' konce virové RNA s použitím 5' konce virové genomové +ssRNA jako začátku templátu a tRNA<sup>Lys1,2</sup> navázané na vazebné místo pro primer (primer binding site; PBS) jako primeru (obr. 3). Výsledkem je krátký záporný řetězec DNA, který se nazývá -sssDNA (minus-strand strong-stop DNA). Obsahuje oblast R, U5 a stále ještě tRNA navázanou na PBS. Virová RNA, která sloužila jako templát, je postupně degradována aktivitou RNázy H reverzní transkriptázy, přičemž zůstává jednořetězcová DNA. Aby pokračovala syntéza záporného řetězce DNA, je -sssDNA translokována a hybridizována s komplementárními sekvencemi na 3' konci virové genomové RNA, která slouží jako templát pro pokračující syntézu a prodlužování záporného řetězce DNA (Champoux, 1994; Champoux & Schultz, 2009; K. A. Jones & Matija Peterlin, 1994). Poté RNáza H pokračuje v degradaci templátového řetězce ve směru 5'→3'. Není ale schopna degradovat polypurinový trakt (PPT) sousedící s oblastí U3 na 5' konci templátové RNA (Fu & Taylor, 1992; Gopalakrishnan et al., 1992). Segment PPT slouží jako primer pro zahájení syntézy +DNA (Charneau et al., 1992). Syntéza +DNA začíná kopírováním části tRNA, k získání krátkého řetězce +sssDNA (plus-strand strong DNA) ve směru 5', dokud nedosáhne konce oblasti R. Jakmile je syntéza tohoto segmentu DNA dokončena, 3' konec nově

syntetizované DNA hybridizuje s R oblastí 3' konce virové RNA. Tato translokace se nazývá přenos prvního vlákna. RNáza H dokončuje degradaci tRNA a sekvence PBS ve vláknu nasedají na komplementární sekvence na 3' konci –sssDNA. Aktivita RNA-dependentní DNA polymerázy pokračuje syntézou DNA a prodlužováním kladných i záporných vláken (pomocí druhého vlákna jako templátu). Za zastavení elongace je zodpovědná modifikovaná báze, která se nachází v tRNA umístěné na 5' konci záporného vlákna DNA. Molekula dvouřetězcové DNA je zformována po odstranění tRNA lokalizovaných na 5' koncích (Bushman et al., 1990). Nově syntetizovaná dvouvláknová DNA zůstává spojena s virovými proteiny za vzniku PIC. Tento komplex se skládá z lineární virové DNA, matrixového proteinu, Vpr-like, integrázy a RT (Acheampong et al., 2003; Gomez-Lucia, 2021; Grandgenett & Mumm, 1990).

V procesu, který zahrnuje duplikaci oblastí od 5' po 3' konce virového genomu, jsou generovány i LTR, ohraničující DNA genom proviru. Vif blokuje buněčnou cytidindeaminázu APOBEC3 s cílem eliminovat míru chybovosti RT (Andrésdóttir, 2018; Gomez-Lucia, 2021).

### 2.2.3.3 Integrace

Provirová DNA ve formě preintegračního komplexu prochází jadernou membránou a pomocí virového enzymu integrázy přítomného v PIC je integrována do chromozomu hostitelské buňky. Protein Vpr-like (přítomný také ve virové částici, RTC a PIC) hraje v tomto procesu důležitou roli. Řídí jadernou lokalizaci PIC a zprostředkovává zastavení buněčného cyklu ve fázi G2, aby se usnadnila integrázou zprostředkovaná integrace provirové DNA do buněčného genomu hostitele. Ačkoli se předpokládá, že integrace lentivirů je náhodná, SRLV preferují exony nebo nekódující sekvence hostitelské DNA. Integrovaný provirus může zůstat v buněčné DNA bez následné exprese měsíce nebo i roky, dokud neproniknou jadernou membránou příslušné signální molekuly. Rozpoznají specifické krátké sekvence v oblasti U3 5'LTR – vazebná místa transkripčních faktorů (responzivní elementy) (transcription factor binding sites; TFBSs) spouštějící transkripci lentivirového genomu buněčnou RNA polymerázou II (Acheampong et al., 2003).

Oblasti U3, R a U5 obsažené v LTRs na 5' a 3' konci genomu integrovaného proviru hrají důležitou roli v regulaci životního cyklu retroviru. Konkrétně 5' LTR obsahuje prvky pro regulaci transkripce a také pro syntézu RNA. V oblasti U3 se nachází transkripční regulační faktory – enhancer a promotor, zatímco v oblasti R jsou to CAP (Catabolite activator protein, známý též jako cAMP) a místo startu pro transkripci a místo polyadenylace mRNA. Mezi



promotorové elementy patří TATA Box a vazebná místa pro hostitelské AP-1 a AP-4 buněčné transkripční faktory, které jsou zodpovědné za up-regulaci transkripce prováděné buněčnou RNA polymerázou (Barros et al., 2005; Gabuzda et al., 1989; Hess et al., 1989).

Buněčná RNA polymeráza II využívající provirovou DNA jako templát k transkripci jak sestřižené subgenomické mRNA, která bude translatována na cílové polyproteiny, tak kompletní virové RNA, která bude zabalena do nově vzniknuvší virové částice. Jako první jsou exprimovány doplňkové regulační geny. Jakmile produkty těchto genů dosáhnou příslušných úrovní, Rev usnadňuje export nesestříhaných a částečně sestříhaných transkriptů do cytoplazmy vazbou RRE na virovou RNA. Povrchový (a obvykle i transmembránový) glykoprotein kódovaný *env* podléhá N-glykosylaci. Oba tyto glykoproteiny jsou vloženy do diskretních glykolipoproteinových mikrodomén (lipidové rafty) v cytoplazmatické membráně. Vnitřní proteiny viru podléhají částečné modifikaci (acylace mastnou kyselinou na N-konci MA proteinu), shromažďují se na plazmatické membráně, kde se spojují s SU a TM glykoproteiny za účelem zahájení pučení. V tomto pozdním stádiu, kdy je zahájena syntéza strukturálních a enzymatických proteinů, je syntéza regulačních transaktivátorů inhibována (Andrésdóttir, 2018; Cullen, 1992).

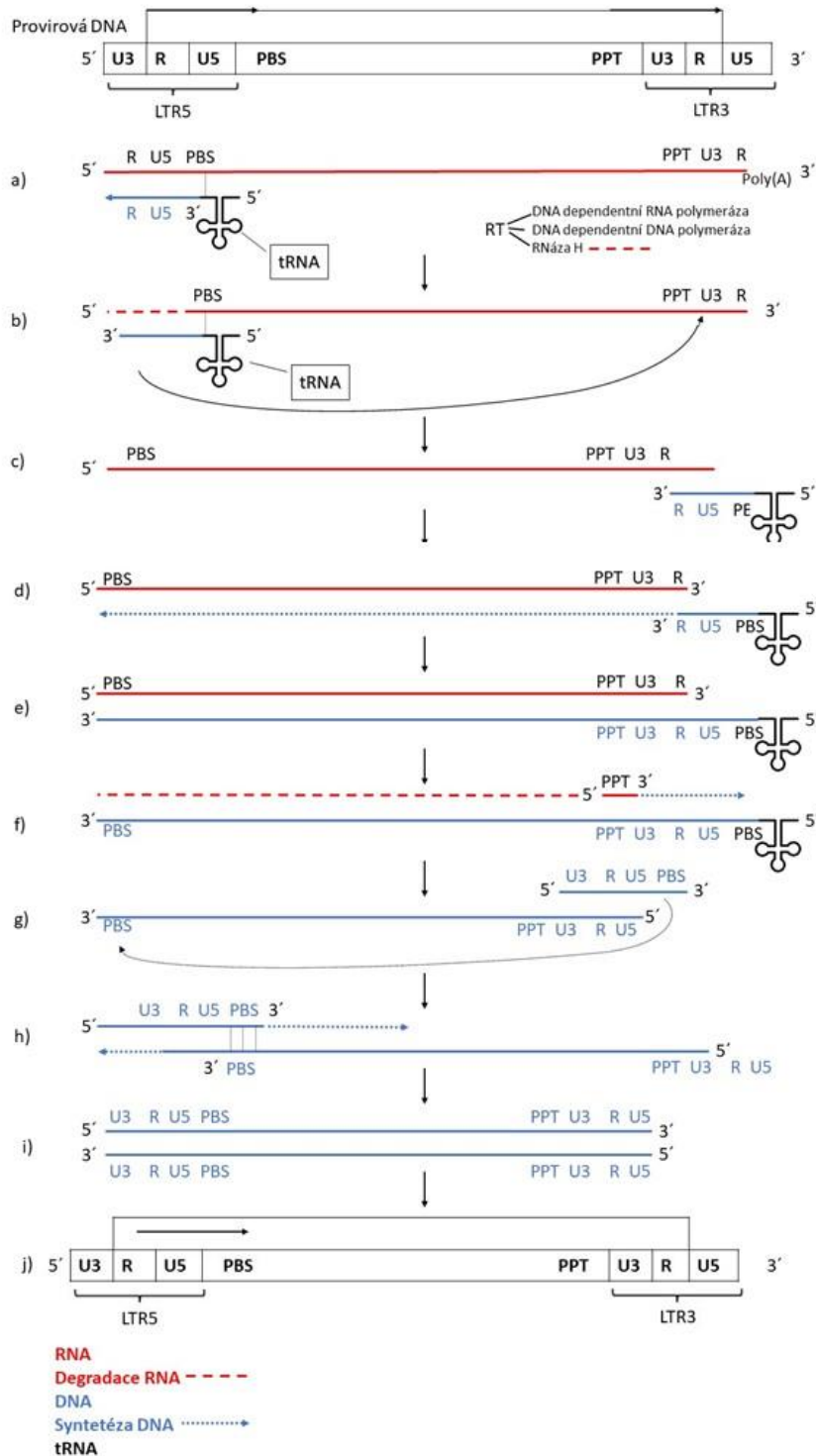
#### 2.2.3.4 Enkapsidace a sestavení virové částice

Po enkapsidaci se nezralé virové částice uvolňují ven z buňky pučením. Proteináza štěpí polyproteiny uvnitř virionů, což vede ke vzniku zralé virové částice. Prekurzory Gag a Gag-Pol jsou transportovány do plazmatické membrány, kde se tvoří kapsida. Geny *gag*, *pol* a *env* kódují strukturální a enzymatické složky používané k zahájení procesu enkapsidace (balení) a sestavení do virionů. Gag proteiny jsou translatovány z nesestříhané virové RNA délky genomu na volných polyribosomech v cytoplazmě jako polyproteinové prekurzory (Jewell & Mansky, 2000). Krátce po své syntéze je polyprotein štěpen na protein MA, NC a CA virovou PR. Po štěpení zůstává MA protein připojen k virové membráně, zatímco CA protein tvoří jádro kolem komplexu RNA/NC (Hunter, 1994). Prekurzory Gag-Pol jsou zpracovány posunem ribozomálních rámců. Kódující sekvence *gag* a *pol* jsou v různých rámcích a během translace *gag* mohou ribozomy sklouznout o jeden nukleotid zpět a pak pokračovat v translaci genu *pol*. Glykoproteiny SU a TM jsou zpočátku syntetizovány jako větší prekurzorový polyprotein (gp160, SU-TM) ze sestřižené genomové RNA. Jakmile jsou proteiny Gag, Gag-Pol a Env syntetizovány, začnou agregovat v místě na buněčné membráně specifikovaném MA proteinem se dvěma kopiemi primerů virové RNA a tRNA k zahájení

enkapsidace a sestavení virových částic. Genomová RNA lentiviru je vybrána pro enkapsidaci a sestavení prostřednictvím interakce mezi virovou sekvencí sbalovacího signálu  $\psi$  (psí sbalovací signál je zodpovědný za sbalování RNA do virového kapsidu) a NC proteinem. Tento  $\psi$  signál se nachází mezi 5' LTR a iniciačním kodonem Gag (Bjarnadottir et al., 2006). Pro sbalení viru jsou též velmi důležité zinkové prstové domény. Lentivirové genomové RNA jsou společně zabaleny jako volně spojené dimery ve virové částici v procesu označovaném jako dimerizace. Dimerizace retrovirové genomové RNA je nezbytná pro účinnou replikaci viru a je zprostředkována strukturálními interakcemi mezi identickými motivy RNA ve vedoucí sekvenci viru. *In vitro* studie domén odpovědných za tuto interakci identifikovala 20nukleotidovou sekvenci, která funguje jako iniciační místo dimerizace jádra. Předpokládá se, že tato oblast tvoří strukturu GACG tetraloop. Motiv je u obou SRLV silně konzervován, což naznačuje křížovou funkční roli (Acheampong et al., 2003; Ballandras-Colas et al., 2022; Monie et al., 2005).

#### **2.2.4 Tropismus**

Ačkoli různé studie popsaly *in vivo* infekci v buňkách z epitelu mléčné žlázy, třetího očního víčka, kostní dřeni, samčího i samičího reprodukčního traktu, centrálního nervového systému a karpálních kloubů, hlavní cílové buňky pro SRLV *in vivo* jsou monocytární/makrofágové linie. *In vitro* bylo dosaženo virové produkce v širokém spektru buněčných typů, např. buňky synoviální membrány a choroidálního plexu. Vstup viru byl také detekován v buňkách heterologního původu, jako je lidská buněčná linie 293-T (Ali Al Ahmad et al., 2012; Andrésdóttir, 2018; Crespo et al., 2011; Lyall et al., 2000; Óskarsson et al., 2007; Thormar, 2005). Vzhledem k tomu, že SRLV nemá tropismus k T-lymfocytům, jako např. HIV, nepůsobuje u malých přežvýkavců imunodeficienci (Gorrell et al., 1992; Heaton et al., 2012; Thormar, 2005).



Obr. 3: Schéma reverzní transkripce: a) virový genom – ssRNA slouží jako templát, podle kterého RT syntetizuje vlákno DNA s využitím hostitelské tRNA jako primeru (nasedá na PBS), b) syntéza krátkého úseku -sssDNA a degradace části templátové RNA, c) translokace a hybridizace -sssDNA s komplementární sekvencí (R) na 3' konci RNA, d) syntéza DNA, e) degradace RNA, kromě úseku PPT, f) PPT slouží jako primer pro syntézu +sssDNA, g) degradace PPT, translokace +sssDNA, h) sekvence PBS nasedají na komplementární sekvenci na 3' konci -sssDNA, RNA-dependentní DNA polymeráza pokračuje syntézou DNA a prodlužováním kladných i záporných vláken, i) nově syntetizovaná dvouvláknová DNA, j) DNA genom proviru s kompletními LTR (vlastní zpracování)

## 2.3 Historie onemocnění

Maedi-visna byla poprvé popsána islandským vědcem Björnem Sigurðssonem roku 1954, přičemž se jednalo o první virus z rodu *Lentivirus*, který byl izolován (Straub, 2004). Ačkoliv v mnoha zemích probíhala pravděpodobně nákaza bez povšimnutí, islandské ovce žijící po staletí v naprosté izolaci od zbytku světa, byly k nemoci velmi náchylné. Jako zdroj nákazy byli označeni berani karakulské ovce importovaní v roce 1933 z německého Halle. Epizootické studie ukazují, že mezi 20 exportovanými kusy byli 2 přenašeči bez klinických příznaků. Jeden způsobil epizootii v severní a druhý v západní části Islandu (Pálsson, 1976). Rychlému šíření infekce dopomohlo společné, dlouhé, zimní ustájení. Kvůli dlouhému preklinickému období se onemocnění nepozorovaně rozšířilo do mnoha stád a rozpoznáno bylo 6-7 let po importu.

Virus byl pojmenován v islandském jazyce podle respiračních příznaků maedi (maedi – *dispnoea*) a neurologických příznaků visna (visna-chřadnutí), jako maedi-visna virus (Sigurdsson et al., 1960; Sigurdsson & Palsson, 1958). V průběhu roku 1965 na Islandu uhynulo v důsledku tohoto onemocnění přes 100 tisíc ovcí a dalších 650 tisíc bylo poraženo v rámci razantního eradikačního programu (Brinkhof, 2009). Lentiviry u ovcí byly identifikovány po celém světě a jsou různě označovány jako maedi-visna virus (MVV), visna/maedi virus (VMV), virus progresivní pneumonie ovcí (OPPV), ovčí lentivirus (OvLV), „Zwoegerziekte“ v Holandsku, „la Bouhite“ ve Francii či „Graaff-Reinet disease“ v Jihoafrické republice (Andrésdóttir, 2018; MacLachlan & Dubovi, 2016).

U koz bylo onemocnění poprvé zaznamenáno v Indii, následovala hlášení z Německa a USA (1980) (Greenwood, 1995; Paul et al., 2021; Waseem et al., 2015). Na základě symptomů bylo onemocnění pojmenováno jako artritida a encefalitida koz. Roku 1980 byl původce identifikován jako lentivirus – virus artritidy a encefalitidy koz (CAEV). Zanedlouho poté byl jeho výskyt potvrzen ve většině evropských států (Cebra & Cebra, 2012). V roce 2004 byl tento virus poprvé detekován v Japonsku (Konishi et al., 2016), kde byla v letech 2006 až 2007 potvrzena séroprevalence tohoto onemocnění u 10 % z 857 vzorků séra. Hodnoty séroprevalence v USA, Kanadě a Evropě oscilují v rozmezí 38 až 81 %, zatímco v Anglii, Austrálii a rozvojových zemích dosahují maximálně 10 % (Cebra & Cebra, 2012). V Turecku byly v roce 2014 zjištěny protilátky u 7,14 % ze 162 angorských koz a 15,72 % ze 491 koz kašmírských (Duman et al., 2014). Současná nákazová situace ukazuje na celosvětové rozšíření onemocnění SRLV s výjimkou Islandu, Nového Zélandu a Austrálie, které jsou v současné době jedinými zeměmi bez MVV, nikoli však CAEV (Brinkhof, 2009;

Cebra & Cebra, 2012). Lentivirus koz má stejnou organizaci genomu a cílové orgány jako MVV (Karr et al., 1996; Leroux et al., 1997; Zaroni, 1998). Lentiviry ovčí a koz se běžně označují jako lentiviry malých přežvýkavců a dělí se do pěti fylogenetických skupin A-E, které se opět dělí na podskupiny. Prototyp kmenů MVV je ve skupině A1, zatímco prototyp CAEV je ve skupině B1 (Andrésdóttir, 2018; Grego et al., 2007, 2009; Shah et al., 2004a).

Vzhledem k tomu, že neexistují konkrétní právní předpisy, týkající se programů státní kontroly, mnoho zemí jako Nizozemsko, Finsko, Německo, Švýcarsko, Francie, Španělsko a Itálie zavedlo dobrovolné plány eradikace se spornou účinností. Dostupné epizootické údaje ukazují na rostoucí séroprevalenci zejména v evropských stádech, což znepokojuje zemědělce kvůli značným ekonomickým škodám v důsledku obchodních omezení, snížené produkce mléka ohrožující růst jehňat, zvýšené úmrtnosti novorozených jehňat a předčasné porážky infikovaných zvířat (Kalogianni et al., 2020). Světová organizace pro zdraví zvířat (World Organisation for Animal Health, OIE) zařadila SRLV na seznam oznamovatelných chorob suchozemských a vodních živočichů kvůli vysokému socioekonomickému dopadu na mezinárodní obchod se zvířaty a jejich produkty (Arcangeli et al., 2021; OIE, 2019).

V České republice byl výskyt SRLV poprvé popsán počátkem 90. let na základě výsledků sérologické diagnózy detekcí specifických protilátek pomocí agarového imunodifuzního testu (agar gel immunodiffusion, AGID). První izolace viru a částečná genomová charakterizace lentiviru z české ovce byla publikována v roce 1997 (Celer et al., 1997). Další šest českých ovčích lentivirových izolátů bylo charakterizováno s využitím amplifikace částečných sekvencí *gag* s využitím snPCR (seminested polymerase chain reaction). Výsledky potvrdily, že genotyp ovčího lentiviru v České republice je úzce příbuzný s prototypy kmenů maedi-visna K1514 (Island), EV1 (Skotsko) a SA-OMVV (Jižní Afrika), seskupenými do podskupiny A1 (Barták et al., 2018; Celer et al., 2000).

## 2.4 Definice, popis, onemocnění

Maedi-visna virus a virus artritidy encefalitidy koz byly dlouhou dobu považovány za druhově specifické, s MVV infikujícím ovce a CAEV infikujícím kozy, a to jak z hlediska tropismu hostitele, tak z hlediska klinických příznaků onemocnění. Později však molekulární epizootické studie ukázaly, že tyto dva viry představují spektrum variant schopných infikovat v přirozených podmínkách ovce i kozy navzájem a následně byl zdokumentován mezidruhový přenos i koinfekce (Aalberts et al., 2021; da Cruz et al., 2013; Fras et al., 2013; Michiels et

al., 2020; Minguijón et al., 2015). Proto se tyto viry souhrnně označují jako lentiviry malých přežvýkavců (Blacklaws, 2012). Vysoká rychlost virových mutací ve spojení se selektivním tlakem může formovat vývoj různých virů a změnit patogenezí i virový tropismus. Tropismus SRLV probíhá na základě interakce hostitel-virus na různých úrovních: buněčné, orgánové/tkáňové nebo hostitelské. Cílovou buňkou SRLV jsou monocyty či jejich prekurzory, infekce se však stává produktivní až po maturaci v makrofágy. Po integraci virového genomu do monocytu nebo jeho prekurzoru nedochází k okamžité transkripci ani translaci virových proteinů a imunitní systém hostitele z toho důvodu nedokáže reagovat na přítomnost viru v buňkách. Až po maturaci monocytu v makrofág (který mezitím migroval do cílových tkání a orgánů) dochází k transkripci a translaci virových proteinů a tvorbě nových virových částic, na které je imunitní systém hostitele schopen reagovat eliminací buněk produkujících virus. Vzhledem k tomu, že tyto buňky představují 10 % všech virem infikovaných buněk, zůstává v infikovaném organismu neustále dostatečně velká zásoba buněk s latentně ukrytým virem, zajišťujících jeho přežívání. Monocyt, hlavní cílová buňka SRLV, se bezprostředně po infikování *in vivo* chová jako „trojský kůň“ schopný šířit virus v těle a zároveň udržovat latentní infekci. Tento mechanismus latentní diseminace viru v organismu označujeme jako mechanismus Trojského koně (Celer, 2010).

Transkripce provirové DNA a genová exprese je potlačena, dokud infikované monocyty nedozrají na makrofágy (Minguijón et al., 2015). Jakmile jsou infikované makrofágy v cílových orgánech, iniciují virovou replikaci a transkripci virových genů, což vyvolává zánětlivou kaskádu. Navzdory intenzivní imunitní reakci nelze virus eliminovat a zvíře zůstane nosičem po celý život. Většina zvířat zůstává bez příznaků, ale u určitého procenta se klinická choroba vyvine v jednom nebo několika cílových orgánech. Subklinická infekce a progresse onemocnění se mohou pohybovat řádově od měsíců do let. Jak MV, tak CAE jsou nakonec smrtelné. Genetické faktory hostitele, virový kmen a management stáda ovlivňují výskyt, délku a spektrum postižení cílových orgánů (Larruskain & Jugo, 2013). Řádově měsíce po počáteční viremické fázi dojde k sérokonverzi (Gjerset et al., 2009). Klasické klinické příznaky, jejichž projevy souvisejí mimo jiné s virovým kmenem, se mohou projevit až roky po nakažení (Leroux et al., 2010). Lentiviry malých přežvýkavců obecně způsobují zápal plic, slabost, mastitidu, polyartritidu, encefalomyelitidu a progresivní paralýzu ovlivňující produkci a welfare zvířat (Kalogianni et al., 2020). Hlavními cílovými orgány jsou plíce, klouby, vemeno a nervový systém. K přenosu dochází jak vertikální, tak horizontální cestou (McNeilly et al., 2008). Infekce je celoživotní a jak naznačuje rodová nomenklatura (*lentus*; latinsky pomalý), lentiviry způsobují pomalé, progresivní onemocnění,

jež se během života hostitele může, nebo nemusí klinicky projevit. Onemocnění MV bylo pojmenováno pro své klinické respirační a neurologické projevy (dušnost, meningoencefalitida) a CAE byla pojmenována na základě artritických a/nebo neurologických příznaků onemocnění. U infikovaných jedinců dochází k celoživotní přetrvávající infekci v buňkách, zejména ve výše zmíněných orgánech a tkáních, stejně jako v lymfatických uzlinách a slezině (Ravazzolo et al., 2006).

#### 2.4.1 Přenos

Přestože hlavní vstupní cestou pro průnik SRLV do těla hostitele je laktogenní cesta (Blacklaws et al., 2004; Gaeta et al., 2018; Peterhans et al., 2004) a kontakt mezi zdravými a infikovanými zvířaty (Álvarez et al., 2006; McNeilly et al., 2008), virová kompartmentalizace s migrací viru z krevního oběhu do jiných orgánů, jako je děloha, může být považována za další rizikový faktor (Araújo et al., 2020).

Vertikální přenos je založen hlavně na požití infikovaného mleziva a/nebo mléka. Existuje předpoklad intrauterinního přenosu na základě výskytu provirové DNA ve tkáních dělohy, vejcovodu, vaječnicků a pupečníku. Tropismus k buňkám reprodukčních orgánů potvrdilo velké množství studií (Araújo et al., 2020; Fieni et al., 2003; Martins et al., 2017; Oguma et al., 2014; Sousa et al., 2018). K horizontálnímu přenosu dochází přímým kontaktem mezi zvířaty, především pak infekčním aerosolem z respiračních sekretů (McNeilly et al., 2008). Virus MVV byl nalezen ve spermatu, ale přenos MVV pohlavní cestou nebyl dosud prokázán (Ali Al Ahmad et al., 2012; Peterson et al., 2008).

##### 2.4.1.1 Mezdruhový přenos

De Souza et al. (2015) provedli studii s cílem zhodnotit možnost mezidruhového přenosu SRLV z koz na ovce. U všech 9 jehňat krmených kolostrem CAEV pozitivních koz, stejně jako u 9 jehňat krmených mlékem těchto koz, byla potvrzena nákaza SRLV. Z 8 ovcí ustájenými společně se dvěma CEV pozitivními kozami, došlo k prokazatelné nákaze u 6. U všech zvířat byla nákaza prokázána pomocí nPCR (nested PCR), přičemž sérologické vyšetření potvrdilo výsledky pouze u třech z těchto zvířat. Během 720 dnů pozorování nedošlo k manifestaci klinických příznaků. Sekvence viru získaná z infikovaných zvířat vykazovala vysokou shodu s prototypem CAEV-Cork. Nákaza CAEV byla potvrzena u kozorožce horského (*Capra ibex*) (Erhouma et al., 2008) a kamzíka běláka (*Oreamnos americanus*) (Patton et al., 2012). Pozitivní nález specifických protilátek proti SRLV byl

potvrzen u srnce obecného (*Capreolus capreolus*), jelena evropského (*Cervus elaphus*), kamzíka středozevního (*Rupicapra pyrenaica*) a muflona evropského (*Ovis aries musimon*) (Gentile et al., 2000; Kumar et al., 2022; López-Olvera et al., 2009; Olech et al., 2020; Sanjosé et al., 2016). Experimentálně se podařilo MVV nakazit křížence ovce domácí a muflona evropského (*Ovis aries musimon* X *Ovis* spp) (Blacklaws et al., 2004; Guiguen et al., 2000).

#### 2.4.2 Klasifikace lentivirů malých přežvýkavců

Rychlý vývoj bodových mutací (virová RT postrádá korekční schopnost) a možných rekombinací v hostitelských buňkách během koinfekce jsou zdrojem rychlé genetické variability, rozmanitosti kmenů a evoluce viru. Vysoká genetická variabilita mezi SRLV a odpovídající fylogenetické vztahy mezi sekvencemi byly popsány v mnoha studiích v různých zemích (Ramírez et al., 2013). V roce 2004b Shah et al. navrhli klasifikaci genotypů SRLV na základě sekvenční informace 2 genomových oblastí, oblasti *gag-pol* (1,8 kb) a *pol* (1,2 kb). Tento klasifikační systém pro genotypizaci a subtypizaci SRLV zahrnuje 5 genotypů (A až E), které mají 25 až 37% variabilitu v nukleotidové sekvenci (Eltahir, 2011; Gomez-Lucia et al., 2018). Genotypy A, B a E jsou dále rozděleny na nejméně 29 aktuálně uznávaných podtypů, které se liší mezi 15 % a 27 % jejich sekvence. Genotypy A a B jsou označovány jako MVV-like a CAEV-like a jsou celosvětově nejrozšířenější. Genotyp A představuje nejběžnější a nejvíce heterogenní skupinu s 24 odlišnými subtypy (A1–A24) (Bazzucchi et al., 2021; Michiels et al., 2020). Genotyp B, reprezentovaný subtypy B1–B3, zahrnuje kmeny podobné CAEV a ve srovnání s genotypem A vykazuje nižší genetickou variabilitu (Bertolotti et al., 2011). Genotypy C, D a E (subtypy E1–E2) jsou omezeny na specifické geografické oblasti. Genotyp C byl identifikován pouze u norských ovcí a koz (Gjerset et al., 2006). Genotyp D byl nalezen pouze u švýcarských a španělských ovcí (z hlediska *pol* sekvence) (Glaria et al., 2009) a genotyp E je úzce spojen s kozami v severní Itálii (kmen E1 – Roccaverano), Sardinii a regionech Umbrie (subtyp E2) (Bertolotti et al., 2013; Giammarioli et al., 2011; Grego et al., 2009; Reina et al., 2009a). Genotyp D byl původně identifikován analýzou pouze genu *pol*, ale následná další fylogenetická analýza zahrnující také oblast *gag* na stejných izolátech spíše spojuje tyto sekvence s genotypem A, což naznačuje, že genotyp D je ve skutečnosti genotyp A, který vykazuje divergenci v genu *pol* (Araújo et al., 2020; Colitti et al., 2019; Ramírez et al., 2013). Je třeba poznamenat, že subtyp B4, dříve identifikovaný Santrym et al. (2013), byl později překlasifikován jako rekombinantní kmen (L’Homme et al., 2015). Subtyp B5 byl identifikován analýzou pouze



oblasti *pol*, s ohledem na další analýzu (*gag-pol*) byl však přiřazen k subtypu B1 (Arcangeli et al., 2021; Michiels et al., 2020).

Většina z těchto genotypů a podtypů byla detekována u ovcí i koz (např. všechny B, C a D stejně jako některé podtypy genotypu A), zatímco jiné podtypy (genotypů A a E) se jeví jako druhově specifické. V těchto případech existuje však možnost, že mezidruhov<sup>á</sup> infekce ještě neproběhla či nebyla identifikována (Cirone et al., 2019; Colitti et al., 2019; Glaria et al., 2009; Highland, 2017; Kalogianni et al., 2021; Olech et al., 2012; Pérez et al., 2015; Reina et al., 2009a; Shah et al., 2004b). První izolaci viru a částečnou charakterizaci genomu českého izolátu MVV publikovali Celer et al. (Celer et al., 1997). Dalších šest izolátů českého lentiviru ovcí bylo charakterizováno z produktů snPCR amplifikace parciálních sekvencí genu *gag* (Celer et al., 2000), které potvrdily, že genotyp ovčího lentiviru v ČR úzce souvisí s prototypem kmenů maedi-visna K1514 (Island), EV1 (Skotsko) a SA-OMVV (Jižní Afrika), nedávno seskupenými do podskupiny A1. Nicméně mezi šesti analyzovanými viry a prvním izolátem MVV lze nalézt jasné fylogenetické rozdíly (Barták et al., 2018).

### 2.4.3 Příznaky onemocnění

Lentiviry malých přežvýkavců způsobují řadu ekonomicky významných multisystémových progresivních zánětlivých syndromů, které jsou charakterizovány různými kombinacemi nejčastějších syndromů: dušnost spojená s intersticiální pneumonií (maedi), chřadnutí a vzestupná paralýza (visna), artritida a mastitida. Klinicky jde o pomalu progredující onemocnění charakterizované postupnou ztrátou tělesné kondice v důsledku chronického zánětu v různých orgánech. Hostitelský tkáňový tropismus kauzativního lentiviru určuje, který ze syndromů choroby se vyskytne, ačkoli mechanismus odpovědný za tuto variabilitu ještě není plně objasněn (Blacklaws, 2009).

Imunitní odpověď generovaná proti virovým proteinům způsobuje chronický zánět, který vede k patologickým změnám pozorovaným v cílových orgánech nakažených zvířat. Hlavní změnou, ke které dochází v postižených tkáních, je infiltrace mononukleárních buněk (lymfocytů, makrofágů a plazmatických buněk), které se progresivně organizují do struktur podobných lymfoidním folikulům, až nakonec dojde k destrukci tkání a omezení funkce postiženého orgánu. Maedi-visna a CAE se vyznačují respiračními, nervovými, mastitidními a artritickými klinickými příznaky. Zdá se, že klinické postižení závisí na tropismu kmene SRLV, postiženém druhu a genetickém pozadí každého plemene nebo jedince. Ačkoli je průběh onemocnění obvykle subklinický, malé procento zvířat může vykazovat některé nebo

i všechny příznaky. Obvykle u MV převládají příznaky respirační a mastitidní, zatímco u CAE nervové a artritické (Blacklaws, 2012).

U koz infikovaných virem CAE jsou rozpoznávány dva základní syndromy: chronická progresivní artritida u dospělých koz (artritida koz) a syndrom ascendentní parézy/paralýzy u mladých (2–6měsíčních) jedinců, tzv. leukoencefalomyelitida. U jednotlivých koz se typicky vyvine pouze jeden z těchto dvou chorobných syndromů a obecně ne oba. Méně často byla infekce virem encefalitidy kozí artritidy spojena s intersticiální pneumonií a mastitidou (MacLachlan & Dubovi, 2016).

Respirační onemocnění (maedi) je nejčastější klinickou formou u ovcí. Postihuje dospělá zvířata starší 2 let (u ovcí nejčastěji 2–5 let; u koz 1–6 měsíců), a jakmile jsou příznaky zjevné, délka života zvířat nepřesáhne 1 rok (Watt et al., 1992). První fáze onemocnění je často přehlížena, nicméně nástup klinických příznaků může být uspišen horšími podmínkami v managementu stáda, či vyšší nemocností. Zpočátku velmi nenápadné příznaky vedou k pomalému zhoršování celkového zdravotního stavu nakažených zvířat. Jedním z prvních příznaků je námahová dyspnoe. Tu chovatel nejčastěji zaznamená při manipulaci se zvířaty, např. během přehánění, kdy může dojít až ke kolapsu zvířete. Dušnost je provázána extenzí krku, rozšířením nozder, dýcháním s otevřenou tlamou. Zvíře si při dýchání pomáhá nadměrným zapojením břišních svalů. Následuje klidová dušnost a častější zrychlené dýchání (Barquero et al., 2015). S progresí onemocnění se objevuje hubnutí, kachexie a postupné chřadnutí. Nemocné zvíře může či nemusí kašlat; nosní exsudát se objeví v případech sekundárních bakteriálních infekcí. Onemocnění nebývá doprovázeno horečkami. Příčinou úhynu bývá nejčastěji sekundární infekce bakterií *Pasteurella multocida*. Klinické příznaky jsou způsobeny chronickou intersticiální pneumonií, která zvětšuje tloušťku alveolárních přepážek (dochází ke zmnožení vazivové tkáně) a progresivně snižuje kapacitu výměny vzduchu postižených plic, čemuž odpovídá patologicko-anatomický nálezn (Gomez-Lucia et al., 2018).

Onemocnění mléčné žlázy je druhou významnou formou s přihlédnutím k ekonomickým ztrátám a četnosti výskytu. U některých plemen (např. španělské Rasa Aragonesa) může být častější než respirační forma (Luján et al., 1991). Obecně postihuje dospělá zvířata ve věku 3 až 5 let (ovce, vzácněji kozy), ale byla pozorována i u jednoletých zvířat (Houwens & Nauta, 1989). Objevuje se častěji v případech automatického dojení a u zvířat chovaných intenzivně (Gayo et al., 2018). Mastitida obvykle probíhá subklinicky, je indurativní, chronická, difuzní, oboustranná a nebolestivá, se zduřením lymfatických uzlin mléčné žlázy. Hlavním klinickým příznakem je nedostatečná produkce mléka, která se

obvykle projevuje zpomaleným a/nebo nedostatečným růstem jehňat. Makroskopické vlastnosti mléka (barva a konzistence) se výrazně nemění (Barquero et al., 2013). V poporodním období se mohou objevovat léze v oblasti vemene, které mohou dále fibrotizovat, což způsobuje induraci mléčné žlázy a stenózu mlékovodu. Patologie odhaluje chronickou intersticiální mastitidu (Gomez-Lucia et al., 2018).

Onemocnění kloubů je nejméně častým projevem u ovcí, ale velmi častým u koz. Artritida postihuje zvířata ve věku od 2 do 3 let. Obvykle postihuje karpální a tarzální klouby, což vede ke kulhání. V menší míře mohou být postiženy také oblast atlasu a šíjové vazivo. Proces začíná edémem a kongescí synoviální membrány a pouzdra kloubu, což způsobuje ztlustění obou struktur a zvětšení kloubů (Pérez et al., 2015; Rowe & East, 1997). Častá je difuzní fibróza pouzdra a dalších struktur, v těžkých případech může být pozorována nekróza tkáně, někdy s dystrofickou kalcifikací a chrupavčitá a/nebo kostní metaplazie (Pérez et al., 2015). Nakonec se artróza vyvine v ankylózu v důsledku kalcifikace nebo fibrózy. Bylo zjištěno, že u koz s Th-2 imunitní odpovědí (CD4+ T-lymfocyty) dochází k rozvoji artritidy, zatímco kozy se smíšenou odpovědí IgG1 a IgG2 zůstávají bez klinických příznaků, což naznačuje, že protilátky anti-SRLV IgG2 chrání před rozvojem onemocnění (Cheevers et al., 1997).

Nervová forma onemocnění se u ovcí vyskytuje velmi vzácně, a to nejčastěji u ustájených zvířat. Postihuje ovce starší 2 let (nejčastěji 2–5leté), i když u některých plemen, jako je izraelské Assaf, se může vyskytnout i u mladších zvířat. V severozápadním Španělsku bylo zaznamenáno rozsáhlé propuknutí infekce MVV dokonce i u zvířat ve věku 4–6 měsíců (Benavides et al., 2007). Nervové příznaky zahrnují slabost zadních končetin a ataxii, hypermetrii a paralýzu, což obvykle vede k ulehnutí, ačkoli zvíře zůstává ostražitě a reaguje na vnější podněty. Hlavní příčinou je encefalitida nebo encefalomyelitida (Benavides et al., 2006, 2009). Častá je chronická nehnisavá meningoencefalomyelitida, obvykle doprovázená demyelinizací. U koz je tato forma méně častá než artritická a je charakteristická leukoencefalomyelitidou u 2–6měsíčních kůzlat. Syndrom zahrnuje inkoordinaci, ataxii zadních končetin, která nakonec může postihnout i přední končetiny, a nakonec naprosté vyčerpání a paralýzu. Tyto klinické příznaky jsou přítomny po dobu 6 měsíců až jednoho roku, doprovázené, stejně jako u ostatních forem, progresivním hubnutím a v některých případech kachexií (Rowe & East, 1997). Konečná fáze patogeneze začíná s manifestací klinických příznaků. I přes vysokou úroveň infekce v některých stádech nemusí být klinické projevy příliš patrné, jelikož existuje mnoho faktorů ovlivňujících patogenezi: virový kmen,

věk, plemeno, cesta expozice, možné sekundární infekce a podmínky chovu (Gomez-Lucia et al., 2018).

## 2.5 Lentiviry malých přežvýkavců a odezva hostitele

Nedávné studie identifikovaly buněčný manózoový receptor CD206 u ovcí (Bruett et al., 2000; Crespo et al., 2011; Hovden & Sommerfelt, 2002; Ramírez et al., 2013). Nicméně u koz nebyly kandidátní buněčné receptory pro SRLV zatím identifikovány. Je tedy možné, že v případě MVV a CAEV existují různé buněčné receptory k pronikání viru do hostitelské buňky (Blacklaws, 2012; Hötzel & Cheevers, 2002). Po vstupu viru do hostitelské buňky a integraci provirové DNA do hostitelského genomu dochází k syntéze virových proteinů a genomové RNA pomocí enzymatických systémů hostitelské buňky, za vzniku nových virových částic. Hostitelský organismus bojuje s infekcí SRLV různými mechanismy na více úrovních, a tak se ne vždy podaří viru buňku infikovat. Po vstupu viru do cílové buňky zahájí hostitelský organismus pomocí procesů řízených adaptivní i vrozenou složkou imunitního systému obrannou reakci. Na této obranné reakci se kromě jiných podílejí molekuly vrozené imunity – druhově specifické antiretroviróvé faktory, např. tripartitní motiv obsahující protein 5 (tripartite motif containing protein; TRIM5), či APOBEC3. Nedostatečně produktivní infekce nemusí být tedy pouze důsledkem nedostatku funkčních receptorů, ale může být ovlivněna i buněčnými restrikčními faktory, které účinkují na různých stupních replikačního cyklu viru (Gomez-Lucia et al., 2018). Nicméně retroviry jsou schopny těmto obranným mechanismům čelit. Virus a hostitel se společně vyvíjejí podle vrozených a adaptivních imunitních tlaků, aby dosáhli převahy ve prospěch viru nebo hostitele. Je třeba poznamenat, že heterologní restrikční faktory vrozené imunity jsou často rozšířenější a silnější než homologní; toto zjištění může mít nové profylaktické a terapeutické důsledky v boji proti lentivirovým infekcím (Andrésdóttir, 2018; Minguijón et al., 2015).

TRIM5 $\alpha$  je 509 aa dlouhý protein z rodiny TRIM, kódovaný genem *TRIM5* umístěným u ovcí i koz na chromozomu 15. Izoforma  $\alpha$  tohoto proteinu funguje jako retroviróvý restrikční faktor v časně fázi retroviróvé infekce. TRIM motiv zahrnuje tři domény: doménu typu zinkového prstu schopnou vázat dva kationty zinku (really interesting new gene domain; RING domain) finger a B-box a coiled-coil doménu (s aktivitou E3 ubikvitin ligázy). Izoforma  $\alpha$  obsahuje C-koncovou doménu PRY/SPRY (též RING finger protein 88; RNF88), která rozpoznává motivy uvnitř kapsidových proteinů a degraduje je

prostřednictvím ubikvitin-proteazomové cesty, brání úspěšné reverzní transkripci, inhibují integrační a postintegrační kroky virového cyklu a pokračování životního cyklu viru. Nedávno se ukázalo, že TRIM5 $\alpha$  může omezit SRLV podobným způsobem jako jiné retroviry (Jáuregui et al., 2012; NCBI, 2022a; 2022b; UniProt, 2022h).

V posledních letech byla věnována velká pozornost systému APOBEC3/Vif, zejména v souvislosti s HIV. Proteiny A3 uplatňují svou inhibiční aktivitu deaminací cytosinu na uracil (C na U). Tímto způsobem jsou vkládány hypermutace G na A do nově syntetizovaného řetězce virové -DNA po odstranění RNA z hybridu DNA/RNA (Harris et al., 2003; Lecossier et al., 2003; Sheehy et al., 2002, 2003). Tyto mutace způsobují abnormální expresi nefunkčních virových proteinů, což vede k narušení životního cyklu viru. U ovce jsou minimálně 4 známé A3 proteiny (A3Z1, A3Z2, A3Z3 a protein s dvojitou doménou A3Z2-Z3) kódované 3 geny na 3. chromozomu (u koz na 5. chromozomu): *APOBEC3Z1*, *APOBEC3Z2* a *APOBEC3Z3* (Esparza-Baquer et al., 2015; Gomez-Lucia et al., 2018; Zhang et al., 2014). Ovčí protein A3Z2-Z3 s dvojitou doménou funguje jako restriční faktor nejen u MVV s delecí Vif, ale i u HIV-1 a viru myši leukémie (murine leukemia virus; MLV). Na rozdíl od humánních A3 proteinů (A3G a A3F, které mají C-koncovou aktivní cytosindeaminázovou doménu), ovčí A3Z2-Z3 proteiny mají aktivní N-koncovou deaminázovou doménu. Protein Vif MVV je nezbytný pro replikaci MVV v makrofázích a bylo prokázáno, že u ovcí neutralizuje proteiny A3Z2-Z3, stejně jako A3Z3. Zatímco proteiny A3 působí jako restriční faktor u široké škály retrovirů a restrikce není druhově specifická, proteiny Vif obvykle působí proti restriční aktivitě proteinů A3 druhově specificky. Ovčí A3Z2-Z3 tedy působí restričně proti HIV-1, ale Vif MVV může degradovat pouze A3Z2-Z3 u ovcí, ale ne u lidí. Nedávné studie však ukázaly, že některé interakce Vif-A3 nejsou tak druhově specifické, jak se předpokládalo. Protein Vif MVV iniciuje degradaci nejen A3Z3 u ovcí, ale také A3H člověka a makaka rhesus, stejně jako A3Z3 proteinů skotu a koček (LaRue et al., 2010). Dvojdoméno­vý protein A3Z2-Z3 má podobnou subcelulární distribuci jako A3F a A3G u lidí. Preferuje deaminaci cytosinů v sekvenčním kontextu T (T/C) C (cytosin/thymin), který funguje jako cílové místo pro mutace ve Vif-deficientních (dVif) kmenech. Protein A3Z2-Z3 je tedy pravděpodobně dominantním antiretrovirovým faktorem z A3 proteinů *in vivo* u ovcí (Jónsson et al., 2006; Jónsson & Andrésdóttir, 2013; LaRue et al., 2008; Minguijón et al., 2015). Lentivirové kofaktory Vif jsou evolučně a strukturně konzervované. Pomocí experimentální analýzy *in vitro* bylo zjištěno, že Vif CAEV degraduje APOBEC3 jak u ovcí, tak u koz. Tato zjištění naznačují, že lentivirový Vif využívá evolučně a strukturálně stabilní proteiny jako své kofaktory pro degradaci

APOBEC3. (Kane et al. (2015) identifikovali jako kofaktor Vif MVV cyklofilin A (CYPA; také známý jako peptidyl-prolyl izomeráza A). Potřeba kofaktoru CYPA byla potvrzena několika studii jak u MVV, tak u CAEV, např. u kmene Cork, 1GA, Roccaverano a K1514. Tato pozorování naznačují, že požadavek CYPA na degradaci A3 proteinů hostitele je společným znakem SRLV (Yoshikawa et al., 2016).

Dalším buněčným antivirovým systémem jsou interferony (IFN). Jedná se o glykoproteiny ze skupiny cytokinů, jejichž syntéza je vyvolána patogenními podněty. Podílejí se na antivirové odpovědi imunitního systému, přičemž svým působením na buňky v nich vyvolávají antivirový stav. U malých přežvýkavců byly identifikovány následující tři typy IFN: typ I (IFN-I), který zahrnuje IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  a několik dalších (IFN- $\omega$  a IFN- $\tau$ ), produkovaných většinou virem infikovaných buněk; typ-II (IFN-II), který zahrnuje pouze IFN- $\gamma$  a je produkován pouze určitými buňkami imunitního systému; a typu III (IFN-III), konkrétně IFN- $\lambda$ . Ke spuštění antivirové odpovědi se IFN vážou na specifické receptory na buněčné membráně a spouštějí kaskádu reakcí, jejichž výsledkem je stimulace exprese IFN-inducibilních genů, které bojují s virem různými mechanismy a důsledkem je odmítnutí virové infekce buňkou (Blaszczuk et al., 2016). Několik studií ukázalo, že oblast U3 LTR, které ohraničují genom provirové DNA SRLV, obsahuje vysoký počet míst, která vážou buněčné faktory aktivující transkripci (transcription-binding place; TBS), mezi nimi ISRE (IFN-sensitive response elements) v případě IFN-I a GAS (gamma-IFN activation site; GAS) v případě IFN-II (Gomez-Lucia et al., 2014, 2018; Murphy et al., 2012).

Pokud je virus schopen překonat antivirové mechanismy, nastává krátká fáze virémie. V této fázi dochází k přechodným imunopatologickým změnám. Tropismus SRLV *in vivo* zahrnuje monocyty, makrofágy a dendritické buňky (Blacklaws, 2012). Mohou také infikovat mikroglie, endoteliální buňky, fibroblasty a epiteliální buňky jiných tkání a tyto buňky mohou působit jako rezervoáry viru, jako např. v případě epiteliálních buněk mléčné žlázy a přispívají k přenosu mezi matkou a mláďetem během laktace (Adedeji et al., 2013; Murphy et al., 2010). Prvními cíli infekce jsou makrofágy a dendritické buňky plicní nebo střevní sliznice. Dendritické buňky migrují do lymfatických uzlin, kde je virus přenesen do makrofágů, které po opuštění lymfatické uzliny šíří infekci dál (Blacklaws, 2012). K replikaci viru dochází až ve zralých monocitech a makrofázích, což umožňuje viru po nějakou dobu unikat buněčným a humorálním imunitním reakcím. Předpokládá se, že infikované makrofágy pronikají do kostní dřeně, kde mohou ovlivnit myeloidní nebo stromální buňky, což může zaručit nepřetržitou produkci infikovaných monocytů a následně chronickou infekci po celý život zvířete (Blacklaws, 2012).

Infikované makrofágy exprimují na svém povrchu virové proteiny kódované *env* a *gag*, asociované především s hlavním histokompatibilním komplexem (Major histocompatibility complex; MHC) (Stonos et al., 2014). Ten je lokalizovaný na 20. chromozomu u ovcí a 23. u koz (Amills et al., 1998; Dukkipati et al., 2006). Geny MHC I. a II. třídy kódují receptorové glykoproteiny, které se naváží na virové proteiny. Komplex virových proteinů/MHC je rozpoznáván T lymfocyty iniciujícími imunitní odpověď a též stimuluje produkci interferonu (I a II). Hlavní histokompatibilní komplex je jedním z mála polymorfních systémů, u kterých bylo možné stanovit funkční význam pro pozorovanou genetickou variaci (Larruskain & Jugo, 2013).

Pokud jde o humorální imunitní odpověď, první protilátky se objevily 3 týdny po experimentální infekci a byly proti p25CA. O dva týdny později byly u ovcí i koz detekovány protilátky proti gp46TM, p14NC a p16MA a ve většině případů se zpožděním protilátky proti gp135SU. Protilátky syntetizované proti Env proteinům blokují vazbu těchto proteinů na buněčný receptor a mají neutralizační schopnost, nicméně neutralizační protilátky jsou produkovány pomalu a mají nízkou afinitu a jejich titry jsou nízké. Ke všemu není zcela jasná jejich funkce *in vivo* s přihlédnutím k faktu, že SRLV jsou klasifikovány jako cell-associated viry a mohou se tedy šířit kontaktem mezi buňkami a neutralizace nemusí šíření viru narušovat (Blacklaws, 2012). Ačkoliv humorální odpověď nestačí k odstranění virové infekce (která je celoživotní), některé studie ukázaly, že může omezovat šíření SRLV (Andrésdóttir et al., 2002). Buňkami zprostředkovaná imunitní reakce proti SRLV nastupuje 1–4 týdny po infekci, nicméně je relativně slabá. Infikované monocyty a makrofágy mohou aktivovat specifické cytotoxické T lymfocyty (CTL). Imunopatologické změny v cílových orgánech jsou částečně způsobeny nárůstem CD8<sup>+</sup> T lymfocytů a inverzí poměru CD4/CD8. Zdá se, že některé kostimulační molekuly, jako je B7 v případě MV a CAE selhávají, jelikož množství transkriptů B7, stejně jako T-buněčné specifické paměťové reakce jsou u infikovaných zvířat významně sníženy v kontrastu se zvýšením pozorovaným během asymptomatické fáze infekce. Důsledkem toho by mohly být anergické T buňky neschopné připojit paměťové reakce. Obecným diagnostickým problémem je, že testy detekující protilátky proti SRLV a testy detekující přítomnost provirového genomu mohou poskytovat opačné výsledky (Barquero et al., 2011; Celer et al., 2000; Kužmak et al., 2003; Larruskain & Jugo, 2013; Reina et al., 2007). Ačkoli neshody ve výsledcích diagnostických metod mohou souviset se samotnými diagnostickými testy, je pravděpodobnější, že jsou spojeny s vývojem protilátek a vylučováním proviru u zvířete. Ovce a kozy reagují na infekci odlišně, jak lze usuzovat podle přítomnosti protilátek a provirové DNA v mléce. Barquero et al. (2013) zjistili, že

u vysokého procenta ovcí s provirovou DNA detekovanou v mléce byly vzorky sérologicky negativní, zatímco u většiny zvířat se po první detekci protilátek v mléce nepodařilo potvrdit přítomnost viru průkazem provirové DNA. Toto zjištění by mohlo naznačovat, že protilátky mají neutralizační účinek. Naproti tomu výsledky PCR u koz nevykazovaly žádnou příčinnou souvislost. U většiny koz s pozitivním PCR testem nebyly detekovány protilátky během 6 měsíců experimentu. Jako všechny retrovirové infekce zůstává infekce SRLV klinicky latentní nebo po určitou dobu postupuje velmi pomalu, což závisí na virovém kmeni, a především na individuální citlivosti a faktorech spouštějících transkripci. Mezi tyto faktory lze kromě výše zmíněných zařadit i steroidní hormony a jejich účinek na expresi SRLV. Steroidy působí podobným způsobem jako IFN – procházejí buněčnými membránami jednoduchou difúzí díky své lipofilní povaze a vážou se na cytoplazmatické receptory. Komplexy hormon/receptor působí jako intracelulární transkripční faktory, které se s vysokou afinitou vážou na určité TBS nazývané hormonální responzivní elementy (HREs) přítomné v DNA. Stejně jako v případě IFN byly funkční HRE identifikovány v DNA (konkrétně LTR) SRLV. Gomez-Lucia et al. (2014) pozorovali inhibiční účinek na aktivaci viru *in vitro* – při zvyšování koncentrací hormonů a s tím související změny v expresi SRLV. Tomu odpovídají i změny v produkci a vylučování SRLV v závislosti na stádiu reprodukčního cyklu u ovcí. Např. v průběhu březosti a nejvyšších hladin progesteronu, byl pozorován maximální inhibiční účinek na aktivaci viru, který pominul po porodu a v průběhu laktace (Gomez-Lucia et al., 2014).

## 2.6 Rezistence

Příklady genetické rezistence k lentivirové infekci jsou známy v případě člověka. Téměř všichni jedinci, kteří postrádají lentivirový koreceptor CCR5 (C-C chemokine receptor type 5), nejsou, ani po významné expozici, nakaženi HIV (Heaton et al., 2013; Liu et al., 1996; Samson et al., 1996). V případě MVV výsledky studií naznačovaly, že rezistence hostitele k lentivirové infekci se může vyskytnout i u ovcí (Herrmann-Hoesing et al., 2008; Larruskain et al., 2010; White et al., 2009). Rozdíly mezi plemeny jak v séroprevalenci SRLV, tak v koncentraci proviru vedly k závěru, že genetika může hrát důležitou roli ve vnímavosti k onemocnění (Cecchi et al., 2019; Herrmann-Hoesing et al., 2008). Důkazy o rozdílné genetické schopnosti ovcí odolávat infekci SRLV vycházející nejen z individuality, ale i z plemenných rozdílů, přineslo několik nezávislých studií v různých lokalitách v průběhu



desítek let (Ayelet et al., 2001; Gates et al., 1978; Herrmann-Hoesing et al., 2008; Houwers & Nauta, 1989; Keen et al., 1997; Larruskain & Jugo, 2013; Peterhans et al., 2004; Snowden et al., 1990; Straub, 2004; White et al., 2012). Například plemeno Rambouillet má nižší pravděpodobnost infekce SRLV než jiná plemena (Cutlip et al., 1986; Herrmann-Hoesing et al., 2008; Houwers & Nauta, 1989), a naopak ovce plemene Columbia mají pravděpodobnost infekce vyšší (Cecchi et al., 2019; Herrmann-Hoesing et al., 2008). V průběhu posledních 15 let se identifikace lokusů asociovaných s odolností malých přežvýkavců vůči lentivirovým infekcím stala cílem několika studií (Arcangeli et al., 2021). Bylo identifikováno několik lokusů: CCR5 (C-C chemokinový receptor typu 5) (Wang et al., 2014; White et al., 2009), některé cytokiny (IL2/IL2R, IL4, IL8, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 1, MCP-1, GM-CSF), MHC (Larruskain et al., 2013), ZNF389 (zinc finger protein 389) (White et al., 2014) a nejvýznamnější transmembránový protein 154 (transmembrane protein 154; TMEM154) (Clawson et al., 2015; Heaton et al., 2012; Sider et al., 2013; White et al., 2012).

### 2.6.1 *TMEM154*

Tento genetický marker resistance ovcí k SRLV byl objeven díky celogenomové asociační studii (GWAS) s využitím čipu Ovine SNP50 BeadChip (Illumina Inc.; San Diego, CA USA) (Heaton et al., 2012). Gen *TMEM154* je na 17. chromozomu u ovcí i koz a jeho 7 exonů kóduje 191 aa dlouhý prekurzorový protein, přičemž výsledný zralý protein má 161 aa. Funkce transmembránového proteinu TMEM154 ani jeho role v interakci virus/hostitel není zatím objasněna. Původní (ancestrální) haplotyp má na pozici 35 glutamát (E) a je asociován se zvýšenou náchylností k infekci. Mutantní alela *TMEM154* kóduje na stejné pozici lysin (K) a je spojena se sníženou vnímavostí. V *TMEM154* byly také pozorovány dvě deleční mutace, jejichž vliv není zatím prokázán, nicméně pravděpodobně ruší funkci proteinu (Clawson et al., 2015; Heaton et al., 2013; White & Knowles, 2013).

V oblastech *TMEM154*, které kódují predikovanou signální sekvenci nebo extracelulární doménu proteinu, bylo detekováno dvanáct nesynonymních jednonukleotidových polymorfismů (single nucleotide polymorphism; SNP) na základě čehož bylo určeno 12 haplotypů, z nichž každý kóduje různé izoformy – kromě ancestrální jsou to K35E, N70I, R4A, E82Y, D33N, L14H, T25I, I74F, A13V, I102T a E31Q (tab. 3). Haplotypy 1, 2 a 3 (tab. 3) jsou nejběžnější haplotypy u ovcí a všechny tři mají asociaci s vnímavostí SRLV. Ovce s haplotypem 2 nebo 3 (oba kódují glutamát na pozici 35 v extracelulární části TMEM154) mají zvýšené riziko infekce SRLV (a to až 69krát). Naopak ovce homozygotní

pro haplotyp 1, který kóduje lysin v poloze 35, mají snížené riziko infekce (tab. 3) (Clawson et al., 2015; Heaton et al., 2013; Murphy et al., 2021; Sider et al., 2013; Yaman et al., 2019).

Tab 3.: Haplotypy *TMEM154* a jejich asociace s náchylností k infekci a podskupinami SRLV (Heaton et al., 2013)

Haplotyp	Označení	Aminokyselina na uvedené pozici												Alelický efekt – vnímavost	Asociace se SRLV
		4	13	14	25	31	33	35	44	70	74	82	102		
1	K35E	R	A	L	T	E	D	K	T	N	I	E	I	snížená	podsk. 1
2	N70I	R	A	L	T	E	D	E	T	I	I	E	I	zvýšená	podsk. 2
3	ancestrální	R	A	L	T	E	D	E	T	N	I	E	I	zvýšená	podsk. 2
4	R4A (4Δ53)	A	P <sup>a</sup>	F <sup>a</sup>	P <sup>a</sup>	R <sup>a</sup>	T <sup>a</sup>	N <sup>a</sup>	W <sup>a</sup>	NA <sup>b</sup>	NA	NA	NA	nez.	nez.
6	I25, E82Y	R	A	L	T	E	D	E	T	N	I	Y	I	nez.	nez.
9	D33N	R	A	L	T	E	N	E	T	N	I	E	I	nez.	nez.
10	L14H, K35	R	A	H	T	E	D	K	T	N	I	E	I	nez.	nez.
11	T25I	R	A	L	I	E	D	E	T	N	I	E	I	nez.	nez.
12 <sup>c</sup>	I74F	R	A	L	T	E	D	E	T	N	F	E	I	nez.	nez.
13	A13V, N33	R	V	L	T	E	N	E	T	N	I	E	I	nez.	nez.
14	I102T	R	A	L	T	E	D	E	T	N	I	E	T	nez.	nez.
15 <sup>c</sup>	E31Q, F74	R	A	L	T	Q	D	E	T	N	F	E	I	nez.	nez.

<sup>a</sup>Výsledek mutace posunu čtecího rámce na aminokyselinové pozici 4.

<sup>b</sup>Nelze použít kvůli předchozímu předčasnému stop kodonu

<sup>c</sup>Haplotyp pozorovaný pouze u divokých ovcí

podsk. – podskupina; nez. – neznámá; A – Alanin, D – kys. asparagová, E – glutamin, F – fenylalanin, H – histidin, I – isoleucin, K – lysin, L – leucin, N – asparagin, P – prolin, Q – glutamin, R – arginin, T – threonin, W – tryptofan

Na straně patogenu byly určeny dvě podskupiny SRLV asociující s alelami polymorfismu *TMEM154* E35K u ovcí. Pro potřeby této analýzy nebyl využit klasický klasifikační systém genotypů SRLV (A až E), ale na základě dostupných sekvencí *gag* a *env* byly definovány dvě fyloskupiny 1 a 2, kdy podskupina 1 byla spojena s hemizygotními a homozygotními genotypy *TMEM154* K35 a podskupina 2 s hemi- a homozygotními E35 genotypy. Bylo zjištěno, že některé, ne-li všechny fylotypy, které zahrnují podskupinu 2, patří do virového genotypu A2 a některé viry genotypu A2 pravděpodobně nejsou schopny infikovat ovce s předpokládanou genetickou bariérou proti infekci asociované s alelou K35 *TMEM154*. Fylogenetická klasifikace fylotypu 1 byla méně průkazná, přičemž zde byla nalezena podobnost *gag* sekvence u SRLV, které pocházely ze severozápadní oblasti Spojených států a zástupcům genotypu A3, který pochází ze Švýcarska. Tyto výsledky

naznačují, že SRLV se adaptovaly k infekci ovcí se specifickými genotypy *TMEM154* E35K (Arcangeli et al., 2021; Heaton et al., 2012, 2013; S. Jones et al., 2022; Ramírez et al., 2021).

### 2.6.2 *ZNF331*

U koz není problematika genetické rezistence k SRLV v současnosti probádána tak podrobně jako u ovcí. Z několika kandidátních lokusů byl s využitím čipu GoatSNP60 BeadChip (Illumina Inc.; San Diego, CA USA) identifikován jeden SNP, jako významný genetický marker rezistence koz. Jedná se o SNP v intronu genu zinkového prstu 331 (*ZNF331*) (Cecchi et al., 2019). Gen leží na 18. chromozomu (u ovcí na 14.) a kóduje 486 aa dlouhý protein obsahující 12 zinkových prstů typu Cys2His2 a jednu doménu KRAB (Krüppel-associated box). Patří do rodiny proteinů zinkových prstů typu Krüppel C2H2 (UniProt, 2022i). Předchozí studie naznačují, že u člověka *ZNF331* funguje např. jako tumor-supresorový gen pro potlačení karcinogeneze žaludku (Yu et al., 2003).

## 2.7 Diagnostické metody

K metodám, které lze použít na detekci protilátek, patří ELISA, imunodifúzní test na agarózovém gelu (AGID) nebo imunoblotting. Zatímco ELISA je citlivější než AGID a vhodnější pro screening velkých souborů vzorků, AGID a imunoblotting jsou často považovány za specifitější (Brinkhof & van Maanen, 2007). Imunoblotting je považován za časově náročný, vyžaduje specializované laboratorní vybavení, vykazuje relativně špatnou reprodukovatelnost a opakovatelnost, není vhodný pro rozsáhlé a automatizované testování a z těchto důvodů je využíván spíše sporadicky (Aalberts et al., 2021; Brinkhof & van Maanen, 2007).

Vzhledem k vyšší citlivosti a dostupnosti množství komerčních testovacích sad je k průkazu protilátek nejvíce využívána ELISA (de Andrés et al., 2005; Echeverría et al., 2020). Tyto komerční sady jsou založené na průkazu různých antigenů, včetně celého viru, rekombinantních proteinů a syntetických peptidů (Aalberts et al., 2021; de Andrés et al., 2005; Leginagoikoa et al., 2006; Nowicka et al., 2014). Testy ELISA postavené na rekombinantních či peptidových antigenech využívají např. rekombinantní proteiny kapsidy, transmembránový protein gp46<sup>TM</sup> nebo purifikovaný povrchový glykoprotein gp135<sup>SU</sup>, k dosažení nejlepších výsledků pak nejčastěji kombinaci více proteinů (Brinkhof & van Maanen, 2007). I přes vysokou sensitivitu, specifitu a významný přínos ELISA testů v dosud

zavedených kontrolních programech má tato metoda své rezervy. Nové genotypy, které rozšiřují antigenní heterogenitu, a především intermitentní protilátková odezva mohou vést k diagnostickým selháním (Cardinaux et al., 2013; Echeverría et al., 2020; Olech et al., 2012; Reina et al., 2009b).

Pomocí technik založených na PCR (real time PCR, nested PCR) lze detekovat integrovanou provirovou DNA v cirkulujících monocyttech (Acevedo Jiménez et al., 2021; de Regge & Cay, 2013; González Méndez et al., 2020; Grego et al., 2002, 2005; Leginagoikoa et al., 2006; Ramírez et al., 2021). Tyto techniky umožňují včasnou diagnostiku, genotypizaci a kvantifikaci virového genetického materiálu a nespornou výhodou je možnost detekovat infekci ještě před sérokonverzí. V současnosti jsou používány především jako konfirmační test nebo pro výzkumné účely, neboť virová genetická heterogenita a selektivní specifická spojená s nedostatkem spolehlivých univerzálních primerů, stejně jako případná nízká virová zátěž, umožňují spíše omezené použití PCR pro rutinní diagnostická vyšetření (Sanjosé et al., 2015).

Mezi nově zaváděné kolorimetrické metody patří LAMP (loop mediated isothermal amplification). Jedná se o molekulární techniku, jejíž nesporné výhody jsou v jednoduchém provedení a nenáročném a levném přístrojovém vybavení (Notomi et al., 2000). Se 4–6 primery, které pracují současně, lze výsledek amplifikace provirové DNA získat během 15–60 minut s vysokou účinností a specificitou (Balbin et al., 2014; Notomi et al., 2000). Nicméně i tato metoda má své nevýhody – křížový je návrh specifických, funkčních primerů a také kvalifikovaný odečet výsledků, kdy detekce produktů LAMP je vizualizována především prostřednictvím zákalu a změny barvy po přidání fluorescenčního barviva, což může vést k subjektivnímu hodnocení a falešně negativním a/nebo pozitivním výsledkům. Použití metody LAMP má zatím svá omezení vyžadující optimalizace především v extrakci a zpracování provirové DNA. V současnosti byla metoda LAMP použita na detekci CAEV (Balbin et al., 2014, 2017; Huang et al., 2012).

Dosud nebyl definován žádný zlatý standard diagnostiky SRLV. Výše uvedené metody mohou občas poskytovat opačné výsledky. Na základě srovnání sensitivity a specificity jednotlivých metod je doporučováno použití kombinace metody sérologické a real time PCR (Barquero et al., 2013; Echeverría et al., 2020; Ramírez et al., 2021).

### 3 Cíle práce

Cílem disertační práce je na základě genetického screeningu navrhnout program markery asistované selekce na rezistenci proti lentivirovým infekcím malých přežvýkavců (SRLV) a navrhnout systém prevence a profylaxe lentivirových infekcí malých přežvýkavců.

Dílčí cíle:

Analýza prevalence lentivirových onemocnění malých přežvýkavců v ČR

Analýza distribuce jednotlivých genotypů SRLV v populaci ovcí a koz v ČR

Analýza kandidátních markerů rezistence proti SRLV u ovcí a koz

Hypotézy:

HYPOTÉZA 1: V populaci ovcí a koz v ČR jsou zvířata séropozitivní na onemocnění maedi-visna ovcí a infekční artritida a encefalitida koz.

HYPOTÉZA 2: Lentiviry malých přežvýkavců se vyskytují v několika genotypch (A-E) a jejich zastoupení v ČR je obdobné jako v ostatních evropských státech.

HYPOTÉZA 3: Lze nalézt kandidátní selekční markery pro odolnost/vnímavost ovcí a koz k onemocnění maedi-visna.

## 4 Komentáře k publikovaným výsledkům

Výsledky disertační práce jsou publikované v následujících vědeckých a odborných periodikách a metodikách:

Barták, P., Šimek, B., Václavek, P., Čurn, V., Plodková, H., Tonka, T., Farková, B., Vernerová, K., & Vejčík, A. (2018). Genetic characterisation of small ruminant lentiviruses in sheep and goats from the Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno*, 87(1), 19–26.

Stehlíková D., Vernerová K., Čurn V., Tonka T., Farková B., Vejčík A., Barták P., & Václavek, P. (2018). Využití metody LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) pro molekulární diagnostiku lentivirů malých přežvýkavců. *Veterinářství*, 68(5), 340-345.

Tonka T., Čurn V., Šoch M., Vejčík A., Vernerová K., Farková B., Štoidl P., Barták P., Šimek B., Václavek P., & Plodková, H. (2019). Srovnání incidence lentivirových infekcí u ovcí a koz s rozdílným genotypem genu transmembránového proteinu TMEM154. *Veterinářství*, 69(5):377-380.

Metodika odběru a zpracování vzorků, serologického a molekulárního stanovení lentivirového onemocnění ovcí a koz (certifikovaná metodika).

Metodika genotypizace ovcí a koz – detekce markerů geneticky podmíněné rezistence k SRLV (certifikovaná metodika).

Systém prevence a profylaxe lentivirových infekcí malých přežvýkavců (ověřená technologie).

V následující kapitole jsou shrnuty dosažené poznatky týkající se problematiky SRLV na území ČR.

Ministerstvo zemědělství ČR stanovuje povinné preventivní a diagnostické úkony k předcházení vzniku a šíření nálezů a nemocí přenosných ze zvířat na člověka, jakož i k jejich zdolávání a určuje, na které z nich a v jakém rozsahu se poskytují příspěvky z prostředků státního rozpočtu. Tato opatření shrnuje každoročně Metodika kontroly zdraví zvířat a nařízené vakcinace, kdy MV je do monitoringu zařazena od roku 2006 do současnosti a CAE od roku 2009 do současnosti. Do monitoringu jsou zařazena pouze hospodářství v kontrole užitkovosti (KU). Hospodářství musí být prosté na základě vyhodnocení laboratorního vyšetření z předešlého roku ze strany KVS (Krajská veterinární správa) anebo se jedná o nové hospodářství zařazené do KU, respektive již ozdravené hospodářství. Pozitivní hospodářství z předešlých let může být do monitoringu zařazeno až po ozdravení a na základě rozhodnutí příslušné KVS. Vyšetření se provádí 1× ročně. Do reprezentativního počtu zvířat se zařazuje 25 % samičích zvířat (všech plemen) starších 12 měsíců nebo

v laktaci, a to nejméně 50 samičích zvířat (je-li v hospodářství méně než 50 zvířat, musí být vyšetřena všechna starší 12 měsíců, nebo která jsou v laktaci) a všichni nekastrovaní samci starší 6 měsíců, vyjma jatečných beránků/kozlíků (SVSCR, 2022). Od roku 2010 je na základě požadavku a jednání se SCHOK (Svaz chovatelů ovcí a koz) součástí šlechtitelského programu ovcí kromě jiného i ověřování parentity plemenných zvířat. Potvrzení o parentitě musí mít chovatel při obchodování s plemeníky (především nákupní trhy beranů) a zatím je požadováno pouze u ovcí. Beránci vybraní pro stanovení parentity musí být z hospodářství zařazeného do KU a prostého MV na základě vyhodnocení laboratorního vyšetření z předešlých let. V případě, že se jedná o nové hospodářství v KU, je do parentity zařazeno až po negativním sérologickém vyšetření na MV. Pozitivní hospodářství na MV může být do parentity zařazeno až po ozdravení a na základě rozhodnutí příslušné KVS. Kritérium negativního hospodářství na MV se netýká hospodářství s chovem plemene Šumavská ovce (SVSCR, 2022).

Vzhledem k podmínkám monitoringu SRLV projeví někteří chovatelé zájem o kompletní sérologický screening ve svém hospodářství a dále pak o možnost testování případných markerů geneticky podmíněné rezistence k SRLV. Celkem bylo odebráno 3 410 vzorků krve ovcí a koz, z 21 stád. Ovce byly plemene Šumavská ovce, Valašská ovce, Cigája, Lacaune, Bergschaf, Východofriška ovce a kříženci Suffolk, kozy byly plemene Hnědá krátkosrstá a Bílá krátkosrstá. Odběr periferní krve probíhal jugulární venepunkcí v souladu se Zákonem o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů č. 166/1999 Sb. Od každého zvířete bylo odebráno 3 x 10 ml nesrážlivé krve, jako antikoagulant byla použita K<sub>3</sub>EDTA (tri-draselná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové) v koncentraci 1,5 mg/ml. Antikoagulant byl okamžitě promíchán s krví opakovaným překlápěním a následně byly vždy 2 zkumavky od každého vzorku umístěny do chladících boxů a svoznou linkou odeslány k další analýze do Státního veterinárního ústavu Jihlava. Jedna zkumavka s 10 ml krve od každého vzorku byla určena pro potřeby Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, kde byly vzorky skladovány v -20 °C.

Všechny vzorky byly vyšetřeny na přítomnost specifických protilátek proti SRLV, které byly detekovány u 642 zvířat (ze 7 hospodářství), což je 33 %. Zjištěná sérologická prevalence MVV u ovcí byla 19,9 % (556 z 2 801) a prevalence CAE u koz 14,1 % (86 z 609). Provirová DNA byla pomocí PCR detekována u 410 vzorků z 631 séropozitivních zvířat (65 %). Výsledné rozdíly mezi výsledky průkazu protilátek a provirové DNA jsou v souladu s jinými studiemi, které poukazují na vyšší sensitivitu ELISA testu v porovnání s PCR (Celer et al., 2000; de Andrés et al., 2005; Extramiana et al., 2002; Muz et al., 2013).

I v rámci jednotlivých testovacích sad ELISA od různých výrobců se vyskytuje určitý rozptyl sensitivity, ovlivněný především antigenní heterogenitou a úrovní protilátkové odezvy (Aalberts et al., 2021; Brinkhof & van Maanen, 2007). Např. Michiels et al. (2018) srovnávali sensitivitu několika ELISA testovacích sad (88 až 100 %) a nejlepších výsledků dosahovali se stejnými testovacími sadami, jako v naší studii i metodice – Elitest MVV/CAEV (Hyphen BioMed; Neuville-sur-Oise, Francie) 98 % a ID screen® MVV/CAEV indirect (IDVet; Grabels, Francie) 100 % (viz Metodika odběrů a zpracování vzorků, sérologického a molekulárního stanovení původce lentivirového onemocnění ovcí a koz). Falešně pozitivní výsledky pak mohou sérologické testy poskytovat v důsledku zkřížené reaktivity protilátek s jinými viry ze stejné čeledi (Crespo et al., 2016; de Souza et al., 2015; Muz et al., 2013). Vzhledem k nízké virové zátěži v postsérokonverzní fázi infekce jsou PCR testy obecně méně citlivé než techniky ELISA, ale vykazují nepochybně vysokou specifitu a zdá se, že jsou schopné detekovat infikovaná zvířata ještě před sérokonverzí (Álvarez et al., 2006; de Andrés et al., 2005; Extramiana et al., 2002). Zajímavé informace pak lze najít ve studiích zaměřených na konfirmaci metod ELISA a PCR, kdy všechny vzorky jsou analyzovány pomocí obou metod a stupeň diagnostické shody obou metod může být velmi nízký (19 %) (Álvarez et al., 2006). Někdy dokonce obě metody poskytnou zcela opačné výsledky, kdy u sérologicky pozitivních vzorků nedojde k detekci provirové DNA, a naopak u vzorků s prokázanou DNA proviru nedojde i při opakovaném vyšetření k sérokonverzi (Álvarez et al., 2006; Echeverría et al., 2020; Extramiana et al., 2002). Leginagoikoa et al. (2006) zkoumali horizontální přenos MV u ovcí vystavených vysokému infekčnímu tlaku a zároveň míru shody ELISA a PCR ve stejném stádě. V průběhu 3letého experimentu 109 (ze 191) ovcí nebylo nikdy ELISA nebo PCR pozitivních, 78 bylo alespoň jednou ELISA a PCR pozitivních, 3 byly ELISA negativní a PCR pozitivní a 1 byla ELISA pozitivní a PCR negativní. Procento shody kumulativních výsledků ELISA a PCR tedy bylo 98 % a celkový stupeň shody  $k = 95,7 (\pm 0,07)$ , což je považováno za téměř dokonalé (Dohoo et al., 2009). Procento a míra shody mezi ELISA a PCR se však lišily podle věku zvířat. Procentuální shoda byla po celou dobu > 88 % a míra shody (Cohenovo kappa) se s věkem zvyšovala z  $\kappa = 0,63$  (podstatná) v roce od jednoho roku ke  $\kappa = 0,94$  (téměř dokonalá) u čtyřletých. V naší studii byly pomocí PCR vyšetřeny pouze séropozitivní vzorky (631 z 642) a nelze tedy objektivně porovnat sensitivitu a specifitu obou použitých metod.

S pokrokem technik molekulární biologie bylo vyvinuto množství PCR protokolů, jelikož kvůli nestabilitě genomu SRLV je obtížné používat stejné primery v různých geografických oblastech. Některé protokoly jsou založeny na amplifikaci vysoce



konzervovaných retrovirových sekvencí LTR (Álvarez et al., 2006; Extramiana et al., 2002; Leginagoikoa et al., 2006), zatímco jiné využívají k amplifikaci specifické geny SRLV, jako jsou oblast *pol*, *gag* či *env* (Echeverría et al., 2020; Grego et al., 2002; Leroux et al., 1997; Michiels et al., 2018). V naší studii byl použit protokol nested PCR s amplifikací úseku *gag* ke confirmaci výsledků sérologie a k determinaci virových genotypů (Barták et al., 2018; Grego et al., 2002).

Předchozí studie využila snPCR protokolu k sekvenační analýze konzervované oblasti *gag* MVV s cílem získat přehled o fylogenetické distribuci MVV na území České republiky. V souladu s použitými metodikami byly výsledky sekvenační analýzy přiřazeny sekvencím izolátů K1514 (Braun et al., 1987), EV1 (Sargan et al., 1991) a SA-OMV (Querat et al., 1990) bez určení genotypů dle v současnosti používaného klasifikačního systému (Celer et al., 2000). V naší studii bylo náhodně vybráno 77 vzorků a u všech byl identifikován genotyp, z toho 60 genotypů A u ovcí i koz a 17 genotypů B u ovcí. Zatímco všechny sekvence genotypu B se jasně shlukovaly v podtypu B2, skupina izolátů genotypu A vykazovala vyšší variabilitu a příbuznost se subtypy A2 a A3. Nicméně k přesné identifikaci jednotlivých subtypů by byla nezbytná podrobnější sekvenační analýza s využitím delších úseků *gag-pol*, *env* či *rev*. Geografická distribuce subtypu A2 je doložena v Kanadě (Fras et al., 2013), Finsku (Laamanen et al., 2007), Polsku (Olech & Kuźmak, 2021), Švýcarsku (Schaer et al., 2022), Turecku (Muz et al., 2013) a USA (Dickey et al., 2021), A3 ve Španělsku (Ramírez et al., 2013), Švýcarsku (Cardinaux et al., 2013) a Turecku (Muz et al., 2013) a B2 ve Francii (Rachid et al., 2013), Itálii (Bazzucchi et al., 2021), Polsku (Olech et al., 2018), Slovinsku (Kuhar et al., 2013), Švýcarsku (Cardinaux et al., 2013) a Španělsku (Glaría et al., 2009). Subtypy A2, A3 i B2 byly prokázány jak u ovcí, tak u koz (Fras et al., 2013; Ramírez et al., 2013), zatímco v naší studii skupina izolátů vykazující příbuznost se subtypem B2 pocházela ze vzorků ovcí. Otázkou zůstává, zda by výsledek byl stejný, pokud by byly osekvenovány všechny sérologicky pozitivní vzorky koz s prokázanou provirovou DNA.

I přes rychlý vývoj diagnostických metod a dostupnost vysoce spolehlivých testovacích sad ELISA, ale i PCR testů, zůstává problematika přesné diagnostiky SRLV stále nedořešena (Echeverría et al., 2020). Obecné doporučení použít kombinaci minimálně dvou metod rapidně zvyšuje náklady eradikačních programů, přičemž ani tak není zaručen 100% výsledek. A naopak, snaha snížit náklady na diagnostiku použitím pouze jednoho diagnostického testu (nejčastěji ELISA) vede k přetrvávání neodhalených přenašečů onemocnění, a snižuje se tak účinnost eradikačních programů. Proto je vývoj přesné, finančně nenáročné diagnostické metody stále vysoce aktuální.

Jednu z možností rychlé diagnostiky virových onemocnění nabízí i metoda LAMP. Jedná se o snadnou, rychlou metodu nenáročnou na provedení, jejíž použití nevyžaduje nákladné přístrojové vybavení, je možné v tzv. polních podmínkách a s použitím ověřené metodiky poskytuje vyšší sensitivitu v porovnání s PCR. Přístroj na tuto metodu je malý, snadno přenosný a na rozdíl od PCR termocyklérů probíhá reakce za izotermických podmínek. Jednoduché ovládání nabízí např. aplikace dostupná pro smartphone, což bylo úspěšně ověřeno v diagnostice SARS-CoV-2 u lidí (Heithoff et al., 2022). Ze séropozitivních vzorků s prokázanou provirovou DNA jsme náhodně vybrali 40 vzorků (8 koz ze 2 stád a 32 ovcí z 8 stád) a 50 vzorků negativních. Séronegativita byla jednoznačně potvrzena metodou LAMP u všech vzorků. Z vybraných SRLV pozitivních vzorků byla pozitivita pomocí LAMP potvrzena u 31 ze 40 vzorků, a to u ovcí i koz. Dle dostupné literatury byla metoda LAMP dosud použita pouze v případě CAE (Enache et al., 2019). Předpoklad vyšší rozpoznávací schopnosti oproti PCR nebyl naplněn, pro což se nabízí několik vysvětlení. Část projektu, zabývající se metodou LAMP, lze považovat za pilotní studii, byla tedy provedena v malém měřítku za účelem ověření proveditelnosti. Nebyly navrženy a ověřeny jiné sady primerů, nebyla provedena opakovaná analýza s použitím nově izolované DNA s ověřenou koncentrací a čistotou a nebyly využity další metody izolace DNA. A právě kvalita a přístupnost DNA je v případě LAMP křížovým aspektem. Tato metoda je úspěšně využívána v diagnostice významných nálezů hospodářských zvířat. Je třeba dalších výzkumů a optimalizací, a především pak zvýšení „přístupnosti“ provirové DNA, aby LAMP byla využitelná i pro screening SRLV (Mansour et al., 2015).

Selekce na základě genetické rezistence k onemocnění byla úspěšně využita nejen v ČR, ale i v mnoha zahraničních eradikačních programech. Typickým příkladem úspěšného ozdravení chovů, založeném na genetické rezistenci k onemocnění, jsou programy na utlumení scrapie ovcí a koz. Např. v Holandsku se vlivem zavedení šlechtitelského programu na utlumení scrapie výrazně snížila prevalence onemocnění, zvýšil podíl geneticky odolných jedinců, přičemž se podařilo prokázat, že účinek šlechtitelského programu na utlumení onemocnění byl vyšší než účinek dalších opatření, jako je utrácení postižených chovů (Hagenaars et al., 2010). Cílem naší studie bylo zjistit distribuci genotypů *TMEM154* v ČR, porovnat je se sérologickým statusem a vyvrátit či potvrdit případnou zvýšenou vnímavost či odolnost k infekci SRLV. Teplotní profil, složení reakce a primery pro PCR byly navrženy a optimalizovány na našem pracovišti. Z vybraných 605 vzorků ovcí a 60 vzorků koz došlo u všech k úspěšné amplifikaci PCR produktu o předpokládané délce. V místě předpokládaného SNP G/A nebylo nalezeno místo restrikce pro žádnou dostupnou restrikční

endonukleázu a po zvážení přínosů jiných metod (kompetitive allele specific PCR; KASP) bylo pro konečnou analýzu zvoleno sekvenování. Naše výsledky (tab. 4) potvrdily předpoklad rizikové alely, kdy nejvíce séropozitivních zvířat bylo heterozygotních EK (61 %) a nejméně homozygotních KK – rezistentní haplotyp 1. Podařilo se prokázat významnou závislost mezi sérologickým statusem a genotypem. Dále bylo potvrzeno (tab. 5), že sérologický status se liší dle typu alely (přítomnost alely E zvyšuje šanci séropozitivoty 1,6krát oproti alele K). U ovcí byly identifikovány všechny tři genotypy, zatímco všechny kozy byly homozygotní s rizikovou alelou (genotyp EE).

Tab: 4: Kontingenční tabulka: distribuce genotypů *TMEM154* E35K ve vztahu k sérologickému statusu

Situace	Genotyp			Celkem	
	KK	EE	EK		
Sérologicky pozitivní	n	107	54	167	328
	% ze sloupců	45 %	58 %	61 %	54 %
Sérologicky negativní	n	129	39	109	277
	% ze sloupců	55 %	42 %	39 %	46 %
Celkem	n	236	93	276	605
	% ze sloupců	100 %	100 %	100 %	100 %

Zdroj: vlastní zpracování v programu Jamovi (Jamovi project; 2021)

Tab. 5: Výpočet poměru šancí a relativního rizika séropozitivit alely E oproti alele K

	Hodnota	95% Interval spolehlivosti	
		Dolní hranice	Horní hranice
Poměr šancí (OR)	1,67	1,03	2,71
Relativní riziko (RR)	1,28	1,03	1,60

Zdroj: vlastní zpracování v programu Jamovi (Jamovi project; 2021)

Ačkoliv možná rezistence/vnímavost v závislosti na genotypu *TMEM154* E35K u ovcí byla jednoznačně prokázána (tab. 5), rozdíl nebyl tak výrazný, jak prezentuje např. Heaton et al. (2013), kdy prokázali 2,8krát vyšší riziko SRLV positivity při výskytu aspoň jedné alely E. Příčina může být v neprokázané séropozitivitě. Vzorokly použité ve studii Heaton et al. (2013) pocházely od ovcí starších 4 let a zároveň vystavených významné expozici infekčnímu agens v rámci jednoho stáda. Lze tedy předpokládat, že případná vnímavost či rezistence k onemocnění měla v těchto podmínkách větší šanci se projevit než v podmínkách extenzivních chovů, kdy neodchází k tak úzkému kontaktu mezi zvířaty. Sérologická odezva

byla již tedy na úrovni dostatečné pro spolehlivou diagnostiku. Kritériem pro zvířata vybraná pro naši studii byla věková kategorie minimálně 4 měsíce po odstavu, což zahrnovalo i jedince relativně mladé, u kterých, vzhledem ke krátké době infekce, nemuselo dojít k požadované sérologické odezvě. Sérologicky tak mohla být tato zvířata považována za negativní, ačkoliv tomu tak ve skutečnosti nemuselo být. Na základě našich zjištění lze doporučit zařazení polymorfismu *TMEM154* do šlechtitelských programů ovcí.

### Genetic characterisation of small ruminant lentiviruses in sheep and goats from the Czech Republic

Pavel Barták<sup>1</sup>, Bronislav Šimek<sup>1</sup>, Petr Václavěk<sup>1</sup>, Vladislav Čurný<sup>2</sup>, Hana Plodková<sup>1</sup>, Tomáš Tonka<sup>2</sup>, Barbora Farková<sup>2</sup>, Kateřina Vernerová<sup>2</sup>, Antonín Vejčík<sup>2</sup>

<sup>1</sup>State Veterinary Institute Jihlava, Jihlava, Czech Republic

<sup>2</sup>University of South Bohemia, Faculty of Agriculture, Biotechnological Centre, České Budějovice, Czech Republic

Received December 18, 2017

Accepted April 3, 2018

#### Abstract

The aim of this study was to determine the prevalence of small ruminant lentivirus (SRLV) infections on sheep and goat farms which are exempt from state monitoring and carry molecular characterisation of strains circulating amongst these farms without SRLV eradication. A total number of 3,410 blood samples of sheep and goats from 21 herds were collected for the purpose of the project. The detected serological prevalence of maedi visna in sheep was 19.9% (556/2801) and the seroprevalence of caprine arthritis and encephalitis in goats was 14.1% (86/609). All positive animals were tested by the nested polymerase chain reaction (nPCR) method for the presence of provirus in the buffy-coats from EDTA-blood samples. Phylogenetic analysis of 93 SRLV strains identified the genotype in 77 sequences, where 60 of them were genotype A and 17 belonged to genotype B. Whereas all of the genotype B sequences were classified in subtype B2, the genotype A group of isolates showed higher variability and were related to subgenotypes A2 and A3. This study represents the first report of genetic characterisation of SRLV strains circulating in the territory of the Czech Republic.

*Maedi visna, caprine arthritis, nested PCR, ELISA*

Small ruminant lentiviruses (SRLVs) are widespread in most regions of the world and infections are associated with economic losses in small-ruminant production. The members of this SRLV group in the *Retroviridae* family, maedi-visna virus (MVV) and caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV), infect sheep and goats (L'Homme et al. 2011). Small ruminant lentiviruses cause persistent infections which can induce systemic diseases affecting joints, mammary glands and respiratory and central nervous systems after long incubation periods (Narayan et al. 1983). Lentiviruses have in common their typical genomic organisation, the induction of slowly progressive diseases, a large spectrum of targeted organs and symptoms, and the ability to persist within their hosts despite a strong immunological response. Ingestion of infected colostrum and milk is the major transmission mode of SRLV within flocks (Blacklaws et al. 2004) but, at least in sheep, horizontal transmission may also play a prominent role (Narayan and Clements 1989). Common clinical signs caused by SRLV infections include neurological disorders, dyspnoea, emaciation, mastitis, and arthritis (Alvarez et al. 2006).

The genomic organisation of SRLVs is typical of lentiviruses: the proviral genome consists of two identical positive-sense single-stranded ribonucleic acid (RNA) subunits (8.4–9.2 kb) (Gifford 2012). The SRLV genome contains the structural genes *gag*, *pol* and *env*, in addition to the regulatory genes *rev*, *vif*, and *tat*. The *gag* and *pol* genes are relatively well conserved among SRLVs, which makes them ideal targets for Polymerase Chain Reaction (PCR) primer design (Pepin et al. 1998; Grego et al. 2007). The MVV prototypical strains such as strain K1514, EV-1, and SA-OMVV from sheep and the CAEV

---

#### Address for correspondence:

Pavel Barták  
State Veterinary Institute Jihlava  
Rantířovská 93/20, 58605 Jihlava, Czech Republic

Phone: +420 567 143 232  
E-mail: bartak@svujihlava.cz  
<http://actavet.vfi.cz/>

strain Cork-CAEV isolated from goat (L'Homme et al. 2011) were originally viewed as distinct viral species restricted to respective host animal species. As more SRLV sequences had become available for phylogenetic analyses, it became evident that SRLVs can cross the species barrier and can be transmitted from sheep to goats under favourable conditions (Shah et al. 2004b; Pisoni et al. 2005).

The classification of viral genotypes into groups and subtypes proposed in the last decade by Shah et al. (2004a) involving two long segments of the SRLV genome (gag-pol segment 1.8 kb; and pol segment 1.2 kb) is widely accepted at present. Accordingly, SRLV are classified into five genotype groups (A–E) which can vary between 25% and 37% in their nucleotide sequences. However, genotypes A, B and E may further be distributed into different subtypes, varying between 15% and 27% of their sequence. Group A has so far 15 recognised subtypes (A1–A15); group B has three subtypes (B1–B3); and group E has only two subtypes (E1 and E2). Genotype D has only been described in Swiss and Spanish sheep, and only regarding pol sequences. Rather, phylogenetic analysis on additional (*gag*) sequences of the same (group D) isolates, classify these sequences with genotype A, suggesting that genotype D is in fact genotype A, exhibiting divergence in the pol gene (Ramírez et al. 2013). The occurrence of genotype E is described in local goat populations in the northwestern region of Italy and the island of Sardinia (Grego 2007; Reina 2010). The high genetic variability amongst SRLV and the corresponding phylogenetic relationships amongst sequences has been described in numerous studies in different countries (Ramírez et al. 2013). Although SRLV infection in small ruminants is widespread on all continents, little information is available on the genetic variants circulating in different geographic regions. Besides SRLV complete genomes available in the GenBank, partial sequences have been published in Brazil, Canada, Finland, France, Greece, Ireland, Japan, Netherlands, Poland, Russia, Slovenia, South Korea, Turkey (reviewed by Ramírez et al. 2013), Switzerland (Shah et al. 2004a), Italy (Grego et al. 2002), and Norway (Gjerset et al. 2007).

In the Czech Republic MVV/CAEV was firstly described in the early 1990s based on the serological diagnosis by detection of specific antibodies using commercial agar gel immunodiffusion test (AGID). First virus isolation and partial genome characterisation of the Czech ovine lentivirus isolate OPM was published by Celer et al. in 1997. Further six Czech ovine lentivirus isolates were characterised from snPCR products of amplification of partial gag gene sequences (Celer et al. 2000), which confirmed the ovine lentivirus genotype in the Czech Republic is closely related to the prototype Maedi-Visna strains K1514 (Iceland), EV1 (Scotland) and SA-OMVV (South Africa), recently grouped to the A1 subgroup. Nevertheless, clear phylogenetic differences can be found between the six viruses analysed and the first OPM isolate.

We tested a large number of sheep and goats throughout the Czech Republic within the framework of our research project aimed to control the lentiviral infections in small ruminants with the use of early detection methods of SRLVs. All samples were tested for the presence of SRLV serum antibodies using different ELISA tests (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Selected samples from SRLV positive farms were further tested by PCR to amplify proviral sequences of sufficient length suitable for the genetic typing of SRLVs circulating in the country. The final goal of the project is also the genetic selection on the basis of markers of genetic resistance to infection (TMEM154 gene).

#### Materials and Methods

##### Animals and blood sampling

Animals at least 4 months after weaning, originating from 21 farms from 7 different regions of the Czech Republic (Karlovy Vary, Liberec, Olomouc, Pardubice, Pilsen, South Bohemian and South Moravian Region) were used for the study. A total of 3,410 blood samples of sheep and goats were collected for the purpose of the project,

of which 2,801 were ovine samples from 16 herds and 609 caprine samples from 7 herds. Two farms were mixed flock with sheep and goats. Whole blood from sheep and goats at a volume of 5 ml was drawn by venipuncture and collected into tubes with ethylenediaminetetraacetic acid (K<sub>3</sub>EDTA).

#### ELISA tests

All samples were tested for SRLV antibodies by commercially available ELISA test (IDEXX MVV/CAEV p28 Ab Screening Test) and the findings were confirmed by additional ELISA assays IDEXX MVV/CAEV p28 Ab Verification Test (IDEXX, USA), IDEXX CAEV/MVV Total Ab Test (IDEXX, USA), Elitest MVV/CAEV (HYPHEN BioMed, France), ID Screen® MVV/CAEV Indirect (IDvet, France) and one agar gel immunodiffusion test AGID MAEDITEC (APHA Scientific, UK). Eradikit SRLV ELISA test (IN3 Diagnostics, Italy) based on a mix of gag and env peptides belonging to the genotypes A and B was used for serological genotyping.

#### Buffy-coat preparation and white blood cell isolation

White blood cells (WBC) were isolated from K3EDTA whole blood by centrifugation at  $400 \times g$  for 20 min at room temperature (RT). After careful removal of plasma for serological testing, buffy coat layer was transferred by pipetting to clean 1.5 ml tubes. Second centrifugation at  $400 \times g$  for 20 min was used for the residual plasma removal. Final cleaning of buffy coat was performed using the lysis solution (NH<sub>4</sub>Cl, NaHCO<sub>3</sub>, EDTA, final pH 7.3). Samples were centrifuged at  $1,000 \times g$  for 5 min at RT and the supernatant was discarded. The obtained pellet was stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

#### Deoxyribonucleic acid extraction

Deoxyribonucleic acid (DNA) from WBC was extracted using a MagNA Pure LC Total NA Isolation kit on MagNA Pure robotic system (Roche). Prelysis step was performed using lysis solution (GuSCN, Tris-HCl (pH 6.4), EDTA (pH 8.0), Triton X-100) in the volume of 300  $\mu\text{l}$  and (50 mg/ $\mu\text{l}$ ) in the volume of 3  $\mu\text{l}$  in a thermomixer ( $56^\circ\text{C}$  for 90 min). The Proteinase K enzyme was subsequently deactivated at  $96^\circ\text{C}$  for 20 min.

#### Polymerase chain reaction

Two-pair primers (Table 1) corresponding to the most highly conserved sequences in the gag gene from the targeted SRLV genomes were used for nested PCR (Grego et al. 2007). The primers GAG F1 and POL R1 were used for the first PCR step, where the consequent length of the amplification product was 0.8 kb. The second set of primers GAG F2 and POL R2 was used for nested PCR step carried out in a 25  $\mu\text{l}$  reaction volume. The extracted DNA was amplified in a reaction mixture of the total volume of 25  $\mu\text{l}$  with the following composition: primers (0.3  $\mu\text{M}$  for each), Deoxynucleotide (dNTPs) Solution Mix (0.12 mM), 1  $\times$  PCR buffer complete with MgCl<sub>2</sub> (0.12 mM), Fast Start Taq Polymerase (1 Unit). The temperature profile started with an initial denaturation step ( $95^\circ\text{C}$  for 10 min), followed by 35 cycles with denaturing ( $95^\circ\text{C}$  for 1 min), annealing ( $55^\circ\text{C}$  for 30 s) and elongation ( $72^\circ\text{C}$  for 1 min). Nested PCR was carried out under similar conditions as the first PCR, where 2  $\mu\text{l}$  of the first PCR product were transferred into the reaction mix. The temperature profile was the same as in the first PCR, except for the annealing step ( $60^\circ\text{C}$  for 30 s).

Table 1. Specific primers for the gag gene region designed according to Grego et al. (2007).

Primer	Sequence 5'-3'	Length of PCR product	Length of nPCR product
GAG F1	TGGTGARKCTAGMTAGAGACATGG	1.3 kb	
POL R1	CATAGGRGGHGC GGACGGCASCA		
GAG F2	CAAACWGTRGCAATGCAGCATGG		0.8 kb
POL R2	GCGGACGGCASCACACG		

PCR: polymerase chain reaction; nPCR: nested polymerase chain reaction; kb: kilobyte

#### Sequencing

The specificity of the resulting PCR products can be verified using the sequence analysis and by comparing the obtained sequences with referential sequences available in the GenBank at the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Polymerase chain reaction products with specific length were cut out from agarose gel and purified on columns (High Pure PCR Product Purification Kit [Roche, Germany] and Expin combo GP [GeneAll Biotechnology, Korea]). Purified DNA was sequenced by Sanger method with reamplification primers using dye terminator chemistry. The output sequence data were processed in the BioEdit software (Tom Hall,



Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA) and modified sequences were compared with sequences in the NCBI database via the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) algorithm. Based on this comparison, supposed incorporation was estimated of detected proviral sequences to the SRLV genotype groups and their subtypes.

#### Phylogenetic analysis

Obtained nucleotide sequences were analyzed, adjusted and preliminarily compared by Bio Edit software (Hall 1999). Multiple alignment of analysed sequences together with reference SRLV sequences was accomplished with Clustal W in MEGA 7 (Kumar et al. 2016). Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were performed using the Neighbour Joining method and the Tamura-Nei model with gamma substitution in MEGA 7 (Nei and Kumar 2000) and all gaps and missing data were ignored. The statistical confidence of the topologies was assessed using 1000 bootstrap replicates.

Table 2. Results of serological testing, PCR and genetic typing on Czech farms.

Farm	Sample code	Species	Nr. of animals	ELISA		PCR positive	Genotype	
				Ab+	Ab-		gag gene	genotype ELISA
A	Po	sheep	243	211	32	29	A2/A3	NDet
A	Pk	goat	431	389	42	18	A2/A3	A
B	Br	sheep	150	126	24	11	A2/A3	A
C	Sch	sheep	230	210	20	14	A2/A3	A,B
D	M	sheep	200	103	97	70	A2/A3	A
E	Ab	sheep	300	91	209	139	B2, A2/A3	B
F	Sl	sheep	113	74	39	23	A2/A3	NDet
G	Zo	sheep	59	45	14	14	A2/A3	A
G	Zk	goat	274	120	154	92	A2/A3	A
total			2000	1369	631	410		

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; PCR: polymerase chain reaction

## Results

A total number of 3,410 blood samples of sheep and goats from 21 herds were tested for presence of specific antibodies against MVV/CAE. Specific SRLV antibodies were detected in 642 animals on 7 farms out of 21 (33%). The detected serological prevalence of MVV in sheep was 19.9% (556/2801) and the prevalence of CAE in goats was 14.1% (86/609). The proviral DNA was detected by PCR in 410 samples (65%) out of 631 seropositive animals. A total of 287 suitable reamplification products were sequenced amongst the 410 PCR positive animals from 7 farms (Table 2). The length of the analysed sequences for the phylogenetic tree was adjusted to about 750 bp (1002–1752 according to the location of the complete genome sequence of the reference strain M60609.1-Icelandic strain K1514).

Small ruminant lentivirus sequences were compared to reference strains from genotype groups A, B, C and E. Due to the high number of positive samples within infected farms, a total of 77 samples representative of each flock were randomly selected for further phylogenetic analysis. Amongst the 77 gag gene sequences, genotype A was identified in 60 of them, and 17 belonged to genotype B. A total of 40 representative sequences (5–8 for each farm) are presented in the phylogenetic tree (35 of them belonging to genotype A and 5 of them to genotype B) (Fig. 1). Whereas all the genotype B sequences clustered clearly in subtype B2, the genotype A group of isolates showed higher variability and were related to subgenotypes A2 and A3. Detailed comparison of partial nucleotide sequences from Farm E with reference strains A1, A2, and A3 (Fig. 2) revealed circulation of more than one subtype (A2/A3 and B2) in this flock.

Nucleotide diversity within each group was compared in group A (mean nucleotide diversity, 15.3 %; range, 0.1–22.5%) and group B (mean, 2.4%; range, 0.2–9.0%). Intra-



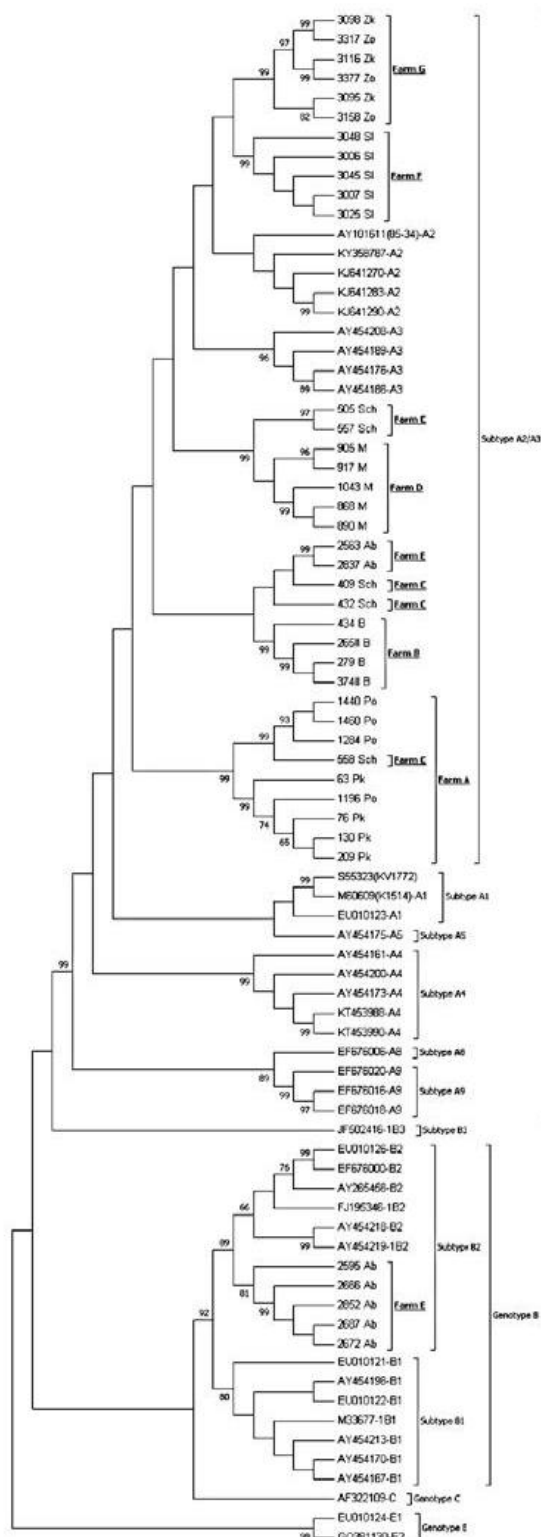


Fig. 1. Phylogenetic relationship of goat and sheep lentivirus nucleotide sequences of isolates from Czech flocks by the Neighbour joining method.

farm heterogeneity in group A: farm A (mean, 6.0%; range, 1.0–18.4%), farm B (mean, 11.4%; range, 3.4–15.5%), farm C (mean, 14.7%; range, 2.4–21.0%), farm D (mean, 4.3%; range, 0.1–10.7%), farm E (mean, 5.6%; range, 0.4–8.4%), farm F (mean, 2.4%; range, 0.1–3.8%), farm G (mean, 9.4%; range, 0.3–15.2%) and group B: farm E (mean, 2.4%; range, 0.2–9.0%).

Results of serological examination of 90 serum samples by subunit ELISA on genotype A and B derived matrix protein (Eradikit SRLV ELISA test) confirmed the presence of genotypes detected by molecular genotyping on 6 out of 7 farms, while on one of them (farm C) a suspected additional presence of genotype B besides genotype A was revealed by sequence analysis. Otherwise, on farm E showing circulation of genotypes A and B, solely genotype B was presented in all significant results (33/55). Even particular samples tested positive for genotype A by PCR reacted in this ELISA obviously with a B subunit antigen.

## Discussion

A 'gold standard' for the detection of SRLV infection has not existed up until now. Tools recommended for early detection consist of laboratory methods for detection of the humoral immune response (serology) and methods detecting the (pro-)viral nucleic acid. The proviral DNA was detected by PCR in 410 samples (65%) out of 631 seropositive animals. This result corresponds to past studies (Celer et al. 1997; Shah et al. 2004a; De Andrés et al. 2005) where the sensitivity of various PCR approaches related to different ELISA tests vary from 60 to 95%. Polymerase chain reaction tests tend to be less sensitive than many ELISA tests regarding the identification of infected individuals by laboratory testing (De Andrés et al. 2005). Polymerase chain reaction appears to

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
1205      1215      1225      1235      1245      1255      1265      1275      1285      1295
EU010123-A1 TCCGGGACA- ----GAATG TCCTAACGGT GGATCAAATT ATGGGAGTAG GACAAACAAA TCAGCAGGCA GCCCAGGCTA ATATGGATCA AGCAAGGCAG
KY358787-A2 GCCCGGGCC- ----AGGTG TCCTTACAGT GGATCAAATC ATGGGAGTAG GACAAACAAA TCATCAGGCA TCACAAGCTA ATATGGATCA AGCAAGGCAG
2512 Abn-A   GCCAGGGCC- ----AAATG TCCTTACAGT GGATCAAATT ATGGGAGTAG GACAAACAAA TCAGCAGGCA TCACAAGCTA ATATGGATCA AGCAAGGCAG
AY454176-A3 GCCAGGGCC- ----AAATG TCCTTACAGT GGATCAAATC ATGGGAGTAG GACAAACAAA TCAGCAGGCA TCACAAGCTA ATATGGATCA AGCAAGGCAG
EU010120-B1 ACCACCTCCA GCAGGAGGAG CACTAACAGT GGATCAAATT ATGGGAGTAG GACAAACGAA TCAAGCAGCA GCACAAGCTA ACATGGATCA AGCAAGGCAG
2424 Abn-B2 ACCACCTCCG GCAGGAGGAG GACTAACCGT GGATCAAATT ATGGGAGTAG GACAAACAAA TCAAGCAGCT GCTCAAGCTA ACATGGATCA AGCAAGGCAG
AY454218-B2 ACCACCTCCG GCAGGAGGAG GATTAACAGT GGATCAAATT ATGGGAGTAG GACAAACAAA TCAGGAGCTC GCACAAGCTA ACATGGATCA AGCAAGGCAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
1305      1315      1325      1335      1345      1355      1365      1375      1385      1395
EU010123-A1 ATATGTTTGC AATGGGTAAT AACAGCATTG AGATCAGTAA GGCATATGTC GCATAGACCA GGAACCCTA TGCTAGTCAA GCAGAAGAAAT AATGAGAGCT
KY358787-A2 GTATGCTTGC AATGGGTAAT ATCAGCATTG AGATCAGTAA GGCATATGTC ACATAGACCA GGAACCCTA TGCTAGTAAA GCAGAAAAT AGTGAAAGTT
2512 Abn-A   TTATGCTTGC AATGGGTAAT AACAGCATTG AGATCAGTAA GGCATATGTC ACATAGACCA GGAATCCTA TGCTGGTAAA GCAAAAAGAA AGTGAAAGCT
AY454176-A3 ATATGCTTGC AATGGGTAAT AACAGCATTG AGATCAGTGC GGCATATGTC ACACAGACCA GGAATCCTA TGTTAGTAAA GCAAAAAT AGTGAAAGTT
EU010120-B1 ATATGCTTGC AATGGGTAAT ATCAGCATTG AGGCGCTGAA GATATATGTC CCATAAGCA GGAATCCTA TGCTAGTAAA ACAAATAA AATGAGCCAT
2424 Abn-B2 ACCTGCTTGC AATGGGTAAT ATCAGCATTG AGAGCTGTA GGCATATGTC TCATAGACCA GGAATCCTA TGCTAGTAAA ACAAATAA AATGAGCCAT
AY454218-B2 ATCTGCTTGC AATGGGTAAT ATCAGCATTG AGAGCTGTA GGCATATGTC TCATAGACCA GGAATCCTA TGTTAGTAAA GCAAAAAG AATGAGCCAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
1405      1415      1425      1435      1445      1455      1465      1475      1485      1495
EU010123-A1 ATGAAGATT CATAGCTAGA CTATTAGAAG CAATTGATGC AGAACCTGTT ACTGAGCCTA TAAAAACATA TCTAAAGGTG ACTCTGTCTG ACACAAATGC
KY358787-A2 ATGAAGATT CATCGCAAGA CACTAGAGGG CCATAGATGC TGAGCCGGTA ACAGACCTA TAAAAACATA CTTGAAAGTG ACTCTGTCTG ATACAAATGC
2512 Abn-A   ATGAAGACTT CATAGCAAGA CTGTTAGAAG CCATAGATGC TGAACAGTT ACAGATCCAA TAAAAACATA TTTGAAAGTA ACTCTGTCTG ACACAAATGC
AY454176-A3 ATGAAGATT TATAGCCAGG TTATTAGAAG CTATAGATGC CGAGCCAGTT ACAGACCTA TAAAAACATA TTTGAAAGTA ACTCTGTCTG ATACAAATGC
EU010120-B1 ATGAAGATT TGCAGCAAGA TTGCTAGAAG CAATAGATGC AGAGCCAGTT ACCCAGCCCA TAAAGAATA TCTAAAGGTA ACATTATCTT ATACAAATGC
2424 Abn-B2 ATGAAGACTT TGCAGCAAGA CTGCTAGAAG CAATAGATGC AGAACCTGTT ACACAACTA TAAAGGAATA TTTAAATTA ACTCTGTCTG ATACAAATGC
AY454218-B2 ATGAAGATT TGCAGCAAGG CTGCTAGAAG CAATAGATGC AGAACCTGTT ACAGCCTA TAAAGAATA TCTAAACTA ACATTATCTT ATACAAATGC

```

Fig. 2. Comparison of two field strains from farm E with the reference strain (subtype A1, A2, A3, B1, B2).

be able to detect an infected animal prior to seroconversion, but due to low viral load in the post seroconversion phase of infection, PCR tests are generally less sensitive than ELISA techniques. It is suggested that the combination of serology and PCR together with relatively short sampling intervals is optimal for detecting SRLV infected animals especially in eradication programmes where the early detection of infection is needed (De Andrés et al. 2005).

In the Czech Republic, an eradication program has never been officially established but breeding flocks under official control of production efficiency were systematically tested for presence of MVV/CAEV antibodies since late 1990s. This attempt has reduced the prevalence of SRLVs in these flocks under 1%. However, there is no exact defined number of other flocks out of this program, where the detected serological prevalence of MVV in sheep was 19.9% (556/2801), and of CAE in goats 14.1% (86/609). Eventually, on 7 farms out of 21 (33%) the SRLV infection was detected. Prevalence within individual herds ranged between 4.5 and 56.2% (Bartak et al. 2017).

This study represents the first report of genetic characterisation of SRLV strains circulating within the territory of the Czech Republic. Previous study reporting about the phylogenetic analysis of the MVV strains in the Czech Republic (Celer et al. 2000) comparing partial gag gene sequences considered the relevance to prototype MVV isolates K1514, EV1 and SA-OMVV without further recently used identification of the genotype. Our results identified the genotypes in 77 sequences, of which 60 were genotype A present in both animal species, and 17 belonged to genotype B occurring in one sheep flock. Ovine and goat sequences, which belong to genotype A could not be assigned to existing subtypes, however, they were found to be related to subtype A2 or A3. Further analyses have to be performed on larger segments of gag-pol and env or rev gene to classify the relevance to existing subtypes. The length of gag gene part analysed in our study was defined by the size of the reamplification product for the reason of the detection of sensitivity. Published data on the distribution of SRLV genotypes and subtypes in goats and sheep from different countries (Ramírez et al. 2012) state the presence of subtype A2 in Canada, Finland,

Turkey, and USA, meanwhile subtype A3 was declared in Spain, Switzerland, and Turkey. In contrast, the genotype B strains limited only to one flock were clearly identified as subtype B2 occurring in France, Italy, Poland, Spain and Switzerland.

Maedi-visna virus prototypes originally isolated from sheep are now referred to as group A, further divided into several subtypes isolated from sheep, goats or both species (Shah et al. 2004a,b). Caprine arthritis-encephalitis virus prototypes originally isolated from goats are referred to as group B, divided into subtypes as well isolated from both species (Pisoni et al. 2005; Shah et al. 2004a). It is clearly confirmed by numerous other studies from several countries that CAEV and VMV often cross the species barrier infecting the new host, persisting in it and spreading across the new host population (Valas et al. 1996; Leroux et al. 1997; Germain et al. 2006). Our study revealed the parallel occurrence of genotype A in a mixed flock on farm A and “CAEV-like” genotype B in sheep on farm E. Thus, even if some genotypes might have been originally assigned to a single host species, the host species spectrum may be wider in nature.

Small ruminant lentivirus displays a high genetic and antigenic heterogeneity and includes diverse genotypes and subgenotypes that display great genetic variability. The molecular epidemiology of SRLV is constantly changing due to animal movements, cross-species transmission and due to their rapid evolutionary rate. Mutations are very frequent in lentiviruses and also the recombination can occur between different SRLVs, creating new variants. Heterogeneous SRLV genotypes may affect the diagnostic sensitivity and specificity. The development of assays tailored by region might help resolve the problem of high mutation rates of SRLV. Sequencing of lentivirus isolates from the area of interest is a prerequisite for this approach. The phylogenetic analysis and nucleotide diversity comparison proved the variability of analysed viral strain across different Czech flocks, except for farm C which had sequences clustered together with two other farms (Farm A and D). On farm E, where mixed infection genotypes A and B were detected in sheep, there is the possibility of introduction of some of them by the purchase of animals from another country.

Comparing the serological and molecular approaches to determining the SRLV genotypes in positive flocks, the results of ELISA designated for that purpose (Eradikit SRLV ELISA test) coincided in the majority of the tested samples with the molecular characterisation of genotypes. There were some exceptions in several individual samples where the genotype was not correlated in both methods, which can be attributed to lower ELISA specificity. If ELISA is used on the flock level rather than the individual level, it could be a suitable tool to differentiate genotypes A and B in case the sequencing analysis is not available in the laboratory.

This study describes an epidemiological situation of SRLV in the Czech Republic. It declares the presence of two SRLV genotypes A and B within the territory of the country and the distribution of different subtypes in sheep and goats. The data reported in this study suggest that Czech SRLV strains are more divergent within the A genotype and further characterization of the A2/A3 strains should be performed to classify them precisely or to confirm a new subtype.

#### Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic with the project NAZV QJ1610096.

#### References

- Alvarez V, Daltabuit-Test M, Arranz J, Leginagoikoa I, Juste RA, Amorena B, de Andres D, Lujan L, Badiola JJ, Berriatua E 2006: PCR detection of colostrum-associated Maedi-Visna virus (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs. *Res Vet Sci* **80**: 226-34

- Barták P, Václavek P, Kostková M, Mikulášková K, Šimek B 2017: Prevalence of lentiviral diseases in small ruminants in the Czech Republic with the use of serologic diagnostic. *Veterinářství* **67**: 227-232
- Blacklaws BA, Berriatua E, Torsteinsdottir S, Watt NJ, de Andres D, Klein D, Harkiss GD 2004: Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet Microbiol* **101**: 199-208
- Celer V 1997: Diagnostic use of structural proteins of the Maedi-Visna virus (in Czech). Dissertation, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno
- Celer V Jr, Němcová H, Celer V 1997: Isolation and partial characterization of ovine lentivirus in the Czech Republic. *Folia Microbiol (Praha)* **42**: 395-399
- Celer V Jr, Celer V, Nejedlá E, Bertoni G, Peterhans E, Zanoni RG 2000: The detection of proviral DNA by semi-nested polymerase chain reaction and phylogenetic analysis of Czech Maedi-Visna isolates based on gag gene sequences. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **47**: 203-215
- De Andrés D, Klein D, Watt NJ, Berriatua A E, Torsteinsdottir S, Blacklaws BA, Harkiss GD 2005: Diagnostic test for small ruminant lentiviruses. *Vet Microbiol* **107**: 49-62
- Gernain K, Valas S 2006: Distribution and heterogeneity of small ruminant lentivirus envelope subtypes in naturally infected French sheep. *Virus Res* **120**: 156-162
- Gifford RJ 2012: Viral evolution in deep time: Lentiviruses and mammals. *Trends Genet* **28**: 89-100
- Gjerset B, Jonassen CM, Rimstad E 2007: Natural transmission and comparative analysis of small ruminant lentiviruses in the Norwegian sheep and goat populations. *Virus Res* **125**: 153-156
- Grego E, Bertolotti L, Quasso A, Profiti M, Lacerenza D, Muz D, Rosati S 2007: Genetic characterization of small ruminant lentivirus in Italian mixed flocks: evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. *J Gen Virol* **88**: 3423-3427
- Hall TA 1999: "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT". *Nucl Acids Symp Ser* **41**: 95-98
- Kumar S, Stecher G, and Tamura K 2016: MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* **33**: 1870-1874
- L'Homme Y, Ouardani M, Lévesque V, Bertoni G, Simard C, Pisoni G 2011: Molecular characterization and phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses isolated from Canadian sheep and goats. *Virol J* **8**: 271
- Leroux C, Chastang, J, Greenland T, Mornex JF 1997: Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: Existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Arch Virol* **142**: 1125-1137
- Narayan O, Kennedy-Stoskopf S, Sheffer D, Griffin DE, Clements JE 1983: Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytesto macrophages. *Infect Immun* **41**: 67-73
- Narayan O, Clements JE 1989: Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J Gen Virol* **70**: 1617-1639
- Nei M, Kumar S 2000: *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York
- Pepin M, Vitu C, Russo P, Mornex JF, Peterhans E 1998: Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Vet Res* **29**: 341-367
- Pisoni G, Bertoni G, Boettcher P, Ponti W, Moroni P 2005: Phylogenetic analysis of the gag region encoding the matrix protein of small ruminant lentiviruses: comparative analysis and molecular epidemiological applications. *Virus Res* **116**: 159-167
- Ramírez H, Reina R, Amorena B, de Andrés D, Martínez HA 2013: Small ruminant lentiviruses: genetic variability, tropism and diagnosis. *Viruses* **23**: 1175-1207
- Reina R, Bertolotti L, Dei Giudici S, Puggioni G, Ponti N, Profiti M, Patta C, Rosati S 2010: Small ruminant lentivirus genotype E is widespread in Sarda goat. *Vet Microbiol* **144**: 24-31
- Shah C, Boni J, Huder JB, Vogt HR, Mühlherr J, Zanoni R, Miserez R, Lutz H, Schüpbach J 2004a: Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: Evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Virology* **319**: 12-26
- Shah C, Huder JB, Böni J, Schönmann M, Mühlherr J, Lutz H, Schüpbach J 2004b: Direct evidence for natural transmission of small-ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and vice versa. *J Virol* **78**: 7518-7522
- Valas S, Benoit C, Guionaud C, Perrin G, Mamoun RZ 1997: North American and French caprine arthritis-encephalitis viruses emerge from ovine maedi-visna viruses. *Virology* **237**: 307-318



# Srovnání incidence lentivirových infekcí u ovcí a koz s rozdílným genotypem genu transmembránového proteinu TMEM154

T. TONKA,<sup>1</sup> V. ČURN,<sup>1</sup> M. ŠOCH,<sup>1</sup> A. VEJČÍK,<sup>1</sup> K. VERNEROVÁ,<sup>1</sup> B. FARKOVÁ,<sup>1</sup> P. ŠTOIDL,<sup>1</sup> P. BARTÁK,<sup>2</sup> B. ŠIMEK,<sup>2</sup> P. VÁCLAVEK,<sup>2</sup> H. PLODKOVÁ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

<sup>2</sup>Státní veterinární ústav Jihlava

## SOUHRN

Tonka T., Čurn V., Šoch M., Vejčík A., Vernerová K., Farková B., Štoidl P., Barták P., Šimek B., Václavek P., Plodková H. **Srovnání incidence lentivirových infekcí u ovcí a koz s rozdílným genotypem genu transmembránového proteinu TMEM154.** Veterinářství 2019;69(5):377-380.

Původci lentivirových infekcí malých přežvýkavců (SRLV), kterými jsou virus Maedi-Visna (MVV) u ovcí a virus artritidy a encefalitidy koz (CAEV), jsou rozšířené po celém světě včetně České republiky. Vnímavost k infekci je ovlivněna genetickou kombinací více genů, z nichž jedním je gen kódující transmembránový protein 154 (*TMEM154*). Genotyp daný kombinací alel spojený s polymorfismem na pozici 35 tohoto genu významně koreluje s citlivostí k infekci SRLV. Selektce odolnějších jedinců na základě genotypizace může být jedním z nástrojů kontrolních programů pro eliminaci SRLV v infikovaných chovech a pro plošnou prevenci.

## SUMMARY

Tonka T., Čurn V., Šoch M., Vejčík A., Vernerová K., Farková B., Štoidl P., Barták P., Šimek B., Václavek P., Plodková H. **Comparison of the incidence of lentivirus infections in sheep and goats with different genotypes of gene of transmembrane protein TMEM154.** Veterinářství 2019;69(5):377-380.

The agents of lentivirus infections of small ruminants (SRLV), which are Maedi-Visna virus (MVV) in sheep and caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in goats are distributed worldwide, including the Czech Republic. Susceptibility to infection is influenced by the genetic combination of multiple genes, one of which is the gene encoding transmembrane protein 154 (*TMEM154*). The genotype given by the combination of alleles associated with polymorphism at position 35 of this gene has a significant correlation with the sensitivity to infection with SRLV. Selection of resistant individuals based on genotyping can be one of the tools for control programs to eliminate SRLV in infected farms and for broad prevention.

## Úvod

Onemocnění, známá jako maedi-visna u ovcí (Maedi-visna virus, MVV) a virová artritida a encefalitida koz (Caprine Arthritis-Encephalitis virus; CAEV), patří do skupiny RNA virů z čeledi *Retroviridae*, rodu *Lentivirus* a jsou souhrnně označovány jako lentivirové infekce malých přežvýkavců (SRLV). V současné době je onemocnění MVV rozšířené po celém světě včetně České republiky.<sup>1,2</sup>

Kontrolní programy lentivirových infekcí ovcí a koz jsou zpravidla založeny na sérologickém screeningu stád s následným vyřazováním seropozitivních zvířat a navazujícím plošným monitoringem. Tento systém byl v minulých letech rozšířen o možnost selektce na základě genetické rezisten-

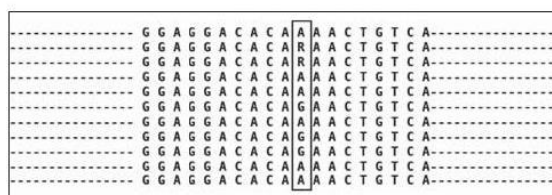
ce podle příslušného genotypu transmembránového proteinu (*TMEM154*). K tomu je nutné znát nejenom variabilitu virových původců onemocnění, ale také genotypové rozložení rezistentních nebo vnímavých jedinců v populaci hostitelských zvířat.<sup>3</sup>

V předchozím článku byly prezentovány výsledky sérologické identifikace infikovaných zvířat jako prvního stupně programu eradikace<sup>2</sup> a možnosti využití metod molekulární biologie pro včasnou detekci provirové DNA, včetně využití metody LAMP.<sup>4</sup> Na tyto postupy navazují metody genotypizace zvířat, určení haplotypu genu *TMEM154* a identifikace markerů genetické rezistence jako druhý stupeň v systému prevence a profylaxe lentivirových infekcí malých přežvýkavců.

Genetická rezistence k retroviróvé infekci byla popsána u člověka<sup>5</sup> a u ovcí.<sup>6,7</sup> Jako klíčový kandidátní gen pro testování odolnosti vůči infekci SRLV u ovcí a koz byl popsán gen *TMEM154* kódující polypeptid o velikosti 191 aminokyselin. Molekulární analýza založená na sekvenování genu *TMEM154* a identifikace konkrétního genotypu je založena na polymorfismu na 35 pozici tohoto genu (obr. 1). U homozygotního genotypu E35 je na této pozici báze guanin, který kóduje aminokyselinu glutamin (E). U homozygotního genotypu K35 báze adenin na této pozici odpovídá aminokyselině lyzin (K). Heterozygotní genotyp E35K má na pozici 35 adenin/guanin a asociovanou aminokyselinu lyzin/glutamin.

Za více vnímavá k infekci SRLV jsou považována zvířata homozygotního genotypu E35 a heterozygotního genotypu E35K s glutaminem na pozici 35,<sup>8</sup> zatímco genotyp K35 je charakterizován jako signifikantně méně vnímavý až rezistentní.<sup>3,6</sup>

Genetická analýza genu *TMEM154* na základě sekvenční analýzy amplifikovaného produktu a identifikace konkrétního genotypu umožňuje výběr jedinců s genotypem s vyšší odolností vůči onemocnění nastavením markerů pro asistovanou selekci. Tento postup se již používá u ovcí.<sup>3,7</sup> U koz není tato problematika blíže probádána, nicméně sekvenční podobnost analyzovaných genů umožňuje detekci polymorfismu u genu *TMEM154* i u koz.



Obr. 1 – Aligment sekvencí amplikonů – genotyp E35 s nukleotidem G (guanin), genotyp K35 s nukleotidem A (adenin) a genotyp E35K s nukleotidem R (adenin/guanin)

## Materiál a metodika

### Vzorky krve

Vzorky krve v jednotlivých stádech byly odebrány podle metodiky SVÚ Jihlava.<sup>9</sup> Identifikace genotypů byla provedena pouze ve stádech, kde byla identifikována sérologicky a virologicky pozitivní i negativní zvířata. Testovány byly vzorky od sérologicky pozitivních a negativních zvířat z příslušného stáda vybraných podle hodnot zjištěných v ELISA testu. Chovy bez sérologicky pozitivních jedinců nebyly do analýzy zahrnuty.

### Izolace DNA

DNA byla izolována z krve testovaných zvířat. Odebraná krev byla po převozu do laboratoře zamražená při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do doby použití. Před vlastní izolací DNA bylo přidáno k 50  $\mu\text{l}$  archivované krve 500  $\mu\text{l}$  TE pufru (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH = 8,0). Po 5 min centrifugaci při 14000 rpm byl pelet z krevních buněk resuspendo-

ván v 500  $\mu\text{l}$  TE pufru. Pro důkladné pročištění získaného peletu byl předchozí krok 3x opakován.

K takto připravenému vzorku bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  5% Chelexu 100 (Bio-Rad, w/v) a 1  $\mu\text{l}$  Proteinázy K (20 mg/ml). Po krátkém promíchání se vzorek inkuboval při  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  45 minut. Po opětovném promíchání a centrifugaci se vzorek inkuboval při  $98\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 10 minut. Takto připravené vzorky byly skladovány při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  před dalším použitím.

### PCR reakce

PCR reakce probíhala v cílovém objemu 25  $\mu\text{l}$ . Reakční směs obsahovala 12,5  $\mu\text{l}$  PPP MasterMix Combi (Top-Bio), 9,5  $\mu\text{l}$  sterilní destilované  $\text{H}_2\text{O}$ , 1  $\mu\text{l}$  každého z primerů (5 pmol/ $\mu\text{l}$ ) a 1  $\mu\text{l}$  templátové DNA. Pro identifikaci mutace v genu *TMEM154* byly použity primery TMEM154F (5'-TTTGCTGAAGTGCCTCTGAA-3') a primer TMEM154R (5'-GGCTGAAGGCATTTTCTGTT-3'). Primery byly navrženy ze sekvence genu transmembránového proteinu *TMEM154* ovce domácí (HM355886 GenBank, db\_xref=InterpidBio:5259707746), přímo na oblast s výskytem polymorfismu E35K pomocí programu Primer3<sup>10</sup>. Po 2 minutách úvodní denaturace při  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  následovalo 30 cyklů denaturace 30 s při  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ , annealingu 30 s při  $58,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 50 s elongace při  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Závěrečná elongace trvala 7 minut při  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Produkty byly vizualizovány na 1,5 % agarózovém gelu pomocí ethidium bromidu.

### Sekvenční analýza

PCR produkt byl před sekvenční reakcí přečištěn pomocí komerčního kitu ExoSap-IT (USB Corp.). K 5  $\mu\text{l}$  PCR produktu byly přidány 2  $\mu\text{l}$  ExoSapu a takto připravená směs se inkubovala 15 minut při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Následně byla provedena inaktivace při  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 15 min. Takto připravený vzorek byl sekvenován v externí laboratoři (SEQme s. r. o., ČR) na kapilárním analyzátoru Applied BioSystems 3500.

### Statistické vyhodnocení

Získaná data o genotypech jednotlivých vzorků byla zpracována asociační analýzou. Výsledky ve formě kontingenčních tabulek byly testovány Pearsonovým  $\chi^2$  testem.

## Výsledky

Pro účely genotypizace byl vybrán soubor sérologicky negativních i pozitivních zvířat z chovů s výskytem SRLV. Celkem bylo analyzováno 605 ovcí a 60 koz ze sedmi chovů ovcí a dvou chovů koz s prevalencí séropozitivních 8,7–56,2 % u ovcí a 13,2 a 30,6 % u koz. U všech analyzovaných vzorků byl úspěšně amplifikován produkt o očekávané délce 865 bp (obr. 2). PCR produkt byl sekvenován u všech analyzovaných vzorků. Získané amplifikované produkty se u jednotlivých genotypů neliší svojí délkou, pro identifikaci genotypu bylo nutné získané amplikony sekvenovat. V analyzovaných vzorcích ovcí byly identifikovány všechny tři genotypy K35, E35 a E35K v různém procentuálním zastoupení (tab. 1).



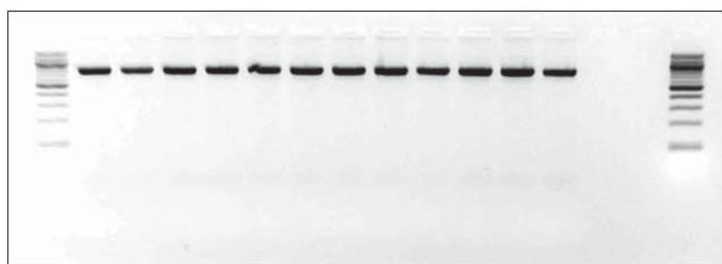
V případě vyšetření koz byl u všech analyzovaných vzorků identifikován pouze genotyp E35.

V chovech ovcí se zastoupení genotypu E35 pohybovalo v rozmezí od 1,92 (chov č. 8) do 55,00 % (chov č. 9) u séropozitivních zvířat. U séronegativních zvířat se tento genotyp vyskytoval od 5,00 % (chov č. 2) do 32,56 % (chov č. 9). V jednom případě (chov č. 1) nebyl tento genotyp u negativních zvířat zastoupen vůbec. Ovce s heterozygotním genotypem E35K byly zastoupeny u séropozitivních zvířat v rozmezí od 31,58 % (chov č. 18) do 73,91 % (chov č. 1). U negativních vzorků se pohyboval výskyt tohoto genotypu od 20,83 (chov č. 1) do 51,85 % (chov č. 8).

Zastoupení homozygotního genotypu K35, kdy na 35. pozici genu *TMEM154* báze adenin kóduje aminokyselinu lyzin a tento genotyp se vyznačuje vyšší mírou odolnosti, u séropozitivních vzorků kolísalo od 12,82 % (chov č. 19) do 48,08 % v chovu č. 8. V chovu č. 9 nebyl homozygotní genotyp K35 zastoupen. U séronegativních kolísalo procento výskytu tohoto genotypu od 16,28 % (chov č. 9) do 79,17 % (chov č. 1).

V celkovém zhodnocení výskytu jednotlivých genotypů (tab. 2) se z celkového počtu 328 ovcí s pozitivním výsledkem ELISA testu vyskytoval genotyp K35 u 107 vyšetřených zvířat (32,6 %), genotyp E35 u 54 zvířat (16,5 %) a heterozygotní genotyp E35K u 167 séropozitivních testovaných ovcí (50,9 %). U 277 séronegativních ovcí se genotyp K35 vyskytoval u 129 vzorků (46,6 %), genotyp E35 u 39 vzorků (14,1 %) a heterozygoti byli identifikováni u 109 zvířat (39,3 %). Statisticky významné rozdíly jsou u séropozitivních ovcí v případě genotypu K35 ( $\chi^2 = 3,42$ ) a u séronegativních vzorků u genotypu E35K ( $\chi^2 = 2,4$ ) (tab. 3.).

V testovaných chovech koz byl u 46 séropozitivních vzorků sekvenční analýzou identifikován genotyp E35 (76 %), stejně jako u 14 séronegativních vzorků (24 %) (tab. 1.)



Obr. 2 – Elektroforetická separace PCR fragmentů genu *TMEM154*; slot č. 1 a č. 16 velikostní marker 100bp; sloty 2–13 specifický amplifikační produkt PCR, slot č. 14 a 15 negativní kontrola

## Diskuse

Tato práce přináší první publikované údaje o rozložení jednotlivých haplotypů genu *TMEM154* v chovech ovcí a koz v ČR v souvislosti s geneticky podmíněnou vnímavostí či odolností proti infekci SRLV.

Podle dříve publikovaných výsledků by měla být senzitivita k infekci SRLV spojena s polymorfismem na

35. pozici genu *TMEM154*.<sup>3,7</sup> Zjištěné výsledky ve vyšetřovaných chovech potvrzují, že rozdíly ve vnímavosti k infekci MVV nebo CAEV v závislosti na polymorfismu genu *TMEM154* mají opodstatnění. Infikovaná zvířata se sice vyskytovala u všech definovaných genotypů, avšak s výjimkou jednoho konkrétního chovu byl procentuální podíl séropozitivních zvířat vždy nižší u homozygotního genotypu K35.

Nejvyšší podíl séropozitivních ovcí byl zjištěn u zvířat s haplotypem obsahujícím vnímavou alelu projevující se inkorporací glutaminu do struktur transmembránového proteinu, tedy heterozygotů s genotypem E35K (50,9%) a homozygotů o genotypu E35 (16,5 %). Podobně v Německu zjistili signifikantně vyšší podíl séronegativních ovcí u genotypu K35 u čtyř různých plemen ovcí.<sup>11</sup>

Zjištěné frekvence výskytu polymorfismu v chovech ovcí tedy odpovídají dříve publikovaným zjištěním, že haplotyp K35 je méně vnímavý k lentivirové infekci. Srovnání podílů genotypů u séronegativních zvířat není zcela relevantní, protože zvířata vnímavého genotypu nemusí být vždy infikovaná. Kromě geneticky podmíněné vnímavosti se v patogenezi infekce SRLV uplatňuje řada dalších faktorů, a to především genotyp viru, stáří zvířat, plemeno, podmínky chovu a další vlivy prostředí.<sup>1,3</sup>

Frekvence výskytu vysoce vnímavého genotypu se významně liší u různých plemen ovcí. Například ovce dakkanská z Indie nebo tibetská mají vůbec nejvyšší frekvenci vnímavé alely v globální populaci, zatímco nejnižší výskyt této alely byl zjištěn u vzácného plemene walliská červená ovce z horských oblastí ve Švýcarsku.<sup>7</sup>

Z našich výsledků je patrné, že homozygotní genotyp E35 se vyskytuje ve sledovaných chovech v nižším procentním podílu, výskyt vnímavé alely je však nejvyšší u heterozygotního genotypu E35K, kde byl zjištěn rovněž největší výskyt séropozitivních ovcí.

Vnímavost k infekci má pravděpodobně i další souvislost s konkrétními genotypy SRLV, které se na sledovaném území vyskytují. V rámci jedné studie se objevila skupina izolátů SRLV, které by mohly vytvořit nový subtyp genotypu A, a které současně vykazují zvýšenou schopnost infikovat jedince méně vnímavých genotypů.<sup>3</sup> V předchozí studii byl zjištěn na území ČR výskyt dvou genotypů SRLV, a sice blíže nedefinované skupiny A2/A3 a genotyp B2.<sup>12</sup> Vyšší podíl pozitivních ovcí s odolnějším genotypem K35 (48 %) oproti 30 % podílu negativních byl zjištěn pouze v jednom chovu plemene šumavské ovce s genotypem viru skupiny A, který nevykazoval významně odlišnou genetickou strukturu od ostatních zjištěných kmenů tohoto typu.

V chovech koz byla situace poněkud jiná. Ve všech analyzovaných chovech se vyskytovali pouze homozygotní jedinci s haplotypem E35. Ten je popisován jako



Tab. 1 – Procentuální zastoupení jednotlivých genotypů vyšetřovaných zvířat v chovech ovcí a koz

Chov		Sérologické vyšetření ELISA					
		Pozitivní			Negativní		
		K35	E35	E35K	K35	E35	E35K
		%	%	%	%	%	%
Ovce	1	21,74	4,35	73,91	79,17	0,00	20,83
	2	40,00	10,00	50,00	55,00	5,00	40,00
	8	48,08	1,92	50,00	29,63	18,52	51,85
	9	0,00	55,00	45,00	16,28	32,56	51,16
	16	43,37	8,43	48,19	58,67	9,33	32,00
	18	15,79	52,63	31,58	36,36	13,64	50,00
	19	12,82	25,64	61,54	61,54	10,26	28,21
Kozy	20	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	26	0,00	100,00	0,00	0,00	100,00	0,00

Tab. 2 – Celková distribuce genotypů v testovaných chovech ovcí

	Počet n	K35	E35	E35K
SRLV pozitivní	328	107 (32,6 %)	54 (16,5 %)	167 (50,9 %)
SRLV negativní	277	129 (46,6 %)	39 (14,1 %)	109 (39,3 %)

Tab. 3 – Kontingenční tabulka analýzy genotypů ovcí (Pearson  $\chi^2 = 6,21$ ,  $df=2$ ,  $p < 0,05$ )

Genotyp	ELISA pozitivní	ELISA negativní
K35	107 (3,42)	129 (0,04)
E35	54 (0,04)	39 (0,28)
E35K	167 (0,03)	109 (2,40)

vnímavý k lentivirové infekci, a výsledky ELISA testů také prokázaly, že více než ¾ vyšetřovaných vzorků s tímto genotypem bylo séropozitivních. U koz není situace s rezistencí jednotlivých haplotypů zcela jasná a může být objasněna dalším výzkumem korelací mezi genotypy koz a monitoringem lentivirových infekcí v chovech.

## Závěr

V naší studii se podařilo identifikovat u ovcí všechny tři genotypy genu *TMEM154*, které jsou odpovědné za vnímavost k infekci SRLV. Celosvětové rozšíření vnímavých alel v populaci ovcí vytváří předpoklad, že genetické testování a následná selekce vnímavých genotypů může přispět ke zlepšení nálezové situace SRLV a ekonomické rentabilitě chovu ovcí.

### Poděkování

Tato práce vznikla za podpory projektu NAZV QJ1610096.

### Literatura:

- RAMÍREZ, H., REINA, R., AMORENA, B., DE ANDRÉS, D., MARTÍNEZ, H. A. Small ruminant lentiviruses: genetic variability, tropism and diagnosis. *Virus* 2013;5(4):1175-207.
- BARTÁK, P., VÁCLAVEK, P., KOSTKOVÁ, M., MIKULÁŠKOVÁ, K., ŠIMEK, B. Prevalence lentivirových onemocnění malých přežvýkavců v ČR s využitím sérologické diagnostiky. *Veterinářství* 2017;67(3):227-232.
- SIDER, L. H., HEATON, M. P., CHITKO-MCKOWN, C. G., HARHAY, G. P., SMITH, T. P., LEYMASTER, K. A., LAEGREID, W. W., CLAWSON, M. L. Small ruminant lenti-

virus genetic subgroups associate with sheep *TMEM154* genotypes. *Vet Res* 2013;44(1):64.

- STEHLÍKOVÁ, D., VERNEROVÁ, K., ČURN, V., TONKA, T., FARKOVÁ, B., VEJČÍK, A., BARTÁK, P., VÁCLAVEK, P. Využití metody LAMP pro molekulární diagnostiku lentivirů malých přežvýkavců. *Veterinářství* 2018;68(5):340-345.
- DEAN, M., CARRINGTON, M., WINKLER, C., HUTTLEY, G. A., SMITH, M. W. a kol. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CKR5* structural gene. *Science* 1996;273:1856-1862.
- HEATON, M. P., CLAWSON, M. L., CHITKO-MCKOWN, C. G., LEYMASTER, K. A., SMITH, T. P., HARHAY, G. P., WHITE, S. N., HERRMANN-HOESING, L. M., MOUSEL, M. R., LEWIS, G. S., KALBFLEISCH, T. S., KEEN, J. E., LAEGREID, W. W. Reduced lentivirus susceptibility in sheep with *TMEM154* mutations. *PLoS Genet* 2012;8:e1002467.
- HEATON, M. P., KALBFLEISCH, T. S., PETRIK, D. T., SIMPSON, B., KIJAS, J. W., CLAWSON, M. L., CHITKO-MCKOWN, C. G., HARHAY, G. P., LEYMASTER, K. A. Genetic testing for *TMEM154* mutations associated with lentivirus susceptibility in sheep. *PLoS One* 2013;8:e55490.
- ALSHANBARI, F. A., MOUSEL, M. R., REYNOLDS, J. O., HERRMANN-HOESING, L. M., HIGHLAND, M. A., LEWIS, G. S., WHITE, S. N. Mutations in *Ovis aries* *TMEM154* are associated with lower small ruminant lentivirus proviral concentration in one sheep flock. *Anim Genet* 2018;4:565-71.
- ŠOCH, M., ČURN, V., A kol. Certifikovaná metodika: Metodika odběru a zpracování vzorků, sérologického a molekulárního stanovení lentivirového onemocnění ovcí a koz. České Budějovice, ZF JU v Č. Budějovicích, 2017.
- ROZEN, S., SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S., MISNER, S. (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 2000:365-386.
- MOLAE, V., ELTANANY, M., LÜHKEN, G. First survey on association of *TMEM154* and *CCRS* variants with serological maedi-visna status of sheep in German flocks. *Vet Res* 2018;1:36.
- BARTÁK, P., ŠIMEK, B., VÁCLAVEK, P., ČURN, V. a kol. Genetic characterisation of small ruminant lentiviruses in sheep and goats from the Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno*, 2018;87:19-26.

### Adresa autora:

**Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D.**  
**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Zemědělská fakulta katedra genetiky a speciální**  
**produkce rostlinné**  
**Na Sádkách 1780**  
**370 05 České Budějovice**  
**e-mail: ttonka@zf.jcu.cz**



# Využití metody LAMP pro molekulární diagnostiku lentivirů malých přežvýkavců

D. STEHLÍKOVÁ,<sup>1</sup> K. VERNEROVÁ,<sup>1</sup> V. ČURN,<sup>1</sup> T. TONKA,<sup>1</sup> B. FARKOVÁ,<sup>1</sup> A. VEJČÍK,<sup>1</sup> P. BARTÁK,<sup>2</sup>  
P. VÁCLAVEK<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

<sup>2</sup> Státní veterinární ústav Jihlava

## SOUHRN

Stehlíková D., Vernerová K., Čurn V., Tonka T., Farková B., Vejčík A., Barták P., Václavek P. **Využití metody LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) pro molekulární diagnostiku lentivirů malých přežvýkavců.** Veterinářství 2018;68(5):340-345.

Lentiviry malých přežvýkavců (SRLV) způsobují chronické, pomalu, ale progresivně probíhající infekce a jsou původci onemocnění maedi-visna ovcí (Maedi-Visna; MVV) a artritidy a encefalitidy koz (Caprine Arthritis-Encephalitis; CAEV). Jedná se o celosvětově rozšířená, neléčitelná onemocnění s významným ekonomickým dopadem. Onemocnění jsou typická a významná svým dlouhotrvajícím latentním charakterem s postupným šířením v infikovaném chovu. Pozitivní nález vytváří bariéru při obchodování s plemenným materiálem, či při pořádání chovatelských akcí. Přímé ztráty úhynem v chovu jsou malé, nicméně užitkovost zvířat klesá. V rámci výzkumného projektu byly na území ČR v průběhu let 2016 a 2017 odebrány vzorky z předem vybraných chovů ovcí a koz, provedena laboratorní diagnostika onemocnění pomocí sérologických metod, metod založených na detekci provirové DNA a v ČR nově zaváděné metody LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification). Z následné analýzy sensitivity a specifity jednotlivých metod vyplývá, že jako nejspolehlivější diagnostická metoda se jeví použití kombinace sérologického a qPCR (real time PCR) testu, zatímco použití metody LAMP má zatím svá omezení vyžadující optimalizace především v extrakci a zpracování provirové DNA.

## SUMMARY

Stehlíková D., Vernerová K., Čurn V., Tonka T., Farková B., Vejčík A., Barták P., Václavek P. **The use of LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) method for molecular diagnosis of lentiviruses in small ruminants.** Veterinářství 2018;68(5):340-345.

Small-ruminant lentiviruses (SRLVs) cause chronic, slow but progressive infections: Maedi-Visna (MVV) in sheep and Caprine Arthritis-Encephalitis (CAEV) in goats. These infectious diseases occurs worldwide, lead to economic losses and there are no vaccines or treatment developed against. MV and CAE are characterised by lifelong persistence and latent character. Besides economical and health impacts it is also a barrier to the exportation of target animals from countries where it is endemic or organizing breeding events. The direct mortality losses are small, however the animal performance is decreasing. Within the framework of the research project samples of pre-selected sheep and goat herds were sampled during the years 2016 to 2017. Laboratory diagnostics of the disease were performed using serological methods, methods based on proviral DNA detection and newly in the Czech Republic introduced Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP). From a subsequent analysis of the sensitivity and specificity of the individual methods, the combination of the serological and qPCR (real time PCR) assays is recommended as the most reliable diagnostic method, whereas the use of LAMP method still has its limitations requiring optimization especially in the field of extraction and processing of proviral DNA.



## Úvod

Lentiviry malých přežvýkavců patří do rodu *Lentivirus*, čeledi *Retroviridae* (podčeleď *Orthoretrovirinae*). Infekce těmito viry způsobují multisystémové, pomalé, progresivní a fatální lymfoproliferativní onemocnění v cílových orgánech, jako jsou plíce, mléčná žláza, mozek a klouby. V posledních desetiletích byla rozeznána celá řada variant SRLV a v současnosti je tato skupina rozdělena do pěti genotypů A až E. Genotyp A (A1 až A13) je heterogenní skupina zahrnující klasické MV viry i jiné varianty, které infikují jak ovce, tak kozy. Genotyp B (B1 až B3) by měl zahrnovat CAE viry infikující výhradně ovce. Genotypy C (postihující ovce i kozy), D a E (výhradně ovce) se v Evropě vyskytují zřídka. Není vyloučena rekombinace vedoucí ke vzniku nových variant SRLV.<sup>1</sup>

Maedi-visna byla poprvé popsána islandským vědcem Björnem Sigurðssonem roku 1954, přičemž se jednalo o první virus z rodu *Lentivirus*, který byl izolován.<sup>2</sup> Jako zdroj nákazy byla označena karakulská ovce importovaná z Německa. Rychlému šíření infekce dopomohlo společně, dlouhé zimní ustájení. Virus byl pojmenován v islandském jazyce podle respiračních příznaků maedi a neurologických příznaků visna.<sup>3</sup> V průběhu roku 1965 na Islandu uhynulo z důvodů tohoto onemocnění přes 100 tisíc ovcí a dalších 650 tisíc bylo poraženo v rámci razantního eradikačního programu.<sup>4</sup> U koz bylo onemocnění poprvé zaznamenáno v Indii, následovala hlášení z Německa a USA. Na základě symptomů bylo onemocnění pojmenováno jako artritida a encefalitida koz. Současná nálezová situace ukazuje na celosvětové rozšíření onemocnění s výjimkou Austrálie a Nového Zélandu, kde doposud byl hlášen pouze výskyt artritidy a encefalitidy koz CAE.<sup>5</sup>

### LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification; Izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkami)

Použití metody LAMP bylo poprvé zdokumentováno a ověřeno při detekci viru hepatitidy B roku 2000. Je to vysoce specifická a účinná amplifikační metoda, která amplifikuje DNA za izotermických podmínek. Ve srovnání s PCR a real-time PCR má LAMP vyšší účinnost amplifikace, která je přisuzována tomu, že není nutné volit složité teplotní podmínky. Na rozdíl od PCR tedy nevyžaduje cyklování.<sup>6</sup> Ve srovnání s tradičními detekčními metodami je specifita LAMP extrémně vysoká. Bylo zjištěno, že metoda LAMP je 10–100x citlivější než PCR. Ve srovnání s PCR a PCR v reálném čase má LAMP výhody v jednoduchosti reakce a vyšší účinnosti amplifikace.<sup>7</sup> Obrovská výhoda LAMP je i v úspoře času. DNA se amplifikuje  $10^9$ – $10^{10}$ x za 15–60 minut, což může ve srovnání s PCR ušetřit i 1 hodinu.<sup>8</sup> Od svého zavedení byla metoda LAMP optimalizována k detekci patogenů humánních, živočišných i rostlinných (viry, bakterie, protozoa) či nejrůznějších potravinových kontaminantů. Vstupní materiál je pak získáván z nejrůznějšího klinického materiálu (krev, faeces atd.). K amplifikaci jsou používány termostabilní DNA polymerázy s dislokázovou aktivitou, které mají 5'–3' endonukleázovou aktivitu. Těmito kritériím

vyhovuje *Bst* polymeráza izolovaná z bakterie *Bacillus stearothermophilus*, *Bsm* polymeráza izolovaná z bakterie *Bacillus smithii* a *Gsp* polymeráza izolovaná z *Geobacillus stearothermophilus*.<sup>9,10</sup> Sada primerů pro amplifikaci LAMP zahrnuje šest primerů, a to vnější přední primer (Forward Outer Primer; F3), vnější zadní (Backward Outer Primer; B3), vnitřní přední (Forward Internal Primer; FIP) a vnitřní zadní (Backward Internal Primer; BIP). Pro urychlení reakce jsou navrženy dva smyčkové primery Loop B (Backward Loop Primer; BLP, Loop B) a Loop F (Forward Loop Primer; FLP, Loop F). Tyto primery odpovídají sekvenci šesti různých oblastí cílového genu. Na 3' konci to jsou oblasti F3c, F2c, F1c a na 5' konci oblasti B1, B2, B3. Vzhledem ke specifickému působení těchto primerů je množství amplifikované DNA vyšší než u reakcí založených na PCR. LAMP amplifikaci lze rozdělit na dvě části. Na přípravu výchozího materiálu a na cyklickou amplifikaci. V první části se vnitřní primer FIP hybridizuje k oblasti F2c, nacházející se na templátovém řetězci DNA. Tento proces zahajuje syntézu řetězce a vytváří se řetězec, který je komplementární k templátu. Poté primer F3 nasedá na oblast F3c templátu. S pomocí dislokázové aktivity termostabilní DNA polymerázy se zahájí řetězová substituční reakce, čímž vzniká vazba primeru FIP a nově vzniklého řetězce. Tato struktura může na jednom konci vytvořit smyčkovou strukturu. Syntetizuje se dvojitěřetězová DNA pomocí primeru F3 a templátového řetězce DNA. Vzhledem k tomu, že na 5' konci řetězce existují komplementární oblasti F1c a F1, po nasednutí BIP a B3 probíhá ekvivalentní proces a vznikne další struktura kmenové smyčky na druhém konci DNA. Celkově tato struktura slouží jako výchozí materiál pro cyklickou amplifikaci. V druhé části probíhá cyklická amplifikace. Struktura vzniklá v první fázi je rychle převedena do kmenové smyčky pomocí syntézy DNA. Poté FIP hybridizuje se smyčkou DNA, čímž disocijuje dvouřetězovou DNA na jednořetězovou, která rychle vytvoří strukturu kmenové smyčky na 3' konci díky komplementárním B1c a B1 oblastem. Poté je od 3' konce oblasti B1 iniciována syntéza DNA a uvolňuje se FIP spojený s vláknem. Později se, díky komplementaritě oblastí F1–F1c a B1c–B1, na obou koncích, tyto oblasti spojí. Stejným způsobem B2 se spojí se smyčkovou oblastí B2c, čímž se vytvoří nová sekvence DNA. Produkt pak slouží jako templát, na který nasedá BIP primer a syntetizuje nové vlákno a následuje cyklická amplifikace až do ukončení reakce. Výsledkem tohoto procesu jsou různé struktury sestávající ze střídavě obrácených opakování cílové sekvence na témže vlákně DNA. Amplifikace a detekce genu může být dokončena v jediném kroku inkubace reakční směsi při konstantní teplotě asi 60–65 °C.<sup>6,7,11</sup> Mezi další komponenty patří dNTPs, jako zdroj potřebných nukleotidů. Dále se do reakční směsi přidávají ionty  $Mg^{2+}$ , pomocí nichž lze reakci optimalizovat. Na stabilizaci poměru AT a GC bází lze do reakčního mixu přidat aminovou sůl, např. betain.<sup>12</sup>

LAMP byl v oblasti SRLV použit především k detekci CEAV, kdy byly jako templát pro design primerů zvoleny konzervativní úseky gag genu a p25 genu.<sup>13,14</sup>

Tab. 1 – Séroprevalence MVV/CAEV v chovech ovcí a koz a výsledky LAMP analýzy

Kód chovu	Druh zvířete	Okres	Celkový počet vzorků	Počet pozitivních	Počet suspektních	Počet negativních	Prevalence %	Počet séronegativních vzorků analyzovaných LAMP	Počet séropozitivních vzorků analyzovaných LAMP	Počet séropozitivních vzorků pozitivních LAMP
1	kozy	JN	243	32	3	208	13,1	2	4	2
2	ovce	KT	150	24	1	125	16,0	2	4	3
3	ovce	KT	230	20	0	210	8,7	2	4	4
4	ovce	ČB	8	0	0	8	0	2	0	0
5	kozy	SY	22	1	0	21	4,5	2	0	0
6	ovce	SY	50	0	1	50	0	2	0	0
7	ovce	KT	100	10	0	90	10	2	4	3
8	ovce	ST	50	0	1	49	0	2	0	0
9	ovce	JH	2	0	0	2	0	2	0	0
10	ovce	PT	200	97	3	100	48,5	2	4	4
11	ovce	JN	431	42	3	386	9,7	2	4	3
12	kozy	BM	18	0	0	18	0	2	0	0
13	ovce	BM	42	0	0	42	0	2	0	0
14	ovce	KT	90	0	0	90	0	2	0	0
15	kozy	ST	103	0	0	103	0	2	0	0
16	ovce	ČK	50	0	0	50	0	2	0	0
17	kozy	ČK	19	0	0	19	0	2	0	0
18	kozy	ČB	31	0	0	31	0	2	0	0
19	ovce	ČB	248	0	3	245	0	2	0	0
20	ovce	KT	91	0	0	91	0	2	0	0
21	ovce	LI	206	0	1	205	0	2	0	0
22	ovce	KV	280	63	1	216	22,5	2	4	4
23	ovce	KV	299	146	1	152	48,8	2	4	4
24	kozy	JS	173	53	0	120	30,6	2	4	1
25	ovce	JS	274	154	0	120	56,2	2	4	3
			3 410	642	17	2751	18,82	50	40	31

## Detekce produktu LAMP

K detekci produktu LAMP bylo navrženo několik metod. Levnou a účinnou metodou detekce je elektroforéza na agarózovém gelu. Produkt je pod UV transiluminátorem vizualizován ve formě velkého množství DNA bandů. Nevýhodou této metody je riziko kontaminace po amplifikaci po otevření vzorku při nanášení na gel.<sup>15</sup> Další možností vizualizace je použití turbidimetrie, kdy

vzniká pyrofosfátový iont, což vede ke vzniku bílé sraženiny pyrofosforečnanu hořečnatého v reakční směsi. Vzhledem k tomu, že množství sraženiny v reakční směsi koreluje s množstvím syntetizované DNA, může být optická hustota měřena turbidimetrem nebo po centrifugaci, kdy je dobře viditelný pouhým okem.<sup>16</sup> Další metodou je využití interkalačních barviv, např. SYBR Green, kdy barvivo po navázání na amplifikovanou DNA emituje zelené zbarvení.<sup>17</sup>



Tab. 2 – Sekvence použitých primerů (Macrogen, KOR)

Primer	Sekvence (5'-3')
F3	GGAAAAGAGATTATCCTGAGCT
B3	TGTTACTCTCCTCAGGAGTT
FIP	GCACCATAACAATTTCCTTCTGTCCAGGCATGCAAGATAAAAGTTC
BIP	TACATGTTTGAGGACCATAAAGAGGTTCTTCACCTTCTGCCATA
LF	AAGTGCTCCCCTCTGAGTC

Tab. 3 – Složení reakční směsi

Reagencie	μl	Primer	Koncentrace pmol
Isothermal master mix (OptiGene, UK)	15		
Primery	5	F3, B3	5
		loopF, B	20
		FIP, BIP	40
Templát (50 ng/ μl)	3		
SYBR green	1		
H <sub>2</sub> O	1		

## Materiál a metodika

Z chovů s prokázaným výskytem infekce SRLV byla vybrána zvířata starší 12 měsíců a odebrány vzorky periferní krve (tab. 1). Nesrážlivá krev (antikoagulant K3EDTA) byla zpracována tzv. buffy coat (leukocyty, trombocyty) s předpokladem co největšího výtěžku provirové DNA. Izolace DNA byla provedena komerčně dostupným kitem MagNA Pure LC Total NA Isolation kit (Roche) s využitím robotického systému MagNA Pure LC. Pozitivita vzorků byla s předstihem testována sérologickými metodami (ELISA) a qPCR.<sup>13</sup> Pro LAMP analýzu byly z každého chovu vybrány dva vzorky sérologicky a qPCR negativní a v deseti pozitivních chovech byly vybrány čtyři vzorky sérologicky pozitivní. Celkem bylo na modelovém panelu sestaveném pro účely ověření metody LAMP analyzováno 90 vzorků.

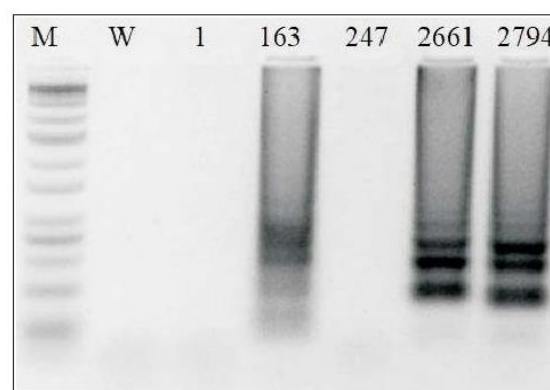
Pro metodu LAMP byly použity primery uvedené v tab. 2. Izotermická reakce v délce 60 minut při 63 °C s následnou závěrečnou denaturací při 90 °C probíhala s využitím LifeECO thermocyklu (Bioer Technology, CHN) a zařízení QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA). Složení reakční směsi je uvedeno v tab. 3.

V případě využití termocyklu bylo po amplifikaci do vzorků přidáno interkalační činidlo ethidium bromid (Sigma Aldrich, USA). Proběhla elektroforetická separace fragmentů na 2% agarózovém gelu s 0,5 X TBE po dobu 80 minut při 4 V/cm. Agarózový gel byl vizualizován pomocí UV prosvěcovací lampy a dokumentačního zařízení InGenius3. V případě real-time zobrazení bylo použito interkalační činidlo SYBR Green (SigmaAldrich, USA) v koncentraci 1x přímo do reakční směsi.

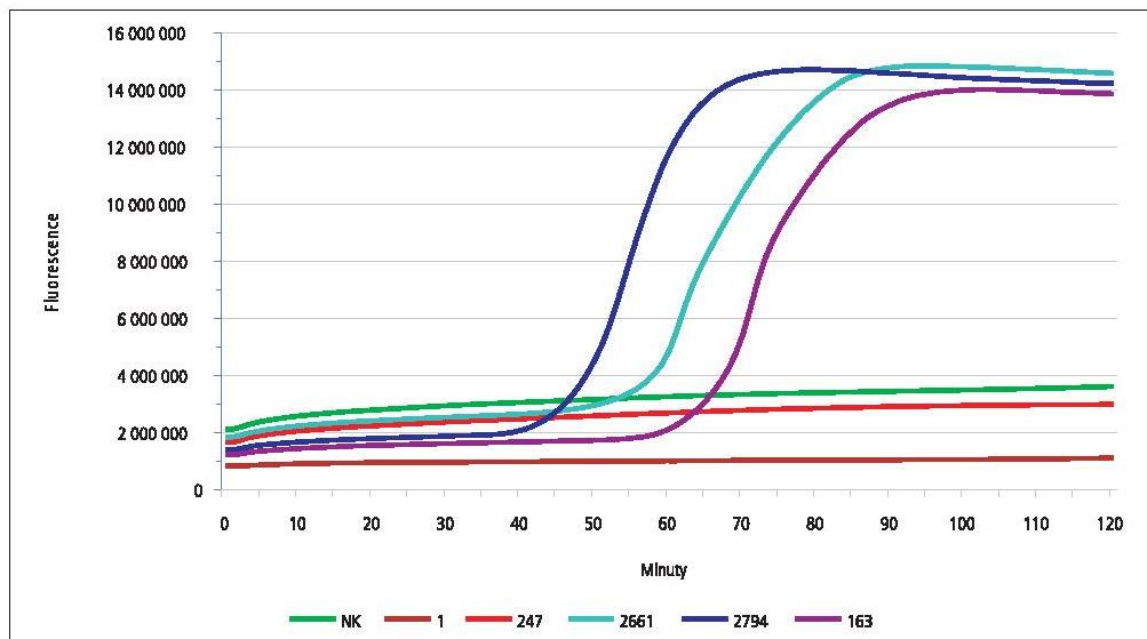
## Výsledky

Na obr. 1 jsou uvedeny výsledky po provedené LAMP analýze u vzorků získaných z krve sérologicky pozitivních a negativních ovcí a koz. Vizualizace amplifikovaných produktů byla provedena pomocí elektroforézy v agarózovém gelu.

Na obr. 2 jsou uvedeny výsledky pro tytéž vzorky jako v prvním případě, ale LAMP analýza proběhla Real-Time PCR Systémem QuantStudio™. Výsledky pak jsou zobraze-



Obr. 1 – Vizualizace produktu LAMP na agarózovém gelu  
 Legenda: M = ladder 10 kb (SigmaAldrich, USA); W = voda; 1 = vzorek 1 - koza CAE negativní; 163 = vzorek 163 – koza CAE pozitivní; 247 = vzorek 247 – ovce MV negativní; 2661, 2794 = = vzorky 2661 a 2794 – ovce MV pozitivní  
 U vzorků W (voda, blank bez DNA), 1 a 247 nejsou přítomné žádné amplifikační produkty a neproběhla amplifikace.  
 U vzorků 163, 2661 a 2794 jsou detekované produkty po LAMP analýze, v případě této analýzy se nehodnotí pozice amplikonů, ale amplifikace jako taková, tedy přítomnost amplikonů na gelu a tyto vzorky odpovídají pozitivnímu výsledku.



Obr. 2 – Vizualizace produktů real-time LAMP

Legenda: Zelená linie = voda; hnědá = vzorek 1 – koza CAE negativní; fialová = vzorek 163 – koza CAE pozitivní; červená = vzorek 247 – ovce MV negativní; světle a tmavě modrá = vzorky 2661 a 2794 – ovce MV pozitivní.

Vzorky 1, 247 a kontrolní vzorek (voda, blank bez DNA) nevykazují nárůst fluorescence a neproběhla amplifikace

U vzorků 163, 2661 a 2794 je patrný v čase kolem 60 minut zřetelný nárůst hodnoty fluorescence a proběhla amplifikace

ny v podobě křivek odpovídajícím nárůstu fluorescence a množství detekovaných amplifikovaných fragmentů. Ve všech třech případech analýzy pozitivních vzorků došlo k počátku exponenciálního nárůstu fluorescence mezi 40-60 minutou analýzy.

Celkem bylo pro účely ověření použitelnosti metody LAMP testováno 90 vzorků. Z každého chovu byly vybrány dva vzorky sérologicky negativní. Z chovů, kde byl zaznamenán výskyt MV/CAE, byly vybrány čtyři vzorky sérologicky pozitivní. Všechny sérologicky negativní výsledky po LAMP analýze rovněž poskytly negativní výsledek. U sérologicky pozitivních vzorků byla úspěšnost LAMP detekce 77,5 % (tab. 1). Příčinou nesouladu mezi výsledky molekulární a sérologické detekce je pravděpodobně nízká koncentrace a kvalita DNA, která je pro úspěšnost LAMP analýzy kritická.

## Diskuse

Metoda LAMP je zaváděna jako jedna z levných a rychlých metod k detekci nejrůznějších patogenů zvířat, přičemž její použití bylo úspěšně ověřeno i pro některé nákazy podléhající povinnému hlášení (slintavka a kulhavka, horečka údolí Rift, mor skotu, enzootická leukóza skotu, klasický i africký mor prasat, vezikulární choroba prasat, newcastleská choroba či aviární influenza).<sup>18</sup> Mezi nesporné výhody této techniky patří vysoká citlivost, specifická, možnost kvantifikace, rychlé a snadné provedení a nízké nároky na přístrojové vybavení v porovnání například s PCR.

V předchozích studiích byla metoda LAMP využita výhradně k detekci CAEV, přičemž vstupním biologickým materiálem byla krev a dále kultury buněk synoviální membrány.<sup>14,19</sup> Vzorky byly v těchto případech získány na území Filipín a Číny. Cílem tohoto projektu bylo ověřit a optimalizovat použití LAMP na naše podmínky s využitím provirové DNA izolované z krve ovcí a koz. Z vybraných vzorků byla pozitivita na MV/CAE pomocí LAMP jednoznačně potvrzena u 31 ze 40 analyzovaných séropozitivních vzorků, a to s použitím obou vizualizačních metod. U devíti pomocí LAMP analyzovaných vzorků (na obr. 1 a 2 vzorek 247 – ovce) nebyla potvrzena předpokládaná pozitivita na MV, ačkoliv s pomocí ELISA testu a real-time PCR byl vzorek jednoznačně označen jako pozitivní. Otázkou je, z jakého důvodu se i při opakované LAMP analýze nepodařilo tento vzorek amplifikovat a potvrdit tak výsledky jiných metod, když vzhledem k výrazně vyššímu počtu syntetizovaných kopií má LAMP oproti PCR vyšší rozpoznávací schopnost. Jednou z možností je ztráta podstatné části vstupního produktu při manipulaci se vzorkem, a to s největší pravděpodobností již během kroku extrakce DNA z buffy coatu či nedostatečná čistota a homogenita vzorku. Optimalizací metod izolace a purifikace DNA a optimalizací metody LAMP bude i nadále věnována pozornost.

## Závěr

Metoda LAMP je využívána k detekci z veterinárního hlediska mnoha významných patogenů. V minulosti byla



již úspěšně použita pro detekci CAEV a díky této studii se prokázala její aplikovatelnost k detekci MVV. Fakt, že u jednoho prokazatelně pozitivního vzorku se nepodařila pomocí LAMP opakovaně prokázat přítomnost provirové DNA, ukazuje na současné rezervy v použití této metodiky. Je potřeba další optimalizace a úpravy protokolu, zejména pak v kroku extrakce provirové DNA, a to tak, aby metoda LAMP mohla být zařazena vedle ELISA testu a PCR, jakožto spolehlivý detekční postup, s přihlédnutím ke své specifitě, rychlosti a nenáročnosti provedení.

#### Poděkování

*Tato práce vznikla za podpory grantu Ministerstva zemědělství QJ1610096 a GAJU 120/2016/Z.*

#### Literatura:

1. PÉPIN, M., VITU, C., RUSSO, P., MORNEX, J.F., PETERHANS, E. Maedi-Visna virus infection in sheep: a review. *Vet Res* 1998;29:341-367.
2. STRAUB, O. C. Maedi-Visna virus infection in sheep. History and present knowledge. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004;27:1-5.
3. SIGURDSSON, B., PALSSON, P. A. Visna of sheep; a slow, demyelinating infection. *Br J Exp Pathol* 1958;39:519-528.
4. BRINKHOF, J., VAN MAANEN, C. Evaluation of five enzyme-linked immunosorbent assays and an agar gel immunodiffusion test for detection of antibodies to small ruminant lentiviruses. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14(9):1210-4.
5. CEBRA, C., CEBRA, M. Diseases of the Hematologic, Immunologic, and Lymphatic Systems (Multisystem) Diseases. In: PUGH, D.G. *Sheep and Goat Medicine*. New York; Elsevier Books, 2012:466-502.
6. NOTOMI, T., OKAYAMA, H., MASABUCHI, H., TOSHIHIRO, Y., WATANABE, K., AMINO, N., HASE, T. Loop-mediated isothermal amplification. *Nucleic Acids Res* 2000;28(12):e63.
7. NAGAMINE, K., WATANABE, K., OHTSUKA, K., HASE, T., NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template. *Clin Chem* 2001;47(9):1742-1743.
8. NZELU, C. O., CÁCERES, A.G., GUERRERO-QUINCHO, S., TINEO-VILLAFUERTE, E., RODRIGUEZ-DELFIN, L., MIMORI, T., UEZATO, H., KATAKURA, K., GOMEZ, E. A., GUEVARA, A. G., HASHIGUCHI, Y., KATO H. A rapid molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis by colorimetric malachite green-loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with an FTA card as a direct sampling tool. *Acta Trop* 2016;153:116-119.
9. KIM, H. J., KIM, Y. J., YONG, D. E., LEE, K., PARK, J. H., LEE, J. M., YOON, S. S. Loop-mediated isothermal amplification of vanA gene enables a rapid and naked-eye detection of vancomycin-resistant enterococci infection. *J Microbiol Methods* 2014;104:61-66.
10. HAWWA, R., AIKENS, J., TURNER, R. J., SANTARSIERO, B. D., MESECAR, A. D. Structural basis for thermostability revealed through the identification and characterization of a highly thermostable phosphotriesterase-like lactonase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Arch Biochem Biophys* 2009;488:109-120.
11. NAGAMINE, K., HASE, T., NOTOMI, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* 2002;16:223-229.
12. DHAMA, K., KARTHIK, K., CHAKRABORTY, S., TIWARI, R., KAPOOR, S., KUMAR, A., THOMAS, P. Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review. *Pak J Biol Sci* 2014;17(2):151-166.
13. BARTÁK, P., VÁCLAVEK, P., KOSTKOVÁ, M., MIKULÁŠKOVÁ, K., ŠIMEK, B. Prevalence lentivirových onemocnění malých přežvýkavců v ČR s využitím serologické diagnostiky. *Veterinářství* 2017;67(3):227-232.
14. HUANG, J., SUN, Y., LIU, Y., XIAO, H., ZHUANG, S. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA. *Arch Virol* 2012;157:1463-1466.
15. TOMITA, N., MORI, Y., KANDA, H., NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc* 2008;3(5):877-882.
16. MORI, Y., NAGAMINE, K., TOMITA, N., NOTOMI, T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289(1):150-154.
17. PARIDA, M., HORIOKEL, K., ISHIDA, H., DASH, P. K., SAXENA, P., JANA, A. M., ISLAM, M. A., INOUE, S., HOSAKA, N., MORITA, K. Rapid Detection and Differentiation of Dengue Virus Serotypes by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *J Clin Microbiol* 2005;43(6):2895-2903.
18. MANSOUR, S. M., ALI, H., CHASE, C. C., CEPICA A. Loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of 18 World Organization for Animal Health (OIE) notifiable viral diseases of ruminants, swine and poultry. *Anim Health Res Rev* 2015;16(2):89-106.
19. BALBIN, M. M., LERTANANTAWONG, B., SURARUENGCHAI, W., MINGALA, C. N. Colorimetric detection of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) through loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with gold nanoprobe. *Small Ruminant Res* 2017;147:48-55.

#### Adresa autorky:

**Ing. Dagmar Stehlíková**

**Zemědělská fakulta**

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Branišovská 1645/31a**

**370 05 České Budějovice**

**e-mail: dagmarstehlik@gmail.com**



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice



Státní  
veterinární  
ústav  
Jihlava

## **Certifikovaná metodika: Metodika odběru a zpracování vzorků, serologického a molekulárního stanovení lentivirového onemocnění ovcí a koz**

Metodika byla vypracovaná jako výstup výzkumného projektu MZe NAZV QJ 1610096 "Program zdravotní kontroly lentivirových infekcí malých přežvýkavců s využitím nových metod časně laboratorní diagnostiky a markerů geneticky podmíněné rezistence k infekci jako selekčního kritéria"

Prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr.h.c.  
Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
Ing. Antonín Vejčík, CSc.  
Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D.  
Ing. Kateřina Vernerová  
Ing. Barbora Farková  
Mgr. Bronislav Šimek  
MVDr. Petr Václavek, Ph.D.  
Mgr. Hana Plodková  
MVDr. Pavel Barták, Ph.D.

České Budějovice, listopad 2017

Metodika odběrů a zpracování vzorků, serologického a molekulárního stanovení  
původce lentivirového onemocnění ovcí a koz

Pavel Barták a kol.  
bartak@svujhlava.cz

Vypracováno za podpory výzkumného projektu MZe NAZV QJ 1610096 "Program zdravotní kontroly lentivirových infekcí malých přežvýkavců s využitím nových metod časně laboratorní diagnostiky a markerů geneticky podmíněné rezistence k infekci jako selekčního kritéria"

Oponenty metodiky byli:

Doc. MVDr. Pavel Novák, CSc.  
MVDr. Petr Šatrán, Ph.D.

Podíl autorů na vypracování metodiky:

Prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr.h.c. – 5%  
Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D. – 15%  
Ing. Antonín Vejčík, CSc. – 5%  
Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D. – 5%  
Ing. Kateřina Vernerová – 5%  
Ing. Barbora Farková – 5%  
Mgr. Bronislav Šimek – 35%  
MVDr. Petr Václavěk, Ph.D. – 10%  
Mgr. Hana Plodková – 5%  
MVDr. Pavel Barták, Ph.D. – 10%

*Text:* ©2017

*Foto:* ©2017

Vydáno bez jazykové úpravy

ISBN: 978-80-7397-671-5



Obsah:

<b>I. Cíl metodiky</b> .....	<b>2</b>
<b>II. Vlastní popis metodiky</b> .....	<b>4</b>
II.1. Úvod .....	4
II.2. Odběr vzorků biologického materiálu .....	6
II.3. Sérologická diagnostika: průkaz specifických protilátek proti SRLV .....	7
II.4. Vyhodnocení sensitivity a specifity sérologických testů .....	11
II.5. Detekce provirové DNA SRLV pomocí PCR metody .....	13
<i>Vzorkování</i> .....	14
<i>Příprava a zpracování buffy coatu</i> .....	14
<i>Extrakce DNA</i> .....	15
<i>Detekce cílové sekvence DNA</i> .....	15
<i>Sekvenční analýza DNA</i> .....	21
II.5. Diagnostika SRLV na základě LAMP analýzy .....	28
<i>Vzorkování</i> .....	28
<i>Extrakce DNA</i> .....	28
<i>Návrh primerů pro LAMP analýzu</i> .....	29
<i>Provedení LAMP analýzy</i> .....	29
<b>III. Srovnání novosti postupů</b> .....	<b>31</b>
<b>IV. Popis uplatnění metodiky</b> .....	<b>31</b>
<b>VI. Seznam publikací, které předcházely metodice</b> .....	<b>36</b>

## I. Cíl metodiky

Chov ovcí a koz je nyní jednou z priorit zemědělství, jak v LFA, tak v produkčních oblastech, a to i z důvodů udržování krajiny v kulturním stavu, využití produkce TTP, či zachování biodiverzity. Vzhledem k rostoucímu zájmu o chov ovcí a koz v ČR, je potřeba podporovat rozvoj chovu těchto přežvýkavců, a to z hlediska zdravotního stavu zvířat, welfare, šlechtění a podpory místního i mezinárodního obchodu s plemenným materiálem.

Lentiviry malých přežvýkavců SRLV, tedy maedi-visna virus ovcí (MVV) a virus infekční artritidy a encefalitidy koz (CAEV), způsobují významná onemocnění po celém světě. Tyto choroby vedou k ekonomickým ztrátám a s přihlédnutím k nakažovému opatřením, omezují možnosti obchodu s plemennými zvířaty. Pro tyto virové infekce neexistuje účinná vakcína či léčba. Současné poznatky ukazují, že používané diagnostické metody nejsou vždy zcela spolehlivé (z důvodů kmenové variability, či nízké úrovně virové zátěže). Je tedy třeba metody imunochemické a molekulárně biologické diagnostiky nadále zdokonalovat. Díky genomové analýze s použitím 50k SNP čipů pro ovce, bylo identifikováno několik kandidátních genů pro odolnost k onemocnění MV, přičemž nejsilnější vztah k odolnosti vykazuje gen Tmem154<sup>26</sup>. U koz je třeba tuto oblast prozkoumat, k čemuž snad dopomůže použití nového 52k SNP mikročipu<sup>27</sup>.

Cílem řešení projektu NAZV QJ 1610096, v rámci něhož byla metodika vypracována je **vypracovat nové diagnostické metody pro včasné odhalení infekčních agens, v tomto případě onemocnění maedi-visny (MV) ovcí a infekční artritidy a encefalitidy koz (CAE), provést průkaz virů MVV a CAEV pomocí imunologických metod a metod založených na molekulární detekci virů** a na základě genetického screeningu navrhnout program markery asistované selekce na rezistenci proti lentivirovým infekcím malých přežvýkavců (SRLV). Tímto prosazovat v plemenitbě genotypy odolnější k onemocnění.

**Cílem metodiky je podání uceleného souboru analytických postupů pro detekci SRLV a vytvoření platformy pro ozdravovací program lentivirových infekcí malých přežvýkavců (ovcí a koz).**

## II. Vlastní popis metodiky

### II.1. Úvod

Lentiviry malých přežvýkavců (SRLV), konkrétně maedi-visna virus ovcí (MVV) a virus infekční artritidy a encefalitidy koz (CAEV) způsobují celosvětově rozšířená onemocnění vyskytující se i v ČR. Lentiviry malých přežvýkavců způsobují maedi-visnu ovcí (MV) a artritidu a encefalitidu koz (CAE) a tyto choroby jsou neléčitelné a neexistují proti nim účinné vakcíny. Vzhledem k současné nakažové situaci jsou onemocnění MV a CAE významným problémem. Způsobují významné ekonomické ztráty a vytváří bariéru při obchodování s plemenným materiálem (nejen v EU), či při pořádání chovatelských akcí (výstavy, svody). Chovy v ČR zařazené v kontrole užitečnosti (KU) musí být MV a CAE prosté.

Současný kontrolní systém prováděný dle Metodiky kontroly zdraví zvířat a nařízené vakcinace, sleduje četnost nálezů pozitivních zvířat v jednotlivých chovech v KU, nejsou však stanovena opatření pro eradikaci nákazy. Plemeno, kde se dle zpráv od chovatelů předpokládá vyšší incidence onemocnění, tedy ovce šumavská, je z monitoringu vyjmuta. Její chovatelé primárně projevují zájem o vývoj markerů geneticky podmíněné rezistence. Stejně jako u eradikace klusavky (scrapie) na základě selekce rezistentních genotypů se i zde nabízí možnost zavedení eradikačního programu spojujícího časnou a přesnou diagnostiku společně s asistovanou selekcí podmíněnou markery genetické rezistence.

Soudobé poznatky ukazují, že používané diagnostické metody nejsou vždy zcela spolehlivé vzhledem ke složité patogenezi onemocnění. Nejspolehlivější je kombinace imunologických a molekulárně biologických metod, přičemž s přihlédnutím ke kmenové variabilitě, je třeba metody molekulárně biologické diagnostiky nadále zdokonalovat<sup>11</sup>. Krevní vzorky jsou primárně testovány metodou ELISA za účelem průkazu specifických protilátek. Suspektní vzorky jsou případně potvrzovány alternativními imunologickými metodami - imunodifuzním testem popř. imunoblotem. Sérologicky pozitivní vzorky a vybrané negativní vzorky jsou dále testovány na přítomnost provirové DNA metodou real-time PCR (qPCR) s cílem vyvinout co nejspolehlivější metodiku s přihlédnutím ke kmenové variabilitě a zároveň zmapovat distribuci jednotlivých genotypů lentivirů v populaci ovcí a koz.

Díky předchozím výzkumům založeným především na genomové analýze s použitím 50k SNP čipů pro ovce, bylo identifikováno několik kandidátních genů pro odolnost proti onemocnění MV. Nejsilnější vztah k odolnosti vykazují polymorfizmy v genu TMEM15<sup>26</sup>. U koz není tato problematika blíže probádána, nicméně nově vyvinutý 52k SNP mikročip, dává naději k identifikaci a následné analýze kandidátních genů pro odolnost u koz<sup>27</sup>.

Vzhledem k rostoucímu zájmu o chov ovcí a koz v ČR je potřeba podporovat rozvoj chovu těchto zvířat, včetně ohrožených domácích plemen, z hlediska zdravotního stavu zvířat, šlechtění i podpory obchodu s plemenným materiálem. Ozdravovací program od lentivirových infekcí malých přežvýkavců založený na kombinaci přesné a rychlé diagnostiky onemocnění a markery asistované selekce (MAS) se jeví jako možné východisko pro řešení současné nálezové situace.

## II.2. Odběr vzorků biologického materiálu

Pro diagnostické účely je odebírána periferní krev zvířat (věková kategorie: minimálně 4 měsíce po odstavu).

Krev je odebírána do plastových 10 ml zkumavek s antikoagulantem K<sub>3</sub>EDTA. Je třeba dodržet maximální hladinu krve označenou ryskou na zkumavce. Ihned po odběru je krev ve zkumavce nutné důkladně promíchat s antikoaguantem, uchovávat při +4°C a zpracovat bezprostředně po doručení do laboratoře.

Ze vzorků krve s K<sub>3</sub>EDTA je odstředěním separována plasma, buffy-coat (bílé krvinky + krevní destičky) a erytrocyty. Krevní plasma se používá pro sérologické vyšetření, buffy coat pro průkaz provirové DNA. Vzorky jsou archivovány při -80°C.

Chemikálie:

- 10 ml plastové odběrové zkumavky z K<sub>3</sub>EDTA

Přístroje:

- centrifuga
- sada automatických pipet
- vortex
- lednice
- hlubokomrazicí box

### II.3. Sérologická diagnostika: průkaz specifických protilátek proti SRLV

Zvířata infikovaná SRLV zůstávají imunokompetentní a reagují na infekci **tvorbou specifických protilátek**. Humorální odpověď na infekci MVV je významně pomalejší, než u jiných virových infekcí s akutním průběhem. **K sérokonverzi dochází různě a to od několika týdnů do několika měsíců po infekci. Protilátky typu IgG jsou po přirozené infekci MVV/CAEV přítomné po celou dobu života zvířete a slouží jako základní indikátor monitorování nákazy v chovech a selekční kritérium při eliminaci nákazy.**<sup>5</sup>

Lentivirové infekce mohou být v laboratorních podmínkách diagnostikovány jak virologickými tak sérologickými metodami. **Obecně je doporučována kombinace minimálně dvou testů kvůli confirmaci výsledků. Jako optimální postup laboratorní diagnostiky lentivirových infekcí je doporučována kombinace ELISA testu a přímého průkazu metodou PCR.**<sup>6</sup>

#### Sérologické metody

**Základem diagnostiky SRLV infekcí jsou sérologické metody**, zahrnující spektrum ověřených laboratorních technik. Jednak máme dispozici **screeningové testy** jako je **imunodifuzní test (IDT/AGID)** a různé varianty imunoenzymatických testů (**ELISA**). Druhou skupinou jsou testy s vyšší náročností provedení: radioimunoanalýza (RIA), radioimunoprecipitace (RIPA) a Western blot (WB). Tyto testy jsou složitější, relativně nákladné a časově náročné a proto jsou používány spíše používány pro výzkumné účely.

Sérologická diagnostika je využívána pro pravidelný zdravotní monitoring v negativní populaci či k identifikaci pozitivních chovů jako součásti programu eradikace. V chovech s potvrzeným výskytem SRLV jsou pak sérologické metody v kombinaci s PCR používány na identifikaci infikovaných jedinců vhodných k vyřazení v rámci ozdravení chovu. Za účelem screeningu či monitoringu jsou používány testy ELISA, které postupně nahradily méně citlivý IDT a od roku 2004 je používán ELISA jako test první volby pro mezinárodní obchod. ELISA test má obecně vyšší sensitivitu než IDT. Mnohé studie rovněž potvrdily, že test ELISA detekuje sérokonverzi v rannějších fázích infekce než test IDT. ELISA test je také ve srovnání s IDT značně rychlejší (2-3 hodiny vs. 2-3 dny) a umožňuje zpracování velkého množství vzorků.

**ELISA testy** na diagnostiku SRLV infekcí lze obecně rozdělit na **nepřímé a kompetitivní**. Nepřímé ELISA testy jako antigen využívají celý virus, rekombinantní proteiny nebo syntetické peptidy. Kompetitivní či blokovací testy jsou založeny na monoklonálních protilátkách proti definovaným epitopům viru.

**ELISA testy postavené na rekombinantních či peptidových antigenech** využívají např. rekombinantní proteiny kapsidy (CA) jako je p55, p25, p16, p14, transmembránový protein (TM) gp46 nebo purifikovaný obalový protein gp135.<sup>7,18</sup> Používány jsou rovněž syntetické peptidy odvozené od p25 nebo TM proteinu.<sup>6</sup>



Proteiny kapsidy jsou považovány za skupinově specifické antigeny s výraznou křížovou sérologickou reaktivitou mezi izoláty viru maedi-visna, která zahrnuje rovněž izoláty viru CAE.<sup>2</sup> TM glykoprotein je pokládán za vysoce imunogenní komponentu viru. Experimenty s rekombinantním TM glykoproteinem prokázaly přítomnost protilátek až u 97% infikovaných ovcí.<sup>19</sup>

Protilátky proti kapsidovému proteinu p25 vzrůstají relativně brzo po infekci a hladina těchto protilátek začne klesat, když se objeví klinické příznaky. Protilátky proti obalovým glykoproteinům gp46 a gp135 vzrůstají později po infekci a perzistují přes klinickou fázi.<sup>6,20</sup> **Většina současných komerčních ELISA testů tak využívá kombinaci kapsidového proteinu (např. p25, p27, nebo p28) viru maedi-visna produkovaného na *Escherichia coli* a peptidu získaného z imunodominantního regionu transmembránového proteinu gp46.** Výsledkem je pak **sensitivita pohybující se u různých testů většinou nad 90% a vysoká specifita v rozmezí 96-100%.**

Problémem sérologické diagnostiky zůstává i přes vysokou vysokou sensitivitu i specifitu testů tzv. **intermitentní sérologická odezva**. Ta se projevuje časovou variabilitou humorální odezvy a to od několika týdnů do několika měsíců po infekci. Obecně se předpokládá, že titr protilátek při sérokonverzi dosáhne maximální výše a pak klesne na nižší, ale stabilní hladinu. Některé studie ovšem uvádí, že u určitého procenta zvířat (10-20%) dochází k tzv. intermitentní protilátkové odezvě zjištěné jak ve WB, IDT či ELISA testu a toto období může trvat týdny, měsíce ale i roky.<sup>6,22</sup> Titry protilátek proti různým proteinům (p25, p16, p14 nebo proteinům obalu) pak mohou průběžně kolísat nebo mohou dočasně klesnout pod detekční schopnost testů a vykazovat tak negativní výsledek. Tento fenomén v praxi komplikuje diagnostiku a eradikaci infekcí SRLV.

### **Použitelnost metod sérologie**

Kvůli výše popsaným omezením je sérologie vhodná zejména pro screening stád či průběžný monitoring, ale omezeně použitelná k identifikaci zdravotního statusu u jednotlivých zvířat. Zde je vhodné přistoupit k opakovanému vyšetření zvířete (tzv. párové vzorky) a to s odstupem několika měsíců od prvního odběru. Vhodná je také doplnění vyšetření přímým průkazem viru testem PCR. Průkaz provirové DNA viru testem PCR je citlivější než ELISA test v ranných fázích infekce, protože detekuje infikované zvíře ještě před sérokonverzí. To lze využít při eradikaci nákazy na úrovni stáda, kdy jsou testem PCR testovány sérologicky negativní zvířata. Obecně je ale PCR diagnostika SRLV hodnocena jako méně citlivá než ELISA testy a to kvůli nízkému množství viru vylučovanému následně během dalších fází infekce po sérokonverzi. Pro optimální detekci SRLV infekce lze doporučit kombinaci vhodně vybraného ELISA testu a PCR. Kvůli genetické a antigenní variabilitě je nutné testy ověřit s ohledem na právě cirkulující kmeny viru v daném regionu.

## **Provedení testů**

Provedení konkrétních testů uvedených v tabulce č.1. se řídí návodem výrobce diagnostické soupravy. Vzorkem k detekci specifických protilátek je plazma získaná způsobem popdaným v kapitole II.2. Testy je vhodné doplnit interními pozitivními kontrolami terénních sér z vyšetřovaných chovů.

Tabulka č. 1. Přehled dostupné komerční serologické diagnostiky (ELISA, IDT) používané k rutinnímu testování SRLV

Název testu	Výrobce	Typ testu	Výpočet	Cut-off	Proteiny viru použité v testu	Sensitivita (Se)	Specifita (Sp)	Reference (Se, Sp) - literatura
IDEXX MVV/CAEV p28 Ab Screening Test	IDEXX Laboratories, Inc., USA (IDEXX Montpellier SAS, Francie)	nepřímý ELISA test	$S/P \% = \frac{OD \text{ vzorek} - OD \text{ NK}}{OD \text{ PK} - OD \text{ NK}}$	cut-off = 1,1 - 1,2	Imunogenní peptidy transmembránových proteinů (TM, ENV gene) a z rekombinantního proteinu p28, který je součástí virové kapsidy (Gag gene).	84,3-100%	96,3-100%	7, 23
IDEXX MVV/CAEV p28 Ab Verification Test	IDEXX Laboratories, Inc., USA (IDEXX Montpellier SAS, Francie)	nepřímý ELISA test dvoujamkový verifikační	$S/P \% = 100 \times \frac{(OD \text{ vzorek}_{\text{+}} - OD \text{ vzorek}_{\text{0}})}{(OD \text{ PK}_{\text{+}} - OD \text{ PK}_{\text{0}})}$	cut-off = 110 - 120	Imunogenní peptidy transmembránových proteinů (TM, ENV gene) a z rekombinantního proteinu p28, který je součástí virové kapsidy (Gag gene).	98,6-100%	96,3-100%	7
IDEXX CAEV/MVV Total Ab Test	IDEXX Laboratories, Inc., USA (IDEXX Switzerland AG, Švýcarsko)	nepřímý ELISA test	$S/P \% = 100 \times \frac{(OD \text{ vzorek} - OD \text{ NK})}{(OD \text{ PK} - OD \text{ NK})}$	cut-off (ovce) = 50-60% cut-off (koza) = 30-40%	Celý virus - inaktivovaný - MVV (kmen OLV).	99%	99,8% (100%)	6, 9, 10, 11
Eitest MVV/CAEV	HYPHEN BioMed Neuville-sur-Oise, Francie	nepřímý ELISA test	Cut-off = (PK-NK)/4 + NK	cut-off = různé dle výpočtu	Syntetický peptid imunodominantního transmembránového proteinu gp46 a rekombinantní hlavní kapsidový protein p25 kapsidy MVV.	99,4% (97,8%)	99,3% (98,2%)	6, 7, 12, 17, 24
ID Screen® MVV / CAEV Indirect	IDiET 310 rue Louis Pasteur 34790 GRABELS, Francie	nepřímý ELISA test	$S/P \% = 100 \times \frac{(OD \text{ vzorek} - OD \text{ NK})}{(OD \text{ PK} - OD \text{ NK})}$	cut-off = 50-60%	Kombinace peptidů MVV/CAE z oblasti GAG (group-specific antigen), TM (transmembránové proteiny) and ENV genes (obalové proteiny).	91,70%	98,90%	13, 14
Small Ruminant Lentivirus Antibody Test kit	VMRD Inc. NW, 425 Old Albion Rd, Pullman, WA 99163, USA	kompetitivní ELISA	$\% I (\text{inhibice}) = 100 \times \frac{(1 - OD \text{ vzorek} - OD \text{ NK})}{(1 - OD \text{ vzorek} - OD \text{ NK})}$	cut-off = 35%	Povrchový gp135 env glykoprotein viru CAEV-63 navázaný na monoklonální protilátku F7-299 (bez vyúžití gag proteinu).	99,50%	100%	6, 15, 16
LSIVet™ Ruminant (MAEDI)-VISNA/CAEV Serum ELISA Kit	LSI - Laboratoire Service International 6 Allée des Ecurieuls 69380 Lissieu, Francie	blokovácí ELISA	$\% \text{ inh} = \frac{(OD_{\text{m.NC}} - OD \text{ Sample}) \times 100}{OD \text{ m.NC}}$	cut-off = 35%	Povrchový protein gp135 viru MVV/CAEV navázaný na monoklonální protilátku.	100,00%	100%	25
Eradikit™ SRLV Genotyping kit	In3diagnostic s.r.l. Largo P.Braccini, 2, 10095, Guglielmo (TO) Italia	nepřímý ELISA test	pozitivní vz. = (OD <sub>265</sub> )>0,4	cut-off = 0,4	Mix peptidů MVV/CAE z oblasti GAG (group-specific antigen) a ENV genes (obalové proteiny) od dvou rozdílných genotypů.	96,8-100%	94,6 - 99,4%	23
AGID (MAEDITEC '100'	APHA Scientific, New Haw, Addlestone, Surrey, United Kingdom	imunofluoresní test	-	-	Celý virus.	65,3%	98,3%,	6, 7, 17

## II.4. Vyhodnocení sensitivity a specifity sérologických testů

Sensitivita testů může být významně ovlivněna vysokou genetickou variabilitou viru, druhem použitého antigenu, druhem zvířete a stadiem infekce. Pro dosažení optimálního výsledku sérologické diagnostiky je třeba provedení širší srovnávací studie dostupných testů s cílem stanovení vhodné kombinace testů pro příslušný region. Genetická heterogenita SRLV ovlivňuje jak na průkaz genomu tak testy založené na detekci virových proteinů. Nevhodně zvolené testy mohou snižovat sensitivitu, produkovat falešně negativní výsledky a komplikovat tak rannou diagnostiku infekce SRLV.

Přehled dostupné sérologické diagnostiky používané v České republice k diagnostice SRLV je uveden v tabulce č 1. Používány jsou zde různé druhy komerčních ELISA testů nebo imunodifuze. Imunodifuzní test (IDT/AGID) je postaven na celém viru a detekuje zejména protilátky proti kapsidovému proteinu p25viru MV (u koz p28 viru CAE) a obalovému glykoproteinu gp135. Specifita imunodifuzního testu je vysoká a pohybuje se kolem 98,3%, ale nevýhodou je jeho nízká senzitivita (76%). Proto bývá IDT využíván spíše jako orientační test a za určitých okolností může být použit i pro confirmaci výsledku získaného ELISA testem.<sup>6,7</sup>

**Sensitivita ELISA testů se pohybuje většinou nad 90% a specifita bývá obecně velmi vysoká (96-100%).** Každý z testů používaných k sérologické diagnostice má své přednosti a nevýhody s ohledem na potenciální možnosti využití, kterými jsou zejména jejich různá specifita a senzitivita. Protože **neexistuje žádný oficiální „zlatý standard“ sérologických testů na diagnostiku infekcí SRLV,** jsou testy většinou porovnávány navzájem mezi sebou a výsledné studie tak mají různou obtížně porovnatelnou kvalitu. Ve studiích na určení specifity a sensitivity by měla být využita experimentálně infikovaná zvířata s jasně definovaným infekčním statutem a dle OIE doporučený počet minimálně 300 pozitivních a 1000 negativních vzorků (OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 2000).<sup>21</sup> Tato kritéria nejsou praxi reálně dosažitelná, a proto jsou využívány různým způsobem definované vzorky po přirozené infekci. **Zjištěná senzitivita a specifita testů se podle přístupu v různých studiích může výrazně lišit. Významnější rozdíly bývají hlavně v sensitivitě testů, specifita bývá většinou vysoká.** Ojedinele se mohou vyskytovat i falešně pozitivní výsledky, u kterých důvod reakce není možno objektivně objasnit.<sup>7</sup> V posledních letech se v některých evropských zemích objevily falešně pozitivní reakce způsobené nedostatečně purifikovanými vakcínami proti viru katarální horečky ovcí.<sup>13</sup>

Pro vyhodnocení relativní sensitivity komerčních ELISA testů na vzorcích z České republiky byl použit soubor terénních vzorků ovcí a koz z různých chovů, které byly sérologicky pozitivní v imunodifuzním testu (IDT/AGID MAEDITEC). Jako nejvíce

citlivý test se jeví Elitest MVV/CAEV, srovnatelnou úroveň vykazuje ID Screen MV Indirect. Nejméně citlivý test v tomto porovnání byl IDEXX MVV/CAEV p28 Ab Screening Test při dodržení kritérií hodnocení daných výrobcem.

**Pro sérologickou diagnostiku SRLV na území ČR jsou vhodné komerční ELISA testy Elitest MVV/CAEV (Hyphen) a ID Screen MV Indirect (IDvet), popř. jejich kombinace při nutnosti konfirmačního vyšetření.**

## II.5. Detekce provirové DNA SRLV pomocí PCR metody

Použití sérologických a molekulárních diagnostických testů pro detekci SRLV (Small Ruminant Lentivirus) je závislé na několika faktorech, jako je například druh testu, procentuální identita virové nukleotidové sekvence detekované ve stádech v dané oblasti a virové sekvence, na základě které se připravují diagnostické postupy a testovací reagenty. Dále je aplikace testů závislá na patogenezí v jednotlivých chovech (regionech) a na míře provirové DNA a SRLV protilátek generujících se během virémie u jednotlivých zvířat daného druhu. (Herrmann-Hoesing, 2010).

U novorozených jehňat a kůzlat od SRLV pozitivních matek, od kterých obdrží velkou část jejich novorozenecké imunity prostřednictvím pasivního přenosu prostřednictvím kolostra a mléka, mohou být sérologické a molekulárně biologické testy falešně pozitivní. Předchozí studie ukázaly, že pokud jsou jehňata přirozeně kojena od SRLV pozitivních matek, jsou u nich detekovány SRLV protilátky po prvním dni sání až do 52. týdne stáří. Obdobná situace je i u detekce provirové DNA, která může být detekována v periferních krevních mononukleárních buňkách až do 24. týdne stáří. Z těchto důvodů je doporučeno testovat zvířata alespoň 4-6 měsíců po odstavu (Herrmann-Hoesing et al. 2007).

K prokázání provirové DNA sekvence lentivirů u malých přežvýkavců je použita molekulárně biologická metoda PCR (polymerázová řetězová reakce). Principem této metody je multiplikace úseku cílové sekvence vybraného genu z provirové DNA vznikající po integraci virového genomu do hostitelské DNA pomocí specifických primerů, které tuto sekvenci ohraničují. Specifita výsledného PCR produktu lze ověřit pomocí sekvenční analýzy a porovnáním získané sekvence se sekvencemi uložených v dostupné databázi NCBI.

Na základě poznatků z předchozích studií je molekulární diagnostika zaměřena na detekci provirové DNA z hostitelské buňky (leukocyty, event. mononukleární buňky) oproti přímé detekci RNA volného viru v plasmě, séru nebo v dalších tělních tekutinách z důvodu vyšší zachytitelnosti infektu v průběhu virémie. Podobný efekt by měl být dosažen také při extrakci provirové DNA z alveolárních makrofágů získaných pomocí plicní laváže (nebo sekčního biologického materiálu). Tento diagnostický postup je ale mnohem pracnější a lze jej aplikovat pouze u menšího počtu zvířat.

Další možností detekce provirové sekvence SRLV je metoda real-time PCR, při které je provirová DNA amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí pomocí DNA polymerázy, specifických primerů a fluoroforu (Sybr Green, Evo Green, atd.). V průběhu nasedání primerů (annealingová fáze) a elongace řetězce dochází k vazbě interkalujícího barviva se vznikající dvouřetězovou DNA. Sybr Green po vazbě s dsDNA emituje silný fluorescenční signál. Intenzita fluorescence je přímo úměrná množství amplifikačního produktu v reakční směsi. Výsledek je sledován v reálném čase a je vyhodnocen pomocí příslušného softwaru Real-time PCR systému na základě hladiny fluorescence. Nevýhodou této metody je nespecifické



nasedání barviva a je nutné věnovat velkou pozornost navržení specifických primerů pro daný úsek DNA sekvence. Vznik nespecifických produktů amplifikace lze odhalit pomocí analýzy křivky tání.

**Souhrn způsobů, jak maximalizovat citlivost a specifičnost molekulárně biologických metod detekující genom SRLV je následující (Herrmann-Hoesing, 2010):**

1. Navrhovat primery pro více konzervativní regiony provirového genomu jako jsou například geny *pol*, *ltr*, *gag*, *env*.
2. Navrhovat primery specificky nasedající na sekvenci pozitivní kontroly (referenční kmeny) a současně na provirovou sekvenci SRLV kmenů vyskytující se v kontrolovaném stádu.
3. Kontrolovat specifitu amplifikačního produktu pomocí sekvenace.
4. U vzorků s negativním PCR výsledkem použít k ověření výsledku interní kontrolu v podobě „housekeeping“ genu jako je například geny pro beta-aktin, cytochrom B, GAPDH nebo 18S ribosomální RNA.
5. Netestovat zvířata mladší než 4 měsíce po odstavu.

## **Vzorkování**

Pro diagnostické účely se odebírá periferní krev zvířat (věková kategorie: minimálně 4 měsíce po odstavu. Odebraná krev, která je ošetřena antikoagulantem K<sub>3</sub>EDTA, je testována po separaci plasmy a krevních elementů na průkaz protilátek i provirové DNA.

## **Příprava a zpracování buffy coatu**

Plná krev s K<sub>3</sub>EDTA o objemu 5 ml je centrifugována v původní odběrové zkumavce při 2 000 x g po dobu 20 minut. Po této centrifugaci jsou separovány tři základní krevní složky: plasma, buffy-coat (bílé krvinky + krevní destičky) a červené krvinky. Po opatrném odpipetování krevní plasmy, která se používá pro sérologické vyšetření, je přepipetována střední vrstva – buffy coat do čisté 1,5 ml zkumavky typu eppendorf. Aby bylo odstraněno reziduum plasmy, je získaný buffy coat opět centrifugován při 2 500 x g po dobu 20 minut. Dodatečné pročištění buffy coatu od erytrocytů se provádí pomocí lyzačního roztoku RLE o složení: NH<sub>4</sub>Cl, NaHCO<sub>3</sub>, EDTA, finální pH 7,3. Bezprostředně po přečištění buffy coatu se z něj extrahuje DNA nebo je archivován při -80°C.

## **Extrakce DNA**

Extrakce DNA z hostitelských buněk se provádí pomocí automatu MagNA Pure LC a komerčního kitu MagNA Pure LC Total NA Isolation kit určeného pro tento přístroj a pro tento typ extrakce. Před vlastní automatickou izolací je proveden preizolační krok pomocí lyzačního roztoku a proteinázy K. Složení prelyzačního roztoku: GuSCN, Tris-HCl (pH 6,4), EDTA (pH 8,0), Triton X-100. Připravený buffy coat je lyzován pomocí 300 ul lyzačního roztoku a 3 ul proteinázy K (50 mg/ul) v termomixeru při nastavené teplotě 56 °C po dobu 90 minut. Po této inkubaci je provedena teplotní inaktivace enzymu při 96 °C po dobu 10-20 minut.

## **Detekce cílové sekvence DNA**

Po screeningovém sérologickém vyšetření je vybrána extrahovaná DNA, u které je provedena testace na přítomnost provirové DNA pomocí nested PCR dle publikace (Grego et al., 2007). Amplifikace cílového úseku provirové DNA je provedena pomocí dvou párů specifických primerů, které tento úsek ohraničují. Cílová oblast genomu je konzervativní oblast *gag* genu. Výsledný amplifikační a reamplifikační produkt o délce 1,3 kb a 0,8 kb. je detekován v agarózovém gelu procházejícím UV světlem po jednosměrné horizontální elektroforéze a vyhodnocen pomocí programu Gel-Pro Analyzer.

Pro ověření správného postupu extrakce DNA a přítomnosti inhibičního faktoru byla zvolena paralelní real-time PCR reakce detekující kontrolní gen pro  $\beta$ -aktin. Beta-aktin je jednou ze šesti aktinových izoform. Aktiny jsou vysoce konzervativní geny zapojené v buněčné motilitě, stavbě a integritě. Aktin je jedna z nejhojnějších intracelulárních bílkovin eukaryotických buněk. Beta-aktin je jako globulární protein hlavní součástí kontraktilního aparátu a jeden ze dvou nesvalových cytoskeletárních aktinů. K detekci genu pro  $\beta$ -aktin se do reakce s templátovou DNA získanou z testovaného zvířete přidává jeden pár specifických primerů a jedna sonda značenou fluorofórem Hex (Toussaint et al., 2007).

V průběhu real-time PCR je vizualizace amplifikačního produktu zajištěna nasednutím specifické fluorescenční sondy typu Taqman pro daný úsek. V elongační fázi dochází k jejímu rozložení pomocí exonukleázové aktivity Taq polymerázy a tím i k uvolnění fluorescenčního záření. Real-time PCR probíhá v termocyklérech, které umožňují teplotní cyklování a zároveň detekují fluorescenci v každém cyklu PCR. Intenzita fluorescence je přímo úměrná množství amplifikačního produktu přítomného v reakční směsi.

### Sekvence primerů používaných pro detekci *gag* genu.

(Grego et al., 2007)

Primer	Sekvence '5—3'
GAG F1	TGGTGARKCTAGMTAGAGACATGG
POL R1	CATAGGRGGHGC GGACGGCASCASCA
GAG F2	CAAACWGTRGCAATGCAGCATGG
POL R2	GCGGACGGCASCACACG

### Sekvence primerů a sondy používaných detekci genu pro $\beta$ -aktin.

(Toussaint et al., 2007)

Primer/sonda	Sekvence '5—3'
ACT1005 F	CAGCACAATGAAGATCAAGATCATC
ACT1135 R	CGGACTCATCGTACTCCTGCTT
ACT1081 próza HEX	TCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGT

PCR reakce probíhá v cílovém objemu 25  $\mu$ l.

Amplifikace i reamplifikace probíhá v konvenčním termocykleru TRIO (Biometra) při níže uvedených teplotních profilech.

#### Příprava mastermixu:

1. Reakční směs se připravuje vždy nová.
2. Roztoky a reagentie po rozmražení dobře promíchat a krátce stočit při 10 000 rpm/10s.
3. Reagentie po krátké centrifugaci vytemperovat v chladicím boxu přibližně na 0,5 až 4°C.
4. Do PCR zkumavky napipetovat reagentie a roztoky v pořadí a objemu níže uvedeném.
5. Po napipetování vzorků nebo kontrol je nutné okamžitě zavřít PCR zkumavku.
6. V každém kole analýz je nutná přítomnost pozitivní i negativní kontroly (již od extrakce) pro ověření chodu PCR a vyloučení křížové kontaminace.

### Složení reakční směsi pro PCR

Reagencie	Objem (μl)	Výsledná konc.
PCR H <sub>2</sub> O	16,4	
10 x PCR pufr complete	2,5	1 x
dNTP(10 mM)	0,3	0,12 mM
Primer GAG F1(25 μM)	0,3	0,3 μM
Primer GAG R1(25 μM)	0,3	0,3 μM
Fast Start Taq Polymeráza (5U/μl)	0,2	1U/reakci
Extrahovaná DNA	5	

### Teplotní profil PCR (amplifikace)

Krok	Teplota (°C)	Čas/cyklování
1(denaturace a aktivace)	95	10 min
2(denaturace)	95	1 min
3(annealing)	55	35 s
4(elongace)	72	1 min
5(cyklování)	Zpět na krok č. 2	35 x
6(finální elongace)	72	7 min
7(chlazení)	10	∞

### Složení reakční směsi pro nPCR

Reagencie	Objem (μl)	Výsledná konc.
PCR H <sub>2</sub> O	18,9	
10 x PCR pufr complete	2,5	1 x
dNTP(10 mM)	0,3	0,12 mM
Primer GAG F1(25 μM)	0,3	0,3 μM
Primer GAG R1(25 μM)	0,3	0,3 μM
Fast Start Taq Polymeráza (5U/μl)	0,2	1U/reakci
Extrahovaná DNA	2,5	

### Teplotní profil PCR (reamplifikace)

Krok	Teplota (°C)	Čas/cyklování
1(denaturace a aktivace)	95	10 min
2(denaturace)	95	1 min
3(annealing)	60	35 s
4(elongace)	72	1 min
5(cyklování)	Zpět na krok č. 2	35 x
6(finální elongace)	72	7 min
7(chlazení)	10	∞

Real-time PCR reakce probíhá v cílovém objemu 25  $\mu$ l.  
Amplifikace probíhá v real-time PCR systému CFX-96 (Bio-Rad) při níže uvedeném teplotním profilu.

#### Příprava mastermixu:

1. Reakční směs se připravuje vždy nová.
2. Roztoky a reagentie po rozmražení dobře promíchat a krátce stočit při 10 000 rpm/10s.
3. Reagentie po krátké centrifugaci vytemperovat v chladicím boxu přibližně na 0,5 až 4°C.
4. Do PCR stripu napipetovat reagentie a roztoky v pořadí a objemu níže uvedeném.
5. Po napipetování vzorků nebo kontrol je nutné okamžitě uzavřít PCR strip stripovými víčky.
6. V každém kole analýz je nutná přítomnost pozitivní i negativní kontroly (již od extrakce) pro ověření chodu PCR a vyloučení křížové kontaminace.

#### Příprava primer-sonda mixu (finální objem 200 $\mu$ l)

Reagentie	Koncentrace	Objem ( $\mu$ l)
ssprimer ACT1005F	100 $\mu$ M	5
ssprimer ACT1135R	100 $\mu$ M	5
ACT1081 proba HEX	100 $\mu$ M	2,5
PCR H <sub>2</sub> O		187,5 $\mu$ l

### Složení reakční směsi pro real-time PCR

Reagenci	Objem (μl)
PCR H <sub>2</sub> O	8
2X QuanTitect Probe PCR Master Mix	12,5
Primer-sonda mix	2
Extrahovaná DNA	2,5

### Teplotní profil real-time PCR

Krok	Teplota (°C)	Čas/cyklování
1(denaturace a aktivace)	95	10 min
2(denaturace)	95	15 s
3(annealing+ elongace)	60	60 s
5(cyklování)	Zpět na krok č. 2	41 x

### ELFO

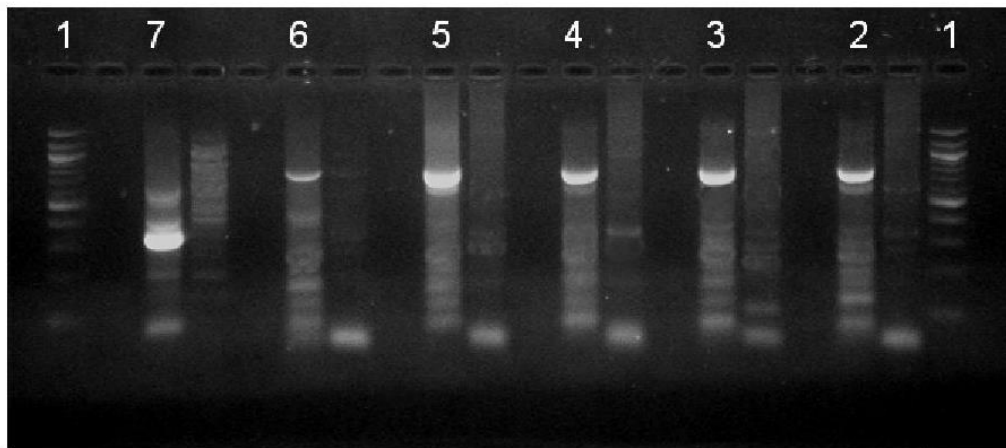
PCR produkty se detekují na 1,5%-2% agarozovém gelu v 1x TBE pufru. Podmínky separace: 120 V 1hod. Jako velikostní marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu a procházejícím UV světlem o vlnové délce 312 nm. Vyhodnocení gelu se provádí pomocí vyhodnocovacího zařízení, jehož součástí je kamerový systém, UV transiluminátor a vyhodnocovací software. Pomocí tohoto programového vybavení je možné pomocí velikostního markeru a pozitivní kontroly potvrdit (stanovit) velikost očekávaného specifického PCR produktu. Po provedení elektroforézy je výsledek zdokumentován a uložen do databáze pro dodatečné vyhodnocení nebo ověření.



## Vyhodnocení testu

### PCR

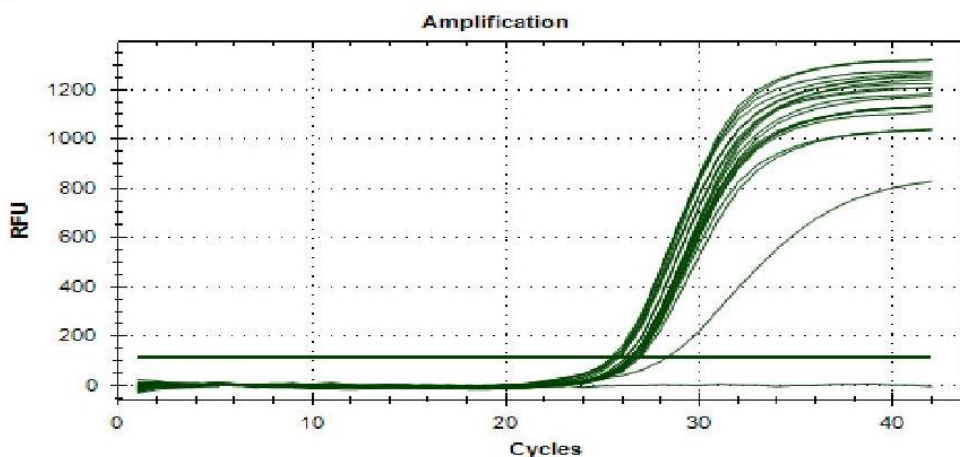
Amplifikační produkt prvního kroku PCR má délku 0,8 kb. Výsledný produkt druhého kroku PCR (nPCR) je o délce 1,3 kb. V případě positivity negativní kontroly (PCR H<sub>2</sub>O) a negativity pozitivních kontrol je nutné analýzu opakovat.



Obr.č.1: Vyhodnocení ELFO; start č.1(velikostní marker 100bp), start č.2-6(specifický reamplifikační produkt PCR), start č.7 (negativní vzorek s nespecifickým produktem)

### Real-time PCR

V případě negativního výsledku PCR metody a při hodnotě Ct (HEX) > 40 je nutné extrahovanou DNA naředit PCR vodou v poměru 1:2 nebo 1:5 a oba testy opakovat.



Obr. č. 2: Amplifikační křivka kontrolního genu pro  $\beta$ -aktin.

## **Sekvenční analýza DNA**

Ověření specifity PCR produktu je možné provést pomocí konfirmační PCR metody nebo pomocí sekvenční analýzy.

Sekvenování DNA v současné době patří k standardním metodám molekulárně-genetických analýz biologického materiálu. Pomocí sekvenace DNA je možné určit pořadí jednotlivých nukleotidů v řetězci DNA a analýzou determinované sekvence získat relevantní informace, které mohou například sloužit při výše zmíněném ověření specifity získaného PCR produktu nebo při genotypování a druhovém zařazení biologických agens, rostlin nebo živočichů.

Výsledný přečištěný PCR produkt slouží jako templátová DNA pro sekvenční reakci, při které je nukleová kyselina denaturována a získaná jednořetězcová DNA slouží jako templát pro syntézu druhého komplementárního řetězce. Syntéza je zprostředkována enzymem polymerázou a reakce je upravena tak, že v určitých místech dochází v závislosti na sekvenci templátového vlákna k ukončení (terminaci) syntézy. Pokud jsou pro detekci sekvenčních produktů použity fluoroforem značené terminátory ddNTP, detekuje se 3'-konec molekuly a tím se i definuje pořadí nukleotidových bází v řetězci DNA.

Po skončení rozdělení DNA na jednotlivé úseky dochází k průchodu těchto terminovaných úseků prostřednictvím automatické kapilární elektroforézy laserovým detektorem. Energie vyzářená z fluorescenčních barviv je zachycovaná speciální CCD kamerou. Jednotlivým úsekům je poté za pomoci algoritmu přiřazována číselná hodnota (RFU).

Tento komplikovaný a přesně kalibrovaný proces můžeme shrnout do dvou kroků. Výsledkem prvního kroku sekvenční analýzy je tzv. elektroforetogram. Jedná se o grafické znázornění výsledných dat. Jednotlivé báze jsou v elektroforetogramu značeny odlišnými fluorescenčními barvami - cytosin je značen modře, thymin červeně, adenin zeleně a guanin žlutě. Následuje druhý krok sekvenční analýzy, kdy jsou data získaná ze sekvenátoru zpracována speciálním typem softwaru.

### **Purifikace nPCR produktu**

Purifikace PCR produktu před provedením sekvenční analýzy je realizována prostřednictvím kolonkového kitu NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Reamplifikační produkt o velikosti 0,8 kb je vyříznut z elektroforetického gelu pomocí skalpelu a následně přenesen do čisté 1,5 ml zkumavky. Do zkumavky s PCR produktem je napipetován vázací pufr NT1 o objemu 20 µl a objem doplněn do 150 µl pomocí PCR H<sub>2</sub>O. Následují purifikační kroky pomocí promývacího pufru a centrifugace (11 000 rcf/30 s). Přečištěná DNA na kolonce je inkubována s 20 µl elučního pufru EN po dobu 1 min při pokojové teplotě a následně je centrifugována (11 000 rcf/1 min) do 1,5 ml zkumavky. Přečištěná nukleová kyselina se skladuje při -20°C nebo při dlouhodobější archivaci v teplotním rozsahu -70 až -80°C.

## Provedení sekvenace DNA

Sekvenace přečištěného PCR produktu je provedena prostřednictvím externí laboratoře (GATC-Biotech, Seqme). Složení zasláního roztoku s templátovou DNA je následující: 5 μl PCR produktu (20-80 ng/μl) a 5 μl primeru (5 μM) pro oba směry odděleně. Akceptovatelný formát pro zaslání je 1,5 ml zkumavka nebo 96-ti jamková destička. Sekvenace přečištěného templátu je provedena technikou zvanou Sangerova (dideoxy) metoda na genetických kapilárních analyzátořech Applied Biosystems 3500/3500xL prostřednictvím BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) za standardních podmínek. Získaná data jsou dostupná on-line ve formátech .ab1 (chromatogram) a FASTA, která jsou dále zpracována v programu BioEdit a upravené sekvence porovnány s on-line dostupnou databází nukleotidových sekvencí NCBI prostřednictvím algoritmu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

### Porovnání sekvenace testovaného vzorku s referenční sekvencí (EU010126) z NCBI:

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      10      20      30      40      50
Vzorek   GAAAGGCAGC TAGCCTAATA TGCTACTACC TGGACAAGTA AAGATATACT
SRLV (NCBI) GAAAGGCAGC TAGCCTAATA TGCTACTACC TGGACAAGTA AAGATATACT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      60      70      80      90     100
Vzorek   AGAAGTATTG GCCATGATGC CAGGGAATAG AGCACAATAA GAACTAATAC
SRLV (NCBI) AGAAGTATTG GCCATGATGC CAGGGAATAG AGCACAATAA GAACTAATAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      110     120     130     140     150
Vzorek   AAGGAAATTT AAATGAGGAA GCAGAAAGGT GGAGAAGAAA CAATCCACCA
SRLV (NCBI) AAGGAAATTT AAATGAGGAA GCAGAAAGGT GGAGAAGAAA CAATCCACCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      160     170     180     190     200
Vzorek   CCTCCAGCAG GAGGAGGAT AACGTGGAT CAAATTATGG GAGTAGGACA
SRLV (NCBI) CCTCCAGCAG GAGGAGGAT AACGTGGAT CAAATTATGG GAGTAGGACA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      210     220     230     240     250
Vzorek   AACAAATCAA GCAGCTGCC C AAGCTAACAT GGAACAAGCA AGACAAACT
SRLV (NCBI) AACAAATCAA GCAGCTGCC C AAGCTAACAT GGAACAAGCA AGACAAACT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      260     270     280     290     300
Vzorek   GCTTGCAATG GGTAATATCA GCATTAAGAG CTGTAGGCA TATGGCTCAT
SRLV (NCBI) GCTTGCAATG GGTAATATCA GCATTAAGAG CTGTAGGCA TATGGCTCAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|

```



Vzorek 310 320 330 340 350  
 AGACCAGGGA ATCCATGTT AGTAAAACAA AAAGAAATG AGCCATATGA  
 SRLV (NCBI) AGACCAGGGA ATCCATGTT AGTAAAACAA AAAGAAATG AGCCATATGA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 Vzorek 360 370 380 390 400  
 AGATTGCA GCAGCTGC TGAAGCAAT AGATGCAGAA CAGTACAC  
 SRLV (NCBI) AGATTGCA GCAGCTGC TGAAGCAAT AGATGCAGAA CAGTACAC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 Vzorek 410 420 430 440 450  
 AACCTATAA AGAATATTTA AATTAACTC TGTCATATAC AAATGCTCC  
 SRLV (NCBI) AACCTATAA AGAATATTTA AATTAACTC TGTCATATAC AAATGCTCC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 Vzorek 460 470 480 490 500  
 TCAGACTGCC AAAAACAAAT GGACAGAGTA TTAGGACAAA GAGTACAACA  
 SRLV (NCBI) TCAGACTGCC AAAAACAAAT GGACAGAGTA TTAGGACAAA GAGTACAACA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 Vzorek 510 520 530 540 550  
 AGCTAGTGTA GAAGAAAAA TGCAAGCATG CAGGATGTG GGATCAGAAG  
 SRLV (NCBI) AGCTAGTGTA GAAGAAAAA TGCAAGCATG CAGGATGTG GGATCAGAAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 Vzorek 560 570 580 590 600  
 GATTTAAAT GCAATTGTTA GCACAGGCTT TAAGGCCGA AAGAAACAA  
 SRLV (NCBI) GATTTAAAT GCAATTGTTA GCACAGGCTT TAAGGCCGA AAGAAACAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 Vzorek 610 620 630 640 650  
 GGAAAGGTC CCACACAAAG TGCTATAAC TGTGAAAAA CAGGACAAG  
 SRLV (NCBI) GGAAAGGTC CCACACAAAG TGCTATAAC TGTGAAAAA CAGGACAAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 Vzorek 660 670 680 690 700  
 GGCAAGCAA TGAGACAAG GGATATATG CATAAATGT GGAAGAGAG  
 SRLV (NCBI) GGCAAGCAA TGAGACAAG GGATATATG CATAAATGT GGAAGAGAG

## Chemikálie a spotřební materiál

### Zpracování buffy coatu

#### Příprava roztoku pro lýzi erytrocytů (RLE):

NH<sub>4</sub>Cl ..... 16,6 g/l(Sigma)  
 NaHCO<sub>3</sub> ..... 2,0 g/l(Sigma)

EDTA ..... 0,185 g/l(Serva)

Upavit na finální pH 7,3

Skladování při 2 až 8 °C

### Extrakce DNA

#### Příprava L6 pufru:

Guanidin thiocyanate (GuSCN) ..... 120 g (Serva)

0,1 M Tris-HCl, pH 6,4 ..... 100 ml (Serva)

0,2 M EDTA, pH 8,0 ..... 22 ml (Serva)

Triton X-100 ..... cca 2,5 ml (Sigma)

Skladování při 2 až 8 °C

Izolační kit MagNa Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (ROCHE):

Složení extrakčního kitu

Označení	Specifikace
Wash Buffer I, lahvička č.1 (černá)	promývací pufr (100 ml) odstranění inhibitorů skladování při pokojové teplotě
Wash Buffer II, lahvička č.2 (modrá)	promývací pufr (100 ml) odstranění solí, proteinů, ... skladování při pokojové teplotě
Wash Buffer III, lahvička č.3 (červená)	promývací pufr (100 ml) odstranění solí skladování při pokojové teplotě
Lysis/Binding Buffer, lahvička č.4 (zelená)	lyzační/vázací pufr (100 ml) lyze buněk a vazba NK skladování při pokojové teplotě
Proteinase K, lahvička č.5 (růžová)	proteináza K (lyofilizovaná) degradace proteinů skladování při pokojové teplotě Příprava : rozpustit obsah 1 lahvičky ve 3 ml elučního pufru skladování při 2 až 8 °C (4 týdny) skladování při -15 až -25 °C (12 měsíců)
Magnetic Glass Particles Suspension (MGPs), lahvička č.6 (hnědá)	magnetické skleněné partikule navázání (adheze) NK před pipetací pečlivě protřepat skladování při pokojové teplotě
Elution Buffer, lahvička č.7 (žlutá)	eluční pufr(100 ml) 10mM Tris-HCl, pH 8,0 eluce pročištěné NK skladování při pokojové teplotě

## PCR

PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio)  
10 x PCR reakční pufr s MgCl<sub>2</sub> (ROCHE)  
mix dNTP, 10 mM (ROCHE)  
ssprimer GAG F1, 100 μM (Generi Biotech)  
ssprimer POL R1, 100 μM (Generi Biotech)  
ssprimer GAG F2, 100 μM (Generi Biotech)  
ssprimer POL R2, 100 μM (Generi Biotech)  
Fast Start Taq Polymerase 5 U/μl (ROCHE)  
Pozitivní kontrolní DNA získaná z krve infikovaného zvířete  
Izolovaná DNA je uchovávána při -70 až -80°C.  
Poznámka: reagenty s roztoky se uchovávají při -15 až -20°C.

## Real-time PCR

PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio)  
2x QuantiTect Probe PCR Master Mixmix dNTP, 10 mM (Qiagen)  
ssprimer ACT1005F, 100 μM (Generi Biotech)  
ssprimer ACT1135R, 100 μM (Generi Biotech)  
sonda ACT1081HEX, 100 μM (Generi Biotech)  
Poznámka: reagenty s roztoky se uchovávají při -15 až -20°C.

## ELFO

EDTA 0,5 M, pH 8,0 (vlastní příprava, viz. níže)  
TBE (10 x) (vlastní příprava, viz. níže)  
agaróza (Serva)  
PCR ethidium bromid (Top-Bio) ! pozor potenciální karcinogen !  
PCR vkladací pufr (Top-Bio)  
DNA Marker 100-1500 pb (BioLabs)

### EDTA 0,5 M

1,0 M EDTA	.....	186,1 g(Sigma)
ultrafiltrovaná voda	.....	800 ml

S roztokem se intenzivně míchá, během míchání se upraví pH na 8,0 pomocí NaOH (cca 20 g). Po úplném rozpuštění roztok EDTA doplníme do objemu 1000 ml a sterilizujeme autoklávováním.

### TBE (10x)

Tris base	.....	108 g(Serva)
kyselina boritá	.....	55 g (Serva)
0,5 M EDTA (pH 8,0)	.....	40 ml(Serva)
ultrafiltrovaná voda	.....	doplnit objem do 1000 ml

Poznámka: skladování výše uvedených roztoků je při pokojové teplotě  
DNA Marker 100-1500 bp (BioLabs) skladovat při -15 až -20°C

## Purifikace nPCR produktu

### Purifikační kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up(Macherey-Nagel)

Složení purifikačního kitu

Označení	Specifikace
Binding Buffer NT1	vázací pufr (2x25 ml) skladování při pokojové teplotě
Wash Buffer NT3	Promývací pufr (20 ml) Příprava: smíchat s 200 ml 96–100% Et-OH skladování při pokojové teplotě
Elution Buffer NE	eluční pufr (15 ml) skladování při pokojové teplotě
Zkumavky s filtrem (žluté kolonky)	skladování při pokojové teplotě

Reagencie neobsažené v kitu: Ethanol 96–100%

### Spotřební materiál

- 1,5 ml zkumavky (Eppendorf)
- jednorázový plast a špičky pro MagNa Pure LC Instrument (ROCHE)
- pipetovací špičky s filtrem (Eppendorf)
- skalpel
- latexové rukavice(MSM)
- pláště (VOS Krok)

### **Přístroje a pomůcky**

- rychlováhy Scaltec SBC 41 (Sartorius)
- třepačky MS-1 (IKA)
- třepačka MS-2 (IKA)
- chlazená centrifuga 1-14K(Sigma)
- centrifuga 5453 (Eppendorf)
- centrifuga 5418 (Eppendorf)
- chladič box CH-100 (Biosan)
- vyhřevná třepačka Komfort ( Eppendorf)
- biohazard boxy BIO 2 (Nuair)
- automat pro extrakci NK MagNa Pure LC Instrument (ROCHE)
- termocykler TRIO (Biometra)
- real-time PCR systém CFX96 (Bio Rad)
- vyhodnocovací zařízení: průmyslová kamera



- UV transiluminátor
  - vyhodnocovací software Gel-Pro Analyzer
- zařízení na přípravu ultrafiltrované vody (Aqual)
- lednice a mrazáky pro uložení reagentů a pro archivaci vzorků
- automatické pipety (Eppendorf ) v rozsahu 0,1 – 1000 ul
- laboratorní sklo pro přípravu a skladování roztoků (kádinky, odměrné válce,..)

## II.5. Diagnostika SRLV na základě LAMP analýzy

Metoda Loop mediated Isothermal Amplification (LAMP) je moderní metodou, která umožňuje vysoce specifickou, účinnou a rychlou amplifikaci nukleových kyselin za izotermických podmínek. V porovnání s metodou PCR je real-time LAMP specifičtější, citlivější a rychlejší. LAMP může být také vhodnou detekční metodou v rozvojových zemích, jelikož nevyžaduje nákladné vybavení. Je ekonomicky efektivní, a to i díky tomu, že pro vizualizaci není potřeba elektroforetického zobrazení. Další výhodou metody LAMP je její rychlost a tedy možnost rychlé a přitom dostatečně přesné analýzy v polních podmínkách.

Mezi základní komponenty každé reakce patří 4 oligonukleotidové primery, jejichž účelem je rozpoznat 6 odlišných oblastí na cílovém genomu a DNA dependentní DNA polymeráza (např. *Bst* DNA polymeráza z organismu *Bacillus stearothermophilus* nebo *Gsp* DNA polymeráza z organismu *Geobacillus* sp.). Pro metodu LAMP je rozhodující správný návrh primerů. Pro spolehlivý průběh analýzy jsou zapotřebí 4 oligonukleotidové primery. Dva jsou vnější (F3 - forward a B3 - backward) a dva jsou vnitřní primery (FIP - forward inner primer a BIP - backward inner primer). Dále se používají smyčkové primery (LF – loop forward a LB – loop backward) pro rychlejší průběh reakce. Pro spolehlivý průběh analýzy je nutné zajistit předepsané podmínky primerů. To jsou: dodržení vzdálenosti mezi primerovými dvojicemi, optimální teplota tání, stabilita konce primerů, optimální obsah G a C bází a absence sekundárních struktur (vlásenek).

### Vzorkování

Pro diagnostické účely se odebírá periferní krev zvířat (věková kategorie: minimálně 4 měsíce po odstavu). Odebraná krev, která je ošetřena antikoagulantem K<sub>3</sub>EDTA, je testována po separaci plasmy a krevních elementů na průkaz protilátek i provirové DNA.

### Extrakce DNA

Extrakce DNA z hostitelských buněk se provádí pomocí automatu MagNA Pure LC a komerčního kitu MagNA Pure LC Total NA Isolation kit určeného pro tento přístroj a pro tento typ extrakce. Před vlastní automatickou izolací byl proveden preizolační krok pomocí lyzačního roztoku a proteinázy K. Složení prelyzačního roztoku: GuSCN, Tris-HCl (pH 6,4), EDTA (pH 8,0), Triton X-100. Z předchozího kroku získaný pelet buffy coatu byl lyzován pomocí 300 ul a 3 ul proteinázy K (50 mg/ul) v termomixeru při nastavené teplotě 56 °C po dobu 90 minut. Po této inkubaci proběhla teplotní inaktivace enzymu při 96 °C po dobu 10-20 minut.

## Návrh primerů pro LAMP analýzu

Pro „in silico“ návrh primerů byly použity částečné sekvence DNA *gag* genu, která se jeví jako vhodná oblast SRLV. Všechny sekvence byly testovány v programu Mfold (Zuker, 2003), kde byla zjištěna pravděpodobnost tvoření sekundárních struktur. Návrh primerů z vybraných sekvencí probíhal v programu PrimerExplorer verze 5 za předem definovaných podmínek. Nejdůležitější je dodržet ideální poměr G a C bazí mezi 50 - 60%, vzdálenost mezi primery, stabilitu na konci primerů a optimální teplotu tání primerových oblastí mezi 59 – 65°C. Primery také nesmí tvořit žádné sekundární struktury (Natomi a kol., 2000).

Po navržení byly primery nejdříve po jednom porovnávány s databází GenBank (NCBI) pro zjištění teoretické specificity pro CAEV. K laboratorním analýzám byly vybrány pouze primery, které měly největší předpoklad pro specifickou detekci viru CAEV a co nejnižší předpoklad detekce ostatních virů.

Sekvence primerů používaných pro LAMP analýzu a detekci *gag* genu.

Primer	Sekvence '5—3'
F3	CAAGTAAGGATATTTTAGAAGTGC
B3	GATCCATATTTGCTTGTGCT
FIP	TCCATCTTTCTGCTTCTTCATTCAATAGCCATGATGCCAGGAA
BIP	GAGGAATAATCCACCCCCAGCTGCCTGATTTGTTGTCCG
LF	CCTTGTATTAACCTTTTTGTGCC
LB	GGCGGCTTGACAGTGGATCA

## Provedení LAMP analýzy

Optimalizace všech primerů probíhala v gradientovém ředění koncentrací MgSO<sub>4</sub> a betainu. Reakční směsi pro metodu LAMP byly připraveny v celkovém objemu 20 µl v následujícím složení: 1,6 µM primeru FIP; 1,6 µM primeru BIP; 0,2 µM primeru F3; 0,2 µM primeru B3; 1,4 mM dNTPs; 0 - 5mM MgSO<sub>4</sub>, 0 – 5mM betainu, 3,2 µl templátové DNA, 8 U GspM2.0 DNA polymerázy, 2 µl 10X reakčního pufru a zbytek objemu byl doplněn sterilní destilovanou H<sub>2</sub>O. Amplifikace probíhala v termocycleru při 60 - 65°C po dobu 30 – 60 minut s následnou závěrečnou denaturací při 90°C. Po amplifikaci bylo do vzorků přidáno interkalační činidlo ethidium bromid. Proběhla elektroforetická separace fragmentů na 1% agarózovém gelu s 0,5X TBE po dobu 80 minut při 4 V/cm. Agarózový gel byl vizualizován pomocí UV prosvěcovací lampy a dokumentačního zařízení InGenius3.

Optimalizovaný postup byl převeden pro real-time LAMP. Pro reakční směs byla zachována koncentrace všech primerů a místo ostatních komponent byl použit izotermální master Mix (Optigene, UK). Namísto ethidium bromidu bylo použito interkalační činidlo SYBR Green. Analýzy probíhaly na zařízení QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Reakce probíhala při teplotě 64°C po dobu 30 min.

### III. Srovnání novosti postupů

V současné době není v ČR k dispozici dostupná metodika zabývající se touto problematikou. Dosud dostupné informace jsou jen dílčí a rozptýlené ve vědeckých publikacích a monografiích, které se zabývají problematikou detekce původců virových onemocnění ovcí a koz, tj. maedi-visna virus ovcí (MVV) a virus infekční artritidy a encefalitidy koz (CAEV).

Předkládaná metodika zahrnuje popis všech metodických a analytických postupů od odběru vzorku, přes jeho uchování, zpracování a postupy imunochemické a molekulární detekce MVV a CAEV.

Součástí metodiky je i vyhodnocení vhodnosti jednotlivých detekčních metod.

Novost postupu spočívá v kombinaci sérologické a molekulárně biologické identifikace infikovaných zvířat, dále v modifikaci extrakce provirové DNA a použití primerů, které dosud nebyly použity pro diagnostiku SRLV v ČR. Použité primery byly ověřeny s pozitivním výsledkem při detekci kmenů aktuálně cirkulujících v chovech ovcí a koz v České republice.

### IV. Popis uplatnění metodiky

„Metodika odběrů a zpracování vzorků, serologického a molekulárního stanovení původce lentivirového onemocnění ovcí a koz“ v první části zahrnuje teoretický úvod do problematiky. V praktické části pak jsou uvedeny postupy potřebné pro správný odběr vzorků, izolaci protilátek a provirové DNA a protokoly pro PCR detekci jednotlivých genů, resp. cílových genotypů.

Metodika představuje soubor optimalizovaných návodů imunochemické/serologické a molekulární analýzy, na jejichž základě lze provádět rutinní analýzy vrosků krve s cílem optimální detekce přítomnosti původců virového onemocnění. Výstupem analýzy je pak detekce pozitivních a negativních zvířat na základě imunochemické/serologické a molekulární analýzy.

Uživatelé metodiky jsou pracoviště výzkumná a veterinární, která mohou s výhodou využít předností optimalizovaných postupů detekce pozitivních a negativních zvířat. Metodika bude uplatněna prostřednictvím SCHOK. S tímto subjektem byla uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.

## V. Ekonomické aspekty

Předpokládané ekonomické přínosy metodiky jsou kalkulovány až do výše 15 000 tis. Kč. Dalšími přínosy předkládané metodiky jsou rozšíření spektra technik a metodických postupů používaných v diagnostických laboratořích, rozšíření portfolia technik a služeb prováděných v laboratoři, metodická a vzdělávací funkce.

Přínosem pro chovatele je možnost vývozu plemenných zvířat (jehnic a beranů) v odhadovaném počtu cca 1000 ks za rok, tzn. min. 5 000 za kalkulované období. Průměrná cena plemenného zvířete je cca 3 tis. Kč.

Do nákladů na zavedení postupů uvedených v metodice lze započítat pořízení nejnutnějšího investičního a neinvestičního vybavení pro provoz laboratoře a provedení úkonů a postupů uváděných v metodice v celkové minimální výši 6,5 mil Kč. V případě automatizace izolace DNA a zpracování velkého objemu vzorků je pak nutné počítat s dalšími náklady na pořízení linky pro izolaci DNA pomocí paramagnetických partikulí v objemu cca 2,5 mil Kč a automatické čipové elektroforézy nebo fragmentačního analyzátoru ve výši 1,4 mil Kč. Další náklady pak představují náklady na chemikálie a na základě dlouhodobých kalkulací činí jednotková cena za analýzu jednoho vzorku 420 Kč (ceny za chemikálie). V uvedeném příkladu kalkulace nákladů nejsou uvedeny doplňkové náklady, odpisy, náklady na vzdělávání a vyškolení personálu laboratoře, náklady na vývoj metod, které jsou odvislé od konkrétní situace a vybavenosti (materiální i personální) pracoviště.

Jako ekonomicky výhodnější se jeví analýza vzorků ve specializovaných laboratořích, kde lze sdílet náklady na pořízení investic, výchovu a vzdělávání pracovníků, služby.

## V. Seznam použité související literatury

### Literatura:

1. PALSSON, P.A. Maedi and Visna in sheep. Slow virus diseases of animals and man. Amsterdam, R.H. Kimberlin 1976, 43s.
2. CELER, V. Diagnostické využití strukturálních proteinů viru Maedi – Visna. Disertační práce, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 1997.
3. PETERHANS, E., GREENLAND, T., BADIOLA, J., HARKISS, G., BERTONI, G., AMORENA, B., ELIASZEWICZ, M., JUSTE, R.A., KRASSNIG, R., LAFONT, J.P., LENIHAN, P., PÉTURSSON, G., PRITCHARD, G., THORLEY, J., VITU, C., MORNEX, J.F., PÉPIN, M. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet. Res.* 2004;35,257–274.
4. MINGUIJÓN, E., REINA, R., PÉREZ, M., POLLEDO, L., VILLORIA, M., RAMÍREZ, H., LEGINAGOIKOA, I., BADIOLA, J.J., GARCÍA-MARÍN, J.F., DE ANDRÉS, D., LUJÁN, L., AMORENA, B., JUSTE, R.A. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Vet Microbiol.* 2015;181(1-2):75-89.
5. BLACKLAWS, B.A. Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2012;35,259–269.
6. DE ANDRÉS, D., KLEIN, D., WATT, N.J., BERRIATUA, E., TORSTEINSDOTTIR, S., BLACKLAWS, B.A., HARKISS, G.D. Diagnostic test for small ruminant lentiviruses. *Vet Microbiol.* 2005; 107 (1-2):49-62.
7. BRINKHOF, J. AND VAN MAANEN C. Evaluation of Five Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and an Agar Gel Immunodiffusion Test for Detection of Antibodies to Small Ruminant Lentiviruses. *Clin.Vac. Immunol.* 2007;14:9,1210-1214.
8. Zprávy o činnosti v oblasti ochrany zdraví zvířat. Státní veterinární správa, Odbor ochrany zdraví a pohody zvířat, Praha. 1994 - 2015.
9. ZANONI, R., VOGT, H.R., POHL, B., BOTTCHE, J., BOMMELI, W., PETERHANS, E. An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small-ruminant lentiviruses. *Zentralbl. Veterinarmed B* 1994; 41, 662–669.
10. CELER JR., V., CELER, V., NEMCOVA, H.R., ZANONI, R., PETERHANS, E. Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole virus ELISA and AGID test. *Zentralbl Veterinarmed [B]* 1998;45,183–188.
11. HERRMANN-HOESING, L.M., BROUGHTON-NEISWANGER, L.E., GOUINE, K.C., WHITE, S.N., MOUSEL, M.R., LEWIS, G.S., MARSHALL, K.L., KNOWLES,



D.P. Evaluation of a Caprine Arthritis-Encephalitis Virus/Maedi-Visna Virus Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in the Serological Diagnosis of Ovine Progressive Pneumonia Virus in U.S. Sheep. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2010;17(2):307-310.

12. SAMAN E., VAN EYNDE G., LUJAN L., EXTRAMIANA B., HARKISS G., TOLARI F., GONZALEZ L., AMORENA B., WATT N. AND BADIOLA J. A New Sensitive Serological Assay for Detection of Lentivirus Infections in Small Ruminants. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1999;6:734-740.

13. COMTET, L., FELIZIANI, F., LESCEU, S. Validation of the ID Screen® Maedi Visna Indirect ELISA: specificity on BTV-8 vaccinated sheep and detection of seroconversion. Poster presented at the 2010 EAVLD meeting, Lelystad, Holland.

14. NOWICKA, D., CZOPOWICZ, M., MICKIEWICZ, M., SZALUŚ-JORDANOW, O., WITKOWSKI, L., BAGNICKA, E., KABA, J. 2014. Diagnostic performance of ID Screen® MVV-CAEV Indirect Screening ELISA in identifying small ruminant lentiviruses infected goats. *Pol J Vet Sci.* 2014;17(3):501-6.

15. HERRMANN, L.M., CHEEVERS, W.P., MCGUIRE, T.C., ADAMS, D.S., HUTTON, M.M., GAVIN, W.G., KNOWLES, D.P. Competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus: Diagnostic tool for successful eradication. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003;10(2):267-271.

16. HERRMANN, L.M., CHEEVERS, W.P., MARSHALL, K.L., MCGUIRE, T.C., HUTTON, M.M., LEWIS, G.S., KNOWLES, D.P. Detection of serum antibodies to ovine progressive pneumonia virus in sheep by using a caprine arthritis-encephalitis virus competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003;10(5):862-5.

17. VAREA, R., MONLEON, E., PACHECO, C., LUJAN, L., BOLEA, R., VARGAS, M.A., VAN EYNDE, G., SAMAN, E., DICKSON, L., HARKISS, G.D., AMORENA, B., BADIOLA, J.J. Early detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. *J Vet Diagn Invest.* 2001;13(4):301-7.

18. CELER JR., V., ZANONI, R., PETERHANS, E. Comparison of various antigens in the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis virus using the ELISA test. *Vet. Med. (Praha)* 1993; 38,237–244.

19. KWANG, CUTLIP, J. R. Detection of Antibodies to Ovine Lentivirus Using a Recombinant Antigen Derived From the Env Gene. *Biochem Biophys Res Commun*1992;183 (3), 1040-1046.

20. BOSHOFF, C. H., B. DUNGU, R. WILLIAMS, J. VORSTER, J. D. CONRADIE, D. W. VERWOERD, AND D. F. YORK. Detection of Maedi-Visna virus antibodies using a single fusion transmembrane-core p25 recombinant protein ELISA and a

modified receiver-operating characteristic analysis to determine cut-off values. *J. Virol. Methods* 1997;63:47–56.

21. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 2000. Chapter 1.1.3: Principles of validation of diagnostic assays for infectious disease, pp. 15–23.

22. KRASSNIG, R., SCHULLER, W. Continuation of the observation and serological investigation of a maedi-visna-virus-infected sheep flock from January 1990 to June 1996. *Dtsch. Tieraztl. Wschr.* 1998;105, 50–53.

23. MICHIELS, R., VAN MAEL, E., QUINET, CH., CAY, A.B., DE REGGE, N. Comparative analysis of different serological and molecular test for detection of small ruminat lentiviruses (SRLVs) in Belgian sheep and goats. poster, WAVLD 2017, Sorrento, Italy.

24. MAZZEI, M., CARROZZA, M.L., BANDECCHI, P., MAZZANTI, G., MANNELLI, A., TOLARI, F. (2005) Evaluation of an ELISA to detect antibodies to maedi-visna virus in individual and pooled samples of milk from sheep. *Vet Rec.* 2005 Oct 29;157(18):552-5.

25. VALIDATION REPORT LSI VET MV/CAE ELISA: 110708-LF-v2-VA-Validation\_Report\_VETCAEV. LSI - Laboratoire Service International. 2011

26. HEATON, M. P, KALBFLEISCH, T. S., PETRIK, D. T., SIMPSON, B., KIJAS J. W., et al. (2013). Genetic Testing for TMEM154 Mutations Associated with Lentivirus Susceptibility in Sheep. *PLoS ONE* 8(2): e55490. doi:10.1371/journal.pone.0055490.

27. TOSSER-KLOPP, G., BARDOU, P., BOUCHEZ, O., CABAU, C., CROOIJMANS, R., et al. (2016). Correction: Design and Characterization of a 52K SNP Chip for Goats. *PLOS ONE* 11(3): e0152632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152632>

## **VI. Seznam publikací, které předcházely metodice**

**Barták P., Václavek P., Kostková M., Mikulášková K., Šimek B. (2017):** Prevalence lentivirových onemocnění malých přežvýkavců v ČR s využitím sérologické diagnostiky. Veterinářství 67: 227-232.

Název: Barták P. a kol. (2017): Metodika odběrů a zpracování vzorků, serologického a molekulárního stanovení původce lentivirového onemocnění ovci a koz

Autorský kolektiv: Prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr.h.c.  
Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
Ing. Antonín Vejčík, CSc.  
Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D.  
Ing. Kateřina Vernerová  
Ing. Barbora Farková  
Mgr. Bronislav Šimek  
MVDr. Petr Václavek, Ph.D.  
Mgr. Hana Plodková  
MVDr. Pavel Barták, Ph.D.

Vydal: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zemědělská fakulta  
Studentská 13  
370 05 České Budějovice

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR, dopisem ze dne ..., jako uplatněná metodika s doporučením pro její využití v zemědělské praxi.

Kontakt na autory: [VCurn@seznam.cz](mailto:VCurn@seznam.cz)

ISBN: 978-80-7397-671-5



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice



Státní  
veterinární  
ústav  
Jihlava

## **Certifikovaná metodika: Metodika genotypizace ovcí a koz - detekce markerů geneticky podmíněné rezistence k SRLV**

Metodika byla vypracovaná jako výstup výzkumného projektu MZe NAZV QJ 1610096 "Program zdravotní kontroly lentivirových infekcí malých přežvýkavců s využitím nových metod časně laboratorní diagnostiky a markerů geneticky podmíněné rezistence k infekci jako selekčního kritéria"

Prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr.h.c.  
Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
Ing. Antonín Vejčík, CSc.  
Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D.  
Ing. Kateřina Vernerová  
Ing. Barbora Farková  
Mgr. Bronislav Šimek  
MVDr. Petr Václavek, Ph.D.  
Mgr. Hana Plodková  
MVDr. Pavel Barták, Ph.D.

České Budějovice, listopad 2018

Metodika genotypizace ovcí a koz - detekce markerů geneticky podmíněné rezistence k SRLV

Pavel Barták a kol.  
bartak@svujihlava.cz

Vypracováno za podpory výzkumného projektu MZe NAZV QJ 1610096 "Program zdravotní kontroly lentivirových infekcí malých přežvýkavců s využitím nových metod časně laboratorní diagnostiky a markerů geneticky podmíněné rezistence k infekci jako selekčního kritéria"

Oponenty metodiky byli:

Doc. MVDr. Pavel Novák, CSc.  
MVDr. Marie Bleierová

Podíl autorů na vypracování metodiky:

Prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr.h.c. – 5%  
Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D. – 15%  
Ing. Antonín Vejčík, CSc. – 5%  
Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D. – 5%  
Ing. Kateřina Vernerová – 5%  
Ing. Barbora Farková – 5%  
Mgr. Bronislav Šimek – 35%  
MVDr. Petr Václavěk, Ph.D. – 10%  
Mgr. Hana Plodková – 5%  
MVDr. Pavel Barták, Ph.D. – 10%

*Text: ©2018*

*Foto: ©2018*

Vydáno bez jazykové úpravy

ISBN: xxx-xx-xxxx-xxx-x



Obsah:

<b>I. Cíl metodiky</b> .....	<b>1</b>
<b>II. Vlastní popis metodiky</b> .....	<b>3</b>
<b>II.1. Úvod</b> .....	<b>3</b>
<b>II.2. Odběr vzorků biologického materiálu</b> .....	<b>4</b>
<b>II.3. Izolace DNA z krve</b> .....	<b>5</b>
<i>Izolace DNA pomocí Chelexu</i> .....	5
<i>Izolace DNA pomocí automatu MagCore NucleicAcid Extractor</i> .....	6
<b>II.4. Detekce polymorfismu na genu TMEM154</b> .....	<b>8</b>
<i>PCR analýza genu TMEM154</i> .....	8
<i>Elektroforéza PCR fragmentů</i> .....	10
<i>Sekvenační analýza</i> .....	10
<b>II.5. Statistické hodnocení jednotlivých genotypů</b> .....	<b>16</b>
<i>Asociační analýza</i> .....	16
<b>III. Srovnání novosti postupů</b> .....	<b>17</b>
<b>IV. Popis uplatnění metodiky</b> .....	<b>17</b>
<b>VI. Seznam publikací, které předcházely metodice</b> .....	<b>23</b>

## I. Cíl metodiky

Onemocnění maedi-visna ovcí (MV) a virová arteritida a encefalitida koz (CAE) patří do skupiny virů z čeledi Retroviridae, rod Lentivirus, označované souhrnně jako lent virové infekce malých přežvýkavců (SRLV). V současné době jsou MV a CAE rozšířeny po celém světě včetně České republiky. Vzhledem k současné nakažové situaci jsou onemocnění MV a CAE významným problémem. Způsobují ekonomické ztráty a vytváří bariéru při obchodování s plemenným materiálem (nejen v EU), či při pořádání chovatelských akcí (výstavy, svody). Chovy v ČR zařazené v kontrole užítkovosti (KU) musí být MV a CAE prosté, výjimku má pouze Šumavka. Na základě požadavků chovatelů vznikl výzkumný projekt, jehož cílem je zpracování programu zdravotní kontroly lentivirových infekcí malých přežvýkavců s využitím metod časně detekce infekce MV a CAE a genetické selekce na základě markerů genetické rezistence k infekci.

Historicky bylo onemocnění s klinickými projevy progresivní pneumonie poprvé popsáno v jižní Africe v roce 1915. Současný název maedi-visna pochází z islandštiny podle typických klinických projevů dyspnoe (maedi) a nervových příznaků (visna). Nejzávažnější epizootie MV v historii byla zaznamenána na Islandu, kam byla infekce zavlečena importem karakulských ovcí z Německa v roce 1933, které byly dovezeny za účelem zvýšení užítkovosti původního primitivního plemene krátkoocasé islandské ovce. Na rozdíl od jiných lentivirových infekcí (HIV, FIV) nejsou u MV a CAE popsány příznaky imunodeficiency. Infikovaná zvířata zůstávají imunokompetentní a reagují na infekci tvorbou specifických protilátek, ale humorální odpověď na infekci MVV je významně pomalejší než u jiných virových infekcí s akutním průběhem.

V současné době je MV rozšířena po celém světě včetně České republiky. Stupeň rozšíření a související ekonomické ztráty jsou obtížně vyčíslitelné, vzhledem k nedostatku seriózních epidemiologických studií a obtížnosti hodnocení možných ekonomických dopadů. Hlavním dokumentovatelným ekonomickým dopadem je omezení mezinárodního i domácího obchodu s chovnými zvířaty, kde je základním zdravotním kritériem nakažový status chovu, tj. chov prostý nákazy. Sledování výskytu MV a CAE v ČR v rámci monitoringu nakaž začiná na počátku 90. let s využitím komerčně dostupných diagnostických testů. Vyšetřování v rámci Metodiky kontroly zdraví SVS ČR na náklady státu je v současné době prováděno pouze v chovech zařazených v kontrole užítkovosti (KU). Hospodářství musí být prosté virové infekce na základě vyhodnocení laboratorního vyšetření z předešlého roku ze strany KVS anebo se jedná o nové hospodářství zařazené do kontroly užítkovosti, respektive již ozdravené hospodářství. Pozitivní hospodářství z předešlých let může být do monitoringu zařazeno až po ozdravení a na základě rozhodnutí příslušné KVS SVS. V hospodářstvích (stádech), v nichž se provádí kontrola užítkovosti, se vyšetření provádí 1x ročně.

Opatření pro eradikaci nákazy v pozitivních chovech ve formě ozdravovacího programu nebo povinnost periodické kontroly nebyla doposud závazně stanovena, nicméně jediným možným postupem se jeví radikální metoda postupné eliminace

séropozitivních zvířat. Tímto způsobem bylo postupně dosaženo ozdravení prakticky všech chovů zařazených do kontroly užitečnosti. Výjimku z těchto podmínek má plemeno šumavské ovce, která je zařazena do světového genofondu ohrožených druhů hospodářských zvířat, a eradikace by znamenala zánik tohoto vzácného plemene s úzkou plemennou základnou. Jedním z cílů projektu je vyvinutí postupů sérologické identifikace infikovaných zvířat, na kterou navazují postupy detekce virů metodami molekulární biologie, genotypizace zvířat a identifikace markerů genetické rezistence. U ovcí již bylo identifikováno několik kandidátních genů pro odolnost proti onemocnění MV. Nejsilnější vztah k odolnosti vykazují polymorfismy v genu *TMEM154*, konkrétně pak polymorfismus E35K. U koz není tato problematika blíže probádána, nicméně pokrok o molekulárních metodách dává naději k identifikaci a následné analýze kandidátních genů pro odolnost i u koz.

Cílem řešení projektu NAZV QJ 1610096, v rámci něhož byla metodika vypracována je **vypracovat nové diagnostické metody pro včasné odhalení** infekčních agens, v tomto případě **onemocnění maedi-visny (MV) ovcí a infekční artritidy a encefalitidy koz (CAE), provést průkaz virů MVV a CAEV pomocí imunologických metod a metod založených na molekulární detekci virů** a na základě genetického screeningu navrhnout program markery asistované selekce na rezistenci proti lentivirovým infekcím malých přežvýkavců (SRLV). Tímto prosazovat v plemenitbě genotypy odolnější k onemocnění.

**Cílem metodiky je podání uceleného souboru analytických postupů pro detekci specifického genotypu zvířete a možnost genetické selekce odolnějších jedinců na základě genetické rezistence k infekci.**

## II. Vlastní popis metodiky

### II.1. Úvod

Lentiviry malých přežvýkavců (SRLV), konkrétně maedi-visna virus ovcí (MVV) a virus infekční artritidy a encefalitidy koz (CAEV) způsobují celosvětově rozšířená onemocnění vyskytující se i v ČR. Lentiviry malých přežvýkavců způsobují maedi-visnu ovcí (MV) a artritidu a encefalitidu koz (CAE) a tyto choroby jsou neléčitelné a neexistují proti nim účinné vakcíny. Vzhledem k současné nálezové situaci jsou onemocnění MV a CAE významným problémem. Způsobují významné ekonomické ztráty a vytváří bariéru při obchodování s plemenným materiálem (nejen v EU), či při pořádání chovatelských akcí (výstavy, svody). Chovy v ČR zařazené v kontrole užitkovosti (KU) musí být MV a CAE prosté.

Současný kontrolní systém prováděný dle Metodiky kontroly zdraví zvířat a nařízené vakcinace, sleduje četnost nálezů pozitivních zvířat v jednotlivých chovech v KU, nejsou však stanovena opatření pro eradikaci nákazy. Plemeno, kde se dle zpráv od chovatelů předpokládá vyšší incidence onemocnění, tedy ovce šumavská, je z monitoringu vyjmuta. Její chovatelé primárně projevují zájem o vývoj markerů geneticky podmíněné rezistence. Stejně jako u eradikace klusavky (scrapie) na základě selekce rezistentních genotypů se i zde nabízí možnost zavedení eradikačního programu spojujícího časnou a přesnou diagnostiku společně s asistovanou selekcí podmíněnou markery genetické rezistence.

Díky předchozím výzkumům založeným především na genomové analýze s použitím 50k SNP čipů pro ovce, bylo identifikováno několik kandidátních genů pro odolnost proti onemocnění MV. Nejsilnější vztah k odolnosti vykazují polymorfismy v genu TMEM15. U koz není tato problematika blíže probádána, nicméně nově vyvinutý 52k SNP mikročip, dává naději k identifikaci a následné analýze kandidátních genů pro odolnost u koz.

Vzhledem k rostoucímu zájmu o chov ovcí a koz v ČR je potřeba podporovat rozvoj chovu těchto zvířat, včetně ohrožených domácích plemen, z hlediska zdravotního stavu zvířat, šlechtění i podpory obchodu s plemenným materiálem. Ozdravovací program od lentivirových infekcí malých přežvýkavců založený na kombinaci přesné a rychlé diagnostiky onemocnění a markery asistované selekce (MAS) se jeví jako možné východisko pro řešení současné nálezové situace.

## II.2. Odběr vzorků biologického materiálu

Pro diagnostické účely je odebírána periferní krev zvířat (věková kategorie: minimálně 4 měsíce po odstavu).

- Krev je odebírána do plastových 5 ml zkumavek s antikoagulantem K<sub>3</sub>EDTA.
- ***Je třeba dodržet maximální hladinu krve označenou ryskou na zkumavce.***
- Ihned po odběru je krev ve zkumavce nutné důkladně promíchat s antikoagulantem, uchovávat při +4°C a zpracovat bezprostředně po doručení do laboratoře.

Ze vzorků krve je provedena izolace DNA a vzorky DNA a zásobní vzorky krve jsou archivovány při -20°C.

---

Chemikálie a spotřební materiál:

- 10 ml plastové odběrové zkumavky z K<sub>3</sub>EDTA

Přístroje:

- centrifuga
- sada automatických pipet
- vortex
- lednice
- hlubokomrazicí box

## II.3. Izolace DNA z krve

### *Izolace DNA pomocí Chelexu*

DNA z hostitelské krve byla izolována pomocí Chelexu 100 (Bio-Rad Laboratories). Tato metoda se často využívá ve forenzní genetice k izolaci DNA ze zaschlých krevních vzorků, vzorků tkání, vlasů a kostí. Čistota DNA není příliš ideální, ale pro následnou PCR reakci je dostačující. Výhodou je minimalizace kontaminace vzorku, kdy celý proces izolace DNA probíhá pouze v jedné zkumavce. Další výhodou je rychlost extrakce a cenové náklady na relativně nízké úrovni.

Chelex je pryskyřice (kopolymer styren divinylbenzenu), obsahující ve svém vzorci párové ionty (iminodiacetátové), působící jako chelatační činidlo. Tyto ionty se vážou na dvojmocné kationty těžkých kovů (Ca, Mn a zejména  $Mg^{2+}$ ), které během extrakce při vysokých teplotách (95 - 100 °C) mohou poškozovat DNA. Blokáce  $Mg^{2+}$  iontů také inaktivuje nukleázy, které hořčnaté kationty vyžadují pro svoji aktivitu.

Principem metody je destrukce a degradace buněčných membrán, proteinů a denaturace DNA v alkalických podmínkách za vysokých teplot. Následně se suspenze centrifuguje a oddělí se pryskyřice a zbytky buněčných komponent od supernatantu, kde je extrahovaná DNA. Ta se, rozpuštěná v supernatantu, může použít přímo pro amplifikaci. Důležité je oddělit supernatant od Chelexu, který je inhibitorem PCR.

Postup:

- Příprava vzorku odebrané krve
  1. V 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavce k objemu 50  $\mu$ l krve přidáme 500  $\mu$ l TE pufru
  2. Vzorek zvortexujeme 10 – 15 s a následně odstředíme při 14 000 rpm 5 minut
  3. Odebereme opatrně supernatant a pelet resuspendujeme opět v 500  $\mu$ l TE pufru
  4. Pro důkladné přečištění krevních vzorků tento postup opakujeme 3x
- Připravíme 5% ní roztok Chelexu (0,5 g Chelexu v 10 ml dH<sub>2</sub>O).
- Před použitím je nutno roztok Chelexu řádně promíchat a promíchaný roztok včetně „kuliček“ Chelexu přidávat ke vzorku ustříhnutou špičkou!
- V 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavce k objemu 50  $\mu$ l krve přidáme 100  $\mu$ l roztoku Chelexu a 1  $\mu$ l Proteinázy K (20 mg/ml).
- Zvortexujeme 10 - 20 s a dáme na 45 minut inkubovat do termobloku s nastavenou teplotou na 56°C.
- Mezitím nahřejeme druhý termoblok na 98°C.
- Po inkubaci při 56°C vzorek 10 - 20 s zvortexujeme, krátce stočíme a dáme na 10 minut inkubovat při 98°C (100°C).



- Po inaktivaci se vzorek 10 – 20 s zvertexuje a následně se odstředuje při 14 000 rpm 5 minut při 4°C.
- Takto upravený vzorek obsahuje v horní frakci (supernatantu) izolovanou DNA, která se dá používat pro další reakce.
- Vzorky lze uchovávat krátkodobě při 4°C nebo dlouhodobě při -20° C. Před každým použitím je třeba vzorek promíchat a znovu stočit.

### ***Izolace DNA pomocí automatu MagCore NucleicAcid Extractor***

Extrakce DNA z krve se provádí pomocí komerčního kitu na automatické robotické stanici, kde za necelou hodinu je vyizolováno dostatečné množství DNA pro další testování.

- 200 µl krve se napipetuje do analytické zkumavky.
- Zkumavka se vloží do robotické stanice MagCore NucleicAcid Extractor.
- Do robotické stanice se vloží extrakční kit MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit 101 (MGB400-02).
- Nastaví se příslušný program a pomocí kitu se vyizoluje DNA v objemu 100 µl.

---

### Izolace Chelexem

Chemikálie a spotřební materiál:

- 5% Chelex ve sterilní dH<sub>2</sub>O
- sterilní dH<sub>2</sub>O
- Proteináza K (20 mg/ml)
- 1.5 ml mikrocentrifugční zkumavky (Eppendorf)
- TE pufr (10mM Tris, 1mM EDTA, pH=8.0)

Přístroje:

- centrifuga
- sada automatických pipet
- vortex
- 2 termobloky
- lednice
- mrazák

### Izolace kitem

Chemikálie a spotřební materiál:

- 10 ml plastové analytická zkumavka
- MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit 101

Přístroje:

- sada automatických pipet
- robotická stanice MagCore NucleicAcid Extractor
- mrazák

## II.4. Detekce polymorfismu na genu *TMEM154*

Genotypizace se provádí na souboru náhodně vybraných, na přítomnost provirové DNA pozitivně i negativně testovaných zvířat. Po otestování zvířat standardními metodami - sérologicky metodou ELISA a molekulárně metodou PCR, se náhodně vybrala zvířata s přítomnou provirovou DNA v genomu a bez přítomnosti provirové DNA SRLV v genomu.

V populacích malých přežvýkavců se u transmembránového genu 154 *TMEM154* vyskytují nejméně 3 polymorfismy. První je polymorfismus K35, kdy je na pozici 35 genu báze adenin, a kdy tato sekvence nukleotidů kóduje aminokyselinu lysin. Zvířata s tímto polymorfismem mají snížené riziko nákazy SRLV infekcí. Druhým polymorfismem - E35 - je přítomnost báze guaninu na 35. pozici, výsledkem je zařazení aminokyseliny glutaminu do peptidového řetězce, a nositelé s tímto polymorfismem jsou náchylnější k infekci SRLV viry. Nejrizikovější skupinou jsou ale heterozygotní nositelé - E35K, kteří mají na pozici 35 R (adenin a guanin), a kteří jsou k infekci lentiviry nejnáchylnější.

Pro identifikaci jednotlivých polymorfismů byla z pozitivně testovaných chovů na přítomnost SRLV vybrána náhodně jak infikovaná, tak neinfikovaná zvířata. Identifikace probíhala ve dvou krocích, prvním byla PCR reakce a druhým krokem bylo sekvenování amplifikovaného produktu v komerční laboratoři firmy SeQme. Osekvenovaná část genu *TMEM154* byla následně zpracována příslušnými programy.

### **PCR analýza genu *TMEM154***

Sekvence primerů používaných pro detekci genu *TMEM154*.

Primer	Sekvence '5—3'
TMEM154R	GGC TGA AGG CAT TTT CTG TT
TMEM154F	TTT GCT GAA GTG CCT CTG AA

PCR reakce probíhá v objemu 25  $\mu$ l. Reakční směs se připravuje vždy nová. Roztoky a reagenty jsou uchovávány v mrazáku při  $-20^{\circ}$  C. Roztoky je nutné dokonale rozmrazit a promíchat před vlastní přípravou PCR reakce. Do PCR zkumavek se napipetuje množství reagentů a roztoků, uvedených níže. Po napipetování se zkumavka uzavře, krátce stočí a vloží do cyklu. V každé reakci je potřeba připravit i negativní kontrolu, kde je DNA nahrazena adekvátním objemem PCR vody.

Amplifikace i reamplifikace probíhá v konvenčním termocykleru TRIO (Biometra) při níže uvedených teplotních profilech.

#### Příprava mastermixu:

1. Reakční směs se připravuje vždy nová.
2. Roztoky a reagentie po rozmražení dobře promíchat a krátce stočit při 10 000 rpm/10s.
3. Reagentie po krátké centrifugaci vytemperovat v chladicím boxu přibližně na 0,5 až 4°C.
4. Do PCR zkumavky napipetovat reagentie a roztoky v pořadí a objemu níže uvedeném.
5. Po napipetování vzorků nebo kontrol je nutné okamžitě zavřít PCR zkumavku.

#### Složení reakční směsi pro PCR

Reagentie	Objem (μl)	Výsledná konc.
PCR H <sub>2</sub> O	9,5	
PPP Mastermix	12,5	1 x
Primer TMEM154F	1,0	5 pmol/ μl
Primer TMEM154R	1,0	5 pmol/ μl
Extrahovaná DNA	1,0	

#### Teplotní profil PCR (amplifikace)

Krok	Teplota (°C)	Čas/cyklování
1(denaturace a aktivace)	94	2 min
2(denaturace)	94	30 s
3(annealing)	58,5	30 s
4(elongace)	72	50 s
5(cyklování)	Zpět na krok č. 2	30 x
6(finální elongace)	72	7 min
7(chlazení)	4	∞

## **Elektroforéza PCR fragmentů**

PCR produkty se detekují na 1,5%-2% agarozovém gelu v 1x TBE pufru. Podmínky separace: 120 V 1 hod. Jako velikostní marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu a procházejícím UV světlem o vlnové délce 312 nm. Vyhodnocení gelu se provádí pomocí vyhodnocovacího zařízení, jehož součástí je kamerový systém, UV transiluminátor a vyhodnocovací software. Pomocí tohoto programového vybavení je možné pomocí velikostního markeru a pozitivní kontroly potvrdit (stanovit) velikost očekávaného specifického PCR produktu. Po provedení elektroforézy je výsledek zdokumentován a uložen do databáze pro dodatečné vyhodnocení nebo ověření.

## **Sekvenační analýza**

Detekce jednotlivých genotypů (E35, K35, E35K) se prováděla pomocí sekvenační analýzy. Sekvenování DNA v současné době patří k standardním metodám molekulárně-genetických analýz biologického materiálu. Pomocí sekvenace DNA je možné určit pořadí jednotlivých nukleotidů v řetězci DNA a analýzou determinované sekvence získat relevantní informace, které mohou například sloužit při výše zmíněném ověření specifity získaného PCR produktu nebo při genotypování a druhovém zařazení biologických agens, rostlin nebo živočichů. Výsledný přečištěný PCR produkt slouží jako templátová DNA pro sekvenační reakci, při které je nukleová kyselina denaturována a získaná jednořetězcová DNA slouží jako templát pro syntézu druhého komplementárního řetězce. Syntéza je zprostředkována enzymem polymerázou a reakce je upravena tak, že v určitých místech dochází v závislosti na sekvenci templátového vlákna k ukončení (terminaci) syntézy. Pokud jsou pro detekci sekvenačních produktů použity fluoroforem značené terminátory ddNTP, detekuje se 3'-konec molekuly a tím se i definuje pořadí nukleotidových bází v řetězci DNA.

Amplifikovaný fragment se sekvenuje s primery specifickými k sekvenci (v našem případě specifickými primery pro úsek *TMEM154* genu). Sekvenování prokáže správnou sekvenci ampliconu a v případě porovnání sekvencí v určitém bodě sekvence rozhodne o příslušnosti k danému genotypu.

Po sekvenační reakci dochází k vlastnímu sekvenování (= určení pořadí nukleotidů) v sekvenátoru/genetickém analyzátoru, který pracuje na principu kapilární elektroforézy a je osazený laserovým detektorem. Energie vyzářená z fluorescenčních barviv je zachycovaná speciální CCD kamerou. Jednotlivým úsekům je poté za pomoci algoritmu přiřazována číselná hodnota (RFU). Tento komplikovaný a přesně kalibrovaný proces můžeme shrnout do dvou kroků. Výsledkem prvního kroku sekvenační analýzy je tzv. elektroforetogram. Jedná se o grafické znázornění výsledných dat. Jednotlivé báze jsou v elektroforetogramu

značeny odlišnými fluorescenčními barvami - cytosin je značen modře, thymin červeně, adenin zeleně a guanin žlutě. Následuje druhý krok sekvenační analýzy, kdy jsou data získaná ze sekvenátoru zpracována speciálním typem softwaru.

Po skončení PCR reakce zůstávají v mixu nespotřebované nukleotidy a zbytky primerů, které mohou negativně ovlivnit další analýzy amplikonů, jako je např. sekvenování. Proto se před vlastní sekvenací PCR reakce ošetří kitem ExoSap-IT (USB Corp.). Jedná se o směs hydrolytických enzymů - exonukleázy a alkalické fosfatázy v pufru, kterým se ošetří konečná PCR reakce. ExoSap nepoškozuje výsledný amplifikovaný produkt. Exonukleáza odstraňuje z produktu primery, alkalická fosfatáza zbytky nukleotidů. ExoSap se přidává přímo do PCR produktu a ve dvou krocích je reakce ukončena.

Postup:

- Na každých 5  $\mu$ l PCR reakce se přidají 2  $\mu$ l ExoSapu. Např. k 25  $\mu$ l reakce přidáme 10  $\mu$ l ExoSapu. Zamícháme a inkubujeme 30 minut při 37°C. Následně inaktivujeme ExoSap při 80°C 15 minut.
- Inkubace může probíhat v termobloku, nebo v termocykleru. Pokud prodloužíme čas inkubace, výsledný produkt bude lépe přečištěný.
- Po ošetření PCR produktu ExoSapem je potřeba k reakci přidat opět jeden z primerů!!
- Na každých 10  $\mu$ l vzorku přidáme 5  $\mu$ l primerů, forward nebo reverse, podle směru, který chceme sekvenovat. Takto upravený vzorek je připraven k sekvenování.

Sekvenace přečištěného produktu probíhá v externí laboratoři (SeqMe). Do laboratoře se posílá vzorek 10  $\mu$ l PCR reakce s 2  $\mu$ l ExoSapu a 5  $\mu$ l primeru (5  $\mu$ M) pro každý směr sekvenování zvlášť (1 vzorek obsahuje forward nebo reverse primer). Vzorek se posílá v 1,5 ml mikrozkuhavce nebo v PCR mikrozkuhavce. Vzorky lze do laboratoře zaslat i v 96ti jamkových destičkách. Sekvenace je provedena Sangerovou metodou na kapilárních analyzátoch Applied BioSystems 3500 prostřednictvím BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied BioSystems). Získaná data jsou dostupná ve formátu ab1 (abi - chromatogram) a jako sekvence ve formátu FASTA. Takto získané soubory sekvencí jednotlivých amplikonů/zvířat jsou dále zpracovány v programech (Mega, Geneious, Unipro Ugene, ...) a upravené sekvence porovnány s on-line dostupnou databází nukleotidových sekvencí NCBI prostřednictvím algoritmu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), sekvence porovnávají mezi sebou a jednotlivé genotypy vyhodnoceny.



## PCR

Chemikálie a spotřební materiál:

- PCR H2O (Top Bio)
- Mastermix (Top Bio)
- primer TMEM154F, 100  $\mu$ M (KRD)
- primer TMEM154R, 100  $\mu$ M (KRD)
- Vyizolovaná DNA
- 1,5 ml mikrocentrifugční zkumavky (Eppendorf)
- PCR zkumavky, stripky nebo destičky

Přístroje:

- PCR termocykler
- centrifuga
- sada automatických pipet
- vortex
- mrazák

## Elektroforéza

Chemikálie a spotřební materiál:

- EDTA 0,5 M, pH 8,0
- TBE (10 x) (vlastní příprava, viz. níže)
- agaróza (Serva)
- PCR ethidium bromid (Top-Bio) ! pozor potenciální karcinogen !
- PCR vkládací pufr (Top-Bio)
- DNA Marker 100-1500 pb (BioLabs)

### EDTA 0,5 M

1,0 M EDTA ..... 186,1 g(Sigma)

ultrafiltrovaná voda ..... 800 ml

S roztokem se intenzivně míchá, během míchání se upraví pH na 8,0 pomocí NaOH (cca 20 g). Po úplném rozpuštění roztok EDTA doplníme do objemu 1000 ml a sterilizujeme autoklávováním.

### TBE (10x)

Tris base ..... 108 g(Serva)

kyselina boritá ..... 55 g (Serva)

0,5 M EDTA (pH 8,0) ..... 40 ml(Serva)

ultrafiltrovaná voda ..... doplnit objem do 1000 ml

Poznámka: skladování výše uvedených roztoků je při pokojové teplotě  
DNA Marker 100-1500 pb (BioLabs) skladovat při -15 až -20°C

ístroje:

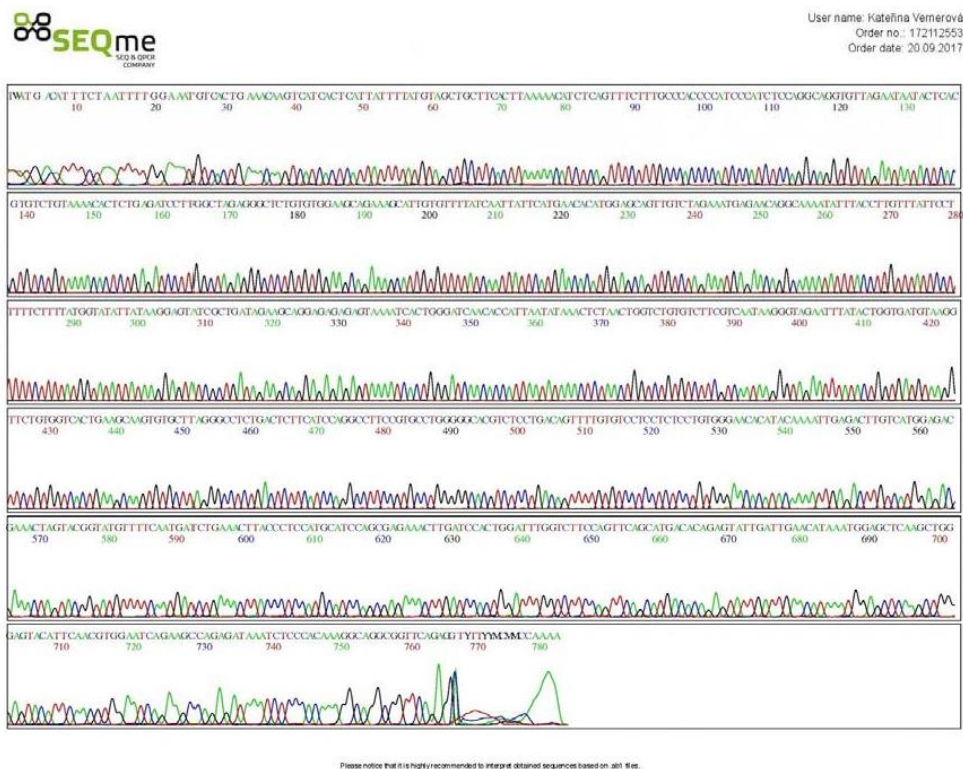
- rychlováhy Scaltec SBC 41 (Sartorius)
- třepačky MS-1 (IKA)
- třepačka MS-2 (IKA)
- chlazená centrifuga 1-14K(Sigma)
- centrifuga 5453 (Eppendorf)
- centrifuga 5418 (Eppendorf)
- chladič box CH-100 (Biosan)
- výhřevná třepačka Komfort ( Eppendorf)
- biohazard boxy BIO 2 (Nuair)
- automat pro extrakci NK MagNa Pure LC Instrument (ROCHE)
- termocykler TRIO (Biometra)
- real-time PCR systém CFX96 (Bio Rad)
- vyhodnocovací zařízení: průmyslová kamera
  - UV transiluminátor
  - vyhodnocovací software Gel-Pro Analyzer
- zařízení na přípravu ultrafiltrované vody (Aqual)
- lednice a mrazáky pro uložení reagensů a pro archivaci vzorků
- automatické pipety (Eppendorf ) v rozsahu 0,1 – 1000 ul
- laboratorní sklo pro přípravu a skladování roztoků (kádinky, odměrné válce,..)

## Příklady výsledků PCR analýzy – amplifikace části genu *TMEM154*

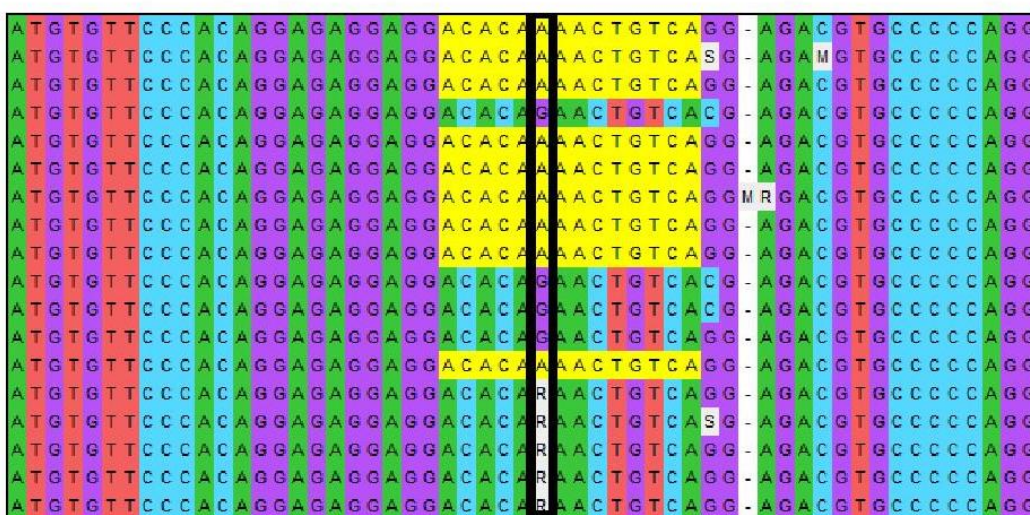
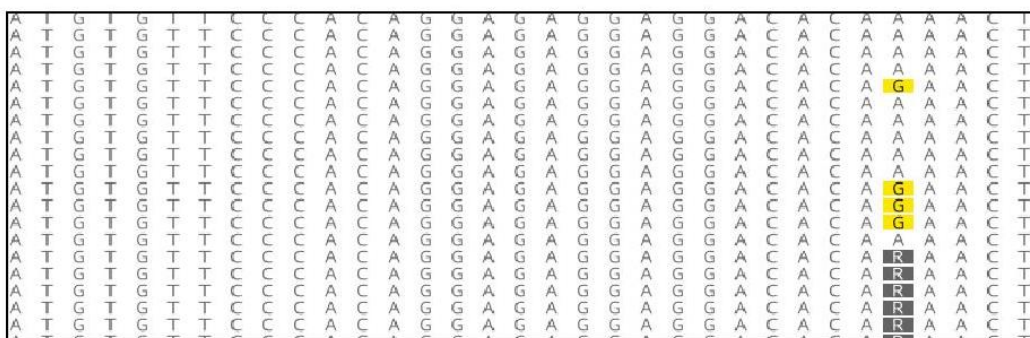
Amplifikační produkt má délku 828 bp u všech třech genotypů. Pro přesnou identifikaci jednotlivých genotypů je nutné osekvenovat naaplifikované produkty.



Obr.č.1: Vyhodnocení ELFO; slot č. 1 a č. 16 velikostní marker 100bp; sloty 2 – 13 specifický amplifikační produkt PCR, slot č. 14 negativní kontrola



Obr. č. 2: Výstup sekvenční analýzy genotypu K35.



Obr. č. 3: Ukázka Alignmentu 3 genotypů. Genotyp E35 s bází guanin, genotyp K35 s nukleotidem A, který je nejméně rizikovým genotypem při infekci lentiviry, a genotyp E35K s nukleotidem R (adenin nebo guanin), který je ohrožen infekcí SRLV nejvíce.

## II.5. Statistické hodnocení jednotlivých genotypů

### Asociační analýza

Asociační analýza zkoumá vztah mezi rizikovými faktory a rozvojem určitého onemocnění. Pokud se u infikovaných jedinců vyskytuje alela s vyšší frekvencí výskytu, než je tomu u zdravých jedinců, mluvíme o genetické asociaci. Vztah mezi alelou, geno- nebo haplotypem a onemocněním se testuje asociační analýzou. Uspořádání takové analýzy má charakter "case-control", kdy se porovnává zastoupení daného znaku (polymorfismu) mezi skupinou, která onemocněla a skupinou, u které onemocnění nevypuklo. Důležité je, aby všichni testovaní jedinci pocházeli ze stejné populace, a aby testovaná skupina byla co nejhomogennější (věk, pohlaví, plemeno). Vyšší frekvence SNP nebo genotypů u infikovaných jedinců může znamenat, že se s určitým genotypem zvyšuje riziko specifického onemocnění. (Lewis a Knight, 2012).

Získané výsledky jsou sumarizovány v kontingenčních tabulkách, kde se statistická významnost testuje Chí kvadrát testem.

Příklad výsledků sumarizovaný v kontingenční tabulce:

	počet n	E35	K35	E35K
SRLV pozitivní	6	1 (16%)	2 (33%)	3 (50%)
SRLV negativní	2	0 (0)	1 (50%)	1 (50%)

Měření vztahu rizikového faktoru a onemocnění pomocí odds ratio - srovnání skupin s a bez rizikového faktoru, jaká je šance onemocnět u obou skupin, nebo jestli se šance na infekci liší. Vypočítá se jako poměr šance vzniku onemocnění u skupiny vystavené riziku ku skupině, na kterou rizikový faktor nepůsobí.



### III. Srovnání novosti postupů

V současné době není v ČR k dispozici dostupná metodika zabývající se touto problematikou. Dosud dostupné informace jsou jen dílčí a rozptýlené ve vědeckých publikacích a monografiích, které se zabývají problematikou detekce původců virových onemocnění ovcí a koz, tj. maedi-visna virus ovcí (MVV) a virus infekční artritidy a encefalitidy koz (CAEV).

Předkládaná metodika zahrnuje popis všech metodických a analytických postupů od odběru vzorku, přes jeho uchování, zpracování a postupy imunochemické a molekulární detekce MVV a CAEV.

Součástí metodiky je i vyhodnocení vhodnosti jednotlivých detekčních metod.

Novost postupu spočívá v kombinaci sérologické a molekulárně biologické identifikace infikovaných zvířat, dále v modifikaci extrakce provirové DNA a použití primerů, které dosud nebyly použity pro diagnostiku SRLV v ČR. Použité primery byly ověřeny s pozitivním výsledkem při detekci kmenů aktuálně cirkulujících v chovech ovcí a koz v České republice.

### IV. Popis uplatnění metodiky

„Metodika genotypizace ovcí a koz - detekce markerů geneticky podmíněné rezistence k SRLV“ v první části zahrnuje teoretický úvod do problematiky. V praktické části pak jsou uvedeny postupy potřebné pro správný odběr vzorků, izolaci DNA a protokoly pro PCR detekci a sekvenování cílového genu/polymorfismu a určení genotypů zvířete.

Metodika představuje soubor optimalizovaných návodů molekulární analýzy, na jejichž základě lze provádět rutinní analýzy vzorků krve s cílem optimální detekce markerů genetické rezistence k infekci SRLV. Výstupem analýzy je pak detekce genotypů u pozitivních a negativních zvířat na základě molekulární analýzy.

Uživatelé metodiky jsou pracoviště výzkumná a veterinární, která mohou s výhodou využít předností optimalizovaných postupů detekce genotypů. Metodika bude uplatněna prostřednictvím SCHOK. S tímto subjektem byla uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.



## V. Ekonomické aspekty

Předpokládané ekonomické přínosy metodiky jsou kalkulovány až do výše 15 000 tis. Kč. Dalšími přínosy předkládané metodiky jsou rozšíření spektra technik a metodických postupů používaných v diagnostických laboratořích, rozšíření portfolia technik a služeb prováděných v laboratoři, metodická a vzdělávací funkce.

Přínosem pro chovatele je možnost vývozu plemenných zvířat (jehnic a beranů) v odhadovaném počtu cca 1000 ks za rok, tzn. min. 5 000 za kalkulované období. Průměrná cena plemenného zvířete je cca 3 tis. Kč.

Do nákladů na zavedení postupů uvedených v metodice lze započítat pořízení nejnětějšího investičního a neinvestičního vybavení pro provoz laboratoře a provedení úkonů a postupů uváděných v metodice v celkové minimální výši 6,5 mil Kč. V případě automatizace izolace DNA a zpracování velkého objemu vzorků je pak nutné počítat s dalšími náklady na pořízení linky pro izolaci DNA pomocí paramagnetických partikulí v objemu cca 2,5 mil Kč a automatické čipové elektroforézy nebo fragmentačního analyzátoru ve výši 1,4 mil Kč. Další náklady pak představují náklady na chemikálie a na základě dlouhodobých kalkulací činí jednotková cena za analýzu jednoho vzorku 420 Kč (ceny za chemikálie). V uvedeném příkladu kalkulace nákladů nejsou uvedeny doplňkové náklady, odpisy, náklady na vzdělávání a vyškolení personálu laboratoře, náklady na vývoj metod, které jsou odvislé od konkrétní situace a vybavenosti (materiální i personální) pracoviště.

Jako ekonomicky výhodnější se jeví analýza vzorků ve specializovaných laboratořích, kde lze sdílet náklady na pořízení investic, výchovu a vzdělávání pracovníků, služby.

## V. Seznam použité související literatury

- Alshanbari F. A., Mousel M. R., Reynolds J. O., et al. Mutations in *Ovis aries* TMEM154 are associated with lower small ruminant lentivirus proviral concentration in one sheep flock. *Animal Genetics*. 2014;45(4):565-571. doi:10.1111/age.12181.
- AMORENA, B., BADIOLA, J.J. Early detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. *J Vet Diagn Invest*. 2001;13(4):301-7.
- Barták P. a kol. Metodika odběrů a zpracování vzorků, serologického a molekulárního stanovení původce lentivirového onemocnění ovcí a koz. České Budějovice, 2017.
- BLACKLAWS, B.A. Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*. 2012;35,259–269.
- BOSHOFF, C. H., B. DUNGU, R. WILLIAMS, J. VORSTER, J. D. CONRADIE, D. W. VERWOERD, AND D. F. YORK. Detection of Maedi-Visna virus antibodies using a single fusion transmembrane-core p25 recombinant protein ELISA and a modified receiver-operating characteristic analysis to determine cut-off values. *J. Virol. Methods* 1997;63:47–56.
- BRINKHOF, J. AND VAN MAANEN C. Evaluation of Five Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and an Agar Gel Immunodiffusion Test for Detection of Antibodies to Small Ruminant Lentiviruses. *Clin.Vac. Immunol*. 2007;14:9,1210-1214.
- CELER JR., V., CELER, V., NEMCOVA, H.R., ZANONI, R., PETERHANS, E. Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole virus ELISA and AGID test. *Zentralbl Veterinarmed [B]* 1998;45,183–188.
- CELER JR., V., ZANONI, R., PETERHANS, E. Comparison of various antigens in the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis virus using the ELISA test. *Vet. Med. (Praha)* 1993; 38,237–244.
- CELER, V. Diagnostické využití strukturálních proteinů viru Maedi – Visna. Disertační práce, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 1997.
- Clawson M. L., Redden R., Schuller G., et al. Genetic subgroup of small ruminant lentiviruses that infects sheep homozygous for TMEM154 frameshift deletion mutation A4Δ53. *Veterinary Research*. 2015;46:22. doi:10.1186/s13567-015-0162-7.
- COMTET, L., FELIZIANI, F., LESCEU, S. Validation of the ID Screen® Maedi Visna Indirect ELISA: specificity on BTV-8 vaccinated sheep and detection of seroconversion. Poster presented at the 2010 EAVLD meeting, Lelystad, Holland.
- DE ANDRÉS, D., KLEIN, D., WATT, N.J., BERRIATUA, E., TORSTEINSDOTTIR, S., BLACKLAWS, B.A., HARKISS, G.D. Diagnostic test for small ruminant lentiviruses. *Vet Microbiol*. 2005; 107 (1-2):49-62.
- Fisher P., Noyes H., Kemp S., Stevens R., Brass A. A systematic strategy for the discovery of candidate genes responsible for phenotypic variation. *Methods Mol Biol*. 2009, 573, 329-345. doi: 10.1007/978-1-60761-247-6\_18

- Fisher, P., Hedeler, C., Wolstencroft, K., Hulme, H., Noyes, H., Kemp, S., ... Brass, A. (2007). A systematic strategy for large-scale analysis of genotype–phenotype correlations: identification of candidate genes involved in African trypanosomiasis. *Nucleic Acids Research*, 35, 5625–5633. doi: 10.1093/nar/gkm623
- Heaton M. P., Clawson M. L., Chitko-Mckown C. G., et al. Reduced Lentivirus Susceptibility in Sheep with TMEM154 Mutations. Haley CS, ed. *PLoS Genetics*. 2012;8(1):e1002467. doi:10.1371/journal.pgen.1002467.
- Heaton M. P., Kalbfleisch T. S., Petrik D. T., et al. Genetic Testing for TMEM154 Mutations Associated with Lentivirus Susceptibility in Sheep. Bardonì B, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e55490. doi:10.1371/journal.pone.0055490.
- HEATON, M. P, KALBFLEISCH, T. S., PETRIK, D. T., SIMPSON, B., KIJAS J. W., et al. (2013). Genetic Testing for TMEM154 Mutations Associated with Lentivirus Susceptibility in Sheep. *PLoS ONE* 8(2): e55490. doi:10.1371/journal.pone.0055490.
- HERRMANN, L.M., CHEEVERS, W.P., MARSHALL, K.L., MCGUIRE, T.C., HUTTON, M.M., LEWIS, G.S., KNOWLES, D.P. Detection of serum antibodies to ovine progressive pneumonia virus in sheep by using a caprine arthritis-encephalitis virus competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003;10(5):862-5.
- HERRMANN, L.M., CHEEVERS, W.P., MCGUIRE, T.C., ADAMS, D.S., HUTTON, M.M., GAVIN, W.G., KNOWLES, D.P. Competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus: Diagnostic tool for successful eradication. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003;10(2):267-271.
- HERRMANN-HOESING, L.M., BROUGHTON-NEISWANGER, L.E., GOUINE, K.C., WHITE, S.N., MOUSEL, M.R., LEWIS, G.S., MARSHALL, K.L., KNOWLES, D.P. Evaluation of a Caprine Arthritis-Encephalitis Virus/Maedi-Visna Virus Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in the Serological Diagnosis of Ovine Progressive Pneumonia Virus in U.S. Sheep. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2010;17(2):307-310.
- KRASSNIG, R., SCHULLER, W. Continuation of the observation and serological investigation of a maedi-visna-virus-infected sheep flock from January 1990 to June 1996. *Dtsch. Tieraztl. Wschr.* 1998;105, 50–53.
- KWANG, CUTLIP, J. R. Detection of Antibodies to Ovine Lentivirus Using a Recombinant Antigen Derived From the Env Gene. *Biochem Biophys Res Commun*1992;183 (3), 1040-1046.
- Larruskain A., Jugo B.M. Retroviral Infections in Sheep and Goats: Small Ruminant Lentiviruses and Host Interaction. *Viruses*. 2013;5(8):2043-2061. doi:10.3390/v5082043.
- Lewis C. M., Knight J. Introduction to genetic association studies. *Cold Spring Harbor Protocol*. 2012, 3, 297 - 306
- Leymaster K. A., Chitko-McKown C. G., Clawson M. L., Harhay G. P., Heaton M. P. Effects of *TMEM154* haplotypes 1 and 3 on susceptibility to ovine progressive pneumonia virus following natural exposure in sheep,, *Journal of Animal Science*, Volume 91, Issue 11, 1 November 2013, Pages 5114–5121,
- MAZZEI, M., CARROZZA, M.L., BANDECCHI, P., MAZZANTI, G., MANNELLI, A., TOLARI, F. (2005) Evaluation of an ELISA to detect antibodies to maedi-

- visna virus in individual and pooled samples of milk from sheep. *Vet Rec.* 2005 Oct 29;157(18):552-5.
- MICHIELS, R., VAN MAEL, E., QUINET, CH., CAY, A.B., DE REGGE, N. Comparative analysis of different serological and molecular test for detection of small ruminant lentiviruses (SRLVs) in Belgian sheep and goats. poster, WAVLD 2017, Sorrento, Italy.
- MINGUIJÓN, E., REINA, R., PÉREZ, M., POLLEDO, L., VILLORIA, M., RAMÍREZ, H., LEGINAGOIKOA, I., BADIOLA, J.J., GARCÍA-MARÍN, J.F., DE ANDRÉS, D., LUJÁN, L., AMORENA, B., JUSTE, R.A. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Vet Microbiol.* 2015;181(1-2):75-89.
- Molae V., Eltanany M., Lühken G. First survey on association of TMEM154 and CCR5 variants with serological maedi-visna status of sheep in German flocks. *Veterinary Research.* 2018;49:36. doi:10.1186/s13567-018-0533-y.
- NOWICKA, D., CZOPOWICZ, M., MICKIEWICZ, M., SZALUŚ-JORDANOW, O., WITKOWSKI, L., BAGNICKA, E., KABA, J. 2014. Diagnostic performance of ID Screen® MVV-CAEV Indirect Screening ELISA in identifying small ruminant lentiviruses infected goats. *Pol J Vet Sci.* 2014;17(3):501-6.
- OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 2000. Chapter 1.1.3: Principles of validation of diagnostic assays for infectious disease, pp. 15–23.
- PALSSON, P.A. Maedi and Visna in sheep. *Slow virus diseases of animals and man.* Amsterdam, R.H. Kimberlin 1976, 43s.
- PETERHANS, E., GREENLAND, T., BADIOLA, J., HARKISS, G., BERTONI, G., AMORENA, B., ELIASZEWICZ, M., JUSTE, R.A., KRASSNIG, R., LAFONT, J.P., LENIHAN, P., PÉTURSSON, G., PRITCHARD, G., THORLEY, J., VITU, C., MORNEX, J.F., PÉPIN, M. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet. Res.* 2004;35,257–274.
- Pinczowski P., Sanjosé L., Gimeno M., Crespo H., Glaria I., Amorena B., de Andrés D., Pérez M., Reina R., and Luján L. Small Ruminant Lentiviruses in Sheep: Pathology and Tropism of 2 Strains Using the Bone Marrow Route. *Vet. Pathol.* 54(3), 413 – 424, doi: 10.1177/0300985816688742
- SAMAN E., VAN EYNDE G., LUJAN L., EXTRAMIANA B., HARKISS G., TOLARI F., GONZALEZ L., AMORENA B., WATT N. AND BADIOLA J. A New Sensitive Serological Assay for Detection of Lentivirus Infections in Small Ruminants. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1999;6:734-740.
- Sider L. H., Heaton M. P., Chitko-McKown C. G., et al. Small ruminant lentivirus genetic subgroups associate with sheep TMEM154 genotypes. *Veterinary Research.* 2013;44(1):64. doi:10.1186/1297-9716-44-64.
- Teare T. D. Candidate genes association studies. *Methods Mol. Biol.* 2011, 713, 105 – 117, doi: 10.1007/978-1-60327-416-6\_8
- TOSSER-KLOPP, G., BARDOU, P., BOUCHEZ, O., CABAU, C., CROOIJMANS, R., et al. (2016). Correction: Design and Characterization of a 52K SNP Chip for Goats. *PLOS ONE* 11(3): e0152632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152632>
- VALIDATION REPORT LSI VET MV/CAE ELISA: 110708-LF-v2-VA-Validation\_Report\_VETCAEV. LSI - Laboratoire Service International. 2011
- VAREA, R., MONLEON, E., PACHECO, C., LUJAN, L., BOLEA, R., VARGAS, M.A., VAN EYNDE, G., SAMAN, E., DICKSON, L., HARKISS, G.D.,

- White S. N. , Knowles D. P. Expanding Possibilities for Intervention against Small Ruminant Lentiviruses through Genetic Marker-Assisted Selective Breeding. *Viruses*. 2013;5(6):1466-1499. doi:10.3390/v5061466.
- White, S. N., Mousel, M. R., Herrmann-Hoesing, L. M., Reynolds, J. O., Leymaster, K. A., Neibergs, H. L., Lewis, G. S., Knowles, D. P. (2012). Genome-Wide Association Identifies Multiple Genomic Regions Associated with Susceptibility to and Control of Ovine Lentivirus. *PLoS ONE*, 7(10), e47829.
- White, S. N., Mousel, M. R., Reynolds, J. O., Herrmann-Hoesing, L. M., & Knowles, D. P. (2014). Deletion variant near ZNF389 is associated with control of ovine lentivirus in multiple sheep flocks. *Animal Genetics*, 45(2), 297–300. doi: 10.1111/age.12107.
- ZANONI, R., VOGT, H.R., POHL, B., BOTTCHEER, J., BOMMELI, W., PETERHANS, E. An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small-ruminant lentiviruses. *Zentralbl. Veterinarmed B* 1994; 41, 662–669.
- Zprávy o činnosti v oblasti ochrany zdraví zvířat. Státní veterinární správa, Odbor ochrany zdraví a pohody zvířat, Praha. 1994 - 2015.

## **VI. Seznam publikací, které předcházely metodice**

Barták P., Václavek P., Kostková M., Mikulášková K., Šimek B. (2017): Prevalence lentivirových onemocnění malých přežvýkavců v ČR s využitím sérologické diagnostiky. *Veterinářství* 67: 227-232.

Barták P. a kol. Metodika odběrů a zpracování vzorků, serologického a molekulárního stanovení původce lentivirového onemocnění ovcí a koz. České Budějovice, 2017.



Název: Barták P. a kol. (2019): Metodika genotypizace ovcí a koz - detekce markerů geneticky podmíněné rezistence k SRLV

Autorský kolektiv: Prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr.h.c.  
Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
Ing. Antonín Vejčík, CSc.  
Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D.  
Ing. Kateřina Vernerová  
Ing. Barbora Farková  
Mgr. Bronislav Šimek  
MVDr. Petr Václavek, Ph.D.  
Mgr. Hana Plodková  
MVDr. Pavel Barták, Ph.D.

Vydal: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zemědělská fakulta  
Studentská 13  
370 05 České Budějovice

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR, dopisem ze dne 17.1.2019, čj. 910/2019-MZE-14152 jako uplatněná metodika s doporučením pro její využití v zemědělské praxi.

Kontakt na autory: [VCurn@seznam.cz](mailto:VCurn@seznam.cz)

ISBN:



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice



Státní  
veterinární  
ústav  
Jihlava

## **Ověřená technologie: Systém prevence a profylaxe lentivirových infekcí malých přežvýkavců**

Technologie byla vypracovaná jako výstup výzkumného projektu MZe NAZV QJ 1610096 "Program zdravotní kontroly lentivirových infekcí malých přežvýkavců s využitím nových metod časně laboratorní diagnostiky a markerů geneticky podmíněné rezistence k infekci jako selekčního kritéria"

Prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr.h.c.  
Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
Ing. Antonín Vejčík, CSc.  
Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D.  
Ing. Kateřina Vernerová  
Ing. Barbora Fařková  
Mgr. Bronislav Šimek  
MVDr. Petr Václavek, Ph.D.  
Mgr. Hana Plodková  
MVDr. Pavel Barták, Ph.D.

České Budějovice, listopad 2018

## Systém prevence a profylaxe lentivirových infekcí malých přežvýkavců

Pavel Barták a kol.  
bartak@svujihlava.cz

Vypracováno za podpory výzkumného projektu MZe NAZV QJ 1610096 "Program zdravotní kontroly lentivirových infekcí malých přežvýkavců s využitím nových metod časné laboratorní diagnostiky a markerů geneticky podmíněné rezistence k infekci jako selekčního kritéria"

Oponenty metodiky byli:

Doc. MVDr. Pavel Novák, CSc.

MVDr. Marie Bleierová

Podíl autorů na vypracování metodiky:

Prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr.h.c. – 5%

Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D. – 15%

Ing. Antonín Vejčík, CSc. – 5%

Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D. – 5%

Ing. Kateřina Vernerová – 5%

Ing. Barbora Farková – 5%

Bc. Petr Štoidl

Ing. Eva Jozová, Ph.D.

Ing. Irena Hoštičková

Mgr. Bronislav Šimek – 35%

MVDr. Petr Václavek, Ph.D. – 10%

Mgr. Hana Plodková – 5%

MVDr. Pavel Barták, Ph.D. – 10%

*Text: ©2018*

*Foto: ©2018*

Vydáno bez jazykové úpravy

Obsah:

<b>I. Anotace technologie .....</b>	<b>1</b>
<b>II. Předmět a cíl technologie .....</b>	<b>2</b>
<b>III. Vlastní popis technologie .....</b>	<b>4</b>
<i>Odběr vzorků krve .....</i>	4
<i>Sérologická diagnostika: průkaz specifických protilátek proti SRLV .....</i>	4
<i>Detekce provirové DNA SRLV pomocí PCR metody .....</i>	4
<i>Detekce provirové DNA SRLV pomocí RT-PCR metody .....</i>	4
<i>Diagnostika SRLV na základě LAMP analýzy .....</i>	5
<i>Detekce polymorfismu na genu TMEM154 .....</i>	5
<b>IV. Testování vlastní technologie – protokol a ověření .....</b>	<b>6</b>
<b>V. Shrnutí .....</b>	<b>8</b>

## I. Anotace technologie

Ověřená technologie je výsledkem projektu MZe NAZV QJ 1610096 "Program zdravotní kontroly lentivirových infekcí malých přežvýkavců s využitím nových metod časně laboratorní diagnostiky a markerů geneticky podmíněné rezistence k infekci jako selekčního kritéria".

V technologii je popsán nový systém prevalence a profylaxe lentivirových infekcí malých přežvýkavců jako předpoklad pro nový, účinný eradikační program. Technologie zahrnuje zásady a metodické postupy odběru, uchování a zpracování vzorků krve; postupy pro sérologické stanovení virového onemocnění, postupy pro molekulární detekci virové NK (izolace provirové DNA, detekce provirové DNA pomocí PCR, RT-PCR a LAMP, postupy pro izolaci DNA ovcí a koz a detekci genotypu majícího vztah k rezistenci k SRLV. Dále jsou uvedena doporučení pro chovatele, tak aby nedocházelo k rozšiřování či zavlékání onemocnění maedi-visna ovcí (MV) a virová arteritida a encefalitida koz (CAE) v chovech.

## II. Předmět a cíl technologie

Lentiviry malých přežvýkavců (SRLV), konkrétně maedi-visna virus ovcí (MVV) a virus infekční artritidy a encefalitidy koz (CAEV) způsobují celosvětově rozšířená onemocnění vyskytující se i v ČR – maedi-visnu ovcí (MV) a artritidu a encefalitidu koz (CAE). Tyto choroby jsou neléčitelné a neexistují proti nim účinné vakcíny. Vzhledem k současné nakažové situaci jsou onemocnění MV a CAE závažným problémem. Způsobují významné ekonomické ztráty a vytváří bariéru při obchodování s plemenným materiálem (nejen v EU), či při pořádání chovatelských akcí (výstavy, svody). Chovy v ČR zařazené v kontrole užitečnosti (KU) musí být MV a CAE prosté.

Současný kontrolní systém prováděný dle Metodiky kontroly zdraví zvířat a nařízené vakcinace monitoruje nakažový status v chovech v KU sledováním výskytu protilátek. Nejsou však stanoveny systémová opatření pro eradikaci nákazy pro chovy, které nejsou nakažové prosté nebo do nichž byla infekce zavlečena. Plemeno ovce šumavská, kde na základě předchozích zjištění známa vyšší incidence onemocnění, je z monitoringu vyjmuto. Je to české národní plemeno, které je zařazené do programu uchování genetických zdrojů, je součástí genové rezervy a je zahrnuta do světového genofondu ohrožených plemen hospodářských zvířat. Ozdravování chovů na základě vyřazení pozitivních zvířat by ohrozila plemennou základnu natolik, že by mohlo dojít k jeho zániku. Stejně jako u eradikace klusavky (scrapie) na základě selekce rezistentních genotypů se i zde nabízí možnost zavedení eradikačního programu spojujícího časnou a přesnou diagnostiku společně s asistovanou selekcí podmíněnou markery genetické rezistence.

Souběžné poznatky ukazují, že používané diagnostické metody nejsou vždy zcela spolehlivé vzhledem ke složité patogenezí onemocnění. Nejspolehlivější je kombinace imunologických a molekulárně biologických metod, přičemž s přihlédnutím ke kmenové variabilitě, je třeba metody molekulárně biologické diagnostiky nadále zdokonalovat. Krevní vzorky jsou primárně testovány metodou ELISA za účelem průkazu specifických protilátek. Suspektní vzorky jsou případně potvrzovány alternativními imunologickými metodami - imunodifuzním testem popř. imunoblotem. Sérologicky pozitivní vzorky a vybrané negativní vzorky jsou dále testovány na přítomnost provirové DNA metodou real-time PCR (qPCR) či LAMP.

Na základě analýzy genomu ovcí byl identifikován kandidátní gen pro odolnost proti onemocnění MV/CAE – gen *TMEM154*. Nejsilnější vztah k odolnosti vykazuje polymorfismus E35K. Molekulární analýza založená na sekvenování genu *TMEM154* a identifikace konkrétního genotypu umožňuje markery asistovanou selekci a výběr jedinců s genotypem s vyšší odolností vůči onemocnění.

Vzhledem k rostoucímu zájmu o chov ovcí a koz v ČR je potřeba podporovat rozvoj chovu těchto zvířat, včetně ohrožených domácích plemen, z hlediska zdravotního stavu zvířat, šlechtění i podpory obchodu s plemenným materiálem. Ozdravovací program od lentivirových infekcí malých přežvýkavců založený na kombinaci přesné a rychlé diagnostiky onemocnění a markery asistované selekce (MAS) se jeví jako možné východisko pro řešení současné nálezové situace.

***Cílem technologie je navrhnout modelový postup založený na přesné a včasné detekci SRLV a molekulární detekci specifického genotypu zvířete. Tento postup umožňuje markery asistovanou selekci odolnějších jedinců na základě genetické odolnosti k infekci a současně eliminaci infikovaných jedinců z chovu.***



### **III. Vlastní popis technologie**

#### ***Odběr vzorků krve***

Pro diagnostické účely je odebírána periferní krev zvířat (věková kategorie: minimálně 4 měsíce po odstavu). Krev je odebírána do plastových 5 ml zkumavek s antikoagulantem K<sub>3</sub>EDTA. Ihned po odběru je krev ve zkumavce nutně důkladně promíchána s antikoagulantem a uchovávána při +4°C. Ze vzorků krve je odstředěním separována plazma, buffy-coat a erytrocyty. Krevní plazma se používá pro sérologické vyšetření, buffy coat pro průkaz provirové DNA. Pro stanovení genotypu zvířete je DNA izolována z celého vzorku krve. Vzorky jsou archivovány při -80°C.

#### ***Sérologická diagnostika: průkaz specifických protilátek proti SRLV***

Zvířata infikovaná SRLV zůstávají imunokompetentní a reagují na infekci tvorbou specifických protilátek. Humorální odpověď na infekci MVV je významně pomalejší, než u jiných virových infekcí s akutním průběhem. K sérokonverzi dochází různě a to od několika týdnů do několika měsíců po infekci. Protilátky typu IgG jsou po přirozené infekci MVV/CAEV přítomné po celou dobu života zvířete a slouží jako základní indikátor monitorování nákazy v chovech a selekční kritérium při eliminaci nákazy. Pro sérologickou diagnostiku SRLV na území ČR jsou vhodné komerční ELISA testy Elitest MVV/CAEV (Hyphen) a ID Screen MV Indirect (IDvet), popř. jejich kombinace při nutnosti konfirmačního vyšetření.

#### ***Detekce provirové DNA SRLV pomocí PCR metody***

K prokázání provirové DNA sekvence lentivirů u malých přežvýkavců je použita molekulárně biologická metoda PCR (polymerázová řetězová reakce). Principem této metody je multiplikace úseku cílové sekvence vybraného genu z provirové DNA vznikající po integraci virového genomu do hostitelské DNA pomocí specifických primerů, které tuto sekvenci ohraničují. Izolace provirové DNA je prováděna z buffy coatu a u extrahované DNA je provedena testace na přítomnost provirové DNA pomocí nested PCR dle Grego et al. (2007). Cílová oblast genomu je konzervativní oblast *gag* genu. Výsledný amplifikační a reamplifikační produkt je o délce 1,3 kb a 0,8 kb.

#### ***Detekce provirové DNA SRLV pomocí RT-PCR metody***

V průběhu real-time PCR je vizualizace amplifikačního produktu zajištěna nasednutím specifické fluorescenční sondy typu Taqman pro daný úsek. V elongační fázi dochází k jejímu rozložení pomocí exonukleázové aktivity Taq polymerázy a tím i k uvolnění fluorescenčního záření. Jako kontrolní gen je použit gen pro  $\beta$ -aktin. K detekci genu pro  $\beta$ -aktin se do reakce s templátovou DNA získanou z testovaného zvířete přidává jeden pár specifických primerů a jedna sonda značenou fluoroforem Hex dle Toussaint et al. (2007).

### **Diagnostika SRLV na základě LAMP analýzy**

Metoda Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) je moderní metodou, která umožňuje vysoce specifickou, účinnou a rychlou amplifikaci nukleových kyselin za izotermických podmínek. V porovnání s metodou real-time PCR je LAMP specifičtější, citlivější a rychlejší a je velmi citlivá na čistotu a kvantitu vstupní DNA. Je ekonomicky efektivní, a to i díky tomu, že pro vizualizaci není potřeba elektroforetického zobrazení. Další výhodou metody LAMP je její rychlost. Mezi základní komponenty každé reakce patří 4 oligonukleotidové primery, jejichž účelem je rozpoznat 6 odlišných oblastí na cílovém genomu a DNA dependentní DNA polymeráza.

### **Detekce polymorfismu na genu *TMEM154***

V populacích malých přežvýkavců se u transmembránového genu 154 *TMEM154* vyskytují nejméně 3 polymorfismy. První je polymorfismus K35, kdy je na pozici 35 genu báze adenin, a kdy tato sekvence nukleotidů kóduje aminokyselinu lysin. Zvířata s tímto polymorfismem mají snížené riziko nákazy SRLV infekcí. Druhým polymorfismem - E35 - je přítomnost báze guaninu na 35. pozici, výsledkem je zařazení aminokyseliny glutaminu do peptidového řetězce, a nositelé s tímto polymorfismem jsou náchylnější k infekci SRLV viry. Nejrizikovější skupinou jsou ale heterozygotní nositelé - E35K, kteří mají na pozici 35 R (adenin a guanin), a kteří jsou k infekci lentiviry nejnáchylnější. Příslušný genotyp (polymorfismus) je detekován na základě PCR amplifikace genu *TMEM154* a sekvenační analýzy amplifikovaného produktu.

## IV. Testování vlastní technologie – protokol a ověření

Pro všechny uvedené postupy byly vypracovány podrobné metodické postupy (Barták et al. 2017 a Barták et al. 2018) a metodické postupy pro zpracování vzorků krve, izolaci provirové DNA a zvířecí DNA, sérologické stanovení protilátek proti SRLV, molekulární detekci SRLV a identifikaci polymorfismu – rezistentního či náchylného genotypu byly otestovány a ověřeny na souboru více než 3500 vzorků ovcí a koz.

Klíčové pro dosažení optimálních výsledků je doporučený odběr a zpracování vzorků krve a optimalizovaný postup izolace provirové DNA. Pro sérologickou diagnostiku SRLV na území ČR jsou vhodné komerční ELISA testy Elitest MVV/CAEV (Hyphen) a ID Screen MV Indirect (IDvet), popř. jejich kombinace při nutnosti konfirmačního vyšetření. Sensitivita ELISA testů se pohybuje většinou nad 90% a specifita bývá obecně velmi vysoká (96-100%). Každý z testů používaných k sérologické diagnostice má své přednosti a nevýhody s ohledem na potenciální možnosti využití, kterými jsou zejména jejich různá specifita a sensitivita. Protože neexistuje žádný oficiální „zlatý standard“ sérologických testů na diagnostiku infekcí SRLV, jsou testy většinou porovnávány navzájem mezi sebou a výsledné studie tak mají různou obtížně porovnatelnou kvalitu.

Pro vyhodnocení relativní sensitivity komerčních ELISA testů na vzorcích z České republiky byl použit soubor terénních vzorků ovcí a koz z různých chovů, které byly sérologicky pozitivní v imunodifuzním testu (IDT/AGID MAEDITEC). Jako nejvíce citlivý test se jeví Elitest MVV/CAEV, srovnatelnou úroveň vykazuje ID Screen MV Indirect. Nejméně citlivý test v tomto porovnání byl IDEXX MVV/CAEV p28 Ab Screening Test při dodržení kritérií hodnocení daných výrobcem.

Technologie obsahuje i metodické postupy molekulární detekce SRLV založené na PCR, RT-PCR a LAMP/RT-LAMP technikách. Tyto techniky jsou vhodným doplňkem sérologického stanovení SRLV, umožňují molekulární identifikaci a kmenovou charakterizaci SRLV nicméně tyto postupy jsou citlivé na dostatečné množství a kvalitu provirové DNA.

Na základě sérologické a molekulární detekce byla vyhodnocena prevalence v analyzovaných chovech ovcí a koz. Prevalence byla ve velmi širokém rozsahu 0 - 53.3 %. Byly identifikovány chovy bez přítomnosti SRLV (13 chovů), ale i 12 chovů s výskytem SRLV, ve 4 případech byla více než třetina zvířat v chovu infikovaná.

Tabulka 1: Prevalence onemocnění MV/CAE ve sledovaných chovech.

Číslo chovu	Druh zvířete	Celkový počet zvířat	Prevalence v %
1.	kozy	243	13.2
2.	ovce	150	15.3
3.	ovce	230	7.8
4.	ovce	8	0
5.	kozy	22	4.5
6.	ovce	50	2
7.	ovce	100	10
8.	ovce	50	0
9.	ovce	2	0
10.	ovce	200	44.5
11.	ovce	431	5.6
12.	kozy	18	0
13.	ovce	42	0
14.	ovce	90	0
15.	kozy	103	0
16.	ovce	50	0
17.	kozy	19	0
18.	kozy	31	0
19.	ovce	248	0
20.	ovce	91	0
21.	ovce	206	0
22.	ovce	280	20
23.	ovce	299	43.1
24.	kozy	173	29.5
25.	ovce	274	53.3

Molekulární analýza polymorfismu v kandidátním genu *TMEM154* potvrdila výskyt všech třech genotypů. Nepotvrdila se ale 100% vazba příslušného polymorfismu na odolnost či vyšší náchylnost k onemocnění pravděpodobně z důvodu mutací SRLV a překonání dříve publikované vazby polymorfismu K35 k rezistenci k SRLV. Nicméně v rámci této skupiny genotypů je patrný trend vyšší odolnosti onemocnění a i selekce jedinců s tímto genotypem je vyžadovaná.

Tabulka 2: Výskyt genotypů zvířat ve skupině sérologicky pozitivních a negativních

ELISA genotyp	pozitivní			negativní		
	E35 %	E35K %	K35 %	E35 %	E35K %	K35 %
1	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	4,35	73,91	21,74	0,00	20,83	79,17
3	10,00	50,00	40,00	5,00	40,00	55,00
10	1,92	50,00	48,08	18,52	51,85	29,63
11	55,00	45,00	0,00	32,56	51,16	16,28
22	25,64	61,54	12,82	10,26	28,21	61,54
23	8,43	48,19	43,37	9,33	32,00	58,67
24	100,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00
25	52,63	31,58	15,79	13,64	50,00	36,36

**Soubor opatření zahrnutý v kontrolním programu je třeba nastavit podle nálezového statusu chovu.**

**1. chov prostý SRLV**

- sérologický monitoring nálezového statusu
- systém biosecurity jako nástroj ochrany chovu před zavlečením infekce
- přednostní zařazování do chovu jedinců o genotypu K35 pro zvýšení kvality stáda z hlediska obchodu a z hlediska prevence

**2. chov infikovaný SRLV**

- sérologická identifikace infikovaných zvířat
- molekulární detekce a identifikace genotypu SRLV
- periodické vyřazování infikovaných zvířat z chovu bez ohledu na jejich genotyp
- přednostní zařazování do chovu jedinců o genotypu K35 s potenciální vyšší odolností SRLV
- systém biosecurity jako nástroj ochrany chovu před zavlečením infekce

**3. chov s neznámým nálezovým statusem**

- identifikace stáda serologickým vyšetřením a identifikace infikovaných zvířat
- molekulární detekce a identifikace genotypu SRLV
- periodické vyřazování infikovaných zvířat z chovu bez ohledu na jejich genotyp
- přednostní zařazování jedinců o genotypu K35 s potenciální vyšší odolností SRLV do chovu
- systém biosecurity jako nástroj ochrany chovu před zavlečením infekce

## V. Shrnutí

Uvedené postupy prokázaly možnost rychlé, včasné a přesné detekce onemocnění SRLV a v řadě případů vysokou prevalenci onemocnění v analyzovaných chovech.

Na základě navržených postupů sérologické a molekulární analýzy lze navrhnout i systém prevence a profylaxe lentivirových onemocnění ovci a koz založený na:

- **důsledné kontrole výskytu onemocnění v chovech;**
- **identifikaci infikovaných zvířat na základě sérologické či sérologické a molekulární analýzy;**
- **vyřazení infikovaných zvířat z chovu bez ohledu na jejich genotyp;**
- **molekulární identifikaci genotypu zvířete a do chovu přednostní zařazování jedinců o genotypu K35 s potenciální vyšší odolností SRLV;**
- **v případě obchodování se zvířaty – důslednou kontrolu zdravotního statusu na základě sérologické či sérologické a molekulární analýzy a identifikace genotypu zvířete.**

Tento systém povede k:

- **ozdravení chovů a postupnému snižování počtu chovů s MV/CAE ;**
- **prevence zavlečení infekce do chovu dovozem infikovaných zvířat.**

V případě genových rezerv – aplikace bodu 3 (*vyřazení infikovaných zvířat z chovu bez ohledu na jejich genotyp*) v míře negativně neovlivňující genetickou základnu chovu.



Název: Barták P. a kol. (2018): Metodika genotypizace ovcí a koz -  
detekce markerů geneticky podmíněné rezistence k SRLV

Autorský kolektiv: Prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr.h.c.  
Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
Ing. Antonín Vejčík, CSc.  
Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D.  
Ing. Kateřina Vernerová  
Ing. Barbora Farková  
Mgr. Bronislav Šimek  
MVDr. Petr Václavěk, Ph.D.  
Mgr. Hana Plodková  
MVDr. Pavel Barták, Ph.D.

Vydal: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zemědělská fakulta  
Studentská 13  
370 05 České Budějovice

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR, dopisem ze dne ..., jako  
uplatněná metodika s doporučením pro její využití v zemědělské praxi.

Kontakt na autory: [VCurn@seznam.cz](mailto:VCurn@seznam.cz)



## 6 Závěr

Disertační práce se zabývala problematikou lentivirových infekcí malých přežvýkavců. V práci jsou shrnuty výsledky analýzy prevalence onemocnění maedi-visna (MV) ovcí a infekční artritidy a encefalitidy koz (CAE) a podává první zprávu o distribuci genotypů SRLV na území ČR Dalším výstupem je přehled o zastoupení haplotypů TMEM154 E35K v českých chovech ovcí a analýza vztahu haplotypu k vnímavosti, resp. odolnosti k SRLV. K praktickým výsledkům patří výstup pilotní studie metody LAMP jakožto možného diagnostického nástroje SRLV a ověřená metodika genotypizace *TMEM154*.

Celkem bylo odebráno 3410 vzorků krve ovcí a koz z 21 stád. Vzorky byly vyšetřeny na přítomnost specifických protilátek proti SRLV, které byly detekovány u 642 zvířat (ze 7 hospodářství), což je 33 %. Zjištěná sérologická prevalence MVV u ovcí byla 19,9 % a prevalence CAE u koz 14,1 %. Všechny séropozitivní a suspektní vzorky byly dále podrobeny analýze real time PCR ke confirmaci výsledku imunochemických stanovení. Provirová DNA byla detekována u 410 vzorků z 631 séropozitivních (65 %). Dále bylo náhodně vybráno 77 séropozitivních vzorků, kde byl u všech identifikován genotyp SRLV. Z toho 60 genotypů (u ovcí i koz) patřilo do skupiny A a 17 genotypů do skupiny B (pouze ovce). Fylogenetickou analýzou byl orientačně stanoven i subtyp obou genotypů, kdy všechny sekvence genotypu B se jasně shlukovaly v podtypu B2. Skupina genotypu A vykazovala vyšší variabilitu a příbuznost se subtypy A2 a A3.

Ze séropozitivních vzorků s prokázanou provirovou DNA bylo náhodně vybráno 40 vzorků (8 koz ze 2 stád a 32 ovcí z 8 stád) a 50 negativních vzorků s cílem navrhnout metodiku pro LAMP diagnostiku SRLV u ovcí a koz. Séronegativita byla metodou LAMP jednoznačně potvrzena u všech vzorků. Séropozitivní vzorky byly potvrzeny ve 31 případech ze 40. Podle výsledků analýzy dostupných literárních pramenů byla LAMP diagnostika k potvrzení SRLV u ovcí poprvé úspěšně použita v naší studii.

Ke genotypizaci *TMEM154* bylo náhodně vybráno 605 vzorků ovcí a 60 vzorků koz. U všech vzorků proběhla amplifikace PCR produktu předpokládané délky. Následně byl sekvenováním určen genotyp všech vzorků. U ovcí bylo 93 vzorků o genotypu EE, 236 vzorků KK a 276 vzorků EK. Nejvíce séropozitivních zvířat bylo heterozygotních EK (50,9 %). Homozygotních EE bylo 16,5 % a homozygotních KK 32,6 %. Všechny vzorky koz byly homozygotní EE v analyzovaném polymorfismu genu *TMEM154* patřily tedy k haplotypu s vyšším rizikem infekce SRLV.

Na základě výsledků disertační práce je možné navrhnout doporučení jak pro výzkum a optimalizaci laboratorních metod, tak pro praktické využití v chovech malých přežvýkavců. Vzhledem k tomu, že „zlatý standard“ laboratorní diagnostiky SRLV nebyl stále nalezen, bylo by vhodné pokračovat ve vývoji co nejpřesnějších nástrojů rané diagnostiky bez navyšování finančních nákladů na vyšetření vzorků. Kromě návrhu univerzálnějších primerů pro spolehlivější výsledky PCR používané pro confirmaci séropozitivních vzorků, lze vzít v potaz i orientační diagnostiku. S úspěchem již byla otestována analýza ELISA s využitím bazénových vzorků mléka. Vyloučení celých chovů bez nálezu SRLV by mohlo částečně snížit finanční náklady na monitoring nákazy v ČR. Jedním z možných řešení by také mohla být optimalizace metody LAMP a její následné použití coby orientačního screeningu v „provozních podmínkách“ a teprve na základě výsledků LAMP přistoupit odpovídajícím způsobem k testování jednotlivců. V tomto případě je klíčová optimalizace izolace DNA. Pro přesnější asociační analýzu vztahu genotypu *TMEM154* u ovcí by bylo žádoucí provést podrobnější sekvenční analýzu virových genotypů tak, aby mohly být zařazeny do fyloskupin s doloženou afinitou k *TMEM154*. Na základě našich zjištění lze doporučit genotypizaci *TMEM154* u chovných beranů k zařazení do šlechtitelských programů, jakožto účinný a finančně nenáročný nástroj pro snížení rizikové alely v chovech.

## 7 Seznam zkratek

A – adenin  
aa – aminokyselina  
AGID – imunodifúzní test v agarovém gelu  
AP-1 – aktivátorový protein-1  
AP-4 – aktivátorový protein-4  
APOBEC3 – apolipoprotein B mRNA–editující enzymový katalytický protein 3  
B7 – kostimulační proteiny z rodiny B7 exprimované na antigen prezentujících buňkách  
BIV – virus imunodeficiency skotu  
C – cytosin  
CA – kapsida  
CAE – artritida a encefalitida koz  
CAEV – virus artritidy a encefalitidy koz  
cAMP – cyklický adenosinmonofosfát  
CAP – protein katabolického aktivátoru  
CCR5 – C-C chemokinový receptor typu 5  
CD206 – manózoový receptor (klastr diferenciacie 206)  
CD4 – diferenciační skupina 4 na pomocných T lymfocytech (CD4+ T-lymfocyty)  
CD8 – diferenciační skupina 8 na cytotoxických T lymfocytech (CD8+ T-lymfocyty)  
cDNA – komplementární deoxynukleová kyselina  
CTL – cytotoxický T lymfocyt  
CYPA – cyklofilin A  
D – kyselina asparagová  
DCAF1 Cul4A – faktor 1 asociovaný s proteinem 1 vázajícím poškození DNA a Cullinem4  
DNA – deoxynukleová kyselina  
dNTP – deoxyribonukleosidtrifosfát  
dsDNA – dvouvláknová deoxynukleová kyselina  
dVif – faktor virové infekčnosti-deficientní  
E – glutamin  
EIAV – virus infekční anemie koní  
ELISA – enzymová imunisorbentní analýza  
*env* – gen pro obalový protein  
F – fenylalanin  
FIV – virus imunodeficiency koček  
G – guanin  
*gag* – gen pro skupinově specifický antigen  
GAS – aktivační místo pro gamma interferon  
GM-CSF – faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů  
gRNA – naváděcí (*guide*) ribonukleová kyselina  
GWAS – celogenomová studie  
H – histidin  
HIV – virus lidské imunodeficiency  
HRE – hormonální rezponzivní element  
I – isoleucin  
ICTV – Mezinárodní výbor pro klasifikaci virů  
IFN – interferon  
IgG1 – imunoglobulin G, podtřída 1  
IgG2 – imunoglobulin G, podtřída 2  
IL2 – interleukin 2

IL2R –receptor interleukinu 2  
 IL4 – interleukin 4  
 IL8 – interleukin 8  
 IN – integráza  
 INF – interferon  
 ISRE – element odezvy citlivý na interferon  
 JDV – virus onemocnění *Jembrana*  
 K – lysin  
 KASP – kompetitivní alelově specifická polymerázová řetězová reakce  
 KRAB – *Krüppel-associated box*, represorová doména  
 KU – kontrola užítkovosti  
 KVS – Krajská veterinární správa  
 L – leucin  
 LAMP – izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou  
 LTR – dlouhá terminální repetice  
 MCP-1 – monocytový chemoatraktantový protein 1  
 MHC – hlavní histokompatibilní komplexem  
 mRNA – messengerová ribonukleová kyselina  
 MV – maedi-visna  
 MVV – maedi-visna virus  
 N – asparagin  
 NA – neanalyzováno  
 NES – jaderný exportní signál  
 NLS – jaderný lokalizační signál  
 nPCR – „zahnížděná“ polymerázová řetězová reakce  
 OIE – Světová organizace pro zdraví zvířat  
 OPPV – virus progresivní pneumonie ovcí  
 ORF – otevřený čtecí rámeček  
 OvLV – ovčí lentivirus  
 P – prolin  
 PBS – vazebné místo pro primer  
 PIC – preintegrační komplex  
 PLV – lentivirus  
*pol* – polymeráza  
 PPT – polypurinový trakt  
 PR – proteáza  
 PRY/SPRY – domény nacházející se v proteinech, které se účastní vrozené imunitní signalizace, potlačení cytokinové signalizace, vývoje buněk a retrovirové restrikce (PRY: pyrinová rodina, SPRY: kináza s dvojí specificitou *splA* a ryanodinový receptor)  
 Q – glutamin  
 R – *repeat* oblast rekombinace  
 R – arginin  
*rev* – gen pro regulátor exprese proteinů virionu  
 RING – skutečně zajímavý nový gen  
 RNáza H – ribonukleáza H  
 RRE – *rev* responzivní element (viz *rev*)  
 RT – reverzní transkriptáza  
 RTC – komplex reverzní transkriptázy  
 SARS-CoV-2 – koronavirus související s těžkým akutním respiračním syndromem  
 SCHOK – Svaz chovatelů ovcí a koz

SIV – virus imunodeficiencie opic  
SNP – jednonukleotidový polymorfismus  
snPCR – semi nested PCR (viz nPCR)  
SRLV – lentiviry malých přežvýkavců  
ssRNA – jednořetězcová DNA  
SU – povrchový  
SVS – Státní veterinární správa  
T – threonin  
TAR – transaktivační responzivní element  
*tat* – gen pro transaktivační protein  
TATA Box – sedminukleotidová sekvence DNA na začátku promotorové oblasti  
TBS – transkripční vazebné místo  
TFBS – vazebná místa transkripčních faktorů  
TGF- $\beta$ 1 – transformující růstový faktor beta 1  
Th-2 – Th2 pomocné lymfocyty  
TM – transmembránový  
TMEM154 – transmembránový protein 154  
TRIM5 – protein 5 obsahující tripartitní motiv  
tRNA – transferová ribonukleová kyselina  
U3 – 3' nepřekládaná oblast  
U5 – 5' nepřekládaná oblast  
dUTPáza – deoxyuridin-trifosfatáza  
*vif* – gen pro faktor virové infekčnosti  
VMV – visna-maedi virus  
*vpr-like* – gen pro virový protein R  
W – tryptofan  
*ZNF331* – gen zinkového prstu 331  
*ZNF389* – zinkový prst 389

## 8 Literatura

- Aalberts, M., Peterson, K., Moll, L., Vellema, P., & van Maanen, C. (2021). Evaluation of five SRLV ELISAs for fitness for purpose in sheep and goat accreditation schemes in the Netherlands. *Small Ruminant Research*, 202. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2021.106452>
- Acevedo Jiménez, G. E., Tórtora Pérez, J. L., Rodríguez Murillo, C., Arellano Reynoso, B., & Ramírez Álvarez, H. (2021). Serotyping versus genotyping in infected sheep and goats with small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology*, 252. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108931>
- Acheampong, E., Rosario-Otero, M., Dornburg, R., & Pomerantz, R. J. (2003). Replication of Lentiviruses. *Frontiers in Bioscience*, 8(6), 156-74. <https://doi.org/10.2741/935>
- Adedeji, A. O., Barr, B., Gomez-Lucia, E., & Murphy, B. (2013). A polytropic caprine arthritis encephalitis virus promoter isolated from multiple tissues from a sheep with multisystemic lentivirus-associated inflammatory disease. *Viruses*, 5(8). <https://doi.org/10.3390/v5082005>
- Agnarsdottir, G., Thorsteinsdottir, H., Oskarsson, T., Matthiasdottir, S., st. Haflidadottir, B., Andresson, O. S., & Andresdottir, V. (2000). The long terminal repeat is a determinant of cell tropism of maedi-visna virus. *Journal of General Virology*, 81(8). <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-8-1901>
- Ali Al Ahmad, M. Z., Chebloune, Y., Chatagnon, G., Pellerin, J. L., & Fieni, F. (2012). Is caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) transmitted vertically to early embryo development stages (morulae or blastocyst) via in vitro infected frozen semen? *Theriogenology*, 77(8), 1673–1678. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.12.012>
- Álvarez, V., Daltabuit-Test, M., Arranz, J., Leginagoikoa, I., Juste, R. A., Amorena, B., de Andrés, D., Luján, L. L., Badiola, J. J., & Berriatua, E. (2006). PCR detection of colostrum-associated Maedi-Visna virus (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs. *Research in Veterinary Science*, 80(2). <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.05.008>
- Amills, M., Ramiya, V., Norimine, J., & Lewin, H. A. (1998). The major histocompatibility complex of ruminants. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 17(1). <https://doi.org/10.20506/rst.17.1.1092>
- Andrésdóttir, V. (2018). Maedi-visna virus as a model for HIV. *Icelandic Agricultural Sciences*, 31(1), 23–47. <https://doi.org/10.16886/IAS.2018.03>

- Andrésdóttir, V., Skraban, R., Matthíasdóttir, S., Lutley, R., Agnarsdóttir, G., & Thorsteinsdóttir, H. (2002). Selection of antigenic variants in maedi-visna virus infection. *Journal of General Virology*, *83*(10). <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-10-2543>
- Araújo, J. F., Andrioli, A., Pinheiro, R. R., Sider, L. H., de Sousa, A. L. M., de Azevedo, D. A. A., Peixoto, R. M., Lima, A. M. C., Damasceno, E. M., Souza, S. C. R., & da Silva Teixeira, M. F. (2020). Vertical transmissibility of small ruminant lentivirus. *PLoS ONE*, *15*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239916>
- Arcangeli, C., Lucarelli, D., Torricelli, M., Sebastiani, C., Ciullo, M., Pellegrini, C., Felici, A., Costarelli, S., Giammarioli, M., Feliziani, F., Passamonti, F., & Biagetti, M. (2021). First survey of snps in tmem154, tlr9, myd88 and ccr5 genes in sheep reared in italy and their association with resistance to srlvs infection. *Viruses*, *13*(7). <https://doi.org/10.3390/v13071290>
- Auewarakul, P., Wacharapornin, P., Srichatrapimuk, S., Chutipongtanate, S., & Puthavathana, P. (2005). Uncoating of HIV-1 requires cellular activation. *Virology*, *337*(1). <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.02.028>
- Ayelet, G., Roger, F., Tibbo, M., & Tembely, S. (2001). Survey of Maedi-Visna (MV) in Ethiopian Highland Sheep. *Veterinary Journal*, *161*(2). <https://doi.org/10.1053/tvj.2000.0544>
- Balbin, M. M., Belotindos, L. P., Abes, N. S., & Mingala, C. N. (2014). Caprine arthritis encephalitis virus detection in blood by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting the proviral gag region. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *79*(1), 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.12.012>
- Balbin, M. M., Lertanantawong, B., Suraruengchai, W., & Mingala, C. N. (2017). Colorimetric detection of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) through loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with gold nanoprobe. *Small Ruminant Research*, *147*, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.11.021>
- Ballandras-Colas, A., Chivukula, V., Gruszka, D. T., Shan, Z., Singh, P. K., Pye, V. E., McLean, R. K., Bedwell, G. J., Li, W., Nans, A., Cook, N. J., Fadel, H. J., Poeschla, E. M., Griffiths, D. J., Vargas, J., Taylor, I. A., Lyumkis, D., Yardimci, H., Engelman, A. N., & Cherepanov, P. (2022). Multivalent interactions essential for lentiviral integrase function. *Nature Communications*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29928-8>
- Barquero, N., Arjona, A., Domenech, A., Tournal, C., de Las Heras, A., Fernández-Garayzabal, J. F., Ruiz-Santa Quiteria, J. A., & Gomez-Lucia, E. (2011). Paper:



- Diagnostic performance of PCR and ELISA on blood and milk samples and serological survey for small ruminant lentiviruses in central Spain. *Veterinary Record*, 168(1). <https://doi.org/10.1136/vr.c4951>
- Barquero, N., Domenech, A., Arjona, A., Fernández-Garayzabal, J. F., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., & Gomez-Lucia, E. (2013). Comparison of two PCR and one ELISA techniques for the detection of small ruminant lentiviruses (SRLVs) in milk of sheep and goats. *Research in Veterinary Science*, 94(3), 817–819. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.01.004>
- Barquero, N., Domenech, A., & Gomez-Lucia, E. (2015). *Infections by Small Ruminant Lentiviruses*. Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing. 84 s. ISBN 978-3659744051
- Barrett, A., Rawlings, N., & Woessner, J. (2012). *Handbook of Proteolytic Enzymes* (3rd ed.). Cambridge (Massachusetts): Academic Press. 4094 s. ISBN 9780123822208
- Barros, S. C., Andrésdóttir, V., & Fevereiro, M. (2005). Cellular specificity and replication rate of Maedi Visna virus in vitro can be controlled by LTR sequences. *Archives of Virology*, 150(2). <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0436-2>
- Barták, P., Šimek, B., Václavek, P., Čurn, V., Plodková, H., Tonka, T., Farková, B., Vernerová, K., & Vejčík, A. (2018). Genetic characterisation of small ruminant lentiviruses in sheep and goats from the Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno*, 87(1), 19–26. <https://doi.org/10.2754/avb201887010019>
- Bazzucchi, M., Pierini, I., Gobbi, P., Pirani, S., Torresi, C., Iscaro, C., Feliziani, F., & Giammarioli, M. (2021). Genomic epidemiology and heterogeneity of SRLV in Italy from 1998 to 2019. *Viruses*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/v13122338>
- Bell, N. M., & Lever, A. M. L. (2013). HIV Gag polyprotein: Processing and early viral particle assembly. *Trends in Microbiology*, 21(3), 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.11.006>
- Benavides, J., Fuertes, M., García-Pariente, C., Ferreras, M. C., Marín, J. F. G., & Pérez, V. (2006). Natural Cases of Visna in Sheep with Myelitis as the Sole Lesion in the Central Nervous System. *Journal of Comparative Pathology*, 134(2–3). <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.11.003>
- Benavides, J., García-Pariente, C., Carmen Ferreras, M., Fuertes, M., Francisco García-Marín, J., & Pérez, V. (2007). Diagnosis of clinical cases of the nervous form of Maedi-Visna in 4- and 6-month-old lambs. *Veterinary Journal*, 174(3), 655–658. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.10.014>

- Benavides, J., García-Pariente, C., Fuertes, M., Ferreras, M. C., García-Marín, J. F., Juste, R. A., & Pérez, V. (2009). Maedi-Visna: the Meningoencephalitis in Naturally Occurring Cases. *Journal of Comparative Pathology*, *140*(1). <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2008.07.010>
- Berger, N., Heller, A. E., Störmann, K. D., & Pfaff, E. (2001). Characterization of chimeric enzymes between caprine arthritis-encephalitis virus, maedi-visna virus and human immunodeficiency virus type 1 integrases expressed in *Escherichia coli*. *Journal of General Virology*, *82*, 139-148. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-1-139>
- Bertolotti, L., Mazzei, M., Puggioni, G., Carrozza, M. L., dei Giudici, S., Muz, D., Juganaru, M., Patta, C., Tolari, F., & Rosati, S. (2011). Characterization of new small ruminant lentivirus subtype B3 suggests animal trade within the mediterranean basin. *Journal of General Virology*, *92*(8). <https://doi.org/10.1099/vir.0.032334-0>
- Bertolotti, L., Reina, R., Mazzei, M., Preziuso, S., Camero, M., Carrozza, M. L., Cavalli, A., Juganaru, M., Profiti, M., de Meneghi, D., Perona, G., Renzoni, G., Tursi, M., Bertoni, G., & Rosati, S. (2013). Small ruminant lentivirus genotype B and E interaction: Evidences on the role of Roccaverano strain on reducing proviral load of the challenging CAEV strain. *Veterinary Microbiology*, *163*(1–2), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.12.004>
- Bertoni, G., Zahno, M. L., Zanoni, R., Vogt, H. R., Peterhans, E., Ruff, G., Cheevers, W. P., Sonigo, P., & Pancino, G. (1994). Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp38 transmembrane protein associates with the development of arthritis. *Journal of Virology*, *68*(11). <https://doi.org/10.1128/jvi.68.11.7139-7147.1994>
- Bjarnadottir, H., Gudmundsson, B., Gudnason, J., & Jonsson, J. J. (2006). Encapsidation Determinants Located Downstream of the Major Splice Donor in the Maedi-Visna Virus Leader Region. *Journal of Virology*, *80*(23). <https://doi.org/10.1128/jvi.01284-06>
- Blacklaws, B. A. (2009). Visna-Maedi Viruses. In Mahy, B., & van Regenmortel, M. Desk Encyclopedia of Animal and bacterial virology. Cambridge (Massachusetts): Academic Press. 247-253 s. ISBN: 9780123751454
- Blacklaws, B. A. (2012). Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *35*(3), 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.12.003>

- Blacklaws, B. A., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Watt, N. J., de Andres, D., Klein, D., & Harkiss, G. D. (2004). Transmission of small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology*, *101*(3), 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.04.006>
- Blaszczyk, K., Nowicka, H., Kostyrko, K., Antonczyk, A., Wesoly, J., & Bluysen, H. A. R. (2016). The unique role of STAT2 in constitutive and IFN-induced transcription and antiviral responses. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, *29*, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.02.010>
- Braun, M. J., Clements, J. E., & Gonda, M. A. (1987). The visna virus genome: evidence for a hypervariable site in the env gene and sequence homology among lentivirus envelope proteins. *Journal of Virology*, *61*(12), 4046–4054. <https://doi.org/10.1128/jvi.61.12.4046-4054.1987>
- Briggs, J. A. G., Wilk, T., Welker, R., Kräusslich, H. G., & Fuller, S. D. (2003). Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO Journal*, *22*(7). <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg143>
- Brinkhof, J. (2009). *Detection and control of lentiviral infections in sheep and goats*. Disertační práce. Utrecht: Utrecht University. ISBN 978-90-393-51796
- Brinkhof, J., & van Maanen, C. (2007). Evaluation of five enzyme-linked immunosorbent assays and an agar gel immunodiffusion test for detection of antibodies to small ruminant lentiviruses. *Clinical and Vaccine Immunology*, *14*(9), 1210–1214. <https://doi.org/10.1128/CVI.00282-06>
- Bruett, L., Barber, S. A., & Clements, J. E. (2000). Characterization of a membrane-associated protein implicated in visna virus binding and infection. *Virology*, *271*(1). <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0309>
- Bukrinskaya, A. (2007). HIV-1 matrix protein: A mysterious regulator of the viral life cycle. *Virus Research*, *124*(1–2), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.07.001>
- Bushman, F. D., Fujiwara, T., & Craigie, R. (1990). Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science*, *249*(4976). <https://doi.org/10.1126/science.2171144>
- Cardinaux, L., Zahno, M. L., Deubelbeiss, M., Zanoni, R., Vogt, H. R., & Bertoni, G. (2013). Virological and phylogenetic characterization of attenuated small ruminant lentivirus isolates eluding efficient serological detection. *Veterinary Microbiology*, *162*(2–4), 572–581. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.017>

- Cavaliere, V., Baiamonte, E., & Iacono, M. L. (2018). Non-primate lentiviral vectors and their applications in gene therapy for ocular disorders. *Viruses*, *10*(6). <https://doi.org/10.3390/v10060316>
- Cebra, Ch., & Cebra, M. (2012). Chapter 16 - Diseases of the Hematologic, Immunologic, and Lymphatic Systems (Multisystem Diseases). In: Pugh, D. G., & Baird, A. N. *Sheep and Goat Medicine*. (2nd ed.). London: Saunders. 466-502 s. ISBN 978-1-4377-2353-3
- Cecchi, F., Dadousis, C., Bozzi, R., Fratini, F., Russo, C., Bandecchi, P., Cantile, C., & Mazzei, M. (2019). Genome scan for the possibility of identifying candidate resistance genes for goat lentiviral infections in the Italian Garfagnina goat breed. *Tropical Animal Health and Production*, *51*(3). <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1728-y>
- Celer, V., & Celer, V. (2010). *Obecná virologie*. Hradec Králové: Nucleus HK. 148 s. ISBN 978-80-87009-70-3
- Celer, V., Celer, V., Nejedlá, E., Bertoni, G., Peterhans, E., & Zanoni, R. G. (2000). The detection of proviral DNA by semi-nested polymerase chain reaction and phylogenetic analysis of Czech Maedi-Visna isolates based on gag gene sequences. *Journal of Veterinary Medicine*, *47*(3). <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2000.00330.x>
- Celer, V., Němcová, H., & Celer, V. (1997). Isolation and Partial Characterization of Ovine Lentivirus in Czech Republic. *Folia Microbiologica*, *42*(4). <https://doi.org/10.1007/BF02816956>
- Champoux, J. J. (1994). Mechanism of Catalysis by Eukaryotic DNA Topoisomerase I. *Advances in Pharmacology*, *29*, 71-82. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(08\)60540-2](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60540-2)
- Champoux, J. J., & Schultz, S. J. (2009). Ribonuclease H: Properties, substrate specificity and roles in retroviral reverse transcription. *FEBS Journal*, *276*(6). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06909.x>
- Charneau, P., Alizon, M., & Clavel, F. (1992). A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *Journal of Virology*, *66*(5). <https://doi.org/10.1128/jvi.66.5.2814-2820.1992>
- Checkley, M. A., Luttge, B. G., & Freed, E. O. (2011). HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *Journal of Molecular Biology*, *410*(4). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.042>
- Cheevers, W. P., Beyer, J. C., & Knowles, D. P. (1997). Type 1 and type 2 cytokine gene expression by viral gp135 surface protein-activated T lymphocytes in caprine arthritis-encephalitis lentivirus infection. *Journal of Virology*, *71*(8). <https://doi.org/10.1128/jvi.71.8.6259-6263.1997>

- Cirone, F., Maggiolino, A., Cirilli, M., Sposato, A., de Palo, P., Ciappetta, G., & Pratelli, A. (2019). Small ruminant lentiviruses in goats in southern Italy: Serological evidence, risk factors and implementation of control programs. *Veterinary Microbiology*, 228, 143–146. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.11.023>
- Clawson, M. L., Redden, R., Schuller, G., Heaton, M. P., Workman, A., Chitko-Mckown, C. G., Smith, T. P., & Leymaster, K. A. (2015). Genetic subgroup of small ruminant lentiviruses that infects sheep homozygous for TMEM154 frameshift deletion mutation A4Δ53. *Veterinary Research*, 46(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0162-7>
- Colitti, B., Coradduzza, E., Puggioni, G., Capucchio, M. T., Reina, R., Bertolotti, L., & Rosati, S. (2019). A new approach for small ruminant lentivirus full genome characterization revealed the circulation of divergent strains. *PLoS ONE*, 14(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212585>
- Conticello, S. G., Harris, R. S., & Neuberger, M. S. (2003). The Vif Protein of HIV Triggers Degradation of the Human Antiretroviral DNA Deaminase APOBEC3G. *Current Biology*, 13(22). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.034>
- Crespo, H., Bertolotti, L., Proffiti, M., Cascio, P., Cerruti, F., Acutis, P. L., de Andrés, D., Reina, R., & Rosati, S. (2016). Low proviral small ruminant lentivirus load as biomarker of natural restriction in goats. *Veterinary Microbiology*, 192, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.07.008>
- Crespo, H., Reina, R., Glaria, I., Ramírez, H., de Andrés, X., Jáuregui, P., Luján, L., Martínez-Pomares, L., Amorena, B., & de Andrés, D. F. (2011). Identification of the ovine mannose receptor and its possible role in Visna/Maedi virus infection. *Veterinary Research*, 42(1). <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-28>
- Cullen, B. R. (1992). Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiological Reviews*, 56(3). <https://doi.org/10.1128/mr.56.3.375-394.1992>
- Cutlip, R. C., Lehmkuhl, Howard. D., Brodgen, K. A., & Sacks, J. M. (1986). Breed susceptibility to ovine progressive pneumonia (maedi/visna) virus. *Veterinary Microbiology*, 12(3), 283-288. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(86\)90057-X](https://doi.org/10.1016/0378-1135(86)90057-X)
- da Cruz, J. C. M., Singh, D. K., Lamara, A., & Chebloune, Y. (2013). Small ruminant lentiviruses (SRLVs) break the species barrier to acquire new host range. *Viruses*, 5(7), 1867–1884. <https://doi.org/10.3390/v5071867>

- de Andrés, D., Klein, D., Watt, N. J., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Blacklaws, B. A., & Harkiss, G. D. (2005). Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology*, *107*(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.01.012>
- de Regge, N., & Cay, B. (2013). Development, validation and evaluation of added diagnostic value of a q(RT)-PCR for the detection of genotype A strains of small ruminant lentiviruses. *Journal of Virological Methods*, *194*(1–2), 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.09.001>
- de Souza, T. S., Pinheiro, R. R., Costa, J. N., de Lima, C. C. V., Andrioli, A., de Azevedo, D. A. A., dos Santos, V. W. S., Araújo, J. F., de Sousa, A. L. M., Pinheiro, D. N. S., Fernandes, F. M. C., & Costa Neto, A. O. (2015). Interspecific transmission of small ruminant lentiviruses from goats to sheep. *Brazilian Journal of Microbiology*, *46*(3). <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140402>
- Desimmie, B. A., Delviks-Frankenberry, K. A., Burdick, R. C., Qi, D., Izumi, T., & Pathak, V. K. (2014). Multiple APOBEC3 restriction factors for HIV-1 and one vif to rule them all. *Journal of Molecular Biology*, *426*(6), 1220–1245. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.10.033>
- Dickey, A. M., Workman, A. M., Smith, T. P. L., Clawson, M. L., & Heaton, M. P. (2021). Classification of small ruminant lentivirus subtype A2, subgroups 1 and 2 based on whole genome comparisons and complex recombination patterns. *F1000Research*, *9*. <https://doi.org/10.12688/f1000research.27898.2>
- Dohoo, I., Martin, W., & Stryhn, H. (2009). *Veterinary Epidemiologic Research* (2nd ed.). Charlottetown (Prince Edward Island): VER, Inc. 865 s. ISBN 978-0919013605
- Dukkipati, V. S. R., Blair, H. T., Garrick, D. J., & Murray, A. (2006). “Ovar-Mhc” - Ovine major histocompatibility complex: Structure and gene polymorphisms. *Genetics and Molecular Research*, *5*(4), 581-608.
- Duman, R., Yavru, S., Simsek, A., Bulut, O., & Avc, O. (2014). Caprine arthritis encephalitis virus infection in goats. / Kecilerde caprine arthritis encephalitis virus enfeksiyonu. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, *30*(3), 129-132. [doi.org/10.15312/EurasianJVetSci.201436511](https://doi.org/10.15312/EurasianJVetSci.201436511)
- Duverger, A., Wolschendorf, F., Zhang, M., Wagner, F., Hatcher, B., Jones, J., Cron, R. Q., van der Sluis, R. M., Jeeninga, R. E., Berkhout, B., & Kutsch, O. (2013). An AP-1 Binding Site in the Enhancer/Core Element of the HIV-1 Promoter Controls the Ability of HIV-1 To Establish Latent Infection. *Journal of Virology*, *87*(4). <https://doi.org/10.1128/jvi.01594-12>

- Echeverría, I., de Miguel, R., de Pablo-Maiso, L., Glaria, I., Benito, A. A., de Blas, I., de Andrés, D., Luján, L., & Reina, R. (2020). Multi-Platform Detection of Small Ruminant Lentivirus Antibodies and Provirus as Biomarkers of Production Losses. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 182. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00182>
- Eltahir, Y. M. (2011). Characterization of the dUTpase-Integrase Region of the Pol Gene of Small Ruminant Lentiviruses from Greece. *International Journal of Animal and Veterinary Advances*, 3(3), 170–176.
- Enache, D. A., Baraitareanu, S., Dan, M., Gurau, M. R., & Danes, D. (2019). Methods of lentiviral infection surveillance and diagnosis in sheep and goat farms: review — International Scientific Publications. *Agriculture & Food*, (7), 143-159.
- Erhouma, E., Guiguen, F., Chebloune, Y., Gauthier, D., Lakhel, L. M., Greenland, T., Mornex, J. F., Leroux, C., & Alogninouwa, T. (2008). Small ruminant lentivirus proviral sequences from wild ibexes in contact with domestic goats. *Journal of General Virology*, 89(6). <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/000364-0>
- España-Baquer, A., Larruskain, A., Mateo-Abad, M., Minguijón, E., Juste, R. A., Benavides, J., Pérez, V., & Jugo, B. M. (2015). SNPs in APOBEC3 cytosine deaminases and their association with Visna/Maedi disease progression. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 163(3–4). <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.11.007>
- Expasy. ViralZone. (2019). ssRNA(RT). [online]. [cit. 20.06.2019]. Dostupné z: <https://viralzone.expasy.org/295>
- Extramiana, A. B., González, L., Cortabarría, N., García, M., & Juste, R. A. (2002). Evaluation of a PCR technique for the detection of Maedi-Visna proviral DNA in blood, milk and tissue samples of naturally infected sheep. *Small Ruminant Research*, 44(2), 109–118. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00044-5](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00044-5)
- Fassati, A., & Goff, S. P. (2001). Characterization of Intracellular Reverse Transcription Complexes of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology*, 75(8). <https://doi.org/10.1128/jvi.75.8.3626-3635.2001>
- Fieni, F., Rowe, J., van Hoosear, K., Buruoa, C., Oppenheim, S., Anderson, G., Murray, J., & Bondurant, R. (2003). Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. *Theriogenology*, 59(7), 1515-1523. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01194-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01194-9)
- Franzdóttir, S. R., Ólafsdóttir, K., Jónsson, S. R., Strobel, H., Andrésón, Ó. S., & Andrésdóttir, V. (2016). Two mutations in the vif gene of maedi-visna virus have



- different phenotypes, indicating more than one function of Vif. *Virology*, 488, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.10.035>
- Fras, M., Leboeuf, A., Labrie, F. M., Laurin, M. A., Singh Sohal, J., & L’Homme, Y. (2013). Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in mixed flocks: Multiple evidence of dual infection and natural transmission of types A2 and B1 between sheep and goats. *Infection, Genetics and Evolution*, 19. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.06.019>
- Fu, T. B., & Taylor, J. (1992). When retroviral reverse transcriptases reach the end of their RNA templates. *Journal of Virology*, 66(7). <https://doi.org/10.1128/jvi.66.7.4271-4278.1992>
- Gabuzda, D. H., Hess, J. L., Small, J. A., & Clements, J. E. (1989). Regulation of the visna virus long terminal repeat in macrophages involves cellular factors that bind sequences containing AP-1 sites. *Molecular and Cellular Biology*, 9(6). <https://doi.org/10.1128/mcb.9.6.2728>
- Gaeta, N. C., Hasegawa, M. Y., Ribeiro, B. L. M., Gomes, A. L., Castro, R. S., & Gregory, L. (2018). Studying the elimination pattern of caprine arthritis encephalitis virus in the milk of infected females. *Acta Scientiae Veterinariae*, 44(1). <https://doi.org/10.22456/1679-9216.81174>
- Gates, N. L., Winward, L. D., Gorham, J. R., & Shen, D. T. (1978). Serologic survey of prevalence of ovine progressive pneumonia in Idaho range sheep. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 173(12), 1575–1577.
- Gayo, E., Polledo, L., Balseiro, A., Martínez, C. P., García Iglesias, M. J., Preziuso, S., Rossi, G., & García Marín, J. F. (2018). Inflammatory Lesion Patterns in Target Organs of Visna/Maedi in Sheep and their Significance in the Pathogenesis and Diagnosis of the Infection. *Journal of Comparative Pathology*, 159, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2018.01.001>
- Gentile, L., Mart, F., Cardeti, G., & Macri, G. (2000). Serologic survey in a chamois population of Abruzzo. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 11(2) <https://doi.org/10.4404/hystrix-11.2-4158>
- Giammarioli, M., Bazzucchi, M., Puggioni, G., Brajon, G., Dei Giudici, S., Taccori, F., Feliziani, F., & de Mia, G. M. (2011). Phylogenetic analysis of small ruminant lentivirus (SRLV) in Italian flocks reveals the existence of novel genetic subtypes. *Virus Genes*, 43(3). <https://doi.org/10.1007/s11262-011-0653-1>
- Gjerset, B., Rimstad, E., Teige, J., Soetaert, K., & Jonassen, C. M. (2009). Impact of natural sheep-goat transmission on detection and control of small ruminant lentivirus group C

- infections. *Veterinary Microbiology*, 135(3–4), 231–238.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.069>
- Gjerset, B., Storset, A. K., & Rimstad, E. (2006). Genetic diversity of small-ruminant lentiviruses: Characterization of Norwegian isolates of Caprine arthritis encephalitis virus. *Journal of General Virology*, 87(3), 573–580. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81201-0>
- Glaria, I., Reina, R., Crespo, H., de Andrés, X., Ramírez, H., Biescas, E., Pérez, M. M., Badiola, J., Luján, L., Amorena, B., & de Andrés, D. (2009). Phylogenetic analysis of SRLV sequences from an arthritic sheep outbreak demonstrates the introduction of CAEV-like viruses among Spanish sheep. *Veterinary Microbiology*, 138(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.002>
- Gomez-Lucia, E. (2021). Animal Lentiviruses (Retroviridae). In Bamford, D. H., & Zuckerman, M. (2021). *Encyclopedia of virology* (4th. Ed.). Cambridge (Massachusetts): Academic Press. 56-67 s. ISBN: 9780128145166
- Gomez-Lucia, E., Barquero, N., & Domenech, A. (2018). Maedi-Visna virus: current perspectives. *Veterinary Medicine: Research and Reports, Volume 9*, 11–21. <https://doi.org/10.2147/vmrr.s136705>
- Gomez-Lucia, E., Sanjosé, L., Crespo, O., Reina, R., Glaria, I., Ballesteros, N., Amorena, B., & Doménech, A. (2014). Modulation of the long terminal repeat promoter activity of small ruminant lentiviruses by steroids. *Veterinary Journal*, 202(2). <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.08.003>
- González Méndez, A. S., Cerón Téllez, F., Tórtora Pérez, J. L., Martínez Rodríguez, H. A., García Flores, M. M., & Ramírez Álvarez, H. (2020). Signature patterns in region V4 of small ruminant lentivirus surface protein in sheep and goats. *Virus Research*, 280, 197900. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197900>
- Gopalakrishnan, V., Peliska, J. A., & Benkovic, S. J. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: Spatial and temporal relationship between the polymerase and RNase H activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(22). <https://doi.org/10.1073/pnas.89.22.10763>
- Gorrell, M. D., Brandon, M. R., Sheffer, D., Adams, R. J., & Narayan, O. (1992). Ovine lentivirus is macrophagetropic and does not replicate productively in T lymphocytes. *Journal of Virology*, 66(5). <https://doi.org/10.1128/jvi.66.5.2679-2688.1992>
- Grandgenett, D. P., & Mumm, S. R. (1990). Unraveling retrovirus integration. *Cell*, 60(1), 3-4. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90707-L](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90707-L)

- Greenwood, P. L. (1995). Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. *Preventive Veterinary Medicine*, 22(1–2), 71–87. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(94\)00399-4](https://doi.org/10.1016/0167-5877(94)00399-4)
- Grego, E., Bertolotti, L., Carrozza, M. L., Profiti, M., Mazzei, M., Tolari, F., & Rosati, S. (2005). Genetic and antigenic characterization of the matrix protein of two genetically distinct ovine lentiviruses. *Veterinary Microbiology*, 106(3–4), 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.12.007>
- Grego, E., Bertolotti, L., Quasso, A., Profiti, M., Lacerenza, D., Muz, D., & Rosati, S. (2007). Genetic characterization of small ruminant lentivirus in Italian mixed flocks: Evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. *Journal of General Virology*, 88(12). <https://doi.org/10.1099/vir.0.83292-0>
- Grego, E., Lacerenza, D., Reina Arias, R., Profiti, M., & Rosati, S. (2009). Serological characterization of the new genotype E of small ruminant lentivirus in roccaverano goat flocks. *Veterinary Research Communications*, 33, 137–140. <https://doi.org/10.1007/s11259-009-9266-8>
- Grego, E., Profiti, M., Giammarioli, M., Giannino, L., Rutili, D., Woodall, C., & Rosati, S. (2002). Genetic heterogeneity of small ruminant lentiviruses involves immunodominant epitope of capsid antigen and affects sensitivity of single-strain-based immunoassay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(4), 828–832. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.4.828-832.2002>
- Gudmundsdóttir, H. S., Olafsdóttir, K., Franzdóttir, S. R., & Andrésdóttir, V. (2010). Construction and characterization of an infectious molecular clone of maedi-visna virus that expresses green fluorescent protein. *Journal of Virological Methods*, 168(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.04.026>
- Guenzel, C. A., Hérate, C., & Benichou, S. (2014). HIV-1 Vpr-a still “enigmatic multitasker.” In *Frontiers in Microbiology*, 5(127). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00127>
- Guiguen, F., Mselli-Lakhal, L., Durand, J., Du, J., Favier, C., Fornazero, C., Grezel, D., Balleydier, S., Hausmann, E., & Chebloune, Y. (2000). Experimental infection of Mouflon-domestic sheep hybrids with caprine arthritis-encephalitis virus. *American Journal of Veterinary Research*, 61(4). <https://doi.org/10.2460/ajvr.2000.61.456>
- Hagenaars, T. J., Melchior, M. B., Bossers, A., Davidse, A., Engel, B., & van Zijderveld, F. G. (2010). Scrapie prevalence in sheep of susceptible genotype is declining in a population subject to breeding for resistance. *BMC Veterinary Research*, 6. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-6-25>

- Harris, R. S., Bishop, K. N., Sheehy, A. M., Craig, H. M., Petersen-Mahrt, S. K., Watt, I. N., Neuberger, M. S., & Malim, M. H. (2003). DNA Deamination Mediates Innate Immunity to Retroviral Infection major targets for HIV infection in vivo) and has been shown to be a potent inhibitor of Vif-deficient HIV. *Cell*, *113*(6), 803-809. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00423-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00423-9)
- Heaton, M. P., Clawson, M. L., Chitko-Mckown, C. G., Leymaster, K. A., Smith, T. P. L., Harhay, G. P., White, S. N., Herrmann-Hoesing, L. M., Mousel, M. R., Lewis, G. S., Kalbfleisch, T. S., Keen, J. E., & Laegreid, W. W. (2012). Reduced lentivirus susceptibility in sheep with TMEM154 mutations. *PLoS Genetics*, *8*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002467>
- Heaton, M. P., Kalbfleisch, T. S., Petrik, D. T., Simpson, B., Kijas, J. W., Clawson, M. L., Chitko-McKown, C. G., Harhay, G. P., & Leymaster, K. A. (2013). Genetic Testing for TMEM154 Mutations Associated with Lentivirus Susceptibility in Sheep. *PLoS ONE*, *8*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055490>
- Heithoff, D. M., Barnes, L. v., Mahan, S. P., Fox, G. N., Arn, K. E., Ettinger, S. J., Bishop, A. M., Fitzgibbons, L. N., Fried, J. C., Low, D. A., Samuel, C. E., & Mahan, M. J. (2022). Assessment of a Smartphone-Based Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of SARS-CoV-2 and Influenza Viruses. *JAMA Network Open*, *5*(1). <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.45669>
- Herrmann-Hoesing, L. M., White, S. N., Mousel, M. R., Lewis, G. S., & Knowles, D. P. (2008). Ovine progressive pneumonia provirus levels associate with breed and Ovar-DRB1. *Immunogenetics*, *60*(12). <https://doi.org/10.1007/s00251-008-0328-9>
- Hess, J. L., Small, J. A., & Clements, J. E. (1989). Sequences in the visna virus long terminal repeat that control transcriptional activity and respond to viral trans-activation: involvement of AP-1 sites in basal activity and trans-activation. *Journal of Virology*, *63*(7). <https://doi.org/10.1128/jvi.63.7.3001-3015.1989>
- Highland, M. A. (2017). Small Ruminant Lentiviruses: Strain Variation, Viral Tropism, and Host Genetics Influence Pathogenesis. *Veterinary Pathology*, *54*(3), 353–354). <https://doi.org/10.1177/0300985817695517>
- Hötzels, I., & Cheevers, W. P. (2002). Differential receptor usage of small ruminant lentiviruses in ovine and caprine cells: Host range but not cytopathic phenotype is determined by receptor usage. *Virology*, *301*(1). <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1575>

- Houwens, D. J., & Nauta, I. M. (1989). Immunoblot analysis of the antibody response to ovine lentivirus infections. *Veterinary Microbiology*, *19*(2). [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(89\)90078-3](https://doi.org/10.1016/0378-1135(89)90078-3)
- Hovden, A. O., & Sommerfelt, M. A. (2002). The influence of CD4 and CXCR4 on maedi-visna virus-induced syncytium formation. *APMIS*, *110*(10). <https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2002.1101003.x>
- Huang, J., Sun, Y., Liu, Y., Xiao, H., & Zhuang, S. (2012). Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA. *Archives of Virology*, *157*(8), 1463–1469. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1322-y>
- Hunter, E. (1994). Macromolecular interactions in the assembly of HIV and other retroviruses. *Seminars in Virology*, *5*(1). <https://doi.org/10.1006/smvy.1994.1008>
- ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. (2021). Virus Taxonomy: 2019 Release. [online]. [cit. 27.07.2021]. Dostupné z: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Imai, K., & Okamoto, T. (2006). Transcriptional repression of human immunodeficiency virus type 1 by AP-4. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(18). <https://doi.org/10.1074/jbc.M511773200>
- Jamovi project (2021). jamovi (Version 1.6) [Computer Software]. Dostupné z: <https://www.jamovi.org>
- Jáuregui, P., Crespo, H., Glaria, I., Luján, L., Contreras, A., Rosati, S., de Andrés, D., Amorena, B., Towers, G. J., & Reina, R. (2012). Ovine TRIM5 $\alpha$  Can Restrict Visna/Maedi Virus. *Journal of Virology*, *86*(17). <https://doi.org/10.1128/jvi.00440-12>
- Jewell, N. A., & Mansky, L. M. (2000). In the beginning: Genome recognition, RNA encapsidation and the initiation of complex retrovirus assembly. *Journal of General Virology*, *81*(8). <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-8-1889>
- Jones, K. A., & Matija Peterlin, B. (1994). Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annual Review of Biochemistry*, *63*, 717-743. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.003441>
- Jones, S., McKay, H., Eden, L., Bollard, N., Dunham, S., Davies, P., & Tarlinton, R. (2022). Clearance of Maedi-visna infection in a longitudinal study of naturally infected rams is associated with homozygosity for the TMEM154 resistance allele. *Journal of Medical Microbiology*, *71*(2). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001506>

- Jónsson, S. R., & Andrésdóttir, V. (2013). Host restriction of lentiviruses and viral countermeasures: APOBEC3 and vif. *Viruses*, 5(8), 1934–1947. <https://doi.org/10.3390/v5081934>
- Jónsson, S. R., Haché, G., Stenglein, M. D., Fahrenkrug, S. C., Andrésdóttir, V., & Harris, R. S. (2006). Evolutionarily conserved and non-conserved retrovirus restriction activities of artiodactyl APOBEC3F proteins. *Nucleic Acids Research*, 34(19). <https://doi.org/10.1093/nar/gkl721>
- Kalogianni, A. I., Bossis, I., Ekateriniadou, L. v., & Gelasakis, A. I. (2020). Etiology, epizootiology and control of maedi-visna in dairy sheep: A review. *Animals*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/ani10040616>
- Kalogianni, A. I., Stavropoulos, I., Chaintoutis, S. C., Bossis, I., & Gelasakis, A. I. (2021). Serological, molecular and culture-based diagnosis of lentiviral infections in small ruminants. *Viruses*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/v13091711>
- Kane, J. R., Stanley, D. J., Hultquist, J. F., Johnson, J. R., Mietrach, N., Binning, J. M., Jónsson, S. R., Barelier, S., Newton, B. W., Johnson, T. L., Franks-Skiba, K. E., Li, M., Brown, W. L., Gunnarsson, H. I., Adalbjornsdóttir, A., Fraser, J. S., Harris, R. S., Andrésdóttir, V., Gross, J. D., & Krogan, N. J. (2015). Lineage-Specific Viral Hijacking of Non-canonical E3Ubiquitin Ligase Cofactors in the Evolution of Vif Anti-APOBEC3 Activity. *Cell Reports*, 11(8), 1236–1250. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.038>
- Karr, B. M., Chebloune, Y., Leung, K., & Narayan, O. (1996). Genetic characterization of two phenotypically distinct North American ovine lentiviruses and their possible origin from caprine arthritis-encephalitis virus. *Virology*, 225(1). <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0569>
- Keen, J. E., Hungerford, L. L., Littledike, E. T., Wittum, T. E., & Kwang, J. (1997). Effect of ewe ovine lentivirus infection on ewe and lamb productivity. *Preventive Veterinary Medicine*, 30(2). [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(96\)01101-4](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(96)01101-4)
- Knecht, K. M., Hu, Y., Rubene, D., Cook, M., Ziegler, S. J., Jónsson, S. R., & Xiong, Y. (2021). Maedi-visna virus Vif protein uses motifs distinct from HIV-1 Vif to bind zinc and the cofactor required for A3 degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 296. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015828>
- Konishi, M., Hayama, Y., Shirafuji, H., Kameyama, K. I., Murakami, K., Tsutsui, T., & Akashi, H. (2016). Serological survey of caprine arthritis-encephalitis virus infection in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(3). <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0357>

- Konvalinka, J., Kräusslich, H. G., & Müller, B. (2015). Retroviral proteases and their roles in virion maturation. *Virology*, 479–480, 403–417. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.021>
- Kosugi, Y., Uriu, K., Suzuki, N., Yamamoto, K., Nagaoka, S., Kimura, I., Konno, Y., Aso, H., Willett, B. J., Kobayashi, T., Koyanagi, Y., Ueda, M. T., Ito, J., & Sato, K. (2021). Comprehensive Investigation on the Interplay between Feline APOBEC3Z3 Proteins and Feline Immunodeficiency Virus Vif Proteins. *Journal of Virology*, 95(13). <https://doi.org/10.1128/jvi.00178-21>
- Kristbjörnsdóttir, H. B., Andrésdóttir, V., Svansson, V., Torsteinsdóttir, S., Matthíasdóttir, S., & Andrésón, Ó. S. (2004). The vif gene of maedi-visna virus is essential for infectivity in vivo and in vitro. *Virology*, 318(1), 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.09.044>
- Kuhar, U., Barlič-Maganja, D., Zadnik, T., & Grom, J. (2013). Molecular and genetic characteristics of small ruminant lentiviruses in Slovenia. *Acta Veterinaria Hungarica*, 61(1), 135–146. <https://doi.org/10.1556/AVet.2012.057>
- Kumar, K., Kumar, P., Sindhoora, K., Valecha, S., Kumar, R., Singh, V., & Singh, R. (2022). Detection and immune cell response of natural maedi visna virus (MVV) infection in Indian sheep and goats. *Microbial Pathogenesis*, 165. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105467>
- Kuźmak, J., Kędziora, A., Rola, M., Kozaczyńska, B., Chebloune, Y., & Gallay, K. (2003). Evaluation of PCR and PCR/hybridization method for the detection of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 47(2), 293-300.
- Laamanen, I., Jakava-Viljanen, M., & Sihvonen, L. (2007). Genetic characterization of maedi-visna virus (MVV) detected in Finland. *Veterinary Microbiology*, 122(3–4), 357–365. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.02.002>
- Larruskain, A., Bernales, I., Luján, L., de Andrés, D., Amorena, B., & Jugo, B. M. (2013). Expression analysis of 13 ovine immune response candidate genes in Visna/Maedi disease progression. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 36(4). <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2013.02.003>
- Larruskain, A., & Jugo, B. M. (2013). Retroviral infections in sheep and goats: Small ruminant lentiviruses and host interaction. *Viruses*, 5(8), 2043–2061. <https://doi.org/10.3390/v5082043>



- Larruskain, A., Minguijón, E., García-Etxebarria, K., Moreno, B., Arostegui, I., Juste, R. A., & Jugo, B. M. (2010). MHC class II DRB1 gene polymorphism in the pathogenesis of Maedi-Visna and pulmonary adenocarcinoma viral diseases in sheep. *Immunogenetics*, 62(2). <https://doi.org/10.1007/s00251-009-0419-2>
- LaRue, R. S., Jónsson, S. R., Silverstein, K. A. T., Lajoie, M., Bertrand, D., El-Mabrouk, N., Hötzel, I., Andrésdóttir, V., Smith, T. P. L., & Harris, R. S. (2008). The artiodactyl APOBEC3 innate immune repertoire shows evidence for a multi-functional domain organization that existed in the ancestor of placental mammals. *BMC Molecular Biology*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-104>
- LaRue, R. S., Lengyel, J., Jónsson, S. R., Andrésdóttir, V., & Harris, R. S. (2010). Lentiviral Vif Degrades the APOBEC3Z3/APOBEC3H Protein of Its Mammalian Host and Is Capable of Cross-Species Activity. *Journal of Virology*, 84(16), 8193–8201. <https://doi.org/10.1128/jvi.00685-10>
- Lecossier, D., Bouchonnet, F., Clavel, F., & Hance, A. J. (2003). Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science*, 300(5622). <https://doi.org/10.1126/science.1083338>
- Leginagoikoa, I., Daltaubuit-Test, M., Álvarez, V., Arranz, J., Juste, R. A., Amorena, B., de Andrés, D., Luján, L. L., Badiola, J. J., & Berriatua, E. (2006). Horizontal Maedi-Visna virus (MVV) infection in adult dairy-sheep raised under varying MVV-infection pressures investigated by ELISA and PCR. *Research in Veterinary Science*, 80(2), 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.05.003>
- Leroux, C., Chastang, J., Greenland, T., & Mornex, J. F. (1997). Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: Existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Archives of Virology*, 142(6). <https://doi.org/10.1007/s007050050147>
- Leroux, C., Cruz, J. C. M., & Mornex, J.-F. (2010). SRLVs: a genetic continuum of lentiviral species in sheep and goats with cumulative evidence of cross species transmission. *Current HIV Research*, 8(1).
- L'Homme, Y., Leboeuf, A., Arsenault, J., & Fras, M. (2015). Identification and characterization of an emerging small ruminant lentivirus circulating recombinant form (CRF). *Virology*, 475, 159–171. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.11.006>
- Liu, R., Paxton, W. A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S. R., Horuk, R., MacDonald, M. E., Stuhlmann, H., Koup, R. A., & Landau, N. R. (1996). Homozygous defect in HIV-1

- coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*, 86(3). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80110-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80110-5)
- López-Olvera, J. R., Vidal, D., Vicente, J., Pérez, M., Luján, L., & Gortázar, C. (2009). Serological survey of selected infectious diseases in mouflon (*Ovis aries musimon*) from south-central Spain. *European Journal of Wildlife Research*, 55(1), 75–79. <https://doi.org/10.1007/s10344-008-0215-6>
- Luján, L., García Marin, J. F., Fernández de Luco, D., Vargas, A., & Badiola, J. J. (1991). Pathological changes in the lungs and mammary glands of sheep and their relationship with maedi-visna infection. *The Veterinary Record*, 129(3). <https://doi.org/10.1136/vr.129.3.51>
- Lyall, J. W., Solanky, N., & Tiley, L. S. (2000). Restricted species tropism of maedi-visna virus strain EV-1 is not due to limited receptor distribution. *Journal of General Virology*, 81(12). <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-12-2919>
- MacLachlan, N. J., & Dubovi, E. J. (2016). *Fenner's veterinary virology* (5th ed.). Cambridge (Massachusetts): Academic Press. 602 s. ISBN 978-0-12-800946-8
- Malashkevich, V. N., Singh, M., & Kim, P. S. (2001). The trimer-of-hairpins motif in membrane fusion: Visna virus. *Journal of Virological Methods*, 297. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114266>
- Mansour, S. M. G., Ali, H., Chase, C. C. L., & Cepica, A. (2015). Loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of 18 World Organization for Animal Health (OIE) notifiable viral diseases of ruminants, swine and poultry. *Animal Health Research Reviews*, 16(2), 89–106. <https://doi.org/10.1017/S1466252315000018>
- Martins, G. R., Marinho, R. C., Junior, R. Q. B., Alves, A. de O., Câmara, L. M. C., Albuquerque-Pinto, L. C., & Teixeira, M. F. da S. (2017). Goat umbilical cord cells are permissive to small ruminant lentivirus infection in vitro. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(1), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.11.002>
- Massa, A. T., Mousel, M. R., Durfee, C. J., Herndon, M. K., Hemmerling, K. M., Taylor, J. B., Neibergs, H. L., & White, S. N. (2021). A dna regulatory element haplotype at zinc finger genes is associated with host resilience to small ruminant lentivirus in two sheep populations. *Animals*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/ani11071907>
- McDonald, D., Vodicka, M. A., Lucero, G., Svitkina, T. M., Borisy, G. G., Emerman, M., & Hope, T. J. (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *Journal of Cell Biology*, 159(3). <https://doi.org/10.1083/jcb.200203150>

- McNeilly, T. N., Baker, A., Brown, J. K., Collie, D., MacLachlan, G., Rhind, S. M., & Harkiss, G. D. (2008). Role of Alveolar Macrophages in Respiratory Transmission of Visna/Maedi Virus. *Journal of Virology*, 82(3). <https://doi.org/10.1128/jvi.02148-07>
- Michiels, R., Adjadj, N. R., & de Regge, N. (2020). Phylogenetic analysis of belgian small ruminant lentiviruses supports cross species virus transmission and identifies new subtype B5 strains. *Pathogens*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/pathogens9030183>
- Michiels, R., van Mael, E., Quinet, C., Adjadj, N. R., Cay, A. B., & de Regge, N. (2018). Comparative analysis of different serological and molecular tests for the detection of small ruminant lentiviruses (Srlvs) in Belgian sheep and goats. *Viruses*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/v10120696>
- Minguijón, E., Reina, R., Pérez, M., Polledo, L., Villoria, M., Ramírez, H., Leginagoikoa, I., Badiola, J. J., García-Marín, J. F., de Andrés, D., Luján, L., Amorena, B., & Juste, R. A. (2015). Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Veterinary Microbiology*, 181(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.007>
- Molaei, V., Bazzucchi, M., de Mia, G. M., Otarod, V., Abdollahi, D., Rosati, S., & Lühken, G. (2020). Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in Germany and Iran suggests their expansion with domestic sheep. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58990-9>
- Monie, T. P., Greatorex, J. S., Maynard-Smith, L., Hook, B. D. C., Bishop, N., Beales, L. P., & Lever, A. M. L. (2005). Identification and visualization of the dimerization initiation site of the prototype lentivirus, maedi visna virus: A potential GACG tetraloop displays structural homology with the  $\alpha$ - and  $\gamma$ -retroviruses. *Biochemistry*, 44(1). <https://doi.org/10.1021/bi048529m>
- Morcock, D. R., Sowder, R. C., & Casas-Finet, J. R. (2000). Role of the histidine residues of visna virus nucleocapsid protein in metal ion and DNA binding. *FEBS Letters*, 476(3). [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01723-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01723-3)
- Morse, B. A., Carruth, L. M., & Clements, J. E. (1999). Targeting of the Visna Virus Tat Protein to AP-1 Sites: Interactions with the bZIP Domains of Fos and Jun In Vitro and In Vivo. *Journal of Virology*, 73(1). <https://doi.org/10.1128/jvi.73.1.37-45.1999>
- Mótyán, J. A., Miczi, M., & Tózsér, J. (2020). Dimer interface organization is a main determinant of intermonomeric interactions and correlates with evolutionary relationships of retroviral and retroviral-like ddi1 and ddi2 proteases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4). <https://doi.org/10.3390/ijms21041352>

- Murphy, B., Hillman, C., Castillo, D., Vapniarsky, N., & Rowe, J. (2012). The presence or absence of the gamma-activated site determines IFN gamma-mediated transcriptional activation in CAEV promoters cloned from the mammary gland and joint synovium of a single CAEV-infected goat. *Virus Research*, 163(2), 537–545. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.12.001>
- Murphy, B., McElliott, V., Vapniarsky, N., Oliver, A., & Rowe, J. (2010). Tissue tropism and promoter sequence variation in caprine arthritis encephalitis virus infected goats. *Virus Research*, 151(2). <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.05.002>
- Murphy, T. W., Chitko-McKown, C. G., Heaton, M. P., & Freking, B. A. (2021). Effect of TMEM154 E35K variant (haplotypes 1 and 3) on the incidence of ovine lentivirus infection and ewe productivity during lifetime exposure. *Journal of Animal Science*, 99(11). <https://doi.org/10.1093/jas/skab304>
- Muz, D., Oğuzoğlu, T. Ç., Rosati, S., Reina, R., Bertolotti, L., & Burgu, I. (2013). First molecular characterization of visna/maedi viruses from naturally infected sheep in Turkey. *Archives of Virology*, 158(3), 559–570. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1518-1>
- Narayan, S., & Young, J. A. T. (2004). Reconstitution of retroviral fusion and uncoating in a cell-free system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(20). <https://doi.org/10.1073/pnas.0401312101>
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. (2022a). LOC105614607 Tripartite motif-containing protein 5-like [Ovis aries (sheep)] - Gene - NCBI. [online]. [cit. 20.06.2022]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/105614607>
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. (2022b). LOC102169889 Tripartite motif-containing protein 5 [Capra hircus (goat)] - Gene - NCBI. [online]. [cit. 20.06.2022]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/102169889>
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12). <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- Nováková, K., Celer, V., & Netřebská, K. (2016). *Atlas veterinárně významných RNA virů*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinárního lékařství. 73 s.
- Nowicka, D., Czopowicz, M., Mickiewicz, M., Szaluś-Jordanow, O., Witkowski, L., Bagnicka, E., & Kaba, J. (2014). Diagnostic performance of ID Screen® MVV-CAEV Indirect Screening ELISA in identifying small ruminant lentiviruses-infected goats.

- Polish Journal of Veterinary Sciences*, 17(3), 501–506. <https://doi.org/10.2478/pjvs-2014-0072>
- Oguma, K., Tanaka, C., Harasawa, R., Kimura, A., Sasaki, J., Goryo, M., & Sentsui, H. (2014). Isolation of maedi/visna virus from a sheep in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(2). <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0269>
- OIE. World Organisation for Animal Health. (2019). Caprine arthritis-encephalitis & Maedi-visna. [online]. [cit. 10.08.2019]. Dostupné z: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.07.02\\_CAE\\_MV.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.07.02_CAE_MV.pdf)
- Olech, M., & Kuźmak, J. (2020). Molecular characterization of small ruminant lentiviruses of subtype A5 detected in naturally infected but clinically healthy goats of carpathian breed. *Pathogens*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/pathogens9120992>
- Olech, M., & Kuźmak, J. (2021). Molecular characterization of small ruminant lentiviruses in polish mixed flocks supports evidence of cross species transmission, dual infection, a recombination event, and reveals the existence of new subtypes within group a. *Viruses*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/v13122529>
- Olech, M., Osiński, Z., & Kuźmak, J. (2020). Seroprevalence of small ruminant lentivirus (SRLV) infection in wild cervids in Poland. *Preventive Veterinary Medicine*, 176. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.104905>
- Olech, M., Rachid, A., Croisé, B., Kuźmak, J., & Valas, S. (2012). Genetic and antigenic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in Poland. *Virus Research*, 163(2), 528–536. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.11.019>
- Olech, M., Valas, S., & Kuźmak, J. (2018). Epidemiological survey in single-species flocks from Poland reveals expanded genetic and antigenic diversity of small ruminant lentiviruses. *PLoS ONE*, 13(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193892>
- Óskarsson, T., Hreggvidsdóttir, H. S., Agnarsdóttir, G., Matthíasdóttir, S., Ogmundsdóttir, M. H., Jónsson, S. R., Georgsson, G., Ingvarsson, S., Andrésón, Ó. S., & Andrésdóttir, V. (2007). Duplicated Sequence Motif in the Long Terminal Repeat of Maedi-Visna Virus Extends Cell Tropism and Is Associated with Neurovirulence. *Journal of Virology*, 81(8). <https://doi.org/10.1128/jvi.02319-06>
- Pálsson, P. A. (1976). Maedi and visna in sheep. *Frontiers of Biology*, 44, 17–43.
- Patton, K. M., Bildfell, R. J., Anderson, M. L., Cebra, C. K., & Valentine, B. A. (2012). Fatal caprine arthritis encephalitis virus-like infection in 4 Rocky Mountain goats (*Oreamnos americanus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(2). <https://doi.org/10.1177/1040638711435503>

- Paul, B. T., Hashi, H. A., Burhannuddin, N. N., Chung, E. L. T., Jesse, F. F. A., Lila, M. A. M., Haron, A. W., Amat, A. C., Abba, Y., Maqbool, A., Bhutto, K. U. R., Isa, K. M., Amira, N. A., Odhah, M. N., Hambali, I. U., & Norsidin, M. J. (2021). Further insights into caprine arthritis encephalitis (Cae): The current status of seroprevalence among small ruminants in two selected states of peninsular malaysia. *Tropical Life Sciences Research*, 32(2), 83–96. <https://doi.org/10.21315/tlsr2021.32.2.6>
- Pepin, M., Vitu, C., Russo, P., Mornex, J. F., & Peterhans, E. (1998). Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Veterinary Research*, 29(3-4), 341-367.
- Pérez, M., Biescas, E., Reina, R., Glaria, I., Marín, B., Marquina, A., Salazar, E., Álvarez, N., de Andrés, D., Fantova, E., Badiola, J. J., Amorena, B., & Luján, L. (2015). Small Ruminant Lentivirus–Induced Arthritis: Clinicopathologic Findings in Sheep Infected by a Highly Replicative SRLV B2 Genotype. *Veterinary Pathology*, 52(1). <https://doi.org/10.1177/0300985813519654>
- Peterhans, E., Greenland, T., Badiola, J., Harkiss, G., Bertoni, G., Amorena, B., Eliazewicz, M., Juste, R. A., Kraßnig, R., Lafont, J. P., Lenihan, P., Pétursson, G., Pritchard, G., Thorley, J., Vitu, C., Mornex, J. F., & Pépin, M. (2004). Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Veterinary Research*, 35(3). <https://doi.org/10.1051/vetres:2004014>
- Peterson, K., Brinkhof, J., Houwers, D. J., Colenbrander, B., & Gadella, B. M. (2008). Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology*, 69(4). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.10.013>
- Pétursson, G., Turelli, P., Matthíasdóttir, S., Georgsson, G., Andrésson, Ó. S., Torsteinsdóttir, S., Vigne, R., Andréddóttir, V., Gunnarsson, E., Agnarsdóttir, G., & Quérat, G. (1998). Visna Virus dUTPase Is Dispensable for Neuropathogenicity. *Journal of Virology*, 72(2). <https://doi.org/10.1128/jvi.72.2.1657-1661.1998>
- Querat, G., Audoly, G., Sonigo, P., & Vigne, R. (1990). Nucleotide sequence analysis of SA-OMVV, a visna-related ovine lentivirus: phylogenetic history of lentiviruses. *Virology*, 175(2), 434–447. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90428-T](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90428-T)
- Rachid, A., Croisé, B., Russo, P., Vignoni, M., Lacerenza, D., Rosati, S., Kuźmak, J., & Valas, S. (2013). Diverse host-virus interactions following caprine arthritis-encephalitis virus infection in sheep and goats. *Journal of General Virology*, 94(3), 634–642. <https://doi.org/10.1099/vir.0.044768-0>
- Ramírez, H., Echeverría, I., Benito, A. A., Glaria, I., Benavides, J., Pérez, V., de Andrés, D., & Reina, R. (2021). Accurate diagnosis of small ruminant lentivirus infection is needed

- for selection of resistant sheep through tmem154 e35k genotyping. *Pathogens*, *10*(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/pathogens10010083>
- Ramírez, H., Reina, R., Amorena, B., de Andrés, D., & Martínez, H. A. (2013). Small ruminant Lentiviruses: Genetic variability, tropism and diagnosis. *Viruses*, *5*(4). <https://doi.org/10.3390/v5041175>
- Ravazzolo, A. P., Nenci, C., Vogt, H. R., Waldvogel, A., Obexer-Ruff, G., Peterhans, E., & Bertoni, G. (2006). Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology*, *350*(1). <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.02.014>
- Rea-Boutros, A., Villet, S., Greenland, T., Mehlen, P., Chebloune, Y., Verdier, G., & Legras-Lachuer, C. (2009). Small ruminant lentivirus Tat protein induces apoptosis in caprine cells in vitro by the intrinsic pathway. *Virology*, *383*(1). <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.09.039>
- Refsland, E. W., & Harris, R. S. (2013). The APOBEC3 family of retroelement restriction factors. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *371*. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-37765-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-37765-5_1)
- Refsland, E. W., Stenglein, M. D., Shindo, K., Albin, J. S., Brown, W. L., & Harris, R. S. (2010). Quantitative profiling of the full APOBEC3 mRNA repertoire in lymphocytes and tissues: Implications for HIV-1 restriction. *Nucleic Acids Research*, *38*(13). <https://doi.org/10.1093/nar/gkq174>
- Reina, R., Berriatua, E., Luján, L., Juste, R., Sánchez, A., de Andrés, D., & Amorena, B. (2009a). Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: An update. *Veterinary Journal*, *182*(1), 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.05.008>
- Reina, R., Glaria, I., Benavides, J., de Andrés, X., Crespo, H., Solano, C., Pérez, V., Luján, L., Pérez, M. M., de La Lastra, J. M. P., Rosati, S., Blacklaws, B., Harkiss, G., de Andrés, D., & Amorena, B. (2007). Association of CD80 and CD86 expression levels with disease status of Visna/Maedi virus infected sheep. *Viral Immunology*, *20*(4). <https://doi.org/10.1089/vim.2007.0071>
- Reina, R., Grego, E., Profiti, M., Glaria, I., Robino, P., Quasso, A., Amorena, B., & Rosati, S. (2009b). Development of specific diagnostic test for small ruminant lentivirus genotype E. *Veterinary Microbiology*, *138*(3–4), 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.005>
- Reina, R., Mora, M. I., Glaria, I., García, I., Solano, C., Luján, L., Badiola, J. J., Contreras, A., Berriatua, E., Juste, R., Mamoun, R. Z., Rolland, M., Amorena, B., & de Andrés, D.



- (2006). Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Research*, 121(2). <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.05.011>
- Rosati, S., Pittau, M., Tolari, F., Erre, G., & Kwang, J. (1995). Genetic and antigenic characterization of caev (caprine arthritis-encephalitis virus) recombinant transmembrane protein. *Veterinary Microbiology*, 45(4). [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)00138-M](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)00138-M)
- Rowe, J. D., & East, N. E. (1997). Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 13(1). [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30363-7](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30363-7)
- Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R. J., Parmentier, M., & et. al. (1996). Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, 382(6593). <https://doi.org/10.1038/382722a0>
- Sánchez, A. B., Rodríguez, D., Garzón, A., Amorena, B., Esteban, M., & Rodríguez, J. R. (2002). Visna/maedi virus Env protein expressed by a vaccinia virus recombinant induces cell-to-cell fusion in cells of different origins in the apparent absence of Env cleavage: Role of glycosylation and of proteoglycans. *Archives of Virology*, 147(12). <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0874-7>
- Sanjosé, L., Crespo, H., Blatti-Cardinaux, L., Gllaria, I., Martínez-Carrasco, C., Berriatua, E., Amorena, B., de Andrés, D., Bertoni, G., & Reina, R. (2016). Post-entry blockade of small ruminant lentiviruses by wild ruminants. *Veterinary Research*, 47(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0288-7>
- Sanjosé, L., Pinczowski, P., Crespo, H., Pérez, M., Gllaria, I., Gimeno, M., de Andrés, D., Amorena, B., Luján, L., & Reina, R. (2015). Diagnosing infection with small ruminant lentiviruses of genotypes A and B by combining synthetic peptides in ELISA. *Veterinary Journal*, 204(1), 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.01.012>
- Santry, L. A., de Jong, J., Gold, A. C., Walsh, S. R., Menzies, P. I., & Wootton, S. K. (2013). Genetic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in naturally infected sheep and goats in Ontario, Canada. *Virus Research*, 175(1). <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.03.019>

- Sargan, D. R., & Bennet, I. D. (1989). A transcriptional map of visna virus: Definition of the second intron structure suggests a rev-like gene product. *Journal of General Virology*, 70(8). <https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-8-1995>
- Sargan, D. R., Bennet, I. D., Cousins, C., Roy, D. J., Blacklaws, B. A., Dalziel Watt, R. G. N. J., & McConnell, I. (1991). Nucleotide sequence of EV1, a British isolate of maedi-visna virus. *Journal of General Virology*, 72(8), 1893–1903. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-8-1893>
- Schaer, J., Cvetnic, Z., Sukalic, T., Dörig, S., Grisiger, M., Iscaro, C., Feliziani, F., Pfeifer, F., Origgi, F., Zanoni, R. G., & Abril, C. E. (2022). Evaluation of Serological Methods and a New Real-Time Nested PCR for Small Ruminant Lentiviruses. *Pathogens*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens11020129>
- Shah, C., Böni, J., Huder, J. B., Vogt, H. R., Mühlherr, J., Zanoni, R., Miserez, R., Lutz, H., & Schüpbach, J. (2004a). Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: Evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Virology*, 319(1). <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.09.047>
- Shah, C., Huder, J. B., Böni, J., Schönmann, M., Mühlherr, J., Lutz, H., & Schüpbach, J. (2004b). Direct Evidence for Natural Transmission of Small-Ruminant Lentiviruses of Subtype A4 from Goats to Sheep and Vice Versa. *Journal of Virology*, 78(14). <https://doi.org/10.1128/jvi.78.14.7518-7522.2004>
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D., & Malim, M. H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*, 418(6898). <https://doi.org/10.1038/nature00939>
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., & Malim, M. H. (2003). The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nature Medicine*, 9(11). <https://doi.org/10.1038/nm945>
- Sider, L. H., Heaton, M. P., Chitko-Mckown, C. G., Harhay, G. P., Smith, T. P., Leymaster, K. A., Laegreid, W. W., & Clawson, M. L. (2013). Small ruminant lentivirus genetic subgroups associate with sheep TMEM154 genotypes. *Veterinary Research*, 44(1). <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-64>
- Sigurdsson, B., & Palsson, P. A. (1958). Visna of Sheep. A Slow Demyelinating Infection. *The British Journal of Experimental Pathology*, 39(5), 519-528.

- Sigurdsson, B., Thormar, H., & Pálsson, P. A. (1960). Cultivation of visna virus in tissue culture. *Archiv Für Die Gesamte Virusforschung*, 10(3). <https://doi.org/10.1007/BF01250682>
- Snowder, G. D., Gates, N. L., Glimp, H. A., & Gorham, J. R. (1990). Prevalence and effect of subclinical ovine progressive pneumonia virus infection on ewe wool and lamb production. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 197(4).
- Sousa, A. L. M., Pinheiro, R. R., Araújo, J. F., Santos, V. W. S., Azevedo, D. A. A., Peixoto, R. M., Souza, V., Andrioli, A., Damasceno, E. M., Dantas, T. V. M., & Teixeira, M. F. S. (2018). In vitro and in vivo evaluation of sodium dodecyl sulfate (SDS) as an inactivator of caprine lentivirus (CLV) in colostrum and milk. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 70(5), 1459–1467. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9556>
- South, T. L., & Summers, M. F. (1993). Zinc- and sequence-dependent binding to nucleic acids by the N-terminal zinc finger of the HIV-1 nucleocapsid protein: NMR structure of the complex with the Psi-site analog, dACGCC. *Protein Science*, 2(1). <https://doi.org/10.1002/pro.5560020102>
- Stonos, N., Wootton, S. K., & Karrow, N. (2014). Immunogenetics of small ruminant lentiviral infections. *Viruses*, (6)8, 3311–3333. <https://doi.org/10.3390/v6083311>
- Straub, O. C. (2004). Maedi - Visna virus infection in sheep. History and present knowledge. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27(1). [https://doi.org/10.1016/S0147-9571\(02\)00078-4](https://doi.org/10.1016/S0147-9571(02)00078-4)
- Strnad, P., Haubová, Š., & Ruml, T. (2003). Genom retrovirů a fyziologické funkce jeho produktů. *Chemické Listy*, 97, 949-956.
- SVSCR. Státní veterinární správa. (2022). Metodiky kontroly zdraví zvířat a nařízené vakcinace. [online]. [cit. 10.07.2022]. Dostupné z: <https://www.svscr.cz/category/dokumenty-a-publikace/prehled-podle-temat/metodiky-kontroly-zdravi-zvirat-a-narizene-vakcinace/>
- Thormar, H. (2005). Maedi-Visna Virus and its Relationship to Human Immunodeficiency Virus. *AIDS Reviews*, 7, 233-45.
- UniProt. The UniProt Consortium. (2022a). Gag polyprotein · Maedi visna virus (strain 1514 / clone LV1-1KS2) (MVV) (Visna lentivirus). [online]. [cit. 15.06.2022]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P23425>

- UniProt. The UniProt Consortium. (2022b). pol - Gag-Pol polyprotein - Maedi visna virus (strain 1514 / clone LV1-1KS1) (MVV) - pol gene & protein. [online]. [cit. 15.06.2022]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P23426>
- UniProt. The UniProt Consortium. (2022c). pol - Gag-Pol polyprotein - Maedi visna virus (strain KV1772) (MVV) - pol gene & protein. [online]. [cit. 15.06.2022]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P35954>
- UniProt. The UniProt Consortium. (2022d). env - Envelope glycoprotein gp160 precursor - Maedi visna virus (strain KV1772) (MVV) - env gene & protein. [online]. [cit. 15.06.2022]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P35954>
- UniProt. The UniProt Consortium. (2022e). Virion infectivity factor · Maedi visna virus (strain 1514) (MVV) (Visna lentivirus) · Gene: vif. [online]. [cit. 20.06.2022]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P69715/entry>
- UniProt. The UniProt Consortium. (2022f). tat - Probable Vpr-like protein - Maedi visna virus (strain KV1772) (MVV) - tat gene & protein. [online]. [cit. 20.06.2022]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P35958>
- UniProt. The UniProt Consortium. (2022g). rev - Protein Rev - Maedi visna virus (strain 1514) (MVV) - rev gene & protein. [online]. [cit. 20.06.2022]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P21280>
- UniProt. The UniProt Consortium. (2022h). TRIM5 alpha · Ovis aries (Sheep) · Gene: TRIM5. [online]. [cit. 05.07.2022]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/I7A6K6/entry>
- UniProt. The UniProt Consortium. (2022i). Zinc finger protein 331 · Capra hircus (Goat) · Gene: ZNF331. [online]. [cit. 05.07.2022]. Dostupné z: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.07.02\\_CAE\\_MV.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.07.02_CAE_MV.pdf)
- Vigne, R., Barban, V., Quérat, G., Mazarin, V., Gourdou, I., & Sauze, N. (1987). Transcription of visna virus during its lytic cycle: Evidence for a sequential early and late gene expression. *Virology*, *161*(1). [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(87\)90188-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(87)90188-7)
- Vigne, R., Filippi, P., Quérat, G., Sauze, N., Vitu, C., Russo, P., & Delori, P. (1982). Precursor Polypeptides to Structural Proteins of Visna Virus. *Journal of Virology*, *42*(3). <https://doi.org/10.1128/jvi.42.3.1046-1056.1982>
- Villet, S., Bouzar, B. A., Morin, T., Verdier, G., Legras, C., & Chebloune, Y. (2003). Maedi-Visna Virus and Caprine Arthritis Encephalitis Virus Genomes Encode a Vpr-Like but No Tat Protein. *Journal of Virology*, *77*(17), 9632–9638. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.17.9632-9638.2003>

- Vogt, V. (1997). Taxonomy and Sequence Relatedness of Retroviruses. In: Coffin, JM Hughes, SH Varmus, HE, Retroviruses. In *Retroviruses*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 978-0879696504
- Wang, W., Ye, C., Liu, J., Zhang, D., Kimata, J. T., & Zhou, P. (2014). CCR5 gene disruption via lentiviral vectors expressing Cas9 and single guided RNA renders cells resistant to HIV-1 infection. *PLoS ONE*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115987>
- Waseem, A., Pawaiya, R. V. S., Singh, R., Gupta, V. K., Rajukumar, K., Mir, M. S., & Aamir, S. (2015). Seroprevalence of caprine arthritis encephalitis virus infection (CAEV) in Indian goats. *Indian Journal of Veterinary Pathology*, 39(1), 15. <https://doi.org/10.5958/0973-970x.2015.00004.8>
- Watt, N. J., King, T. J., Collie, D., McIntyre, N., Sargan, D., & McConnell, I. (1992). Clinicopathological investigation of primary, uncomplicated maedi-visna virus infection. *The Veterinary Record*, 131(20). <https://doi.org/10.1136/vr.131.20.455>
- White, S. N., & Knowles, D. P. (2013). Expanding possibilities for intervention against small ruminant lentiviruses through genetic marker-assisted selective breeding. *Viruses*, 5(6), 1466–1499. <https://doi.org/10.3390/v5061466>
- White, S. N., Mousel, M. R., Gonzalez, M. v., Highland, M. A., Herrmann-Hoesing, L. M., Taylor, J. B., & Knowles, D. P. (2014). Association analysis of variant near ZNF389 with ewe cumulative production in three sheep breeds. *Animal Genetics*, 45(4). <https://doi.org/10.1111/age.12161>
- White, S. N., Mousel, M. R., Herrmann-Hoesing, L. M., Reynolds, J. O., Leymaster, K. A., Neiberghs, H. L., Lewis, G. S., & Knowles, D. P. (2012). Genome-Wide Association Identifies Multiple Genomic Regions Associated with Susceptibility to and Control of Ovine Lentivirus. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047829>
- White, S. N., Mousel, M. R., Reynolds, J. O., Lewis, G. S., & Herrmann-Hoesing, L. M. (2009). Common promoter deletion is associated with 3.9-fold differential transcription of ovine CCR5 and reduced proviral level of ovine progressive pneumonia virus. *Animal Genetics*, 40(5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01882.x>
- Xu, H., Svarovskaia, E. S., Barr, R., Zhang, Y., Khan, M. A., Strelbel, K., & Pathak, V. K. (2004). A single amino acid substitution in human APOBEC3G antiretroviral enzyme confers resistance to HIV-1 virion infectivity factor-induced depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(15). <https://doi.org/10.1073/pnas.0400830101>

- Yaman, Y., Keleş, M., Aymaz, R., Sevim, S., Sezenler, T., Önalı, A. T., Kaptan, C., Başkurt, A., Koncagül, S., Öner, Y., Öztürk, E. E., İriadam, M., Ün, C., & Heaton, M. P. (2019). Association of TMEM154 variants with visna/maedi virus infection in Turkish sheep. *Small Ruminant Research*, *177*, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.06.006>
- Yoshikawa, R., Izumi, T., Nakano, Y., Yamada, E., Moriwaki, M., Misawa, N., Ren, F., Kobayashi, T., Koyanagi, Y., & Sato, K. (2016). Small ruminant lentiviral Vif proteins commonly utilize cyclophilin A, an evolutionarily and structurally conserved protein, to degrade ovine and caprine APOBEC3 proteins. *Microbiology and Immunology*, *60*(6), 427–436. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12387>
- Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P., & Yu, X. F. (2003). Induction of APOBEC3G Ubiquitination and Degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF Complex. *Science*, *302*(5647). <https://doi.org/10.1126/science.1089591>
- Zanoni, R. G. (1998). Printed in Great Britain Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *Journal of General Virology*, *79*, 1951–1961. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-8-1951>
- Zhang, J., Wu, J., Wang, W., Wu, H., Yu, B., Wang, J., Lv, M., Wang, X., Zhang, H., Kong, W., & Yu, X. (2014). Role of cullin-elonginB-elonginC E3 complex in bovine immunodeficiency virus and maedi-visna virus Vif-mediated degradation of host A3Z2-Z3 proteins. *Retrovirology*, *11*. <https://doi.org/10.1186/s12977-014-0077-9>
- Zhao, L., Zhang, L., Shi, X., Duan, X., Li, H., & Liu, S. (2021). Next-generation sequencing for the genetic characterization of maedi/visna virus isolated from the northwest of China. *Journal of Veterinary Science*, *22*, 1–9. <https://doi.org/10.4142/JVS.2021.22.E66>