



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**

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Genotypizace vybraných kandidátních markerů rezistence proti
lentivirovým infekcím malých přežvýkavců**

Ing. Barbora Farková

2022

Školitel: prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta zemědělská a technologická

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu disertační práce **prof. Ing. Miloslavu Šochovi, CSc., dr. h. c.**, za pomoc a rady, které mi poskytoval v průběhu doktorandského studia.

Dále bych ráda poděkovala **prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D.**, za pomoc a cenné rady, které mi poskytl při řešení této práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 30.07. 2022

Podpis

Abstrakt

Lentivirové infekce malých přežvýkavců (SRLV – Small Ruminant Lentiviruses) známé jako onemocnění maede-visna u ovcí a virová artritida a encefalitida u koz jsou rozšířené po celém světě a způsobují značné ekonomické ztráty. Lentivirová onemocnění byla zahrnuta do aktuální Metodiky kontroly zdraví zvířat a nařízené vakcinace pro chovy zařazené v kontrole užitkovosti. Kontrolní programy jsou zpravidla založené na sérologickém screeningu a následně jsou sérologicky pozitivní zvířata vyřazena z chovu. V literárním přehledu uvádím významné lentiviry včetně těch, které nebyly předmětem analýz.

Cílem této práce byl screening výskytu lentivirových infekcí u malých přežvýkavců v České republice a dále pak genotypizace vybraného kandidátního markeru a nalezení genotypu souvisejícího s možností genové rezistence.

Celkem bylo odebráno přes 3200 vzorků krve ovcí a koz u chovatelů v rámci celé České republiky. Genotypizace byla provedena u stád, kde byl zachycen výskyt sérologicky pozitivních zvířat. Amplifikace zkoumané sekvence DNA byla prováděna pomocí PCR (Polymerase chain reaction) analýzy, při správné amplifikaci daného úseku následovala sekvenační analýza a výsledky byly statisticky vyhodnoceny.

V mé práci jsem došla k závěru, že v České republice byl dosud zachycen výskyt 2 z 5 možných genotypů SRLV (genotyp A a B) a distribuce různých subtypů u ovcí a koz. Největší rozdíly vykazovaly sekvence u genotypu A, kde jedna skupina izolátů vykazovala možnost zařazení do zcela nového subtypu.

U ovcí se podařilo identifikovat všechny tři genotypy genu *TMEM154*. Výskyt sérologicky pozitivních byl statisticky významně vyšší u zvířat s rizikovým genotypem. Z důvodu možné mutace viru a vzniku nového subtypu genotypu A je pravděpodobnost větší adaptace viru pro napadení a infekci jedinců s více rezistentním genotypem.

U koz byl prokázán pouze jeden genotyp, takže zde s největší pravděpodobností nelze najít marker související s rezistencí proti SRLV infekcím.

Klíčová slova: lentiviry, SRLV, genotypizace, marker, přežvýkavec, rezistence

Summary

Small Ruminant Lentiviruses (SRLV) known as maedi-visna in sheep, and viral arthritis and encephalitis in goats are widespread worldwide and cause significant economic losses. Lentiviral diseases have been included in the current Animal Health Control and Vaccination Guidelines for Breeding Controls. Control programs are generally based on serological screening and subsequently serologically positive animals are removed from breeding. In the literature review I write about important lentiviruses, including those that have not been analyzed.

The aim of this work was to screen for the occurrence of lentiviral infections in small ruminants in the Czech Republic and the genotyping of selected candidate markers and finding the genotype related to the possibility of gene resistance.

In total, over 3200 blood samples were collected from sheep and goats from breeders all over the Czech Republic. Genotyping was carried out in herds where serologically positive animals were detected. Amplification of the DNA sequence of interest was performed by PCR (Polymerase Chain Reaction) analysis, followed by genotyping by sequence analysis, and the results were statistically evaluated.

In my work, I came to the conclusion that in the Czech Republic the occurrence of 2 out of 5 possible SRLV genotypes (genotype A and B) and distribution of different subtypes in sheep and goats has been detected so far. The greatest differences were in the sequence of genotype A, where one group of isolates showed the possibility of classification into a completely new subtype.

In sheep, all three genotypes of the TMEM154 gene were identified. The incidence of serologically positive was statistically significantly higher in animals with a risk genotype. Because of the possible mutation of the virus and the emergence of a new subtype of genotype A, the virus is more likely to adapt to attack and infect individuals with a more resistant genotype.

Only one genotype has been demonstrated in goats, so most likely there is no marker associated with resistance to SRLV infections.

Key Words: lentiviruses, SRLV, genotyping, marker, ruminant, resistance

Obsah

| | |
|---|-----|
| Úvod..... | 8 |
| 1 Lentiviry | 10 |
| 1.1 Klasifikace lentivirů | 11 |
| 1.2 Životní cyklus lentivirů | 14 |
| 1.3 Struktura lentivirů | 16 |
| 1.3.1 Genomická struktura SRLV (small ruminant lentivirus)..... | 18 |
| 1.4 Generační přenos lentivirů | 19 |
| 1.5 Schopnost infekce lentiviry | 20 |
| 2 Infekce lidí způsobované lentiviry | 21 |
| 2.1 HIV | 21 |
| 2.1.1 Dějiny viru HIV | 22 |
| 2.1.2 Struktura virové částice HIV | 23 |
| 2.1.3 Rozdíly mezi HIV-1 a HIV-2 | 24 |
| 2.1.4 Možnosti nákazy a léčba HIV | 25 |
| 2.2 Uplatnění lentivirů v rámci léčby onemocnění | 25 |
| 2.2.1 Genová terapie | 26 |
| 2.2.2 Výhody použití lentivirových vektorů | 27 |
| 3 Infekce hospodářských zvířat způsobené lentiviry | 28 |
| 3.1 Ovčí vir maedi-visna (MVV) | 29 |
| 3.2 Virus artritidy a encefalitidy koz (CAEV) | 33 |
| 3.3 Infekční anemický virus koní (EIAV)..... | 35 |
| 3.4 Virus imunodeficiency skotu (BIV) | 37 |
| 4 Genová rezistence..... | 40 |
| 4.1 Rezistence vůči viru HIV | 40 |
| 4.2 Rezistence vůči SRLV | 41 |
| 5 Komentáře k publikacím | 43 |
| 6 Publikace | 48 |
| Závěr | 149 |
| Seznam použité literatury | 151 |
| Seznam obrázků | 161 |

Úvod

Lentiviry patří do skupiny RNA virů, které jsou původci mnoha onemocnění. Společnými znaky těchto nemocí je například dlouhá inkubační doba, pomalý, často latentní průběh a dosud žádná známá léčba.

Napadají širokou škálu živočišných druhů, včetně člověka. U malých přežvýkavců se jedná o maedi-visna virus ovcí (MVV) a virus artritidy a encefalitidy koz (CAEV). Souhrnně se tyto lentiviry označují jako lentiviry malých přežvýkavců. Lentiviry dále například u koní způsobují infekční anémii a u skotu imunodeficienci. U lidí patří do skupiny lentivirů virus HIV způsobující onemocnění AIDS (syndrom získaného selhání imunity).

Lentiviry malých přežvýkavců (SRLV) způsobující onemocnění maedi-visnu ovcí (MV) a artritidu a encefalitidu koz (CAE), jsou rozšířeny po celém světě. Tyto choroby jsou neléčitelné a neexistují proti nim účinné vakcíny. 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 užitečnosti (KU) musí být MV a CAE prosté, výjimku má pouze šumavka.

Fylogenetická analýza odhalila, že MVV a CAEV jsou z velké části shodné. Přenos je možný jak mezi jednotlivci či chovy (přenos horizontální), tak z matky na potomky (přenos vertikální).

Zatímco výskyt MV je doložen téměř celosvětově, výskyt CAE je hlášen spíše z oblastí s intenzivním chovem koz. Faktem, který poměrně komplikuje ozdravení chovů od tohoto onemocnění, je poměrně dlouhá, a ještě k tomu individuálně specifická délka mezi infekcí a sérologickou odezvou. V praxi to znamená, že zvíře, ač nakažené, může být sérologicky negativní.

Onemocnění se vyskytuje ve dvou formách, ve formě progresivní pneumonie (Maedi) a nervové formě (Visna). Výrazně častěji se na území ČR vyskytuje forma Maedi. Aktuálně se laboratorní diagnostika provádí na Státním veterinárním ústavu za použití metod ELISA (průkaz protilátek) a v případě pozitivního výsledku pak pomocí RT-PCR (real-time PCR) pro průkaz provirové DNA.

Nejčastěji přenos probíhá kapénkovou cestou. V běžných podmínkách prakticky nelze ve stádě zamezit šíření nákazy. V dřívějších dobách byl výrazným rizikovým

faktorem odběr vzorků krve ve stádě jednou jehlou, ale v dnešních dobách snad k tomuto již nedochází.

Klinický obraz u nemocných zvířat je spíše neurčitý, často si chovatel ani nevšimne, že je zvíře nemocné.

U koz se onemocnění vyskytuje stejně jako u ovcí ve dvou formách, ve formě artritické, která je výrazně častější a formě encefalitické, jejíž výskyt je nízký a zdokumentovaný spíše u mladších zvířat.

Mnohé výzkumy se zabývaly možností genetické rezistence ovcí k onemocnění MV. Díky stále vzrůstajícímu zájmu o chov ovcí a také díky vývoji metod molekulární biologie byl vyvinut speciální čip pro ovce Ovine SNP50 BeadChip (Illumina Inc.; San Diego, CA USA), který analyzuje 50 tisíc jednonukleotidových polymorfismů (SNP). S použitím tohoto bylo vytypováno několik nadějných lokusů s předpokládanou asociací s geneticky podmíněnou rezistencí. Nejsilnější afinitu k odolnosti vykazoval polymorfismus v genu pro transmembránový protein TMEM154.

Maedi-visna virus má 5 genotypů (A, B, C, D a E) a součástí práce bude i analýza distribuce virových genotypů v České republice.

Pokud by se opravdu prokázal vztah určitého genotypu k větší odolnosti nebo naopak náchylnosti k lentivirovým onemocněním, mohlo by to vést k efektivnější plemenitbě a rychlejšímu ozdravení chovů.

1 Lentiviry

Viry lze obecně specifikovat jako malé obligatorní intracelulární parazity s RNA (ribodeoxynukleové kyseliny) nebo DNA (deoxyribodeoxynukleové kyseliny) genomem, jež jsou obklopeny ochranným proteinovým obalem a které přenášejí svůj genetický materiál do infikovaných buněk (Miyoshi, 1998). Mezi viry se mimo jiné řadí také lentiviry způsobující v hostitelských orgánech chronická onemocnění. Jejich název je odvozený od dlouhé inkubační doby onemocnění (*lentus* – pomalý), jež je těmito viry vyvoláváno (Lois, 2002). Délka doby od počátku infekce do nástupu onemocnění se může protáhnout na několik měsíců, či dokonce několik let. Lentiviry infikují široké spektrum savců, jako jsou primáti, kopytníci (koně, skot, ovce, kozy) a kočkovité šelmy (Durand, Cimorelli, 2011).

Lentiviry produkují vysoké titry virových částic (Yaniz-Galende, Hajjar, 2014). Lentiviry patří do skupiny retrovirů. Retroviry, jež nejsou u zdravých jedinců běžně přítomné, se označují jako exogenní. Ty, které tvoří sekvence DNA v buněčných genomech, jež jsou s retroviry homologické, se označují jako retroviry endogenní. Stane-li se vir součástí genomu zárodečné linie, kdy se dědí v hostiteli do dalších generací (Morita, 2004).

Vědci si dlouhou dobu mysleli, že lentiviry nejsou schopny proměny v endogenní formu (Moss, 1989). Endogenní formy lentivirů byly poprvé popsány až v roce 2007 v genomu králíka, následně také u lemurů a fretek. V roce 2014 popsal lentivirovou DNA v genomu letuchy malajské tým vědců z Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky. Tento významný objev endogenního lentiviru nazývaný ELVgv (Endogenous Lentivirus *Galeopterus variegatus*) je do současnosti nejstarší lentivirovou sekvencí, která je popsána a která poskytuje ucelené informace o původu těchto virů. Letucha malajská je asijský stromový plachtící savec. Jde o nejbližší příbuzný druh primátů, od nichž byli tito savci odděleni zhruba před 81 miliony let. V této studii byly analyzovány lentiviry u čtyř druhů malajských letuch, kdy jejich přítomnost potvrdil v rámci všech zkoumaných druhů. To ukazuje existenci tohoto viru již v době před jejich druhovým rozdělením. Vzhledem k tomu, že se ELVgv nenachází také u jiných savců, je časový interval proniknutí tohoto lentiviru do genomu letuch 15 až 81 milionů let (Hron, 2014).

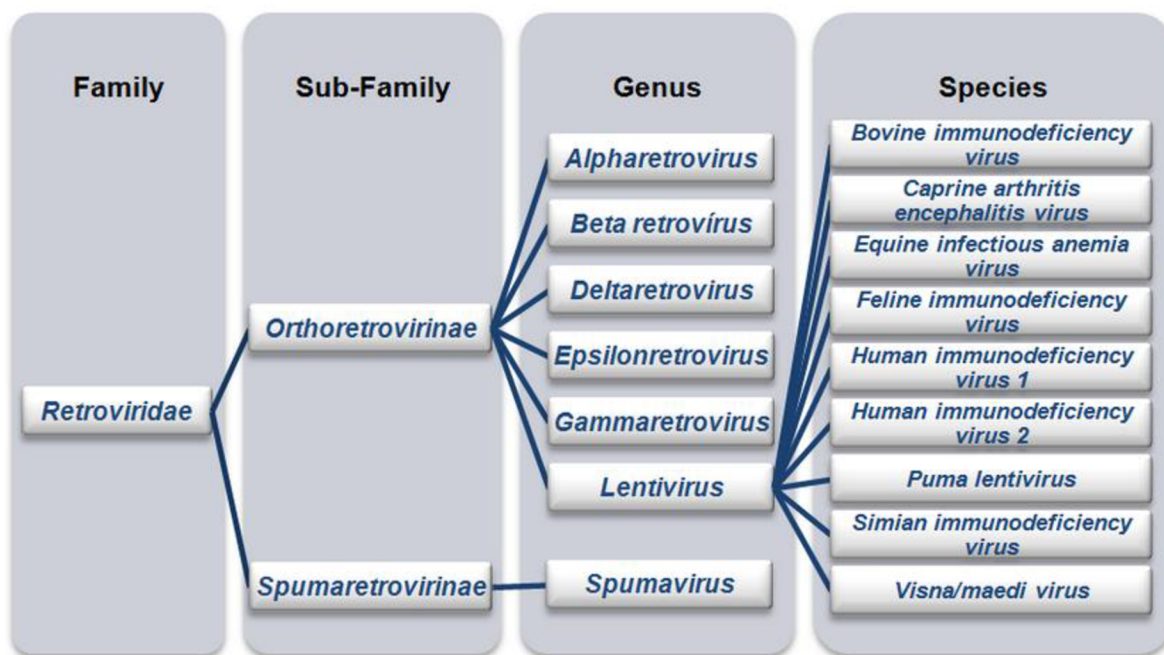
Tento časový úsek byl pak ještě dále zúžen v rámci použití přesnějších fylogenetických metod s možností analýzy změn v sekvencích ELVgv, jež probíhají při

začleňování do genomu hostitele a přepisu RNA do DNA, na 40 až 60 milionů let. Elleder věří, že pokud bude úspěšný i další objev endogenní sekvence u jiných savců, bude lentiviry možné studovat ještě hlouběji do historie (Hron et al., 2016). Výzkumy tak posunují předpokládaný vznik tohoto viru až za hranice geologického období třetihor (Hron et al., 2016). To, že se podařilo nalézt změny způsobené pozitivní selekcí působící na jeden z antivirových restričních faktorů *TRIM5* u společného předka letuch (*Dermoptera*) by do budoucna mohlo vést k objasnění mechanismů, prostřednictvím kterých se jejich předchůdci lentivirovým infekcím ubránili (Hron et al., 2016). Vznik lentivirů lze však i přes výše uvedené označit za téměř neprozkoumaný (Hron et al., 2016). Předchůdce lentivirů byl objeven v roce 2009. Šlo o endogenní „foamy“ virus (Sloth Endogenous Foamy Virus = SloEFV) z podčeledi spumaviry, který byl vědci zachycen v genomu lenochoda (Farkašová, 2017).

1.1 Klasifikace lentivirů

Lentiviry se dle klasifikace Mezinárodního výboru pro taxonomii virů (ICTV) řadí do jednoho ze sedmi rodů čeledi *Retroviridae* (Strnad et al., 2003). Jejich podčeledí je *Orthoretrovirinae* (Luciw, 1996). Jde o sférické viry o průměru přibližně 80 až 120 nm (Helio, 2013). Jsou to RNA viry využívající reverzní transkriptázy (Strnad et al., 2003). Reverzní transkriptáza (RNA-dependentní DNA-polymeráza) je enzym, který tvoří molekulu DNA na základě přepisu informace, jež je uložena v RNA s opačným postupem, než je tomu při běžné buněčné transkripci (Vokurka, Hugo, 2019).

Enzym se tedy podílí na přeměně RNA na DNA, jež se začleňuje do genomu hostitele (Yaniz-Galende, Hajjar, 2014). Lentivirů je devět druhů. Sedm z nich je živočišných a dva lidské. Živočišné lentiviry se vyskytují u ovcí, kde se jedná o vir maedi-visna, u koz, kde jde o virus artritidy a encefalitidy (CAEV), u skotu - virus imunodeficiency skotu (BIV), u koní - infekční anemický virus (EIAV), u koček, kde jde o virus kočičí imunodeficiency (FIV), dále lentivirus pum (PLV) a opic - virus opičí imunodeficiency (SIV). Lidskými druhy lentivirů jsou virus lidské imunodeficiency 1 (HIV-1) a virus lidské imunodeficiency 2 (HIV-2), (Miyoshi, 1998). Schéma taxonomického zařazení lentivirů uvádí obrázek číslo 1.



Obrázek 1 Schéma taxonomického zařazení lentivirů (Helio, 2013)

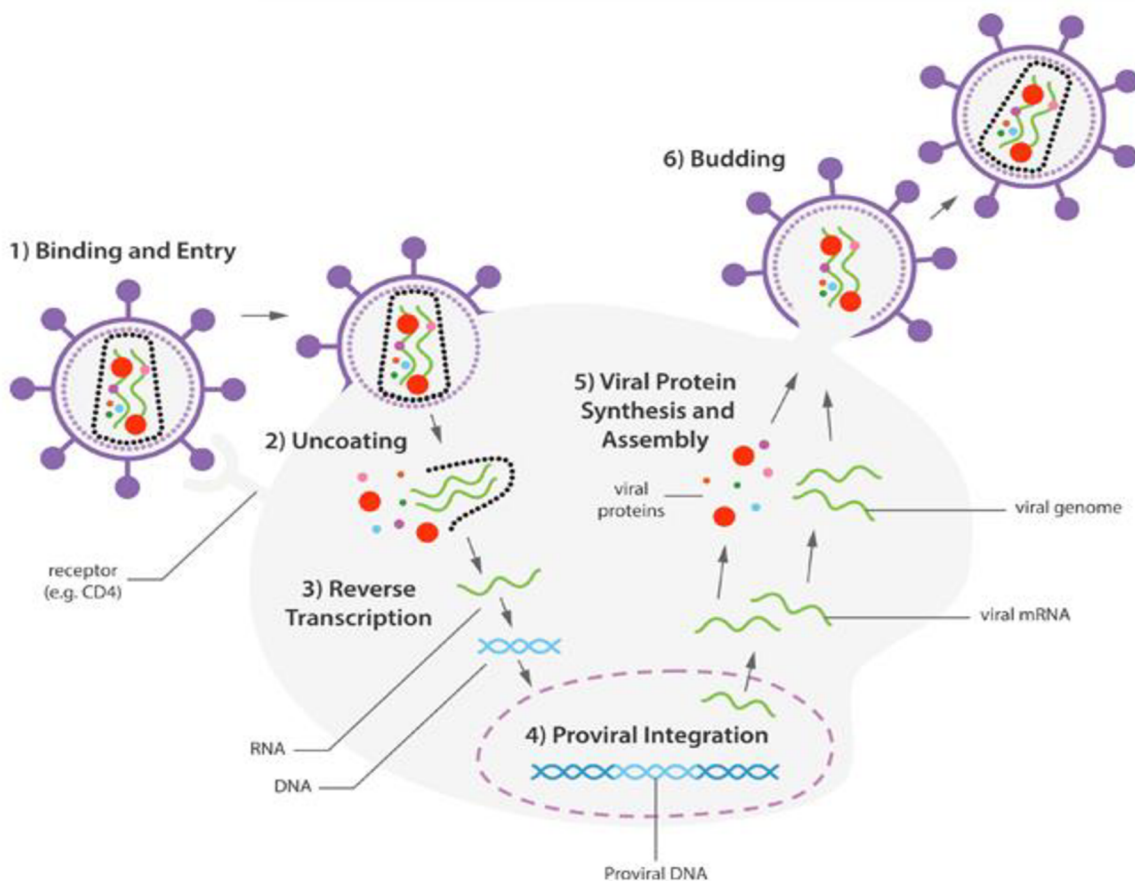
Retroviry mají svou dědičnou informaci uloženou v molekulách RNA a lze je rozdělit na jednoduché a složité. V rámci tohoto dělení se lentiviry řadí do retrovirů složitých, jelikož mají více možností sestřihu RNA, což s sebou nese jejich zvýšenou variabilitu, co se týče genových produktů. Společným znakem retrovirů je přítomnost dlouhých koncových repetitiv (LTR) na obou koncích retrovirového genomu (Shytaj, 2015). Tyto LTR se skládají z přímých repetitiv (oblasti R) a dále i z unikátních sekvencí (Unique 3 – U3, Unique 5 – U5), které jsou zase důležité pro transkripci. Oblast U3 obsahuje virový promotor a enhancerové elementy, zatímco v oblasti R je umístěno iniciační místo mRNA. Funkce U5 oblasti není zcela objasněna, nicméně odděluje oblast R od vazebného místa pro primer – PBS (primer binding site), V případě HIV stejně jako SRLV slouží jako primer zahajující reversní transkripci tRNA (transferová RNA) (Bennett, 2020). Mezi sekvencemi LTR se nachází tři strukturální geny, a sice *gag*, *pol* a *env* (Strnad et al., 2003).

Viry opičí imunodeficiency SIV se větví do dalších pěti linií, které nesou název podle svého hostitele (SM – mangabej kouřový, AGM – africká zelená opice, CPZ – šimpanz, MND – mandril, SYK – syke) (Durand, Cimarelli, 2011). Primáti, již jsou tímto virem přirozeně infikováni, zůstávají obvykle zdraví, bez vývoje infekce, jež by přešla v onemocnění AIDS. Přenos těchto virů na člověka vedl ke vzniku pravděpodobně

nejstudovanějšího lentiviru, kterým se zejména kvůli pandemii AIDS stal HIV. U člověka je kinetika i pandemický potenciál tohoto viru výrazně odlišný, než je tomu v případě opic. HIV způsobujícího AIDS (syndrom získaného imunodeficitu) existují dva vzdálené subtypy. Ve většině světových oblastí převažuje subtyp HIV-1, který je úzce příbuzný SIVcpz a který v nepřítomnosti antivirové léčby indikuje rychlý nástup syndromu. Především v západní Africe byl pak izolován subtyp HIV-2, který je úzce příbuzný SIVsm a který má pomalejší nástup syndromu. Oba typy vznikly s největší pravděpodobností nezávislým přenosem SIV na příslušníky afrických domorodých kmenů. Ve světovém měřítku je hlavní příčinou AIDS kmen HXB-2-HIV-1, jenž je používán jako prototyp většiny studií týkajících se tohoto onemocnění (Durand, Cimarelli, 2011; Miyoshi, 1998; Strnad et al., 2003).

1.2 Životní cyklus lentivirů

Životní cyklus lentivirů lze rozdělit do šesti fází, kterými jsou vazba a vstup, obnažení genomu, reverzní transkripce, prozatímní integrace, syntéza a shromažďování proteinů a pučení. Tyto fáze zobrazuje schéma životního cyklu lentiviru, označené jako obrázek číslo 2 (Sakuma, 2012).



Obrázek 2 Schéma fází životního cyklu lentivirů (Sakuma, 2012)

Aby mohl lentivirus začít svůj životní cyklus, musí nejprve vstoupit do cílové buňky. Tento vstup probíhá buďto formou endocytózy, nebo fúze s buněčnou membránou, poté, co se virus naváže na specifický receptor. Lentivirus se tak na cílovou buňku váže prostřednictvím interakcí mezi glykoproteinem ve svém obalu a specifickými povrchovými receptory buňky hostitele. Například pro HIV-1 je tímto receptorem buněčný povrchový lymfocytový marker CD4 a jeho chemkinový receptor typu 4 CXCR4 (exprimovaný na T-lymfocytech) nebo CCR5 (C-C chemkinový receptor typu 5) exprimovaný na monocytech. Chemkinový receptor CXCR4 je široce exprimován v buňkách imunitního i centrálního nervového systému (Jazin et al., 1997; Moepps et al., 1997). Může zprostředkovat migraci klidových leukocytů a hematopoetických progenitorů v reakci na jeho ligand, SDF-1 (Aiuti et al., 1997; Bleul et al., 1996a; Bleul

et al., 1996b; Oberlin et al., 1996). CXCR4 je také hlavním receptorem pro kmeny viru lidské imunodeficiency-1 (HIV-1), který vzniká v průběhu progresu infekce HIV k AIDS (Feng et al., 1996). Po rozpoznání receptoru mění virové transmembránové proteiny konformaci pro usnadnění membránové fúze s buňkou hostitele, což vede k virovému vstupu (Durand, Cimarelli, 2011; Helio, 2013; Sakuma, 2012; Ulbricht et al., 2012).

Po vstupu do buňky se antivirové jádro obnaží a uvolní se virový genom i virové proteiny do cytoplazmy, kde dojde k reverzní transkripci. Virová RNA je použita jako templát a spolu s hostitelskými nukleotidy a reverzní transkriptázou se syntetizuje provirová DNA. Po reverzní transkripci je vzniklá DNA transportována do jádra a integrována do genomu hostitelské buňky za pomoci enzymu integrázy. Genetický materiál viru je tedy transportován do jádra cílové buňky, kde se integruje do chromozomu hostitelské buňky. Tento proces se nazývá provirová integrace. Integrovaný provirus může přetrvávat v latentní formě jako trvalá součást genomu buněk i řadu let. Mechanismus aktivace viru a procesu transkripce není dodnes znám (Aldovini a Young, 1990).

Transkripce z integrovaného proviru má za následek transport buď úplných genomů RNA či tvorbu RNA, jež kódují enzymatické a strukturální proteiny (tzv. translace). První virové mRNA se mnohonásobně spojují do krátkých transkriptů kódujících nestrukturální proteiny Tat, Rev a Nef, jež usnadňují produkci dalších transkriptů. Tat zesiluje transkripci jiných strukturálních proteinů, Rev usnadňuje transport střížených a nesestřížených virových mRNA do cytoplazmy. Sestříhané transkripty kódují env i doplňkové proteiny a nesestříhané virové RNA jsou přeloženy do gag a pol nebo působí jako genomické RNA pro virové potomky. Virový RNA genom je tedy uvolňován a reverzně transkribován za vzniku DNA. Část transkriptu slouží pro syntézu virových proteinů a část je inkorporována do nově vznikajících částic jako genomová RNA. Tím je nastartovaná pozdní fáze virového životního cyklu (Durand, Cimarelli, 2011; Helio, 2013; IBIDI, 2016; Miyoshi, 1998; Sakuma, 2012; Ulbricht et al., 2012).

V konečné fázi se virový genom a proteiny shromáždí na plazmatické membráně a uvolní se z buňky hostitele. Dojde tedy ke sloučení s buněčnou membránou, což vede k uvolnění virového nukleoproteinového komplexu, který se skládá z virového genomu s proteiny hostitelských buněk. Určení přesného složení virového komplexu je obtížné, jelikož jde o labilní strukturu, která se v čase mění, v rámci přizpůsobování se přeměně virového genomu z RNA na DNA. Část komplexu je navíc během infekce v „*nefunkční*“

formě. V rámci tohoto procesu vykonává svoji činnost enzym virová proteáza na specifických polyproteinech, kde uvolňuje strukturální proteiny a nově vzniklým virionům tak předává infekčnost, čímž získají schopnost znovu zahájit životní cyklus (Durand, Cimarelli, 2011; Helio, 2013; IBIDI, 2016; Miyoshi, 1998; Sakuma, 2012; Ulbricht et al., 2012).

Nezralé virové částice se z buněk uvolňují pučením. Potom, co nezralý vir opustí při pučení buňku, dojde ke štěpení proteinů gag a pol za vzniku zralého infekčního virionu (Helio, 2013).

U většiny typů virů se přepisuje virová DNA do RNA a až poté se převádí na protein. U retrovirů je RNA nejprve reverzně transkribována do DNA a odtud se pak integruje do genomu hostitelské buňky. Po integraci hostitelská buňka přepíše virové geny společně s geny vlastními, čímž utvoří stabilní expresi transgenu (Sakuma, 2012).

Životní cyklus lentivirů lze tedy rozdělit do dvou fází. V rámci první fáze dochází k přenosu virového genomu do hostitelské buňky. A ve fázi druhé k jeho šíření (Durand, Cimarelli, 2011).

1.3 Struktura lentivirů

Lentiviry disponují obalem, dvojitou lipidovou membránou, jsou mírně pleomorfní, kulovité a měří 80–100 nm v průměru. Výstupky na povrchu způsobují, že povrch těchto virů vypadá drsně. Na povrchu viru mohou být také přítomny rovnoměrně rozptýlené drobné hroty (o délce kolem asi 8 nm). Nukleokapsidy neboli jádra jsou izometrická. Nukleoidy jsou soustředné a tyčovité nebo ve tvaru komolého kužele (Helio, 2013).

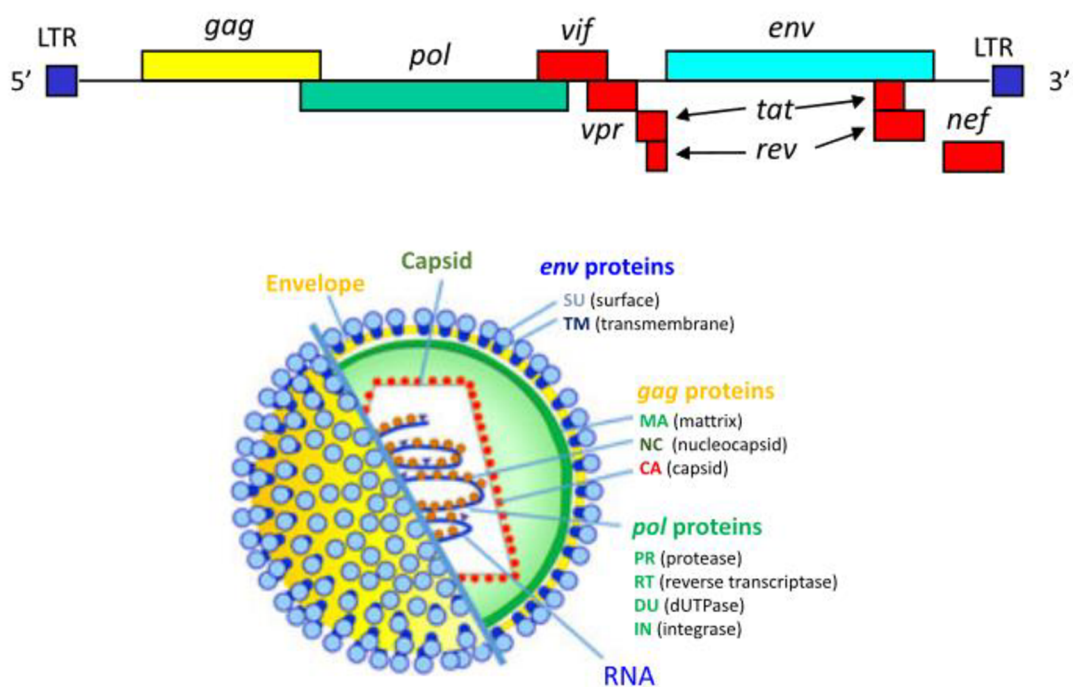
Lentiviry jsou tvořeny ve svém vnitřním prostředí řetězci RNA, enzymy a proteiny (Helio, 2013). Infekce je zahájena připojením virové částice k buněčnému povrchu (Clapham, McKnight, 2002). Genom lentiviru se skládá z jednovláknové RNA, která se během procesu replikace přemění na dvouvláknovou DNA (Sakuma, 2012).

Stejně jako všechny retroviry mají lentiviry geny *gag*, *pol* a *env*, kódující virové proteiny v pořadí: 5'-*gag-pol-env*-3'. Na rozdíl od jiných retrovirů však lentiviry mají dva regulační geny, *tat* a *rev*. Mohou mít také další doplňkové geny v závislosti na viru (např. pro HIV-1: *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*), jehož produkty se účastní regulace syntézy a zpracování virové RNA a dalších replikačních funkcí. Dlouhá koncová repetice (LTR) je dlouhá asi 600 nt, z toho oblast U3 je 450, sekvence R 100 a oblast U5 je dlouhá asi 70 nt (Gilbert et al., 2003).

Retroviry nesou specifické proteiny ve svých kapsidách, které se typicky spojují s genomem RNA. Tyto proteiny se typicky účastní raných fází replikace genomu a zahrnují reverzní transkriptázu a integrázu. Reverzní transkriptáza je virově kódovaná RNA-dependentní DNA polymeráza. Enzym využívá genom virové RNA jako templát pro syntézu komplementární kopie DNA (Blomer et al., 1997).

Reverzní transkriptáza má také aktivitu RNázy H pro destrukci RNA-templátu. Integráza váže jak virovou cDNA generovanou reverzní transkriptázou, tak hostitelskou DNA. Integráza zpracovává LTR před vložení virového genomu do hostitelské DNA. Tat působí jako trans-aktivátor během transkripce ke zvýšení iniciace a prodloužení. Element reagující na Rev působí post-transkripčně, reguluje sestřih mRNA a transport do cytoplazmy (Gilbert et al., 2003).

Zobrazení struktury genomu HIV-1 a lentivirové částice ukazuje obrázek číslo 3.



Obrázek 3 Struktura lentiviru HIV-1 (Gomez-Lucia, 2021)

Protein gag je transkribován nejprve do nevyzrálé mRNA a poté je rozštěpen do transkriptů kódujících tři proteiny, kterými jsou proteiny matricové (MA), jež jsou nezbytné pro stavbu virionu a infekci nedělících se buněk, kapsidové proteiny (CA) tvořící hydrofóbní jádro a nukleokapsidové proteiny (NC), které chrání genom virionu. Gen *pol* kóduje virovou proteázu, reverzní transkriptázu a integrázu, což jsou enzymy nezbytné

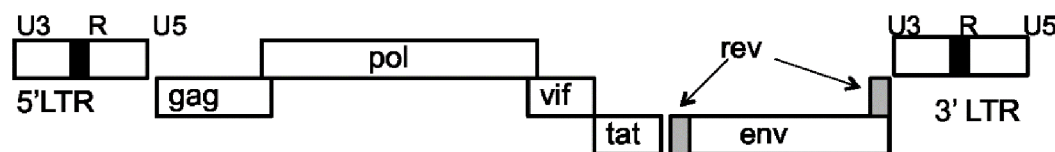
pro replikaci viru. Gen *env* kóduje během zrání viru povrchové glykoproteidy, nezbytné pro vstup viru do buňky hostitele, jelikož umožňují vazbu na buněčné receptory nebo fúzi buněčnými membránami. Mimo tyto geny strukturální obsahují lentiviry také geny regulační, jejich podrobnější popis bude uveden v rámci kapitoly 2.1.2 (Sakuma, 2012).

1.3.1 Genomická struktura SRLV (small ruminant lentivirus)

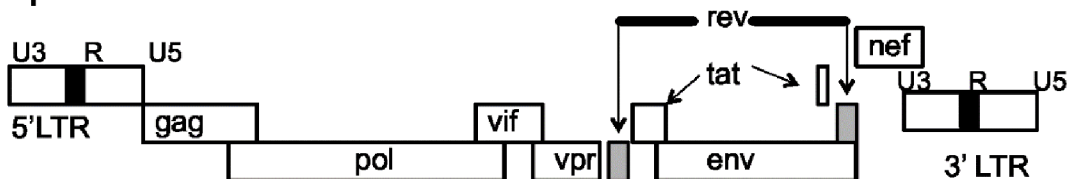
Genom SRLV se skládá ze tří strukturálních genů, *gag*, *pol* a *env*, a tří doplňkových genů, *vif*, *tat* a *rev* (obrázek 4) (L'Homme et al., 2011; Reina et al., 2009). Gen *gag* kóduje kapsidové proteiny, *pol* kóduje virové enzymy proteázu, reverzní transkriptázu a integrázu a *env* kóduje obalové glykoproteiny gp135 (SU) a gp38 (TM) (Abelson, Schoborg, 2003). Zatímco gen *tat* je pro účinnou virovou replikaci nepostradatelný (Harmache et al., 1995), *vif* je absolutně nezbytný pro účinnou *in vivo* replikaci viru a patogenitu (Harmache et al., 1996; Kristbjornsdottir et al., 2004). Ohraničující konce provirové DNA jsou oblasti dlouhých terminálních repetitiv (LTR), které obsahují oblasti U3, R a U5 (Angelopoulou et al., 2006; Angelopoulou et al., 2008; Leroux, 2008). Tyto oblasti poskytují signály potřebné pro virovou transkripci a integraci do hostitelského genomu (Angelopoulou et al., 2008). Lentiviry malých přežvýkavců se liší od lentivirů primátů v tom, že jejich proteiny Tat netransaktivují virové promotory LTR (Villet et al., 2003a). Protein SRLV Tat je spíše funkčně podobný proteinu Vpr HIV typu 1 (HIV-1) (Villet et al., 2003b).

Genom HIV-1 je podobný genomu SRLV, je však složitější a obsahuje další geny (Valas et al., 2008). Na rozdíl od SRLV obsahuje HIV-1 devět genů kódujících 15 proteinů; tyto geny zahrnují strukturální geny *gag*, *pol* a *env*, které kódují kapsidové proteiny, virové enzymy a obalové glykoproteiny, gp120 (SU) a gp41 (TM), v daném pořadí (Watts et al., 2009). Nestrukturální geny HIV-1 se skládají z *vif*, *tat*, *rev*, *nef*, *vpr* a *vpr* a jsou spojeny s patogenezí HIV-1 a imunitním únikem (Malim et al., 2008). Stejně jako genom SRLV obsahují lemující konce proviru LTR sestávající z oblastí U3, R a U5 (Arellano et al., 2010). Kromě toho byla v oblasti LTR HIV-1 identifikována řada promotorových a enhancerových prvků. Některé z těchto prvků odezvy zahrnují AP-1, NF- κ B a Sp1, důležité transkripční faktory související s imunitou hostitele, které všechny vedou k aktivaci transkripce a replikaci viru (Katagiri et al., 2006). Na obrázku 4 je znázorněno porovnání genomické struktury lentivirů malých přežvýkavců (SRLV) a HIV-1.

SRLV



HIV-1



Obrázek 4 Genomická organizace SRLV a HIV-1 (Valas et al., 2008)

1.4 Generační přenos lentivirů

Po nakažení hostitelské buňky retrovirem je potřebné, aby vir vpravil svůj genetický materiál do jejího chromozomu. Jen tak se může nadále reprodukovat. V případě, kdy virus nakazí buňku rozmnožovací a z daného vajíčka či spermie vzejde potomek, může se stát sekvence viru permanentní součástí hostitelského genomu za vzniku endogenního retroviru (Farkašová, 2017).

Lentiviry mají schopnost se během svojí replikace integrovat do genomu hostitelské buňky. Je-li touto hostitelskou buňkou ta pohlavní, tím se eventuálně stanou součástí dědičné genetické informace hostitelského druhu a budou dále přecházet do dalších generací. Vědci se původně domnívali, že jejich infiltrace do pohlavních buněk je nesmírně vzácná. To však dle nové studie realizované týmem biologů texaské univerzity vyvrací. Ti hledali dědičnou informaci lentiviru u několika druhů lemurů z Madagaskaru. Téměř kompletní sekvence DNA lentivirů objevili u šesti druhů lemurů z rodu *Microcebus*, do něhož patří mimo jiné také nejmenší primát světa maki trpasličí (Gifford, 2008).

V genomu makiho trpasličího objevili vědci zlomky endogenního lentiviru v roce 2008 (Farkašová, 2017). Stabilní součástí genomu primátů tohoto rodu se lentiviry staly před 4,2 miliony let. V té době však byly začleněny i do dalšího rodu makiů,

Cheirogaleus. Což dokazuje, že lentiviry mohly během evoluce velmi úspěšně a také opakovaně infiltrovat DNA pohlavních buněk primátů (Gifford, 2008).

1.5 Schopnost infekce lentiviry

Schopnost lentiviru infikovat buňky *in vitro* závisí na typu buněk v buněčné kultuře. Různé typy buněk tak vyžadují pro úspěšnou transdukcí a poražení cílového genu různý počet lentivirových částic na buňku (MOI – multiplicity of infection). Teoreticky lze říci, že vyšší MOI bude generovat vyšší počet transdukci na buňku, vyšší počet integrací transgenu i vyšší expresi. Schopnost infekce je poměrem virových částic, jež byly využity k infikování buňky ke skutečnému počtu buněk (Sakuma, 2012).

$$MOI = \frac{\text{počet lentivirových částic}}{\text{počet buněk v kultuře}}$$

Titř lentivirových částic je uváděn obvykle transdukční jednotkou TU nebo infekční jednotkou IU na mililitr. V případě 1 IU jde o 1 infekční částici, tedy k infikování například 106 buněk bude použito 106 IU. MOI je v tomto případě 1. Použije-li se k infikování stejného počtu buněk 5 x větší množství UI (5 x 106), pak je MOI rovno 5 (Sakuma, 2012).

2 Infekce lidí způsobované lentiviry

Lidský genom je z jedné desetiny tvořený virovou DNA, která patří k „cizorodým“ složkám organismu, jež mají v rámci evoluce nedozírný význam. Jde o zbytky virů z rodiny retrovirů, jež v minulosti infikovaly buňky předků člověka. Pozůstatky dávných retrovirových onemocnění – endogenní retroviry (human endogenous retroviruses = HERVs) patří mezi přenositelné elementy obsahující LTR sekvence na 5' i 3' konci. Lidské endogenní retroviry tvoří až 8 % lidského genomu. Nejsou jen nepotřebnými elementy, ale zastávají i klíčové funkce. Zvětšují plasticitu lidského genomu a v některých případech se v LTR mohou nacházet vazebná místa pro určité proteiny (např. p53) (Pluta, 2009).

Uchování schopnosti rozmnožování bylo oproti některým jiným organismům v případě endogenních virů člověka prokázáno už v nedávné době. Tyto endogenní viry mají s retroviry společné znaky v rozmnožování. Stejně jako u endogenních virů se tyto „parazitické DNA“ označují společně jako retroelementy a tvoří cca 40 % lidské DNA. Veškeré sekvence kódující proteiny oproti tomu tvoří pouze zhruba 1,1 % genomu (Matoušková, 2005).

Lentiviry mají schopnost transdukce do dělících se i nedělících se buněk, což jim umožňuje infikovat kmenové buňky, srdeční buňky či kardiomyocyty tak, aniž by po infikování vykazovaly imunitní odpověď (Yaniz-Galende, Hajjar, 2014). Mimo to jsou lentiviry jedinečnými členy čeledi *Retroviridae*, jelikož většina retrovirů není schopná produktivně infikovat nedělící se buňky (Sakuma, 2012). Lentiviry jsou schopné vyvolat širokou škálu patologií u různých živočišných druhů, člověka nevyjímaje. K lentivirům s afinitou k primátům patří HIV-1, HIV-2 a SIV, které způsobují onemocnění AIDS u lidí. Virus lidské imunitní nedostatečnosti patří k nejstudovanějším lentivirům.

Vysoká virulence viru je obecně znakem nově vzniklých onemocnění. V případech, kdy se jedná o virus smrtící, virus zabíjí mimo hostitele i sám sebe. Starší a rozvinutější choroby jeví známky nižší virulence, z tohoto důvodu se rozmnožují úspěšněji (Farkašová, 2017).

2.1 HIV

Vývoj virů je ve srovnání s vývojem člověka mnohonásobně rychlejší. Viry jsou schopné se množit v rámci dní a s vyšší rychlostí mutace RNA, z čehož vyplývá, že virus HIV se

vyvíjel milionkrát rychleji než člověk. Vzhledem k tomu, že se HIV vyvíjí již miliony let, tak by se dalo přepokládat, že by měl mít dnes podobu silně sofistikovaného, vyvinutého, smrtícího viru s daleko vyšší infekčností. Je tedy zajímavé, že většina genetických změn viru HIV z uplynulého století je zcela náhodná. Virus se tak za sto milionů let příliš nezměnil, což je pozitivní zprávou pro výzkumníky a výrobce vakcín, jejichž činnost by na základě této informace mohla vést k vytvoření očkování proti viru HIV (Farkašová, 2017).

Při kopírování RNA do DNA dochází k chybám. Rychlost mutace je tak vysoká, že je označována za hranici povolené evoluční rychlosti. HIV vir tedy generuje obrovské množství mutací. Avšak to neznamena, že vir HIV neprochází také klasickým darwinovským přirozeným výběrem. Vir HIV tak dokáže unikat imunitnímu systému i účinkům léků. Aby vir HIV ošálil imunitní systém, tak je schopen změnit některé své proteiny až o 25 %. Tyto změněné proteiny přitom nadále fungují. Virus HIV tak dokázal náhodných mutací využít ve svůj prospěch (Farkašová, 2017).

Díky vysoké mutační rychlosti unikají HIV lentiviry všem druhům léčby. Jakmile se z retroviru vyvine endogenní vir, který se dědí jako gen vlastní, začne se vir měnit mnohokrát pomaleji. Ve své podstatě evolučně zamrzne. To je také důvodem, proč je možné rekonstruovat viry v takové podobě, kterou měly před desítkami milionů let (Moss, 1989).

2.1.1 Dějiny viru HIV

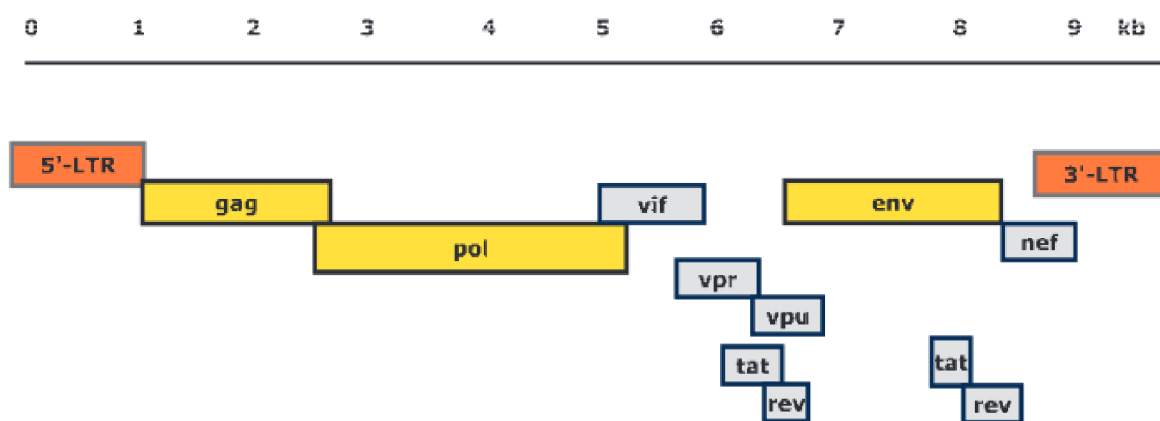
Historie HIV sahá do roku 1981, kdy lékaři v New Yorku a v Kalifornii ohlásili výskyt nového syndromu. Mladí homosexuálně zaměřeni muži začali umírat na různé kombinace vzácných nemocí, jež se obvykle vyskytovaly u lidí s poruchami imunity a také u starších osob. Virus HIV-1 se poprvé rozšířil v Konžské demokratické republice. Z Afriky se virus HIV dostal kolem roku 1966 na Haiti a kolem roku 1969 také do USA, což bylo 12 let před tím, než byl lékaři identifikován první pacient (Montagnier, 2014).

Z USA se virus rozšířil do Kanady a také do Evropy. Současně se do Asie a Evropy dostal také kmen přímo z Afriky, což dalo vznik dvou odlišných kmenů viru HIV v rámci stávající epidemie. Několik různých kmenů HIV bylo zapříčiněno přenosem SIV z opic na člověka. Z nich lze za viníka současné pandemie označit kmen HIV-1, ostatní viry označované jako HIV-2 se vyskytují pouze v afrických oblastech. Bylo potvrzeno, že vir HIV-1 pochází od šimpanzů z východního Kamerunu. O přesné době přenosu je stále diskutováno, uvádí se rozmezí let 1884 až 1924 (Farkašová, 2017).

2.1.2 Struktura virové částice HIV

Struktura genomu HIV se skládá ze dvou zcela identických jednořetězcových RNA molekul, jež jsou společně uzavřené v jádru virové částice. Genom se v případě HIV-1 skládá ze 9 200- 9 600 nukleotidů a přibližně z 9 800 nukleotidů u HIV-2. Genom DNA je vytvářen reverzní transkripcí genomu virové RNA a vložen do hostitelské DNA. Vzniklý DNA genom HIV je na obou svých koncích lemován sekvencemi LTR (viz Obr. 5), (Luciw, 1996). Dlouhé terminální repetice na 5' a 3' koncích provirové dvouvláknové DNA působí jako promotory (Morita, 2004).

Příklad struktury a organizaci genomu HIV-1 ukazuje Obr. 5, na kterém jsou zobrazené čtecí rámce genů kódované strukturálními a regulačními proteiny.



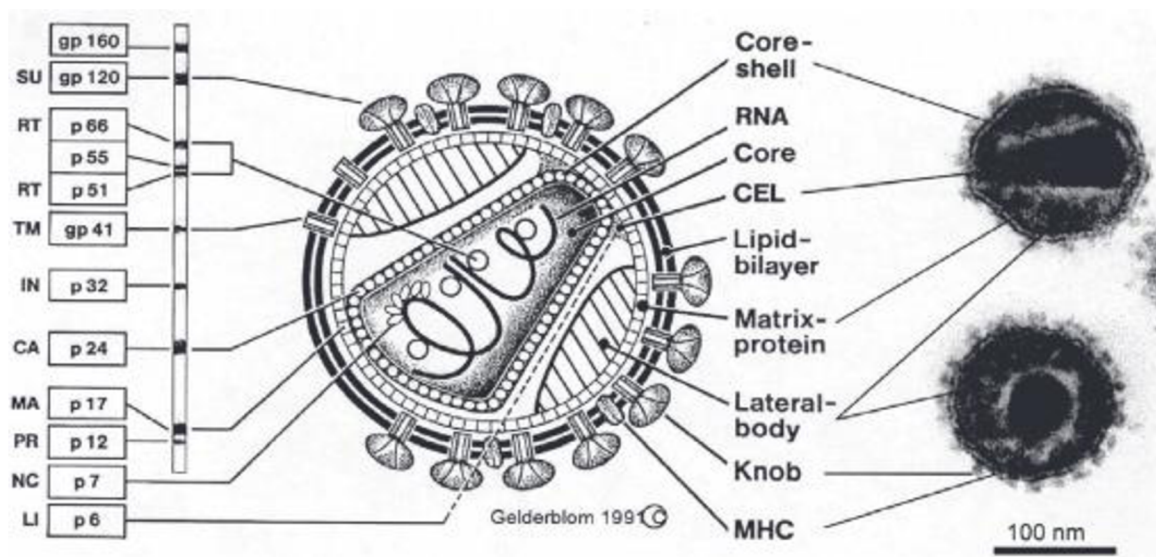
Obrázek 5 Struktura a organizace genomu HIV-1 (Luciw, 1996)

LTR – dlouhé koncové repetice, strukturální gen *gag* – jenž kóduje strukturální proteiny virového jádra, *pol* – jenž kóduje reverzibilní transkriptázu, proteasu a integrázu a *env* – jenž kóduje glykoprotein ve virovém obalu (Luciw, 1996).

Dlouhé terminální repetice jsou nekódující regulační oblasti, mezi kterými jsou umístěny otevřené čtecí rámce, jež kódují strukturální proteiny a enzymy viru, kterými jsou *gag*, *pol* a *env* (Ulbricht et al., 2012).

Mimo strukturálních genů *gag*, *pol* a *env* kóduje genom HIV také několik genů regulačních. Těmi jsou gen *tat*, kódující trans aktivátorový protein a protein regulující sestřih a transport transkriptů z jádra do cytoplazmy a geny *rev*, jež jsou nezbytnými pro zahájení replikace HIV. Geny *tat* a *rev* jsou první proteiny, jež mají být syntetizovány po integraci a jež jsou nutné k urychlení produkce virových mRNA. Dále také faktor negativní regulace (*nef*), virový infekční faktor (*vif*) a virové proteiny *vpr* a *vpu*, které nejsou nezbytné pro replikaci viru, avšak mají vliv na jeho vznik a patogenezi. Protein

Vpr je přítomný pouze v lentivirech primátů. Vpu je pak částečně zodpovědný za sníženou patogenitu viru HIV-2. Přehled proteinů viru HIV-1 a jejich funkcí uvádí příloha tohoto textu číslo 1 (Sakuma, 2012). Ukázkou struktury virové částice HIV včetně jejího mikroskopického zobrazení ukazuje Obr. 6.



Obrázek 6 Struktura virové částice HIV (Luciw, 1996)

GP – glycoprotein, p – protein, SU – povrchový protein, RT – reverzní transkriptáza, TM – transmembránový protein, IN – integráza, CA – kapsidový protein, MA – matricový protein, PR – proteáza, NC – protein, jenž váže nukleovou kyselinu, LI – vazebný protein, MHC – hlavní histokompatibilní proteiny (Luciw, 1996).

2.1.3 Rozdíly mezi HIV-1 a HIV-2

Nejčastějším typem HIV je HIV-1, který se vyskytuje po celém světě. Dle dostupných informací má typ HIV-1 až 95 % lidí žijících s HIV. HIV-2 se vyskytuje převážně v Africe, avšak postupně se pomalu objevuje i v rámci jiných regionů, jako jsou USA, Evropa či Indie. Oba lentiviry mají shodné účinky na lidské tělo, avšak geneticky jsou odlišné. Studie z roku 2008 odhalila pouze 55% sekvenční identitu mezi oběma typy HIV (Popper, 1999).

Co se týče přenosu, ten je u typu HIV-2 pro lidi mnohem složitější, než je tomu u přenosu viru HIV-1. Nejběžnějším způsobem přenosu HIV-2 pohlavní styk mezi heterosexuály. I tak jde však o míru až 5krát až 10krát nižší, než je tomu u HIV-1. Přenos z matky na dítě je u HIV-2 20krát až 30krát nižší, než je tomu u viru HIV-1. Lidé s HIV-2 mají také nižší virovou zátěž či hladinu viru v krvi, než je tomu u lidí s typem HIV-1. HIV infekce se vlivem viru HIV-2 rozvíjí pomaleji než u viru HIV-1. Lidé s HIV-2 mají

delší bezpříznakové období než lidé s HIV-1 a také pomalejší progresi do 3. stadia. HIV-2 má pak také nižší úmrtnost (Popper, 1999).

2.1.4 Možnosti nákazy a léčba HIV

HIV virem se lze nakazit přímým kontaktem s tělními tekutinami obsahujícími tento virus (nejčastěji se jedná o krev, mateřské mléko a pohlavní sekrety). K rizikovým faktorům přenosu patří pohlavní styk a sdílení injekčního materiálu. Pouze velmi malé riziko přenosu existuje u nakažených HIV, kteří berou správně léky a udržují si tak virovou zátěž na nezjistitelné úrovni. U těchto existuje pouze malé riziko přenosu v rámci pohlavního styku a také nižší riziko přenosu viru z matky na plod (Popper, 1999).

I přes nesmírné úsilí farmaceutických a akademických pracovišť neexistuje ani v současné době žádná účinná vakcína (Ulbricht et al., 2012).

K léčbě HIV je využívána kombinace několika léků v rámci tzv. antiretrovirové terapie. Nakaženým je současně podáváno inhibitorů tří enzymů (proteázy, reverzní transkriptázy a nově také integrázy). V současné době jde o jedinou schválenou terapii proti AIDS. K nalezení dlouhodobé antiretrovirové terapie je však potřeba hledat další inhibitory, jež budou působit na další kroky životního cyklu viru. Nadějí úplného odstranění viru z těla je genová terapie, jež by byla cílená na všechny buňky, které provirus obsahují (Popper, 1999).

První krok v rámci tohoto procesu byl již učiněn použitím *ex vivo* genové terapie, v rámci transplantace kmenových buněk kostní dřeně ošetřených tak, aby neprodukovaly CCR5 (chemokinový receptor typu 5) koreceptor HIV (Ulbricht et al., 2012). Při správném a pravidelném užívání léků lze progresi HIV zpomalit, pomoci ochránit imunitní systém a také snížit riziko možného přenosu HIV. Virus lidské imunitní nedostatečnosti-2 obecně méně reaguje na určité léčivé látky, které působí na HIV-1. Není-li virová nákaza HIV léčena, pak oslabuje imunitní systém člověka, čímž se stává pro další onemocnění a infekce zranitelnější (Popper, 1999).

2.2 Uplatnění lentivirů v rámci léčby onemocnění

V naději na vyléčení AIDS bylo vyvinuto velké úsilí týkající se pochopení a struktury viru HIV. Ve snaze o léčitelnost byly vyvinuty silné transgenní vektory na bázi HIV-1. Vektory založené na HIV tvoří většinu lentivirových vektorů, které jsou používány v dnešní době ve výzkumu (Sakuma, 2012).

Přesto, že jsou lentiviry zodpovědné za onemocnění AIDS, tak jsou dnes široce využívány v rámci genové terapie a vývoje genových vakcín. Jejich užitečnost vychází z toho, že se stabilně začleňují do cílových buněk. Lentivirové vektory také překonávají omezení, jež s sebou nesou jednoduché retrovirové vektory (nižší frekvence inzerční mutagenese a vyšší stabilita virových částic). Pro jejich využití v imunoterapii je pak zásadním faktem, že mohou transdukovat vysoce diferencované buňky (Miyoshi, 1998). Vektory lze charakterizovat jako přenašeče, elementy dědičné hmoty, jež jsou schopné se samy ve svém hostiteli množit a do kterých lze vkládat požadované úseky DNA (Morita, 2004).

2.2.1 Genová terapie

Uplatnění lentivirů lze nalézt zejména v genové terapii, která je založená na úvaze přenosu dědičného materiálu do buněk pacienta k nahrazení defektních genů či k zavedení nové buněčné funkce. A právě zavedení nové buněčné funkce by mohlo být v budoucnu využíváno k léčbě komplexních onemocnění, jako je například rakovina, AIDS, Parkinsonova nemoc či onemocnění kardiovaskulárního systému. Aby byl specifický typ tkáně či buňky ovlivněn, musel by do ní být gen dodán tak, aby působil spolehlivě, tedy na vhodné úrovni a také dostatečně dlouhou dobu (Mazakaris, 2003).

Za neúčinnější metodu tohoto dodání lze považovat použití modifikovaných virů tzv. virových vektorů. Retroviry jsou pro tyto účely vhodné, neboť do hostitelské buňky svůj vlastní genetický materiál přenášejí velmi úspěšně. Genetická modifikace viru probíhá *in vitro*. Jsou odstraněny geny kódující proteiny viru a místo nich vloženy tzv. léčebné geny. Sekvence LTR viru jsou ponechány. Na rozdíl od konvenčních retrovirových vektorů, které pro infekci vyžadují buněčné dělení, nedávno vyvinuté lentivirové vektory nevyžadují buněčné dělení a mohou tak být použity pro expresi transgenů v neuronech. Poprvé bylo přenosu genetické informace za pomoci virů využito v roce 1968. Od té doby se stala tato problematika předmětem mnoha studií (Mazakaris, 2003; Youngsuk et al., 2011).

K vlastnostem, díky kterým lze lentiviry využít v rámci genové terapie, patří jejich schopnost dodat jeden, dva nebo tři terapeutické geny. Lentiviry vytvářejí nízkou imunitní reakci u hostitele a také se velmi málo pomnožují (Mazakaris, 2003).

Přeměna viru na virový vektor byla zahájena poprvé v 80. letech 20. století pomocí vektorů založených na Molonyho viru leukemie označovaném MoMLV. Z lentivirů byly vyvinuté nejprve vektory založené na viru lidské imunodeficiency HIV-1, jež získaly

široké využití pro základní i aplikované účely (Durand, Cimorelli, 2011). Lentivirové vektory odvozené od HIV-1 se staly hlavními nástroji pro doručování genů do savčích buněk (Sakuma, 2012).

Jejich nejvýhodnějším znakem je schopnost zprostředkovat účinnou transdukcí, integraci a dlouhodobou expresi do dělících se i nedělících se buněk, a to jak *in vitro*, tak *in vivo* (IBIDI, 2016). Lentiviry mohou infikovat buňky bez ohledu na jejich stav proliferace, což je činí pro genovou terapii zvláště přitažlivými. Příklady cílů pro genovou terapii založené na lentivirových vektorech jsou neurony, hepatocyty nebo monocyty (Sakuma, 2012).

Lentivirové vektory jsou obecně vytvářené ze dvou zdrojů. Tím prvním jsou viry primátů, kam patří vir HIV či vir SIV. Druhým pak viry neprimátů, kam spadají viry kravského a kočičího syndromu (BIV a FIV) a také nejjednodušší vir infekční koňské anémie (EIAV). Komerční společnosti zabývající se vývojem genové terapie vyvinuly lentivirový vektorový systém (odvozený od EIAV, infikující koně, ale ne lidi) zprostředkovávající dlouhodobý a účinný přenos genů do buněk savců (Buchschacher, Wong-Staal, 2020; Mazakaris, 2003).

2.2.2 Výhody použití lentivirových vektorů

Za atraktivní nosiče genů jsou lentivirové vektory považovány z toho důvodu, že jsou schopné infikovat dělící se i nedělící se buňky, že jsou schopné infikovat široké spektrum buněk, že nabízejí dlouhodobou genovou expresi skrze stabilní vektorové integrace do genomu hostitele, že postrádají po transdukcí vektoru imunogenní virové proteiny a také proto, že pro výrobu vektorů jsou lentiviry relativně snadným systémem k manipulaci (Sakuma, 2012).

3 Infekce hospodářských zvířat způsobené lentiviry

Mimo lidí infikují lentiviry také zvířata. Hospodářská zvířata (kopytníci) jsou mnohdy přirozenými hostiteli lentivirů. Jak již bylo napsáno výše, tak u kopytníků se jedná o MVV ovcí, CAEV koz, BIV skotu a EIAV koní.

I přes různé patologie, jež jsou lentiviry vyvolávány, mají tyto viry některé rysy společné. Počátek infekce je charakteristický akutní fází virové replikace, která je přechodná, avšak rychle se mění ve dlouhotrvající fázi chronickou, během níž je replikace snížena. Po chronické fázi se projeví dlouhodobá asymptotická fáze onemocnění. Ne všechny lentiviry jsou však spojeny s nástupem onemocnění. Například některé kmeny BIV způsobují pouze mírné symptomy¹ (Durand, Cimarelli, 2011).

Lentiviry se zaměřují na imunitní systém tak, že infikují primárně monocyty a makrofágy s tím, že SRLV nemají na rozdíl od virů způsobujících imunodeficienci afinitu k T lymfocytům. Latentně perzistují a unikají imunitní reakci (Arnarson et al., 2017).

Ovce infikované SRLV vykazují počáteční viremickou fázi, ale následně je virus většinou buněčně asociovaný s minimem volného viru cirkulujícího v periferní krvi (Blacklaws, 2012). Cirkulující infikované monocyty infiltrují intersticiální prostory cílových orgánů, jako jsou plíce, mléčná žláza nebo synoviální tkáň kloubů, nesou provirovou DNA integrovanou do genomu hostitelské buňky, a proto jsou pro imunitní systém neviditelné. Sérokonverze je opožděná, obvykle o několik měsíců (Rimstad, 1993). Replikace viru začíná po zranění monocytů na makrofágy a následná imunitní odpověď pomalu a progresivně způsobuje chronické zánětlivé léze a makroskopickou patologii (Gendelman et al., 1986; Lerondelle et al., 1999). Trvá až roky, než se projeví klinické příznaky, přesto jsou infikované ovce zjevně trvalým zdrojem viru a jeho přenašeči (de Boer et al., 1979).

V laboratorních podmínkách mohou být lentivirové infekce diagnostikovány metodami virologickými i metodami sérologickými. Obecným doporučením je kvůli potvrzení výsledků použití alespoň dvou testů. Za optimální řešení je považována kombinace variant imunoenzymatických testů tzv. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) testu a testu PCR (polymerase chain reaction). ELISA je sérologický

¹ K dalším výjimkám z tohoto společného popisu patří také infekce kojenců HIV-1, při níž dochází k nástupu onemocnění velmi rychle (Durand, Cimarelli, 2011).

rychlý test, trvající 2 až 3 hodiny. Například ve srovnání s imunodifúzním testem (IDT), který se při stanovení tohoto typu taktéž používá a který trvá 2 až 3 dny. V rámci výzkumu jsou pak používány i další nákladnější i časově náročnější testy, jako je například RIPA (ristocetin-induced platelet aggregation) a WB (western blott) (Barták et al., 2018).

Průzkumy však ukazují, že diagnostické metody nejsou vždy zcela spolehlivé, a to z důvodu nízké úrovně virové zátěže nebo kmenové variability. Diagnostické metody je tedy třeba neustále zdokonalovat (Akashina et al., 2017).

Kontroverzní otázkou je také dopad mastitidy vyvolané SRLV na produkci. Některé studie nezjišťují rozdíly v množství a kvalitě mléka od infikovaných a neinfikovaných koz (Leitner, 2008; Nord, 1997; Turin, 2005). Jiné zprávy ukazují snížení produkce mléka (9 % u koz plemene Murciano-Grenadine) bez změny kvality mléka (Martínez, 2002). Konečně existují zprávy ukazující 15% pokles produkce mléka spojený s nízkou kvalitou a sníženým obsahem tuku (Martinez-Navalon, 2013; Ryan, 1993). U dojných ovcí byl pozorován průměrný roční pokles produkce mléka o 3,2 % a procenta mléčného tuku o 2 % (Christodoulopoulos, 2005). Kromě toho může infekce SRLV u malých přežvýkavců negativně ovlivnit kvalitu mléka a zdá se, že spouští zvýšený počet somatických buněk (Leitner, 2008; Martinez-Navalon, 2013).

Lentivirová onemocnění hospodářských zvířat vedou k ekonomickým ztrátám a vzhledem k nutným nakažovým opatřením také omezují možnost obchodu se zvířaty, a to jak na trhu domácím, tak v rámci obchodu mezinárodního nejen v Evropské unii. Léčba lentivirových onemocnění zvířat neexistuje a dostupná není ani účinná vakcína s výjimkou vakcíny proti FIV (Akashina et al., 2017; Westman et al., 2021).

3.1 Ovčí vir maedi-visna (MVV)

Taxonomicky se virus maedi-visna řadí do čeledi *Retroviridae*, podčeledi *Othoretrovirinae*, rodu *Lentivirus*. Vir je členěn do genotypů maedi-visna A-E, které jsou dále děleny do subgenotypů (Shah et al., 2004; Straub, 2004). Genom MVV je dlouhý přes 9000 nukleotidů a obsahuje podobně jako ostatní retroviry sekvence kódující tři strukturální geny *gag*, *pol* a *env* a tři doplňkové geny kódující proteiny s regulačními funkcemi při replikaci viru *vif*, *tat* (někdy nazývaný spíše gen pro viral protein R=*vpr*) a *rev* (Barták et al. 2018; Villet et al. 2003).

Gen *gag* kóduje tři proteiny, a sice MA (p16 matrix protein), CA (p25 kapsidový protein) a NC (p 14 nukleokapsidový protein). Gen *pol* kóduje virové enzymy: proteázu (PR), reverzní transkriptázu (RT) s funkcí ribonukleázy H (RNáza H), deoxyuridin-

trifosfatázu (dUTPázu) a integrázu. Gen *Env* obsahuje sekvence povrchových glykoproteinů gp160 (surface=SU) a transmembránových glykoproteinů gp46 (transmembrane=TM) (Andrésdóttir, 2018).

Provirový genom MVV je na obou koncích ohraničen dvěma shodnými LTR s oblastmi U3, R a U5. Oblast U3 obsahuje promotorové a regulační prvky, které jsou zodpovědné za tkáňový tropismus (Glaria et al., 2012; Óskarsson et al. 2007).

Ovčí virus maedi-visna je druhým historicky popsáním onemocnění vyvolaným lentiviry, jež pocházelo z pozorování poruchy u stáda ovcí z 50. let 20. století na Islandu, kde šlo o závažnou formu pneumo-encefalopatie (Durand, Cimarelli, 2011). Infekce sem byla zavlečena importem karakulských ovcí z Německa, jež sem byly dovezené za účelem zvýšení užitkovosti domácího plemene krátkoocasé ovce islandské. Avšak první zmínky o tomto onemocnění pochází z jižní Afriky z roku 1915. Z islandštiny také pochází současný název maedi-visna. Jde o odvozeninu od typických projevů dyspnoe (maedi) a nervových příznaků (visna) (Blacklaws, 2012).

Viry, které způsobují virové onemocnění maedi-Visna (MV), způsobují taktéž další virové onemocnění artritida a encefalitida koz (CAE). Tuto specifickou skupinu lentivirů nazýváme lentiviry malých přežvýkavců (SRLV), a to díky jejich strukturálním, genetickým a patogenním podobnostem. Molekulární studie navíc ukázaly, že oba viry představují široké spektrum variant, které mohou postihnout ovce i kozy, dokonce i jiné živočišné druhy (Germain, Vallas, 2006).

Nicméně, infekce MVV je častější u ovcí a infekce CAEV je častější u koz, takže je pravděpodobně upřednostňován homologní přenos. Schopnost SRLV produkovat zkrřížené infekce přeskakující mezidruhovou bariéru je neobvyklá, protože většina lentivirů má velmi omezenou schopnost růst v buňkách, které nepocházejí z jejich hostitelských druhů (Blacklaws, 2012).

Pro maedi-visna ovčí vir je typická dlouhá inkubační doba v řádu několika měsíců až několika let. V rámci produkčních chovů se tak zvíře klinických projevů onemocnění často ani nedožije (Barták et al., 2018). Přímé ztráty úhynem tak bývají ve stádě malé, avšak užitkovost zvířat s průběhem onemocnění klesá (Hamza, 2017). U mláďat dochází k přenosu skrze infikované kolostrum nebo mléko. Možný je také přenos transplacentární. Mezi dospělými zvířaty je hlavní cestou přenosu přímý kontakt, především vzájemnou inhalací respiratorních sekretů (Blacklaws, 2012), tedy infekčním aerosolem.

Maedi-visna virus se nepřenáší na dlouhé vzdálenosti, ale pouze na několik metrů. Nejsnadnější cestu šíření tak přinášejí invazivní chovy ovcí ať už ustájených nebo na pastvách. Postup nákazy je pomalý. V promořeném stádě se za ¾ roku nakazí přibližně polovina nově přivedených ovcí. Za teoreticky možný je označován také přenos kontaminovaným strojem na dojení, neuklizenými placentami infikovaných zvířat a použitím nesterilních jehel k veterinárním úkonům na zvířatech. Přenos nákazy na člověka není možný (Hamza, 2016).

Maedi-visna virus infikuje promonocyty, což jsou buňky kostní dřeně. Ta slouží v organismu pro vir jako rezervoár. Tyto infikované promonocyty pak kolují do krevního řečiště v podobě monocytů a dále ve tkáních maturují do formy makrofágů, kde dochází k replikaci viru (Barták et al., 2018). Tím se také liší od viru HIV, který se množí v lymfocytech, jež jsou v řízení imunitní odpovědi zásadními. Další odlišnost spočívá ve výběru hostitelských buněk. Celková obranyschopnost ovce zůstane téměř nenarušená. Její imunitní systém ale není schopný virus zničit. Stejně jako je tomu u všech lentivirů, tak i virus maedi-visna má schopnost se trvale zapsat do DNA nakažené buňky a v podobě genetické informace pak skrytě přetrvávat po dlouhou dobu (Hamza, 2016).

U viru maedi-visna nejsou popsány příznaky imunodeficiency. Infikovaná zvířata zůstávají imunokompetentní a na tvorbu infekce reagují tvorbou protilátek specifické povahy. Avšak imunitní (humorální) odpověď je zde mnohem pomalejší, než je tomu u jiných virových infekcí, jež jsou doprovázeny akutním průběhem. K vývoji specifických protilátek dochází v rozmezí několika týdnů až několika měsíců od infekce. Jako základní indikátor monitorování nákazy v chovech slouží protilátky typu IgG, jež jsou po přirozené infekci v těle zvířete přítomné po celou dobu jejich života. Slouží také jako selekční kritérium v rámci eliminace nákazy (Blacklaws, 2012).

U infekcí způsobených SRLV nejvíce převládají příznaky spojené s dýchacími cestami, jako např. dušnost a břišní dýchání v důsledku chronické intersticiální pneumonie. Mohou se vyskytnout i jiné klinické projevy jako mastitida (zatvrdlé vemeno), artritida (kulhání), progresivní slabost a v některých případech i úhyn nakažených zvířat (Straub, 2004). Zvíře zůstává doživotním přenašečem nákazy a infekce končí úhynem zvířete (Hamza, 2016). Zvířata infikovaná MV ukazuje obrázek číslo 7.

Paréza pánevních končetin v důsledku infekce virem Maedi-Visna.



Nervové příznaky onemocnění. Z hlediska diferenciální diagnózy je důležité zvážit další možné infekce (tetanus, Aujeszkého choroba...).



Zvíře trpící respirační formou onemocnění.



Obrázek 7 Ovce infikované virem maedi-visna (Crilly, 2015)

Onemocnění je rozšířeno především ve Středozeří (Itálie, Řecko, Španělsko) a v Severní Americe. V původní lokalitě výskytu na Islandu bylo onemocnění úspěšně vymýceno. Naopak například na Novém Zélandu nebo v Austrálii se onemocnění nevyskytuje vůbec (Hamza, 2016). Maedi-visna virus ovcí lze i tak označit za (téměř) celosvětově rozšířený patogen. Výjimkou jeho výskytu není ani Česká republika. Vzhledem k nedostatku studií i obtížnosti hodnocení možných ekonomických dopadů je však stupeň rozšíření viru i ekonomické ztráty s ním související těžko vyčíslitelné. I přes to je nejdiskutovanějším dopadem omezení domácího i mezinárodního obchodu s chovy zvířat, kde je nálezový status základním zdravotním kritériem (Blacklaws, 2012).

Rostoucí zájem o chov ovcí s sebou nese potřebu rozvoje chovu těchto přežvýkavců a ten se neobejde bez znalosti jejich zdravotního stavu.

V České republice je vir monitorován od počátku 90. let. Vyšetřování zvířat probíhá na základě metodiky každoročně vydávané Státní veterinární správou České republiky.

Do monitoringu MV v ČR jsou zařazeny pouze chovy v kontrole užítkovosti (KU). Chovy zařazené v kontrole užítkovosti musí být MV prosté. Hlavní diagnostickou metodou monitoringu MV je stanovení protilátek z krevního séra. Po zjištění pozitivních výsledků na přítomnost viru může být hospodářství zařazeno opět až po „ozdravení“, které je prokázáno na základě monitoringu a které je potvrzeno rozhodnutím příslušné Krajské veterinární správy (Barták et al., 2018).

Kontrola je prováděna 1x ročně a do reprezentativního vzorku je zařazeno 25 % samičích zvířat všech plemen nad 12 měsíců věku či zvířat v laktaci, a to však nejméně v počtu 50 kusů zvířat. Při menším počtu zvířat v hospodářství jsou vyšetřena všechna zvířata starší 12 měsíců nebo ta, jež jsou v laktaci. U samců jsou vyšetřováni všichni nekastrovaní jedinci starší 6 měsíců s výjimkou jatečních beránků. V současnosti je ozdravení stáda řešeno především eliminací séropozitivních zvířat. Výjimku mají stáda šumavských ovcí, jež je zařazená do světového genofondu ohrožených druhů hospodářských zvířat, pro něž by tato eliminace znamenala zánik plemene (SVSCR, 2022).

3.2 Virus artritidy a encefalitidy koz (CAEV)

Taxonomicky se virus artritidy a encefalitidy koz řadí do čeledi *Retroviridae*, podčeledi *Othoretrovirinae*, rodu *Lentivirus* (EMBL-EBI, 2019).

Virus artritidy a encefalitidy koz je velice blízce příbuzný MVV, tomu odpovídá i vysoká sekvenční homologie jejich genomů (Pyper et al., 1986). Genom CAEV obsahuje stejné strukturální i doplňkové regulační geny jako genom MVV (Padiernos et al., 2015). S největší pravděpodobností se jedná o různě adaptované kmeny jednoho viru. V rámci rodu *Lentivirus* jde však o samostatný virový druh. Virus artritidy a encefalitidy koz a MVV se společně označují zkratkou SRLV – lentiviry malých přežýkavců. V rámci onemocnění CAE a MV byl potvrzen také mezidruhový přenos virů (Akashi et al., 2016). Je tedy pravděpodobné, že při společném chovu zvířat se nemocí ovcí může nakazit také koza, jelikož je přirozeným hostitelem velmi podobného druhu lentiviru, kterým je právě CAEV. Přenos viru na člověka není možný (Akashi et al., 2016).

Virus CAE způsobuje u koz vleklé, celoživotní a nevléčitelné infekce, které jsou doprovázené chronickými a zhoršujícími se záněty šlachových pochev, kloubů a tíhových váčků. Nejčastěji bývá postižen kloub předního kolene (kloub zápěstí). Dalším klinickým syndromem onemocnění je zánět mozku (encefalitida). Mimo mozek je napadána také mícha, což způsobuje, že zvíře začne trpět obrnami, které se postupně vyvinou v ochrnutí.

Mimo artritidy a encefalitidy bývá onemocnění doprovázeno i chronickým zápalom plic, který se může projevit buďto spolu s jedním z výše zmíněných příznaků onemocnění, nebo i samostatně. Stejně jako u jiných lentivirových onemocnění je i zde bezpříznakové období velice dlouhé, a tedy je dlouhodobé i skryté nosičství. Nemoc se tak chovem šíří pomalu a nepozorovaně. K dalším projevům nákazy, které jsou méně časté, patří i chronické záněty vemene (Mselli-Lakhal et al., 2000).

Postižení CNS ve formě encefalitidy je spíše vzácným jevem. Vyskytuje se pouze u kůzlat v rozmezí dvou až šesti měsíců jejich věku. Klinické projevy CAE jsou tedy od klinických projevů MV odlišné (Mselli-Lakhal et al., 2000). Projev nákazy koz CAEV způsobující postižení kloubu předního kolene ukazuje obrázek číslo 8. Zbytnění karpálních kloubů v pokročilém případě SRLV u ovce; malý obrázek – výrazná proliferace a zánět synoviální membrány u postiženého kloubu (Minguijón et al., 2015)



Obrázek 8 Artritida u kozy způsobená virem CAEV (Minguijón et al., 2015)

Stejně jako u MV, tak ani u CAE nejsou popsány příznaky imunodeficiency. Buňky infikovaných zvířat zůstávají schopné odpovědět na antigenní podnět a na tvorbu infekce tak reagují tvorbou protilátek specifické povahy. I zde, stejně jako u infekce ovce, je imunitní odpověď mnohem pomalejší, než je tomu u jiných virových infekcí, jež jsou doprovázeny akutním průběhem. K vývoji specifických protilátek dochází od infekce v rozmezí několika týdnů až několika měsíců. Jako základní indikátor monitorování nákazy v chovech slouží protilátky typu IgG, které jsou po přirozené infekci v těle zvířete

přítomné po celou dobu jejich života. Slouží také jako selekční kritérium v rámci eliminace nákazy (Mselli-Lakhal et al., 2000).

Přenos CAEV je obdobně jako MVV zapříčiněn sáním mleziva a mléka od nemocných samic. A to přes to, že je toto mléko bohaté na protilátky proti CAEV. K přenosu může vést již pouhé jedno nakrmení od nemocné kozy. Některá kůzlata pozitivních matek se již nakažená narodí nebo se nakazí krví či poševními sekrety matky při porodu. To snižuje úspěšnost při ozdravování chovů. Stejně jako MVV se CAEV na krátkou vzdálenost přenáší aerosolem. Takže zamezit šíření viru lze oddělením prostorů pro nakažená a zdravá zvířata. Na rozdíl od MV se CAE nepřenáší předměty ani pomůckami, což neplatí při jejich styku s krví (např. injekční jehly). V případě CAEV nebyl prokázán pohlavní přenos (Mselli-Lakhal et al., 2000).

Výskytem viru v kozích stádech se zabíraly vědecké studie z celého světa. Zink et al. (1997) například při zkoumání viru zjistili sníženou mléčnou užitkovost a zvýšené brakování u koz, které byly infikovány CAEV. Stejní autoři také předložili údaje, které naznačovaly, že virus může snižovat reprodukční výkonnost a vést ke zhoršení zdravotního stavu jedinců, a to z mnoha různých příčin. Naproti tomu studie, která byla uskutečněna výzkumníky Elliotem a Masonem (1995), přišla s překvapivými výsledky, kdy séropozitivní kozy byly v lepší tělesné kondici než na virus negativní jedinci a nebyl u nich zjištěn ani žádný rozdíl ohledně reprodukčních ukazatelů.

Rostoucí zájem o chov koz s sebou nese potřebu rozvoje chovu těchto přežvýkavců a ten se neobejde bez znalosti jejich zdravotního stavu. Lentiviry koz, stejně jako lentiviry ovčí, způsobují významná onemocnění po celém světě, a je tedy třeba jim věnovat dostatek pozornosti (Akashi et al., 2016). Chovy zařazené v kontrole užitkovosti musí být CAEV prosté (SVSCR, 2022). Pro monitoring a diagnostiku lentiviru koz je využíváno stejných metod a postupů jako u viru ovčí.

3.3 Infekční anemický virus koní (EIAV)

Taxonomicky se anemický virus koní řadí do čeledi *Retroviridae*, podčeledi *Othoretrovirinae*, rodu *Lentivirus* (Straub, 2004). Virus infekční anemie koní je dlouhý 8359 nukleotidů a jedná se o živočišný lentivirus s nejjednodušším genomem. Gen *gag* kóduje prekurzorový polyprotein Gag, jehož výsledným produktem jsou 4 strukturální proteiny: MA (p15 matrix protein), CA (p26 kapsidový protein), NC (p11 nukleokapsidový protein) a P9 protein. Gen *pol* kóduje virové enzymy: proteázu, reverzní transkriptázu (RT) s funkcí ribonukleázy H, deoxyuridin-trifosfatázu (dUTPázu) a

integrázu. Oblast *Env* obsahuje sekvence povrchových glykoproteinů gp90 (surface=SU) a transmembránových glykoproteinů gp45 (transmembrane=TM) glykoproteinů. Genom EIAV obsahuje tři regulační peptidy: S1 (Tat), S2 a S3 (Rev). Provirový genom je na 5' a 3' konci lemován dvěma identickými LTR obsahujícími promotorické a regulační prvky (Deshiere et al., 2019).

Infekční anémie koní byla prvním popsáným onemocněním, jež bylo způsobeno lentiviry. První zmínka o této nákaze pochází z Francie roku 1843 (Miyoshi, 1998). Onemocněním trpí mimo koní také osli a zebry. Rozšíření onemocnění EIA je celosvětové. Výjimkou není ani Česká republika, která je však od roku 1989 nákazy prostá. Přenos nákazy na člověka není možný (Toman, 2000).

Virus EIAV se přenáší mechanicky hmyzími vektory (Foil et al., 1993) nebo nesterilními jehlami. Hlavní cestou přenosu je hematofágní hmyz z čeledi *Tabanidae*, a to konkrétně prostřednictvím bodavě-sacího ústrojí těchto ovádů (Cupp a Kemen, 1980). Receptor pro EIAV na buněčné membráně zůstává neznámý. Po celá léta byly znalosti molekulární biologie EIAV zpomaleny nedostatkem systému tkáňových kultur. Vývoj systémů *in vitro* a produkce virových částic vedly ke klasifikaci EIAV jako člena čeledi *Retroviridae* a otevřely možnosti biochemických a molekulárních studií (Ciupe a Scheartz, 2013).

Na rozdíl od jiných retrovirů je dlouhodobá infekce spojena s omezenou replikací viru a absencí klinických projevů. Imunitní mechanismy odpovědné za tuto kontrolu mohou mít značné důsledky pro návrh vakcíny u jiných lentivirových infekcí (Leroux et al., 2004).

Onemocnění probíhá v akutním, chronickém i dlouhodobě asymptotickém stadiu. Počátek akutního onemocnění v rámci experimentální infekce koní se projevil do 3 až 4 týdnů vysokou hladinou virémie a klinickými projevy, jako je mimo anémie také kolísavá horečka doprovázená celkovým chřadnutím, průjmy, letargie, otoky a trombocytopenie. U některých koní dochází pouze k jedné epizodě onemocnění, u většiny ale přejde akutní fáze do fáze chronické, pro niž jsou charakteristické nepravidelně se opakující cykly projevů onemocnění. Pravděpodobně díky vývoji trvalé ochranné imunity se tato fáze vyvine v asymptotické stadium nemoci. Nosič viru zůstává infikován po celý život. Na nákazu neexistuje lék (Leroux, 2001).

Jak již bylo zmíněno, velmi často je toto onemocnění přenášeno hmyzem sajícím krev. Avšak jeho přenos je časově omezený, protože průzkumy ukázaly, že 4 hodiny po nasátí krve z pozitivního jedince již na ústním ústrojí komára vir detekován nebyl. Kvůli

možnosti šíření skrze krev jsou u těchto zvířat rizikové všechny veterinární zákroky. Virus je schopný na injekční jehle vydržet při pokojové teplotě až čtyři dny, což s sebou nese riziko podkovářských, ošetřovatelských i chovatelských pomůcek. Pro nízkou koncentraci viru je přenos nákazy v rámci společného ustájení málo pravděpodobný (Toman, 2000).

Klinické příznaky akutního onemocnění spočívají v rychlém nástupu vysokých teplot, které se pohybují kolem 41 °C, blednutím sliznic někdy s přítomností drobných krvácenin (především v okolí uzdičky spodní části jazyka), postojem jako při schvácení kopyt a apatii zvířete. Během průběhu subakutního jsou příznaky obdobné průběhu akutnímu, avšak jsou mírnější. Navíc dochází k blednutí spojivek a při zátěži se projevuje dušnost a pocení. V rámci průběhu chronického lze pozorovat mimo anémie na zvířeti i to, že hubne a je celkově slabé. Vlivem poruchy krevního oběhu u nich dochází k otokům končetin a spodiny břicha (Toman, 2000).

Diagnostika zde, stejně jako v případě SRLV, probíhá sérologickým vyšetřením vzorku krve. Ke stanovení je využíváno mezinárodně uznávaného Cogginsova testu. Z metod screeningových pak ELISA. Kultivace i izolace viru vůbec je velmi náročným procesem. Z tohoto důvodu se rutinně neprovádí. Virus však lze z krve či orgánů prokázat také metodami molekulárně biologickými (např. nested RT-PCR).

Infekce EIAV má za následek vysoký titr infekční plazmatické virémie do tří týdnů po infekci. Několik důkazů naznačuje, že je zapotřebí jak humorálních, tak buněčných EIAV-specifických odpovědí, aby byla ukončena počáteční virémie. Jak již bylo uvedeno, virová replikace je u zvířat účinně redukována na subklinickou úroveň, tedy z chronického stadia do asymptomatického stadia infekce EIAV. U dlouhodobých inaparentních přenašečů EIAV lze detekovat nízkou úroveň virové infekce a replikace v tkáňových makrofázích spojenou s plazmatickou virémií. Imunosuprese u asymptomatických zvířat může vést k opětovnému výskytu symptomů onemocnění i po několika desetiletích od nakažení (Ciupe a Scheartz, 2013).

3.4 Virus imunodeficiencie skotu (BIV)

Taxonomicky se anemický virus skotu řadí do čeledi *Retroviridae*, podčeledi *Othoretrovirinae*, rodu *Lentivirus*. Poprvé byl BIV izolován v roce 1969 v USA (Bhatia, Patil, Sood, 2013), na 8 let staré krávě, která měla lymfocytózu, lymfadenopatii, progresivní slabost, únavu a poškození centrálního nervového systému. Virus imunodeficiencie skotu má nejkompexnější organizaci genomu mezi lentiviry. Virová

částice obsahuje dvě kopie jednovláknového RNA genomu (dimer), podobně jako jiné retroviry. Lineární genom BIV je dlouhý 8960 nukleotidů. Provirová DNA, obsahuje strukturální retrovirové geny *gag*, *pol* a *env* ohraničené na 5' a 3' koncích LTR. Dlouhé terminální repetice obsahují promotory, zesilovače a terminátory transkripce. Centrální oblast genomu BIV obsahuje kódující exony několika domnělých nestrukturálních doplňkových genů včetně *vif*, *tat*, *rev*, *vprw*, *vpy* a *tmx* (Bhatia et al., 2013).

Histologické vyšetření tkání uhynulého zvířete odhalilo generalizovanou folikulární hyperplazii lymfatických uzlin a perivaskulární manžetu mozku. Izolovaný virus indukoval tvorbu syncytia v buněčných kulturách a byl strukturálně podobný MVV, proto byl označen jako „bovine visna-like virus.“ Protože tento bovinní lentivirus nebyl považován za původce leukémie/lymfosarkomu, jeho biologie se změnila, nebyl studován téměř deset a půl roku po svém počátečním objevu, dokud nebyl v roce 1983 objeven HIV (Barre-Sinonoussi et al., 1983).

Kvůli široké podobnosti s virem HIV-1 byl BIV použit jako živočišný model pro pochopení patogeneze HIV-1 (Rodrigues et al., 2019). Úzce příbuzným kmenem je také lentivirus Jembranovy choroby (JDV), který je známý tím, že způsobuje akutní onemocnění skotu na Bali a nelze jej sérologicky odlišit pomocí v současnosti dostupných imunodiagnostických metod. BIV byl pojmenován na základě svých morfologických, sérologických a genetických vlastností podobných virům HIV a opičím imunodeficiencím (SIV), (Malmquist et al., 1969).

Virus imunodeficiencie skotu se vyskytuje celosvětově (De Pablo-Maiso et al., 2018). Virus způsobuje nevyléčitelné onemocnění trvající po celý život zvířete (Rodrigues et al., 2019). Globální distribuce infekce BIV u mléčného a masného skotu má séroprevalenci 1,4–33 %. Klinické příznaky byly častěji pozorovány u mléčného skotu infikovaného BIV než u skotu masného. Důvodem může být méně stresových faktorů v chovu masného skotu (Yamamoto, 2009).

Virus imunodeficiencie skotu je morfologicky podobný lentiviru MV (Miyoshi, 1998). Patogenita BIV není až tak vysoká. Například u telat má infekce benigní průběh (Toman, 2009). Po napadení hostitele může vir v těle hostitele setrvat i po mnoho let bez toho, aby se projevil. Urychlit jeho projevy může například souběžná infekce, vyšší věk nebo stres. BIV napadá skot různého věku. Přenos nákazy na člověka není možný (Bhatia et al., 2013).

Infekce BIV jako taková nebyla nikdy přímo spojována s konkrétním onemocněním, jako spíše s projevy v podobě lymfadenopatie (zvětšení uzlin), lymfocytózy, lézemi

centrálního nervového systému či progresivní slabostí, poklesem výtěžku mléka, snížením blastogenní odpovědi a paraplegickým syndromem skotu (syndrom nehybnosti), (Bhatia, Patil, Sood, 2013). Z tohoto důvodu není skutečný dopad této infekce skotu znám (Rodrigues et al., 2019). Projevy onemocnění se obvykle vyskytují v asymptotické formě. I tak jde pořád o život ohrožující onemocnění. Patologicky je ale BIV více příbuzný lentivirům spojeným s chronickými zánětlivými onemocněními (SRLV a EIAV) než těm spojeným s těžkou imunodeficiencí (HIV, SIV a FIV) (De Pablo-Maiso et al., 2018).

Přenos viru probíhá skrze kolostrum, mléko či placentu, ale také výměnou tělních tekutin nebo z krve (Rodrigues et al., 2019). Stejně jako je tomu u EIAV, je také možný přenos skrze mouchy (De Pablo-Maiso et al., 2018). BIV infikuje stejně jako ostatní lentiviry buňky imunitního systému, především monocyty, lymfocyty a mikrofágy (Rodrigues et al., 2019).

Infekci je možné diagnostikovat sérologickou detekcí specifických protilátek či molekulární detekcí virového genomu za pomoci polymerázové řetězové reakce (PCR), (Rodrigues et al., 2019).



Obrázek 9 Skot infikovaný BIV (Nagy, 2014)

4 Genová rezistence

Stejně jako v lidských životech, tak i v chovech zvířat způsobují infekční onemocnění obrovské škody. Nejde jen o případné nutné likvidace nakažených chovů, ale také o snížení užitkovosti takto postižených zvířat. Zemědělci i molekulární genetické se tak shodují na vysokém významu šlechtění zvířat odolných vůči různým nemocem (Petr, 2000).

K naplnění tohoto cíle se lze vydat mnohými cestami. Jednou z nich je přenos příslušných genů do dědičné informace zvířat. Velká pozornost je věnována také genům, jež jsou přirozenou součástí genetické informace zvířat a jež vyvolávají přirozenou rezistenci (odolnost) vůči infekčním chorobám (Petr, 2000). Možnosti genové rezistence byly podrobněji zkoumány u lidského HIV a také u SRLV hospodářských zvířat. V rámci kapitoly bude pro tyto dvě skupiny nastíněna obecná charakteristika této problematiky.

4.1 Rezistence vůči viru HIV

V rámci výzkumu HIV vědci zjistili, že mnozí lidé, jež přišli do kontaktu s krví HIV pozitivního člověka, neonemocněli AIDS, či dokonce nebyli ani HIV pozitivní. To je přimělo k průzkumu genetických rozdílů mezi osobami HIV pozitivními a osobami, které se po vystavení HIV pozitivními nestaly. V rámci průzkumů bylo objeveno několik genů, u kterých některé z jejich variant před nákazou virem HIV člověka brání či v příděch, kdy k nákaze dojde, tak tomuto nakaženému člověku dopomáhají prodloužit život s nákazou (Galvani, 2005).

Ke vstupu do buňky virus potřebuje, aby na jejím povrchu byly přítomny receptory umožňující jeho vstup do jejího nitra. K nim patří CD4 s nezbytnou přítomností CCR5 či CXCR4 koreceptoru. A právě mutace koreceptoru CCR5 vede ke vzniku rezistence vůči viru HIV nebo lepší prognóze vzhledem k průběhu onemocnění (Galvani, 2005).

Receptor CCR5 podobně jako jiné receptory buňky představuje vstupní bránu pro různorodé zoonotické infekce do této konkrétní buňky. V případě receptoru CCR5 pro virus lidské imunodeficiencie (HIV). Mutací v genu pro CCR5 (tzv. CCR5 Δ 32) dochází k poruše tvorby CCR5 na cytoplazmatické membráně buňky, díky čemuž nedojde k nákaze buňky infekcí HIV (Holt et al., 2010).

Je poměrně zajímavé, že se tato receptorová mutace hojně vyskytuje v populaci zejména severoevropské, a směrem na jih této mutace ubývá. V rovníkových oblastech Afriky a východní Asii se tato mutace takřka nevyskytuje (Holt et al., 2010).

Výskyt heterozygotů neboli jedinců disponujících pouze jednou CCR5 $\Delta 32$ alelou je v evropské populaci přibližně desetiprocentní. Výskyt homozygotů, tedy jedinců, kteří disponují 2 alelami, je přibližně jednoprocentní. Kupodivu jsou nositelé této mutace zdravotně zcela v pořádku, bez známek jiných poruch imunity. Téže mutace lze využít v moderní buněčné terapii k léčbě HIV nakažených pacientů, např. pomocí transplantace hematopoetických kmenových buněk s mutací CCR5 $\Delta 32$. Tento typ buněčné terapie bohužel s sebou přináší mnohá úskalí, proto je v současné době stále ve fázi výzkumu (Holt et al., 2010).

4.2 Rezistence vůči SRLV

Infekcím způsobeným lentiviry malých přežvýkavců (SRLV) jsou věnovány četné výzkumy, jelikož jde o onemocnění, jež jsou rozšířená po celém světě, včetně České republiky. Jak již bylo uvedeno výše, tak musí být chovy zařazené v kontrole užitkovosti na MV a CAEV prosté (s výjimkou ovce šumavky). Vzhledem k poměrně četnému výskytu nákazy v České republice vznikl na žádost chovatelů výzkumný projekt, jehož cílem bylo zpracování programu pro zdravotní kontrolu infekcí způsobovaných lentiviry u malých přežvýkavců. Konkrétně se pak jednalo o metodu časně detekce infekce MV a CAE a také genetické selekce na základě markerů genetické rezistence k infekci.

Zprvu byla u určitých jedinců rezistence proti MV a CAE potvrzena pokusy založenými na opakované expozici infekčnímu agens, nicméně mechanismus rezistence se objasnit nepodařilo. Z tohoto důvodu se skrze SNP50 čipy pro ovce hledaly geny, jež by mohly být za rezistenci k onemocnění zodpovědné (Heaton et al., 2012). U ovcí tak bylo identifikováno několik genů, jež by bylo možné považovat za kandidáty odolnosti proti onemocnění MV. K odolnosti zde vykazovaly nejsilnější vztah polymorfismy v genu *TMEM154* (konkrétně polymorfismus *E35K*) (Šoch et al., 2018).

U ancestrálního haplotypu je na 35. pozici kódovaného proteinu *TMEM154* glutamin a na 70. pozici asparagin. Kóduje-li alela *TMEM154* lysin v poloze 35, pak je tento genotyp u ovcí zodpovědný za zvýšenou rezistenci k MV. V genu *TMEM154* nachází celkem 11 haplotypů. Nejběžněji se u ovcí vyskytují haplotypy označované 1, 2 a 3, jež kódují polypeptidy v pozici 35. Haplotyp 3 je také s vysokou pravděpodobností nejspíše původní verzí genu *TMEM154*, jelikož ovce s ním jsou k MV nejvíce náchylné. Právě tento původní (ancestrální) haplotyp je spojován se zvýšenou citlivostí k MVV (Heaton et al., 2012, Heaton et al., 2013).

Vyskytuje se ale také zmutovaný haplotyp charakteristický zkrácením polypeptidu kódovaného *TMEM154*, čímž u něho dochází k částečné nebo k úplné ztrátě funkce transmembránového proteinu (ztráta u haplotypu 4 a 6). Vliv na odolnost ovcí vůči MV v tomto případě nebyl řádně prozkoumán z důvodu nedostatku ovcí s tímto haplotypem. I tak existence těchto dvou polymorfismů naznačuje tomu, že neplnohodnotná funkce genu *TMEM154* může mít v rámci ochrany proti MV výhodu (Heaton et al., 2012, Heaton et al., 2013).

U koz tato problematika není blíže prozkoumána. Avšak vyspělost současné vědy poukazuje na časně probádání této problematiky i u koz. Naději na identifikaci a následnou analýzu kandidátních genů pro odolnost u koz dává zejména nově vyvinutý 52k SNP mikročip (Šoch et al., 2018).

5 Komentáře k publikacím

Lentiviry malých přežvýkavců (SRLV) způsobující onemocnění maedi-visnu ovcí (MV) a artritidu a encefalitidu koz (CAE), jsou rozšířeny po celém světě. Tyto choroby jsou neléčitelné a neexistují proti nim účinné vakcíny. Vzhledem k současné nálezové 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 užitkovosti (KU) musí být MV a CAE prosté, výjimku má pouze šumavka.

Současný kontrolní systém prováděný dle Metodiky kontroly zdraví zvířat a nařízené vakcinace na rok 2022, sleduje četnost nálezů pozitivních zvířat v jednotlivých chovech v KU, nejsou však stanovena opatření pro eradikaci nákazy. Dalším problémem znesnadňujícím chovatelům ozdravení je fakt, že do monitoringu je zahrnuto pouze 25 % zvířat u hospodářství s více než 50 zvířaty. Zbylá zvířata by chovatel musel nechat testovat na vlastní náklady, čímž by mu vznikaly další výdaje. Situaci též nenahrává průběh onemocnění, kdy detekovatelné množství protilátek se může u zvířete objevit až měsíce po nákaze.

Sami chovatelé primárně projevují zájem o vývoj markerů geneticky podmíněné rezistence. Stejně jako u eradikace klusavky (scrapie) na základě selekce rezistentních genotypů se i v případě maedi-visny nabízí možnost zavedení eradikačního programu spojujícího časnou a přesnou diagnostiku společně s asistovanou selekcí podmíněnou markery genetické rezistence.

Jako reakce na tuto problematiku vznikl výzkumný projekt, jehož cílem je vyvinutí programu zdravotní kontroly SRLV s využitím nových metod časně detekce onemocnění MV a CAE a genetické selekce na základě markerů geneticky podmíněné rezistence k infekci. V rámci projektu byly do monitoringu zařazen chovy v KU a vybrané chovy mimo KU, chovy s neznámou nálezovou situací nebo historií výskytu onemocnění a stáda šumavské ovce.

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. Virologickou a sérologickou diagnostiku v rámci projektu prováděl SVÚ Jihlava.

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 *TMEM154*, konkrétně pak polymorfizmus *E35K*. U koz není tato problematika blíže probádána, nicméně nově vyvinutý 52k SNP mikročip dává naději k identifikaci a následné analýze kandidátních genů pro odolnost i u koz.

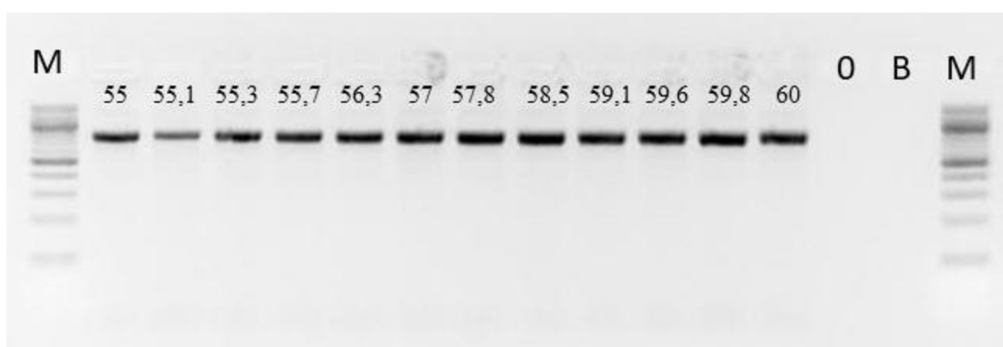
Jedním z cílů projektu bylo na základě diagnostického nálezu provést identifikace genetických variant ovlivňujících geneticky podmíněnou vnímavost/odolnost ovcí k onemocnění MV a analýza možných kandidátních markerů u koz.

Vzorky krve byly primárně vyšetřeny pomocí ELISA testu za účelem průkazu specifických protilátek. Suspektní vzorky byly dále potvrzovány alternativními imunologickými metodami – imunodifuzním testem, popř. imunoblotem. Sérologicky pozitivní vzorky a vybrané negativní vzorky byly dále testovány na přítomnost provirové DNA metodou real-time PCR (qPCR) s cílem vyloučit falešnou pozitivitu.

Celkem bylo v rámci projektu sérologicky vyšetřeno 2801 vzorků ovcí a 609 vzorků koz. Z celkového počtu ovcí bylo 496 vzorků pozitivních na MVV, tedy 17,71 % prevalence onemocnění. U koz byl výskyt pozitivních na CAEV 89 s 13,79 % prevalencí.

Pro diagnostické účely byla odebírána periferní krev zvířat (věková kategorie: minimálně 4 měsíce po odstavu) dle metodiky SVÚ Jihlava. Krev byla odebírána do plastových zkumavek s objemem 10 ml, jako antikoagulant byla použita K_3EDTA . Ihned po odběru byla krev ve zkumavce důkladně promíchána s antikoagulantem a dále uchována při +4 °C. Pro potřeby sérologické analýzy a průkazu provirové DNA byly vzorky krve dále zpracovávány. Separovaná plazma byla použita pro sérologické vyšetření, „buffy coat“ pro průkaz provirové DNA.

Identifikace genotypů *TMEM154* byla provedena u stád s výskytem sérologicky pozitivních i negativních zvířat zjištěných dle ELISA testu. Pro stanovení genotypů *TMEM154* u ovcí a koz byla použita plná krev. Izolace DNA proběhla především s využitím Chelexu 100. Jedná se o levnou, rychlou a nenáročnou metodu izolace s uspokojivým výtěžkem a s vyšším stupněm znečištění výsledného produktu. Pro analýzu PCR a amplifikace potřebné sekvence byly navrženy specifické primery s využitím programu Primer3 a zvolen teplotní profil nejvíc vyhovující pro amplifikaci s danými primery dle výsledků gradientové PCR (obrázek 10).



Obrázek 10 Gradientová PCR (Farková, 2017)

Na základě intenzity signálu zvolena nasedací teplota $T_A = 58,5$ °C. M- velikostní marker, 0 – kontrolní vzorek s H₂O místo DNA, B – blank (pouze voda). (Farková, 2017)

Po potvrzení amplifikace produktu gelovou elektroforézou byly vzorky přečištěny a zaslány do externí laboratoře pro účely sekvenační analýzy. Získané sekvence cílového úseku *TMEM154* byly analyzovány pomocí programu MEGA 10 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 10; Pennsylvania USA) a statisticky vyhodnoceny. Genotyp *TMEM154* byl analyzován u 645 vzorků ovcí a 60 vzorků koz.

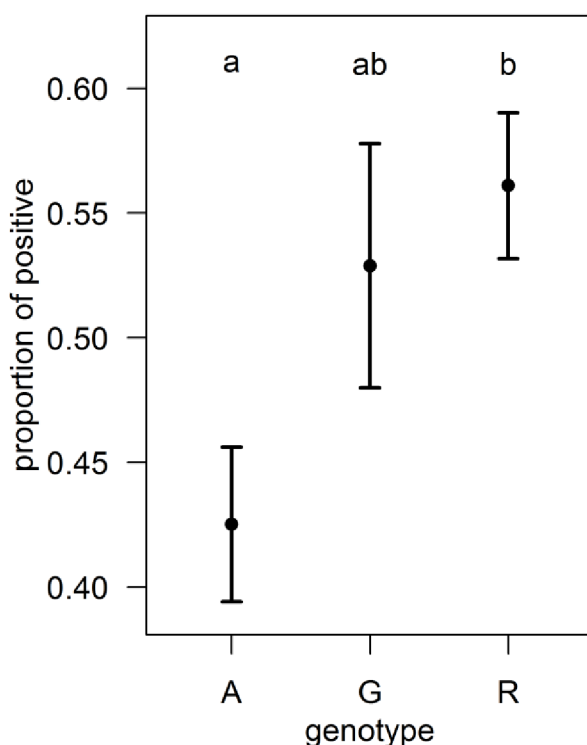
Bylo osekvenováno 645 vzorků krve ovcí s těmito výsledky:

Tabulka 1 Podíl jednotlivých genotypů

| SNP | genotyp | počet |
|-----|---------|-------|
| G | E35 | 104 |
| A | K35 | 254 |
| R | E35K | 287 |

Zdroj: Vlastní zpracování v programu Excel (Microsoft, 2020)

Graf 1 Podíl pozitivních v jednotlivých genotypech



Zdroj: Vlastní zpracování v programu R (RStudio, 2020)

Statistická analýza byla provedena v počítačovém programu R (RStudio, Boston, USA).

Podíl pozitivních v jednotlivých genotypech ovcí byl u genotypu A 42,5 %, u genotypu G 52,9 % a u genotypu R činil podíl pozitivních 56,1 % a z grafu je patrný větší podíl rizikových genotypů G a R u séropozitivních zvířat.

Zatímco u ovcí byly prokázány všechny 3 genotypy, u koz byl také amplifikován a osekvenován stejný úsek genu *TMEM154* (vysoce homologní s ovčí DNA), nicméně u všech analyzovaných vzorků koz byl identifikován pouze jeden genotyp (E35) jak u sérologicky pozitivních, tak u sérologicky negativních zvířat. Takže u koz se nepředpokládá polymorfismus a nalezení markeru rezistence v této sekvenci genu *TMEM154*.

Při genetické charakteristice lentivirů malých přežvýkavců v České republice byly detekovány 2 kmeny A a B. Kmen A byl nalezen u ovcí i koz, s největší pravděpodobností ho lze přiřadit k subtypu A2 (výskyt v Kanadě, Finsku, Turecku a USA) nebo k subtypu A3 (výskyt ve Španělsku, Švýcarsku a Turecku). Kmen B byl nalezen pouze u jednoho

stáda a byl s jistotou identifikován jako subtyp B2. Tento subtyp se vyskytuje ve Francii, Itálii, Polsku, Španělsku a Švýcarsku. S velkou pravděpodobností se kmen B dostal do České republiky nákupem chovných jedinců ze zahraničí.

Genetická analýza polymorfismu v kandidátním genu *TMEM 154* potvrdila výskyt všech 3 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 lentivirovým onemocněním. Nicméně v rámci této skupiny genotypů je patrný trend vyšší odolnosti k onemocnění. Nejvyšší podíl séropozitivních zvířat byl zjištěn u zvířat v polymorfismu obsahujícím vnímavou alelu projevující se inkorporací glutaminu do struktur transmembránového proteinu, tedy heterozygotů s genotypem E35K. Zjištěné frekvence výskytu polymorfismu odpovídají dříve publikovaným zjištěním. Srovnání podílu genotypů není zcela relevantní, protože zvířata vnímavého genotypu nemusí být vždy infikována.

Kromě geneticky podmíněné rezistence se v patogenezi infekce SRLV uplatňuje řada dalších faktorů, a to především genotyp a možná mutace viru, stáří zvířat, plemeno, podmínky chovu a další vlivy prostředí.

U koz se sekvence genu s očekávaným výskytem polymorfismu též podařila amplifikovat. Ale u všech analyzovaných vzorků byl potvrzen výskyt pouze jednoho genotypu (E35), takže se předpokládá, že zde nedochází k mutacím a vzniku polymorfismu, který by mohl mít souvislost s vyšší odolností vůči lentivirovým infekcím.

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

Pavel Barták¹, Bronislav Šimek¹, Petr Václavěk¹, Vladislav Čurný², Hana Plodková¹, Tomáš Tonka², Barbora Farková², Kateřina Vernerová², Antonín Vejčík²

¹State Veterinary Institute Jihlava, Jihlava, Czech Republic

²University 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
Rašterova 95/20, 58605 Jihlava, Czech Republic

Phone: +420 567 143 232
E-mail: bartak@vujihlava.cz
<http://actavet.vfu.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 (K₂EDTA).

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 K₂EDTA whole blood by centrifugation at 400 × 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 × g for 20 min was used for the residual plasma removal. Final cleaning of buffy coat was performed using the lysis solution (NH₄Cl, NaHCO₃, EDTA, final pH 7.3). Samples were centrifuged at 1,000 × g for 5 min at RT and the supernatant was discarded. The obtained pellet was stored at -80 °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 µl and (50 mg/µl) in the volume of 3 µl in a thermomixer (56 °C for 90 min). The Proteinase K enzyme was subsequently deactivated at 96 °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 µl reaction volume. The extracted DNA was amplified in a reaction mixture of the total volume of 25 µl with the following composition: primers (0.3 µM for each), Deoxynucleotide (dNTPs) Solution Mix (0.12 mM), 1 × PCR buffer complete with MgCl₂ (0.12 mM), Fast Start Taq Polymerase (1 Unit). The temperature profile started with an initial denaturation step (95 °C for 10 min), followed by 35 cycles with denaturing (95 °C for 1 min), annealing (55 °C for 30 s) and elongation (72 °C for 1 min). Nested PCR was carried out under similar conditions as the first PCR, where 2 µl 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 °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 | 0.8 kb |
| POL R1 | CATAGGRGGHGCAGCGGCASCA | | |
| GAG F2 | CAAACWGTGCAATGCAGCATGG | 0.8 kb | 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-

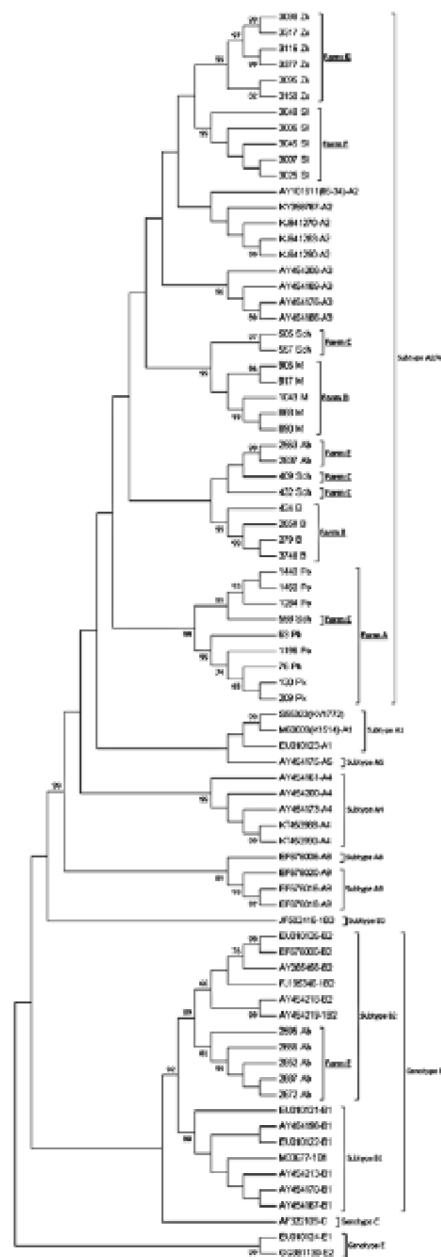


Fig. 1. Phylogenetic relationship of goat and sheep lentivirus nucleotide sequences of isolates from Czech flocks by the Neighbour joining method.

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
EUR18123-A1 TCCGGGACA- .....GAATG TCCTTACGTT GGAATCAAAT ATGGGAGTAG GACAAACAAA TCAGCAGGCA GCCCAGGCTA ATATGGATCA AGCAAGGCAG
KY358787-A2 GCCCGGGCC- .....AGGTG TCCTTACGTT GGAATCAAAT ATGGGAGTAG GACAAACAAA TCATCAGGCA TCACAAGCTA ATATGGATCA AGCAAGGCAG
2512 Abn-A GCCCAGGCC- .....AAATG TCCTTACGTT GGAATCAAAT ATGGGAGTAG GACAAACAAA TCAGCAGGCA TCACAAGCTA ATATGGATCA AGCAAGGCAG
AY454176-A3 GCCCAGGCC- .....AAATG TCCTTACGTT GGAATCAAAT ATGGGAGTAG GACAAACAAA TCAGCAGGCA TCACAAGCTA ATATGGATCA AGCAAGGCAG
EUR18128-B1 ACCACCTCCG GCAGGAGGAG GATTACAGTT GGAATCAAAT ATGGGAGTAG GACAAACAAA TCAGGCAAGCT GCACAAGCTA ACATGGATCA AGCAAGGCAG
2424 Abn-B2 ACCACCTCCG GCAGGAGGAG GATTACAGTT GGAATCAAAT ATGGGAGTAG GACAAACAAA TCAGGCAAGCT GCACAAGCTA ACATGGATCA AGCAAGGCAG
AY454218-B2 ACCACCTCCG GCAGGAGGAG GATTACAGTT GGAATCAAAT ATGGGAGTAG GACAAACAAA TCAGGCAAGCT GCACAAGCTA ACATGGATCA AGCAAGGCAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1305 1315 1325 1335 1345 1355 1365 1375 1385 1395
EUR18123-A1 ATATGTTTGC AATGGGTAAT AACAGCATTG AGATCAGTAG GGCATATGTC GCATAGACCA GGAATCCCTA TGCTAGTCAA GCAGAAATAT AATGGAGGCT
KY358787-A2 ATATGTTTGC AATGGGTAAT ATCAGCATTG AGATCAGTAG GGCATATGTC ACATAGACCA GGAATCCCTA TGCTAGTCAA GCAGAAATAT AATGGAGGCT
2512 Abn-A ATATGTTTGC AATGGGTAAT AACAGCATTG AGATCAGTAG GGCATATGTC ACATAGACCA GGGATCCCTA TGCTAGTCAA GCAGAAATAT AATGGAGGCT
AY454176-A3 ATATGTTTGC AATGGGTAAT AACAGCATTG AGATCAGTAG GGCATATGTC ACATAGACCA GGGATCCCTA TGCTAGTCAA GCAGAAATAT AATGGAGGCT
EUR18128-B1 ATATGTTTGC AATGGGTAAT ATCAGCATTG AGAGCGGTAG GATATATGGC CCATAGACCA GGGATCCCTA TGCTAGTCAA ACAGAAATAT AATGGAGGCT
2424 Abn-B2 ACCTGTTTGC AATGGGTAAT ATCAGCATTG AGAGCGGTAG GGCATATGTC TCATAGACCA GGGATCCCTA TGCTAGTCAA ACAGAAATAT AATGGAGGCT
AY454218-B2 ATCTGTTTGC AATGGGTAAT ATCAGCATTG AGAGCGGTAG GGCATATGTC TCATAGACCA GGAATCCCTA TGCTAGTCAA ACAGAAATAT AATGGAGGCT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1405 1415 1425 1435 1445 1455 1465 1475 1485 1495
EUR18123-A1 ATGAGATTTC CATAGTAGTA CTATTAGTAG CAATTAGATG AGAACCTGTT ACTGAGCCCTA TAAAAGATA TCTAAAGGTG ACTCTGTGCT AGACAAATGC
KY358787-A2 ATGAGATTTC CATAGTAGTA CTATTAGTAG CCATAGATGTC TGAGCCGGTA ACAGAGCCCTA TAAAAGATA CTTGAAAGTG ACTCTGTGCT ATACAAATGC
2512 Abn-A ATGAGATTTC CATAGTAGTA CTATTAGTAG CCATAGATGTC TGAGCCGGTA ACAGAGCCCTA TAAAAGATA TTTGAAAGTG ACTCTGTGCT AGACAAATGC
AY454176-A3 ATGAGATTTC CATAGTAGTA CTATTAGTAG CCATAGATGTC TGAGCCGGTA ACAGAGCCCTA TAAAAGATA TTTGAAAGTG ACTCTGTGCT ATACAAATGC
EUR18128-B1 ATGAGATTTC TGACAGCAAG CTGCTAGTAG CAATAGATGTC AGAACCGATT ACCAGCCCTA TAAAAGATA TCTAAAGGTG ACATTATCTT ATACAAATGC
2424 Abn-B2 ATGAGATTTC TGACAGCAAG CTGCTAGTAG CAATAGATGTC AGAACCGATT ACAGAGCCCTA TAAAAGATA TTTAAATTA ACTCTGTGCT ATACAAATGC
AY454218-B2 ATGAGATTTC TGACAGCAAG CTGCTAGTAG CAATAGATGTC AGAACCGATT ACCAGCCCTA TAAAAGATA TCTAAAGGTG 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 (Čelner 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, Václavěk 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 Andrés 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
- Germain 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
- Ramirez 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,¹ V. ČURN,¹ M. ŠOCH,¹ A. VEJČÍK,¹ K. VERNEROVÁ,¹ B. FARKOVÁ,¹ P. ŠTOIDL,¹ P. BARTÁK,² B. ŠÍMEK,² P. VÁCLAVEK,² H. PLODKOVÁ²

¹Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

²Státní 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.^{1,2}

Kontrolní programy lentivirových infekcí ovcí a koz jsou zpravidla založeny na sérologickém screeningu stád s následným vyřazením séropozitivních zvířat a navazujícím plošným monitoringu. Tento systém byl v minulých letech rozšířen o možnost selekce 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.³

V předchozím článku byly prezentovány výsledky sérologické identifikace infikovaných zvířat jako prvního stupně programu eradikace⁴ a možnosti využití metod molekulární biologie pro včasnou detekci provirové DNA, včetně využití metody LAMP.⁴ 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 člověka⁵ a u ovcí.^{6,7} 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 sekvencování genu *TMEM154* a identifikace konkrétního genotypu je založena na polymorfismu na 35 pozicích 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 35,⁸ zatímco genotyp K35 je charakterizován jako signifikantně méně vnímavý až rezistentní.^{3,6}

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.^{3,7} 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 ampliconů – 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.⁹ 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.

Isolace 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 μl archivované krve 500 μl 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 μl TE pufru. Pro důkladné pročištění získaného peletu byl předchozí krok 3x opakován.

K takto připravenému vzorku bylo napipetováno 100 μl 5% Chelexu 100 (Bio-Rad, w/v) a 1 μl 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 μl . Reakční směs obsahovala 12,5 μl PPP MasterMix Combi (Top-Bio), 9,5 μl sterilní destilované H_2O , 1 μl každého z primerů (5 pmol/ μl) a 1 μl templátové DNA. Pro identifikaci mutace v genu *TMEM154* byly použity primery TMEM154F (5'-TTTGCTGAAGTGCCTTGAA-3') a primer TMEM154R (5'-GGCTGAAGGCATTTCTGTT-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 Primer3¹⁰. 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 μl PCR produktu byly přidány 2 μl 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 χ^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 koz². 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 amplicony sekvenovat. V analyzovaných vzorcích ovcí byly identifikovány všechny tři genotypy K35, E35 a E35K v různém procentuálním zastoupení (tab. 1).

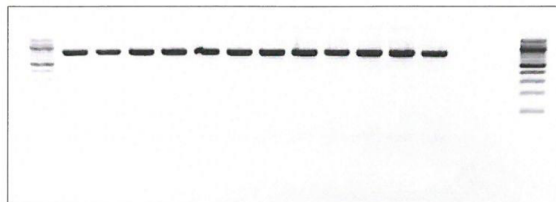
V případech vyšetření koz byl u všech analyzovaných vzorků identifikován pouze genotyp E35.

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*.^{3,7} 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.¹¹

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 infikována. Kromě geneticky podmíněné vnímavosti se v patogenezě infekce SRLV uplatňuje řada dalších faktorů, a to především genotyp viru, stáří zvířat, plemeno, podmínky chovu a další vlivy prostředí.^{1,3}

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.⁷

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.³ V předchozí studii byl zjištěn na území ČR výskyt dvou genotypů SRLV, a sice blíže nedefinované skupiny A2/A3 a genotyp B2.¹² Vyšší podíl pozitivních ovcí s odolnějším genotypem K35 (48 %) oproti 30 % podílu negativních byl zjištěn pouze v jednom chovu plemene žumavské 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., ŠÍMEK, 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 lentiviruses 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 *CCR5* variants with serological maedi-visna status of sheep in German flocks. *Vet Res* 2018;1:36.
- BARTÁK, P., ŠÍMEK, 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,¹ K. VERNEROVÁ,¹ V. ČURNÝ,¹ T. TONKA,¹ B. FARKOVÁ,¹ A. VEJČÍK,¹ P. BARTÁK,²
P. VÁCLAVEK²

¹Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

²Státní veterinární ústav Jihlava

SOUHRN

Stehlíková D., Vernerová K., Čurný V., Tonka T., Farková B., Vejčík A., Barták P., Václavěk 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 specificity 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., Čurný V., Tonka T., Farková B., Vejčík A., Barták P., Václavěk 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.¹

Maedi-visna byla poprvé popsána islandským vědcem Björnem Sigurðssonem roku 1954, přičemž se jednalo o první virus z rodu *Lentivirus*, který byl izolován.² 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.³ 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.⁴ U koz bylo onemocnění poprvé zaznamenáno v Indii, následovala hlášení v islandském 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.⁵

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.⁶ Ve srovnání s tradičními detekčními metodami je specifická 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.⁷ 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.⁸ 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. Těmto kritériím

vyhovuje *Bst* polymeráza izolovaná z bakterie *Bacillus stearothermophilus*, *Bsm* polymeráza izolovaná z bakterie *Bacillus smithii* a *Gsp* polymeráza z *Geobacillus stearothermophilus*.^{9,10} 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 východního 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 dvojitý řetězec 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 disociuje dvojitý řetězec DNA na jednořetězcovou, 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 téže vláknu DNA. Amplifikace a detekce genu může být dokončena v jediném kroku inkubace reakční směsi při konstantní teplotě asi 60–65 °C.^{6,7,11} 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 bázi lze do reakčního mixu přidat amidovou sůl, např. betain.¹²

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.^{13,14}

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 | 2 751 | 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.¹⁵ 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.¹⁶ Další metodou je využití interkalačních barviv, např. SYBR Green, kdy barvivo po navázání na amplifikovanou DNA emituje zelené zbarvení.¹⁷

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

| Primer | Sekvence (5'-3') |
|--------|---|
| F3 | GGAAAAGAGATTATCTGAGCT |
| B3 | TGTTACTCTCCTCAGGAGTT |
| FIP | GCACCAATAACAATTTCCTTCTGTCCAGGCAIGCAAGATAAAAGTTC |
| BIP | TACAIGTTGAGGACCATAAAGAGGTTCTTCACCTTCTGCCATA |
| LF | AAGTGCTCCCTCTGAGTC |

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 ₂ 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.¹³ 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.

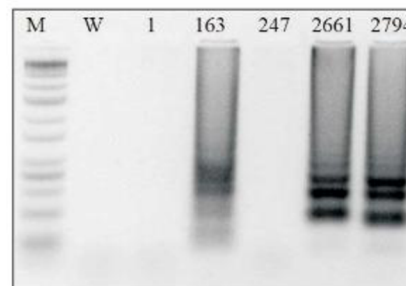
Pro metodu LAMP byly použity primery uvedené v tab. 2. Izotermická reakce v délce 60 minut při 63 °C s následnou závěrečnou denaturací při 90 °C probíhala s využitím LifeECO thermocyklu (Bioer Technology, CHN) a zařízení QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA). Složení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

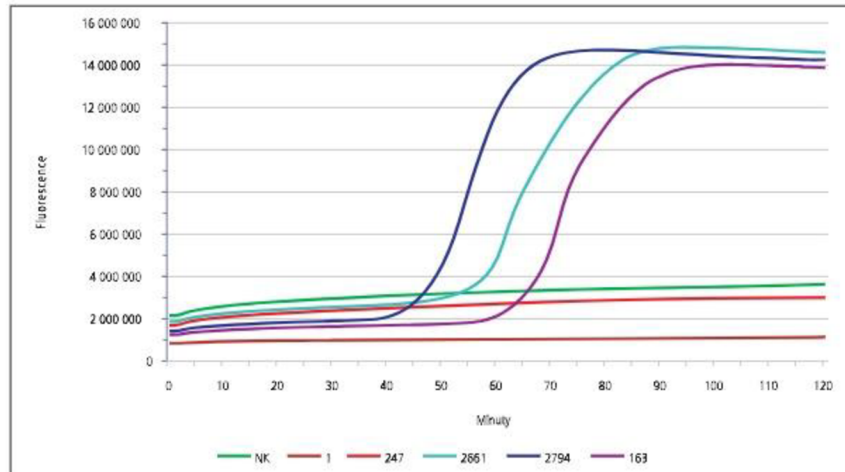
Výsledky

Na obr. 1 jsou uvedeny výsledky po provedení 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 ampliconů, ale amplifikace jako taková, tedy přítomnost ampliconů 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).¹⁸ 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.^{14,19} 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 přihlednutím ke své specifčnosti, 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., MORNEIX, 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-DELFÍN, I., 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. *Veterinární* 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 autorů:

Ing. Dagmar Stehlíková
Zemědělská fakulta
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Branšíšovská 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 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 Václavěk, 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@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. 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:

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

I. Cíl metodiky

Onemocnění maedi-visna ovci (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 povinnosti periodické kontroly nebyla doposud závazně stanovena, nicméně jediným možným postupem se její radikální metoda postupně eliminace

séropozitivních zvířat. Tímto způsobem bylo postupně dosaženo ozdravení prakticky všech chovů zařazených do kontroly užitkovosti. 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 K₃EDTA.
- **Je třeba dodržet maximální hladinu krve označenou rýskou 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 K₃EDTA

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 Mg²⁺), které během extrakce při vysokých teplotách (95 - 100 °C) mohou poškozovat DNA. Blokáce Mg²⁺ 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 µl krve přidáme 500 µl TE pufru
 2. Vzorek zvortexujeme 10 – 15 s a následně odstředujeme při 14 000 rpm 5 minut
 3. Odebereme opatrně supernatant a pelet resuspendujeme opět v 500 µl TE pufru
 4. Pro důkladné přečištění krevních vzorků tento postup opakujeme 3x
- Připravíme 5% ní roztok Chelexu (0,5 g Chelexu v 10 ml dH₂O).
- 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 µl krve přidáme 100 µl roztoku Chelexu a 1 µl 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 zvortexuje 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 vyzolováno 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 vyzoluje DNA v objemu 100 µl.

Izolace Chelexem

Chemikálie a spotřební materiál:

- 5% Chelex ve sterilní dH₂O
- sterilní dH₂O
- 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 virem. 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 µl. Reakční směs se připravuje vždy nová. Roztoky a reagenty jsou uchovávány v mrazáku při -20° 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 cyklieru. 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 reagenty po rozmražení dobře promíchat a krátce stočit při 10 000 rpm/10s.
3. Reagenty po krátké centrifugaci vytemperovat v chladicím boxu přibližně na 0,5 až 4°C.
4. Do PCR zkumavky napipetovat reagenty 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

| Reagenty | Objem (μl) | Výsledná konc. |
|----------------------|------------|----------------|
| PCR H ₂ 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_i, 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 ampikonu 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 sekvenční 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 ampliconů, 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 μ l PCR reakce se přidají 2 μ l ExoSapu. Např. k 25 μ l reakce přidáme 10 μ 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 μ l vzorku přidáme 5 μ l primerů, forward nebo reverse, podle směru, který chceme sekvenovat. Takto upravený vzorek je připraven k sekvenování.

Sekvence přečištěného produktu probíhá v externí laboratoři (SeqMe). Do laboratoře se posílá vzorek 10 μ l PCR reakce s 2 μ l ExoSapu a 5 μ l primeru (5 μ 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. Sekvence 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 ampliconů/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 H20 (Top Bio)
- Mastermix (Top Bio)
- primer TMEM154F, 100 μ M (KRD)
- primer TMEM154R, 100 μ M (KRD)
- Vyizolovaná DNA
- 1,5 ml mikrocentrifugční zkumavky (Eppendorf)
- PCR zkumavky, stripy 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 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 |

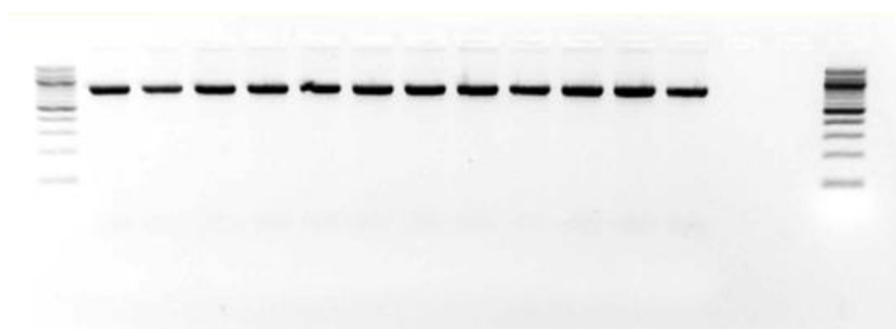
Poznámka: skladování výše uvedených roztoků je při pokojové teplotě DNA Marker 100-1500 bp (BioLabs) skladovat při -15 až -20°C

Přístroje:

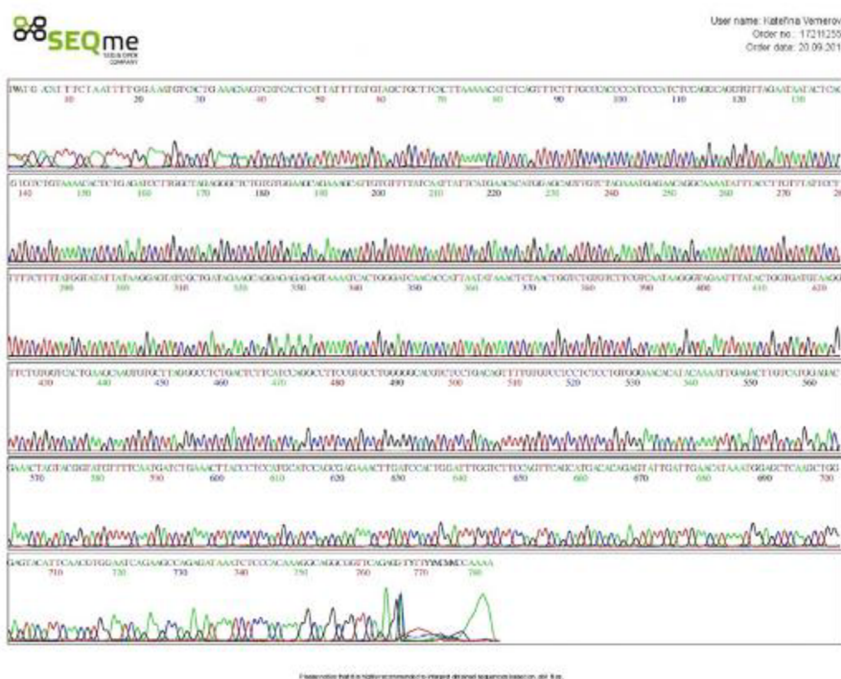
- rychlováhy Scaltec SBC 41 (Sartorius)
- třepačky MS-1 (IKA)
- třepačka MS-2 (IKA)
- chlazená centrifuga 1-14K(Sigma)
- centrifuga 5453 (Eppendorf)
- centrifuga 5418 (Eppendorf)
- chladicí box CH-100 (Biosan)
- vyhřevná třepačka Komfort (Eppendorf)
- biohazard boxy BIO 2 (Nuair)
- automat pro extrakci 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 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*

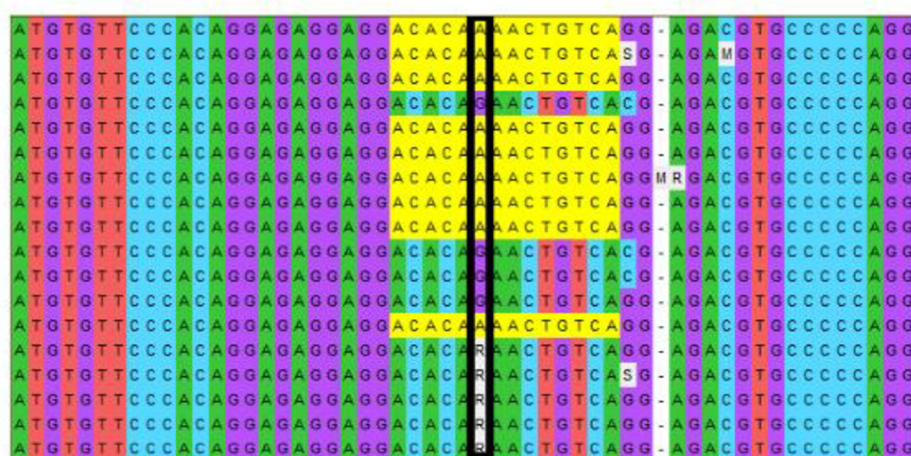
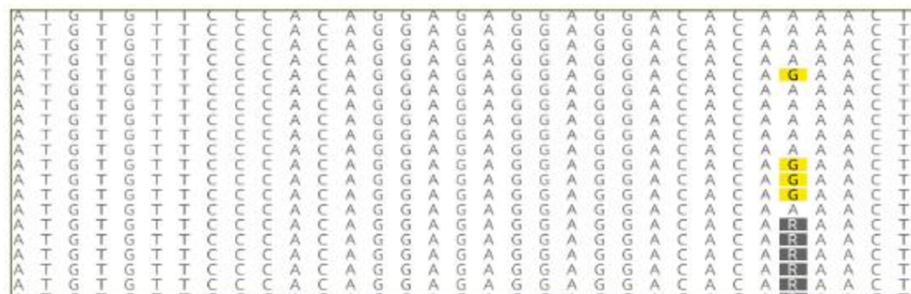
Amplifikační produkt má délku 828 bp u všech třech genotypů. Pro přesnou identifikaci jednotlivých genotypů je nutné osekvenovat naamplifikované produkty.



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 sekvenační 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 onemocněním 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. *Bardoni 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. Tierarztl. 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., Eitanany 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., Galaria 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., MÓNLEÓN, 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., BOTTCHEr, 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., Václavěk 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.



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 Farková
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@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. 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

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 encefalitu 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 užítkovosti (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 nákazy 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 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.

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. 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 K₃EDTA. Ihned po odběru je krev ve zkumavce nutné důkladně promíchat s antikoagulantem a uchovávat při +4°C. Ze vzorků krve je odstředěním separována plasma, buffy-coat a erytrocyty. Krevní plasma 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 β -aktin. K detekci genu pro β -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 ovcí 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 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

Smlouva o uplatnění ověřené technologie
zpracované v rámci řešení projektu 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"
uzavřená podle ustanovení § 11 zákona č. 130/2002 Sb., o podpoře výzkumu,
experimentálního vývoje a inovací z veřejných prostředků

Smluvní strany:

1. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
se sídlem Branišovská 1645/31a, 370 05 České Budějovice
IČ/RČ: 60076658
DIČ: CZ 60076658
zastoupená doc. Tomášem Machulou, Ph.D., Th.D., rektorem JU
(dále jen „poskytovatel technologie“)
2. Svaz chovatelů ovcí a koz z.s.
se sídlem Ptašínského 308/5, 602 00 Brno
IČ/RČ: 63109859
DIČ: CZ 63109859
zastoupený Ing. Vitem Marešem, předsedou představenstva
(dále jen „uživatel technologie“)

Článek 1 Předmět smlouvy

- 1.1 Předmětem této smlouvy je uplatnění ověřené technologie s názvem „Systém prevence a profylaxe lentivirových infekcí malých přežvýkavců“ zpracované na pracovišti poskytovatele v rámci řešení projektu MZe 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" (dále jen „technologie“).
- 1.2 Celé znění technologie je nedílnou přílohou této smlouvy (viz. Příloha č.1)

Článek 2 Autorství technologie a cíl uplatnění technologie

- 2.1 Autory jsou: 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, Ing. Dagmar Stehliková, MVDr. Pavel Barták, Ph.D., Mgr. Bronislav Šimek, MVDr. Petr Václavek, Ph.D.). Zástupcem autorského týmu je prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr.h.c.
- 2.2 Cílem uplatnění ověřené technologie je poskytnutí systému 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

Článek 3

Úprava vlastnických a uživatelských práv k technologii


- 3.1 Všechna práva k technologii patří autorům technologie.
- 3.2 Uživatel technologie je oprávněn užívat uvedenou technologii po dobu účinnosti této smlouvy.
- 3.3 Autor/zástupce autorského kolektivu ověřené technologie prohlašuje, že zpracovaná ověřená technologie nezasahuje do práv jiných osob z průmyslového nebo jiného duševního vlastnictví.
- 3.4 Autor/zástupce autorského kolektivu ověřené technologie prohlašuje, že zpracovaná ověřená technologie, vyvinutá v rámci řešení projektu, bude v rámci příslušných publikací, případně plánu uplatnění výsledků, přístupná všem potenciálním uživatelům.

Článek 4

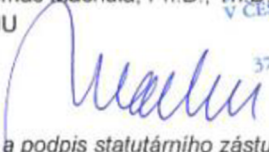

Závěrečná ustanovení

- 4.1 Tato smlouva se uzavírá na dobu neurčitou s tříměsíční výpovědní lhůtou. Výpovědní lhůta začíná běžet od prvního dne měsíce následujícího po doručení výpovědi druhé smluvní straně.
- 4.2 Jakékoliv změny a doplnění této smlouvy mohou být provedeny pouze po sobě číselnými dodatky k této smlouvě, podepsanými zmocněnými zástupci smluvních stran.
- 4.3 Závazky, práva a povinnosti vyplývající z této smlouvy přecházejí na eventuální právní nástupce smluvních stran.
- 4.4 Tato smlouva nabývá platnosti a účinnosti dnem podpisu obou smluvních stran.
- 4.5 Tato smlouva se vyhotovuje ve třech stejnopisech, z nichž každý má platnost originálu. Každá smluvní strana obdrží jeden stejnopis. Jeden stejnopis obdrží poskytovatel podpory na řešení projektu, v jehož rámci byla ověřená technologie zpracována.
- 4.6 Podpis ověřené technologie je nedílnou součástí této smlouvy. Autor/zástupce autorského týmu ověřené technologie předá uživateli při podpisu smlouvy popis této ověřené technologie v tištěné a elektronické podobě a ten ji tímto přebírá. V případě, že ověřená technologie bude následně vydána tiskem, předá poskytovatel bezprostředně po vytištění originální výtisk s označením ISBN.
- 4.7 Ověřená technologie je poskytována příjemci ověřené technologie bezplatně.
- 4.8 Poskytovatel ověřené technologie vloží uplatněnou ověřenou technologii do systému evidence RIV. Tato smlouva bude uvedena ve zprávě o řešení výzkumného projektu za rok 2018.
- 4.9 Poskytovatel nenesе žádné právní důsledky za komerční využití ověřené technologie.

Podpisy smluvních stran

| | |
|---|--|
| Za autora technologie (za autorský tým) | prof Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr.h.c |
| V Českých Budějovicích dne: 14.12.2018 | (jméno/podpis)  |

Podpisy smluvních stran

| | |
|---|--|
| Za poskytovatele technologie | doc. Tomáš Machula, Ph.D., Th.D. rektor JU |
| V Českých Budějovicích dne: 19-12-2018 |  (jméno a podpis statutárního zástupce) |
| Za uživatele technologie | Ing. Vít Mareš předseda představenstva SCHOK |
| V Brně dne: 6.12.2018 |  (jméno a podpis statutárního zástupce) |

ČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
REKTORÁT
Branšovská 31a
370 05 České Budějovice

OPONENTNÍ POSUDEK

Formulář pro posudek pracovníka příslušného odborného orgánu státní správy
Metodika

Název metodiky: Ověřená technologie: Systém prevence a profylaxe lentivirových infekcí malých přežvýkavců

Autor/autoři: Šach M., Čum. V., Vajbík, A., Tosiš, T., Věrnáková, K., Farková, B., Šimek, B., Václavík, P., Podková, H., Barták, P.

Předkládající organizace: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Státní veterinární ústav Jihlava

Projekt č.: QJ 1610086 "Program zdravotní kontroly lentivirových infekcí malých přežvýkavců s využitím nových metod časně laboratorní diagnostiky a markerů genotypů odolných rezistence k infekci jako selekčního kritéria"

1) Splňuje metodika požadavky na strukturu metodiky?

ANO / NE

I) Cíl metodiky

Komentář:

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

Komentář:

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.

III) Vyjádření k "novosti postupů"

Komentář:

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.

IV. Popis uplatnění metodiky (pro koho je určena, jakým způsobem bude uplatněna)

Komentář :

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 (odhad nákladů v tis. Kč a ekonomického přínosu pro uživatele v tis. Kč)

Komentář :

Ekonomické přínosy předkládané metodiky jsou rozšíření spektra technik a metodických postupů používaných v diagnostických laboratorích, rozšíření portfolia technik a služeb prováděných v laboratorích, metodická a vzdělávací funkce. Další ekonomický přínos spočívá v racionalizaci komplexní diagnostiky s využitím novelizovaných metod, které mohou přispět ke zvýšení produkčních a reprodukčních ukazatelů a rentability chovu ovcí a koz. Je uvedena kalkulace nákladů spojených se zavedením metodiky a jednotková cena za analýzu ve výši nákladů za chemikálie. Přínosem pro chovatele je možnost vývozu plemených zvířat (jetnic a beranů) v odhadovaném počtu oca 1000 ks za rok, tzn. min. 5 000 za kalkulované období.

POSUDEK ZPRACOVAL/A: MVDr. Marie Bleierová

Pracoviště: Ústřední veterinární správa Státní veterinární správy

Ulice: Slezská 100/7

PSČ, Obec: 120 56 Praha 2

Telefon: +420 607 060 348 E-mail: m.bleierova@svscr.cz

Prohlašuji, že nejsem v zaměstnaneckém či obdobném vztahu k subjektům, které předložily metodiku, nemám osobní ani obdobný vztah k žádnému z předkladatelů a není mi známa žádná skutečnost, která by mohla ovlivnit moji nepodjatost.

21. 12. 2018

Datum

MVDr. Zbyněk Semerád

Jméno vedoucího pracovníka

21. 12. 2018

Datum

Bleierová

Podpis zpracovatele posudku



Podpis vedoucího pracovníka a
razítko organizace státní správy

OPONENTNÍ POSUDEK

Formulář pro posudek oponenta z oboru

Technologie

Název technologie: **Systém prevence a profylaxe lentivirových infekcí malých přežvýkavců**

Autor/autofi: **M. Šoch a kol.**

Předkládající organizace: **Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

Projekt č.: **QJ 1610096**

1) Splňuje metodika požadavky na strukturu metodiky?

ANO / NE

I) Cíl metodiky

Komentář:

Cílem ověřené technologie "Systém prevence a profylaxe lentivirových infekcí malých přežvýkavců" je návrh modelového postupu, založeného na přesné a včasné detekci SRLV a molekulární detekci specifického genotypu zvířete.

II) Vlastní popis metodiky

Komentář:

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.

III) Vyjádření k "novosti postupů"

Komentář:

Navrhovaný postup umožňuje detekci markerů pro asistovanou selekci odolnějších jedinců na základě genetické odolnosti k infekci a současně eliminaci infikovaných jedinců z chovu.

IV. Popis uplatnění metodiky (pro koho je určena, jakým způsobem bude uplatněna)

Komentář :

Uživateli ověřené technologie budou vědeckovýzkumná a veterinární pracoviště, která v rámci své činnosti mohou využívat předností optimalizovaných postupů detekce genotypů.

V) Ekonomické aspekty (odhad nákladů v tis. Kč a ekonomického přínosu pro uživatele v tis. Kč)

Komentář :

Předpokládaný ekonomický přínos ověřené technologie je vyjádřen v samostatné "Metodice genotypizace ovcí a koz - detekce markerů geneticky podmíněné rezistence k SRLV" ve výši 15 000 000 Kč.

1/2

VI) Seznam použité literatury

Komentář :

Seznam použité literatury je uveden v samostatné "Metodice genotypizace ovcí a koz - detekci markerů geneticky podmíněné rezistence k SRLV". Obsahuje celkem 40 zahraničních a 5 tuzemských vědeckých literárních pramenů.



VI) Seznam publikací, které předcházely metodice/Výstupy z originální práce

Komentář :

Barták P., Václavěk 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.



2) Dedikace

= uvedení odkazu na příslušný projekt VaV/podporu na rozvoj výzkumné organizace



3) Uzavřená smlouva o využití výsledku (metodiky) s konkrétním uživatelem

Komentář:

Ověřená technologie byla vypracována jako součást výzkumného projektu MZe NAZV QJ 1610096. Její využití bude uplatněno prostřednictvím Svazu chovatelů ovcí a koz České republiky, se kterým byla uzavřena smlouva o uplatnění související samostatně metodiky.



4) SOUHRNNÉ VYJÁDRĚNÍ

(Odpovídá požadavkům na metodiku?)

Předkládaný "Systém prevence a profylaxe lentivirových infekcí malých přežvýkavců" odpovídá požadavkům na ověřenou technologii. Doporučuji její přijetí jako výstupu dosaženého v rámci řešení 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".



POSUDEK ZPRACOVAL/A: Titul, jméno, příjmení, titul

Pracoviště: doc.MVDr. Pavel Novák, CSc.

Ulice: Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.

PSČ, Obec: 104 00 Praha Uhřetěves

Telefon: +420 603 783 765 E-mail: novak.pavel@email.cz

Prohlašuji, že nejsem v zaměstnaneckém či obdobném vztahu k subjektům, které předložily metodiku, nemám osobní ani obdobný vztah k žádnému z předkladatelů a není mi známa žádná skutečnost, která by mohla ovlivnit moji nepodjatost.

17.12.2018.....
Datum


.....
Podpis zpracovatele posudku



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:

| | |
|--|-----------|
| I. Cíl metodiky | 2 |
| II. Vlastní popis metodiky | 4 |
| 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 |
| III. Srovnání novosti postupů | 31 |
| IV. Popis uplatnění metodiky | 31 |
| VI. Seznam publikací, které předcházely metodice | 36 |

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 nakažovými 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 TMEM154²⁶. U koz je třeba tuto oblast prozkoumat, k čemuž snad dopomůže použití nového 52k SNP mikročipu²⁷.

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 užítkovosti (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 vyjmuto. 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 zdokonalovat¹¹. 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 polymorfismy v genu TMEM15²⁶. 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 koz²⁷.

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 K₃EDTA. Je třeba dodržet maximální hladinu krve označenou ryskou na zkumavce. Ihned po odběru je krev ve zkumavce nutně důkladně promíchat s antikoagulantem, uchovávat při +4°C a zpracovat bezprostředně po doručení do laboratoře.

Ze vzorků krve s K₃EDTA 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 K₃EDTA

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.**⁵

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.**⁶

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 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 blokové testy jsou založeny na monoklonálních protilátkách proti definovanému 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.^{7,18} Používány jsou rovněž syntetické peptidy odvozené od p25 nebo TM proteinu.⁶

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

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.^{6,20} **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 titer 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.^{6,22} 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.

Tabuka č. 1. Přehled dostupné komerční sérologické 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 | $S/P = (OD \text{ vzorek} - OD \text{ NK}) / (OD \text{ PK} - OD \text{ NK})$ | 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 dvoupekový verifikační | $S/P \% = 100 \times ((OD \text{ vzorek}_{\text{p28}} - OD \text{ vzorek}_{\text{p24}}) / (OD \text{ PK}_{\text{p28}} - OD \text{ PK}_{\text{p24}}))$ | 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 | $S/P \% = 100\% \times ((OD \text{ vzorek} - OD \text{ NK}) / (OD \text{ PK} - OD \text{ NK}))$ | cut-off (ovice) = 50-60% cut-off (kozy) = 30-40% | Celý virus - inaktivovaný - MVV (kmen OUV). | 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 tlavní kapsidový protein p25 kapsidy MVV. | 99,4% (97,8%) | 99,3% (98,2%) | 6, 7, 12, 17, 24 |
| ID Screen® MVV / CAEV Indirect | IDvet 310 rue Louis Pasteur 34790 GRABELS, Francie | nepřímý ELISA test | $S/P \% = 100 \times (OD \text{ vzorek} - OD \text{ NK}) / (OD \text{ PK} - OD \text{ NK})$ | 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 | $\% \text{ Inh} = 100 \times (1 - OD \text{ vzorku} - OD \text{ NK})$ | cut-off = 35% | Povrchový gp135 env glykoprotein viru CAEV+63 navázaný na monoklonální protilátku F7-299 (bez využití gag proteinů). | 99,50% | 100% | 6, 15, 16 |
| LSIVet™ Ruminant MAEDI-VISNA/CAEV Serum ELISA Kit | LSI - Laboratoire Service International 6 Allée des Ecurieuls 69390 Lissieu, Francie | blokovácí ELISA | $\% \text{ Inh} = (OD \text{ NC} - OD \text{ Sample}) \times 100 / OD \text{ NC}$ | cut-off = 35% | Povrchový protein gp135 viru MVV/CAEV navázaný na monoklonální protilátku. | 100,00% | 100% | 25 |
| Eradikit™ SRLV Genotyping kit | InoDiagnostic s.r.l. Largo P. Bressani, 2, 10095, Grugliasco (TO) Itálie | nepřímý ELISA test | pozitivní vz. = (OD _{test})>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 | imunodifuzní 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 potvrzení výsledku získaného ELISA testem.^{6,7}

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).²¹ 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.⁷ V posledních letech se v některých evropských zemích objevily falešně pozitivní reakce způsobené nedostatečně purifikovanými vakcínami proti viru katarální horečky ovcí.¹³

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 patogenezi 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 dvouřetězcovou 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 návržení specifických primerů pro daný úsek DNA sekvence. Vznik nespecifických produktů amplifikace lze odhalit pomocí analýzy křivky tání.

Souhrn způsobů, jak maximalizovat citlivost a specifčnost 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 vyskytujících 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 K₃EDTA, je testována po separaci plasmy a krevních elementů na průkaz protilátek i provirové DNA.

Příprava a zpracování buffy coatu

Plná krev s K₃EDTA 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: NH₄Cl, NaHCO₃, 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 β -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 β -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 | CATAGGRGGHGCGGACGGCASCA |
| GAG F2 | CAAACWGTRGCAATGCAGCATGG |
| POL R2 | GCGGACGGCASCACACG |

Sekvence primerů a sondy používaných detekci genu pro β -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 μ 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. Rostoky 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 ₂ 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 ₂ 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 μ 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 μ l)

| Reagentie | Koncentrace | Objem (μ l) |
|----------------------|-------------|------------------|
| ssprimer ACT1005F | 100 μ M | 5 |
| ssprimer ACT1135R | 100 μ M | 5 |
| ACT1081 proba HEX | 100 μ M | 2,5 |
| PCR H ₂ O | | 187,5 μ l |

Složení reakční směsi pro real-time PCR

| Reagenci | Objem (μl) |
|------------------------------------|------------|
| PCR H ₂ 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 |

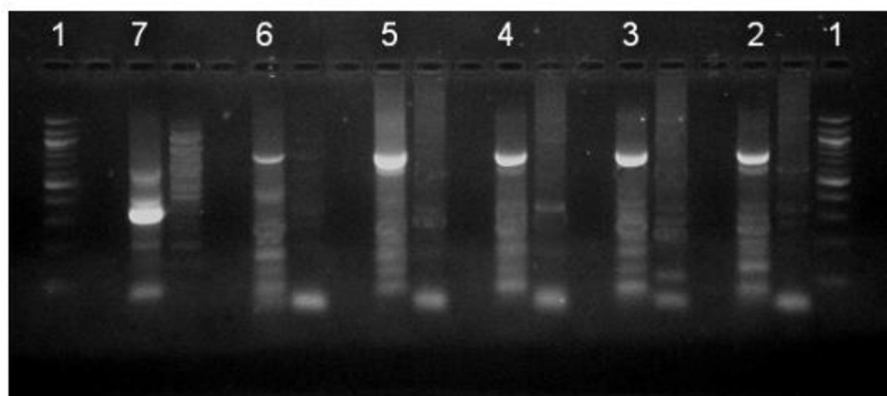
ELFO

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

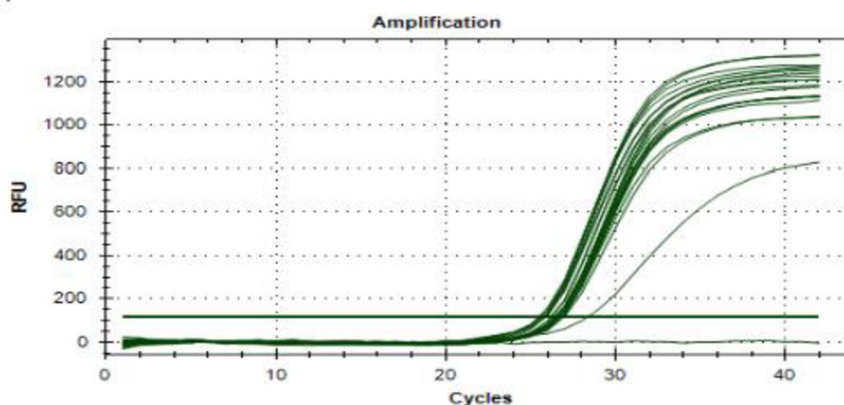
Amplifikační produkt prvního kroku PCR má délku 0,8 kb. Výsledný produkt druhého kroku PCR (nPCR) je o délce 1,3 kb. V případě pozitivity negativní kontroly (PCR H₂O) a negativity pozitivních kontrol je nutné analýzu opakovat.



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 β -aktin.

Sekvenační analýza DNA

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

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 zachycována 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.

Purifikace nPCR produktu

Purifikace PCR produktu před provedením sekvenační 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 H₂O. 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: 5µl PCR produktu (20-80ng/µl) a 5µl primeru (5µM) 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 TAGC TATA TA TGCTACTACC TGGACAAGTA AAGATATACT
SRLV (NCBI) GAAAGGCAGC TAGC TATA TA TGCTACTACC TGGACAAGTA AAGATATACT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          60          70          80          90         100
Vzorek   AGA GTATTG GCCATGATGC C GGGAAATAG GCTCAAAA GATTAATC
SRLV (NCBI) AGA GTATTG GCCATGATGC C GGGAAATAG GCTCAAAA GATTAATC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          110         120         130         140         150
Vzorek   AAGG AAAATT AAATGAGAA GCAGAAAGGT GGAGAAGAAA CAATCCACCA
SRLV (NCBI) AAGG AAAATT AAATGAGAA GCAGAAAGGT GGAGAAGAAA CAATCCACCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          160         170         180         190         200
Vzorek   CCTCC GCAG GAGGAGGCT AAC GTGGAT CAAATTATGG GAGTAGGACA
SRLV (NCBI) CCTCC GCAG GAGGAGGCT AAC GTGGAT CAAATTATGG GAGTAGGACA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          210         220         230         240         250
Vzorek   AACAAATCA GCAGCTGC C AAGCTAACAT GGA CAAGCA AGACAAAT
SRLV (NCBI) AACAAATCA GCAGCTGC C AAGCTAACAT GGA CAAGCA AGACAAAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          260         270         280         290         300
Vzorek   GCTTGCAATG GGTAAATATCA GCATTAAGAG CTGT AGGCA TATGGCTCAT
SRLV (NCBI) GCTTGCAATG GGTAAATATCA GCATTAAGAG CTGT AGGCA TATGGCTCAT

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

```

```

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

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                360          370          380          390          400
Vzorek          AGATTGCA GCAAGCTGC TAGAGCAAT AGATGCAGAA CCAGTACAC
SRLV (NCBI)     AGATTGCA GCAAGCTGC TAGAGCAAT AGATGCAGAA CCAGTACAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                410          420          430          440          450
Vzorek          AACCIATAA GGAATATTTA AATTAACTC TGCTATATAC AAATGCATCC
SRLV (NCBI)     AACCIATAA GGAATATTTA AATTAACTC TGCTATATAC AAATGCATCC

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

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

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                560          570          580          590          600
Vzorek          GATTTAAAAT GCAATTGTA GCACAGGCT TAAGGCCGA AAGAAACAA
SRLV (NCBI)     GATTTAAAAT GCAATTGTA GCACAGGCT TAAGGCCGA AAGAAACAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                610          620          630          640          650
Vzorek          GGAAAGGTC CCGACAAAAG ATGCTAAAC TGTGGAAAAG CAGGACAAG
SRLV (NCBI)     GGAAAGGTC CCGACAAAAG ATGCTAAAC TGTGGAAAAG CAGGACAAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                660          670          680          690          700
Vzorek          GGCAAGCAG TGAGACAAG GGATATATG CCAAACTGT GGAAGAGAG
SRLV (NCBI)     GGCAAGCAG TGAGACAAG GGATATATG CCAAACTGT GGAAGAGAG

```

Chemikálie a spotřební materiál

Zpracování buffy coatu

Příprava roztoku pro lýzi erytrocytů (RLE):

NH₄Cl 16,6 g/l(Sigma)
 NaHCO₃ 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)

Skldování při 2 až 8 °C

Isolační 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 eluče pročištěné NK skladování při pokojové teplotě |

PCR

PCR H₂O (Top-Bio)
10 x PCR reakční pufr s MgCl₂ (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 H₂O (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 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 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 reagensů 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_3EDTA , 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 specifity 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 | GAGGAATAATCCACCCCCAGCTGCCTGATTTGTTTGTCCG |
| LF | CCTTGATTAACCTTTTTGTGCC |
| LB | GGCGGCTTGACAGTGATCA |

Provedení LAMP analýzy

Optimalizace všech primerů probíhala v gradientovém ředění koncentrací MgSO₄ 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 MgSO₄, 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 H₂O. 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 v rozkú 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. BOSHOF, 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. Tierarztl. 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.

7 Závěr

Pro včasnou, rychlou a přesnou detekci onemocnění SRLV u ovcí a koz se použité postupy prokázaly jako vhodný nástroj pro včasnou diagnostiku a prevalenci onemocnění ve stádu. V některých analyzovaných chovech se ukázala vysoká prevalence onemocnění s vysokým procentem séropozitivních zvířat. Molekulární analýza polymorfismu v kandidátním genu *TMEM154* prokázala výskyt všech tří genotypů, vazba na příslušný genotyp potvrzující vyšší rezistenci nebo náchylnost k onemocnění se ale neprokázala s očekávanou přesností pravděpodobně z důvodu dalších mutací viru a překonání dříve publikované vazby genotypu K35 s rezistencí k SRLV. Nicméně v této skupině genotypů se genotyp K35 jeví jako potenciální marker, jelikož v analyzované skupině se projevuje trend vyšší odolnosti proti onemocněním způsobeným SRLV u jedinců s tímto polymorfismem.

Podařilo se tedy identifikovat všechny tři známé polymorfismy vztahující se k rezistenci a odolnosti k lentivirovým infekcím. Práce dává představu o možném rozložení genotypů u sérologicky pozitivních zvířat.

Dle dřívějších výzkumů je rezistence nebo naopak vnímavost k onemocnění spojena s polymorfismem na 35. pozici genu *TMEM154*.

Výsledky potvrzují větší výskyt rizikových genotypů E35 a E35K u sérologicky pozitivních zvířat. Naopak genotyp K35 (dle dřívějších výzkumů související s odolností) se u pozitivních zvířat vyskytoval nejméně. Ale jeho větší podíl u pozitivních zvířat ukazuje na možnou mutaci viru a adaptaci na napadení zvířat s genotypem, který byl považován za rezistentní.

U analyzovaných vzorků koz se vyskytl pouze genotyp E35, takže zde pravděpodobně nelze předpokládat možnost polymorfismu a nalezení markeru pro rezistenci.

Program prevence a profylaxe onemocnění dle navržených metod sérologické a molekulární analýzy lze efektivně aplikovat pro ozdravení stád a pomáhá zvýšit celkové povědomí o prevalenci onemocnění způsobených SRLV v českých chovech. Tento program je založen na vyšetřování symptomatických zvířat, identifikaci nemocných zvířat na základě sérologické nebo sérologické a molekulární analýzy a v případě potvrzení výskytu infekce tyto jedince vyřadit z chovu bez ohledu na jejich genotyp (v případě genových rezerv do míry neohrožující genetickou základnu chovu). Dále pak provést molekulární analýzu chovných jedinců a do chovu zařazovat jedince

s potenciálně odolnějším genotypem. Při obchodu se zvířaty dbát na důslednou kontrolu zdravotního stavu a využití sérologické a molekulární analýzy pro prevenci výskytu infikovaných zvířat a pro výběr jedinců s potenciálně odolnějším genotypem. Tento program by měl pomoci ke snížení výskytu onemocnění způsobených lentiviry u malých přežvýkavců a snižování počtu stád s infekcí a onemocněním MV/CAE. Tento systém pomáhá dále zamezit introdukci viru a onemocnění infikovanými jedinci ze zahraničí při obchodování se zvířaty. Při genetické charakteristice lentivirů malých přežvýkavců v České republice byly detekovány kmeny A a B. Kmen B byl detekován pouze v jednom chovu a do České republiky se pravděpodobně dostal nákupem plemenných zvířat ze zahraničí. Důležité je samozřejmě dbát i na biosekuritu a správnou chovatelskou praxi jako nástroj prevence zavlečení onemocnění do chovu.

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 použití sérologických a molekulárních metod se jeví jako možné východisko pro řešení současné nálezové situace a vedoucí k postupnému ozdravování chovů v České republice.

8 Seznam použité literatury

- Aiuti, A. et al. (1997). The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J. Exp. Med.*, 185:111–120.
- Abelson, M. a Schoborg, R. (2003). Characterization of the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) rev N-terminal elements required for efficient interaction with the RRE. *Virus Res.*, 92:23–35.
- Akashi, H. et al. (2016). Serological survey of caprine arthritis-encephalitis virus infection in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(3):447–450.
- Aldovini A. a Young, R. A. (1990). Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J Virol*, 64:1920–1926.
- Andrésdóttir, V. (2018). Maedi-visna virus as a model for HIV. *Icelandic Agricultural Sciences*, 31(1):23–47.
- Angelopoulou, K. et al. (2006). A novel deletion in the LTR region of a Greek small ruminant lentivirus may be associated with low pathogenicity. *Virus Res.*, 118:174–184.
- Angelopoulou, K. et al. (2008). A deletion in the R region of long terminal repeats in small ruminant lentiviruses is associated with decreased pathology in the lung. *Vet. J.*, 175:346–355.
- Arellano, E. et al. (2010). Drastic decrease of transcription activity due to hypermutated long terminal repeat (LTR) region in different HIV-1 subtypes and recombinants. *Antivir. Res.*, 88:152–159.
- Arnarson H. et al. (2017). Maedi-visna virus persistence: Antigenic variation and latency. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 55:6–12.
- Barre-Sinoussi, F. et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220:868–871.

- Barták, P. et al. (2018). Genetic characterisation of small ruminant lentiviruses in sheep and goats from the Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno*, 87(1):19–26.
- Bennett, J. E. et al. (2020). Human Immunodeficiency Viruses. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 9th Edition. Philadelphia: Elsevier. ISBN 9780323482554.
- Bhatia, S. et al. (2013). Bovine immunodeficiency virus: a lentiviral infection. *Indian Journal of Virology*, 24(3):332–341. DOI: 10.1007/s13337-013-0165-9. ISSN 0970-2822.
- Blacklaws, BA. (2012). Small ruminant lentiviruses: immunopathogenesis of Visna-Maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 35(3):259–269.
- Bleul, C. C. et al. (1996). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*, 382:829–833.
- Bleul, C. C. et al. (1996). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J. Exp. Med.*, 184:1101–1109.
- Blomer, U. et al. (1997). Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol*, 71:6641–6649.
- Buchschacher, G. L. a Wong-Staal, F. (2020). Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood*, 95(8):2499–2504.
- Ciupe, S. M. a Schwartz, E. J. (2013). Understanding virus–host dynamics following EIAV infection in SCID horses. *Journal of Theoretical Biolog*, 343:1–8.
- Clapham, P. R. et al. (2002). Cell surface receptors, virus entry and tropism of primatelentiviruses. *Journal of General Virology*, 83:1809–1829. DOI: 10.1099/vir.0.18313-0.
- Crilly, J. P. et al. (2015). Diagnosing limb paresis and paralysis in sheep. *In practice*, 37:490. DOI:10.1136/inp.h5547.
- Cupp, E. W. a Kemen, MJ. (1980). The role of stable flies and mosquitoes in the transmission of equine infectious anemia virus, *Proc. Annu. Meet. US Anim. Health Assoc.*, 84:362–367.

- De Boer, G. F. et al. (1979). Studies in epidemiology of maedi/visna in sheep. *Research in Veterinary Science*, 26:202–208.
- De Pablo-Maiso, L. et al. (2018). Prospects in Innate Immune Responses as Potential Control Strategies against Non-Primate Lentiviruses. *Viruses*, 10(8). DOI: 10.3390/v10080435. ISSN 1999-4915.
- Deshiera, A. et al. (2019). Molecular characterization of Equine Infectious Anemia Viruses using targeted sequence enrichment and next generation sequencing. *Virology*, 537:121–129.
- Durand, S. a Cimarelli, A. (2011). The Inside Out of Lentiviral Vectors. *Viruses*, 3(2):132-159. DOI: 10.3390/v3020132. ISSN 1999–4915.
- Elliot, J. a Mason, R. W. (1995). Results of serological surveys of the prevalence of caprine retrovirus in Tasmania. In: Outeridge, P. M. (Eds.). *Australian Advances in Veterinary Science 1985*. Australian Veterinary Association, Artarmon, NSW, Australia, pp. 58–59.
- EMBL-EBI. (2019). *Taxonomy – Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV)*. UniProt Consortium.
- Farkašová, H. (2017). *Host-virus interactions of mammalian endogenous retroviruses*. PhD thesis, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta. 10.13140/RG.2.2.25019.82720.
- Feng, Y. et al. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G-protein-coupled receptor. *Science*, 272:872–877.
- Foil, L. D. et al. (1993). Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer flies (*Chrysops flavidus*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *Am. J. Vet. Res.*, 44:55–156.
- Galvani, A. P. a Novembre, J. (2005). The evolutionary history of the CCR5-Δ32 HIV-resistance mutation. *Microbes and Infection*, 7(2):302–309.
- Gendelman H. E. et al. (1986). Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *Journal of Virology*, 58(1):67–74.

- Germain, K. a Valas, S. (2006). Distribution and heterogeneity of small ruminant lentivirus envelope subtypes in naturally infected French sheep. *Virus Res.*, 120(1–2):156–162.
- Gifford, R. J. et al. (2008). A transitional endogenous lentivirus from the genome of a basal primate and implications for lentivirus evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51):20362–20367.
- Gilbert, J. R. et al. (2003). HIV-2 and SIV Vector Systems. *Lentiviral Vector Systems for Gene Transfer*. Ed. Gary L. Buchschacher. Georgetown.
- Glaria et al. (2012). Visna/Maedi virus genetic characterization and serological diagnosis of infection in sheep from a neurological outbreak. *Veterinary Microbiology*, 155(2–4):137-146.
- Gomez-Lucia, E. (2021). Animal Lentiviruses (Retroviridae). In: Bamford, D. a Zuckerman M.. *Encyclopedia of Virology*. 4th Edition. Academic Press, pp. 58. ISBN 9780128145166.
- Hamza, L. A., et al. (2017). Serological investigation of Maedi-Visna in sheep with chronic respiratory disease in Erbil, Iraq. *Atatürk Üniv Vet Bil Derg*, 12(3):227–234.
- Harmache, A. et al. (1995). The vif gene is essential for efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goat synovial membrane cells and affects the late steps of the virus replication cycle. *J. Virol*, 69:3247–3257.
- Harmache, A. et al. (1996). Requirement of caprine arthritis encephalitis virus vif gene for in vitro replication. *Virology*, 224:246–255.
- Heaton, M. P. et al. (2013). Genetic Testing for TMEM154 Mutations Associated with Lentivirus Susceptibility in Sheep. *PLOS ONE*, 8(2). DOI: 10.1371/journal.pone.0055490. ISSN 1932–6203.
- Heaton, M. P. et al. (2012). Reduced Lentivirus Susceptibility in Sheep with TMEM154 Mutations. *PLoS Genetics*, 8(1) DOI: 10.1371/journal.pgen.1002467. ISSN 1553–7404.

- Helio, A. et al. (2013). Lentiviral Gene Therapy Vectors: Challenges and Future Directions. In MARTIN, F. (Eds.). *Gene Therapy - Tools and Potential Applications*, pp. 288–290. DOI: 10.5772/52534. ISBN 978-953-51-1014-9.
- Holt, J. et al. (2010). Zinc finger nuclease-mediated CCR5 knockout hematopoietic stem cell transplantation controls HIV-1 in vivo. *Nat Biotechnol*, 28(8):839–847.
- Hron, T. et al. (2014). Endogenous lentivirus in Malayan colugo (*Galeopterus variegatus*), a close relative of primates. *Retrovirology*, 11(1):84.
- Hron, T. et al. (2016). Life history of the oldest lentivirus: Characterization of ELVgv integrations in the dermopteran genome. *Molecular biology and evolution*, 33(10): 2659–2669.
- Human Immunodeficiency Virus (HIV). (2016). *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 43:203-222. DOI: 10.1159/000445852
- Christodoulopoulos, G. (2005) Milk Production and Milk Fat Content in Commercial Karagouniko Breed Flocks Infected by Maedi Disease in Greece. *Proceedings of the Sixth International Sheep Veterinary Congress; Hersonissos Crete, Greece. 17–21 June 2005; pp. 344–345.*
- IBIDI. (2016). Protocol for Lentiviral Transduction of Human Cells. *Ibidi cells in focus GmbH*, pp. 1–7.
- Jazin, E. E. et al. (1997). Embryonic expression of the mRNA for the rat homologue of the fusin/CXCR-4 HIV-1 co-receptor. *J. Neuroimmunol.*, 79:148–154.
- Katagiri, D. et al. (2006). Estrogen stimulates transcription of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Int. Immunopharmacol.*, 6:170–181
- Kristbjornsdottir, H. et al. (2004). The vif gene of madei-visna is essential for infectivity in vivo and vitro. *Virology*, 318:350–359.
- Leitner, G. Et al. (2007). Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infection and its relation to somatic cell count. *Small Rum. Res.*, 74:221–225. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2007.02.009.

- Leitner, G. Et al. (2010). The effect of caprine arthritis encephalitis virus infection on production in goats. *Vet. J.*, 183:328–331. DOI: 10.1016/j.tvjl.2008.12.001.
- Lerondelle, C. et al. (1999). Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. *Veterinary Research*, 30:467–474.
- Leroux, C. et al. (2004). Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us?. *Vet. Res.*, 35:485–512.
- Leroux, C. et al. (2001). Equine Infectious Anemia Virus Genomic Evolution in Progressor and Nonprogressor Ponies. *Journal of Virology*, 75(10):4570–4583. DOI: 10.1128/JVI.75.10.4570-4583.2001.
- Leroux, C. a Mornex, J. (2008). Retroviral infections in sheep and the associated diseases. *Small Rumin. Res.*, 76:68–76.
- L'Homme, Y. et al. (2011). Molecular characterization and phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses isolated from Canadian sheep and goats. *Viol. J.*, 8:271–278.
- Lois, C. (2002). Germline Transmission and Tissue-Specific Expression of Transgenes Delivered by Lentiviral Vectors. *Science*, 295(5556):868–872. ISSN 00368075. DOI: 10.1126/science.1067081.
- Luciw, P. A. (1996). Human immunodeficiency viruses and their replication. *Fields virology*, 2:1881–1952.
- Malim, M. a Emerman, M. (2008). HIV-1 accessory proteins—Ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe*, 3:388–398.
- Malmquist, W. A. et al. (1969). Isolation, immunodiffusion and immunofluorescence and electron microscopy of a lymphosarcomatous and apparently normal cattle. *Cancer Res.*, 1969(29):188–200.
- Martínez, N. B. et al. (2002). Efectos del virus de la artritis-encefalitis caprina sobre la producción y composición de la leche en cabras murciano-granadinas. *Pequeños Rumiantes*, 3:26–30.
- Martínez-Navalon, B. et al. (2013). Quantitative estimation of the impact of caprine arthritis encephalitis virus infection on milk production by dairy goats. *Vet. J.* DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.12.020.

- Matoušková, M. (2005). Za co všechno vděčíme genomovým parazitům. *Živa*, 5:6–8. ISSN 0044-4812.
- Mazakarlis, N. (2003). Zacíleno na genovou terapii. *EPDA Focus*, 23. In: *Parkinson, 2004*, 16:20–22.
- Minguijón, E. et al. (2015). Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Vet. Microbiol.*, 181(1-2):75–89.
- Miyoshi, H. et al. (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *Journal of virology*, 72(10):8150–8157.
- Moepps, B. et al. (1997). Two murine homologues of the human chemokine receptor CXCR4 mediating stromal cell-derived factor 1alpha activation of Gi2 are differentially expressed in vivo. *J. Immunol.*, 27: 2102–2112.
- Morita, E. a Sundquist, W. I. (2004). Retrovirus budding. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20:395–425.
- Moss, A. R. a Bacchetti, P. (1989). Natural history of HIV infection. *Aids*, 3(2):55–62.
- Mselli-Lakhall, L. et al. (2000). Lack of functional receptors is the only barrier that prevents human cells from CAEV infection. *J. Virol*, 74:8343–8348.
- Nord K. a Adnoy T. (1997). Effects of infection by caprine arthritis-encephalitis virus on milk production of goats. *J. Dairy Sci.*, 80:2391–2397. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76190-3.
- Oberlin, E. et al. (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*, 382:833–835.
- Óskarsson, T. et al. (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>
- Padiernos et al. (2015). Molecular characterization of the gag gene of caprine arthritis encephalitis virus from goats in the Philippines. *Archives of Virology*, 160:969–978.
- Petr, J. (2000). Transgenová hospodářská zvířata. Praha: *Vesmír*, 79:514–517.

- Pluta, K. a Kacprzak, M. M. (2009). Use of HIV as a gene transfer vector. *Acta biochimica polonica*, 4:56.
- Popper, S. J. et al. (1999). Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *The Journal of infectious diseases*, 180(4):1116–1121.
- Pyper, J. M. et al. (1986). Sequence homology between cloned caprine arthritis encephalitis virus and visna virus, two neurotropic lentiviruses. *Journal of virology*, 58(2):665-670.
- Reina, R. et al. (2009). Genome analysis of small ruminant lentivirus genotype E: A caprine lentivirus with natural deletions of the dUTPase subunit, vpr-like accessory gene, and 70-base-pair repeat of the U3 regions. *J. Virol*, 83:1152–1155.
- Rimstad E. et al. (1993). Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *American Journal of Veterinary Research*, 54:1858–1862
- Rodrigues, A. P. S. et al. (2019). Molecular detection of bovine immunodeficiency virus (BIV) in bovines from the state of Minas Gerais, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71(2):711–714. DOI: 10.1590/1678-4162-10495. ISSN 1678-4162.
- Ryan, D. P. et al. (1993). Effect of caprine arthritis-encephalitis virus infection on milk cell count and N-acetyl-beta-glucosaminidase activity in dairy goats. *J. Dairy Res.*, 60:299–306. DOI: 10.1017/S0022029900027643.
- Sakuma, T. et al. (2012). Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochemical Journal*, 443(3):603–618.
- Shah, C. et al. (2004). Direct Evidence for Natural Transmission of Small-Ruminant Lentiviruses of Subtype A4 from Goats to Sheep and Vice Versa. *Journal of Virology*, 78(14): 7518–7522.
- Shytaj, I. a Savarino, A. (2015). Cell-mediated anti-Gag immunity in pharmacologically induced functional cure of simian AIDS: a ‘bottleneck effect’?. *Journal of medical primatology*, 44(5):227–240.

- Straub, O. (2004). Maedi–Visna virus infection in sheep. History and present knowledge. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 27(1):1–5.
- Strnad, P. et al. (2003). Genom retrovirů a fyziologická funkce jeho produktů. *Chemické listy*, 97:949–956.
- SVSCR. Státní veterinární správa. (2022). *Metodiky kontroly zdraví zvířat a nařízené vakcinace*. [online]. [cit. 18.07.2022]. Dostupné z: <https://www.svscr.cz/category/dokumenty-a-publikace/prehled-podle-temat/metodiky-kontroly-zdravi-zvirat-a-narizene-vakcinace/>.
- Šoch, M. et al. (2018). Ověřená technologie: Systém prevence a profylaxe lentivirových infekcí malých přežvýkavců.
- Toman, M. (2009). *Veterinární imunologie*. 2., dopl. a aktualiz. vyd. Praha: Grada, pp. 262. ISBN 9788024724645.
- Toman, M. et al. (2000). *Veterinární imunologie*. Praha: Grada, pp. 277. ISBN 8071697273.
- Turin, L. et al. (2004). Correlation between milk parameters in CAEV seropositive and negative primiparous goats during an eradication program in Italian farm. *Small Rum. Res.*, 57:73–79. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2004.06.018.
- Ulbricht, T. et al. (2012). Vyřešení struktury retroviróvé částice jako klíč k inhibici HIV / P. *Chemické listy*, 106(10):911–919. ISSN 0009-2770.
- Valas, S. et al. (2008). Characterization of a new 5' splice site within the caprine arthritis encephalitis virus genome: evidence for a novel auxiliary protein. *Retrovirology*, 5:1–17.
- Villet, S. et al. (2003). Lack of trans-activation function for madei visna virus and caprine arthritis encephalitis virus tat proteins. *Virology*, 307:317–327.
- Villet, S. et al. (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.

- Vokurka, M. a Hugo J. (2015). *Velký lékařský slovník*. 10. aktualizované vydání. Praha: Maxdorf. Jessenius. ISBN 978-80-7345-456-2.
- Watts, J. et al. (2009). Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature*, 460:711–719.
- Westman, M. E. et al. (2021). Antibody Responses in Cats Following Primary and Annual Vaccination against Feline Immunodeficiency Virus (FIV) with an Inactivated Whole-Virus Vaccine (Fel-O-Vax ® FIV). *Viruses*, 13(3):470.
- Yamamoto, J. K. (2008). Bovine and Feline Immunodeficiency Viruses. In: Mahy, B. a van Regenmortel M. (2009). *Desk Encyclopedia Animal and Bacterial Virology*. Academic Press, pp. 54. ISBN 9780123751454.
- Yaniz-Galende, E. a Hajjar, R. J. (2014). Stem cell and gene therapy for cardiac regeneration. *Cardiac Regeneration and Repair*. Elsevier, pp. 347–379, DOI: 10.1533/9780857096708.4.347. ISBN 9780857096586.
- Youngsuk, Yi. Et al. (2011). Current Advances in Retroviral Gene Therapy. *Current Gene Therapy*, 11:218-228.
- Zink, M.C. et al. (1997). Pathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis-encephalitis: new leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 15:167–180.

9 Seznam obrázků

| | |
|---|----|
| Obrázek 1 Schéma taxonomického zařazení lentivirů (Helio, 2013) | 12 |
| Obrázek 2 Schéma fází životního cyklu lentivirů (Sakuma, 2012) | 14 |
| Obrázek 3 Struktura lentiviru HIV-1 (Gomez-Lucia, 2021) | 17 |
| Obrázek 4 Genomická organizace SRLV a HIV-1 (Valas et al., 2008) | 19 |
| Obrázek 5 Struktura a organizace genomu HIV-1 (Luciw, 1996)..... | 23 |
| Obrázek 6 Struktura virové částice HIV (Luciw, 1996)..... | 24 |
| Obrázek 7 Ovce infikované virem maedi-visna (Crilly, 2015) | 32 |
| Obrázek 8 Artritida u kozy způsobená virem CAEV (Minguijón et al., 2015)..... | 34 |
| Obrázek 9 Skot infikovaný BIV (Nagy, 2014) | 39 |
| Obrázek 10 Gradientová PCR (Farková, 2017)..... | 45 |

PŘÍLOHA 1 Přehled proteinů viru HIV-1 a jejich funkce

(Transfusion Medicine and Hemotherapy (2016); 43:203–222)

| Gene | Size* | Protein | Function |
|------------|----------|--------------------------------------|--|
| <i>gag</i> | p24 | Pr55Gag | precursor of the inner structural proteins |
| | p17 | capsid protein (CA) | formation of conical capsid |
| | p7 | matrix protein (MA) | myristilated protein, forming the inner membrane layer |
| | p6 | nucleoprotein (NC) | formation of the nucleoprotein/RNA complex involved in virus particle release |
| <i>pol</i> | p10 | Pr160GagPol protease (PR) | precursor of the viral enzymes proteolytic cleavage of Gag (Pr55) and Gag-Pol (Pr160GagPol) precursor protein; release of structural proteins and viral enzymes |
| | p51 | reverse transcriptase (RT) | transcription of HIV RNA in proviral DNA |
| | p15 (66) | RNase H | degradation of viral RNA in the viral RNA/DNA replication complex |
| | p32 | integrase (IN) | integration of proviral DNA into the host genome |
| <i>env</i> | gp120 | PrGp160 surface glycoprotein (SU) | precursor of the envelope proteins SU and TM, cleavage by cellular protease attachment of virus to the target cell |
| | gp41 | transmembrane protein (TM) | anchorage of gp120, fusion of viral and cell membrane |
| <i>tat</i> | p14 | transactivator protein | activator of transcription of viral genes |
| <i>rev</i> | p19 | RNA splicing regulator | regulates the export of non-spliced and partially spliced viral mRNA |
| <i>nef</i> | p27 | negative regulating factor | myristilated protein, influence on HIV replication, enhancement of infectivity of viral particles, downregulation of CD4 on target cells and HLA cells on target |
| <i>vif</i> | p23 | viral infectivity protein | critical for infectious virus production in vivo |
| <i>vpr</i> | p15 | virus protein r | component of virus particles, interaction with p6, facilitates virus infectivity, effect on the cell cycle |
| <i>vpu</i> | p16 | virus protein unique | efficient virus particle release, control of CD4 degradation, modulates intracellular trafficking |
| <i>vpx</i> | p15 | virus protein x | interaction with p6 in virus particles, involved in early steps of virus replication of HIV-2, component of virus particles |
| <i>tev</i> | p26 | tat/rev protein | Tat-Env-Rev fusion protein, regulates the activity of Tat and Rev in nucleus |

*Numbers correspond to the size of the proteins (p) or glycoproteins (gp) in 1,000 Da.