



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. Martin Beňka

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>Sekvenační 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 nakažovému opatřením, omezují možnosti obchodu s plemennými zvířaty. Pro tyto virové infekce neexistuje účinná vakcína či léčba. Současné poznatky ukazují, že používané diagnostické metody nejsou vždy zcela spolehlivé (z důvodů kmenové variability, či nízké úrovně virové zátěže). Je tedy třeba metody imunochemické a molekulárně biologické diagnostiky nadále zdokonalovat. Díky genomové analýze s použitím 50k SNP čipů pro ovce, bylo identifikováno několik kandidátních genů pro odolnost k onemocnění MV, přičemž nejsilnější vztah k odolnosti vykazuje gen 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 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 užitečnosti (KU) musí být MV a CAE prosté.

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

Soudobé poznatky ukazují, že používané diagnostické metody nejsou vždy zcela spolehlivé vzhledem ke složité patogenezi onemocnění. Nejspolehlivější je kombinace imunologických a molekulárně biologických metod, přičemž s přihlédnutím ke kmenové variabilitě, je třeba metody molekulárně biologické diagnostiky nadále 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 polymorfizmy 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 nakažové 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 nutné 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
- hlubokomrazící box

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

Zvířata infikovaná SLRV 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 používány pro výzkumné účely.

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

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

ELISA testy postavené na rekombinantních či peptidových antigenech využívají např. rekombinantní proteiny kapsidy (CA) jako je p55, p25, p16, p14, transmembránový protein (TM) gp46 nebo purifikovaný obalový protein gp135.^{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 senzitivitu i specifitu testů tzv. **intermitentní sérologická odezva**. Ta se projevuje časovou variabilitou humorální odezvy a to od několika týdnů do několika měsíců po infekci. Obecně se předpokládá, že titr protilátek při sérokonverzi dosáhne maximální výše a pak klesne na nižší, ale stabilní hladinu. Některé studie ovšem uvádí, že u určitého procenta zvířat (10-20%) dochází k tzv. intermitentní protilátkové odezvě zjištěné jak ve WB, IDT či ELISA testu a toto období může trvat týdny, měsíce ale i roky.^{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 kmény 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 dvoujankový verifikační	$S/P \% = 100 \times ((OD \text{ vzorek}_{KAg+} - OD \text{ vzorek}_{KAg-}) / (OD \text{ PK}_{KAg+} - OD \text{ PK}_{KAg-}))$	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 (ovce) = 50-60% cut-off (koza) = 30-40%	Celý virus - inaktivovaný - MVV (kmen OLV).	99%	99,8% (100%)	6, 9, 10, 11
Elitest MVV/CAEV	HYPHEN BioMed Neuville-sur-Oise, Francie	nepřímý ELISA test	cut-off = (PK-NK)/4 + NK	cut-off = různé dle výpočtu	Syntetický peptid imunodominantního transmembránového proteinu gp46 a rekombinantní hlavní kapsidový protein p25 kapsidy MVV.	99,4% (97,8%)	99,3% (98,2%)	6, 7, 12, 17, 24
ID Screen® MVV / CAEV Indirect	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	$\% I (\text{inhibice}) = 100 \times (1 - (OD \text{ vzorku} - OD \text{ NK}))$	cut-off = 35%	Povrchový gp135 env glykoprotein viru CAEV-63 navázaný na monoklonální protilátku F7-299 (bez využití gag proteinu).	99,50%	100%	6, 15, 16
LSIVet™ Ruminant MAEDI-VISNA/CAEV Serum ELISA Kit	LSI - Laboratoire Service International 6 Allée des Ecurieuls 69380 Lissieu, Francie	blokovací ELISA	$\% \text{ Inh} = (ODm \text{ NC} - OD \text{ Sample}) \times 100 / ODm \text{ NC}$	cut-off = 35%	Povrchový protein gp135 viru MVV/CAEV navázaný na monoklonální protilátku.	100,00%	100%	25
Eradikit™ SRLV Genotyping kit	In3diagnostic s.r.l. Largo P.Braccini, 2, 10095, Grugliasco (TO) Italia	nepřímý ELISA test	pozitivní vz. = (OD ₄₀₅)>0.4	cut-of = 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 sensitivity, produkovat falešně negativní výsledky a komplikovat tak rannou diagnostiku infekce SRLV.

Přehled dostupné sérologické diagnostiky používané v České republice k diagnostice SRLV je uveden v tabulce č 1. Používány jsou zde různé druhy komerčních ELISA testů nebo imunodifuze. Imunodifuzní test (IDT/AGID) je postaven na celém viru a detekuje zejména protilátky proti kapsidovému proteinu p25viru MV (u koz p28 viru CAE) a obalovému glykoproteinu gp135. Specifita imunodifuzního testu je vysoká a pohybuje se kolem 98,3%, ale nevýhodou je jeho nízká senzitivita (76%). Proto bývá IDT využíván spíše jako orientační test a za určitých okolností může být použit i pro confirmaci výsledku získaného ELISA testem.^{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 reagentie. 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 sekvenační 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 navržení specifických primerů pro daný úsek DNA sekvence. Vznik nespecifických produktů amplifikace lze odhalit pomocí analýzy křivky tání.

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

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

Vzorkování

Pro diagnostické účely se odebírá periferní krev zvířat (věková kategorie: minimálně 4 měsíce po odstavu. Odebraná krev, která je ošetřena antikoagulantem 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 kontraktálního 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 termocyklech, které umožňují teplotní cyklování a zároveň detekují fluorescenci v každém cyklu PCR. Intenzita fluorescence je přímo úměrná množství amplifikačního produktu přítomného v reakční směsi.

Sekvence primerů používaných pro detekci gag genu.

(Grego et al., 2007)

Primer	Sekvence '5—3'
GAG F1	TGGTGARKCTAGMTAGAGACATGG
POL R1	CATAGGRGGHGC GGACGGCASCA
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. Roztoky a reagentie po rozmražení dobře promíchat a krátce stočit při 10 000 rpm/10s.
3. Reagentie po krátké centrifugaci vytemperovat v chladicím boxu přibližně na 0,5 až 4°C.
4. Do PCR zkumavky napipetovat reagentie a roztoky v pořadí a objemu níže uvedeném.
5. Po napipetování vzorků nebo kontrol je nutné okamžitě zavřít PCR zkumavku.
6. V každém kole analýz je nutná přítomnost pozitivní i negativní kontroly (již od extrakce) pro ověření chodu PCR a vyloučení křížové kontaminace.

Složení reakční směsi pro PCR

Reagencie	Objem (μl)	Výsledná konc.
PCR H 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 ($^{\circ}\text{C}$)	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

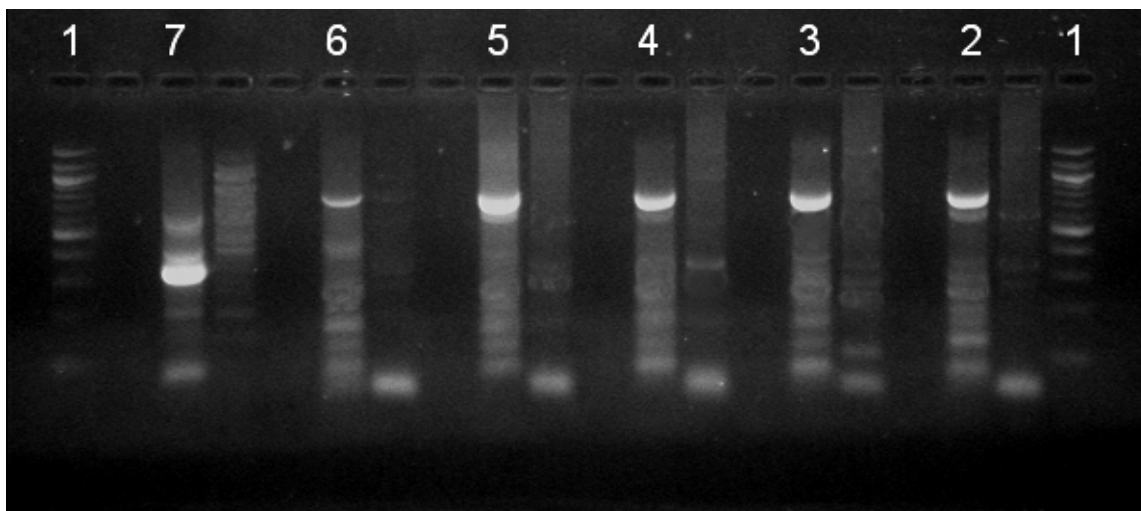
ELFO

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

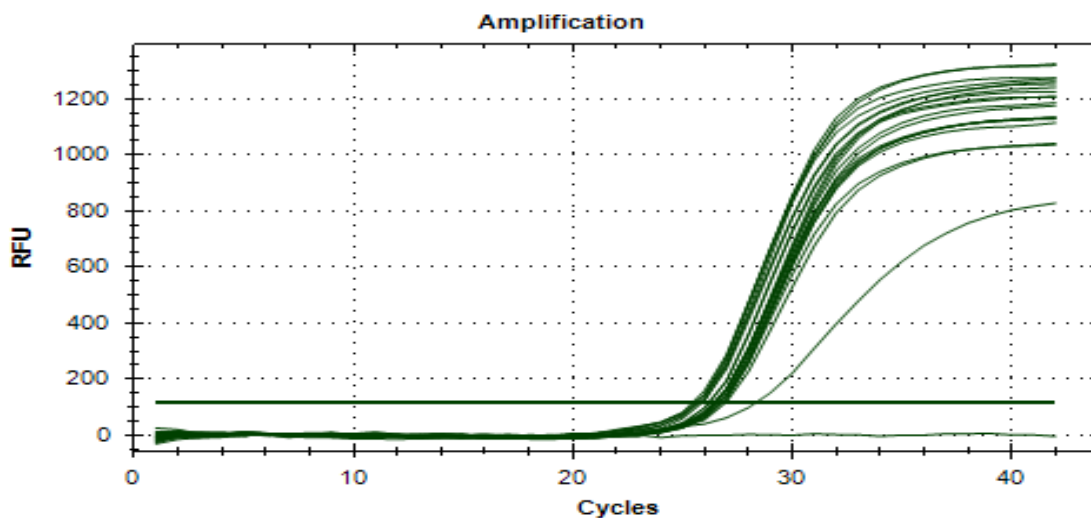
Amplifikační produkt prvního kroku PCR má délku 0,8 kb. Výsledný produkt druhého kroku PCR (nPCR) je o délce 1,3 kb. V případě pozitivity negativní kontroly (PCR H₂O) a negativity pozitivních kontrol je nutné analýzu opakovat.



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 zachycovaná speciální CCD kamerou. Jednotlivým úsekům je poté za pomoci algoritmu přiřazována číselná hodnota (RFU).

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

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 zasláného roztoku s templátovou DNA je následující: 5 μ l PCR produktu (20-80ng/ μ l) a 5 μ l primeru (5 μ M) 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 sekvence testovaného vzorku s referenční sekvencí (EU010126) z NCBI:

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

```
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          60          70          80          90          100
Vzorek    AGAAGTATTG GCCATGATGC CAGGGAATAG AGCTCAAAAA GAGTTAATAC
SRLV (NCBI) AGAAGTATTG GCCATGATGC CTGGGAATAG GGCCAGAAA GAATTAATCC
```

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

```
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          160         170         180         190         200
Vzorek    CCTCCGGCAG GAGGAGGACT AACCGTGGAT CAAATTATGG GAGTAGGACA
SRLV (NCBI) CCTCCGGCAG GAGGAGGACT AACCGTGGAT CAAATTATGG GAGTAGGACA
```

```
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          210         220         230         240         250
Vzorek    AACAAATCAA GCAGCTGCTC AAGCTAACAT GGATCAAGCA AGACAAACCT
SRLV (NCBI) AACAAATCAG GCAGCTGCAC AAGCTAACAT GGATCAAGCA AGACAAATTT
```

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

```
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
```

```

          310          320          330          340          350
Vzorek      AGACCAGGGA ATCCAATGCT AGTAAAACAA AAAAGTAAATG AGCCATATGA
SRLV (NCBI) AGACCAGGGA ATCCTATGTT AGTGAAACAA AAGAGCAATG AGCCATATGA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          360          370          380          390          400
Vzorek      AGACTTTGCA GCAAGACTGC TAGAAGCAAT AGATGCAGAA CCAGTTACAC
SRLV (NCBI) AGACTTTGCA GCGAGGCTGC TGGAGGCAAT AGATGCAGAA CCAGTCACGC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          410          420          430          440          450
Vzorek      AACCTATAAA GGAATATTTA AAATTAACTC TGTCATATAC AAATGCATCC
SRLV (NCBI) AACCTATCAA AGAATATTTA AAGTTAACTC TGTCCTATAC AAATGCCTCC

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

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          510          520          530          540          550
Vzorek      AGCTAGTGTA GAAGAAAAGA TGCAAGCATG CAGAGATGTG GGATCAGAAG
SRLV (NCBI) AGCTAGTGTA GAAGAAAAAA TGCAAGCATG CAGCGATGTG GGATCAGAAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          560          570          580          590          600
Vzorek      GATTTAAAAT GCAATTGTTA GCACAGGCGT TAAGGCCCGA AAGGAAACAA
SRLV (NCBI) GATTTAAAAT GCAGTTACTA GCACAGGCTT TAAGGCCTGA AAAGAAACAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          610          620          630          640          650
Vzorek      GGAACAGGSC CCACACAAAG ATGCTATAAC TGTGGAAAAC CAGGACATAG
SRLV (NCBI) GGAATAGGCC CCGCACAAAG GTGCTACAAC TGTGGAAAAG TGGGACACAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          660          670          680          690          700
Vzorek      GGCAAGGCAG TGCAGACAAG GGATTATATG CCATAACTGT GGTAAAGAGAG
SRLV (NCBI) GGCAAGACAA TGTAGACAAG GGATCATATG TCACAATTGT GGCAAAGAGAG

```

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)

Skladování při 2 až 8 °C

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

Složení extrakčního kitu

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

PCR

PCR 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 vkladací pufr (Top-Bio)

DNA Marker 100-1500 pb (BioLabs)

EDTA 0,5 M

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

ultrafiltrovaná voda 800 ml

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

TBE (10x)

Tris base 108 g(Serva)

kyselina boritá 55 g (Serva)

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

ultrafiltrovaná voda doplnit objem do 1000 ml

Poznámka: skladování výše uvedených roztoků je při pokojové teplotě

DNA Marker 100-1500 bp (BioLabs) skladovat při -15 až -20°C

Purifikace nPCR produktu

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

Složení purifikačního kitu

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

Reagencie neobsažené v kitu: Ethanol 96–100%

Spotřební materiál

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

Přístroje a pomůcky

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

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

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 μ l a 3 μ l proteinázy K (50 mg/ μ l) 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	CCTTGTATTA ACTCTTTTTGTGCC
LB	GGCGGCTTGACAGTGGATCA

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 vložek 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 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

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., MORNEIX, 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., 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.
10. CELER JR., V., CELER, V., NEMCOVA, H.R., ZANONI, R., PETERHANS, E. Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole virus ELISA and AGID test. *Zentralbl Veterinarmed [B]* 1998;45,183–188.
11. HERRMANN-HOESING, L.M., BROUGHTON-NEISWANGER, L.E., GOUINE, K.C., WHITE, S.N., MOUSEL, M.R., LEWIS, G.S., MARSHALL, K.L., KNOWLES,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

22. KRASSNIG, R., SCHULLER, W. Continuation of the observation and serological investigation of a maedi-visna-virus-infected sheep flock from January 1990 to June 1996. *Dtsch. Tierärztl. 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 ruminant lentiviruses (SRLVs) in Belgian sheep and goats. poster, WAVLD 2017, Sorrento, Italy.

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

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

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

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

VI. Seznam publikací, které předcházely metodice

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

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

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

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

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR, dopisem ze dne 2.1.2018, č.j 74673/2017-MZE-14152 jako uplatněná metodika s doporučením pro její využití v zemědělské praxi.

Kontakt na autory: VCurn@seznam.cz

ISBN: 978-80-7397-671-5