



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

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



Státní  
veterinární  
ústav  
Jihlava

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

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

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

**České Budějovice, listopad 2018**

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

Pavel Barták a kol.  
bartak@svujihlava.cz

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

Oponenty metodiky byli:

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

Podíl autorů na vypracování metodiky:

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

*Text:* ©2018

*Foto:* ©2018

Vydáno bez jazykové úpravy

ISBN: xxx-xx-xxxx-xxx-x

Obsah:

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

## I. Cíl metodiky

Onemocnění maedi-visna ovcí (MV) a virová arteritida a encefalitida koz (CAE) patří do skupiny virů z čeledi Retroviridae, rod Lentivirus, označované souhrnně jako lent virové infekce malých přežvýkavců (SRLV). V současné době jsou MV a CAE rozšířeny po celém světě včetně České republiky. Vzhledem k současné nakažové situaci jsou onemocnění MV a CAE významným problémem. Způsobují ekonomické ztráty a vytváří bariéru při obchodování s plemenným materiálem (nejen v EU), či při pořádání chovatelských akcí (výstavy, svody). Chovy v ČR zařazené v kontrole užitkovosti (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 užitkovosti 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 užitkovosti (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 užitkovosti, 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 užitkovosti, se vyšetření provádí 1x ročně.

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

séropozitivních zvířat. Tímto způsobem bylo postupně dosaženo ozdravení prakticky všech chovů zařazených do kontroly 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 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.

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

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

## II.2. Odběr vzorků biologického materiálu

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

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

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

---

Chemikálie a spotřební materiál:

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

Přístroje:

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

## II.3. Izolace DNA z krve

### *Izolace DNA pomocí Chelexu*

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

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

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

Postup:

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



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

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

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

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

---

### **Izolace Chelexem**

Chemikálie a spotřební materiál:

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

Přístroje:

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

### Izolace kitem

#### Chemikálie a spotřební materiál:

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

#### Přístroje:

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

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

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

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

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

### **PCR analýza genu *TMEM154***

#### **Sekvence primerů používaných pro detekci genu *TMEM154*.**

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

PCR reakce probíhá v objemu 25 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 cyklu. V každé reakci je potřeba připravit i negativní kontrolu, kde je DNA nahrazena adekvátním objemem PCR vody.

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

#### Příprava mastermixu:

1. Reakční směs se připravuje vždy nová.
2. Roztoky a reagensie po rozmražení dobře promíchat a krátce stočit při 10 000 rpm/10s.
3. Reagensie po krátké centrifugaci vytemperovat v chladicím boxu přibližně na 0,5 až 4°C.
4. Do PCR zkumavky napipetovat reagensie 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

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

#### Teplotní profil PCR (amplifikace)

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

## **Elektroforéza PCR fragmentů**

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

## **Sekvenační analýza**

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

Amplifikovaný fragment se sekvenuje s primery specifickými k sekvenci (v našem případě specifickými primery pro úsek *TMEM154* genu). Sekvenování prokáže správnou sekvenci amplikonu 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 nespoteřované 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  $\mu$ l PCR reakce se přidají 2  $\mu$ l ExoSapu. Např. k 25  $\mu$ l reakce přidáme 10  $\mu$ l ExoSapu. Zamícháme a inkubujeme 30 minut při 37°C. Následně inaktivujeme ExoSap při 80°C 15 minut.
- Inkubace může probíhat v termobloku, nebo v termocykleru. Pokud prodloužíme čas inkubace, výsledný produkt bude lépe přečištěný.
- Po ošetření PCR produktu ExoSapem je potřeba k reakci přidat opět jeden z primerů!!
- Na každých 10  $\mu$ l vzorku přidáme 5  $\mu$ l primerů, forward nebo reverse, podle směru, který chceme sekvenovat. Takto upravený vzorek je připraven k sekvenování.

Sekvence přečištěného produktu probíhá v externí laboratoři (SeqMe). Do laboratoře se posílá vzorek 10  $\mu$ l PCR reakce s 2  $\mu$ l ExoSapu a 5  $\mu$ l primeru (5 $\mu$ M) pro každý směr sekvenování zvlášť (1 vzorek obsahuje forward nebo reverse primer). Vzorek se posílá v 1,5 ml mikrozkuhavce nebo v PCR mikrozkuhavce. Vzorky lze do laboratoře zaslat i v 96ti jamkových destičkách. Sekvence je provedena Sangerovou metodou na kapilárních analyzátoch Applied BioSystems 3500 prostřednictvím BigDye Terminator v3.1Cycle 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 H2O (Top Bio)
- Mastermix (Top Bio)
- primer TMEM154F, 100  $\mu$ M (KRD)
- primer TMEM154R, 100  $\mu$ M (KRD)
- Vyizolovaná DNA
- 1,5 ml mikrocentrifugční zkumavky (Eppendorf)
- PCR zkumavky, 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)
- 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,..)

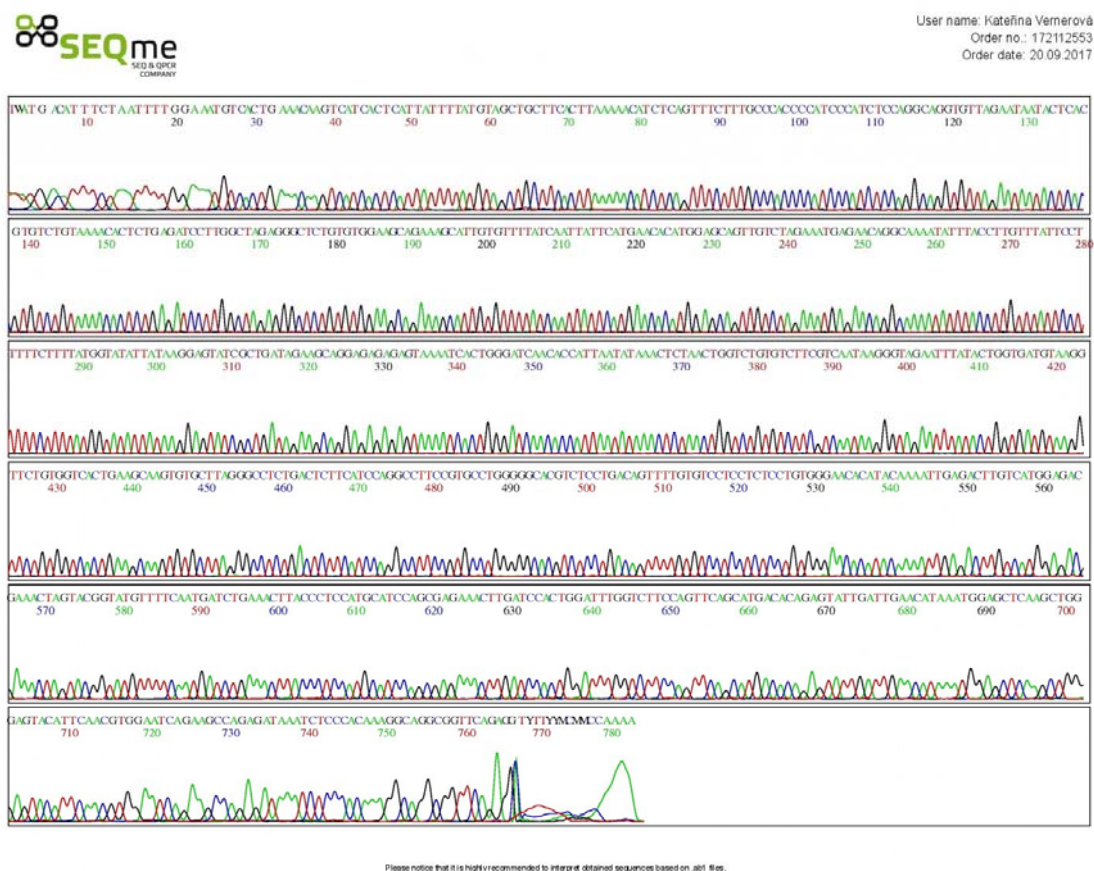


## Příklady výsledků PCR analýzy – amplifikace části genu *TMEM154*

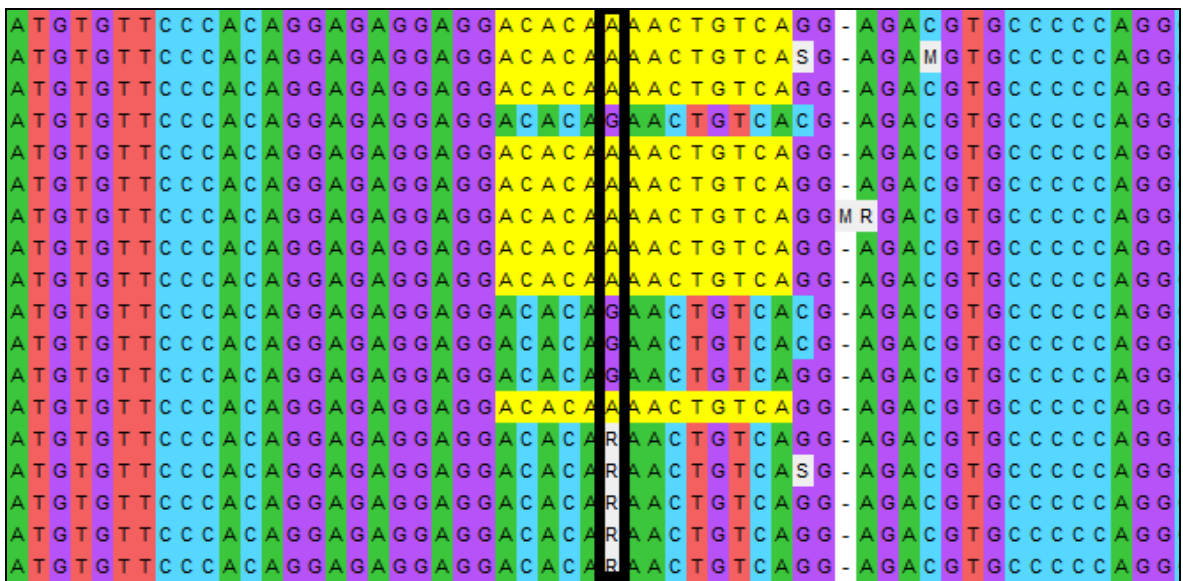
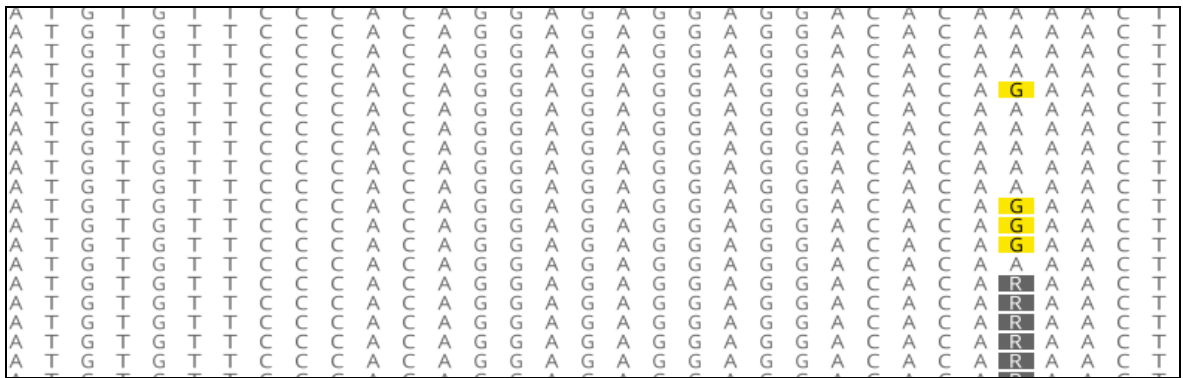
Amplifikační produkt má délku 828 bp u všech třech genotypů. Pro přesnou identifikaci jednotlivých genotypů je nutné osekvenovat naamplifikované produkty.



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



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

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

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

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



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

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

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

Vydáno bez jazykové úpravy

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

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

ISBN: