

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH  
BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4131 Zemědělství  
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie - Rostlinné  
Katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Maedi-visna ovcí – genetické aspekty  
vnímavosti/odolnosti k onemocnění

Autor práce: Petr Štoidl  
Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Tonka Ph.D.  
Konzultant práce: prof. Ing. Vladislav Čurn Ph.D.  
Ing. Kateřina Vernerová

České Budějovice, 2019

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

## **Poděkování**

V první řadě bych chtěl poděkovat mému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Tomáši Tonkovi, Ph.D. za to, že se mě ujal v době, kdy se nevědělo kam se mnou, za rady, které mi poskytoval v laboratoři i během psaní bakalářské práce a za neutichající příval připomínek. Dále bych chtěl poděkovat prof. Ing. Vladislavu Čurnovi Ph.D. s Ing. Kateřinou Vernerovou za možnost podílet se na projektu NAZV QJ1610096 a Ing. Ireně Hoštičkové, která mě vždy dokázala vybičovat k nejlepším výkonům. V neposlední řadě chci poděkovat Janu Harenčákovi za pomoc, podporu a kritický názor, který se mi nikdy nebál říct.

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu NAZV QJ1610096.

## **Abstrakt**

Tato práce je zaměřena na zhodnocení míry korelace mezi výskytem onemocnění Maedi-visna a polymorfismem na 35. pozici genu pro transmembránový protein TMEM154 u ovcí. Výskyt onemocnění Maedi-visna u ovcí byl stanoven pomocí sérologické metody ELISA v laboratoři Státního veterinárního ústavu Jihlava a k určení polymorfismu genu *TMEM154* byly použity molekulární metody PCR a sekvenování. Provedeným výzkumem byla prokázána souvislost mezi výskytem Maedi-visna viru a polymorfismem genu transmembránového proteinu TMEM154 u ovcí. Hlavním přínosem této práce je možnost eradikace Maedi-visna viru vyřazováním ovcí s méně odolným genotypem.

## **Klíčová slova**

Lentiviry malých přežvýkavců, Maedi-visna virus, Progresivní pneumonie ovcí, TMEM154, polymorfismus, SNP, ovce

## **Summary**

The aim of this research is to evaluate the rate of correlation between Maedi-visna sheep disease and the polymorphism on 35th position of the gen for TMEM154 transmembrane protein. The incidence of Maedi-visna disease was evaluated using serological ELISA method at the State Veterinary Institute Jihlava, and for TMEM154 gene polymorphism detection, molecular PCR method was used. This research proves correlation between Maedi-visna sheep disease and the gene polymorphism for TMEM154 transmembrane protein. The main contribution of this research is the possibility to eradicate Maedi-visna virus by eliminating sheep with less resistant genotype.

## **Key words**

Small ruminant lentivirus, Maedi-visna virus, ovine progressive pneumonia, TMEM154, polymorphism, SNP, sheep

# Obsah

Úvod.....	1
1 Teoretická část .....	2
1.1 Maedi – Visna virus .....	2
1.1.1 Historie onemocnění Maedi-visna .....	2
1.1.2 Fylogenetické rozdělení MVV a CAEV .....	3
1.1.3 Virový genom .....	4
1.1.4 Replikace viru .....	5
1.1.5 Patogeneze lentivirů .....	5
1.1.6 Klinické příznaky onemocnění Maedi-visna .....	7
1.1.7 Současné způsoby eradikace MVV .....	8
1.2 Transmembránový protein TMEM 154 .....	9
2 Metody použité k detekci SRLV a genotypů TMEM154 .....	11
2.1 Sérologické metody k detekci SRLV .....	11
2.1.1 ELISA .....	11
2.2 Molekulární metody k detekci genotypů TMEM 154.....	12
2.2.1 Izolace Chelexem 100 .....	12
2.2.2 Izolace Kitem MagCore® Genomic DNA Whole Blood .....	13
2.2.3 PCR .....	14
2.2.4 Sanger-Coulsonova metoda sekvenování .....	16
3 Hypotézy a cíle práce .....	18
3.1 Hypotézy .....	18
3.2 Cíle .....	18
4 Materiál a metodika.....	19
4.1 Odběr vzorků krví .....	19
4.2 ELISA.....	20
4.3 Izolace DNA z krve .....	20

4.3.1	Izolace DNA Chelexem 100 .....	20
4.3.2	Izolace DNA pomocí robotické stanice .....	21
4.4	Navržení oligonukleotidových primerů pro PCR.....	22
4.5	PCR .....	23
4.6	Vizualizace fragmentů.....	24
4.7	Sekvenování ampliconu .....	25
4.8	Statistické vyhodnocení.....	25
5	Výsledky .....	26
6	Diskuse.....	31
7	Závěr .....	33
8	Seznam literatura.....	34

## Úvod

Maedi-visna virus ovcí (MVV) a virus infekční artritidy a encefalitidy koz (CAEV) se řadí mezi lentiviry malých přežvýkavců (SRLV) způsobující nevy léčitelná onemocnění, napadající ovce a kozy po celém světě s výjimkou Islandu, Austrálie a Nového Zélandu. SRLV způsobují významné ekonomické ztráty spojené především se sníženou produkcí a předčasným úhynem infikovaných zvířat. Nejvýznamnější ekonomickou ztrátou je omezení obchodu s plemennými zvířaty.

V České republice se podle Metodiky kontroly zdraví SVS ČR sledují pouze chovy ovcí a koz, zařazené do kontroly užitkovosti. Dle této metodiky se vyhodnocuje počet nálezů infikovaných zvířat, ale neuvádí se zde způsoby eradikace nákazy. Problémem jsou i diagnostické metody, používané pro určení pozitivních ovcí a koz, které nejsou vždy 100 % spolehlivé. Další problém představuje doba nutná pro identifikaci infekce z důvodu pomalého nástupu onemocnění.

Jedním z cílů chovatelů a šlechtitelů je zlepšení diagnostických metod pro včasný průkaz sérologicky pozitivních ovcí a snaha dosáhnout ochrany proti SRLV. Za pomoci předchozích výzkumů a genomové analýzy s využitím SNP50 BeadChip čipů pro ovce se podařilo objevit řadu genů, které by mohly mít vliv na rezistenci vůči SRLV. Nejsilnější vztah k rezistenci proti lentivirům byl prokázán u genu TMEM154, kde díky jednonukleotidovému polymorfismu (SNP) dochází ke změně genetického kódu a následně ke změně aminokyseliny na 35. pozici.

Z důvodu ozdravování chovů či obchodování s plemennými zvířaty je nutné rozvíjet ochranu ovcí na základě zvýšené rezistence spojené s polymorfismem v genu transmembránového proteinu TMEM154, protože neexistuje doposud vakcinace ani jiná léčba. Zatím jedinou možností ochrany proti SRLV je prevence a radikální eradikace, zahrnující likvidaci séropozitivních jedinců.



# 1 Teoretická část

## 1.1 Maedi – Visna virus

Maedi-visna virus (MVV), původce onemocnění maedi-visna (MV) ovcí, v Severní Americe také známé jako progresivní pneumonie ovcí (OPP) (Heaton a kol., 2013), patří do čeledi *Retroviridae*, podčeledi *Orthoretrovirinae*, rodu *Lentivirus*. Do tohoto rodu patří i virus lidské imunitní nedostatečnosti (HIV), virus opičí imunodeficiency (SIV), virus imunodeficiency koček (FIV), virus bovinní imunodeficiency (BVD), virus infekční anémie koní (EFV) nebo virus artritidy a encefalitidy koz (CAEV). Retroviry jsou charakteristické schopností reverzně přepisovat virovou RNA do dsDNA (double-stranded DNA) pomocí reverzní transkriptázy (Minguijón a kol., 2015; Maclachlan a kol., 2017).

MVV společně s CEAV se označují jako lentivirové infekce malých přežvýkavců (SRLV) a způsobují inestetickou pneumonii, encefalitidu, artritidu, mastitidu a chronickou ztrátu hmotnosti (Pépin a kol., 1998).

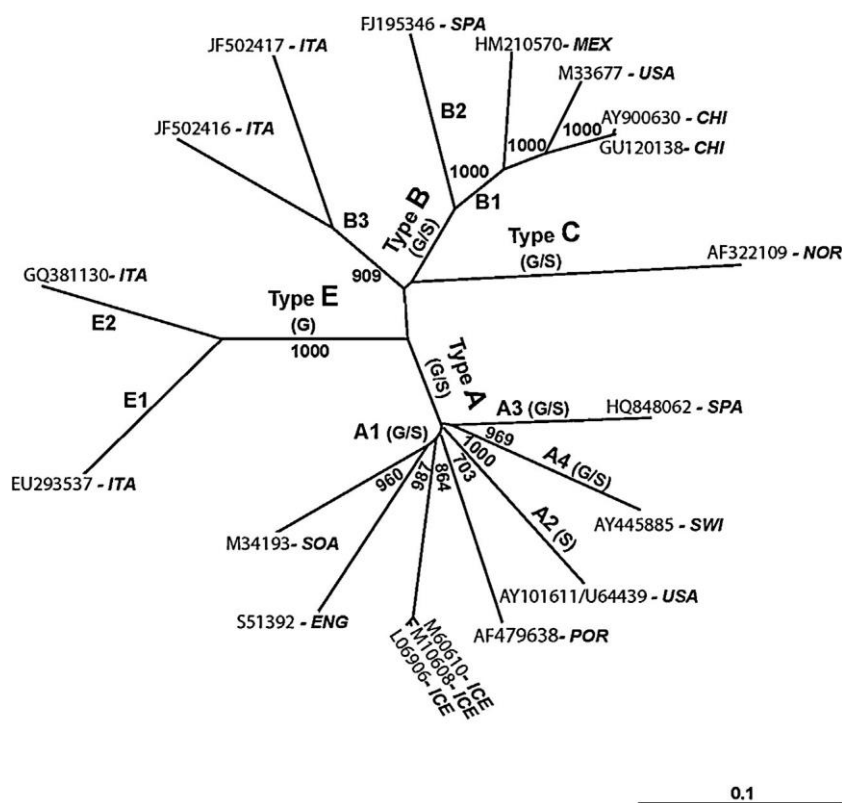
### 1.1.1 Historie onemocnění Maedi-visna

První zmínky o onemocnění maedi-visna s klinickými projevy progresivní pneumonie byly popsány roku 1915 v jižní Africe (Pépin a kol., 1998; Barták a kol., 2017). Podobný syndrom byl roku 1923 pozorován i v USA (Pasick, 1998). Pro pomalou rychlost viru při infikování jedince se ujal název *Lentivirus* (*lentus* (lat.) = pomalý) (Pépin a kol., 1998). Do povědomí veřejnosti se toto onemocnění dostalo až po roce 1939, kdy vznikl i současný název maedi-visna, pocházející z islandštiny, podle typických klinických projevů dyspnoe (maedi) a postižení centrální nervové soustavy (visna). Pojmenování MV vzniklo během největší epizootie infekce, která propukla na Islandu po importu Karakulských ovcí z Německa v letech 1931–1933 (Thormar, 2005; De la Concha-Bermejillo, 1997). Tyto ovce byly importovány pro zvýšení užitkovosti původního primitivního plemene krátkoocasé islandské ovce (Barták a kol., 2017). Po této epizootii došlo k detekování MV v různých zemích po celém světě s výjimkou Austrálie a Nového Zélandu (Tabet a kol., 2017). Roku 1985 došlo k prvnímu osekvenování viru Maedi-visna. Jednalo se o MVV s označením K1514 z islandské epidemie o velikosti ~ 9,2 Kb (Pasick, 1998).

## 1.1.2 Fylogenetické rozdělení MVV a CAEV

V současné době jsou genotypy SRLV rozdělené do pěti genotypů s označením A až E. Genotyp A se dělí na podtypy A1 až A13. Do tohoto genotypu patří viry napadající ovce i kozy. Genotyp B se dělí na podtypy B1 až B3 a tvoří ho klasické kmeny CAEV. Genotyp C infikuje ovce i kozy. Poslední dva genotypy D a E napadají pouze kozy (Minguijón a kol., 2015).

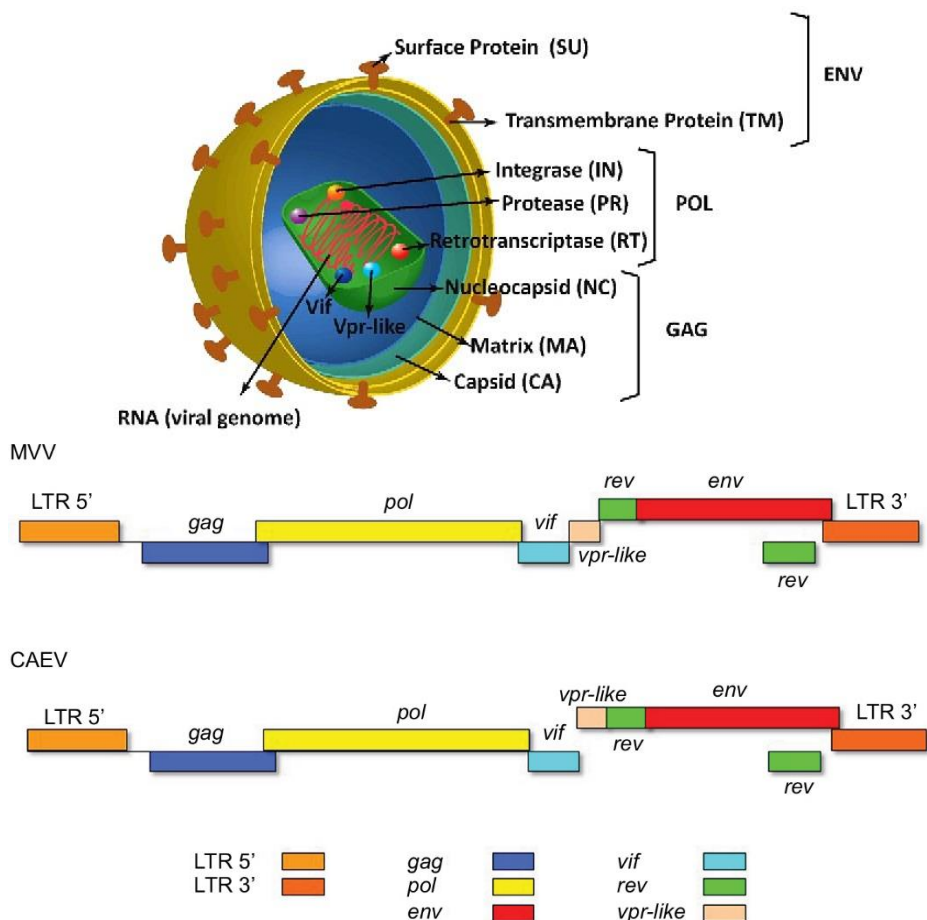
MVV a CAEV byly objeveny skoro ve všech zemích, kde se chovají ovce a kozy s výjimkou Islandu, kde došlo k úplné eradikaci MVV, Austrálie a Nového Zélandu. Nejrozšířenějšími genotypy jsou A a B. Genotyp C se vyskytuje v Norsku, genotyp D ve Španělsku a Švýcarsku a genotyp E v Itálii (Ramírez a kol., 2013).



Obrázek 1: Fylogenetické vztahy mezi jednotlivými genotypy SRLV (A-E) a subtypy (číslo izolátu země původu (CHI: Čína; ENG: Anglie; ICE: Island; ITA: Itálie, MEX: Mexiko, NOR: NOR, POR: Portugalsko, SOA: Jižní Afrika, SPA: Španělsko, SWI: Švýcarsko, USA: Spojené státy) (Minguijón a kol., 2015)

### 1.1.3 Virový genom

Lentivirové viriony SRLV mají průměr přibližně 80-100 nm a obsahují nukleokapsid s dimerem RNA, jenž má polaritu pozitivního vlákna o velikosti 8,4 – 9,2 Kb, kapsid, matici a obal (Minguijón a kol., 2015; Dimmock a kol., 2007). V centrální části viru se nachází genomnukleoproteinový komplex obsahující reverzní transkriptázu. Všechny lentiviry mají základní genetickou organizaci stejnou. Na obou koncích genomu viru se nachází nekódující dlouhé sekvence LTR (long terminal repeat), které poskytují signál potřebný pro transkripci, integraci a polyadenylaci virové RNA. Virový genom se skládá ze tří strukturálních genů: *gag* (kóduje nukleokapsid, kapsid a matriční proteiny, zajišťující vazbu mezi kapsidou a obalem), *pol* (kóduje proteázy, integrázy a reverzní transkriptázu) a *env* (kóduje glykoproteiny) (Obr.2) (Solanky a kol., 2000; Minguijón a kol., 2015; Maclachlan a kol., 2017). Dále virový genom obsahuje pomocné geny, lišící se počtem a úlohou v závislosti na daném genotypu lentiviru.



Obrázek 2: Struktura virové jednotky SRLV, rozdíly mezi MVV a CAEV genomem (Minguijón a ko., 2015; Gomez-Lucia a kol., 2018)

### 1.1.4 Replikace viru

Na rozdíl od ostatních retrovirů je provirová DNA lentivirů transkribována do buněčného jádra hostitele, ve kterém se poté replikují virové genomy (Minguijón a kol., 2015). Mechanismus reverzní transkripce je náchylný k chybám, proto se replikace lentivirů vyznačuje vysokou frekvencí bodových mutací (insercí a delecí). Četnost mutací se pohybuje okolo 0,1-2 mutace na genom a replikační cyklus (Pétrusson, 1994; Minguijón a kol., 2015; Ramírez a kol., 2013). Strukturní geny lentivirů, jako např. *gag*, *pol* či některé části *env* genu jsou vysoce konzervativní. Části strukturního genu *env*, kódující vazebná místa protilátek, jsou naopak vysoce variabilní (Murphy a kol., 1999; Maclachlan a kol., 2017).

Mutace, jež vedou k vysoké variabilitě, tvoří tzv. quasispecies. Koncept quasispecies byl navržený Manfredem Eigenem, který jej popsal jako populaci genetických variant, přičemž jedna z nich je dominantní. Virus, původně infikující zvíře, přežívá a zároveň koexistuje s novými variantami daného viru (Murphy a kol., 1999).

Rekombinace je dalším procesem, který vede ke genetické variabilitě během reverzní transkripce. U lentivirů je mnohonásobně vyšší šance výskytu rekombinace a mutace než u jiných zvířecích virů (např. 2,8krát vyšší možnost rekombinace než u HIV) (Blacklaws a kol., 2004). Rekombinace lze považovat za velkou evoluční výhodu ve srovnání s mutacemi. Hlavním důvodem této výhody je vznik prospěšných genetických kombinací, a zároveň i odstraňování nežádoucích, či dokonce škodlivých, chyb.

Mutace se také podílejí na překonání druhové bariéry. Tento přenos byl potvrzen u experimentálně infikovaných druhů volně žijících přežvýkavců (muflon) nebo přirozeně infikovaných přežvýkavců (kozorožec horský) (Murphy a kol., 1999).

### 1.1.5 Patogeneze lentivirů

Retroviry lze rozdělit do dvou skupin. Do první skupiny náleží HIV, FIV a SIV. Jsou to viry, replikující se v lymfocytech a makrofázích. Viry této skupiny způsobují syndrom získané imunodeficience a onemocnění postihuje centrální nervový systém či plíce. Druhá skupina zahrnuje SRLV, EIAV a BIV. Tyto viry se replikují v makrofázích a způsobují pomalá onemocnění plic, centrálního nervového

systemu, retikuloendoteliálního systému, mléčné žlázy nebo kloubů (Leroux a kol., 2010). Průběh a dopady jednotlivých lentivirových onemocnění (délka nemoci, napadené orgány, příznaky infekce) mohou být odlišné mezi jednotlivými zvířecími druhy. Virus MVV napadá buňky kostní dřeně – promonocyty (Leroux a kol., 2008), které následně proudí krevním řečištěm v podobě monocytů a zrají v makrofágy, ve kterých se replikuje virus (Heaton a kol., 2012; Gendelman a kol., 1985; Barták a kol., 2017).

Virus je z těla vylučován zejména plícemi, mlékem či kolostrum (Broughton-Neiswanger a kol., 2010). Jako primární cesta průniku viru do organismu se udává požití infikovaného kolostra/mléka nebo vdechnutí respiračních sekretů (Blacklaws a kol., 2004; Alshanbari a kol., 2014). Byl také prokázán přenos *in utero* spermatem, ale tomuto přenosu není přikládán velký význam.

#### **1.1.5.1 Přenos viru SRLV**

Přenos viru SRLV probíhá dvěma hlavními cestami: horizontálně a vertikálně. Při horizontálním přenosu dochází k infekci inhalací respiračních sekretů (Zink a Johnson, 1994; Pálsson, 1976). Horizontální přenos je úzce spjatý se zimním ustájením, kdy jsou ovce v těsném kontaktu. Existuje určitá možnost přenosu viru z nakažené pitné vody po její předešlé konzumaci nakaženými ovci, ale tento přenos je zatím teoretický a není prokázán žádnou studií (Pépin a kol., 1998).

Vertikální přenos je klíčovým faktorem epidemiologie MV. Při vertikálním přenosu dochází k šíření infekce od bahnic na jehňata přes kolostrum či mléko (Cutlip a kol., 1985; Lerondelle a Ouzrout, 1990). Po porodu dochází ke zvýšené tvorbě mléka a imunoglobulinů a tím dochází i ke zvýšené expresi lentivirů, které jsou ve formě proviru uvnitř makrofágů (Zink a Johnson, 1994).

Vzhledem k přítomnosti MVV ve všech tělních tekutinách je pravděpodobný přenos i spermatem. Sérologicky pozitivní berani vylučují virus spermatem, není však na 100 % potvrzen podobný mechanismus přenosu jako u pohlavních nemocí (Pálfi a kol., 1989).

### 1.1.5.2 Šíření SRLV v organismu

Hlavním faktorem šíření SRLV v těle jedince je interakce hostitel – virus na různých úrovních: buněčné (vstup, integrace, po integraci virového genomu do hostitelské DNA), tkáňové nebo hostitelské.

*In vivo* zůstává infekce latentní do doby než monocyt, cílová buňka pro SRLV působící jako “trojský kůň“ v těle hostitele, uzraje v makrofág a dojde ke spuštění kaskády virové transkripce (Sider a kol., 2013; Blacklaws a kol., 2004; Gendelman a kol., 1985). V *in vitro* podmínkách se liší replikace viru podle tkáně, ze které byl virus vyizolován. U virů vyizolovaných z mozkové tkáně docházelo k rychlejší replikaci než u izolátů z plic.

Po vniknutí viru do cílové buňky zahajuje imunitní reakce omezení šíření viru a replikačních pochodů v napadené buňce. Na inhibici viru se podílejí imunitní molekuly např. TRIM5 $\alpha$  (Tripartite motif-containing protein 5), která váže virové kapsidy, inhibuje integraci i postintegrační kroky (Jauregui a kol., 2012), APOBEC protein brání vzniku mutací v genech viru (Ramírez a kol., 2013). Lentiviry mají několik možností obrany proti imunitní reakci hostitele. Jednou z možností je mutace či rekombinace. Další možností obrany je virový protein *Vif* neutralizující protein A3Z3, který je kódován zmíněnou imunitní molekulou APOBEC, způsobující mutaci virového genomu (Ramírez a kol., 2013).

### 1.1.6 Klinické příznaky onemocnění Maedi-visna

Onemocnění MV může mít dva klinické projevy: maedi a visna. Forma maedi je nejběžnějším projevem onemocnění s velice dlouhou inkubační dobou. Teprve po uplynutí 3 let se poprvé projevují klinické příznaky u ovcí (problémy s pohybem, únava, dechové potíže). Je možné pozorovat výtok z nosu, suchý kašel, úbytek na váze (i přes příjem potravy), záněty kloubů nebo tuhá vazovitá ložiska v mléčné žláze. Forma maedi je nakonec fatální (Heaton a kol., 2012). Formy onemocnění maedi i visna mají stejně dlouhou inkubační dobu. V průběhu formy visna lze pozorovat nekoordinované pohyby při chůzi, netypické držení hlavy, slabost v zádech, třes pysků a v pozdějších fázích i poruchy hybnosti. V současné době se infekce MVV v podobě visny vyskytuje pouze sporadicky.

### **1.1.7 Současné způsoby eradikace MVV**

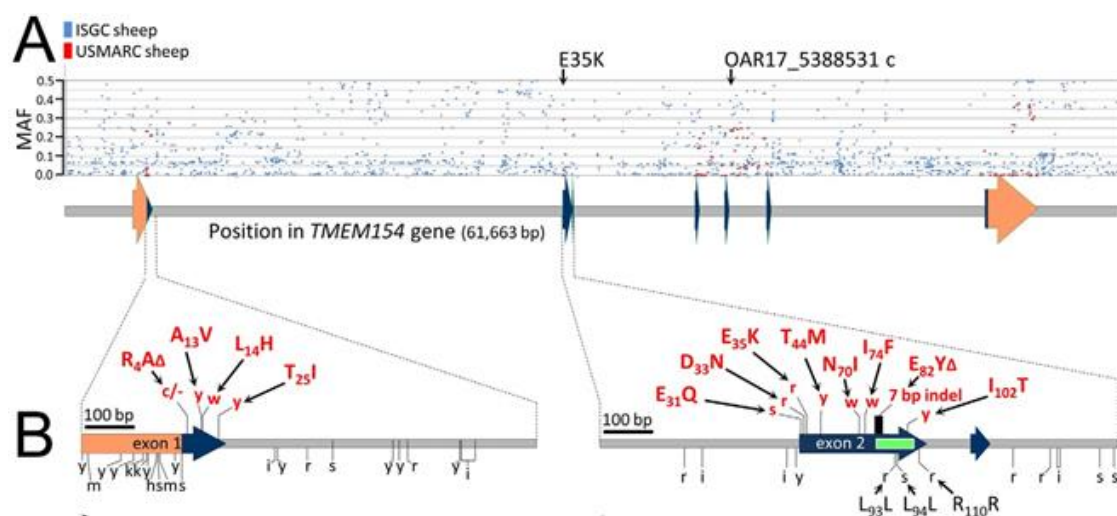
Proti infekci bylo navrženo několik ozdravovacích metod, bohužel se neshledaly s velkým úspěchem z důvodů dlouhé inkubační doby lentivirů a nepřesnými výsledky.

V současné době se kontrola SRLV provádí pomocí sérologických (ELISA test) a molekulárních (PCR) metod. PCR se používá v počáteční fázi infekce před začátkem tvorby protilátek. Díky těmto sérologickým a molekulárním metodám je možnost ozdravení chovů za předpokladu odstranění pozitivních ovcí již v ranějším věku (před propuknutím klinických příznaků).

Druhou možností je oddělení čerstvě narozených jehňat od nakažených bahnic a jejich krmení mlékem od séronegativní bahnice (Synge a Ritchie, 2010). Jelikož jsou tyto praktiky časově a finančně velmi náročné, je snaha najít jiné způsoby ochrany ovcí před SRLV.

## 1.2 Transmembránový protein TMEM 154

U určitých jedinců i po opakované expozici MVV byla potvrzena rezistence proti SRLV (Heaton a kol., 2012) přesto, že se nepodařilo mechanismus rezistence proti MVV zjistit. Proto se za pomoci SNP50 BeadChip čipů pro ovce hledaly kandidátní geny, podílející se na rezistenci k onemocnění (Heaton a kol., 2013). Nejsilnější vztah k odolnosti proti MVV byl nalezen v genu *TMEM154*, který kóduje transmembránový protein TMEM154. Původní alela *TMEM154* kóduje 191 aminokyselinový peptid a v poloze 35 se nachází kodon pro glutamát (E). Jedinci s tímto genotypem jsou náchylnější k infekci MVV. Zmutovaná alela *TMEM154* kóduje lysin (K) v poloze 35 a ovce s tímto genotypem mají zvýšenou rezistenci k SRLV (Heaton a kol., 2012). Doposud stále není zcela objasněna funkce transmembránového proteinu TMEM 154 v buňce ani jeho funkce během pronikání viru do buňky.



Obrázek 3: Obr.3 Mapa polymorfismu transmembránového genu *TMEM 154*.

Obr. 3A Znárodnuje genomovou mapu *TMEM 154* Modré šipky označují oblast kódujících exonů. Modré červené tečky označují polohu a frekvenci SNP.

Obr. 3B Oblasti *TMEM 154* cílených pro amplifikaci (Heaton a kol., 2013)

V genu *TMEM154* se na pozici 35 nachází celkem 11 možných haplotypů (Heaton a kol., 2013; Sider a kol., 2013). Na vzorcích z celého světa (75 chovů) se zjišťovaly nejběžnější kandidátní haplotypy pro rezistenci k MVV u ovcí (Heaton a kol., 2013). Haplotypy 1, 2 a 3 genu *TMEM154* jsou u ovcí nejběžnější (Sider a kol., 2013; Heaton a kol., 2012).



Homozygotní haplotyp 2 a heterozygotní haplotyp 3 kódují kompletní polypeptid s guaninem (E35) a guaninem/adeninem (E35K) na pozici 35. Haplotyp 3 je zároveň nejspíš původní verzí genu TMEM154, jelikož ovce s ním jsou nejvíce náchylné k MVV. Haplotyp 1 (polymorfismu K35) kóduje kompletní polypeptid s lysinem v pozici 35. Zřejmě se jedná o nejnověji zmutovaný haplotyp, spojený se sníženou citlivostí k SRLV (Heaton a kol., 2012). V Tab. 1 jsou zobrazeny haplotypy 1,2 a 3.

V posledních letech se začínají vyskytovat nově zmutované haplotypy, které, mají zkrácený polypeptid kódovaného TMEM154 a tím částečnou či úplnou ztrátu funkce transmembránového proteinu. K této ztrátě dochází u haplotypu 4 a 6. Z důvodu nedostatku ovcí s tímto haplotypem nebyl dosud řádně prozkoumán vliv na případnou odolnost k MVV. Ale existence těchto dvou polymorfismů ukazuje, že ovce bez plnohodnotné funkce genu TMEM154 mohou mít výhodu v ochraně proti MVV (Heaton a kol., 2012).

*Tabulka 1: Rozdělení haplotypů TMEM 154 (1 – K35, 2 – E35, 3 – E35K)  
Haplotypy 1,2 a 3 společně s odlišnostmi mezi jednotlivými variantami. Zároveň je vyznačen i polymorfismus, který byl vybrán jako kandidátní gen pro rezistenci k SRLV (Sider a kol., 2013)*

Haplotype	cgggg- [C,-]-gcgcg	cgccc- [T,A]-tttcc	tccca- [C,T]-ccgcc	aggag- [G,A]-acaca	acaca- [G,A]-aactg	aggca- [C,T]-ggaag	tataa- [A,T]-ttcta
	4a	14	25	33	35	44	70
1	R	L	T	D	K	T	N
2	R	L	T	D	E	T	I
3	R	L	T	D	E	T	N

## **2 Metody použité k detekci SRLV a genotypů TMEM154**

### **2.1 Sérologické metody k detekci SRLV**

Základní metodou pro detekci SRLV jsou imunodifuzní test (IDT/AGI) a imunoenzymatické testy (ELISA). Serologické metody se využívají k pravidelným zdravotním kontrolám nebo k identifikaci pozitivních chovů. Při odhalení pozitivních ovcí se přistupuje ke kombinaci sérologických metod (ELISA) s molekulárními metodami (PCR), aby se následně mohla infikovaná ovce vyřadit z chovu.

#### **2.1.1 ELISA**

ELISA (**E**nzyme-**L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay) je imunologická metoda, sloužící k detekci, popřípadě stanovení koncentrace antigenů. Jedná se o jednu z nejcitlivějších metod, sloužící k detekci protilátek na principu imunoenzymatické reakce. Tato metoda se opírá o dvě základní vlastnosti imunoglobulinů. V první řadě potenciálu navázat se na umělé hmoty a za druhé navázat enzym na FC fragmenty (fragment, díky němuž se protilátka může vázat na buňky mající příslušné receptory) imunoglobulinových molekul (Toman a kol., 2000).

V současné době se využívá řada modifikací ELISA testu (přímá metoda, nepřímá metoda, přímá sendvičová metoda, nepřímá sendvičová atd.). Principem metody je vazba antigenu na mikrotitrační plastikovou plotnu. K testovanému séru se přidá protilátka proti druhově specifickým imunoglobulinům konjugovaná s enzymem, a nakonec substrát reagující s enzymem. Po každém kroku dojde k promytí plotny z důvodu odstranění přebytečných reagentů. Pokud se v plotně nacházela protilátka, dojde k vytvoření komplexu enzym-substrát, a tím se buď mění barva nebo dochází k odštěpení produktů, které reagují s další látkou (chromogen) za tvorby barevné reakce. V jamkách, kde se nenacházela protilátka, nedojde k vytvoření komplexu enzym-substrát a nenastane barevná změna (Toman a kol., 2000).

## **2.2 Molekulární metody k detekci genotypů TMEM 154**

Molekulární metody slouží k detekci genu transmembránového proteinu TMEM154, k detekci SRLV v raných fázích infekce či pro rozlišení podkmenů viru.

Základním krokem pro veškeré analýzy DNA je schopnost jí vyizolovat. Cílem izolace je získání vzorku DNA pomocí fyzikálních či chemických metod ze zkoumaných biologických materiálů v dostatečném množství a s náležitou čistotou bez příměsí ostatních kontaminantů. Pro získání DNA ze vzorku je potřeba narušit buňku, rozvolnit její obsah, odstranit kontaminanty a všechny ostatní složky kromě extrahované DNA.

### **2.2.1 Izolace Chelexem 100**

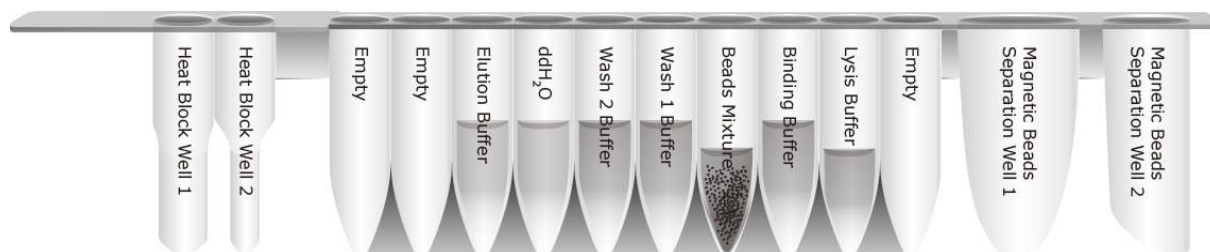
Chelex 100 slouží k izolaci DNA např. ze zaschlých krevních vzorků, vzorků kostí, tkání či vlasů. Nevýhodou izolace Chelexem 100 je horší čistota získané DNA. Výhodou je minimalizace kontaminace vzorku, protože celý proces probíhá v jedné zkumavce, rychlost extrakce a relativně nízké cenové náklady (Polski a kol., 1998).

Chelex je pryskyřice (kopolymer styren divinylbenzenu), která obsahuje ionty vázající se na dvojmocné kationty  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  a především  $\text{Mg}^{2+}$  zapříčiňující poškození DNA během extrakce za vysokých teplot (~ 100 °C). Principem je destrukce a degradace buněčných membrán, proteinů a denaturace DNA v alkalických podmínkách za vysoké teploty (Čurn a kol., 2018).

## 2.2.2 Izolace Kitem MagCore® Genomic DNA Whole Blood

Komerční kit MagCore® Genomic DNA Whole Blood se používá k izolaci DNA (genomové, mitochondriální či virové) z krve, plazmy, séra, buffy coatu. K izolování DNA se využívá kazeta, obsahující proteinázu K a chaotropickou sůl k lyzaci buněk a degradaci proteinů. Principem izolace je vazba DNA na celulózu potažené magnetické kuličky. Po promytí od kontaminantů se purifikovaná DNA rozpouští slabým elučním pufrem.

Takto vyizolovaná DNA se vyznačuje vysokou čistotou a vyšší analytickou citlivostí je proto vhodná pro PCR, real-time PCR, genotypizaci, sekvenování.



Obrázek 4: Kazeta s Kitem MagCore® Genomic DNA Whole Blood pro izolaci DNA z krve (<https://www.rbcbioscienceusa.com/product/magcore-genomic-dna-whole-blood-kit/>)

### 2.2.3 PCR

Metoda PCR slouží k selektivní amplifikaci vybraných oblastí molekuly DNA v *in vitro* podmínkách. Pro tuto metodu může být použita DNA vyizolovaná z různých zdrojů, jejíž amplifikací se dají získat miliony stejných kopií vybrané oblasti DNA.

Polymerázová řetězcová reakce je metoda rychlého namnožení určitého úseku DNA, jejímž principem je replikace nukleových kyselin. K amplifikaci můžeme vybrat libovolný úsek z libovolné molekuly DNA (tkáň živočišně, rostlinné, ale i komplementární DNA) pokud známe okrajové sekvence tohoto úseku (Brown, 2007; Ishmael a Stellato, 2008). PCR proběhne jedině tehdy, když dva krátké oligonukleotidy hybridizují s molekulou DNA, jsou přítomny 4 základní nukleotidy adenin, thymin, guanin a cytosin, enzym DNA polymeráza, prodlužující amplifikovaný úsek (Ishmael a Stellato, 2008), voda a  $Mg^{2+}$  ionty, které slouží ke zpevnění vazby DNA – polymeráza.

Základní kroky PCR jsou následující:

(1) Počáteční denaturace

- Rozrušení vodíkových můstků spojující k sobě vlákna DNA

(2) Denaturace

- dsDNA je denaturovaná na jednotlivá vlákna

(3) Annealing

- Při této teplotě dochází k nasedání krátkých oligonukleotidů neboli primerů na specifická místa ssDNA dle komplementarity bází.
- Teplota a doba nasedání primerů závisí na délce a složení jednotlivých primerů

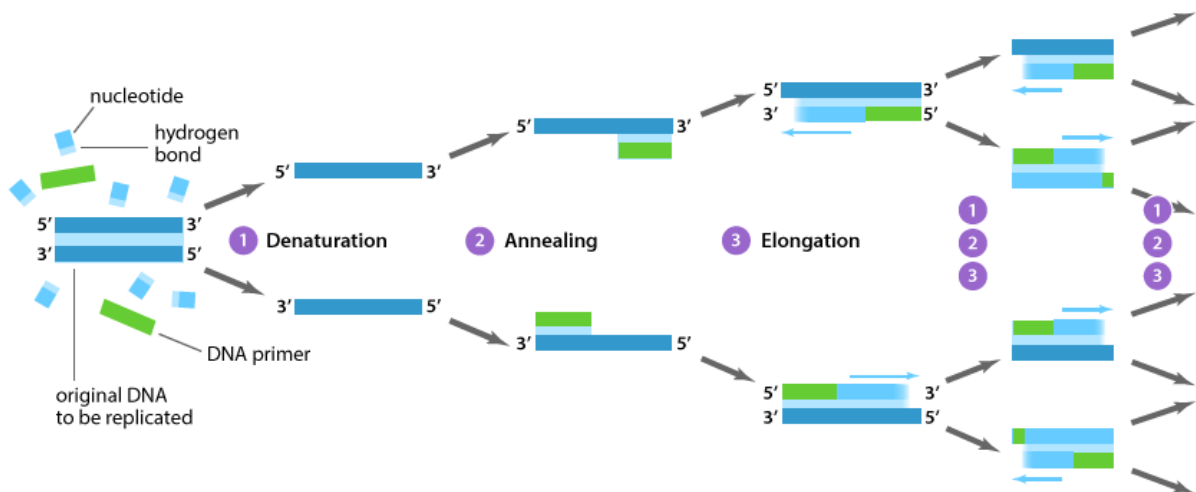
(4) Elongace

- Dochází k aktivaci enzymu *Taq* DNA polymerázy, které se připojuje k primerům, které jsou jejich startovací místa a od nichž dochází k syntéze nového vlákna komplementárního k templátovým molekulám DNA
- Syntéza probíhá ve směru  $5' \rightarrow 3'$

## (5) Závěrečná elongace

- Dochází ke komplementaci všech amplifikovaných úseků DNA

Kroky 2, 3 a 4 se cyklicky opakují 25 – 40x. Což má za následek geometrické navýšení amplikonů po každém cyklu. Lze to také vyjádřit jako  $2^n$ , kde n je počet cyklů (Ishmael a Stellato, 2008).



Obrázek 5: Průběh PCR reakce

([https://www.abmgood.com/marketing/knowledge\\_base/polymerase\\_chain\\_reaction\\_introduction.php](https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_introduction.php))

## 2.2.4 Sanger-Coulsonova metoda sekvenování

Jedná se o metodu, založenou na enzymaticky katalyzované terminaci syntézy DNA po zabudování dideoxyribonukleotidu do nově vznikajícího komplementárního vlákna.

Stejně jako při metodě PCR je potřeba krátkých oligonukleotidových primerů, které se připojí na templátovou DNA a slouží jako startovací bod pro syntézu druhého vlákna DNA polymerázou. Je nutná přítomnost všech čtyř deoxyribonukleotidů (2'-deoxyguanozin 5'-trifosfát (dGTP), 2'-deoxytymidin 5'-trifosfát (dTTP), 2'-deoxyadenozin 5'-trifosfát (dATP), 2'-deoxycytidin 5'-trifosfát (dATP)). Poslední složkou je modifikovaný nukleotid nazývaný dideoxynukleotid (např. dideoxyATP), který se zabuduje do prodlužujícího se polynukleotidového řetězce stejně jako normální nukleotid s tím rozdílem, že blokuje další syntézu vlákna (Sanger a kol, 1977). Důvodem blokace další syntézy je absence hydroxylové skupiny na 3' konci, která zajišťuje připojení dalšího nukleotidu do řetězce (Sanger a kol, 1977). Výsledkem je terminace řetězce tam, kde dojde k zabudování dideoxynukleotidu.

Syntéza jednotlivých vláken probíhala ve čtyřech zcela samostatných reakcích, kdy se v každé reakci nacházel jiný dideoxynukleotid (dideoxyATP, dideoxyCTP, dideoxyTTP a dideoxy GTP) (Sanger a kol, 1977).

Dříve se po syntéze separovala jednotlivá vlákna na gelové elektrofoze. Separace byla prováděna na tenkých akrylamidových gelech (max. 0,5 mm) obsahujících močovinu, která DNA denaturovala, a nově syntetizovaná vlákna se oddělila od templátu. Z důvodu opětovného nespojení vláken se elektroforéza prováděla za vysokého napětí a teploty min. 60°C.

Vizualizace sekvencí se prováděla ručně na tzv. autoradiogramu (Sanger a kol, 1977). Našel se proužek, který putoval nejdále a je tudíž nejmenší a začáteční. Takto se postupovalo dále proužek po proužku, dokud se nedošlo k místu, kde byly proužky tak nakupené, že se nedalo poznat jaký proužek je následující (Brown a kol., 2007).

#### **2.2.4.1 Automatizovaná verze Sanger-Coulsonovy metody**

K automatizaci sekvenování DNA se používá metoda popsaná výše pozměněná v jednom podstatném bodu. V tradiční metodě terminace řetězců se nově vzniklé řetězce zakončují radioaktivními značkami a poté sekvence čteme z autoradiogramu. Bohužel takovéto značky nejsou ideální z důvodu negativního vlivu na zdraví, a proto není ideální používat je v automatizovaných metodách, kde by pracovník přicházel do kontaktu s touto látkou pořád.

Proto se začala používat hybridizace *in situ* a na místo radioaktivního značení se používají fluorescenční značky. Fluorescenční značení je připojeno k dideoxynukleotidům na 3' konec. Jelikož pro každý dideoxynukleotid můžeme použít jiný fluorochrom, nemusíme provádět čtyři oddělené reakce a následně je identifikujeme dle charakteristického fluorescenčního signálu.

K detekci je zapotřebí speciální snímací systém a počítač, jenž bude odečítat sekvence DNA. K detekci se používá polyakrylamidový gel s jamkami či trubicový kapilární systém do kterých se nadávkuje reakční produkt a nechá se procházet detektorem. Detektor identifikuje jednotlivé signály a posléze je přeposílá do počítače, který je převede na příslušnou sekvenci DNA.



## **3 Hypotézy a cíle práce**

### **3.1 Hypotézy**

Typ alely genu pro transmembránový protein TMEM154 ovlivňuje vnímavost ovcí k viru SRLV.

Ovce s alelou genu transmembránového proteinu TMEM154 K35 jsou rezistentní proti MVV. Ovce s alelou genu transmembránového proteinu nejsou rezistentní proti MVV.

### **3.2 Cíle**

Cílem práce bylo odlišit jednotlivé genotypy ovcí, lišící se polymorfismem genu pro transmembránový protein TMEM154, který se nachází na 35. pozici.

Dalším cílem bylo porovnat získané výsledky genotypizace s výsledky sérologického vyšetření testovaných ovcí na přítomnost SRLV a prokázat/vyloučit korelaci mezi SRLV a polymorfismy na 35. pozici genu pro transmembránový protein TMEM154.

## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Odběr vzorků krví

Pro diagnostické účely se odebírala periferní krev od ovcí ve věku minimálně 4. měsíce po odstavu. Vzorky byly odebírány z chovů, které nejsou zařazeny do pravidelné kontroly užitkovosti.

Krev byla odebírána do 10 ml zkumavek s předem připraveným antikoagulantem K<sub>3</sub>EDTA. Po odebrání vzorku bylo nutné okamžitě promíchat krev s antikoagulantem a převézt ji zchlazenou ihned do laboratoře, kde byla dále zpracována.

Vzorky krví byly odebrány ze 14 chovů. Bylo odebráno celkem 2 728 vzorků a z toho 587 vzorků sérologicky pozitivních na protilátku proti SRLV a 2060 vzorků sérologicky negativních.

Tabulka 2: Souhrnný přehled chovů s počtem zvířat rozdělených na sérologicky pozitivní a negativní

Chov	Počet (ks)	ELISA	
		Pozitivní	Negativní
1.	150	23	126
2.	230	20	210
3.	200	97	103
4.	8	0	8
5.	431	42	383
6.	48	0	48
7.	90	0	90
8.	50	0	50
9.	248	0	248
10.	91	0	91
11.	206	0	206
12.	579	208	371
13.	150	39	111
14.	274	154	120

## 4.2 ELISA

Sérologická diagnostika na průkaz protilátek proti lentivirům byla provedena ve Státním veterinárním ústavu Jihlava za použití komerčních ELISA testů.

Jako základní test pro analýzu byl zvolen ELISA test IDEXX MVV/CAEV p28 Screening Test. Konfirmačním testem pro všechny suspektivní vzorky byl zvolen ELISA test IDEXX MVV/CAEV p28 Ab Verification Test (Barták a kol., 2017).

## 4.3 Izolace DNA z krve

Byly použity dvě metody izolace DNA, Chelexem 100 (Bio-Rad, USA) a izolace komerčním kitem Mag Core<sup>®</sup> Genomic DNA Whole Blood Kit (RBC Bio Science corp., Taiwan). Chelexem 100 byla vyizolována DNA zhruba u 95 % všech vzorků. Komerční kit Mag Core<sup>®</sup> Genomic DNA Whole Blood Kit byl použit u vzorků, které nebyly ideálně vyizolovány Chelexem 100.

### 4.3.1 Izolace DNA Chelexem 100

DNA byla izolována z celkového objemu 50  $\mu$ l krve. Vzorek krve byl před samotnou izolací 3x přečištěn 500  $\mu$ l TE pufru (1M Tris base, 100mM EDTA, H<sub>2</sub>O). Po přidání TE pufru k vzorku byla celá směs promíchána a následně centrifugována při 14 000 rpm/5 min. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a pelet ještě 2x přečištěn.

K přečištěnému peletu krve bylo napipetováno 100  $\mu$ l 5 % Chelexu 100, následně proběhla krátká centrifugace a přidání 1  $\mu$ l Proteinázy K (ředění 50 mg/ml, Top-bio s.r.o., ČR). Mikrozkuhavka se vzorkem byla vložena do předem předeřátého termobloku a inkubována 45 minut při 56 °C. Po inkubaci byl vzorek krátce promíchán a inkubován při 98 °C 10 minut.

Množství a čistota vyizolované DNA byla změřena spektrofotometricky na BioSpec-nano (Shimadzu corp., Japonsko) a vyizolovaná DNA uchována při teplotě - 20 °C.

### 4.3.2 Izolace DNA pomocí robotické stanice

DNA z části vzorků se izolovala pomocí komerčního kitu Mag Core® Genomic DNA Whole Blood Kit v automatické robotické stanici MagCore NucleicAcid Extractor (RBC Bioscience corp.) dle manuálu výrobce.



Obrázek 6 Princip izolace DNA za pomoci Kitu MagCore® Genomic DNA Whole Blood (<http://www.labgene.ch/nucleic-acids-purification/151-magcore-hf16.html>)

## 4.4 Navržení oligonukleotidových primerů pro PCR

Oligonukleotidové primery byly navrženy v programu PRIMER3 (Untergasser a kol., 2012). Forward primer se nachází v genu TMEM 154 v oblasti 28 861 bp, reverse primer je v oblasti 29 701 bp (Obr.6). Samotný polymorfismus E35K se nachází v pozici 29 168 bp.

```

28861  tattgtgcta  gacactgcca  agcttctcag  tgccctttgc tgaagtgcct ctgaaccgcc
28921  tgcctttgtg  ggagatttat  ctctggcttc  tgattgattc  cacgttgaat  gtactcccag
28981  cttgagctcc  atttatgttc  aatcaatact  ctgtgtcatg  ctgaactgga  agaccaaatc
29041  cagtggatca  agtttctcgc  tggatgcatg  gagggtaagt  ttcagatcat  tgaaaacata
29101  ccgtactagt  ttcgtctcca  tgacaagtct  caattttgta  tgtgttycca  caggagagga
29161  gracacaaa  ctgtcaggag  acgtgcccc  aggcayggaa  ggcttgatg  aagagtcaga
29221  ggccctaagc  aacttgctt  cagtgaccac  agaaccttac  atcaccagta  taawttctac
29281  ctttattgac  gaagacacag  accagttaga  gtttatatta  atgggtgtga  tcccagtgat
29341  tttactctct  ctctgcttc  tatcagcgat  actccttata  atataccata  aaagaaaaag
29401  gaataaaca  ggtaaattt  ttgcctgttc  tcatttctag  acaactgctc  catgtgttca
29461  tgaataattg  ataaaacaca  atgctttctg  cttccacaca  gagccctcta  gcccaaggatc
29521  tcagagtgtt  ttacagacac  gtgagtatta  ttctaacacc  tgcctggaga  tgggatgggg
29581  tgggcaaaga  aactgagatg  tttttaagtg  aagcagctac  ataaaataat  gagtgatgac
29641  ttgtttcagt  gacattttcc  aaaatttaga  aatgtcatat  acctttctat  ttaaaaaaaa
29701  gaaacagaaa atgccttcag cctaaactga  aaattgaaac  acacagcttc  catctctgta

```

Obrázek 7: Mapa ovčího transmembránového proteinu TMEM 154(GenBank: HM355886.3) s vyznačenými foward, reverse primery a SNP E35K

Tabulka 3: PCR primery TMEM 154

TMEM154Foward (IntegratedDNA Technologies,USA)	TTT GCT GAA GTG CCT CTG AA
TMEM154Reverse (IntegratedDNA Technologies, USA)	GGC TGA AGG CAT TTT CTG TT

## 4.5 PCR

Amplifikace DNA probíhala v konvenčním termocykleru T3000 (Biometra, Německo), ve kterém byla provedena i gradientová PCR pro zjištění specifické teploty pro nasedání primerů.

Tabulka 4: Složení PCR reakce

Reagencie	Objem (μl)
PCR H <sub>2</sub> O (Top-bio s.r.o., ČR)	9,5
PPP Mastermix (Top-bio s.r.o., ČR)	12,5
Primer TMEM154 F	1
Primer TMEM154 R	1
Extrahovaná DNA	1

PCR probíhala v objemu 25 μl. PCR reagencie byly prvně rozmrazeny, promíchány a smíchány v řádném poměru (Tab.5). Průběh PCR reakce je v Tab.6.

Tabulka 5: Průběh PCR reakce

Krok	Teplota (°C)	Čas
1. Denaturace a aktivace	94	2 min
2. Denaturace	94	30 s
3. Annealing	58,5	30 s
4. Elongace	72	50 s
Cyklování kroku (2–4)		30x
5. Závěrečná elongace	72	7 min
6. Chlazení	4	∞

## 4.6 Vizualizace fragmentů

Produkty PCR reakce se vizualizovaly na 2 % agarózovém gelu v 1x TBE pufru (Trizma base, kyselina boritá, 0,5 M EDTA). DNA fragmenty byly obarveny za pomoci ethidium bromidu a společně se 100 bp DNA ladderem (velikostní marker) separovány v gelu při 120 V / 1 h. Gel se vyhodnocoval za pomoci UV transluminátoru s UV světlem o vlnové délce 312 nm., snímacího kamerového systému a vyhodnocovacího softwaru.

## 4.7 Sekvenování amplikonu

Vzorky naamplifikované DNA se před sekvenováním ošetřovaly kitem ExoSap-IT (Affymetrix, USA) z důvodu odstranění nepotřebných nukleotidů a zbytku primerů. Tento kit je směs hydrolytických enzymů – exonukleáz a alkalické fosfatázy. Exonukleázy odstraňují primery a alkalická fosfatáza zbytky nukleotidů z konečného produktu.

Postup:

- K 10  $\mu$ l PCR produktu se přidaly 2  $\mu$ l ExoSapu-IT a nechalo se inkubovat při 37 °C/15 min. V následujícím kroku se inaktivoval ExoSap při 80 °C/15 min. K reakci se přidal jeden z primerů v množství 5  $\mu$ l před sekvenováním.

Po přečištění byly vzorky zaslány do externí laboratoře SeqMe s.r.o. (Dobříš), kde byly osekvenovány Sangerovou metodou na kapilárním analyzátoru Applied Biosystems 3500 prostřednictvím Big dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Čurn kol., 2018).

K vyhodnocení sekvencí byly použity programy Geneious (Biomatters, Nový Zéland) a Mega7 (Pennsylvania State University, USA).

## 4.8 Statistické vyhodnocení

Získaná data byla zpracována pomocí Microsoft Excel, analyzována v programu STATISTICA (StatSoft CR s.r.o., ČR) a vyhodnocena Pearsonovým  $\chi^2$  testem.



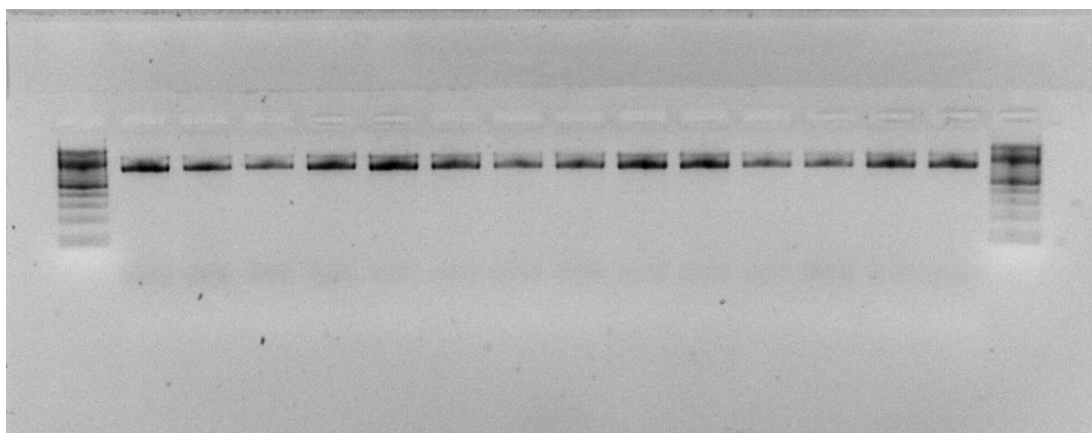
## 5 Výsledky

V rámci výzkumu SRLV bylo odebráno 2752 vzorků krví ze 14 chovů. K detekci genotypů TMEM154 byly použity pouze vzorky sérologicky pozitivních a sérologicky negativních ovcí z chovů, kde byla ELISA testem potvrzena přítomnost SRLV. Celkově bylo analyzováno 605 vzorků z 8 sérologicky pozitivních chovů, přičemž prevalence MVV infikovaných ovcí se pohybovala od 8,69 do 56,2 % (Tab.7).

Tabulka 6: Prevalence SRLV v jednotlivých chovech

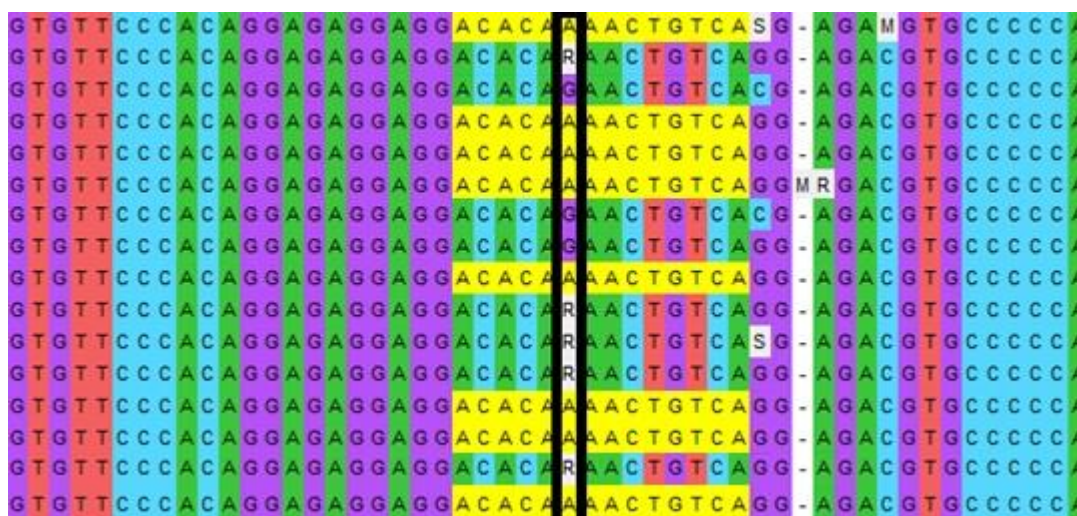
<b>Číslo chovu</b>	<b>Celkový počet zvířat</b>	<b>Prevalence v %</b>
1.	150	16
2.	230	8,69
3.	200	52
4.	8	0
5.	431	9,28
6.	42	0
7.	90	0
8.	50	0
9.	248	0
10.	91	0
11.	206	0
12.	579	35,92
13.	150	34,51
14.	274	56,2

U všech analyzovaných vzorků byla provedena PCR z důvodu amplifikace produktu o očekávané délce 865 bp a posléze elektroforéza k vizualizaci amplifikonů (Obr.7).



Obrázek 8: Vizualizace amplifikonů z PCR reakce na 2 % agarózovém gelu v UV transluminátoru

Pro identifikaci jednotlivých genotypů bylo zapotřebí osekvenovat amplifikované produkty, protože jednotlivé polymorfismy se neliší délkou fragmentů (Obr. 7).



Obrázek 9: Aligment genotypů – K35 s bazí A (adenin), E35 s bazí G (guanin) a genotyp E35K s nukleotidem R (adenin nebo guanin); program Mega7

Tabulka 7: Početní a procentuální zastoupení genotypů vyšetřovaných pozitivních ovcí v chovech

Chov	Sérologické vyšetření ELISA					
	Pozitivní					
	K35		E35		E35K	
	Počet	%	Počet	%	Počet	%
1	5	21,74	1	4,35	17	73,91
2	8	40,00	2	10,00	10	50,00
3	50	48,08	2	1,92	52	50,00
5	0	0	22	55	18	45
12	36	43,37	7	8,43	40	48,19
14	5	12,82	10	25,64	24	61,54
15	3	15,78	10	52,63	6	31,58

Pomocí sekvenování a následného vyhodnocení v programu Mega7 (Obr.8) byla zjištěna přítomnost tří genotypů K35, E35 a E35K s rozdílnými zastoupením u sérologicky pozitivních i sérologicky negativních ovcí (Tab.8, Tab. 9).

Tabulka 8: Početní a procentuální zastoupení genotypů vyšetřovaných negativních ovcí v chovech

Chov	Sérologické vyšetření ELISA					
	Negativní					
	K35		E35		E35K	
	Počet	%	Počet	%	Počet	%
1	19	79,17	0	0	5	20,83
2	11	55,00	1	5,00	8	40
3	16	29,63	10	18,52	28	51,85
5	7	16,28	14	36,56	22	51,16
12	44	58,67	7	9,33	24	32
14	24	61,54	4	10,26	11	28,21
15	8	36,36	3	13,64	11	50

Ovce s homozygotním genotypem K35 a bází adenin na 35. pozici, který v tripletu kóduje aminokyselinu lysin se v chovech s potvrzeným výskytem MVV vyskytovaly od 0 % (chov 6), kde nebyly vůbec zastoupeny, do 48,08 % (chov 4). Ovce s genotypem K35 se v chovech bez přítomnosti MVV vyskytovaly od 16,28 % (chov 6) do 79,17 % (chov 1). Ze tří identifikovaných genotypů (K35, E35, E35K) má genotyp K35 nejvyšší míru rezistence k onemocnění MV.

Jedinci s homozygotním genotypem E35, u kterých se na pozici 35 nachází báze guanin, která v kodonu kóduje aminokyselinu glutamin, byli u chovů s potvrzeným výskytem MVV identifikováni od 1,92 % (chov 4) do 55 % (chov 6). U chovů bez přítomnosti MVV se výskyt pohyboval mezi 0 % (chov 1), kde nebyl nalezen, až 32,56 % (chov 6).

Ovce s heterozygotním genotyp E35K mají na pozici 35 bázi adenin nebo guanin. Výskyt jedinců s genotypem E35K u chovů s potvrzeným výskytem MVV byl od 31,58 % (chov 20) do 73,91 % (chov 1). V chovech, kde nebyl výskyt MVV potvrzen bylo zastoupení ovcí s genotypem E35K od 20,00 % (chov 17) do 51,85 % (chov 4). Na rozdíl od ovcí s genotypem K35 se jedinci s genotypem E35K vyznačují nejvyšší náchylností k onemocnění MV.

Tabulka 9: Distribuce polymorfismu v genech TMEM154 v testovaných chovech ovcí

	Počet n	K35		E35		E35K	
		Počet	%	Počet	%	Počet	%
Pozitivní	328	107	32,6	54	16,5	167	50,9
Negativní	277	129	46,6	39	14,1	109	39,3

Pohled na distribuci genotypů napříč všemi chovy (Tab. 10) ukazuje celkový počet sérologicky pozitivních a sérologicky negativních ovcí i s početním a procentuálním rozdělením jednotlivých genotypů. V pozitivních chovech bylo pomocí ELISA testu zjištěno 328 infikovaných ovcí. Sekvenováním byl určen počet jednotlivých genotypů, kdy se genotyp K35 vyskytoval u 107 ovcí (32,6 %), genotyp E35 u 54 ovcí (16,5 %) a E35K u 167 ovcí (50,9 %). 277 vyšetřovaných ovcí bylo sérologicky negativních a genotyp K35 se vyskytoval u 129 ovcí (46,6 %), genotyp E35 u 39 ovcí (14,1 %) a genotyp E35K u 109 ovcí (39,3 %).

Tabulka 10: Kontingenční tabulka analýzy genotypů ovce (Pearson  $\chi^2 = 14,4479$ ,  $df=2$ ,  $p < 0,05$ )

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

\* Statisticky významné hodnoty

Pro statistické vyhodnocení byl použit Pearsonův  $\chi^2$  test (Tab.11). Ovce s genotypem K35 byly sérologicky pozitivní ve 107 případech ( $p < 0,05$ ) a ovce s genotypem E35K sérologicky negativní ve 109 případech ( $p < 0,05$ ).

## 6 Diskuse

MVV je původce onemocnění Maedi-visna ovcí z čeledi *Retroviridae*, rodu *Lentivirus* (Heaton a kol., 2013; Minguijón a kol., 2015; Ramírez a kol., 2013) a na celém světě je snaha snížit prevalenci tohoto onemocnění. Heaton a kol. (2012) potvrdili rezistenci proti MVV i po opakované expozici viru, ale nevěděli, čím to je způsobené. Proto se za pomoci SNP50 BeadChip zkoumaly kandidátní geny, zvyšující rezistenci ovcí k MVV a několik jich bylo objeveno (Heaton a kol., 2013). Nejsilnější vztah k vnímavosti/odolnosti ovcí k MVV byl nalezen v genu transmembránového proteinu TMEM154 (Heaton a kol., 2012; Sider a kol., 2013; Alshanbari a kol., 2014).

Vnímavost/odolnost ovcí k MVV ovlivňuje na transmembránovém proteinu TMEM154 polymorfismus na 35. pozici způsobující změnu aminokyseliny (Leymaster a kol., 2013; Sider a kol., 2013; Guan a kol., 2014). Na celém světě bylo objeveno 11 možných polymorfismů na 35. pozici genu transmembránového proteinu TMEM154 u ovcí (Heaton a kol., 2013). V České republice byly zdokumentovány pouze 3 nejčastější polymorfismy na 35. pozici genu transmembránového proteinu TMEM154 u ovcí (Čurn a kol., 2018). Jednalo se o polymorfismy na 35. pozici genu transmembránového proteinu TMEM154 s označením K35, E35 a E35K (Heaton a kol., 2013; Sider a kol., 2013; Molaei a kol., 2018). U ovcí s homozygotním genotypem K35, u kterých se na 35. pozici nachází báze adenin, která v tripletu s dalšími dvěma bázemi kóduje aminokyselinu lysin. Ovce s tímto genem se jeví jako nejodolnější k infekci způsobenou MVV (Heaton a kol., 2013). U jedinců s homozygotním genotypem E35, u kterých se na pozici 35 nachází báze guanin, který s dalšími dvěma bázemi kóduje aminokyselinu glutamin. Ovce mající tento polymorfismus genu E35 jsou více náchylné k onemocnění způsobeným MVV. Nejvíce vnímavé k MVV jsou ovce s heterozygotním genotypem označeným E35K, kde se na 35. pozici nachází báze adenin/guanin a asociovaná aminokyselina lysin/glutamin. (Heaton a kol., 2012; Heaton, 2013; Sider a kol., 2013; Leymaster a kol., 2013; Molaei a kol., 2018).

Z výsledků analýz byla potvrzena vnímavost/odolnost MVV v závislosti na daném polymorfismu. Jedinci s polymorfismem genu, označeným E35K, kódující lysin/glutamin u transmembránového proteinu TMEM154 s nejvyšší vnímavostí k MVV, se vyskytovali u 50,9 % všech sérologicky pozitivních ovcí a u

39,3 % sérologicky negativních ovcí. Ovce s polymorfismem genu označeným E35, zařazujícím glutamin do struktury transmembránového proteinu TMEM154 se sníženou vnímavostí k MVV, se vyskytovali u 16,5 % sérologicky pozitivních ovcí a u 14,1 % sérologicky negativních ovcí. Ovce mající polymorfismus genu označeným K35, kódující lysin do struktury transmembránového proteinu TMEM154 s nejvyšší odolností k MVV, se nacházel u 32,6 % sérologicky pozitivních ovcí a u 46,6 % sérologicky negativních ovcí.

Výskyt ovcí s odolným genotypem mezi sérologicky pozitivními jedinci a výskyt ovcí s vnímavým genotypem mezi sérologicky negativními jedinci nepotvrdila hypotézu o rezistenci jedinců s genotypem K35 ( $\chi^2 = 14,4479$ ,  $df=2$ ,  $p < 0,05$ ). Větší podíl sérologicky negativních jedinců s genotypem E35K je nejspíš způsoben tím, že ovce jsou SRLV infikovány krátce a nebylo možné virus identifikovat. Ovce s polymorfismem K35 se sice vyskytovaly ve všech sérologicky pozitivních chovech, ale zastoupení jedinců s tímto polymorfismem, až na jednu výjimku (chov 4), byl vždy menší než u sérologicky negativních chovů, jak vyplývá z výsledků. Fakt, že se MVV vyskytuje i u sérologicky pozitivních ovcí s polymorfismem K35, odolným k viru, se dá vysvětlit mutací a vznikem nové varianty viru, který je schopný překonat bariéry rezistence (Molae a kol., 2018). Dalšími faktory ovlivňujícími odolnost ovcí k MVV jsou podmínky chovu, stáří jedince a plemeno (Sider a kol., 2013; Molae a kol., 2018).

Genotyp K35 se vyskytuje téměř po celém světě s výjimkou několika oblastí Blízkého východu (Turecko, Džammú a Kašmír, Bangladéš, Indie, Indonésie, Tibet), kde dominuje jeden z prapůvodních genotypů E35 (Heaton a kol., 2013). Radikální selekce pozitivních jedinců na SRLV a šlechtění ovcí na odolný genotyp K35 by bylo možnou alternativou, jak snížit prevalenci SRLV. Zároveň se objevují nově zmutované typy genotypů (haplotyp 4 a 6) (Heaton a kol., 2013), způsobující zkrácení kódovaného transmembránového proteinu TMEM154, což má za následek částečnou či úplnou ztrátu funkce proteinu (Heaton a kol., 2013). V budoucnu by tyto haplotypy mohly být také možnou cestou k eradikaci onemocnění MV, protože ztráta funkce transmembránového proteinu TMEM154 může snížit schopnost viru proniknout do hostitelské buňky.

## 7 Závěr

Z výsledků plyne, že existuje závislost vzniku onemocnění Maedi-visny na polymorfismu nacházejícím se na 35. pozici transmembránového proteinu TMEM154. Ovce s odolným genotypem K35 byly infikovány MVV méně, než ovce s náchylným genotypem E35K, což by také odpovídalo teorii o zvýšené rezistenci spojené s transmembránovým proteinem TMEM154. Dále se potvrdilo, že má smysl, na základě zvýšeného počtu ovcí s genotypem K35 na straně sérologicky negativních a zároveň zvýšeného počtu ovcí s vnímavým genotypem E35K na straně sérologicky pozitivních, testovat ovce na vnímavost/odolnost k SRLV způsobeným polymorfismem genu TMEM 154 a následná selekce může mít pozitivní vliv na prevalenci SRLV. Z výsledků je patrné, že ovce s polymorfismem K35 jsou méně náchylné k onemocnění MV a šlechtění na tento genotyp zároveň spojené s likvidací sérologicky pozitivních ovcí by mohlo snížit výskyt MV. Hypotéza o rezistenci ovcí s odolným genotypem nebyla potvrzena.

Za pomoci získaných výsledků lze provádět včasnou, rychlou, a hlavně přesnou detekci SRLV. Nabízí se možnost vytvoření systému sérologických a molekulárních analýz sloužících k identifikaci a následnému snížení výskytu SRLV. Zahrnovalo by to důslednou kontrolu výskytu onemocnění v chovech za pomoci sérologických či molekulárních analýz s následnou selekcí infikovaných zvířat bez ohledu na genotyp zvířete. Dalším krokem by byla identifikace a následné zařazování do chovů jedinců s odolnějším genotypem K35 k SRLV.

Sérologické kontroly by se měly provádět během mezinárodního obchodu s plemennými zvířaty, i za předpokladu, že je se zvířaty dodán certifikát zaručující zdravotní stav zvířete. Hlavním důvodem je možnost zavlečení nového poddruhu viru, který by mohl po rozšíření decimovat stáda.



## 8 Seznam literatury

ALSHANBARI, F. A., M. R. MOUSEL, J. O. REYNOLDS, L. M. HERRMANN-HOESING, M. A. HIGHLAND, G. S. LEWIS a S. N. WHITE, 2014. Mutations in *Ovis aries* TMEM154 are associated with lower small ruminant lentivirus proviral concentration in one sheep flock. *Animal Genetics* [online]. **45**(4), 565-571. DOI: 10.1111/age.12181. ISSN 02689146.

BARTÁK, Pavel, Petr VÁCLAVEK, Marcela KOSTKOVÁ, Kateřina MIKULÁŠKOVÁ a Bronislav ŠIMEK, 2017. Prevelace lentivirových onemocnění malých přežvýkavců v ČR s využitím sérologické diagnostiky. *Veterinářství*. **3**, 227-232.

BLACKLAWS, B.A, E BERRIATUA, S TORSTEINSDOTTIR, N.J WATT, D DE ANDRES, D KLEIN a G.D HARKISS, 2004. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology* [online]. **101**(3), 199-208. DOI: 10.1016/j.vetmic.2004.04.006. ISSN 03781135.

BROUGHTON-NEISWANGER, Liam E., Stephen N. WHITE, Donald P. KNOWLES, Michelle R. MOUSEL, Gregory S. LEWIS, David R. HERNDON a Lynn M. HERRMANN-HOESING, 2010. Non-maternal transmission is the major mode of ovine lentivirus transmission in a ewe flock: A molecular epidemiology study. *Infection, Genetics and Evolution* [online]. **10**(7), 998-1007. DOI: 10.1016/j.meegid.2010.06.007. ISSN 15671348.

BROWN, T. A, 2007. *Klonování genů a analýza DNA: úvod*. Olomouc: Univerzita Palackého. ISBN 978-80-244-1719-6.

CUTLIP, Randall Curry, Howard Duane LEHMKUHL, Kim BROGDEN a Steven BOLIN, 1985. Mastitis associated with ovine progressive pneumonia virus infection in sheep. *American journal of veterinary research*. **1985**(46), 326-328.

ČURN, Vladislav, Miloslav ŠOCH, Antonín VEJČÍK a kol., 2018. *Certifikovaná metodika: Metodika genotypizace ovcí a koz - detekce markerů geneticky podmíněné rezistence k SRLV*. České Budějovice. ISBN 978-80-7397-671-5.

DE LA CONCHA-BERMEJILLO, Andrés, 1997. Maedi-Visna and Ovine Progressive Pneumonia. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* [online]. **13**(1), 13-34. DOI: 10.1016/S0749-0720(15)30362-5. ISSN 07490720.

DIMMOCK, Nigel, Andrew EASTON a Keith LEPPARD, 2007. *Introduction to Modern Virology*. 6. Oxford: Blackwell publishing. ISBN 1-4051-3645-6.

GENDELMAN, H. E., O. NARAYAN, S. MOLINEAUX, J. E. CLEMENTS a Z. GHOTBI, 1985. Slow, persistent replication of lentiviruses: role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **82**(20), 7086-7090. DOI: 10.1073/pnas.82.20.7086. ISSN 0027-8424.

GOMEZ-LUCIA, Esperanza, Nuria BARQUERO a Ana DOMENECH, 2018. Maedi-Visna virus: current perspectives. *Veterinary Medicine: Research and Reports* [online]. **9**, 11-21. DOI: 10.2147/VMRR.S136705. ISSN 2230-2034.

GUAN, F., G. SHI, J. ZHAO a Y. WANG, 2014. Progress on ovine lentivirus and its resistant genes. *Yi Chuan* [online]. **36**(12), 1204-12010. DOI: 10.3724/SP.J.1005.2014.1204.

HEATON, Michael P., Michael L. CLAWSON, Carol G. CHITKO-MCKOWN et al., 2012. Reduced Lentivirus Susceptibility in Sheep with TMEM154 Mutations. *PLoS Genetics* [online]. **8**(1). DOI: 10.1371/journal.pgen.1002467. ISSN 1553-7404.

HEATON, Michael P., Theodore S. KALBFLEISCH, Dustin T. PETRIK et al., 2013. Genetic Testing for TMEM154 Mutations Associated with Lentivirus Susceptibility in Sheep. *PLoS ONE*. **8**(2). DOI: 10.1371/journal.pone.0055490. ISSN 1932-6203.

ISHMAEL, Faoud T. a Cristiana STELLATO, 2008. Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* [online]. **101**(4), 437-443. DOI: 10.1016/S1081-1206(10)60323-7. ISSN 10811206. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1081120610603237>

JAUREGUI, P., H. CRESPO, I. GLARIA et al., 2012. Ovine TRIM5 Can Restrict Visna/Maedi Virus. *Journal of Virology*. **86**(17), 9504-9509. DOI: 10.1128/JVI.00440-12. ISSN 0022-538X.

LERONDELLE, Catherine a R. OUZROUT, 1990. Expression of maedi-visna virus in mammary secretions of a seropositive ewe. *Developments in biological standardization*. (72), 223-227. ISSN 0301-5149.

LEROUX, Caroline, Juliano Minardi CRUZ a Jean-Francois MORNEX, 2010. SRLVs: A Genetic Continuum of Lentiviral Species in Sheep and Goats with Cumulative Evidence of Cross Species Transmission. *Current HIV Research* [online]. **8**(1), 94-100. DOI: 10.2174/157016210790416415. ISSN 1570162X.

LEROUX, Caroline a Jean-Francois MORNEX, 2008. Retroviral infections in sheep and the associated diseases. *Small Ruminant Research* [online]. **76**(1-2), 68-76. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2007.12.010. ISSN 09214488.

LEYMASTER, K. A., C. G. CHITKO-MCKOWN, M. L. CLAWSON, G. P. HARHAY a M. P. HEATON, 2013. Effects of TMEM154 haplotypes 1 and 3 on susceptibility to ovine progressive pneumonia virus following natural exposure in sheep<sup>1,2,3</sup>. *Journal of Animal Science*. **91**(11), 5114-5121. DOI: 10.2527/jas.2013-6663. ISSN 0021-8812.

MACLACHLAN, Nigel James, Edward J. DUBOVI, Stephen W. BARTHOLD, David E. SWAYNE a James R. WINTON, 2017. *Fenner's veterinary virology*. Fifth edition. Amsterdam: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier. ISBN 978-012-8009-468.

MINGUIJÓN, E., R. REINA, M. PÉREZ et al., 2015. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Veterinary Microbiology*. **181**(1-2), 75-89. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.08.007. ISSN 03781135.

MOLAEI, Vahid, Marwa ELTANANY a Gesine LÜHKEN, 2018. First survey on association of TMEM154 and CCR5 variants with serological maedi-visna status of sheep in German flocks. *Veterinary Research*. **49**(1). DOI: 10.1186/s13567-018-0533-y. ISSN 1297-9716.

MURPHY, Frederick A., Paul GIBBS, Marian HORZINEK a Michael STUDDERT, 1999. *Veterinary virology*. 3rd ed. San Diego: Academic Press. ISBN 01-251-1340-4.

PÁLFI, V., I. HAJTÓS a R. GLÁVITS, 1989. Testicular lesions in rams infected by maedi/visna virus. *Acta Veterinaria Hungarica*. (37), 97-102.

- PÁLSSON, Páll, 1976. Maedi and visna in sheep. *Frontiers of biology*. **1976**(44), 17-43.
- PASICK, John, 1998. Maedi-visna virus and caprine arthritis-encephalitis virus: distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. *Canadian Journal of Veterinary Research*. **1998**(62), 241-244.
- PÉPIN, Michel, Christian VITU, Paola RUSSO, Jean François MORNEX a Ernst PETERHANS, 1998. Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Veterinary research*. (29), 341-367.
- PÉTRUSSON, Gudmundur, 1994. Experience with Visna Virus in Iceland. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. **724**(1), 43-49. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb38894.x. ISSN 0077-8923.
- POLSKI, J. M., S. KIMZEY, R. W. PERCIVAL a L. E. GROSSO, 1998. Rapid and effective processing of blood specimens for diagnostic PCR using filter paper and Chelex-100. *Molecular Pathology* [online]. **51**(4), 215-217. DOI: 10.1136/mp.51.4.215. ISSN 1366-8714.
- RAMÍREZ, Hugo, Ramsés REINA, Beatriz AMORENA, Damián ANDRÉS a Humberto MARTÍNEZ, 2013. Small Ruminant Lentiviruses: Genetic Variability, Tropism and Diagnosis. *Viruses*. **5**(4), 1175-1207. DOI: 10.3390/v5041175. ISSN 1999-4915.
- RAMÍREZ, Hugo, Ramsés REINA, Beatriz AMORENA, Damián ANDRÉS a Humberto MARTÍNEZ, 2013. Small Ruminant Lentiviruses: Genetic Variability, Tropism and Diagnosis. *Viruses*. **5**(4), 1175-1207. DOI: 10.3390/v5041175. ISSN 1999-4915.
- SANGER, F., S. NICKLEN a A. R. COULSON, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **74**(12), 5463-5467. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463. ISSN 0027-8424.
- SIDER, Lucia H, Michael P HEATON, Carol G CHITKO-MCKOWN, Greg P HARHAY, Timothy PL SMITH, Kreg A LEYMASTER, William W LAEGREID a Michael L CLAWSON, 2013. Small ruminant lentivirus genetic subgroups associate with sheep TMEM154 genotypes. *Veterinary Research*. **44**(1). DOI: 10.1186/1297-9716-44-64. ISSN 1297-9716.

SOLANKY, N., J. W. LYALL a L. S. TILEY, 2000. Restricted species tropism of maedi–visna virus strain EV-1 is not due to limited receptor distribution. *Journal of General Virology* [online]. **81**(12), 2919-2927. DOI: 10.1099/0022-1317-81-12-2919. ISSN 0022-1317.

SYNGE, B. A. a C. M. RITCHIE, 2010. Elimination of small ruminant lentivirus infection from sheep flocks and goat herds aided by health schemes in Great Britain. *Veterinary Record*. **167**(19), 739-743. DOI: 10.1136/vr.c5853. ISSN 0042-4900.

TABET, Edouard, Robert TLAIGE, Jeanne EL HAGE a Alain ABI RIZK, 2017. The occurrence of maedi-visna virus (MVV) in Lebanon. *Revue scientifique et technique* [online]. **36**(3). DOI: 10.20506/rst36.3.2723.

THORMAR, Halldor, 2005. Maedi-visna virus and its relationship to human immunodeficiency virus. *AIDS reviews*. (7), 233-245.

TOMAN, Miroslav, Jaromír DOSTÁL, Martin FALDYNA, et al., 2000. *Veterinární imunologie*. 3. Praha: Grada. ISBN 80-716-9727-3.

UNTERGASSER, Andreas, Ioana CUTCUTACHE, Triinu KORESSAAR, Jian YE, Brant C. FAIRCLOTH, Maido REMM a Steven G. ROZEN, 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* [online]. **40**(15), 115-115. DOI: 10.1093/nar/gks596. ISSN 1362-4962.

ZINK, M.C. a L.K. JOHNSON, 1994. Pathobiology of lentivirus infections of sheep and goats. *Virus Research* [online]. **32**(2), 139-154. DOI: 10.1016/0168-1702(94)90039-6. ISSN 01681702.

## **Vydané publikace související s touto prací**

TONKA, Tomáš, Vladislav ČURN, Miloslav ŠOCH, Antonín VEJČÍK, Kateřina VERNEROVÁ, Barbora FARKOVÁ, Petr ŠTOIDL, Pavel BARTÁK, Bronislav ŠIMEK, Petr VACLAVEK, Hana PLODKOVÁ., Srovnání incidence lentivirových infekcí u ovcí a koz s rozdílným genotypem genu transmembránového proteinu TMEM154. *Veterinářství*. v tisku.