



University  
of Ljubljana *Veterinary*  
faculty



UNIVERZA V LJUBLJANI  
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 636.3.09:578.828:57.083:577.21:575.8:616-036.22(497.12) (043.3)

Urška Kuhar, dr. vet. med.

**LENTIVIRUSNE OKUŽBE V SLOVENSKIH REJAH IN  
OVAC**

Doktorska disertacija

**LENTIVIRUS INFECTIONS IN SLOVENIAN GOAT AND  
SHEEP FARMS**  
Doctoral dissertation

Ljubljana, 2013

Urška Kuhar

Lentivirusne okužbe v slovenskih rejah koz in ovac

Delo je bilo opravljeno v viroloških laboratorijih na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani.

Javni zagovor je bil opravljen

Mentor: prof. dr. Jože Grom

Somentorica: prof. dr. Darja Barlič-Maganja

Izjava o delu:

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in da nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter Hostnik

Član: prof. dr. Tomaž Zadnik

Član: prof. dr. Mario Poljak

## IZVLEČEK

*Ključne besede: lentivirusne infekcije – epidemiologija; arthritis-encefalitis virus, kozji – genetika; visna-maedi virus – genetika; zaporedje aminokislin; genski produkti, gag – genetika; genski produkti, pol – genetika; DNA virusna; protitelesa, virusna – analize; encimsko vezani imunosorbentni test; polimerazna verižna reakcija – metode; molekulska zaporedje, podatki; filogeneza; koze – virologija; ovce – virologija; Slovenija – epidemiologija*

V okviru doktorskega dela smo za ugotavljanje specifičnih protiteles proti lentivirusom drobnice (angl. small ruminant lentiviruses, SRLV) s testom ELISA pregledali 1538 serumskih vzorcev živali iz 36 rej drobnice. Ugotovili smo, da je odstotek seropozitivnih koz (32,1 %) višji kot odstotek seropozitivnih ovac (24,8 %) in da je odstotek rej koz, v katerih smo ugotovili seropozitivne živali (76,2 %), višji kot odstotek rej ovac (66,7 %) in mešanih rej (44,4 %), v katerih smo ugotovili seropozitivne živali. Tudi odstotek seropozitivnih živali v posameznih rejah je bil najvišji v rejah koz. S klasičnimi metodami PCR smo testirali vzorce polne krvi 524 živali iz šestih rej. Uporabili smo metodo LTR-PCR, s katero smo pregledali vzorce polne krvi vseh živali. Vzorce polne krvi seropozitivnih živali, v katerih z metodo LTR-PCR nismo uspeli pomnožiti DNA SRLV, smo pregledali še z metodo gag-PCR. Z metodo LTR-PCR smo DNA SRLV pomnožili v 175 vzorcih oziroma v 54 % vzorcev, medtem ko smo skupaj z metodo LTR-PCR in metodo gag-PCR DNA SRLV pomnožili v 229 vzorcih oziroma v 71 % vzorcev. V petih vzorcih seronegativnih živali iz treh rej smo z metodo LTR-PCR dokazali DNA SRLV. Ugotovili smo, da je metoda PCR manj zanesljiva kot ELISA, vendar nam omogoča dokazovanje prisotnosti virusne nukleinske kisline pred serokonverzijo. V vzorcih tistih živali, pri katerih s klasičnimi metodami PCR nismo uspeli pomnožiti DNA SRLV, smo pozitiven rezultat testa ELISA potrdili s testom WB ali s testom SU5 ELISA oziroma z obema. S testom SU5 ELISA smo uspešno določili tudi genotip SRLV. Ugotovili smo, da je test WB manj zanesljiv pri določanju protiteles proti virusu meadi visna (angl. maedi visna virus, MVV) kot pri določanju protiteles proti virusu kozjega artritisa in encefalitisa (angl. caprine arthritis encephalitis virus, CAEV). Filogenetske analize odseka gena gagMA in odseka gena pol so pokazale, da so v Sloveniji prisotni sevi

SRLV genetske skupine A in B. Ugotovili smo tudi, da so slovenski sevi SRLV zelo heterogeni in da ovčji sevi SRLV spadajo v genetsko skupino A ter kozji sevi SRLV v genetsko skupino A in B. V dveh rejah koz smo ugotovili prisotnost SRLV tako genetske skupine A kot genetske skupine B. Ugotovili smo prisotnost sevov MVV oziroma genetske skupine A pri kozah in potrdili možnost naravnega navzkrižnega prenosa SRLV med vrstami. Na filogenetskih drevesih smo odkrili podskupino kozjih sevov SRLV v genetski skupini A z visoko statistično podporo, ki se od ostalih sevov SRLV na nukleotidnem nivoju v povprečju razlikujejo za več kot 15 %, in predlagali njihovo uvrstitev v nov podtip A14. Prav tako smo na filogenetskem drevesu odseka v genu *pol* odkrili podskupino ovčjih sevov SRLV v genetski skupini A z visoko statistično podporo, ki se od ostalih sevov SRLV na nukleotidnem nivoju v povprečju razlikujejo za več kot 21 %, in predlagali njihovo uvrstitev v nov podtip A15. Razvili smo novo metodo PCR v realnem času z uporabo hidrolizirajočih sond TaqMan za specifično določanje MVV in CAEV ter razlikovanje med njima. Metodo smo načrtovali v regiji gena *gagMA*. Sestavljena je iz testa za specifično določanje SRLV genetske skupine B oziroma CAEV (test CAEV) in iz testa za specifično določanje SRLV genetske skupine A oziroma MVV (test MVV). Metoda je 100-odstotno specifična in hkrati omogoča tako določanje virusnih sevov SRLV genetske skupine A in B kot ločevanje med njimi. Analitična občutljivost testa CAEV je 26 molekul plazmidne DNA virusa CAEV in testa MVV 72 molekul plazmidne DNA virusa MVV, medtem ko je diagnostična občutljivost metode 79-odstotna. Ponovljivost in obnovljivost testa MVV je na splošno dobra. Ponovljivost in obnovljivost testa CAEV sta nekoliko slabša kot pri testu MVV. Učinkovitost pomnoževanja je za test CAEV variirala med 83,73 % in 98,58 %,  $R^2$  pa je bil višji od 0,985. Učinkovitost pomnoževanja testa MVV je bila od 88,56 % do 96,48 %,  $R^2$  pa je bil višji od 0,994. Reakcija obeh testov je bila linearna v območju vseh zaporednih redčin. Pri primerjavi novo razvite metode PCR v realnem času z metodo LTR-PCR, katere občutljivost je bila 54-odstotna, smo ugotovili, da je novo razvita metoda PCR v realnem času bolj občutljiva. Tudi pri primerjavi z metodo LTR-PCR in metodo *gag*-PCR, katerih skupna občutljivost je bila 71-odstotna, smo ugotovili, da je novo razvita metoda PCR v realnem času bolj občutljiva. V vseh petih vzorcih seronegativnih živali, v katerih smo z metodo LTR-PCR dokazali DNA SRLV, smo le-to dokazali tudi z novo razvito metodo PCR v realnem času. Novo razvita metoda predstavlja dodatno orodje za potrditev okužbe z virusi SRLV. Primerna je tudi za zgodnje odkrivanje okužb s SRLV pri živalih, ki še niso razvile specifičnih protiteles.

## ABSTRACT

*Keywords: Lentivirus infections – epidemiology; arthritis-encephalitis virus, caprine – genetics; visna-maedi virus – genetics; aminoacid sequence; gene products, gag – genetics; gene products, pol – genetics; DNA, viral; antibodies, viral – analysis; enzime-linked immunosorbent assay; polymerase chain reaction – methods; molecular sequence data; phylogeny; goats – virology; sheep – virology; Slovenia – epidemiology*

Within the framework of the study, the ELISA test was used for detecting specific antibodies against small ruminant lentiviruses (SRLV). All 1538 serum samples from 36 flocks were tested. It was established that the percentage of seropositive goats (32.1%) was higher than the percentage of seropositive sheep (24.8%) and that the percentage of seropositive goat flocks (76.2%) was higher than the percentage of seropositive sheep flocks (66.7%) and mixed flocks (44.4%). The percentage of seropositive animals was also highest in goat flocks. Classic PCR methods were used for testing whole blood samples from 524 animals from 6 seropositive flocks. Whole blood samples from all animals were examined with LTR-PCR. Whole blood samples from seropositive animals that were negative with LTR-PCR were examined with *gag*-PCR. Amplification of SRLV DNA with LTR-PCR was successful in 175 samples (54%), while amplification using LTR-PCR and *gag*-PCR was successful in 229 samples (71%). SRLV DNA was amplified in 5 samples from seronegative animals from 3 flocks, using LTR-PCR. It was established that PCR is less reliable than ELISA. However, PCR is able to detect viral nucleic acid prior to seroconversion. WB and SU5 ELISA were used for examining serum samples from seropositive animals that were negative using the aforementioned PCR methods. The ELISA positive result was confirmed with at least one of the confirmatory tests or with both. SU5 ELISA was also used to define the SRLV genotype. It was established that WB is less reliable for the detection of maedi visna virus (MVV) antibodies than for the detection of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) antibodies. Phylogenetic analysis of the *gagMA* gene region and of the *pol* gene region showed that Slovenian SRLV strains belong to genotypes A and B. It was established that Slovenian SRLV strains are highly heterogeneous, with ovine strains belonging to genotype A and caprine strains to genotypes A and B. Virus sequences from genotypes A and B were found to circulate within two goat flocks. Goat virus strains belonging to genotype A or to MVV

strains were found in this study, which confirms the possibility of cross-species virus transmissions. Goat virus strains belonging to genotype A and differing at the nucleotide level from all other SRLV strains by more than 15% were found on the phylogenetic tree. Based on the high bootstrap support of this cluster on the phylogenetic tree, we propose classifying this virus strain to a new subtype A14. Sheep virus strains from flock 31, which belong to genotype A, differed at the nucleotide level from all other SRLV strains by more than 21% in relation to the *pol* gene. Based on the high bootstrap support of this cluster on the phylogenetic tree, we propose classifying this virus strain to a new subtype A15.

A new real time PCR method using TaqMan probes for the specific detection of MVV and CAEV and differentiation between them was developed. The primers and probes were designed in the *gagMA* gene region. Two assays were designed: a CAEV assay for the specific detection of genotype B SRLV strains and MVV assay for the specific detection of genotype A SRLV strains. The method is 100% specific and enables the detection of genotype A and B SRLV strains, as well as differentiation between them. The analytical sensitivity of the CAEV and MVV assays was 26 and 72 plasmid molecules, respectively, while the diagnostic sensitivity was 79%. The reproducibility and repeatability of the MVV assay was generally good. The CAEV assay exhibited slightly worse repeatability and reproducibility than the MVV assay. The efficiency of the CAEV assay varied between 83.73% and 98.58%, with  $R^2$  being higher than 0.985. The efficiency of the MVV assay varied between 88.56% and 96.48%, with  $R^2$  being higher than 0.994. Both assays had a wide dynamic range, detecting all serial dilutions. Comparison of the new real time PCR with LTR-PCR together with *gag*-PCR showed a better performance of real time PCR. Real time PCR showed a better sensitivity than LTR-PCR and LTR-PCR together with *gag*-PCR, with 54% and 71% sensitivity, respectively. The new real time PCR also detected all of the 5 samples from seronegative animals that were LTR-PCR positive. The new real time PCR can serve as an additional tool for confirming infection with SRLV and is also useful for early detection of infected animals prior to seroconversion.

## KAZALO VSEBINE

|   |    |
|---|----|
| <b>IZVLEČEK</b>   | 4  |
| <b>ABSTRACT</b>   | 6  |
| <b>KAZALO VSEBINE</b>   | 8  |
| <b>KAZALO SLIK</b>  | 12 |
| <b>KAZALO TABEL</b>   | 14 |
| <b>SEZNAM OKRAJŠAV</b>  | 17 |
| <b>1 UVOD</b>   | 20 |
| <b>2 PREGLED LITERATURE</b>   | 22 |
| <b>2.1 Virusna meadi visna (MVV) in kozji artritis encefalitis (CAEV)</b> | 22 |
| 2.1.1 Taksonomska uvrstitev   | 22 |
| 2.1.2 Morfološke značilnosti  | 22 |
| 2.1.3 Organizacija genoma   | 23 |
| 2.1.4 Virusni geni in proteini  | 24 |
| 2.1.5 Nekodirajoče regije virusnega genoma in njihova vloga               | 27 |
| <b>2.2 Pomnoževanje</b>   | 28 |
| <b>2.3 Zgodovina okužb z MVV in CAEV</b>                                  | 31 |
| 2.3.1 MVV in CAEV v Sloveniji   | 31 |
| <b>2.4 Molekularna epizootiologija</b>                                    | 32 |
| <b>2.5 Prenos okužbe</b>  | 33 |
| <b>2.6 Imunopatogeneza</b>  | 34 |
| <b>2.7 Imunski odziv</b>  | 34 |
| <b>2.8 Klinična slika bolezni in patohistološke spremembe</b>             | 36 |
| 2.8.1 Maedi visna   | 37 |
| 2.8.2 Kozji artritis in encefalitis                                       | 38 |
| <b>2.9 Diagnostika lentivirusov drobnice (SRLV)</b>                       | 39 |
| 2.9.1 Posredne diagnostične metode  | 39 |
| 2.9.1.1 Agar gel imunodifuzijski test (AGID)                              | 39 |
| 2.9.1.2 Encimsko imunski test (ELISA)                                     | 40 |
| 2.9.1.3 Metoda prenosa po Westernu (WB)                                   | 41 |
| 2.9.2 Neposredne diagnostične metode                                      | 41 |
| 2.9.2.1 Izolacija virusa na celični kulturi                               | 41 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.9.2.2 Molekularne metode .....  | 42        |
| 2.9.2.3 Klasična metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR) .....                             | 42        |
| 2.9.2.4 Metoda PCR v realnem času .....   | 43        |
| 2.9.3 Detekcija SRLV s PCR v realnem času .....   | 47        |
| <b>2.10 Izkoreninjenje in preventiva bolezni .....</b>  | <b>48</b> |
| <b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>  | <b>49</b> |
| <b>3.1 Živali .....</b>   | <b>49</b> |
| <b>3.2 Serumski vzorci .....</b>  | <b>51</b> |
| <b>3.3 Vzorci polne krvi .....</b>  | <b>51</b> |
| <b>3.4 Virusni sevi .....</b>   | <b>51</b> |
| <b>3.5 Priprava pufrov in gojišč .....</b>  | <b>51</b> |
| 3.5.1 Pufer za lizo eritrocitov (angl. red cell lysis buffer, RCLB) .....                     | 51        |
| 3.5.2 Fosfatni pufer brez pozitivno nabitih ionov (angl. phosphate buffer saline, PBS-A)      |           |
| .....   | 52        |
| <b>3.6 Encimsko imunski test (ELISA) .....</b>  | <b>52</b> |
| <b>3.7 Metoda prenosa po Westernu (WB) .....</b>  | <b>53</b> |
| <b>3.8 Encimsko imunski test SU5 (SU5 ELISA) .....</b>  | <b>54</b> |
| <b>3.9 Izolacija levkocitov iz polne krvi .....</b>   | <b>55</b> |
| <b>3.10 Izolacije genomske DNA .....</b>  | <b>56</b> |
| <b>3.11 Metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR) .....</b>                                  | <b>57</b> |
| 3.11.1 Pomnoževanje odseka na regiji LTR .....  | 57        |
| 3.11.2 Pomnoževanje odseka na genu <i>gag</i> .....   | 58        |
| 3.11.3 Pomnoževanje odseka na genu <i>pol</i> .....   | 61        |
| <b>3.12 Določanje nukleotidnega zaporedja .....</b>   | <b>62</b> |
| <b>3.13 Analiza nukleotidnih zaporedij .....</b>  | <b>64</b> |
| <b>3.14 Filogenetske analize .....</b>  | <b>65</b> |
| 3.14.1 Analiza nukleotidnih zaporedij in filogenetska analiza odseka na genu <i>gag</i> ..... | 65        |
| 3.14.2 Analiza nukleotidnih zaporedij in filogenetska analiza odseka na genu <i>pol</i> ..... | 68        |
| <b>3.15 Razvoj metode PCR v realnem času .....</b>  | <b>70</b> |
| 3.15.1 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sond TaqMan .....                             | 70        |
| 3.15.2 Načrtovanje metode PCR v realnem času za določanje in ločevanje CAEV in MVV .....      | 71        |

|   |     |
|---|-----|
| 3.15.3 Optimizacija testov za določanje CAEV in MVV.....  | 73  |
| 3.15.4 Izvedba testov za določanje CAEV in MVV.....   | 74  |
| 3.15.5 Analiza rezultatov.....  | 75  |
| 3.15.6 Analitična specifičnost metode PCR v realnem času .....  | 75  |
| 3.15.7 Analitična občutljivost metode PCR v realnem času .....  | 77  |
| 3.15.7.1 Priprava DNA standardov.....   | 77  |
| 3.15.7.2 Določanje meje detekcije.....  | 78  |
| 3.15.8 Določanje učinkovitosti pomnoževanja.....  | 79  |
| 3.15.9 Ponovljivost in obnovljivost.....  | 79  |
| 3.15.10 Kontrola inhibicije .....   | 79  |
| 3.15.11 Diagnostična specifičnost .....   | 80  |
| 3.15.12 Testiranje metode na kliničnih vzorcih in diagnostična občutljivost .....                       | 80  |
| <b>4 REZULTATI.....</b>   | 82  |
| <b>4.1 Rezultati testa ELISA.....</b>   | 82  |
| <b>4.2 Rezultati testa WB in testa SU5 ELISA .....</b>  | 85  |
| <b>4.3 Rezultati metode PCR .....</b>   | 88  |
| 4.3.1 Pomnoževanje odseka na regiji LTR.....  | 88  |
| 4.3.2 Pomnoževanje odseka na genu <i>gag</i> .....  | 89  |
| <b>4.4 Ugotavljanje filogenetskih odnosov .....</b>   | 90  |
| 4.4.1 Filogenetske analize odseka na genu <i>gagMA</i> .....  | 90  |
| 4.4.2 Filogenetske analize odseka na genu <i>pol</i> .....  | 95  |
| <b>4.5 Rezultati razvoja metode PCR v realnem času za določanje CAEV in MVV .....</b>                   | 100 |
| 4.5.1 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sond ter optimizacija metode PCR v<br>realnem času ..... | 100 |
| 4.5.2 Rezultati vrednotenja razvite metode PCR v realnem času.....                                      | 101 |
| 4.5.2.1 Analitična specifičnost in občutljivost .....   | 101 |
| 4.5.2.2 Učinkovitost reakcije .....   | 101 |
| 4.5.2.3 Ponovljivost in obnovljivost reakcije .....   | 103 |
| 4.5.2.4 Kontrola inhibicije.....  | 106 |
| 4.5.3 Diagnostična specifičnost .....   | 106 |
| 4.5.4 Rezultati testiranja metode PCR v realnem času na kliničnih vzorcih.....                          | 107 |
| 4.5.4.1 Diagnostična občutljivost .....   | 109 |

|   |            |
|---|------------|
| 4.5.5 Primerjava metode PCR v realnem času z metodama LTR-PCR in <i>gag</i> -PCR .....                              | 109        |
| 4.5.6 Primerjava diagnostične občutljivosti metode PCR v realnem času z metodama<br>LTR-PCR in <i>gag</i> -PCR..... | 111        |
| <b>5 RAZPRAVA.....</b>  | <b>112</b> |
| <b>5.1 Serološki testi .....</b>  | <b>113</b> |
| <b>5.2 Metode PCR .....</b>   | <b>113</b> |
| <b>5.3 Filogenetske analize .....</b>   | <b>115</b> |
| <b>5.4 Razvoj metode PCR v realnem času.....</b>  | <b>119</b> |
| <b>6 ZAKLJUČKI .....</b>  | <b>127</b> |
| <b>7 POVZETEK.....</b>  | <b>130</b> |
| <b>8 SUMMARY.....</b>   | <b>134</b> |
| <b>9 ZAHVALE .....</b>  | <b>138</b> |
| <b>10 LITERATURA .....</b>  | <b>139</b> |

## KAZALO SLIK

|   |     |
|---|-----|
| Slika 2-1: Shematski prikaz retrovirusa.....  | 23  |
| Figure 2-1: Schematic presentation of a retrovirus .....  | 23  |
| Slika 2-2: Organizacija genoma retrovirusov (A) in virusni geni (B).....  | 24  |
| Figure 2-2: Genome organization of retroviruses (A) and virus genes (B).....  | 24  |
| Slika 2-3: Pomnoževanje retrovirusov .....  | 29  |
| Figure 2-3: Retroviral replication .....  | 29  |
| Slika 2-4: Reverzna transkripcija .....   | 30  |
| Figure 2-4: Reverse transcription .....   | 30  |
| Slika 2-5: Prikaz poteka PCR v realnem času .....   | 45  |
| Figure 2-5: Presentation of the real time PCR course .....  | 45  |
| Slika 4-1: Grafični prikaz rezultatov testiranj s testom ELISA v rejah koz.....   | 83  |
| Figure 4-1: Graphical presentation of ELISA test results in goat farms. ....  | 83  |
| Slika 4-2: Grafični prikaz rezultatov s testom ELISA v rejah ovac. ....   | 83  |
| Figure 4-2: Graphical presentation of ELISA test results in sheep farms. ....   | 83  |
| Slika 4-3: Grafični prikaz rezultatov testiranj s testom ELISA v mešanih rejah. ....  | 84  |
| Figure 4-3: Graphical presentation of ELISA test results in mixed species farms.....  | 84  |
| Slika 4-4: Filogenetsko drevo v genu <i>gagMA</i> po metodi NJ.....   | 94  |
| Figure 4-4: NJ phylogenetic tree of the <i>gagMA</i> gene. ....   | 95  |
| Slika 4-5: Filogenetsko drevo v regiji 1,2 kb <i>pol</i> po metodi NJ.....  | 99  |
| Figure 4-5: NJ phylogenetic tree of the 1.2 kb <i>pol</i> fragment .....  | 99  |
| Slika 4-6: Lineарне regresijske premice redčin izolirane DNA referenčnega seva CAEV Co za tri ponovitve testa CAEV.....                           | 102 |
| Figure 4-6: Linear regression lines derived from 3 repeats of serial dilutions of reference virus strain CAEV Co DNA using the CAEV assay. ....   | 102 |
| Slika 4-7: Lineарне regresijske premice redčin izolirane DNA referenčnega seva MVV KV1514 za tri ponovitve testa MVV.....                         | 103 |
| Figure 4-7: Linear regression lines derived from 3 repeats of serial dilutions of reference virus strain MVV KV1514 DNA using the MVV assay. .... | 103 |
| Slika 4-8: Grafični prikaz primerjave rezultatov metode LTR-PCR, metod LTR-PCR in <i>gag</i> -PCR skupaj ter metode PCR v realnem času. ....      | 110 |

Figure 4-8: Graphical presentation of results comparing the LTR-PCR method and the  
LTR-PCR method together with the *gag*-PCR method with the real time PCR.....110

## KAZALO TABEL

|  |    |
|--|----|
| Tabela 3-1: Seznam živali, ki smo jih vključili v raziskavo.....   | 50 |
| Table 3-1: List of animals included in this study .....  | 50 |
| Tabela 3-2: Začetna oligonukleotida, ki smo ju uporabili za pomnoževanje odseka na regiji LTR.....   | 58 |
| Table 3-2: Primers used for the LTR region fragment amplification.....   | 58 |
| Tabela 3-3: Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili za pomnoževanje odseka na genu <i>gag</i> .....  | 59 |
| Table 3-3: Primers used for the <i>gag</i> gene region fragment amplification.....   | 59 |
| Tabela 3-4: Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili za pomnoževanje odseka na genu <i>pol</i> .....  | 61 |
| Table 3-4: Primers used for the <i>pol</i> gene region fragment amplification.....   | 61 |
| Tabela 3-5: Seznam sevov SRLV, ki smo jih uporabili v filogenetski analizi odseka na genu <i>gag</i> .....                                       | 65 |
| Table 3-5: List of SRLV strains used for phylogenetic analysis of the <i>gag</i> gene region fragment.....                                       | 65 |
| Tabela 3-6: Seznam sevov SRLV, ki smo jih uporabili v filogenetski analizi odseka na genu <i>pol</i> .....                                       | 68 |
| Table 3-6: List of SRLV strains used for phylogenetic analysis of the <i>pol</i> gene region fragment.....                                       | 68 |
| Tabela 3-7: Seznam začetnih oligonukleotidov in sonde za pomnoževanje odseka na genu <i>gagMA</i> s testom CAEV.....                             | 72 |
| Table 3-7: List of primers and probe used for the <i>gagMA</i> gene region fragment amplification with the CAEV assay.....                       | 72 |
| Tabela 3-8: Seznam začetnih oligonukleotidov in sonde za pomnoževanje odseka na genu <i>gagMA</i> s testom MVV .....                             | 73 |
| Table 3-8: List of primers and probe used for the <i>gagMA</i> gene region fragment amplification with the MVV assay .....                       | 73 |
| Tabela 3-9: Seznam virusnih sevov, ki smo jih uporabili za optimizacijo in za določanje analitične specifičnosti metode PCR v realnem času ..... | 76 |
| Table 3-9: List of virus strains used for optimization and evaluation of analytical specificity  |    |

|   |    |
|---|----|
| of the real time PCR .....  | 76 |
| Tabela 4-1: Rezultat testiranj 524 vzorcev serumov s testom ELISA v izbranih šestih rejah.  | 85 |
| Table 4-1: ELISA test results of 524 serum samples in selected six farms.   | 85 |
| Tabela 4-2: Rezultati testiranj 93 serumskih vzorcev s testom WB in s testom SU5 ELISA v izbranih šestih rejah.   | 86 |
| Table 4-2: WB and SU5 ELISA test results of 93 serum samples in selected six farms.   | 86 |
| Tabela 4-3: Rezultat testiranj 524 vzorcev polne krvi z metodo LTR-PCR in z metodo <i>gag</i> -PCR v izbranih šestih rejah. Prikazano je število pozitivnih oziroma odstotek pozitivnih glede na število vseh živali.   | 89 |
| Table 4-3: LTR-PCR and <i>gag</i> -PCR results of 524 whole blood samples in selected six farms. Number of positives or percentage of positives concerning the number of all animals is shown.  | 89 |
| Tabela 4-4: Rezultat testiranj 524 vzorcev polne krvi z metodo LTR-PCR in z metodo <i>gag</i> -PCR v izbranih šestih rejah. Prikazano je število pozitivnih oziroma odstotek pozitivnih glede na število seropozitivnih živali in število pozitivnih oziroma odstotek pozitivnih, ki so bili seronegativni. | 90 |
| Table 4-4: LTR-PCR and <i>gag</i> -PCR results of 524 whole blood samples in selected six farms. Number of positives or percentage of positives concerning the number of seropositive animals and number of positives or percentage of positives concerning the number of seronegative animals is shown.    | 90 |
| Tabela 4-5: Genetske razdalje v genu <i>gagMA</i> .   | 93 |
| Table 4-5: The genetic distances of the <i>gagMA</i> gene.  | 93 |
| Tabela 4-6: Matrika genetskih razdalj v genu <i>gagMA</i> med skupinami slovenskih sevov SRLV iz izbranih šestih rej.   | 93 |
| Table 4-6: The genetic distances matrix of the <i>gagMA</i> gene between groups of Slovenian SRLV strains from selected six farms.  | 93 |
| Tabela 4-7: Genetske razdalje v regiji 1,2 kb <i>pol</i> .  | 98 |
| Table 4-7: The genetic distances of the 1.2 kb <i>pol</i> fragment.   | 98 |
| Tabela 4-8: Matrika genetskih razdalj v regiji 1,2 kb <i>pol</i> med skupinami slovenskih sevov SRLV iz izbranih šestih rej.  | 98 |
| Table 4-8: The genetic distances matrix of the 1.2 kb <i>pol</i> fragment between groups of Slovenian SRLV strains from selected six farms.   | 98 |

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 4-9: Lastnosti delovanja testa MVV znotraj posameznih testiranj.....  | 104 |
| Table 4-9: Intra-assay performance of the MVV assay.....   | 104 |
| Tabela 4-10: Lastnosti delovanja testa MVV med testiranji.....   | 104 |
| Table 4-10: Inter-assay performance of the MVV assay.....  | 104 |
| Tabela 4-11: Lastnosti delovanja testa CAEV znotraj posameznih testiranj. ....   | 105 |
| Table 4-11: Intra-assay performance of the CAEV assay. ....  | 105 |
| Tabela 4-12: Lastnosti delovanja testa CAEV med testiranji.....  | 106 |
| Table 4-12: Inter-assay performance of the CAEV assay. ....  | 106 |
| Tabela 4-13: Rezultat testiranj 380 vzorcev polne krvi z metodo PCR v realnem času v izbranih šestih rejah. Prikazano je število pozitivnih s testom MVV in testom CAEV v posameznih rejah. ....   | 108 |
| Table 4-13: Real time PCR results of 380 whole blood samples in selected six farms. Number of positives with the MVV and CAEV assay in individual farms is shown. ....   | 108 |
| Tabela 4-14: Rezultat testiranj 380 vzorcev polne krvi z metodo PCR v realnem času v izbranih šestih rejah. Prikazano je število pozitivnih oziroma odstotek pozitivnih glede na število vseh živali. ....   | 108 |
| Table 4-14: Real time PCR results of 380 whole blood samples in selected six farms. Number of positives or percentage of positives concerning the number of all animals is shown.....  | 108 |
| Tabela 4-15: Rezultat testiranj 380 vzorcev polne krvi z metodo PCR v realnem času v izbranih šestih rejah. Prikazano je število pozitivnih oziroma odstotek pozitivnih glede na število seropozitivnih živali in število pozitivnih oziroma odstotek pozitivnih, ki so bili seronegativni.....  | 109 |
| Table 4-15: Real time PCR results of 380 whole blood samples in selected six farms. Number of positives or percentage of positives concerning the number of seropositive animals and number of positives or percentage of positives concerning the number of seronegative animals is shown. .... | 109 |

## SEZNAM OKRAJŠAV

|                 |  |
|-----------------|--|
| AP-4            | zaporedje na provirusni DNA za vezavo transkripcijskih faktorjev   |
| B               | bovška pasma ovac  |
| BHQ             | nefluorescenčni dušilec (angl. black hole quencher)  |
| BIV             | bovini virus imunske pomanjkljivosti (angl. bovine immunodeficiency virus)   |
| BLAST           | iskalnik podobnih zaporedij v genski banki (angl. Basic Local Alignment Search Tool)   |
| BU              | burska pasma koz   |
| CA              | protein kapside (angl. capsid protein)   |
| CAEV            | virus kozjega artritisa encefalitisa (angl. Caprine arthritis encephalitis virus)  |
| Cq              | točka, v kateri signal fluorescence poročevalske molekule bistveno naraste in prečka linijo fluorescenčnega praga (angl. quantification cycle) |
| C <sub>t</sub>  | točka, v kateri signal fluorescence poročevalske molekule bistveno naraste in prečka linijo fluorescenčnega praga (angl. cycle threshold)      |
| DU              | dUTPaza  |
| dUTP            | 2-deoksiuridin 5-trifosfat   |
| dUTPaza         | deoksiuridin trifosfataza  |
| ΔRn             | razlika v jakosti normalizirane fluorescence   |
| E               | učinkovitost pomnoževanja z RT-PCR v realnem času (angl. efficiency)   |
| EIAV            | virus infekciozne anemije kopitarjev (angl. equine infectious anemia virus)  |
| FAM             | 6-karboksi-fluorescein   |
| FIV             | mačji virus imunske pomanjkljivosti (angl. feline immunodeficiency virus)  |
| FRET            | fluorescenčni resonančni prenos energije   |
| <i>gag</i>      | angl. group specific antigen   |
| <i>gagMA</i>    | odsek na genu <i>gag</i> , ki kodira protein matriksa  |
| <i>gag</i> -PCR | metoda PCR, s katero smo pomnoževali odsek na genu <i>gag</i>  |
| gp46            | transmembranski glikoprotein   |
| gp135           | površinski glikoprotein  |
| gp150           | predhodni poliprotein za glikozilirana strukturna proteina ovojnice  |

|            |   |
|------------|---|
| GSM        | sinonovialne membrane koz (angl. goat synovial membrane)  |
| HIV-1      | humani virus imunske pomanjkljivosti tip 1 (angl. human immunodeficiency virus type 1)  |
| HIV-2      | humani virus imunske pomanjkljivosti tip 2 (angl. human immunodeficiency virus type 2)  |
| ICTV       | Mednarodni odbor za taksonomijo virusov (angl. International Committee for the Taxonomy of Viruses)                                   |
| JS         | jezersko-solčavska pasma ovac   |
| JSR        | oplemenjena jezersko-solčavska pasma ovac   |
| IN         | integraza   |
| L          | vodilno zaporedje (angl. leader)  |
| LOD        | meja zaznavanja metode (angl. limit of detection)   |
| LTR        | regija na obeh koncih provirusnega genoma (angl. long terminal repeat)  |
| LTR-PCR    | metoda PCR, s katero smo pomnoževali odsek na regiji LTR  |
| LSM        | sinovialna membrana ovac (angl. lamb synovial membrane)   |
| MA         | protein matriksa (angl. matrix protein)   |
| MGB        | organska molekula, ki se veže v mali žleb dvojne viačnice DNA   |
| ML         | metoda največjega verjetja, s katero iščemo filogenetska drevesa  |
| MVV        | virus maedi visna (angl. maedi visna virus)   |
| NC         | nukleokapsidni protein (angl. nucleocapsid protein)   |
| NCBI       | angl. National Centre for Biotechnology Information   |
| NFQ        | neflurescenčni dušilec (angl. non-fluorescing quencher)   |
| NJ         | metoda povezovanje s sosedom, s katero iščemo filogenetska drevesa  |
| OIE        | Mednarodna organizacija za zdravje živali (fr. Office International des Epizooties)   |
| p14        | nukleokapsidni protein  |
| p17        | protein matriksa  |
| p25        | kapsidni protein  |
| PBS        | mesto vezave tRNA, ki služi kot začetni oligonukleotid pri virusnem pomnoževanju, na virusni molekuli RNA (angl. primer binding site) |
| <i>pol</i> | polimeraza (angl. polymerase)   |
| PPT        | polipurinski trakt (angl. polypurine tract)   |

|                          |   |
|--------------------------|---|
| PR                       | proteaza  |
| Pr55 <sup>gag</sup>      | prekurzorski protein za 3 strukturne virusne proteine, ki jih kodira gen <i>gag</i>   |
| Pr150 <sup>Gag-Pol</sup> | prekurzorski poliprotein za virusne encime, ki jih kodira gena <i>gag</i> in <i>pol</i>   |
| R                        | regija R (angl. repeat)   |
| R <sup>2</sup>           | koeficient korelacije linearne regresije  |
| <i>rev</i>               | angl. regulator of virion protein expression  |
| Rn-                      | normalizirana fluorescenca ozadja   |
| Rn+                      | normalizirana fluorescenca med pomnoževanjem  |
| Rn                       | normalizirana fluorescenca na pasivno referenčno barvilo  |
| RNaza H                  | endonukleaza, ki katalizira razgradnjo molekul RNA  |
| ROX                      | pasivno referenčno barvilo 5-(ali 6-)karboksi-X-rodamin   |
| RT                       | reverzna transkriptaza  |
| s                        | naklon linearne regresijske premice (angl. slope)   |
| SA                       | slovenska sanska pasma koz  |
| SCP                      | ovčje celice horoidnega pleteža (angl. sheep choroid plexus)  |
| SIV                      | opičji virus imunske pomanjkljivosti (angl. simian immunodeficiency virus)  |
| SR                       | slovenska srnasta pasma koz   |
| SRLV                     | lentivirusi drobnice (angl. small ruminant lentiviruses)  |
| SU                       | površinski glikoprotein (angl. surface glycoprotein)  |
| SU5 ELISA                | test ELISA, v katerem se kot antigen uporablja sintetični peptidi, ki so sestavljeni iz zaporedja 25 aminokislin virusnega površinskega glikoproteina, in sicer celotno zaporedje imunodominantnega epitopa SU5 |
| TAR                      | angl. trans-activation responsive element   |
| <i>tat</i>               | angl. transactivator of transcription   |
| TAMRA                    | 6-karboksi-tetrametil-rodamin   |
| T                        | pasma ovac teksel   |
| TM                       | transmembranski glikoprotein (angl. transmembrane glycoprotein)   |
| U3                       | regija U3 na 3' koncu virusnega genoma  |
| U5                       | regija U5 na 5' koncu virusnega genoma  |
| <i>vif</i>               | angl. viral infectivity factor  |

## 1 UVOD

Lentivirusi drobnice (angl. small ruminant lentiviruses, SRLV) so razširjeni v mnogih državah po svetu (Peterhans in sod., 2004). Na podlagi dosedanjih podatkov so SRLV razširjeni tudi v Sloveniji, kjer so leta 1996 v čredi koz z detekcijo specifičnih protiteles prvič dokazali okužbo z virusom kozjega artritisa in encefalitisa (angl. caprine arthritis encephalitis virus, CAEV). V letu 1997 so na prisotnost protiteles proti SRLV pregledali še pet čred ovac in čredo koz ter ugotovili, da je 57 % živali serološko pozitivnih (Grom in sod., 1998). Leta 2005 so na podlagi obsežnega monitoringa na ravni države, ki je potekal v skladu s Pravilnikom o izvajanju sistematičnega spremljanja stanja kužnih bolezni in cepljenj živali v letu 2005 (UR List RS, št. 142/2004) in v okviru katerega je bilo serološko pregledanih skoraj 30.000 koz in ovac, ugotovili, da je skoraj 6 % živali serološko pozitivnih. Na podlagi filogenetskih analiz so SRLV razvrščeni v pet genetskih skupin, in sicer od A do E (Shah in sod., 2004; Grego in sod., 2007). Virusi SRLV, ki spadajo v genetski skupini A in B, so razširjeni po vsem svetu, medtem ko so virusi genetskih skupin C, D in E omejeni na določena geografska področja (Shah in sod., 2004; Gjerset in sod., 2006; Reina in sod., 2006; Grego in sod., 2007). Klasične diagnostične metode za določevanje SRLV temeljijo predvsem na detekciji specifičnih protiteles z agar gel imunodifuzijskim testom (AGID) ali z encimsko imunskim testom (ELISA). Metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR) za dokazovanje provirusnega genoma v levkocitih je najpogosteje uporabljena molekularna metoda v diagnostiki SRLV (de Andrés in sod., 2005; Herrmann-Hoesing, 2010). V zadnjem času se uveljavlja tudi metoda PCR v realnem času. Do zdaj sta objavljena le dva opisa metode PCR v realnem času za uporabo v diagnostične namene. Brinkhoff in sodelavci (2008) so za diagnostiko SRLV razvili PCR v realnem času z uporabo interkalirajočega barvila SYBR Green. Herrmann-Hoesing in sodelavci (2007) so razvili in validirali metodo PCR v realnem času za določanje ameriških sevov meadi visna (angl. maedi visna virus, MVV). Ta poleg detekcije omogoča tudi kvantifikacijo. Temelji na specifičnem pomnoževanju DNA MVV z uporabo hidrolizirajoče sonde TaqMan.

Namen doktorskega dela je bil določiti genotipe in odkriti morebitne nove genotipe oziroma podtipi med slovenskimi sevi SRLV ter s filogenetskimi analizami ugotoviti sorodnost med sevi SRLV, ki so razširjeni v Sloveniji, in sevi SRLV v sosednjih državah ter širše po svetu.

Namen dela je tudi bil ugotoviti morebiten navzkrižen prenos sevov SRLV med vrstami. Na podlagi ugotovljenih genetskih lastnosti virusnih sevov lahko razvijemo novo, hitrejšo in bolj specifično metodo PCR v realnem času ter tako izboljšamo obstoječo molekularno diagnostiko okužb s SRLV. Metoda PCR v realnem času z uporabo specifičnih sond ima v primerjavi s klasično metodo PCR več prednosti. Omogoča pridobitev rezultatov v krajšem času, saj detekcija produktov na agaroznem gelu ni potrebna. Zaradi zaprtega sistema je tudi možnost kontaminacije manjša. Poleg uporabe začetnih oligonukleotidov uporabljam tudi specifične sonde, kar nam omogoča večjo specifičnost. Namen doktorskega dela je bil razviti novo metodo PCR v realnem času za specifično določanje MVV in CAEV in hkrati za razlikovanje med njima. Taka metoda do zdaj še ni bila opisana.

Z raziskavo smo poskušali potrditi naslednje hipoteze:

1. Slovenski sevi SRLV spadajo v genetski skupini A in B.
2. Novo razvita metoda PCR v realnem času bo primerna za hitro in specifično določanje sevov SRLV genetskih skupin A in B.
3. Z novo razvito metodo PCR v realnem času bo mogoče razlikovati med sevi MVV (genetska skupina A) in CAEV (genetska skupina B).

## 2 PREGLED LITERATURE

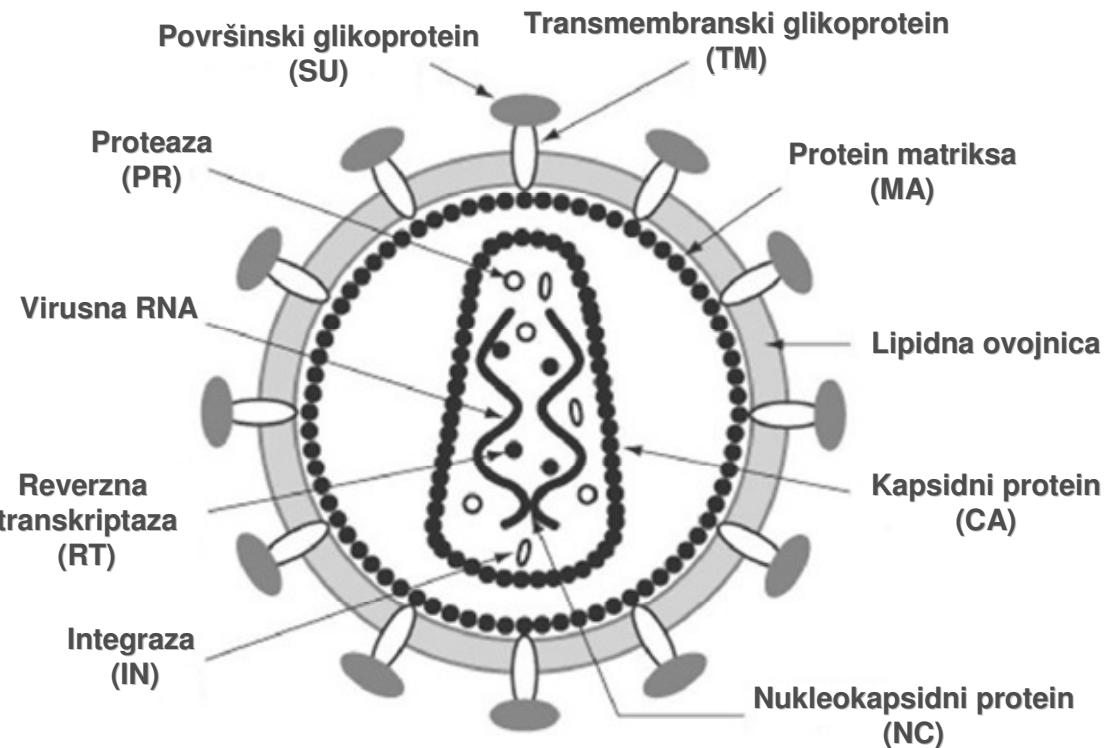
### 2.1 Virusa meadi visna (MVV) in kozji artritis encefalitis (CAEV)

#### 2.1.1 Taksonomska uvrstitev

Mednarodni odbor za taksonomijo virusov (angl. International Committee for the Taxonomy of Viruses, ICTV) uvršča virus meadi visna (angl. maedi visna virus, MVV) in virus kozjega artritisa in encefalitisa (angl. caprine arthritis encephalitis virus, CAEV) v družino *Retroviridae*, poddružino *Ortoretrovirinae* in rod *Lentivirus*, v katerega spadajo še humani virus imunske pomanjkljivosti tip 1 in 2 (angl. human immunodeficiency virus type 1 and 2, HIV-1, HIV-2), opičji virus imunske pomanjkljivosti (angl. simian immunodeficiency virus, SIV), mačji virus imunske pomanjkljivosti (angl. feline immunodeficiency virus, FIV), bovini virus imunske pomanjkljivosti (angl. bovine immunodeficiency virus, BIV) in virus infekcione anemije kopitarjev (angl. equine infectious anemia virus, EIAV) (Desrosiers, 2007; Goff, 2007).

#### 2.1.2 Morfološke značilnosti

Virion je kroglaste oblike in v premeru meri 80–100 nm. Ima ikozaedrično kapsido, obdaja ga lipidna ovojnica, v katero so vgrajeni glikoproteini. Virus pridobi ovojnico ob brstenju iz okužene celice, v katero se predhodno vgradijo virusni glikoproteini, in sicer površinski (SU) in transmembranski (TM) glikoprotein. Neposredno pod ovojnico je virusni matriks, ki je zgrajen iz proteina matriksa (MA) in obdaja virusno kapsido. Virusna kapsida je sestavljena iz proteina kapside (CA) in genomske RNA skupaj z nukleokapsidnim proteinom (NC) ter virusnimi encimi (Desrosiers, 2007; Goff, 2007) (Slika 2-1).



Slika 2-1: Shematski prikaz retrovirusa

(what-when-how, <http://what-when-how.com/molecular-biology/retroviruses-part-1-molecular-biology/>).

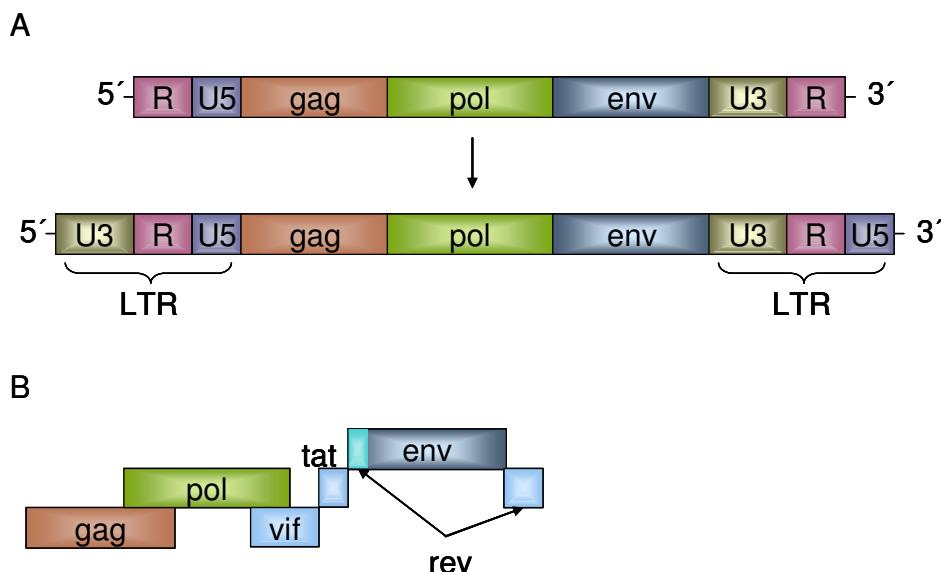
Figure 2-1: Schematic presentation of a retrovirus

(what-when-how, <http://what-when-how.com/molecular-biology/retroviruses-part-1-molecular-biology/>).

### 2.1.3 Organizacija genoma

Genom retrovirusov je sestavljen iz dveh identičnih kopij linearne pozitivno polarne enovijačne molekule RNA. Pri lentivirusih je vsaka molekula RNA velika približno 9 kb in vsebuje zapis za 3 gene (*gag*, *pol* in *env*), ki kodirajo strukturne proteine, ter zapis za gene, ki kodirajo nestruktурne proteine, pomembne pri regulaciji različnih faz virusnega pomnoževanja (Sonigo in sod., 1985; Saltarelli in sod., 1990). Slednji so pri MVV in CAEV le trije, in sicer *tat*, *rev* in *vif* (Davis in Clements, 1989; Sargan in Bennet, 1989; Kalinski in sod., 1991; Harmache in sod., 1995a; Kristbjörnsdóttir in sod., 2004) (Slika 2-3). Gen *gag* kodira strukturne proteine, in sicer protein matriksa, kapsidni protein in nukleokapsidni protein. Proteaza (PR), od RNA odvisna DNA polimeraza oziroma reverzna transkriptaza (RT), integraza (IN) in dUTPaza (DU) so virusni encimi, ki jih kodira gen *pol*. Gen *env* kodira glikoproteine ovojnice, in sicer površinski in transmembranski glikoprotein (Vigne in sod., 1982; Cheevers in sod., 1988a). Genom vseh retrovirusov vsebuje tudi nekodirajoče

regije, pomembne za pomnoževanje virusa (Sherman in sod., 1986; Hess in sod., 1989), in sicer regijo R (angl. repeat) na obeh koncih genoma, kratko zaporedje U5 na 5' koncu in zaporedje U3 na 3' koncu genoma. Provirusni genom pa ima na obeh koncih regijo LTR (angl. long terminal repeat), sestavljeni iz preurejenih segmentov U3-R-U5 (Sonigo in sod., 1985; Hess in sod., 1986; Sherman in sod., 1986; Saltarelli in sod., 1990) (Slika 2-2).



Slika 2-2: Organizacija genoma retrovirusov (A) in virusni geni (B).

Figure 2-2: Genome organization of retroviruses (A) and virus genes (B).

## 2.1.4 Virusni geni in proteini

### Gen *gag* (angl. group specific antigens)

Gen *gag* se najprej prevede v poliprotein ( $\text{Pr}55^{\text{gag}}$ ), ki je prekurzorski protein za tri strukturne virusne proteine in ga virusna proteaza razcepi v kapsidni protein (p25), nukleokapsidni protein (p14) in protein matriksa (p17) (Vigne in sod., 1982; Sonigo in sod., 1985; Cheevers in sod., 1988a). Protein matriksa leži neposredno pod lipidno ovojnico. Ker ima na N-terminalnem koncu veliko bazičnih preostankov, ima visoko moč vezave lipidov in je z virusno ovojnico neposredno povezan, prav tako je povezan tudi s citoplazemskim repom virusnega glikoproteina ovojnice. Kapsidni protein je temeljna sestavina virusne kapside (Goff, 2007). V serumu okuženih živali se najprej pojavijo protitelesa proti kapsidnemu proteinu (Petursson, 1990), kar je pomembno za diagnostiko bolezni. Nukleokapsidni protein je v tesnem stiku z virusno RNA in ima pomembno vlogo pri pomnoževanju virusa.

Pospošuje prileganje komplementarnih zaporedij molekul RNA. V začetni fazi virusnega pomnoževanja s tem vzpodbuja prileganje tRNA, ki služi kot začetni oligonukleotid, na mesto PBS virusne molekule RNA. Pospošuje tudi dimerizacijo dveh kopij molekule virusne RNA, ki skupaj tvorita virusni genom (Vogt, 1997).

### **Gen *pol* (angl. polymerase)**

Gen *pol* se skupaj z genom *gag* prevede v velik predhodni poliprotein Gag-Pol (Pr150<sup>Gag-Pol</sup>), ki ga virusna proteaza razcepi na štiri virusne encime: proteazo, reverzno transkriptazo, integrazo in dUTPazo (Vigne in sod., 1982; Pépin in sod., 1998).

S pomočjo polimerazne domene encima reverzna transkriptaza se virusna enovijačna RNA prepiše v dvojnovijačno DNA. Hkrati pa ta encim, ki ima tudi ribonukleazno domeno (angl. RNase H), razgrajuje osnovno matrico RNA (Lin in Papini, 1979; Cheevers in sod., 1981).

Encim integraza, ki ima encimsko aktivnost endonukleaze in ligaze, na vsakem 3' koncu genoma odreže nekaj nukleotidov in ustvari lepljive konce ter nato posreduje vgradnjo virusnega genoma v genom okuženih celic (Stormann in sod., 1995).

V končni fazi virusnega pomnoževanja, ko virus zapusti celico z brstenjem iz celične površine, sodeluje encim proteaza, ki znotraj novonastalih virusnih delcev razreže predhodne poliproteine v posamezne končne virusne proteine (Pearl in Taylor, 1987; Pépin in sod., 1998).

Gen *pol* pri nekaterih lentivirusih (EIAV, FIV, CAEV, MVV) kodira tudi encim dUTPazo, katere aktivnost znižuje nivo dUTP/TTP in s tem zmanjšuje možnost vgraditve uracila v virusno DNA. Aktivnost celične dUTPaze je večja v celicah, ki se delijo, kot v celicah, ki se ne delijo (npr. makrofagi). Turelli in sodelavci (1996) so dokazali, da je pri mutiranih virusih CAEV in MVV, ki ne nosijo zapisa za dUTPazo, močno zmanjšano pomnoževanje virusa v celicah, ki se ne delijo. V delečih se celicah ta mutacija ne vpliva na pomnoževanje virusa, saj je verjetno na razpolago dovolj celičnega encima. Pétursson in sodelavci (1998) so ugotovili, da pri intracerebralni okužbi ta mutacija ne vpliva na patogenost virusa MVV.

### **Gen *env* (angl. envelope)**

Gen *env* se prevede v predhodni poliprotein env (gp150), ki ga virusna proteaza razcepi na dva glikozilirana strukturna proteina ovojnice, in sicer površinski glikoprotein (gp135) in transmembranski glikoprotein (gp46) (Vigne in sod., 1982; Pépin in sod., 1998). Transmembranski glikoprotein je zasidran v membrano in nekovalentno povezan s površinskim glikoproteinem v heterodimer ter s citoplazemskim repom povezan z virusnim proteinom matriksa (Willey in sod., 1988; Gallaher in sod., 1989). Oba proteina virusne ovojnice sta odgovorna za pritrjevanje virusa na tarčno celico in za njegov vstop v celico, saj prepozna celične receptorje. Površinski glikoprotein omogoča pritrjevanje na receptor tarčne celice, medtem ko transmembranski glikoprotein posreduje zlitje virusne ovojnice s celično membrano in s tem vstop virusa v celico (Crane in sod., 1988; Malashkevich in sod., 2001). Oba proteina predstavlja antigensko mesto za nevtralizirajoča protitelesa (Torsteinsdóttir in sod., 2007).

### **Gen *vif* (angl. viral infectivity factor)**

Vif je virusni protein, ki deluje v kasnejših fazah virusnega pomnoževanja (Harmache in sod., 1995a) in je pomemben za nastanek perzistentne okužbe in za kužnost virusa (Harmache in sod., 1996; Kristbjörnsdóttir in sod., 2004). Študije virusa CAEV so pokazale, da vpliva na delovanje celičnih proteinov (Seroude in sod., 2002) in posledično povečuje kužnost virusa tako, da zavira celične protivirusne proteine iz družine APOBEC3 (Holmes in sod., 2007; Harris in Liddament, 2004; LaRue in sod., 2010).

### **Gen *tat* (angl. transactivator of transcription)**

Protein tat je pomemben za učinkovito pomnoževanje virusov HIV, SIV, BIV in EIAV, saj deluje kot močan transaktivacijski dejavnik prepisovanja z vezavo na TAR (angl. transactivating responsive element). Virusna genoma CAEV in MVV nimata zaporedja TAR in pri le-teh je protein tat šibek transaktivacijski dejavnik prepisovanja (Pépin in sod., 1998; Villet in sod., 2003a) in nima bistvenega pomena v procesu virusnega pomnoževanja (Harmache in sod., 1995b). Villet in sodelavci (2003b) so ugotovili, da protein tat virusov CAEV in MVV deluje podobno kot protein vpr virusa HIV-1.

### **Gen *rev* (angl. regulator of virion protein expression)**

Delovanje proteina rev je enotno znotraj rodu *Lentivirus* in je ključnega pomena za virusno pomnoževanje in kužnost virusa (Toohey in Haase, 1994; Clements in Zink, 1996). Protein rev se veže na mesto RRE (angl. rev responsive element) virusnih mRNA molekul in omogoča prenos nerazrezanih (angl. unspliced) in nepopolno razrezanih virusnih mRNA molekul iz jedra okužene celice v citoplazmo (Schoborg in sod., 1994; Clements in Zink, 1996).

### **2.1.5 Nekodirajoče regije virusnega genoma in njihova vloga**

Regija R je na obeh koncih virusnega genoma in vsebuje ponavljajoča zaporedja ter ima vlogo pri prenosu vijačnice med obratnim prepisovanjem (Berkhout, 2000). Na 5' koncu virusnega genoma, med regijo R in PBS (angl. primer binding site), je kratko zaporedje U5. Regija PBS je sestavljena iz nukleotidnega zaporedja, ki je komplementarno 3' koncu celične tRNA, ki služi kot začetni oligonukleotid za sintezo negativno polarne verige DNA (Beerens in Berkhout, 2002). Vodilno zaporedje (angl. leader, L) ima vlogo pri sestavljanju novih virusnih delcev (Berkhout, 1996). Na 3' koncu virusnega genoma je nekodirajoča regija, sestavljena iz zaporedij PPT (angl. polypurine tract), U3 in R. PPT je kratko zaporedje sestavljeno iz ponavljajočih baz A/G, ki je pomembno pri obratnem prepisovanju, saj je začetno mesto sinteze pozitivno polarne vijačnice DNA. U3 zaporedje se nahaja med PPT in R ter je signalno zaporedje za začetek prepisovanja provirusnega genoma (Telesnitsky in Goff, 1997).

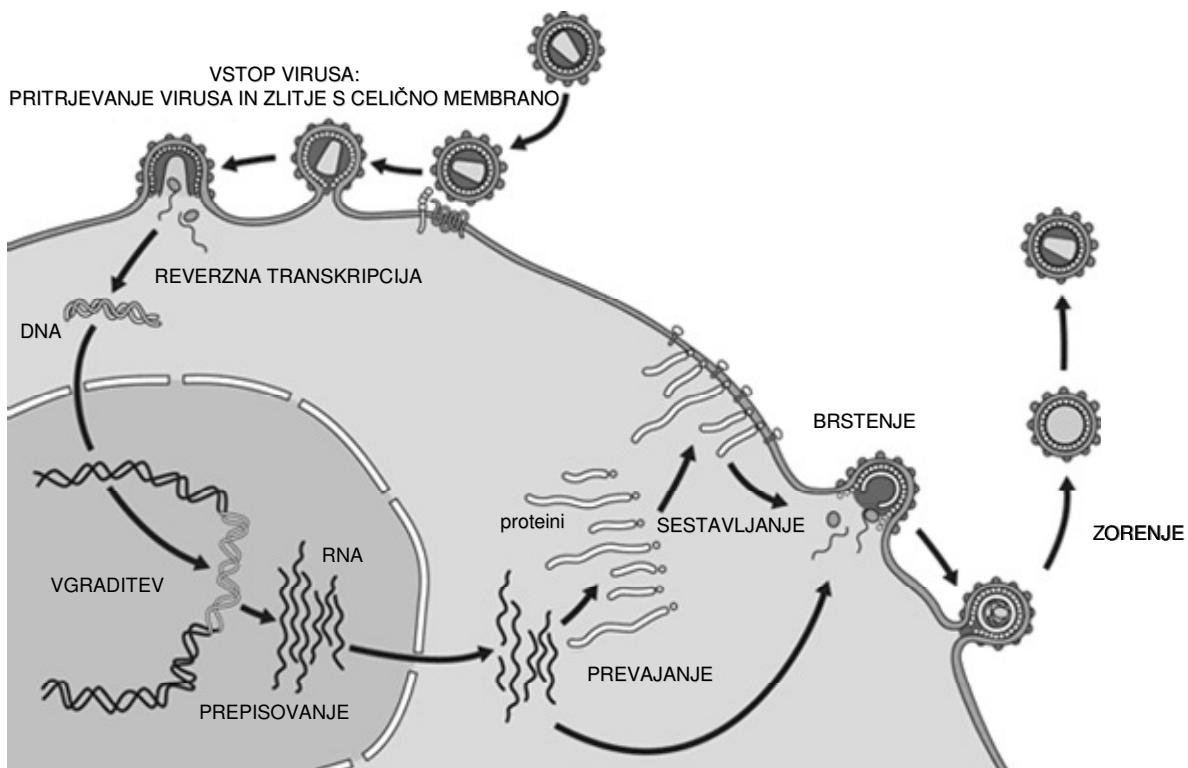
Provirusni genom ima na obeh koncih regijo LTR, ki predvsem znotraj zaporedja U3 vsebuje promotorje in ojačevalna zaporedja (angl. enhancers), na katere se vežejo transkripcijski faktorji ter uravnavaajo začetek prepisovanja provirusnega genoma (Sonigo in sod., 1985; Hess in sod., 1986; Saltarelli in sod., 1990). Regija LTR pri SRLV v nasprotju z virusi HIV in EIAV nima zaporedja TAR, na katerega se veže transkripcijski faktor tat (Pépin in sod., 1998). Pri SRLV je verjetno najpomembnejše mesto za bazalno aktivnost transkripcije in vezavo transkripcijskih faktorjev zaporedje AP-4 (Hess in sod., 1989). Regija LTR ima pomemben vpliv na celični tropizem SRLV (Agnarsdóttir in sod., 2000), saj nadzoruje ekspresijo virusnih genov, ki poteka le v končno diferenciranih zrelih makrofagih (Small in

sod., 1989; Clements in Zink, 1996). Aktivnost LTR je tudi pomemben dejavnik, ki vpliva na patogenost virusa. Znotraj regije LTR so pri sevih MVV, ki so povzročili nevrološko obliko bolezni, ugotovili dvakratno ponovitev zaporedja CAAAT, ki naj bi bilo neposredno povezano z nevrovirulenco (Andréssdóttir in sod., 1998; Oskarsson in sod., 2007). Angelopoulou in sodelavci (2008) so pri izolatih iz Grčije, ki so jih dokazali pri živalih brez kliničnih znakov, opisali delecijo v regiji R. Pri sevih, ki so jih izolirali pri živalih s pljučnico, pa te delecije niso ugotovili.

## 2.2 Pomnoževanje

S pomočjo glikoproteinov virusne ovojnice se virus pritrdi na receptorje celične membrane in vstopi v tarčno celico. Dalziel in sodelavci (1991) so na podlagi študije celičnih receptorjev domnevali, da MVV uporablja za vstop v tarčno celico molekule MHC II. Kasnejše študije (Barber in sod., 2000; Bruett in sod., 2000) pa nakazujejo, da naj bi bile za vstop MVV v tarčne celice odgovorne fosforilirane membranske serin/treonin kinaze. Crespo in sodelavci (2011) so proučevali ovčji lektin, ki je receptor za manozo in ga izražajo makrofagi in dendritične celice. Domnevajo, da ima le-ta vlogo pri vstopu virusa MVV v celice. Specifični celični receptorji, ki jih za vstop v tarčno celico uporablja CAEV, še niso odkriti. Znano je, da so celični receptorji tako za MVV kot za CAEV na različnih tipih celic različnih vrst gostiteljev (Lyall in sod., 2000; Hotzel in Cheevers, 2002a). Virusa MVV in CAEV pa naj ne bi uporabljala istih receptorjev (Hotzel in Cheevers, 2001; Hotzel in Cheevers, 2002b).

Pomnoževanje virusov MVV in CAEV poteka enako kot pri ostalih retrovirusih (Narayan in Clements, 1989; Freed in Martin, 2007; Goff, 2007), za katere je značilno, da se v okuženi celici virusna enovijačna RNA s pomočjo virusnega encima reverzne transkriptaze najprej prepiše v dvojnovijačno DNA, ki se vgradi v genom gostiteljske celice. Pomnoževanje se nadaljuje s prepisovanjem (transkripcijo) virusne DNA v virusno RNA in prevajanjem (translacijsko) RNA v virusne proteine. Pomnoževanje se zaključi s sestavljanjem novih virusnih delcev in brstenjem iz okužene celice (Slika 2-3).

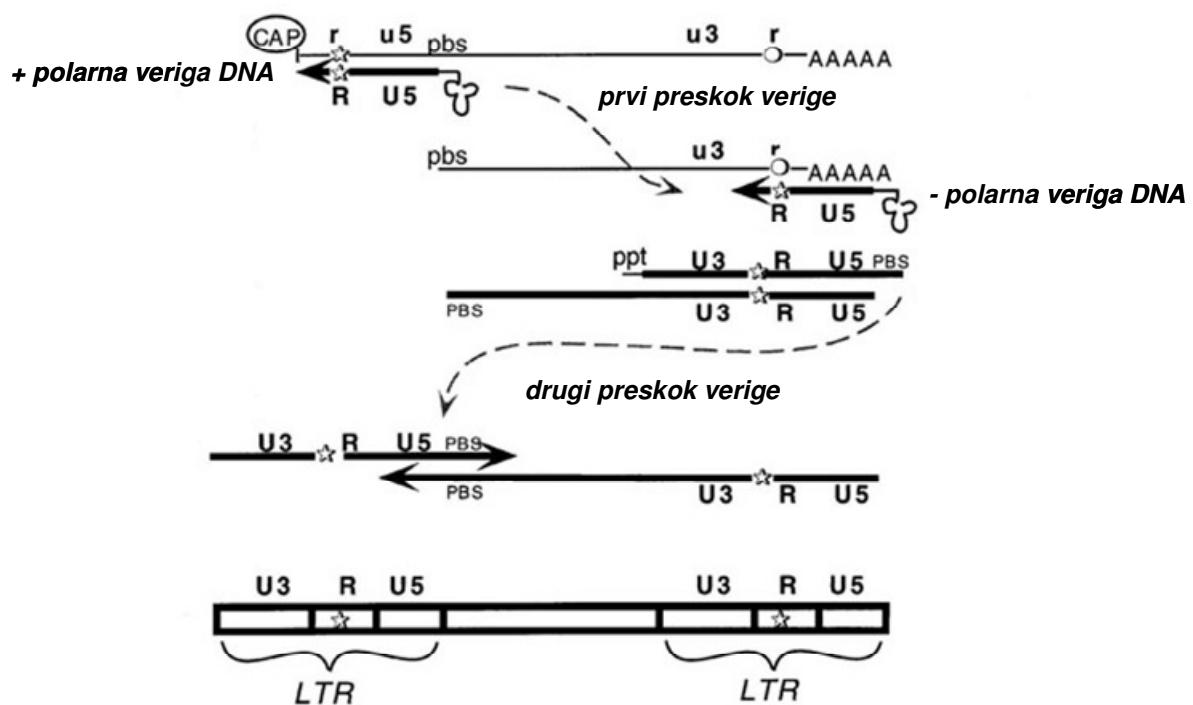


Slika 2-3: Pomnoževanje retrovirusov (Münk in Landau, 2003).

Figure 2-3: Retroviral replication (Münk and Landau, 2003).

Prepisovanje virusnega genoma poteka v več fazah in se začne s prileganjem tRNA, ki služi kot oligonukleotidni začetnik, na mesto PBS virusne RNA. Polimerazna domena virusne reverzne transkriptaze nadaljuje prepisovanje virusne RNA s podaljševanjem negativno polarne vijačnice DNA, ki je komplementarna zaporedjemu U5 in R. Domena reverzne transkriptaze, ki deluje kot RNaza H, hkrati s prepisovanjem razgrajuje zaporedja U5 in R virusne RNA. Negativno polarna vijačnica DNA nato »preskoči« na 3' konec virusne RNA. Na mestu zaporedij R, ki sta komplementarni, se obe verigi bazno parita in reverzna transkriptaza nadaljuje s podaljševanjem negativno polarne vijačnice DNA, pri čemer nastane hibridna molekula RNA:DNA. RNaza H razgradi virusno RNA razen zaporedja PPT, ki služi kot oligonukleotidni začetnik sinteze pozitivno polarne vijačnice DNA. Tudi zaporedje PPT nato razgradi RNaza H. Sledi drug »preskok« vijačnice DNA na način, da se zaporedje PBS pozitivno polarne vijačnice DNA in komplementarno zaporedje negativno polarne vijačnice DNA bazno parita. Reverzna transkriptaza dokonča sintezo obeh verig DNA in nastane dvojnovidna virusna DNA. Pri sintezi dvojnovidne DNA nastane na 3' in 5' koncih regija LTR, ki je sestavljena iz preurejenih segmentov U3-R-U5 in vsebuje promotorje in ojačevalna

zaporedja (Slika 2-4). Nastala dvojnovijačna DNA se s pomočjo encima integraze, ki odreže nekaj nukleotidov na obeh koncih in ustvari lepljive konce, nato prenese v celično jedro, kjer se s pomočjo zaporedij LTR vgradi v celični genom. Po vgraditvi se pomnoževanje retrovirusov nadaljuje s prepisovanjem in prevajanjem z uporabo gostiteljskih mehanizmov. Regija LTR, na katero se vežejo celični dejavniki prepisovanja, uravnava prepisovanje, ki poteka s pomočjo celične polimeraze RNA II. Med prepisovanjem nastaneta dve vrsti virusne RNA, in sicer virusna genomska RNA in razrezane ter nerazrezane mRNA, ki se prevedejo v virusne proteine. Dve kopiji genomske RNA, ki predstavlja genom novega viriona, in virusni proteini skupaj tvorijo nukleokapsido. Virusni glikoproteini ovojnici se vgradijo v celično membrano (Narayan in Clements, 1989; Goff, 2007). Virus zapusti celico z brstenjem s celične površine ali iz makrofagov z eksocitozo (Lee in sod., 1996).



Slika 2-4: Reverzna transkripcija (Brinkhof in van Maanen, 2010).

Figure 2-4: Reverse transcription (Brinkhof and van Maanen, 2010).

## 2.3 Zgodovina okužb z MVV in CAEV

Kronično bolezen maedi visna je leta 1952 prvič opisal Sigurdsson s sodelavci (1952) na Islandiji. Leta 1933 so na Islandijo uvozili ovce pasme karakul iz Nemčije, ki so bile okužene z virusom MVV, ampak niso kazale kliničnih znakov bolezni. Vir okužbe na Islandiji so bile te ovce, vendar zaradi počasnega poteka bolezni le-te več let niso opazili. V naslednjih več deset letih je bolezen povzročila smrt velikega števila ovac v tej državi. Bolezen se je izražala v dveh značilnih oblikah (Sigurdsson in sod., 1952; Sigurdsson in sod., 1957): kot oteženo dihanje, ki je posledica obolenja dihal (isl. maedi), in kot hujšanje, ki je posledica obolenja centralnega živčnega sistema (isl. visna). Bolezen so uvrstili med počasi napredajoče bolezni (angl. slow disease), med katere spadajo okužbe z lentivirusi in prioni in za katere je značilno, da se bolezenski znaki pojavijo več let po okužbi. Koncept počasi napredajočih bolezni je še danes v veljavi (Torsteinsdóttir in sod., 2007). Leta 1960 so ugotovili, da je povzročitelj bolezni virus (Sigurdsson in sod., 1960; Sigurdardóttir in Thormar, 1964).

Kasneje, leta 1974, so Cork in sodelavci (1974) v Združenih državah Amerike opisali bolezen neznane etiologije pri kozličkih s paralizo. Leta 1980 so izolirali virus in ga uvrstili med lentiviruse ter ga poimenovali CAEV (Crawford in sod., 1980a; Cork in Narayan, 1980). Epidemiološke in virološke študije kozjih čred, v katerih so opazili artritise pri odraslih kozah in levkoencefalomielitise pri kozličkih, so pokazale, da je za obe oblike bolezni odgovoren isti povzročitelj, in sicer CAEV (Clements in Zink, 1996).

Danes sta MVV in CAEV pri ovkah in kozah razširjena v mnogo državah po svetu (Peterhans in sod., 2004).

### 2.3.1 MVV in CAEV v Sloveniji

V Sloveniji so leta 1996 v čredi koz z detekcijo specifičnih protiteles prvič dokazali okužbo s CAEV. V letu 1997 so na prisotnost protiteles proti SRLV pregledali še pet čred ovac in čredo koz ter ugotovili, da je 57 % živali serološko pozitivnih (Grom in sod., 1998). Leta 2005 je v skladu s Pravilnikom o izvajanju sistematičnega spremljanja stanja kužnih bolezni in cepljenj živali v letu 2005 (UR List RS, št. 142/2004) potekal monitoring na ravni države, v

okviru katerega je bilo serološko pregledanih skoraj 30.000 koz in ovac. Ugotovili so, da je skoraj 6 % pregledanih živali serološko pozitivnih.

## 2.4 Molekularna epizootiologija

Filogenetska analiza nukleotidnih zaporedij celotnih genomov štirih virusnih sevov MVV in enega seva CAEV je potrdila sorodnost med temi virusi (Sonigo in sod., 1985; Pyper in sod., 1986; Querat in sod., 1990; Saltarelli in sod., 1990; Sagan in sod., 1991; Andrésson in sod., 1993). Virusa MVV in CAEV sta bila prvotno opredeljena kot vrstno specifična. Opisane so bile eksperimentalne okužbe ovc s CAEV in koz z MVV, vendar se naj ne bi pojavljale v naravi (Oliver in sod., 1982; Banks in sod., 1983; Smith in sod., 1985; Dickson in Ellis, 1989). V Franciji so na podlagi molekularne epidemiološke študije prvič opisali naravno okužbo ovc s CAEV in dokazali, da se virus prenaša med vrstami tudi v naravi (Leroux in sod., 1995; Leroux in sod., 1997). V naslednjih letih so sledili številni podobni opisi tudi iz drugih držav sveta (Castro in sod., 1999; Rolland in sod., 2002; Shah in sod., 2004; Pisoni in sod., 2005; Germain in Valas, 2006; Gjerset in sod., 2007, Grego in sod., 2007; Kuzmak in sod., 2007; Laamanen in sod., 2007; Glaria in sod., 2009), ki so potrdili prenos virusov CAEV in MVV med vrstami. Zato se danes uporablja izraz lentivirusi drobnice (angl. small ruminant lentiviruses, SRLV).

Zanoni (1998) je predlagal uvrstitev SRLV v šest skupin na podlagi filogenetske analize nukleotidnih zaporedij sevov SRLV dostopnih v genski banki. Filogenetska analiza je temeljila na zaporedjih relativno kratkih odsekov genov *gag*, *pol* in *env*. Kasneje so Shah in sodelavci (2004) določili nukleotidna zaporedja številnih virusnih sevov, izoliranih pri ovcah in kozah iz Švice. Uporabili so približno 1,8 kb dolgo zaporedje v regijah genov *gag* in *pol* in približno 1,2 kb dolgo zaporedje v regiji gena *pol*. Na podlagi nukleotidnih zaporedij 104 virusnih sevov, izoliranih pri ovcah in kozah iz Švice, ter zaporedij sevov SRLV, dostopnih v genski banki, so opravili filogenetske analize in predlagali uvrstitev SRLV v pet genetskih skupin, in sicer od A do D. Skupini A in B so razdelili na podskupine. Skupino A, v katero spadajo prototipi MVV, ki so bili prvotno izolirani pri ovcah, in je najbolj raznolika, so razdelili v sedem podskupin. Skupino B, v katero spadajo prototipi CAEV, ki so bili prvotno izolirani pri kozah, pa so razdelili v dve podskupini. V naslednjih letih so bile opravljene

številne molekularne epidemiološke študije (Gjerset in sod., 2006; Reina in sod., 2006; Grego in sod., 2007; Pisoni in sod., 2010; Bertolloti in sod., 2011; Gaimmarioli in sod., 2011; Olech in sod., 2012) in danes je znanih že 13 podskupin v genetski skupini A, v genetsko skupino B pa spadajo tri podskupine. V Italiji so pri kozah odkrili virus SRLV, ki spada v novo genetsko skupino E in je razdeljena v dve podskupini (Grego in sod., 2007; Reina in sod., 2010). Virusi SRLV, ki spadajo v genetski skupini A in B, so razširjeni po vsem svetu, medtem ko so virusi genetskih skupin C, D in E omejeni na določena geografska področja. Virusne seve, ki spadajo v genetsko skupino C, so ugotovili le na Norveškem (Gjerset in sod., 2006), virusne seve genetske skupine D so izolirali le v Švici in Španiji (Shah in sod., 2004; Reina in sod., 2006).

## 2.5 Prenos okužbe

Glavne tarčne celice SRLV so monociti ozziroma makrofagi in dendritične celice (Anderson in sod., 1983; Narayan in sod., 1982; Narayan in sod., 1983; Gendelman in sod., 1986; Ryan in sod., 2000). Tudi celice različnih tkiv so dovzetne za okužbo s SRLV in služijo kot rezervoar virusa. Okužene epitelne celice mlečne žleze so pomemben vir za prenos okužbe z matere na potomca (Zinc in sod., 1990; Lerondelle in sod., 1999). Druge celice, katerih okužba z virusom je pomembna za patogenezo bolezni, so endotelijalne celice in celice mikroglije centralnega živčnega sistema (Stowring in sod., 1985; Georgsson in sod., 1989). Ni še popolnoma razjasnjeno, ali se virus prenaša kot prost virion ali preko okuženih celic. Okužba pa se prenaša s tesnim stikom med živalmi, in sicer z matere na potomca predvsem s kolostrumom preko prebavnega trakta (Blacklaws in sod., 2004; Alvarez in sod., 2005), med starejšimi živalmi pa z respiratornimi izločki preko dihalnih poti (Blacklaws in sod., 2004; McNeilly in sod., 2007; McNeilly in sod., 2008). Neisalla in sodelavci (2008) so opisali eksperimentalen prenos virusa MVV preko očesne veznice. Prenos virusa *in utero* je redek in ni pojasnjeno, ali se plod okuži preko placente že v maternici ali med porodom (Ali Al Ahmad in sod., 2006). Opisana je tudi prisotnost provirusne DNA v semenu ovnov in kozlov, ki so bili z virusom okuženi po naravni poti, vendar prenosa virusa s spolnim stikom niso uspeli dokazati (Peterson in sod., 2008; Ali Al Ahmad in sod., 2008). Iatrogen prenos okužbe je malo verjeten, saj ni dokazov, da bi se virus v krvi nahajal kot prost virion in tudi virusno breme v krvi je nizko (Pétursson in sod., 1976; Klevjer-Anderson in sod., 1984).

## 2.6 Imunopatogeneza

Ne glede na način prenosa virus vstopi v organizem preko sluznice, in sicer najpogosteje preko sluznice dihal in prebavil. V sluznični površini virus okuži dendritične celice. Okužene dendritične celice nato potujejo do bezgavk, kjer okužijo makrofage. Okuženi makrofagi, ki zapustijo bezgavke, nato virus prenesejo v kostni možeg, kjer naj bi okužil mieloidne zarodne celice (Gendelman in sod., 1985) ali stromalne celice (Grossi in sod., 2005), kar povzroči perzistentno okužbo in kontinuirano produkcijo okuženih celic. Okužene mieloidne celice vstopijo v krvni obtok kot monociti, ki so prikrito (latentno) okuženi in prenesejo okužbo, ki je v tej fazi neproduktivna, po telesu in v tarčne organe (pljuča, centralni živčni sistem, skele in mlečno žlezo). V tkivih teh organov monociti dozorijo v tkivne makrofage, kar je povod za produktivno okužbo, saj lahko virus izpelje celotni cikel pomnoževanja le v zrelih makrofagih (Peluso in sod., 1985; Haase, 1986). Tkvni makrofagi izrazijo virusne antogene, ki aktivirajo imunski odziv gostitelja. Imunski odziv gostitelja nato povzroči kronično vnetje in patološke spremembe v tkivih tarčnih organov, ki so limfoproliferativne narave (Haase, 1986). Poškodbe tkiv pa privabijo še več monocitov, ki v tkivih dozorijo v makrofage, ti pa ponovno izrazijo virusne antogene. Hkrati pa imunska aktivacija makrofagov pospeši pomnoževanje SRLV. Ni še popolnoma raziskano, kateri citokini pri tem sodelujejo. Do zdaj je znano, da je pomnoževanje SRLV pospešeno pod vplivom GM-CSF, IL-1 $\beta$  in IFN- $\gamma$ . Opisali so tudi vpliv TNF- $\alpha$  na stimulacijo makrofagov (Ellis in sod., 1994; Tong-Starksen in sod., 1996; Zhang in sod., 2002; Murphy in sod., 2006). Počasno in progresivno napredovanje bolezni, značilno za okužbo s SRLV, je torej posledica konstantne poškodbe tkiv in kroničnega vnetja, ki postopno povzročajo vedno hujše patološke spremembe. Imunski odziv proti okužbi SRLV tako celo deluje spodbudno na pomnoževanje SRLV in napredovanje bolezni (Bertoni in Blacklaws, 2010).

## 2.7 Imunski odziv

Okužba s SRLV povzroči naraven ali prirojen imunski odziv. Ta je nespecifičen kot tudi pridobljen ali specifičen imunski odziv. Makrofagi in dendritične celice, le-te so glavne tarčne celice SRLV, služijo kot antigen predstavlajoče celice (angl. antigen presenting cells, APC) in so celice, ki predstavljajo pomembno povezavo med prirojenim in pridobljenim imunskim odzivom. Okužba s SRLV vpliva na delovanje APC in tako spremeni imunski odziv.

Eden izmed najpomembnejših mediatorjev, ki sodelujejo pri prirojenem imunskejem odzivu na virus, je interferon tipa I (angl. type I interferon, IFN) (Blacklaws, 2012). Pri okužbi s SRLV verjetno sodeluje tudi interferon tipa II oziroma IFN- $\gamma$ . IFN tipa I prepreči proliferacijo in diferenciacijo monocitov in zato prepreči pomnoževanje SRLV v monocitih, medtem ko na pomnoževanje SRLV v makrofagih bistveno ne vpliva. Zaradi IFN tipa I pa se poveča število celic, okuženih s SRLV, v tarčnih organih, saj spodbudi zbiranje monocitov (Bertoni in Blacklaws, 2010).

Pridobljen imunski odziv na okužbo s SRLV je humoralen in celično posredovan. Protitelesa lahko dokažemo od 1 do 3 mesece po eksperimentalni okužbi. Pri naravni okužbi pa se lahko protitelesa pojavijo od 6 mesecev do 2 leti po okužbi, kar predstavlja oviro za uporabo seroloških testov in potrebo po ponavljajočih testiranjih. Protitelesa proti SRLV spadajo v razreda IgM in IgG. Pri ovcah so prisotna le protitelesa izotipa IgG1, medtem ko so pri kozah prisotna tudi protitelesa izotipa IgG2. Pri nekaterih živalih lahko po začetni serokonverziji protitelesa tudi izginejo. Nevtralizacijska protitelesa spadajo tako v razred IgM kot v razred IgG1. Čeprav koze razvijejo tudi protitelesa IgG2, so nevtralizacijska le IgG1. Po okužbi s SRLV se tvorijo protitelesa proti vsem virusnim proteinom. Najpomembnejša so tista proti strukturnim proteinom virusa, ki imajo vlogo pri nadzoru okužbe in pomnoževanju virusa ter so pomembna tudi v diagnostiki SRLV.

Nevtralizacijska protitelesa so funkcionalno najpomembnejša protitelesa pri okužbi z virusi. Preprečujejo vezavo virusa na celične receptorje ali zlitje s celično membrano. Pri okužbi s SRLV se nevtralizacijska protitelesa pojavijo od 2 do 5 mesecev po okužbi, imajo nizko afiniteto in njihov titer je relativno nizek. Verjetno tudi funkcionalno niso pomembna, saj so SRLV v okuženem gostitelju vezani na celico in prostega virusa ne zaznamo. Nevtralizacijska protitelesa se tvorijo proti strukturnim proteinom, ki jih kodira gen *env*, in jih dokazujemo predvsem z imunoprecipitacijo. Protitelesa proti strukturnim proteinom, ki jih kodira gen *gag*, dokazujemo predvsem z encimsko imunskimi testi in z metodo prenosa po Westernu. Pri ovcah se najprej pojavi protitelesa proti proteinom, ki jih kodira gen *gag*. Protitelesa proti proteinom, ki jih kodira gen *env*, se pojavi kasneje in takrat tudi prevladujejo. Pri kozah se od 1 do 3 tedne po okužbi pojavi protitelesa proti proteinom, ki jih kodirata gena *gag* in *env*.

Po 6 mesecih prevladujejo protitelesa proti proteinom, ki jih kodira gen *env* (Bertoni in Blacklaws, 2010; Blacklaws, 2012).

Makrofagi in dendritične celice so fagociti in nosijo receptor za fragment protiteles Fc. Ko se nevtralizacijska protitelesa vežejo na virus, se ti kompleksi s pomočjo fragmenta Fc vežejo na receptorje na makrofagih in dendritičnih celicah ter s tem omogočijo vstop virusa v celico. Na tak način nevtralizacijska protitelesa ne delujejo zaščitno, temveč celo pospešujejo okužbo celic s SRLV.

Pri obrambi proti okužbi z virusi je pomemben tudi celični imunski odziv. Pri okužbi s SRLV nastanejo celice T pomagalke ali T CD4<sup>+</sup> in citotoksične celice T ali T CD8<sup>+</sup>, vendar nobene od njih ne nudijo zaščite proti okužbi s SRLV. Celice T CD4<sup>+</sup> pa imajo celo pomembno vlogo pri poteku okužbe s SRLV, saj sodelujejo pri okužbi makrofagov v bezgavkah (Blacklaws, 2012).

## 2.8 Klinična slika bolezni in patohistološke spremembe

Za okužbo s SRLV so značilne kronične vnetne spremembe predvsem centralnega živčnega sistema, pljuč, sklepov in mlečne žleze. Inkubacijska doba traja več mesecev ali let, potek bolezni je počasen in živali ostanejo okužene vse življenje. Zaradi dolge inkubacijske dobe veliko okuženih živali ne kaže kliničnih znakov bolezni, so pa vir okužbe za ostale živali (Peterhans in sod., 2004). V krvi je količina celic, okuženih s SRLV, majhna in v plazmi, tkivih ter limfi zelo redko opazimo prost virus (Ryan in sod., 2000; McNeilly in sod., 2007; Pétursson in sod., 1976; Pisoni in sod., 2007).

Bolezen je multisistemska s kroničnimi vnetnimi spremembami ter imunopatogena. Glavna sprememba je infiltracija tkiva z mononuklearnimi celicami, ki so lahko limfociti in monociti iz krvi ali pa proliferajoče tkivne celice. Limfociti, makrofagi in plazmatke so celice, ki sestavljajo infiltrate v tkivu. Ko se akumulira dovolj limfocitov, se ti organizirajo v limfoidne folikle, ki so podobni tistim v bezgavkah. Normalna tkivna sestava je sčasoma uničena in tkivo več ne more opravljati svoje funkcije. Katera tkiva bodo prizadeta in kako hitro bo

bolezen napredovala, je odvisno od seva SRLV, s katerim se je žival okužila, ter od genetskega ozadja živali (Blacklaws, 2012).

### 2.8.1 Maedi visna

Klinični znaki bolezni, ki so jo prvič opisali pri ovcah na Islandiji in jo poimenovali maedi (Sigurdsson in sod., 1952), se pojavijo pri odraslih živalih starejših od 3 do 4 let. Živali začnejo počasi hujšati in oteženo dihajo, predvsem po fizičnem naporu. Ti klinični znaki postopoma napredujejo in dihanje postane oteženo tudi kadar mirujejo. Bolezen s kliničnimi znaki po navadi traja od 3 do 8 mesecev ali več in nato žival pogine (Pálsson, 1976). Tipična patološka sprememba so močno povečana pljuča, ki so spremenjene barve in konzistence. Povečane so tudi traheobronhialne in mediastinalne bezgavke. Pri histološkem pregledu pljuč opazimo vnetje intersticija z odebeljenimi interalveolarnimi septami. Prisotna je tudi hiperplazija in hipertrofija gladkih mišičnih vlaken v interalveolarnih septah, občasno tudi fibroza. V pljučih je tudi močno razširjeno limfatično tkivo (Georgsson in sod., 1976).

Sigurdsson in sodelavci (1957) so opisali tudi nevrološko obliko bolezni pri ovcah in jo poimenovali visna. Bolezen se je pojavljala sporadično in pri živalih, pri katerih so opazili tudi bolezen maedi. Pri živalih, starejših od dveh let, opazimo ataksijo in parezo zadnjih nog, ki počasi napreduje do paraplegije ali popolne paralize živali. Živali hujšajo kljub normalnemu apetitu in hranjenju. Bolezen traja več mesecev ali celo več let in se vedno konča s poginom živali. Najpogostejsa patološka sprememba je kronično vnetje možganov in hrbtenjače. Za začetno fazo bolezni je značilno povečano število mononuklearnih celic v cerebrospinalni tekočini. Pri histološkem pregledu opazimo perivaskularno in subependimsko infiltracijo limfocitov ali mikroglije. Značilna je tudi demielinizacija. Vnetne spremembe se pojavljajo tudi v meningah možganov in hrbtenjače (Sigurdsson in Pálsson, 1958; Georgsson in sod., 1976). Medtem ko so po izbruhu bolezni na Islandiji opazili le prej omenjeni oblici bolezni, pa so v ZDA in Evropi kot posledico okužbe z virusom MVV pri ovcah opisali tudi mastitis in artritis. Zaradi infiltracije limfocitov in makrofagov postane vime trdo in povečano. Seski se lahko zamašijo in jagenjčki ne morejo sesati mleka (Oliver in sod., 1981; Deng in sod., 1986; Houwers in sod., 1988). Za artritis so značilni boleči in otekli sklepi.

Sklepi otečejo zaradi sinovialne hiperplazije in subsinovialne infiltracije limfocitov in plazmatk (Oliver in sod., 1981).

### **2.8.2 Kozji arthritis in encefalitis**

Artritis ali bolezen velikih kolen (angl. »big knee« disease) je najbolj pogosta klinična oblika bolezni pri kozah, okuženih z virusom CAEV (Crawford in Adams, 1981). Zbolijo odrasle živali in le približno tretjina jih kaže težke klinične znaake bolezni. Prizadeti so lahko vsi sklepi, vendar najpogosteje karpalni sklepi. Ti so v zgodnji fazi bolezni otekli (Bulgin, 1990; Cheevers in sod., 1988b) in v pozni fazi bolezni tudi zelo boleči (Krieg in Peterhans, 1990). Prizadete živali so lahko kljub normalnemu apetitu močno shujšane. Kozam v laktaciji pade količina mleka. Značilne patološke spremembe so otekli sklepi zaradi povečane količine sinovialne tekočine in v primeru težje oblike bolezni tudi mineralizacija mehkih tkiv, prisotnost fibrinskih vlaken ter poškodbe sklepnih površin. Pri patohistološkem pregledu prizadetih sinovialnih ovojnici opazimo hiperplazijo in hipertrofijo vilov, infiltracijo mononuklearnih celic intime in subintime ter angiogenezo (Crawford in sod., 1980b; Adams in sod., 1980; Woodard in sod., 1982; Wilkerson in sod., 1995; von Bodungen in sod., 1998). Poleg artritisa pa lahko pri kozah, okuženih s CAEV, opazimo tudi mastitis ali bolezen trdega vimena (angl. »hard udder« disease). Za to obliko bolezni so značilne kronične vnetne spremembe mlečne žleze, v kateri lahko otipamo trde vozliče, ki so posledica infiltracije tkiva mlečne žleze z mononuklearnimi levkociti (Cork in Narayan, 1980; Kennedy-Stoskopf in sod., 1985).

Pomembna oblika bolezni je tudi encefalitis pri kozličkih, okuženih s CAEV (Cork in sod., 1974). Ta klinična oblika bolezni se lahko pojavi tudi pri odraslih živalih. Prve klinične znaake opazimo pri kozličkih starih od 2 do 6 mesecev, in sicer parezo zadnjih nog ali ataksijo. Bolezen hitro napreduje in v nadaljnjih nekaj tednih se pojavi tudi pareza sprednjih nog. Živali se normalno odzivajo in imajo normalen apetit (Cork, 1976). Encefalomielitis z demielinizacijo in perivaskularno infiltracijo limfocitov, makrofagov in plazmatk je tipična patohistološka spremembra, ki jo opazimo pri tej obliki bolezni (Cork in sod., 1974; O'Sullivan in sod., 1978; Norman in Smith, 1983).

Pri kozah, okuženih s CAEV, se lahko pojavi tudi pljučnica. Za prizadeto pljučno tkivo je značilna limfocitna intersticijska pljučnica z infiltracijo levkocitov, makrofagov in plazmatik (Cork in sod., 1974; Narayan in Cork, 1985). Ta oblika bolezni pri kozah ni tako pomembna in izrazita kot maedi pri ovcah (Pépin in sod., 1998).

## 2.9 Diagnostika lentivirusov drobnice (SRLV)

Klasične diagnostične metode za določanje SRLV temeljijo predvsem na detekciji specifičnih protiteles. Agar gel imunodifuzijski test (AGID) in encimsko imunski test (ELISA) se najpogosteje uporablja in služita predvsem kot presejalna testa. Radioimunoprecipitacijski test (RIPA) in metoda prenosa po Westernu (angl. Western blot, WB) služita kot potrditvena testa, med katerima se najpogosteje uporablja test WB. Ker lahko od okužbe živali do tvorbe specifičnih protiteles preteče tudi več mesecev, nekatere živali pa ostanejo tudi serološko negativne (Peterhans in sod., 2004), je za določanje živali, pozitivnih na SRLV, poleg dokazovanja specifičnih protiteles treba dokazati tudi virus oziroma virusno nukleinsko kislino. Metoda izolacije virusa je dolgotrajna in nezanesljiva ter se ne uporablja v rutinski diagnostiki. Metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR) za dokaz provirusnega genoma v levkocitih je najpogosteje uporabljen molekularna metoda v diagnostiki SRLV (de Andrés in sod., 2005; Herrmann-Hoesing, 2010). V mikrobiološki diagnostiki se je uveljavila tudi metoda PCR v realnem času. Ta nam poleg detekcije omogoča tudi kvantifikacijo in genotipizacijo mikroorganizmov (Mackay in sod., 2007). Diagnostične metode lahko delimo tudi na posredne diagnostične metode, s katerimi dokazujemo prisotnost protiteles, in neposredne diagnostične metode, s katerimi dokazujemo virus oziroma virusno nukleinsko kislino.

### 2.9.1 Posredne diagnostične metode

#### 2.9.1.1 Agar gel imunodifuzijski test (AGID)

Prvi test AGID za uporabo v diagnostiki MVV je razvil Terpstra s sodelavci (1973) in je še danes klasična serološka metoda za dokazovanje okužbe s SRLV. Uporablja se tudi kot referenčni test (Herrmann-Hoesing, 2010). Splošno značilno za ta test je, da je visoko specifičen, ponovljiv in preprost za uporabo, potrebnih pa je veliko izkušenj za pravilno oceno

rezultatov (Rosati in sod., 1994; Peterhans in sod., 2004). V primerjavi s testom ELISA je AGID manj občutljiv (Rimstad in sod., 1994; Varea in sod., 2001; Toft in sod., 2007). Pri oceni občutljivosti in specifičnosti testa AGID je treba upoštevati, kateri virusni sev in virusni antigen se uporablja v testu, saj je občutljivost in specifičnost odvisna predvsem od le-teh (Knowles in sod., 1994). Knowles in sodelavci (1994) so v primerjalni študiji preiskovali serume koz in jih testirali s testom AGID z uporabo dveh virusnih sevov, in sicer CAEV-63 in WLC1. Pri uporabi ovčjega virusnega seva WLC1 za dokaz protiteles v serumu koz so ugotovili znatno nižjo občutljivost testa AGID. Antigena, ki se najpogosteje uporablja, sta površinski glikoprotein (gp135) in kapsidni protein p28 (CAEV) oziroma p25 (MVV), vendar pri odraslih ovcah, okuženih z MVV, in odraslih kozah, okuženih s CAEV, prevlada imunski odziv, ki je usmerjen proti antigenu gp135 (Herrmann in sod., 2005; Knowles in sod., 1990). Titer imunoprecipitacijskih protiteles proti p28 je po navadi nižji kot proti gp135. Poročajo tudi, da so pri nekaterih kozah, okuženih s CAEV, zaznali protitelesa proti gp135 in ne proti p28 ter obratno (Dawson, 1985; Adams in Gorham, 1986; Rimstad in sod., 1994). Priporočljivo je, da se v testu AGID uporablja oba antigena: gp135 in p28.

### **2.9.1.2 Encimsko imunski test (ELISA)**

Houwers in sodelavci (1979) so razvili prvi test ELISA za dokaz specifičnih protiteles proti MVV. V naslednjih letih in vse do danes je bilo opisanih že več kot 30 testov ELISA za detekcijo protiteles proti MVV in CAEV v serumih ovc in koz (de Andrés in sod., 2005; Herrmann-Hoesing, 2010). Najpogosteje se uporablajo indirektni testi ELISA (angl. indirect ELSA, i-ELISA), ki temeljijo na vezavi preiskovanih protiteles na antigen (Houwers in sod., 1982; Zanoni in sod., 1994; Saman in sod., 1999). Opisani so tudi kompetitivni testi ELISA (angl. competitive ELISA, c-ELISA), pri katerih se uporablajo monoklonska protitelesa, ki s protitelesi v preiskovanem serumu tekmujejo za vezavo z antigenom (Herrmann in sod., 2003a; Herrmann in sod., 2003b). Antigen, ki se uporablja v teh testih, je lahko v obliki prečiščenega celega virusa ali v obliki rekombinantnega proteina in tudi sintetičnega peptida. Na splošno velja, da so testi ELISA na osnovi celega virusa bolj občutljivi kot testi, ki temeljijo na uporabi le enega rekombinantnega proteina. Uporaba dveh rekombinantnih proteinov zviša občutljivost testa, ki je primerljiva z občutljivostjo testa osnovanega na uporabi celega virusa (de Andrés in sod., 2005). Pomanjkljivost testov i-ELISA je, da je

preiskovani serum po navadi treba redčiti. Posledica redčenja šibko pozitivnega seruma je lahko lažno negativen rezultat. Prednost testov c-ELISA pa je, da preiskovanih serumov ni treba redčiti, saj se preiskovana protitelesa vežejo na antigen in s tem preprečijo vezavo monoklonskih protiteles (Herrmann-Hoesing, 2010). S tem se poviša občutljivost testa, vendar se poveča tudi število lažno pozitivnih rezultatov. Izmed vseh opisanih testov ELISA jih le nekaj dosega visoko specifičnost in občutljivost v primerjavi s testi AGID, WB ali RIPA (Kwang in sod., 1993; Rosati in sod., 1994; Saman in sod., 1999; Herrmann in sod., 2003a; Herrmann in sod., 2003b; Houwers in Schaake, 1987; Heckert in sod., 1992).

### **2.9.1.3 Metoda prenosa po Westernu (WB)**

Test WB so razvili nekoliko kasneje kot AGID in RIPA (Houwers in Nauta, 1989). Danes se v rutinski diagnostiki SRLV uporablja predvsem kot potrditveni test za potrditev pozitivnih ali neopredeljenih rezultatov, pridobljenih s presejalnimi testi ELISA ali AGID (de Andrés in sod., 2005). Na nitrocelulozno membrano so naneseni posamezni virusni proteini. Membrano prepojimo s preiskovanim serumom in dodamo konjugat. Po dodatku substrata se mesta, kamor so naneseni virusni proteini, obarvajo. Test WB nam omogoča tudi določanje specifičnih protiteles proti posameznim virusnim proteinom (Reina in sod., 2009). Je bolj občutljiv kot testa ELISA in AGID, vendar ni na voljo standardiziranega protokola za izvedbo testa in interpretacijo rezultatov (Peterhans in sod., 2004).

## **2.9.2 Neposredne diagnostične metode**

### **2.9.2.1 Izolacija virusa na celični kulturi**

Za izolacijo virusa na celični kulturi se uporablja metoda kokultivacije levkocitov okužene živali z indikatorskimi celicami. Indikatorske celice, ki se najpogosteje uporabljajo, so primarne celične kulture, pridobljene iz zarodkov ali neokuženih novorojenih živali, in sicer ovčje celice horoidnega pleteža (angl. sheep choroid plexus, SCP), ovčje celice sinovialne membrane (angl. lamb synovial membrane, LSM) in kozje celice sinovialne membrane (angl. goat synovial membrane, GSM) (Hoff-Jorgensen, 1990). Uspešno izolacijo in pomnoževanje virusa v celični kulturi opazimo, ko se pojavi citopatski učinek (angl. cytopathic effect, CPE): propad celic in pojav večjedrinih celic velikank (sincicijev). Pomnoževanje virusa v celični

kulturi lahko spremljamo tudi z merjenjem aktivnosti reverzne traskriptaze v supernatantu celične kulture. Citopatski učinek se po navadi pojavi po nekaj pasažah okužene celične kulture. Zaradi nizkega virusnega bremena pa izolacija virusa na celični kulturi pogosto ni uspešna (Peterhans in sod., 2004; Thormar, 2005; OIE, 2008a). Metoda izolacije virusa na celični kulturi, ki je dolgotrajna in velikokrat neuspešna, se izvaja večinoma le v raziskovalne namene ter se v rutinski diagnostiki ne uporablja (Reina in sod., 2009).

### **2.9.2.2 Molekularne metode**

Velik napredek v diagnostiki SRLV je prinesel razvoj molekularnih metod: metoda verižne reakcije s polimerazo (angl. polymerase chain reaction, PCR) in PCR v realnem času (angl. real time PCR). Molekularne metode so se izkazale za uporabne predvsem za dokazovanje okuženih in seronegativnih živali. Od okužbe živali do tvorbe specifičnih protiteles lahko namreč preteče več mesecev, nekatere živali pa ostanejo tudi serološko negativne. Prav tako nam olajšajo diagnostiko SRLV za dokazovanje okužbe kozličkov in jagenjčkov, ki imajo prisotna kolostralna protitelesa in pri katerih so serološki testi neuporabni (Peterhans in sod., 2004; de Andrés in sod., 2005; Reina in sod., 2009). Poleg prej omenjenega nam molekularne metode omogočajo tudi genotipizacijo virusov in pomagajo razjasniti epidemiologijo in poti širjenja virusa (Reina in sod., 2009). Seveda imajo molekularne metode tudi nekaj pomanjkljivosti. Največja pomanjkljivost molekularnih testov v diagnostiki SRLV je nizko virusno breme v krvi okuženih živali. SRLV so virusi z RNA genomom, za katere je značilna visoka stopnja mutacij in posledično velika heterogenost, ki tudi predstavlja oviro pri uporabi molekularnih metod. Molekularne diagnostične metode naj bi temeljile predvsem na detekciji virusnih sevov, ki krožijo na določenem geografskem področju (de Andrés in sod., 2005). V plazmi ali serumu naravno okuženih živali prostega virusa s PCR s predhodno reverzno transkripcijo (angl. reverse transcription PCR, RT-PCR) niso uspeli dokazati, zato se v diagnostiki dokazuje predvsem provirusna DNA v levkocitih okuženih živali (Peterhans in sod., 2004; de Andrés in sod., 2005; Reina in sod., 2009; Herrmann-Hoesing, 2010).

### **2.9.2.3 Klasična metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR)**

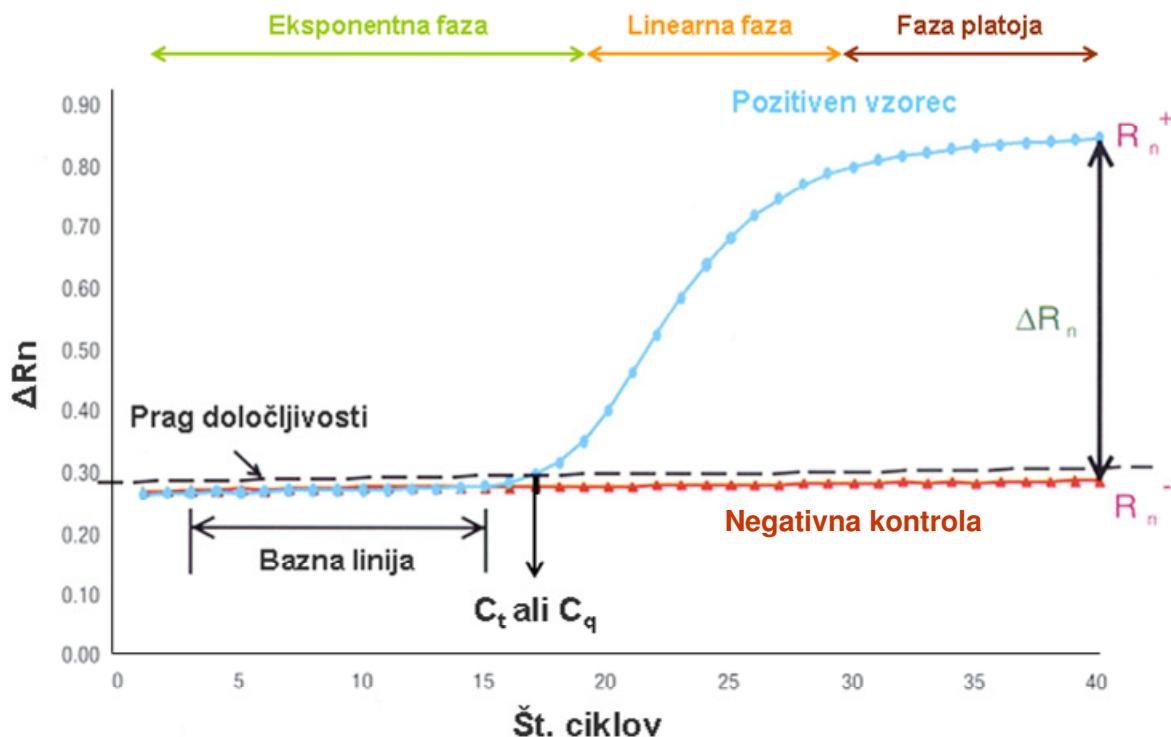
Klasična metoda PCR je robustna molekularna metoda, pri kateri s pomočjo termostabilnega encima DNA polimeraze pomnožujemo specifične odseke tarčne DNA. Pomnoževanje poteka

v treh korakih pri različnih temperaturah: denaturacija DNA, prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje verige z encimom DNA polimeraza. Vsi trije koraki sestavljajo en cikel, PCR pa izvajamo v več zaporednih ciklih (30–40) v termopomnoževalniku z zveznim spremiščanjem temperature. Število pomnoženih molekul DNA (produktov PCR) se ob optimalnih pogojih v vsakem ciklu podvoji in tako s potekom reakcije eksponentno narašča (Mackay in sod., 2002; Mackay, 2007). Produkte PCR detektiramo po končani reakciji z elektroforezo v agaroznem gelu in barvanju z interkalirajočim barvilom. Specifičnost metode PCR je določena z izbiro začetnih oligonukleotidov. Metodo PCR je leta 1983 zasnoval Kary B. Mullis (Mullis, 1990). Nekoliko kasneje so bili na voljo že različni komercialni kompleti in različne aparature za izvedbo PCR, kar je omogočilo, da se je metoda PCR začela množično uporabljati tudi v rutinski virološki diagnostiki (Tang in sod., 1997; Fredericks in Relman, 1999; Mackay in sod., 2002). Uporabo metode PCR za detekcijo provirusne DNA MVV in CAEV iz okužene celične kulture je prvi opisal Zanoni s sodelavci (1990). Sledile so številne objave metod PCR, ki pomnožujejo odseke različnih regij genoma SRLV. Pogosto se uporablja tudi metoda ugnezdene PCR ali semiugnezdene PCR, ki poveča občutljivost (Herrmann-Hoesing, 2010).

#### **2.9.2.4 Metoda PCR v realnem času**

Nadgradnja klasične metode PCR je metoda PCR v realnem času, ki so jo leta 1993 opisali Higuchi in sodelavci. S to metodo zaznamo produkte PCR neposredno že med samo reakcijo pomnoževanja, torej v realnem času. Pri uporabi te metode analiza produktov PCR na agaroznem gelu ni potrebna, in zato velja za izredno hitro diagnostično metodo. Reakcija poteka podobno kot pri klasični metodi PCR v termopomnoževalniku z zveznim spremiščanjem temperature v ponavljačih se ciklih. Zaznavanje produktov PCR poteka na osnovi merjenja sproščene fluorescence med reakcijo, ki je sorazmerna količini nastalih produktov PCR in med reakcijo narašča eksponentno. Zaradi osnovnega principa metode PCR v realnem času, ki temelji na zaznavanju sproščene fluorescence, je s to metodo mogoče pomnoževanje kratkih odsekov nukleinskih kislin, kar zagotavlja večjo specifičnost in ponovljivost te metode ter tudi krajši čas podaljševanja v primerjavi s klasično metodo PCR (Bustin, 2000; Ginzinger, 2002; Bustin, 2004).

Na tržišču trenutno obstaja veliko različnih kemijskih metod in tudi veliko različnih aparatur za izvajanje metode PCR v realnem času (Valasek in Repa, 2005). Ne glede na izbrano kemijsko metodo je osnovni princip zaznavanja količine nastalega produkta PCR skupen (Slika 2-5). Fluorescenco merimo ves čas poteka reakcije in računalniški program preračuna spremembo v signalu fluorescence ( $\Delta R_n$ ), ki je izražena kot razlika med fluorescenco produkta PCR v kateri koli časovni točki med pomnoževanjem ( $R_n+$ ) in fluorescenco ozadja v isti časovni točki ( $R_n-$ ). Končni rezultat je v obliki sigmoidne krivulje, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence ( $\Delta R_n$ ) od števila ciklov. Jakost fluorescence je v začetnih ciklih pomnoževanja pod pragom zaznavanja, saj je fluorescentni signal šibkejši od fluorescentnega signala ozadja. V eksponentni in linearni fazì pomnoževanja je količina produkta PCR že dovolj velika in jakost fluorescence dovolj močna, da zaznamo fluorescentni signal. Linearni fazì sledi plato faza, v kateri se zaradi zmanjšane aktivnosti encima in zmanjšanja koncentracije začetnih oligonukleotidov ter akumulacije tarčnih molekul reakcija upočasni. Količina produktov PCR več ne narašča in jakost fluorescentnega signala se več ne povečuje (Mackay in sod., 2002; Kubista in sod., 2006). Ko je reakcija pomnoževanja zaključena, z računalniškim programom izračunamo bazno linijo in določimo prag določljivosti. Bazna linija je v začetni fazì pomnoževanja, ko je jakost fluorescentnega signala še pod pragom zaznavanja, torej v prvih nekaj ciklih reakcije. Prag določljivosti določimo v začetni fazì eksponentne rasti fluorescence. Število ciklov, ki so potrebni za dvig signala fluorescence nad prag določljivosti, predstavlja vrednost  $C_q$  (angl. quantification cycle) oziroma  $C_t$  (angl. threshold cycle) (Bustin in sod., 2009). Rezultat reakcije podamo kot vrednost  $C_t$ , pri kateri fluorescentni signal prečka prag določljivosti. Čim večje je število tarčnih molekul v vzorcu, prej bo narasla jakost fluorescence in nižja bo vrednost  $C_t$ . Če primerjamo vrednosti  $C_t$  tarčnih molekul nukleinske kisline v vzorcu z vrednostmi  $C_t$  standardov z znanim številom kopij, lahko v vzorcu natančno določimo absolutno število kopij tarčnih molekul. Zaradi tega PCR v realnem času imenujemo tudi kvantitativni PCR (angl. quantitative PCR, qPCR) (Walker, 2002; Bustin in sod., 2005; Kubista in sod., 2006).



Slika 2-5: Prikaz poteka PCR v realnem času

(University of Iowa, DNA Facility: <http://dna-9.int-med.uiowa.edu/?q=node/19>).

Figure 2-5: Presentation of the real time PCR course

(University of Iowa, DNA Facility: <http://dna-9.int-med.uiowa.edu/?q=node/19>).

Za ugotavljanje nastalih produktov PCR uporabljamo nespecifično in specifično detekcijo.

Nespecifična detekcija temelji na uporabi interkalirajočih barvil, ki se nespecifično vgradijo v dvojnovidno DNA (angl. double stranded DNA, dsDNA) in oddajo močan fluorescentni signal (Kubista in sod., 2006). Specifičnost te metode je določena izključno z začetnimi oligonukleotidi, saj se ta barvila vgradijo v vsako dsDNA (Bustin, 2000). Morebitni nastanek nespecifičnih produktov PCR preverimo z analizo talilnih krivulj (angl. melting curve analysis) po končani reakciji PCR (Ririe in sod., 1997). Interkalirajoče barvilo, ki se najpogosteje uporablja, je SYBR® Green I (Wittwer in sod., 1997).

Pri specifični detekciji uporabljamo fluorescentno označene oligonukleotidne sonde. Mehanizem delovanja temelji na fluorescentno rezonančnem prenosu energije (angl. fluorescent resonance energy transfer, FRET) (Mackay, 2007). Pri uporabi metode PCR v realnem času za detekcijo virusov se najpogosteje uporablja hidrolizirajoče sonda, ki so

označene z dvema barviloma (Gunson in sod., 2006; Belak, 2007). Te sonde so na 5' koncu označene s poročevalskim barvilo (angl. reporter), na 3' koncu pa z dušilnim barvilo (angl. quencher). Poročevalsko in dušilno barvilo sta fizično tako blizu, da dušilno barvilo absorbira emitirano svetlobo vzbujenega reporterskega barvila. Kakor hitro se ti dve barvili prostorsko ločita, ko polimeraza DNA s 5'→3' eksonukleazno aktivnostjo katalizira hidrolitično razgradnjo vezane sonde, mehanizem FRET preneha delovati in poročevalsko začne oddajati energijo v obliki fluorescence (Kreuzer in sod., 2000; Arya in sod., 2005).

Najpogosteje uporabljeno poročevalsko barvilo je derivat fluoresceina FAM (6-karboksi-fluorescein). Na voljo so tudi druga barvila z emisijskim spektrom drugih valovnih dolžin. Dušilno barvilo je lahko drugi fluorofor, na primer TAMRA (6-karboksi-tetrametil-rodamin), ki oddaja prejeto energijo v obliki svetlobe druge valovne dolžine. V zadnjem času se vse bolj uporablja dušilna barvila, ki ne fluorescirajo: NFQ (angl. nonfluorescent quencher) ali BHQ (angl. black hole quencher), ki prejeto energijo oddajajo v obliki toplote. Sonde MGB (angl. minor groove binding) so kemično modificirane TaqMan® sonde. Na 3' koncu imajo poleg NFQ vezan dihidrociklopiroloindol tripeptid (DPI3), ki se veže v mali graben molekule DNA, in tako sondi poveča jakost in stabilnost vezave (Kutyavin in sod., 2000).

### Absolutna kvantifikacija

Za absolutno kvantifikacijo tarčnih molekul DNA potrebujemo standard z znano koncentracijo oziroma z znanim številom kopij, ki je lahko izolirana DNA referenčnega materiala, *in vitro* sintetizirana ssDNA, prečiščena plazmidna dsDNA z vstavljenim tarčnim zaporedjem ali produkt PCR. Pripravimo serijo desetkratnih razredčin standarda in iz njih standardno krivuljo. Iz linearne regresije standardne krivulje lahko za neznan vzorec določimo število kopij tarčne molekule (Bustin, 2000). Vrednost  $C_t$  je obratno sorazmerna logaritmu začetnega števila tarčnih molekul (Bustin, 2000; Higuchi in sod., 1993). Linearna regresijska premica se izračuna kot odvisnost vrednosti  $C_t$  od koncentracije oziroma števila kopij DNA v vzorcu.

Učinkovitost pomnoževanja (angl. efficiency, E) se izračuna na podlagi standardne krivulje in naklona linearne regresijske premice (angl. slope, s) po formuli:  $E = (10^{(1/s)}) - 1$ .

100-odstotna učinkovitost pomnoževanja ustreza naklonu standardne krivulje  $s = -3,32$ , kar pomeni, da se količina DNA z vsakim ciklom točno podvoji, kar pa je v praksi v bioloških vzorcih zelo redek pojav (Mackay, 2007).

Na podlagi razredčin standarda lahko določimo tudi mejo zaznavanja (angl. limit of detection, LOD). Meja zaznavanja je najnižja koncentracija, pri kateri zaznamo 95 % pozitivnih vzorcev. Iz standardne krivulje določimo območje, v katerem je reakcija linearna (angl. linear range), pri čemer je pomemben tudi koeficient korelacije (angl. correlation coefficient,  $R^2$ ) (Bustin in sod., 2009).

### **2.9.3 Detekcija SRLV s PCR v realnem času**

Za detekcijo SRLV z metodo PCR v realnem času je relativno malo opisov (Herrmann-Hoesing, 2010). Gudmundsson in sodelavci (2003) so opisali prvo kvantitativno metodo RT-PCR v realnem času (RT-qPCR) z uporabo fluorescentno označenih oligonukleotidnih sond. Določali so genomska zaporedja virusne RNA, DNA in mRNA v različnih fazah virusnega pomnoževanja v celičnih kulturah. Barros in sodelavci (2004) so v okviru študije genetske karakterizacije virusnega seva P1OLV razvili metodo RT-qPCR za določanje kinetike rasti virusa v celični kulturi. Ravazzolo in sodelavci (2006) so opisali metodo RT-qPCR in qPCR. Uporabili so jo za določanje virusnega bremena v tkivih različnih organov koz, ki so jih eksperimentalno okužili s CAEV. Tudi Carozza in sodelavci (2010) so razvili metodo RT-qPCR in qPCR za določanje virusnega bremena pri eksperimentalno okuženih živalih. V okviru te študije so raziskovali virusni sev MVV EV1, s katerim so okužili ovce.

Brinkhoff in sodelavci (2008) so razvili PCR v realnem času za diagnostiko SRLV pri ovcah in kozah z uporabo interkalirajočega barvila SYBR Green. Tarčno zaporedje so izbrali na ohranjeni regiji LTR in leader-gag za specifično detekcijo SRLV. Testirali so provirusno DNA izolirano iz levkocitov vzorcev periferne krvi koz in ovac.

Metodo PCR v realnem času, ki poleg detekcije omogoča tudi kvantifikacijo, vendar je specifična le za MVV, so razvili Herrmann-Hoesing in sodelavci (2007). Temelji na

specifičnem pomnoževanju tarčnega odseka gena *env* z uporabo hidrolizirajoče sonde TaqMan. Testirali so krvne vzorce ovc in določali provirusno DNA izolirano iz levkocitov.

## 2.10 Izkoreninjenje in preventiva bolezni

Islandija je edina evropska država, ki je uspela izkoreniniti bolezen MV (Pálsson in sod., 1985). Poskusi izkoreninjenja bolezni so sledili tudi v drugih evropskih državah: v Belgiji, Franciji, na Danskem, Nizozemskem, Finskem, Norveškem, Švedskem in v Švici. Podobne programe izkoreninjenja so vpeljali tudi v Združenih državah Amerike in Kanadi (Peterhans in sod., 2004; Reina in sod., 2009). Poznamo različne načine izkoreninjenja bolezni glede na seroprevalenco in število živali, vključenih v program izkoreninjenja. Na Islandiji so bolezen izkoreninili z usmrтitvijo živali v vseh okuženih tropih, ki so jih nadomestili z živalmi, prostimi okužbe s SRLV (Pálsson in sod., 1985). Večinoma pa programi izkoreninjenja temeljijo na serološkem testiranju živali, starejših od 6 mesecev. Usmrti se vse seropozitivne živali razen brejih seropozitivnih živali. Te ločimo od seronegativnih. Neposredno po porodu, pred zaužitjem kolostruma, se jagenjčke in kozličke loči od seropozitivnih mater, le-te pa se usmrti. Jagenjčke in kozličke se napaja s kolostrumom seronegativnih živali, pasteriziranim kolostrumom ali kravjim kolostrumom. Vsakih od 6 do 12 mesecev se serološko testira vse živali in usmrti seropozitivne (Reina in sod., 2009). Ne glede na način, ki ga izberemo za izkoreninjenje bolezni, pa bi moral program vključevati tako živali okužene z MVV kot s CAEV (Reina in sod., 2009).

Trenutno ni na voljo učinkovitega cepiva proti MVV in CAEV (Reina in sod., 2009).

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 Živali

V raziskavo smo vključili ovce in koze različnih pasem iz različnih geografskih področij Slovenije. Vse živali so bile starejše od 6 mesecev. V raziskavo smo vključili mesne pasme ovc; te so bile jezersko-solčavska (JS), oplemenjena jezersko-solčavska (JSR), texel (T) in suffolk, in eno mlečno pasmo ovc, in sicer bovško pasmo (B). Od mlečnih pasem koz smo v raziskavo vključili koze slovenske srnaste pasme (SR) in slovenske sanske pasme (SA). Burska pasma (BU) je bila edina mesna pasma koz, ki smo jo vključili v raziskavo (Tabela 3-1).

V raziskavo smo zajeli skupaj 36 rejcev drobnice, in sicer 21 rejcev koz, 6 rejcev ovac in 9 rejcev mešanih tropov (Tabela 3-1). Skupno število živali je bilo 1538.

Vzorce polne krvi in serumske vzorce smo odvzeli v sodelovanju z veterinarji s Klinike za prežvekovalce in ambulatorno kliniko na Veterinarski fakulteti in zasebnimi veterinarji ter študenti Veterinarske fakultete.

Vzorce krvi smo odvzeli iz jugularne vene v vakuumske epruvete.

Tabela 3-1: Seznam živali, ki smo jih vključili v raziskavo.

Table 3-1: List of animals included in this study.

| Oznaka<br>reje | Vrsta<br>živali | Pasma živali   | Starost živali | Število<br>živali | Leto<br>odvzemaja<br>vzorcev | Statistična regija    |
|----------------|-----------------|----------------|----------------|-------------------|------------------------------|-----------------------|
| 1              | koze            | SR             | 1-9 let        | 112               | 2008                         | Jugovzhodna Slovenija |
| 2              | koze            | SR             | *              | 104               | 2008                         | Obalno-kraška         |
| 3              | koze            | *              | 1-5 let        | 12                | 2008                         | Osrednjeslovenska     |
| 4              | koze            | *              | *              | 10                | 2008                         | Osrednjeslovenska     |
| 5              | koze            | *              | 6 mes-10 let   | 30                | 2009                         | Savinjska             |
| 8              | koze            | SR             | *              | 34                | 2010                         | Osrednjeslovenska     |
| 9              | koze            | *              | *              | 6                 | 2010                         | Savinjska             |
| 10             | koze            | BU             | *              | 12                | 2010                         | Osrednjeslovenska     |
| 11             | koze            | BU             | *              | 67                | 2010                         | Podravska             |
| 12             | koze            | *              | *              | 8                 | 2010                         | Osrednjeslovenska     |
| 13             | koze            | *              | *              | 137               | 2010                         | Osrednjeslovenska     |
| 14             | ovce            | JSR            | 6 mes-20 let   | 22                | 2010                         | Jugovzhodna Slovenija |
| 15             | koze            | *              | *              | 23                | 2010                         | Osrednjeslovenska     |
| 16             | koze            | *              | *              | 17                | 2010                         | Savinjska             |
| 17             | ovce            | B              | 2-8 let        | 20                | 2010                         | Goriška               |
| 18             | ovce/koze       | B, SR, SA      | 8 mes-5 let    | 4/15              | 2010                         | Goriška               |
| 19             | koze            | *              | *              | 165               | 2010                         | Osrednjeslovenska     |
| 20             | koze            | *              | *              | 13                | 2010                         | Podravska             |
| 21             | koze            | *              | *              | 19                | 2010                         | Savinjska             |
| 22             | koze            | *              | *              | 17                | 2010                         | Pomurska              |
| 23             | ovce/koze       | T, BU, SR      | 2-7 let        | 1/10              | 2010                         | Spodnjeposavska       |
| 24             | koze            | BU             | 6 mes-8 let    | 35                | 2010                         | Osrednjeslovenska     |
| 25             | ovce/koze       | *              | 9 mes-5 let    | 6/2               | 2011                         | Jugovzhodna Slovenija |
| 26             | ovce/koze       | *              | 1-2 leti       | 13/2              | 2011                         | Jugovzhodna Slovenija |
| 27             | koze            | BU             | 2-7 let        | 16                | 2011                         | Zasavska              |
| 28             | ovce            | JSR            | *              | 20                | 2011                         | Jugovzhodna Slovenija |
| 29             | koze            | BU             | *              | 20                | 2011                         | Jugovzhodna Slovenija |
| 30             | ovce            | JS             | 2-4 leta       | 5                 | 2011                         | Jugovzhodna Slovenija |
| 31             | ovce/koze       | JS, JSR, T, SR | 2-10 let       | 36/3              | 2011                         | Jugovzhodna Slovenija |
| 32             | ovce/koze       | JS, BU         | 1-12 let       | 32/5              | 2011                         | Gorenjska             |
| 33             | ovce/koze       | JS, SR         | 1-8 let        | 68/2              | 2011                         | Gorenjska             |
| 34             | ovce/koze       | JS, SR, SA     | 1-5 let        | 11/4              | 2011                         | Osrednjeslovenska     |
| 35             | ovce            | Suffolk        | 2-9 let        | 109               | 2011                         | Jugovzhodna Slovenija |
| 36             | ovce            | Suffolk        | 1-8 let        | 70                | 2011                         | Jugovzhodna Slovenija |
| 37             | koze            | SA, SR         | 6 mes-12 let   | 90                | 2011                         | Gorenjska             |
| 38             | ovce/koze       | SA, SR, JS     | *              | 30/101            | 2011, 2012                   | Notranjsko-kraška     |

\* Ni podatka. SR = slovenska srnasta koza, BU = burska koza, JSR = oplemenjena jezersko-solčavska ovca,

B = bovška ovca, SA = slovenska sanska koza, T = ovca pasme texel, JS = jezersko-solčavska ovca.

\* Not known. SR = Slovenian Alpine goat, BU = Boer goat, JSR = Improved Jezersko-Solčava sheep,

B = Bovec sheep, SA = Slovenian Saanen goat, T = Texel sheep, JS = Jezersko-Solčava sheep.

### **3.2 Serumski vzorci**

Za dokazovanje prisotnosti protiteles proti virusom SRLV smo odvzeli 1538 vzorcev serumov v vakuumske epruvete. Krvne vzorce smo centrifugirali 10 minut pri 2000 obratih/min in 20 °C. Do izvedbe seroloških testov smo preiskovane vzorce hranili pri –20 °C.

### **3.3 Vzorci polne krvi**

Za analizo vzorcev z molekularnimi metodami smo odvzeli 524 vzorcev polne krvi v vakuumske epruvete z antikoagulantom EDTA. Iz vzorcev polne krvi, ki smo jih hranili pri 4 °C, smo v 4 dneh od prejetja izolirali levkocite in jih nato hranili pri –20 °C do nadaljnje uporabe. V primerih, ko iz vzorcev polne krvi nismo izolirali levkocitov, smo kri zamrznili in hranili pri –20 °C do nadaljnje uporabe.

### **3.4 Virusni sevi**

Referenčna virusna seva MVV 1514 in CAEV Co smo dobili od dr. G. Bertonija z Inštituta za veterinarsko virologijo Univerze v Bernu (Švica). Prav tako smo od dr. G. Bertonija dobili izolirano provirusno DNA virusnih sevov podtipov A3 in A4. Izolirano provirusno DNA virusnega seva AghOV-478 podtipa B2 smo pridobili od dr. S. Valasa iz referenčnega laboratorija za MVV/CAEV v Niortu (Francija).

### **3.5 Priprava pufrov in gojišč**

#### **3.5.1 Pufer za lizo eritrocitov (angl. red cell lysis buffer, RCLB)**

Za pripravo 1000 ml pufra smo natehtali:

- 8,29 g NH<sub>4</sub>Cl,
- 1,00 g KHCO<sub>3</sub>,
- 0,372 g EDTA.

Reagente smo prenesli v čašo in dodali 1000 ml demineralizirane vode. pH raztopine smo umerili na 7,3 in ga s sistemom za filtriranje filtrirali skozi celuloznoacetatni filter s porami

velikosti 0,22 µm (Corning® filter systems, Corning, ZDA). Hranili smo ga v hladilniku pri temperaturi 4 °C.

### **3.5.2 Fosfatni pufer brez pozitivno nabitih ionov (angl. phosphate buffer saline, PBS-A)**

Za pripravo 1000 ml pufra smo natehtali:

- 8,00 g NaCl,
- 0,20 g KCl,
- 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,
- 0,20 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Reagente smo prenesli v čašo in dodali 1000 ml demineralizirane vode. pH raztopine smo umerili na 7,4 do 7,6 in ga s sistemom za filtriranje filtrirali skozi celuloznoacetatni filter s porami velikosti 0,22 µm (Corning® filter systems, Corning, ZDA). Hranili smo ga v hladilniku pri temperaturi 4 °C.

## **3.6 Encimsko imunski test (ELISA)**

S komercialnim testom Chekit-CAEV/MVV Screening ELISA Test Kit (IDEXX Laboratories, Švica) smo dokazovali prisotnost protiteles proti virusoma MVV in CAEV v serumskih vzorcih koz in ovac. Test zagotavlja hitro, enostavno, občutljivo in specifično dokazovanje protiteles proti virusoma MVV in CAEV v serumskih vzorcih, vzorcih plazme in mleka koz in ovac. V testu se kot antigen uporablja cel virus, in sicer švicarski sev MVV OLV (Zanoni in sod., 1994), ki je vezan na mikrotiterske plošče. Na mikrotiterske plošče nanesemo razredčen vzorec in kontrole. Če so v vzorcu prisotna protitelesa proti MVV ali CAEV, se leta vežejo z antigenom v jamici. Nevezan material speremo in dodamo konjugat z monoklonskimi protitelesi proti protitelesom prežvekovalcev, ki so označena s peroksidazo. V primeru, ko so specifična protitelesa prisotna v vzorcu, se po dodatku substrata raztopina v jamici obarva modro. Po predvidenem reakcijskem času ustavimo reakcijo s stop raztopino, ki spremeni barvo substrata v rumeno. Stopnjo obarvanja odčitamo fotometrično pri valovni dolžini 450 nm. Rezultate ovrednotimo glede na odčitano vrednost OD (angl. optical density,

OD) vzorca in OD pozitivne ter negativne kontrole. Test smo izvedli po navodilih proizvajalca.

#### Izvedba testa ELISA

V vse jamice mikrotiterske plošče smo nanesli 90 µl raztopine za spiranje, ki smo jo predhodno redčili z deionizirano vodo v razmerju 1 : 10. V vsako mikrotitersko ploščo smo dodali 10 µl pozitivne kontrole (PK) in 10 µl negativne kontrole (NK) ter 10 µl vzorca, in sicer en preiskovani vzorec v eno jamico. Sledila je 90-minutna inkubacija pri sobni temperaturi. Mikrotitersko ploščo smo nato trikrat sprali z raztopino za spiranje in v vsako jamico dodali 100 µl konjugata (Anti-Ruminant-IgG Conjugate). Ponovno smo inkubirali 90 minut pri sobni temperaturi in trikrat spirali. V vsako jamico smo nato dodali 100 µl substrata (TMB Substrate) in po 15-minutni inkubaciji pri sobni temperaturi reakcijo ustavili z dodatkom 100 µl stop raztopine (Stop solution). Rezultate smo odčitali s čitalcem mikrotiterskih plošč za test ELISA (Sunrise Absorbance Reader, Tecan, Avstrija) pri valovni dolžini 450 nm. Rezultate smo analizirali na podlagi dobljenih vrednosti OD po enačbah, ki so predložene v navodilih proizvajalca.

### **3.7 Metoda prenosa po Westernu (WB)**

S testom WB, ki so ga razvili na Inštitutu za veterinarsko virologijo Univerze v Bernu (Švica), smo dokazovali prisotnost protiteles proti antigenom p17, p25 in gp135 virusov MVV in CAEV v serumskih vzorcih koz in ovac. V tem testu se uporablja antigene prečiščenega virusa, ki jih ločimo na 12 % poliakrilamidnega gela in prenesemo na nitrocelulozno membrano. Membrano nato narežemo na trakove. Vsak preiskovani serum in kontrolna seruma nanesemo posamično na membranski trak in inkubiramo. Če so bila v vzorcu prisotna protitelesa proti virusoma MVV ali CAEV, se le-ta vežejo z antigenom na membrani. Nevezan material speremo in dodamo konjugat z rekombinantnim proteinom G, ki je označen z alkalno fosfatazo. Specifična protitelesa v vzorcu dokažemo po dodatku substrata, ki se je v primeru pozitivne reakcije obarval rdeče. Po predvidenem reakcijskem času ustavimo reakcijo z destilirano vodo. Test WB smo izvedli na Inštitutu za veterinarsko virologijo Univerze v Bernu (Švica).

### Izvedba testa WB

Antigene prečiščenega virusa smo ločili na 12-odstotnem poliakrilamidnem gelu z elektroforezo v pufru, ki je vseboval natrijev dodecilsulfat (angl. sodium dodecyl sulfate, SDS). Sledil je prenos proteinov na nitrocelulozno membrano s pomočjo električnega toka. Postopek je potekal 1 uro pri 100 V v pufru za prenos. Nitrocelulozno membrano smo nato narezali na trakove, ki smo jih inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi v 5-odstotnem posnetem mleku v pufru TBT, da smo blokirali nezasedena mesta na membrani. Membrane smo nato sprali in nanje nanesli serumske vzorce, ki smo jih redčili v pufru TBT v razmerju 1 : 100 in inkubirali 3 ure pri sobni temperaturi. Po spiranju smo na membrane nanesli konjugat z rekombinantnim proteinom G, ki je bil označen z alkalno fosfatazo, in inkubirali 90 minut pri sobni temperaturi. Ponovno je sledilo spiranje. Nato smo membranam dodali kromogeni substrat, ki je vseboval: Fast-Red, Naphthol AS-MX fosfat in Tris-HCl. Membrane smo sprali z destilirano vodo in posušili. V primeru pozitivne reakcije smo zaznali rdeče obarvan precipitat.

### **3.8 Encimsko imunski test SU5 (SU5 ELISA)**

S testom SU5 ELISA, ki so ga razvili na Inštitutu za veterinarsko virologijo Univerze v Bernu (Švica), smo dokazovali prisotnost protiteles proti virusoma MVV in CAEV v serumskih vzorcih koz in ovac. V tem testu se kot antigen uporablajo sintetični peptidi, ki so sestavljeni iz zaporedja 25 aminokislín površinskega glikoproteina virusa MVV in CAEV, in sicer celotno zaporedje imunodominantnega epitopa SU5. Dokazali so, da je imunski odziv, ki je usmerjen proti tem epitopom, specifičen za posamezne genotipe virusov MVV in CAEV (Mordasini in sod., 2006), zato nam test SU5 ELISA omogoča tudi serotipizacijo, saj uporabljamo 3 sintetične peptide specifične za podtipe A1, A3 in A4 virusa MVV in 2 sintetična peptida specifična za podtipe B1 in B2 virusa CAEV.

Sintetične peptide nanesemo v jamice mikrotiterske plošče. Vanje nato nanesemo razredčen serumski vzorec in kontrole. Če so v vzorcu prisotna protitelesa proti virusoma MVV ali CAEV, se le-ta vežejo z antigenom v jamici. Nevezan material speremo in dodamo konjugat s proteinom G, ki je označen s peroksidazo. V primeru, ko so specifična protitelesa prisotna v vzorcu, se po dodatku substrata jamica obarva. Stopnjo obarvanja odčitamo fotometrično pri

valovni dolžini 405 nm. Rezultate ovrednotimo glede na odčitano vrednost OD vzorca in OD pozitivne ter negativne kontrole. Test SU5 ELISA smo izvedli na Inštitutu za veterinarsko virologijo Univerze v Bernu (Švica).

#### Izvedba testa SU5 ELISA

V vse jamice mikrotiterske plošče (Maxisorp Immunoplate; Nunc, Danska) smo nanesli 100 µl raztopine s sintetičnimi peptidi in inkubirali čez noč pri 4 °C. Mikrotitersko ploščo smo nato trikrat sprali z raztopino pufra PBS, ki je vseboval 0,1 % Tween 20 (Merck, Nemčija) (PBS-Tween). V vsako jamico mikrotiterske plošče smo nato nanesli 150 µl raztopine PBS-Tween, ki je vsebovala 5 % posnetega mleka (Nestle, Švica), da smo blokirali nezasedena mesta v jamici, in inkubirali 1 uro. Mikrotitersko ploščo smo nato enkrat sprali z raztopino PBS-Tween. Preiskovane serumske vzorce smo redčili v razmerju 1 : 25 v raztopini PBS-Tween, ki je vsebovala 5 % posnetega mleka. V jamice mikrotiterske plošče smo nanesli 100 µl vsakega vzorca, in sicer en preiskovani vzorec v eno jamico. Sledila je inkubacija 2 uri pri sobni temperaturi in trikratno spiranje z raztopino PBS-Tween. Pripravili smo konjugat, in sicer smo protein G, označen s peroksidazo, redčili v razmerju 1 : 5000 v raztopini PBS-Tween. V vsako jamico smo dodali 100 µl konjugata in inkubirali 2 uri pri sobni temperaturi. Sledilo je dvakratno spiranje z raztopino PBS-Tween in dvakratno spiranje z raztopino PBS. V vsako jamico smo nato dodali raztopino vodikovega peroksida (raztopina ABTS). Po inkubaciji 30 minut pri sobni temperaturi smo odčitali rezultate s čitalcem mikrotiterskih plošč za test ELISA pri valovni dolžini 405 nm. Rezultate smo analizirali na podlagi dobljenih vrednosti OD.

### **3.9 Izolacija levkocitov iz polne krvi**

Za dokazovanje virusne nukleinske kisline z molekularnimi metodami smo iz vzorcev polne krvi izolirali levkocite. Vzorcu polne krvi smo dodali RCLB v razmerju 1 : 3 (en del krvi, tri dele RCLB), vsebino premešali in pustili stati 10 minut na sobni temperaturi. Nato smo vzorec centrifugirali 10 minut pri 1000 obratih/min. Supernatant smo zavrgli in dodali PBS-A v razmerju 1 : 3 glede na začetno količino krvi. Vzorec smo ponovno centrifugirali 10 minut pri 1000 obratih/min in odlili supernatant. Izolirane levkocite smo razredčili v gojišču RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen, ZDA) in jih hranili pri -70 °C.

### 3.10 Izolacije genomske DNA

Za izolacijo genomske DNA iz levkocitov smo uporabili komplet reagentov DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Nemčija). V primeru, ko smo genomsko DNA izolirali iz vzorcev zamrznjene polne krvi, pa smo uporabili komplet reagentov Flexigene (Qiagen, Nemčija).

#### Izolacija genomske DNA iz levkocitov s kompletom reagentov DNeasy Blood & Tissue Kit

V 1,5 ml epruveto (Eppendorf, Nemčija) smo prenesli 20 µl proteinaze K, dodali 200 µl vzorca in primešali 200 µl lizirajočega pufra (AL). Vsebino epruvete smo dobro premešali na vibracijskem mešalniku in inkubirali 10 minut pri 56 °C v topotnem stresalniku (Thermomixer compact, Eppendorf, Nemčija). Po kratkem centrifugiranju smo mešanici dodali 200 µl absolutnega etanola (Merck, ZDA), dobro premešali, kratko centrifugirali in mešanico prenesli na membrano kolone. Sledilo je centrifugiranje 1 minuto pri 8000 obratih/min. Po vsakem centrifugiranju smo zbirno epruveto z vsebino zavrgli in kolono prenesli v čisto zbirno epruveto. Na membrano kolone smo dodali 500 µl pufra za spiranje AW1, centrifugirali 1 minuto pri 8000 obratih/min in membrano kolone sprali še s 500 µl pufra za spiranje AW2. Centrifugirali smo 3 minute pri 14.000 obratih/min. Kolono smo prenesli v čisto 1,5 ml epruveto in na membrano kolone dodali 100 µl pufra AE. Inkubirali smo 1 minuto in centrifugirali 1 minuto pri 8000 obratih/min. Kolono smo zavrgli, izolirano DNA pa shranili pri –20 °C.

#### Izolacija genomske DNA iz zamrznjene polne krvi s kompletom reagentov Flexigene

V 1,5 ml ali 2 ml epruveto (Eppendorf, Nemčija) smo prenesli ustrezeno količino pufra FG1, ki je ustreza količini vzorca, dodali do 500 µl vzorca in dobro premešali z obračanjem epruvete. Sledilo je centrifugiranje 20 sekund pri 10.000 x g. Previdno smo odlili supernatant in dodali mešanico pufra FG2 in proteaze. Proteazo smo pripravili največ 1 uro pred uporabo, tako da smo za vsak ml krvi zmešali 500 µl pufra FG2 in 5 µl proteaze. Vsebino epruvete smo nemudoma premešali na vibracijskem mešalniku, dokler ni bil pelet popolnoma homogeniziran, in inkubirali 5 minut pri 65 °C v topotnem stresalniku (Thermomixer compact, Eppendorf, Nemčija). Po kratkem centrifugiranju smo mešanici dodali ustrezeno količino 100-odstotnega izopropanola (Merck, ZDA) in dobro premešali, da se je pojavila oborina DNA. Sledilo je centrifugiranje 3 minute pri 10.000 x g. Odlili smo supernatant,

dodali 70-odstotni etanol, premešali na vibracijskem mešalniku in centrifugirali 3 minute pri 10.000 x g. Ponovno smo odlili supernatant in pelet posušili na zraku. Dodali smo ustrezno količino pufra FG3, premešali na vibracijskem mešalniku pri nizkih obratih in inkubirali 10 minut pri 65 °C v topotnem stresalniku oziroma, dokler se pelet ni raztopil. Izolirano DNA smo shranili pri –20 °C.

V vsak postopek izolacije DNA smo vključili pozitivno in negativno kontrolo izolacije. S testiranjem negativne kontrole, za katero nam je služila DEPC H<sub>2</sub>O, smo ugotavljali potencialno navzkrižno okužbo vzorcev med procesom izolacije DNA. Testiranje pozitivne kontrole, za katero smo uporabili referenčna virusa MVV in CAEV, nam je služilo za ugotavljanje uspešnosti postopka izolacije DNA. Pozitivna kontrola izolacije nam je v nadaljnjih testiranjih služila tudi kot pozitivna kontrola reakcije PCR in PCR v realnem času.

### **3.11 Metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR)**

Metodo PCR smo uporabili za dokazovanje provirusne DNA in za pomnoževanje odsekov virusne DNA, ki smo jim nato določevali nukleotidno zaporedje. Z metodo PCR smo pomnoževali različne odseke izolirane genomske DNA. Pomnoževali smo tri odseke genoma SRLV, in sicer odsek na regiji LTR, odsek na genu *gag* in odsek na genu *pol*. Uporabili smo različne pare začetnih oligonukleotidov in kompleta reagentov Platinum® *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, ZDA) ter Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen, ZDA). Reakcija PCR je potekala v termopomnoževalniku T3 (Biometra, ZDA).

#### **3.11.1 Pomnoževanje odseka na regiji LTR**

Odsek na regiji LTR smo pomnoževali s parom začetnih oligonukleotidov LTR2a in LTR2s (Tabela 3-2), ki smo jih povzeli po literaturi (Extramiana in sod., 2002) (metoda LTR-PCR).

Tabela 3-2: Začetna oligonukleotida, ki smo ju uporabili za pomnoževanje odseka na regiji LTR (Extramiana in sod., 2002).

Table 3-2: Primers used for the LTR region fragment amplification (Extramiana et al., 2002).

| Začetni oligonukleotidi | Ime    | Nukleotidno zaporedje v smeri 5'-3' | Mesto v genomu* |
|-------------------------|--------|-------------------------------------|-----------------|
| Pozitivno usmerjen      | LTR 2s | TGACACAGCAAATGTAACCGCAAG            | 8990-9013       |
| Negativno usmerjen      | LTR 2a | CCACGTTGGCGGCCAGCTGCGAGA            | 153-176         |

\* Glede na nukleotidno zaporedje genoma seva MVV KV1514, ki je v javni zbirki nukleotidnih zaporedij dostopen pod številko M10608.

\* According to nucleotide sequence of reference strain MVV KV1514 with accession number M10608.

Za pomnoževanje s kompletom reagentov Platinum® *Taq* DNA polymerase je reakcijska mešanica s končnim volumnom 50 µl vsebovala: 1 x PCR Buffer z 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM vsakega nukleotida iz mešanice nukleotidov (10mM dNTP Mix), 0,4 mM vsakega posameznega začetnega oligonukleotida, 1 enoto encima Platinum® *Taq* DNA polimeraza, 4 µl DNA in DEPC H<sub>2</sub>O do skupnega volumna 50 µl.

Za pomnoževanje s kompletom reagentov Platinum® PCR SuperMix je reakcijska mešanica s končnim volumnom 50 µl vsebovala 45 µl pufra Platinum® PCR SuperMix, 0,2 mM vsakega posameznega začetnega oligonukleotida in 4 µl DNA.

Po začetni denaturaciji, ki je trajala 2 minuti pri 94 °C, je sledilo 40 ciklov pomnoževanja v treh stopnjah: denaturacija (30 sekund pri 94 °C), prileganje začetnih oligonukleotidov (30 sekund pri 60 °C) in podaljševanje verige DNA (1 minuto pri 72 °C). Zadnjemu ciklu je sledilo končno podaljševanje (7 minut pri 72 °C) in ohlajevanje pri 4 °C.

### 3.11.2 Pomnoževanje odseka na genu *gag*

Za pomnoževanje odseka na genu *gag* smo uporabili metodo ugnezdeni PCR (angl. nested PCR). Izvajali smo jo z dvema paroma začetnih oligonukleotidov (Tabela 3-3), in sicer z zunanjim parom GEX5 in GEX3 ter notranjim parom GIN5 in GIN3, ki so specifični za virus CAEV in ki smo jih povzeli po literaturi (Chebloune in sod., 1996) (metoda *gag*-PCR, test *gag*CAEV-PCR).

Tabela 3-3: Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili za pomnoževanje odseka na genu *gag* (Chebloune in sod., 1996; Celer in sod., 2000).

Table 3-3: Primers used for the *gag* gene region fragment amplification (Chebloune et al., 1996; Celer et al., 2000).

| Začetni oligonukleotidi | PCR                | Ime    | Nukleotidno zaporedje v smeri 5'-3' | Mesto v genomu           |
|-------------------------|--------------------|--------|-------------------------------------|--------------------------|
| Specifični za MVV       | Pozitivno usmerjen | 1 in 2 | MVV 1                               | TAGAGACATGGCGAAGCAAG     |
|                         | Negativno usmerjen | 1      | MVV 3                               | CTACCGCCTTCCAACCTTCTC    |
|                         | Negativno usmerjen | 2      | MVV 2                               | TCCTTATTTCGTGTAGTCC      |
| Specifični za CAEV      | Pozitivno usmerjen | 1      | GEX5                                | GAAGTGGTGCTGCGAGAGGTGTTG |
|                         | Negativno usmerjen | 1      | GEX3                                | TGCCTGATCCATGTTAGCTTGTGC |
|                         | Pozitivno usmerjen | 2      | GIN5                                | GATAGAGACATGGCGAGGCAAGT  |
|                         | Negativno usmerjen | 2      | GIN3                                | GAGGCCATGCTGCATTGCTACTGT |

\*<sup>1</sup> Glede na nukleotidno zaporedje genoma seva MVV KV1514, ki je v javni zbirkri nukleotidnih zaporedij dostopen pod številko M10608.

\*<sup>1</sup> According to nucleotide sequence of reference strain MVV KV1514 with accession number M10608.

\*<sup>2</sup> Glede na nukleotidno zaporedje genoma seva CAEV Co, ki je v javni zbirkri nukleotidnih zaporedij dostopen pod številko M33677.

\*<sup>2</sup> According to nucleotide sequence of reference strain CAEV Co with accession number M33677.

Za prvo pomnoževanje s kompletom reagentov Platinum® *Taq* DNA polymerase smo pripravili reakcijsko mešanico, kot je že opisano za pomnoževanje odseka na regiji LTR, in uporabili zunanji par začetnih oligonukleotidov GEX5 in GEX3. Za drugo pomnoževanje smo uporabili enako reakcijsko mešanico, le da smo uporabili notranji par začetnih oligonukleotidov GIN5 in GIN3, namesto DNA pa smo dodali 1 µl produkta PCR, pridobljenega s prvim pomnoževanjem.

Podobno smo za pomnoževanje s kompletom reagentov Platinum® PCR SuperMix pripravili reakcijsko mešanico, kot je že opisano za pomnoževanje odseka na regiji LTR, in uporabili zunanji par začetnih oligonukleotidov GEX5 in GEX3. Za drugo pomnoževanje smo uporabili enako reakcijsko mešanico, le da smo uporabili notranji par začetnih oligonukleotidov GIN5

in GIN3, namesto DNA smo dodali 1 µl produkta PCR, pridobljenega s prvim pomnoževanjem.

Prvo in drugo pomnoževanje je potekalo pod enakimi pogoji. Začetni denaturaciji, ki je potekala 2 minuti pri 94 °C, je sledilo 40 ciklov pomnoževanja v treh stopnjah: denaturacija (30 sekund pri 94 °C), prileganje začetnih oligonukleotidov (30 sekund pri 58 °C) in podaljševanje verige DNA (1 minuto pri 72 °C). Zadnjemu ciklu je sledilo končno podaljševanje (7 minut pri 72 °C) in ohlajevanje pri 4 °C.

Za pomnoževanje odseka na genu *gag* virusa MVV smo uporabili metodo polugnezdene PCR (angl. seminested PCR), pri kateri smo uporabili tri začetne oligonukleotide (Tabela 3-3), in sicer zunanji par MVV1 in MVV3 ter notranji par MVV1 in MVV2, ki so jih opisali Celer in sodelavci (2000) (metoda *gag*-PCR, test *gag*MVV-PCR).

Za prvo pomnoževanje s kompletom reagentov Platinum® *Taq* DNA polymerase smo pripravili reakcijsko mešanico, kot je že opisano za pomnoževanje odseka na regiji LTR, in uporabili zunanji par začetnih oligonukleotidov MVV1 in MVV3. Za drugo pomnoževanje smo uporabili enako reakcijsko mešanico, le da smo uporabili začetna oligonukleotida MVV1 in MVV2, namesto izolirane DNA smo v reakcijsko mešanico dodali 1 µl produkta PCR, pridobljenega s prvim pomnoževanjem.

Podobno smo za pomnoževanje s kompletom reagentov Platinum® PCR SuperMix pripravili reakcijsko mešanico, kot je že opisano za pomnoževanje odseka na regiji LTR, in uporabili zunanji par začetnih oligonukleotidov MVV1 in MVV3. Za drugo pomnoževanje smo uporabili enako reakcijsko mešanico, le da smo uporabili začetna oligonukleotida MVV1 in MVV2, namesto izolirane DNA smo v reakcijsko mešanico dodali 1 µl produkta PCR, pridobljenega s prvim pomnoževanjem.

Prvo pomnoževanje je potekalo pod enakimi pogoji, kot smo že opisali za odsek na genu *gag*, ki je specifičen za CAEV. Drugo pomnoževanje je potekalo pod enakimi pogoji kot prvo pomnoževanje, le da je prileganje začetnih nukleotidov potekalo pri temperaturi 51 °C.

### 3.11.3 Pomnoževanje odseka na genu *pol*

Metodo ugnezdene PCR z uporabo šestih začetnih oligonukleotidov (P28, P34, P32, P33, P29 in P35) (Tabela 3-4), ki so jih opisali Shah in sodelavci (2004), smo uporabili za pomnoževanje odseka na genu *pol* virusa CAEV in MVV.

Tabela 3-4: Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili za pomnoževanje odseka na genu *pol* (Shah in sod., 2004).

Table 3-4: Primers used for the *pol* gene region fragment amplification (Shah et al., 2004).

| Začetni oligonukleotidi | PCR | Ime | Nukleotidno zaporedje v smeri 5'-3' | Mesto v genomu* |
|-------------------------|-----|-----|-------------------------------------|-----------------|
| Pozitivno usmerjen      | 1   | P28 | CATGAAGAGGGGACAAATCAGCA             | 3535-3557       |
| Pozitivno usmerjen      | 1   | P34 | TACATTGGGTGCCTGGACATAA              | 3734-3755       |
| Negativno usmerjen      | 1   | P33 | CTTCCCAVAGTACCTGDGTTGGTC            | 4909-4932       |
| Negativno usmerjen      | 1   | P32 | TACCTGDGTTGGTCCYWGCCACT             | 4918-4941       |
| Pozitivno usmerjen      | 2   | P29 | GCCACTCTCCTGRATGTCCTCT              | 3741-3763       |
| Negativno usmerjen      | 2   | P35 | GGTGCCTGGACATAAAGGGATT              | 4894-4915       |

\* Glede na nukleotidno zaporedje genoma seva CAEV Co, ki je v javni zbirki nukleotidnih zaporedij dostopen pod številko M33677.

\* According to nucleotide sequence of reference strain CAEV Co with accession number M33677.

Za pomnoževanje smo uporabili komplet reagentov Platinum® PCR SuperMix. Pripravili smo reakcijsko mešanico, kot smo že opisali za pomnoževanje odseka na regiji LTR, in uporabili štiri začetne oligonukleotide P28, P34, P32 in P33. Za drugo pomnoževanje smo uporabili enako reakcijsko mešanico, le da smo uporabili začetna oligonukleotida P29 in P35 ter smo namesto izolirane DNA v reakcijsko mešanico dodali 1 µl produkta PCR, pridobljenega s prvim pomnoževanjem.

Po začetni denaturaciji, ki je potekala 2 minuti pri 94 °C, je sledilo 40 ciklov pomnoževanja v treh stopnjah: denaturacija (30 sekund pri 94 °C), prileganje začetnih oligonukleotidov (30 sekund pri 55 °C) in podaljševanje verige DNA (2 minuti pri 72 °C). Zadnjemu ciklu je sledilo končno podaljševanje (7 minut pri 72 °C) in ohlajevanje pri 4 °C. Drugo pomnoževanje je potekalo pod enakimi pogoji kot prvo, le da je prileganje začetnih nukleotidov potekalo pri temperaturi 57 °C.

### 3.12 Določanje nukleotidnega zaporedja

Za čiščenje produktov PCR smo uporabili dva kompleta reagentov Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA) in PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, ZDA) ter postopek izvedli po navodilih proizvajalca. Čiščenje s temi reagenti temelji na metodi vezave molekul DNA na delce silicijevega dioksida v membrani kolon, ki so del kompleta reagentov. Produkte PCR smo čistili tudi z E-Gel® iBase™ Power System (Invitrogen, USA) z 2 % E-Gel® SizeSelect™ (Invitrogen, USA). Pri tem načinu čiščenja produktov PCR z elektroforezo na agaroznem gelu, ki ima jamice v dveh vrstah in vsebuje barvilo SYBR® Safe, ločimo produkte PCR glede na velikost. V komplet je vključen tudi transiluminator, s katerim spremljamo potovanje produktov PCR v agaroznem gelu. Ko produkti PCR želene velikosti dosežejo spodnjo vrsto jamic, jih prenesemo v epruvete.

#### Postopek čiščenja z Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System

Iz agaroznega gela smo izrezali košček želenega produkta PCR oziroma smo neposredno uporabili reakcijsko mešanico s produkтом PCR. Produkt PCR smo prenesli v 1,5 ml epruveto in dodali ustrezno količino pufra MBS, ki je ustrezala teži izrezanega koščka gela oziroma volumnu reakcijske mešanice s produkтом PCR. Vsebino epruvete smo premešali na vibracijskem mešalniku. Epruveto smo vstavili v topotni stresalnik z nastavljivo temperaturo (Thermomixer 5436, Eppendorf, Nemčija) in pri temperaturi 65 °C vsebino segrevali približno 10 minut oziroma toliko časa, da se je gel popolnoma raztopil. Vsebino epruvete smo nato prenesli na membrano kolone in inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi. Sledilo je centrifugiranje 1 minuto pri 16.000 x g. Po vsakem centrifugiranju smo tekočino v zbiralni epruveti zavrgli. Dodali smo 700 µl raztopine za spiranje MWS in ponovno centrifugirali 1 minuto pri 16.000 x g. Postopek spiranja membrane smo ponovili s 500 µl raztopine MWS in centrifugirali 5 minut pri 16.000 x g. Kolono v izpraznjeni zbiralni epruveti smo še enkrat centrifugirali 1 minuto pri 16.000 x g, da smo odstranili vse ostanke raztopine za spiranje. Nato smo kolono prenesli v 1,5 ml epruveto in dodali 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi in nato centrifugirali 1 minuto pri 16.000 x g. Kolono smo po centrifugiranju zavrgli, epruveto z očiščenim produkтом PCR pa shranili pri -20 °C do nadaljnje uporabe.

### Postopek čiščenja s PureLink Quick Gel Extraction Kit

Iz agaroznega gela smo izrezali košček želenega produkta PCR in ga prenesli v 1,5 ml epruveto ter dodali ustrezeno količino pufra L3, ki je ustreza teži izrezanega koščka gela. Vsebino epruvete smo premešali na vibracijskem mešalniku. Epruveto smo vstavili v topotni stresalnik z nastavljivo temperaturo (Thermomixer 5436, Eppendorf, Nemčija) in pri temperaturi 50 °C vsebino segrevali približno 15 minut oziroma toliko časa, da se je gel popolnoma raztopil. Po hitrem centrifugiranju smo dodali ustrezeno količino 100-odstotnega izopropanola (Merck, ZDA), premešali na vibracijskem mešalniku in ponovno hitro centrifugirali. Vsebino epruvete smo nato prenesli na membrano kolone in centrifugirali 1 minuto pri 12.000 x g. Po vsakem centrifugiranju smo tekočino v zbiralni epruveti zavrgli. Dodali smo 700 µl pufra za spiranje W1 in ponovno centrifugirali 1 minuto pri 12.000 x g. Kolono v izpraznjeni zbiralni epruveti smo še enkrat centrifugirali 3 minute pri 16.000 x g, da smo odstranili vse ostanke pufra za spiranje. Nato smo kolono prenesli v 1,5 ml epruveto in dodali 50 µl pufra E5, inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi in nato centrifugirali 1 minuto pri 12.000 x g. Kolono smo po centrifugiranju zavrgli, epruveto z očiščenim produktom PCR pa shranili pri –20 °C do nadaljnje uporabe.

### Postopek čiščenja z E-Gel® iBase™ Power System (Invitrogen, USA) z 2 % E-Gel® SizeSelect™

Pri tem postopku čiščenja produktov PCR smo uporabili agarozni gel pripravljen za čiščenje produktov glede na velikost 2 % E-Gel® SizeSelect™, ki ima jamice v dveh vrstah. Produkte PCR, ki smo jih ustrezeno redčili v DEPC-H<sub>2</sub>O v skupnem volumnu 25 µl, smo nanesli v zgornje jamice na agaroznem gelu. V spodnje jamice na gelu smo nanesli 25 µl DEPC-H<sub>2</sub>O. Prav tako smo v za to pripravljeno jamico nanesli molekularni označevalec (100 bp) (Fermentas, Nemčija). Na aparaturi smo izbrali in zagnali ustrezen program. Potovanje produktov PCR v agaroznem gelu smo spremajali s pomočjo transiluminatorja E-Gel® Safe Imager™ Real Time Transilluminator. Tik preden je produkt PCR ustrezen velikosti dosegel spodnjo jamico, smo v le-to dodali ustrezeno količino DEPC-H<sub>2</sub>O in program ustavili, ko je produkt PCR dosegel spodnjo jamico. Očiščen produkt PCR smo iz spodnje jamice prenesli v 1,5 ml epruveto in shranili pri –20 °C do nadaljnje uporabe.

Prečiščene produkte PCR smo uporabili za neposredno določanje nukleotidnih zaporedij, ki ga je izvedlo podjetje Macrogen ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)) po protokolu BigDyeTM terminator (Applied Biosystems, ZDA) na avtomatskem sekvenatorju ABI3730XL (Applied Biosystems, ZDA).

### **3.13 Analiza nukleotidnih zaporedij**

Analizo elektroferogramov z nukleotidnimi zaporedji smo izvedli s programi paketa LaserGene (DnaStar, ZDA). Dobljena nukleotidna zaporedja v obeh komplementarnih smereh smo uredili s programom SeqMan, ki omogoča sestavljanje zaporedij v soglasno zaporedje, in programom EditSeq, ki nam služi za urejanje zaporedij. Urejena delna nukleotidna zaporedja genoma vseh sevov smo primerjali z nukleotidnimi zaporedji sevov SRLV, ki so dostopni v podatkovni zbirki GenBank (v nadaljevanju: genska banka), ki jo ureja Nacionalni center za informacije s področja biotehnologije (angl. National Centre for Biotechnology Information, NCBI), z uporabo programa BLAST (angl. Basic Local Alignment Search Tool). V analizo nukleotidnih zaporedij slovenskih sevov virusov SRLV smo vključili tudi referenčne seve SRLV in izbrane seve SRLV, ki smo jih pridobili iz genske banke. Urejena nukleotidna zaporedja slovenskih sevov SRLV in sevov, pridobljenih iz genske banke, smo analizirali s programi iz programskega paketa MEGA, verzija 5 (prosto dostopen na medmrežju na naslovu <http://www.megasoftware.net/>) (Tamura in sod., 2011). Nukleotidna zaporedja smo najprej prevedli v aminokislinska, ki smo jih nato poravnali s programom ClustalW (Thompson in sod., 1994). Poravnana aminokislinska zaporedja smo nato prevedli nazaj v nukleotidna in jih porezali ter po potrebi tudi ročno uredili. Za posamezne pare nukleotidnih zaporedij smo s programom MEGA na podlagi modela *p*-distance izračunali matriko genetskih razdalj (angl. pairwise distances).

Nukleotidna zaporedja slovenskih sevov SRLV smo poslali genski banki v odobritev in potrditev. Posameznemu nukleotidnemu zaporedju slovenskega seva so podelili kodo (angl. accession number) (Tabela 3-5 in Tabela 3-6). Z vnosom te kode v gensko banko lahko danes dostopamo do javno dostopnih podatkov o nukleotidnih zaporedjih slovenskih sevov SRLV.

### 3.14 Filogenetske analize

Za filogenetske analize smo uporabili program MEGA, verzija 5, in PhyML, verzija 3 (Guindon in Gascuel, 2003), ki je prosto dostopen na strežniku <http://atgc.lirmm.fr/phym/>. Filogenetska drevesa smo poiskali z uporabo metode povezovanja s sosedom (angl. Neighbor-Joining, NJ) (Saitou in Nei, 1987) s programom MEGA in z metodo največjega verjetja (angl. Maximum Likelihood, ML) (Guindon in Gascuel, 2003) s programom PhyML. Za iskanje dreves s prej omenjenima metodama smo uporabili evolucijski model Tamura-Nei (Tamura in Nei, 1993) z uporabo parametra porazdelitve substitucijske hitrosti (angl. gamma shape parameter alpha,  $\alpha$ ) (Gu in Zhang, 1997). Parameter  $\alpha$  smo ocenili z metodo ML s programom PhyML. Z metodo samovzorčenja (angl. bootstrapping) s 1000 ponovitvami smo ocenili zanesljivost filogenetskih dreves.

#### 3.14.1 Analiza nukleotidnih zaporedij in filogenetska analiza odseka na genu *gag*

Za analizo nukleotidnih zaporedij in filogenetsko analizo smo uporabili 512 bp dolg odsek na genu *gag* virusa CAEV ter 482 bp dolg odsek na genu *gag* virusa MVV, ki kodirata protein matriksa. V analizo smo vključili 77 slovenskih sevov SRLV in 22 sevov SRLV, dostopnih v genski banki (Tabela 3-5).

Tabela 3-5: Seznam sevov SRLV, ki smo jih uporabili v filogenetski analizi odseka na genu *gag*.

Table 3-5: List of SRLV strains used for phylogenetic analysis of the *gag* gene region fragment.

| Oznaka virusnega seva* | Genetska skupina oz. podtip | Država izvora    | Koda GenBank |
|------------------------|-----------------------------|------------------|--------------|
| SA-OMVV                | A1                          | Afrika           | M31646       |
| KV1514                 | A1                          | Islandija        | M10608       |
| EV1                    | A1                          | Velika Britanija | S51392       |
| 85/34USA               | A2                          | ZDA              | AY101611     |
| Ov8                    | A3                          | Španija          | DQ084347     |
| 697                    | A3                          | Španija          | HQ848062     |
| SwissGoat Isolate      | A4                          | Švica            | AY445885     |
| P1OLV                  | A                           | Portugalska      | AF479638     |
| 21PL                   | A                           | Poljska          | DQ442649     |
| It-008g03              | A8                          | Italija          | EU010125     |
| CAEVCo                 | B1                          | ZDA              | M33677       |
| CAEVstraingansu        | B1                          | Kitajska         | AY900630     |
| G215BG                 | B1                          | Italija          | DQ190019     |

| Oznaka virusnega seva* | Genetska skupina oz. podtip | Država izvora | Koda GenBank |
|------------------------|-----------------------------|---------------|--------------|
| G282BG                 | B1                          | Italija       | DQ190033     |
| 67PL                   | B1                          | Poljska       | DQ456487     |
| Ov496                  | B2                          | Španija       | FJ195346     |
| It-Pi1                 | B2                          | Italija       | AY265456     |
| Volterra               | B3                          | Italija       | FJ502417     |
| CAEV1GA                | C                           | Norveška      | AF322109     |
| Roccaverano            | E                           | Italija       | EU293538     |
| It-025g02              | E                           | Italija       | EU010124     |
| 1-24g                  | B1                          | Slovenija     | HQ910472     |
| 1-32g                  | B1                          | Slovenija     | HQ910473     |
| 1-38g                  | B1                          | Slovenija     | HQ910474     |
| 1-43g                  | B1                          | Slovenija     | HQ910475     |
| 1-65g                  | B1                          | Slovenija     | HQ910476     |
| 1-66g                  | B1                          | Slovenija     | HQ910477     |
| 1-77g                  | B1                          | Slovenija     | HQ910478     |
| 1-87g                  | B1                          | Slovenija     | HQ910480     |
| 1-90g                  | B1                          | Slovenija     | HQ910481     |
| 1-96g                  | B1                          | Slovenija     | HQ910482     |
| 1-99g                  | B1                          | Slovenija     | HQ910483     |
| 1-86g                  | B1                          | Slovenija     | HQ910479     |
| 1-108g                 | B1                          | Slovenija     | HQ910485     |
| 1-110g                 | B1                          | Slovenija     | HQ910486     |
| 1-106g                 | B1                          | Slovenija     | HQ910484     |
| 1-112g                 | B1                          | Slovenija     | HQ910487     |
| 1-113g                 | B1                          | Slovenija     | HQ910488     |
| 1-114g                 | B1                          | Slovenija     | HQ910489     |
| 2-3g                   | B1                          | Slovenija     | HQ910490     |
| 2-8g                   | A                           | Slovenija     | HQ910466     |
| 2-15g                  | A                           | Slovenija     | HQ910467     |
| 2-26g                  | A                           | Slovenija     | HQ910468     |
| 2-33g                  | A                           | Slovenija     | HQ910469     |
| 2-55g                  | A                           | Slovenija     | HQ910470     |
| 2-90g                  | B1                          | Slovenija     | HQ910491     |
| 2-97g                  | A                           | Slovenija     | HQ910471     |
| 35-1s                  | A                           | Slovenija     | JQ610907     |
| 35-7s                  | A                           | Slovenija     | JQ610908     |
| 35-4s                  | A                           | Slovenija     | JQ610924     |
| 35-12s                 | A                           | Slovenija     | JQ610925     |
| 35-44s                 | A                           | Slovenija     | JQ610917     |
| 35-46s                 | A                           | Slovenija     | JQ610918     |
| 35-49s                 | A                           | Slovenija     | JQ610919     |
| 35-57s                 | A                           | Slovenija     | JQ610920     |
| 35-59s                 | A                           | Slovenija     | JQ610921     |
| 35-60s                 | A                           | Slovenija     | JQ610922     |
| 35-63s                 | A                           | Slovenija     | JQ610923     |
| 35-65s                 | A                           | Slovenija     | JQ610905     |
| 35-73s                 | A                           | Slovenija     | JQ610906     |
| 35-94s                 | A                           | Slovenija     | JQ610926     |

| Oznaka virusnega seva* | Genetska skupina oz. podtip | Država izvora | Koda GenBank |
|------------------------|-----------------------------|---------------|--------------|
| 35-97s                 | A                           | Slovenija     | JQ610927     |
| 36-1s                  | A                           | Slovenija     | JQ610909     |
| 36-2s                  | A                           | Slovenija     | JQ610928     |
| 36-5s                  | A                           | Slovenija     | JQ610929     |
| 36-9s                  | A                           | Slovenija     | JQ610930     |
| 36-10s                 | A                           | Slovenija     | JQ610931     |
| 36-14s                 | A                           | Slovenija     | JQ610932     |
| 36-22s                 | A                           | Slovenija     | JQ610910     |
| 36-27s                 | A                           | Slovenija     | JQ610911     |
| 36-30s                 | A                           | Slovenija     | JQ610912     |
| 36-36s                 | A                           | Slovenija     | JQ610933     |
| 36-39s                 | A                           | Slovenija     | JQ610934     |
| 36-43s                 | A                           | Slovenija     | JQ610935     |
| 36-48s                 | A                           | Slovenija     | JQ610913     |
| 36-50s                 | A                           | Slovenija     | JQ610936     |
| 36-51s                 | A                           | Slovenija     | JQ610937     |
| 36-52s                 | A                           | Slovenija     | JQ610938     |
| 36-56s                 | A                           | Slovenija     | JQ610939     |
| 36-57s                 | A                           | Slovenija     | JQ610940     |
| 36-61s                 | A                           | Slovenija     | JQ610914     |
| 36-67s                 | A                           | Slovenija     | JQ610915     |
| 36-68s                 | A                           | Slovenija     | JQ610941     |
| 36-70s                 | A                           | Slovenija     | JQ610916     |
| 37-18g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610955     |
| 37-20g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610942     |
| 37-25g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610943     |
| 37-31g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610944     |
| 37-43g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610945     |
| 37-53g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610946     |
| 37-59g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610947     |
| 37-61g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610948     |
| 37-63g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610949     |
| 37-65g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610950     |
| 37-66g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610951     |
| 37-80g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610952     |
| 37-78g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610953     |
| 37-85g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610954     |

\* Slovenski virusni sevi so označeni s številko reje, ki ji sledi številka živali, in oznako živalske vrste (g = koza, angl. goat; s = ovca, angl. sheep).

\* Slovenian viral strains are indicated by farm origin and animal number, followed by the animal species (s, sheep; g, goat).

### 3.14.2 Analiza nukleotidnih zaporedij in filogenetska analiza odseka na genu *pol*

Za analizo nukleotidnih zaporedij in filogenetsko analizo smo uporabili 1175 bp dolg odsek na genu *pol* virusa CAEV in MVV, ki kodira protein dUTPazo, in del proteina integraza (regija 1,2 kb *pol*). V analizo smo vključili 76 slovenskih sevov SRLV in 27 sevov SRLV, dostopnih v genski banki (Tabela 3-6).

Tabela 3-6: Seznam sevov SRLV, ki smo jih uporabili v filogenetski analizi odseka na genu *pol*.

Table 3-6: List of SRLV strains used for phylogenetic analysis of the *pol* gene region fragment.

| Oznaka virusnega seva* | Genetska skupina oz. podtip | Država izvora    | Koda GenBank |
|------------------------|-----------------------------|------------------|--------------|
| SA-OMVV                | A1                          | Afrika           | M31646       |
| KV1514                 | A1                          | Islandija        | M10608       |
| EV1                    | A1                          | Velika Britanija | S51392       |
| 85/34USA               | A2                          | ZDA              | AY101611     |
| SNCR5561               | A3                          | Švica            | AY454247     |
| SNCR5588               | A3                          | Švica            | AY454255     |
| SNCR5745               | A4                          | Švica            | AY454287     |
| SNCR5698               | A4                          | Švica            | AY454278     |
| SNCR5525               | A4                          | Švica            | AY454244     |
| SwissGoat Isolate      | A4                          | Švica            | AY445885     |
| SNCR5560               | A5                          | Švica            | AY454246     |
| SNCR5692               | A7                          | Švica            | AY454277     |
| P1OLV                  | A                           | Portugalska      | AF479638     |
| 697                    | A                           | Španija          | HQ848062     |
| C3                     | A                           | Španija          | DQ632735     |
| C1                     | A                           | Španija          | DQ632734     |
| S604substrain 1        | A                           | Finska           | AM419951B    |
| CAEVCo                 | B1                          | ZDA              | M33677       |
| SNCR5592               | B1                          | Švica            | AY454257     |
| SNCR5572               | B1                          | Švica            | AY454252     |
| Ov496                  | B2                          | Španija          | FJ195346     |
| SNCR5720               | B2                          | Švica            | AY454283     |
| Volterra               | B3                          | Italija          | JF502417     |
| OV1                    | D                           | Španija          | DQ632733     |
| SNCR5668               | D                           | Švica            | AY454269     |
| CAEV1GA                | C                           | Norveška         | AF322109     |
| Roccaverano            | E                           | Italija          | EU293538     |
| 1-107g                 | B1                          | Slovenija        | JQ610956     |
| 1-108g                 | B1                          | Slovenija        | JQ610957     |
| 1-110g                 | B1                          | Slovenija        | JQ610958     |
| 1-111g                 | B1                          | Slovenija        | JQ610959     |
| 1-112g                 | B1                          | Slovenija        | JQ610960     |
| 1-113g                 | B1                          | Slovenija        | JQ610961     |

| Oznaka virusnega seva* | Genetska skupina oz. podtip | Država izvora | Koda GenBank |
|------------------------|-----------------------------|---------------|--------------|
| 1-114g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610962     |
| 1-24g                  | B1                          | Slovenija     | JQ610963     |
| 1-32g                  | B1                          | Slovenija     | JQ610964     |
| 1-38g                  | B1                          | Slovenija     | JQ610965     |
| 1-43g                  | B1                          | Slovenija     | JQ610966     |
| 1-65g                  | B1                          | Slovenija     | JQ610967     |
| 1-66g                  | B1                          | Slovenija     | JQ610968     |
| 1-77g                  | B1                          | Slovenija     | JQ610969     |
| 1-87g                  | B1                          | Slovenija     | JQ610970     |
| 1-90g                  | B1                          | Slovenija     | JQ610971     |
| 1-96g                  | B1                          | Slovenija     | JQ610972     |
| 1-99g                  | B1                          | Slovenija     | JQ610973     |
| 2-3g                   | B1                          | Slovenija     | JQ610974     |
| 2-90g                  | B1                          | Slovenija     | JQ610975     |
| 2-97g                  | A                           | Slovenija     | JQ610989     |
| 31-4s                  | A                           | Slovenija     | JQ611027     |
| 31-9s                  | A                           | Slovenija     | JQ611028     |
| 31-12s                 | A                           | Slovenija     | JQ611029     |
| 31-18s                 | A                           | Slovenija     | JQ611030     |
| 35-1s                  | A                           | Slovenija     | JQ611002     |
| 35-4s                  | A                           | Slovenija     | JQ611003     |
| 35-7s                  | A                           | Slovenija     | JQ611004     |
| 35-12s                 | A                           | Slovenija     | JQ610990     |
| 35-44s                 | A                           | Slovenija     | JQ610991     |
| 35-46s                 | A                           | Slovenija     | JQ611001     |
| 35-49s                 | A                           | Slovenija     | JQ610992     |
| 35-57s                 | A                           | Slovenija     | JQ610993     |
| 35-59s                 | A                           | Slovenija     | JQ610994     |
| 35-60s                 | A                           | Slovenija     | JQ610995     |
| 35-63s                 | A                           | Slovenija     | JQ610996     |
| 35-65s                 | A                           | Slovenija     | JQ610997     |
| 35-73s                 | A                           | Slovenija     | JQ610998     |
| 35-94s                 | A                           | Slovenija     | JQ610999     |
| 36-97s                 | A                           | Slovenija     | JQ611000     |
| 36-1s                  | A                           | Slovenija     | JQ611005     |
| 36-2s                  | A                           | Slovenija     | JQ611006     |
| 36-5s                  | A                           | Slovenija     | JQ611007     |
| 36-9s                  | A                           | Slovenija     | JQ611008     |
| 36-10s                 | A                           | Slovenija     | JQ611009     |
| 36-14s                 | A                           | Slovenija     | JQ611010     |
| 36-22s                 | A                           | Slovenija     | JQ611011     |
| 36-27s                 | A                           | Slovenija     | JQ611012     |
| 36-30s                 | A                           | Slovenija     | JQ611013     |
| 36-36s                 | A                           | Slovenija     | JQ611014     |
| 36-39s                 | A                           | Slovenija     | JQ611015     |
| 36-43s                 | A                           | Slovenija     | JQ611016     |
| 36-48s                 | A                           | Slovenija     | JQ611017     |
| 36-50s                 | A                           | Slovenija     | JQ611018     |

| Oznaka virusnega seva* | Genetska skupina oz. podtip | Država izvora | Koda GenBank |
|------------------------|-----------------------------|---------------|--------------|
| 36-51s                 | A                           | Slovenija     | JQ611019     |
| 36-52s                 | A                           | Slovenija     | JQ611020     |
| 36-56s                 | A                           | Slovenija     | JQ611021     |
| 36-57s                 | A                           | Slovenija     | JQ611022     |
| 36-61s                 | A                           | Slovenija     | JQ611023     |
| 36-67s                 | A                           | Slovenija     | JQ611024     |
| 36-68s                 | A                           | Slovenija     | JQ611025     |
| 36-70s                 | A                           | Slovenija     | JQ611026     |
| 37-20g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610982     |
| 37-25g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610978     |
| 37-31g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610983     |
| 37-43g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610984     |
| 37-53g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610976     |
| 37-59g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610977     |
| 37-61g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610985     |
| 37-63g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610979     |
| 37-65g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610986     |
| 37-66g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610987     |
| 37-70g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610980     |
| 37-85g                 | B1                          | Slovenija     | JQ610981     |
| 37-88g                 | A                           | Slovenija     | JQ610988     |

\* Slovenski virusni sevi so označeni s številko reje, ki ji sledi številka živali, in oznako živalske vrste (g = koza, angl. goat; s = ovca, angl. sheep).

\* Slovenian viral strains are indicated by farm origin and animal number, followed by the animal species (s, sheep; g, goat).

### 3.15 Razvoj metode PCR v realnem času

#### 3.15.1 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sond TaqMan

Začetne oligonukleotide in sonde smo načrtovali glede na osnovna priporočila za načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sond (Applied Biosystems, ZDA). Za začetne oligonukleotide se priporoča, da je:

- delež gvaninov (G) in citozinov (C) od 20 % do 80 %,
- temperatura tališča (Tm) od 58 °C do 60 °C,
- manj kot 2 °C razlike med pozitivno in negativno usmerjenim začetnim oligonukleotidom,
- največ od 2 do 5 G ali C na 3' koncu začetnega oligonukleotida,
- dolžina začetnih oligonukleotidov od 9 do 40 baz (optimalna dolžina 20 nukleotidov),
- 3' konec začetnega oligonukleotida čim bližje sondi, vendar brez prekrivanja.

Pri načrtovanju TaqMan sonde je treba upoštevati naslednje:

- Tm sonde je za 10 °C višja od Tm začetnih oligonukleotidov,
- delež GC je od 20 % do 80 %,
- dolžina je od 9 do 40 baz,
- da na 5' koncu sonde ni G,
- sonda naj vsebuje več C kot G,
- sonda naj ne vsebuje več kot 4 zaporedne G.

Pomembna je tudi dolžina produkta pomnoževanja in naj bi bila od 50 do 150 bp.

Posamezne parametre izbranih začetnih oligonukleotidov in sond smo preverili s prosto dostopnim spletnim programom OligoAnalyzer 3.1 (IDT SciTools, <http://eu.idtdna.com/analyizer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>). S tem programom smo tudi preverili, ali izbrani začetni oligonukleotidi in sonde tvorijo sekundarne strukture in ali kombinacije izbranih začetnih oligonukleotidov tvorijo dimere. Pri tem smo upoštevali termodinamska pravila, ki določajo, da morajo biti talilne temperature takih struktur nizke (PREMIER Biosoft International; [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/PCR\\_Primer\\_Design.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html)).

### **3.15.2 Načrtovanje metode PCR v realnem času za določanje in ločevanje CAEV in MVV**

Metodo PCR v realnem času smo zasnovali za sočasno določanje virusov MVV in CAEV, genetskih skupin A in B, vendar v dveh ločenih reakcijah. Izbrali smo začetne oligonukleotide in sonde, ki so specifični za CAEV oziroma genetsko skupino B (test CAEV), in začetne oligonukleotide in sonde, ki so specifični za MVV oziroma genetsko skupino A (test MVV), ter s tem omogočili tudi sočasno razlikovanje med virusi teh genetskih skupin. Testa CAEV in MVV smo zasnovali na odseku gena *gag*, ki kodira protein matriksa (*gagMA*).

V genski banki smo poiskali nukleotidna zaporedja virusov SRLV na odseku gena *gagMA*. V okviru filogenetskih analiz smo slovenskim virusnim sevom SRLV določili nukleotidna zaporedja tudi v regiji gena *gagMA*. S programom ClustalX verzija 1.83 (Thompson in sod.,

1997) smo poravnali 11 nukleotidnih zaporedij sevov CAEV, dostopnih v genski banki (s kodami GenBank: DQ190014, DQ190016, DQ190019, DQ190020, DQ190028, DQ190033, DQ190044, M33677, AY900630; FJ195346 in AY265456), in 36 nukleotidnih zaporedij slovenskih sevov CAEV (s kodami GenBank: od HQ910472 do HQ910493 in od JQ610942 do JQ610955). Poravnali smo tudi 9 nukleotidnih zaporedij sevov MVV, dostopnih v genski banki (s kodami GenBank: AY445885, DQ084347, M10608, AY101611, M31646, EU010123, AF479638, EU010125 in AY265455), in 49 nukleotidnih zaporedij slovenskih sevov MVV (s kodami Genbank: od HQ910460 do HQ910471 in od JQ610905 do JQ610941). Poravnana zaporedja smo uredili in pregledali s programom BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Poiskali smo najbolj ohranjena področja za načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sond. Izbrali smo en par začetnih oligonukleotidov in sond, ki so specifični za CAEV, in 3 pare začetnih oligonukleotidov in sond, ki so specifični za MVV. Sonde TaqMan smo označili s fluorescentnim poročevalskim barvilom FAM in dušilnim barvilom TAMRA (Tabela 3-7 in Tabela 3-8).

Specifičnost izbranih oligonukleotidov, sond in produktov pomnoževanja smo preverili *in silico* z uporabo programa BLAST.

Tabela 3-7: Seznam začetnih oligonukleotidov in sonde za pomnoževanje odseka na genu *gagMA* s testom CAEV.

Table 3-7: List of primers and probe used for the *gagMA* gene region fragment amplification with the CAEV assay.

| Začetni oligonukleotidi | Ime      | Nukleotidno zaporedje v smeri 5'-3' | Mesto v genomu* |
|-------------------------|----------|-------------------------------------|-----------------|
| Pozitivno usmerjen      | CAEVMA F | GGGAAAAGGGATTATCCTGAG               | 554-574         |
| Negativno usmerjen      | CAEVMA R | GTTTTAAGGCACCAAYAAACAATTTC          | 642-666         |
| <b>Sonda</b>            |          |                                     |                 |
|                         | CAEV MA  | 5' FAM-TCTGTCAAGTKCTCCCTTG-3' TAMRA | 619-639         |

\* Glede na nukleotidno zaporedje genoma seva CAEV Co, ki je v javni zbirki nukleotidnih zaporedij dostopen pod številko M33677.

\* According to nucleotide sequence of reference strain CAEV Co with accession number M33677.

Tabela 3-8: Seznam začetnih oligonukleotidov in sonde za pomnoževanje odseka na genu *gagMA* s testom MVV.

Table 3-8: List of primers and probe used for the *gagMA* gene region fragment amplification with the MVV assay.

| Začetni oligonukleotidi | Ime             | Nukleotidno zaporedje v smeri 5'-3'  | Mesto v genomu* |
|-------------------------|-----------------|--------------------------------------|-----------------|
| Pozitivno usmerjen      | <b>MVVMA F1</b> | GGATACCCCGAGCTCAAAG                  | 520-538         |
| Pozitivno usmerjen      | MVVMA F2        | GATACCCCGAGCTCAAAGA                  | 521-539         |
| Pozitivno usmerjen      | MVVMA F3        | GRTACCCCGAGCTCAARGA                  | 521-539         |
| Negativno usmerjen      | MVVMA R1        | AGTGCCCATAGACAGTTTC                  | 604-622         |
| Negativno usmerjen      | MVVMA R2        | TTCAATGCCCATAGACAGTTC                | 601-621         |
| Negativno usmerjen      | <b>MVVMA R3</b> | TTYAAKGCCAYAGACARTT                  | 601-620         |
| Sonda                   |                 |                                      |                 |
|                         | MVV MA          | 5' FAM-TCTGTCAAGGTCTCCTTCCG-3' TAMRA | 576-596         |

\* Glede na nukleotidno zaporedje genoma seva MVV KV1514, ki je v javni zbirki nukleotidnih zaporedij dostopen pod številko M10608.

\* According to nucleotide sequence of reference strain MVV KV1514 with accession number M10608.

### 3.15.3 Optimizacija testov za določanje CAEV in MVV

Za optimizacijo testov smo uporabili referenčna virusna seva MVV KV1514 in CAEV Co. V postopku optimizacije testov smo najprej določali vpliv temperature prileganja začetnih oligonukleotidov na uspešnost pomnoževanja. Za določanje virusov MVV smo izbrali 3 pozitivno usmerjene in 3 negativno usmerjene začetne oligonukleotide (Tabela 3-8). Pri določanju vpliva temperature prileganja na uspešnost pomnoževanja smo preverili vse kombinacije začetnih oligonukleotidov pri temperaturah prileganja 52 °C, 54 °C, 56 °C in 58 °C. Poleg referenčnega seva MVV KV1514 smo testirali tudi slovenske virusne seve štirih različnih podtipov genetske skupine A (Tabela 3-9). Izbrali smo kombinacijo tistih dveh začetnih oligonukleotidov, s katerima smo uspešno pomnožili vse testirane virusne seve MVV. Pri izbiri začetnih oligonukleotidov smo upoštevali tudi višino normalizirane fluorescence poročevalskega barvila ( $\Delta Rn$ ) in vrednosti Ct. Tudi pri izbiri temperature prileganja smo upoštevali prej omenjene dejavnike. Enak postopek smo uporabili za optimizacijo testa za določanje virusov CAEV, le da smo uporabili en par začetnih oligonukleotidov (Tabela 3-7) in testirali referenčni sev CAEV Co in dva slovenska seva podtipa B1 (Tabela 3-9).

Postopek optimizacije smo nadaljevali z določanjem ustrezne koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond. Najprej smo na podlagi matrike različnih koncentracij od 200 do 800 nM določili optimalno koncentracijo začetnih oligonukleotidov. Nato smo preverili tudi koncentracije sond od 50 do 200 nM in izbrali najbolj optimalno koncentracijo. Izbrali smo tisto končno kombinacijo koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond, ki so med pomnoževanjem izražale najvišjo  $\Delta Rn$  pri najnižji vrednosti Ct.

### 3.15.4 Izvedba testov za določanje CAEV in MVV

Teste smo izvajali na aparatu ABI PRISM 7000 SDS (Applied Biosystems) v optičnih ploščicah s 96 jamicami (Applied Biosystems, ZDA), ki smo jih prekrili z optičnimi adhezivnimi folijami (Applied Biosystems) in centrifugirali 3 minute pri 4000 obratih/min. Uporabljali smo komercialni komplet kemikalij Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen, ZDA).

Reakcijska mešanica za določanje virusov CAEV je vsebovala 7,5 µl 2 x pufra Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG with ROX, 600 nM pozitivno usmerjenega začetnega oligonukleotida, 400 nM negativno usmerjenega začetnega oligonukleotida, 200 nM sonde, 2 µl DNA in DEPC H<sub>2</sub>O do skupnega volumna 15 µl.

Reakcijska mešanica za določanje virusov MVV je vsebovala 7,5 µl 2 x pufra Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG with ROX, 800 nM vsakega začetnega oligonukleotida, 150 nM sonde, 2 µl DNA in DEPC H<sub>2</sub>O do skupnega volumna 15 µl. Uporabili smo začetna oligonukleotida MVVMA F1 in MVVMA R3, ki sta v Tabeli 3-8 označena krepko.

Na optično ploščico (Applied Biosystems, ZDA) smo nanesli po 13 µl pripravljene reakcijske mešanice in v vsako dodali po 2 µl izolirane DNA posameznega vzorca oziroma kontrole.

Vsak vzorec smo na ploščico nanesli v dveh ponovitvah. V dve jamici z reakcijsko mešanicijo smo dodali DEPC H<sub>2</sub>O, ki je služila kot kontrola navzkrižne okužbe reakcijske mešanice (angl. no template control, NTC). V dve jamici z reakcijsko mešanicijo smo dodali pozitivno

kontrolo. Za pozitivno kontrolo reakcije smo uporabili izolirano DNA referenčnih virusov MVV KV1514 in CAEV Co.

Oba testa smo izvedli pod enakimi pogoji pomnoževanja. Pomnoževanje je potekalo z začetno inkubacijo pri 50 °C, ki je trajala 2 minuti in je namenjena aktivaciji encima UDG, ki v primeru kontaminacije s produkti PCR z odstranjevanjem uracilov v enovijačni ali dvojnovijačni DNA prepreči ponovno pomnoževanje produktov PCR. Sledila je začetna denaturacija, ki je potekala 2 minuti pri 95 °C, in 45 ciklov pomnoževanja v dveh stopnjah: denaturacija (15 sekund pri 95 °C) in prileganje začetnih oligonukleotidov ter podaljševanje verige DNA (1 minuto pri 56 °C).

### **3.15.5 Analiza rezultatov**

Rezultate smo analizirali z računalniškim programom SDS 1.2 (Applied Biosystems, ZDA). Vrednosti Ct smo določili po avtomatski nastaviti bazne linije in avtomatski ali ročni nastaviti praga določljivosti. Vzorce, pri katerih je bila vrednost Ct enaka ali večja od 40, smo določili za negativne. Vzorce, pri katerih je bila vrednost Ct manjša od 40, pa smo določili za pozitivne.

### **3.15.6 Analitična specifičnost metode PCR v realnem času**

Z metodo PCR v realnem času smo testirali referenčna virusna seva MVV 1514 (podtip A1) in CAEV Co (podtip B1), virusne seve podtipov A3, A4, slovenske seve štirih različnih podtipov genetske skupine A in podtipa B1 ter virusni sev podtipa B2. Virusni sevi, ki smo jih uporabili za določanje analitične specifičnosti, so navedeni v Tabeli 3-9.

Specifičnost produktov pomnoževanja smo preverili z analizo njihove velikosti na 2-odstotnem agaroznem gelu in določitvijo nukleotidnega zaporedja pomnoženih produktov PCR.

Tabela 3-9: Seznam virusnih sevov, ki smo jih uporabili za optimizacijo in za določanje analitične specifičnosti metode PCR v realnem času.

Table 3-9: List of virus strains used for optimization and evaluation of analytical specificity of the real time PCR.

| Oznaka*<br>virusnega seva | Genotip oz.<br>podtip | Država<br>izvora | Koda GenBank |
|---------------------------|-----------------------|------------------|--------------|
| KV1514                    | A1                    | Islandija        | M10608       |
| 20 BAL                    | A3                    | Švica            | /            |
| 27 BAL                    | A3                    | Švica            | /            |
| 120 M                     | A3                    | Švica            | /            |
| 6 BAL                     | A4                    | Švica            | /            |
| 94 BC                     | A4                    | Švica            | /            |
| 96 BAL                    | A4                    | Švica            | /            |
| CAEV Co                   | B1                    | ZDA              | M33677       |
| AghOv478                  | B2                    | Francija         | /            |
| 1-24g                     | B1                    | Slovenija        | HQ910472     |
| 1-43g                     | B1                    | Slovenija        | HQ910475     |
| 1-65g                     | B1                    | Slovenija        | HQ910476     |
| 1-66g                     | B1                    | Slovenija        | HQ910478     |
| 1-77g                     | B1                    | Slovenija        | HQ910477     |
| 2-8g                      | A14                   | Slovenija        | HQ910466     |
| 2-15g                     | A14                   | Slovenija        | HQ910467     |
| 2-26g                     | A14                   | Slovenija        | HQ910468     |
| 2-33g                     | A14                   | Slovenija        | HQ910469     |
| 2-55g                     | A14                   | Slovenija        | HQ910470     |
| 31-4s                     | A15                   | Slovenija        | JQ611027     |
| 31-9s                     | A15                   | Slovenija        | JQ611028     |
| 31-12s                    | A15                   | Slovenija        | JQ611029     |
| 31-18s                    | A15                   | Slovenija        | JQ611030     |
| 35-1s                     | A5                    | Slovenija        | JQ610907     |
| 35-44s                    | A5                    | Slovenija        | JQ610917     |
| 35-49s                    | A5                    | Slovenija        | JQ610919     |
| 36-10s                    | A5                    | Slovenija        | JQ610931     |
| 36-14s                    | A5                    | Slovenija        | JQ610932     |
| 37-20g                    | B1                    | Slovenija        | JQ610942     |
| 37-25g                    | B1                    | Slovenija        | JQ610943     |
| 37-31g                    | B1                    | Slovenija        | JQ610944     |
| 37-63g                    | B1                    | Slovenija        | JQ610949     |
| 37-65g                    | B1                    | Slovenija        | JQ610950     |
| 37-88g                    | A                     | Slovenija        | JQ610988     |

\* Slovenski virusni sevi so označeni s številko reje, ki ji sledi številka živali, in oznako živalske vrste (g = koza, angl. goat; s = ovca, angl. sheep).

\* Slovenian viral strains are indicated by farm origin and animal number, followed by the animal species (s, sheep; g, goat).

Specifičnost obeh testov smo preverili tudi z navzkrižnim testiranjem. S testom MVV smo testirali referenčni virusni sev CAEV Co, virusni sev podtipa B2 in slovenske seve CAEV podtipa B1. Izmed slovenskih sevov CAEV smo za navzkrižno testiranje izbrali 5 vzorcev izolirane DNA od živali iz reje 1 in 5 vzorcev izolirane DNA od živali iz reje 37. S testom CAEV smo testirali referenčni virusni sev MVV KV1514 in slovenske seve MVV 4 različnih podtipov. Izmed slovenskih sevov MVV smo za navzkrižno testiranje izbrali 5 vzorcev izolirane DNA od živali iz reje 2, 4 vzorcev izolirane DNA od živali iz reje 31, 5 vzorcev izolirane DNA od živali iz rej 35 in 36 ter 1 vzorec izolirane DNA od živali iz reje 37.

### **3.15.7 Analitična občutljivost metode PCR v realnem času**

#### **3.15.7.1 Priprava DNA standardov**

S kloniranjem produktov PCR v plazmidni vektor smo pripravili dva standarda. Uporabili smo izolirano DNA referenčnih sevov virusov MVV 1514 in CAEV Co. Izolirano DNA virusa MVV KV1514 smo pomnožili s specifičnima začetnima oligonukleotidoma MVV1/MVV3. Izolirano DNA virusa CAEV Co pa smo pomnožili s specifičnima začetnima oligonukleotidoma GIN5/GIN3. Specifična produkta PCR smo po postopku elektroforeze izrezali iz agarognega gela. Očistili smo ju s kompletom reagentov Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA), kot je opisano pod točko 3.12. Prečiščena produkta PCR smo ponovno preverili na agaroznem gelu in nato klonirali v plazmidni vektor pCR 2.1, ki je sestavni del kompleta reagentov TA Cloning® Kit (Invitrogen, Velika Britanija).

#### Postopek kloniranja produktov PCR v plazmidni vektor

Pripravili smo 10 µl ligacijske mešanice, ki je vsebovala 6,5 µl očiščenega produkta PCR, 1 µl 10 x ligacijskega pufra, 2 µl vektorja pCR 2,1 in 0,5 µl T4 DNA ligaze. Ligacija je potekala čez noč pri 14 °C. Plazmidni vektor z vstavljenim produkтом PCR smo transformirali v kompetentne celice *Escherichia coli* DH5α. Ligacijski mešanici smo dodali 200 µl kompetentnih celic in inkubirali 15 minut na ledu. Mešanico smo segrevali 90 sekund pri 42 °C in nato 5 minut ohlajali na ledu. Mešanici smo nato dodali 600 µl gojišča LB in 1 uro stresali pri 37 °C in 170 stresljajih/min. Sledilo je centrifugiranje 2 minuti pri 5000 obratih/min. Odlili smo večino supernatanta in pelet resuspendirali v ostanku supernatanta

(100 µl) ter dodali 4 µl IPTG (0,4 M). Po končani transformaciji smo na plošče s selektivnim gojiščem LB z ampicilinom, katere smo predhodno premazali s 40 µl X-gal (0,4 mg/40 µl DMF), nacepili 50 µl bakterijske kulture. Plošče smo inkubirali čez noč pri 37 °C. Naslednji dan smo preverili prisotnost belih in modrih kolonij, od katerih le bele vsebujejo transformiran plazmid, in jih nacepili v tekoče gojišče LB z ampicilinom. Iz vsake plošče LB smo nacepili 1 kolonijo v 7 ml gojišča. Inkubirali smo v inkubatorju z nastavljenim tresenjem 24 ur pri 37 °C in 200 obratih/min.

Iz namnoženih bakterij smo izolirali plazmidno DNA z vstavljenim produktom. Za izolacijo smo uporabili komplet reagentov QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Uspešno izolacijo plazmidov smo preverili na agaroznem gelu in jih do nadaljnje uporabe shranili pri -70 °C. S specifičnimi začetnimi oligonukleotidi MVV1/MVV3 in GIN5/GIN3 smo določili nukleotidno zaporedje vstavljenih produktov PCR, kot je opisano pod točko 3.12, in s tem potrdili prisotnost naših produktov.

### 3.15.7.2 Določanje meje detekcije

Koncentracijo neredčene plazmidne DNA (ng/µl) smo določili s fluorometrom Qubit™ fluorometer (Invitrogen, ZDA) in iz dobljene vrednosti izračunali število molekul plazmidne DNA po formuli (<http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html>):

$$\text{Število molekul} = \frac{6.022 \times 10^{23} (\text{št. molekul/mol}) \times \text{količina DNA (ng)}}{\text{dolžina DNA (bp)} \times 10^9 (\text{ng/g}) \times 650 (\text{g/mol/bp})}$$

Pripravili smo serijo 10-kratnih redčin, ki so vsebovale od 1 do  $10^7$  molekul plazmidne DNA z vstavljenim produkтом PCR v reakcijski mešanici PCR. Vsako redčino smo testirali v 3 ponovitvah. Pripravili smo tudi redčine, ki so vsebovale 100, 75, 50, 25, 10, 5 in 1 molekulo plazmidne DNA v reakcijski mešanici PCR, in vsako redčino testirali v 10 ponovitvah. Mejo detekcije smo določili kot najmanjše število molekul plazmidne DNA, pri kateri s 95-odstotno zanesljivostjo zaznamo pozitiven vzorec. Za določitev meje detekcije smo uporabili analizo Probit.

### 3.15.8 Določanje učinkovitosti pomnoževanja

Pripravili smo serijo 4 zaporednih 10-kratnih redčin izolirane DNA referenčnih sevov virusov MVV 1514 in CAEV Co. Nerazredčeno izolirano DNA referenčnih sevov virusov in vsako posamezno redčino smo testirali v 3 ponovitvah. Serije redčin smo testirali v 3 ločenih poskusih.

Standardno krivuljo smo pridobili tako, da smo izrisali vrednosti Ct v odvisnosti od logaritemske vrednosti količine tarčne DNA. Iz standardne krivulje smo dobili podatke o naklonu (angl. slope, s) in koreacijskem koeficientu ( $R^2$ ) linearne regresijske premice. Učinkovitosti pomnoževanja smo izračunali iz naklona linearne regresijske premice po formuli:

$$E = (10^{(1/s)}) - 1$$

Iz standardne krivulje smo določili tudi območje zaporednih redčin, v katerem je reakcija linearna.

### 3.15.9 Ponovljivost in obnovljivost

Za oba testa smo na podlagi serijskih 10-kratnih redčin izolirane DNA referenčnih sevov virusov MVV 1514 in CAEV Co, ki smo jih testirali, kot je opisano pod točko 3.15.8, določili ponovljivost reakcije v enem testiranju in obnovljivost med več testiranjimi.

Za izračun koeficiente variacije (KV) smo uporabili izračunane teoretične vrednosti števila molekul virusne DNA. Teoretične vrednosti števila molekul virusne DNA smo v nerazredčeni izolirani DNA referenčnih sevov virusov ocenili na podlagi primerjave vrednosti Ct s približno enako vrednostjo Ct redčine z znanim številom molekul plazmidne DNA. Nato smo teoretično število molekul nerazredčene virusne DNA, vsake redčitve in vsake ponovitve letih izračunali iz vrednosti Ct z uporabo formule standardne krivulje.

### 3.15.10 Kontrola inhibicije

Referenčna virusa MVV 1514 in CAEV CO smo namnožili na celični kulturi LSM oziroma GSM. Prisotnost provirusne DNA v okuženih celicah smo preverili s testiranjem z metodo

PCR v realnem času. Okužene celice smo v razmerju 1 : 10 dodali v suspenzijo kozjih in ovčjih levkocitov. Ovče in kozje levkocite smo pridobili od seronegativnih živali iz reje, v kateri so bile vse živali seronegativne, in jih tudi testirali na prisotnost provirusne DNA virusa MVV in CAEV. V nobenem vzorcu levkocitov ni prišlo do pomnoževanja DNA SRLV. Nato smo pripravili suspenzijo levkocitov. Razdelili smo jo na dva dela, in v en del dodali celice okužene z virusom MVV, v drugi del pa celice okužene z virusom CAEV. Vsako od tako pripravljenih suspenzij levkocitov z dodanimi okuženimi celicami smo nato razdelili na 5 delov po 200 µl, iz katerih smo izolirali genomsko DNA po postopku, opisanem pod točko 3.10. Z metodo PCR v realnem času smo nato za test MVV in za test CAEV testirali izolirane genomske DNA posameznih suspenzij. Vsak vzorec smo testirali v dveh ponovitvah. Iz vrednosti Ct smo izračunali KV in na podlagi KV ter primerjave vrednosti Ct ugotavljal ustreznost postopka izolacije in morebitno inhibicijo reakcije.

### **3.15.11 Diagnostična specifičnost**

Z metodo PCR v realnem času smo testirali 43 vzorcev polne krvi koz in ovac iz 3 rej (reja 28, reja 29 in reja 30; glej Tabela 3-1), v katerih so bile vse živali seronegativne. Vse vzorce smo testirali tako s testom CAEV kot s testom MVV.

### **3.15.12 Testiranje metode na kliničnih vzorcih in diagnostična občutljivost**

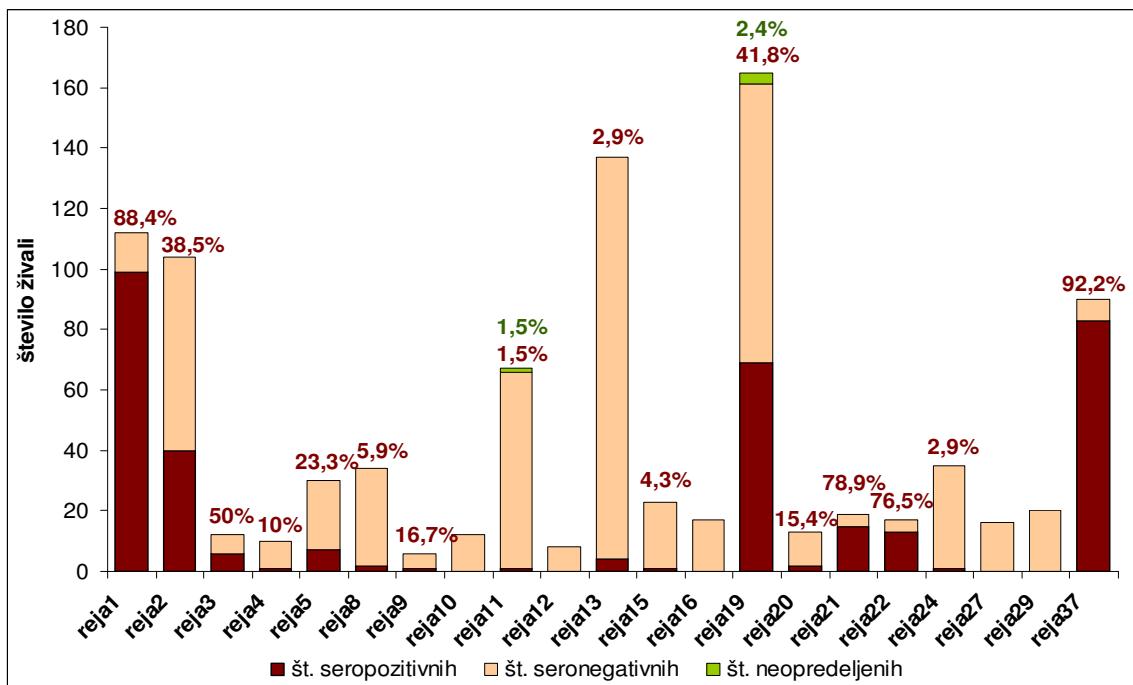
Novo razvito metodo PCR v realnem času za določanje MVV in CAEV smo testirali na vzorcih, pridobljenih v okviru te raziskave. Za testiranje vzorcev z molekularnimi metodami smo izbrali 6 rej, v katerih smo v serumskih vzorcih živali s testom ELISA dokazali prisotnost protiteles proti virusoma MVV in CAEV. Z metodo PCR v realnem času za določanje MVV in CAEV smo testirali vzorce polne krvi živali iz izbranih 6 rej. Testirali smo vzorce vseh serološko pozitivnih živali (320 vzorcev); vzorce živali, katerih rezultat testa ELISA je bil neopredeljen (4 vzorci), in vzorce seronegativnih živali, pri katerih smo z metodo LTR-PCR pomnožili DNA SRLV (5 vzorcev). Da bi ugotovili, ali lahko z novo metodo PCR v realnem času pomnožimo DNA SRLV tudi v vzorcih seronegativnih živali, pri katerih z metodo LTR-PCR nismo pomnožili DNA SRLV, smo testirali tudi izbrano število teh vzorcev. Število vzorcev smo določili z uporabo metode, ki jo je opisal Thrusfield (1995) in je namenjena za izračun števila vzorcev potrebnih, da najdemo najmanj en seropozitven vzorec z verjetnostjo

0,95, pri čemer upoštevamo predvideno seroprevalenco. Pri izračunu števila vzorcev s to metodo smo namesto predvidene seroprevalence uporabili predviden odstotek seronegativnih živali, pri katerih lahko pomnožimo DNA SRLV. Predvidevali smo, da je seronegativnih živali, pri katerih lahko pomnožimo DNA SRLV, do 5 % (Herrmann-Hoesing, 2010). Na podlagi opisane metode smo izmed 201 vzorca seronegativnih živali izbrali 51 vzorcev. Vzorce ovac smo testirali s testom MVV, medtem ko smo vzorce koz testirali s testom CAEV. V tistih rejah, pri katerih smo s filogenetskimi analizami ugotovili prisotnost virusov genetskih skupin A in B, smo v primeru negativnega rezultata pri serološko pozitivnih živalih vzorce ovac testirali tudi s testom CAEV in vzorce koz s testom MVV.

## 4 REZULTATI

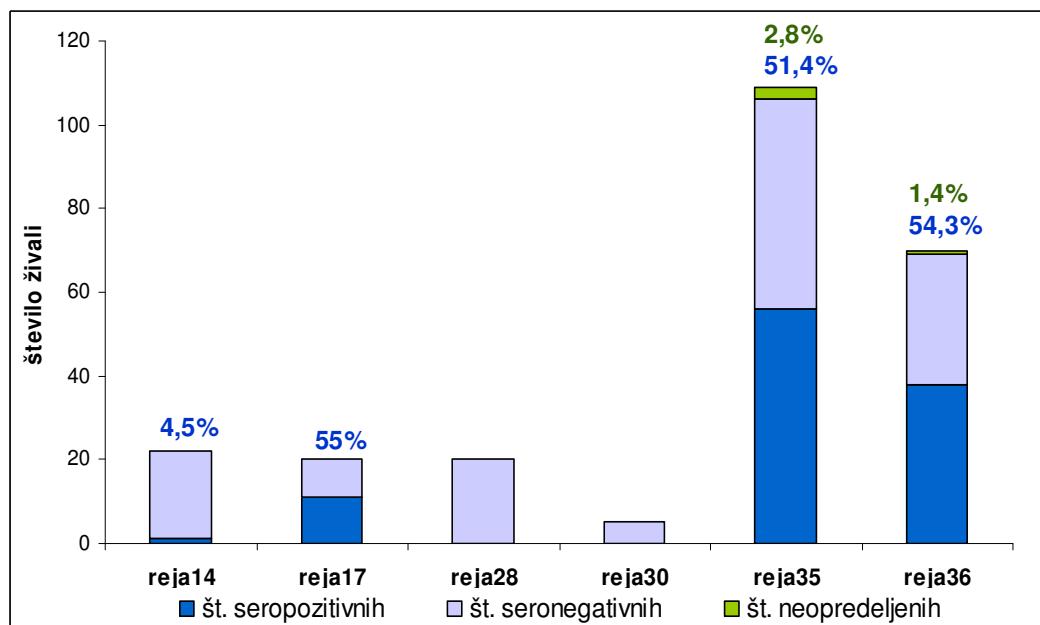
### 4.1 Rezultati testa ELISA

S testom ELISA za dokazovanje prisotnosti protiteles proti virusom SRLV smo pregledali 1538 vzorcev serumov koz in ovac iz 36 rej in pri 461 živalih (30 %) dokazali prisotnost protiteles. Prisotnost protiteles smo ugotovili v 16 od 21 rej koz (76,2 %), v 4 od 6 rej ovac (66,7 %) in v 4 od 9 mešanih rej (44,4 %). Pregledali smo 1091 vzorcev serumov koz in pri 350 živalih (32,1 %) dokazali prisotnost protiteles. Pri 111 (24,8 %) od 447 pregledanih vzorcev ovac smo dokazali prisotnost protiteles. Odstotek seropozitivnih živali v posameznih rejah koz se je gibal od 1,5 % do 92,2 %. Rezultat testa ELISA je bil pri 5 živalih v 2 rejah koz neopredeljen, in sicer je bil neopredeljen rezultat testiranja 1 vzorca v reji 11 in 4 vzorcev v reji 19 (Slika 4-1). V posameznih rejah ovac pa smo ugotovili od 4,5 % do 55 % seropozitivnih živali. Rezultat testa ELISA je bil pri 4 živalih v 2 rejah ovac neopredeljen, in sicer so bili neopredeljen rezultati testiranja 3 vzorcev v reji 35 in 1 vzorca v reji 36 (Slika 4-2). Od 3,8 % do 10,5 % seropozitivnih živali smo dokazali v mešanih rejah. V mešani rejih 18 je bil pri 1 kozi rezultat testa ELISA neopredeljen (Slika 4-3).



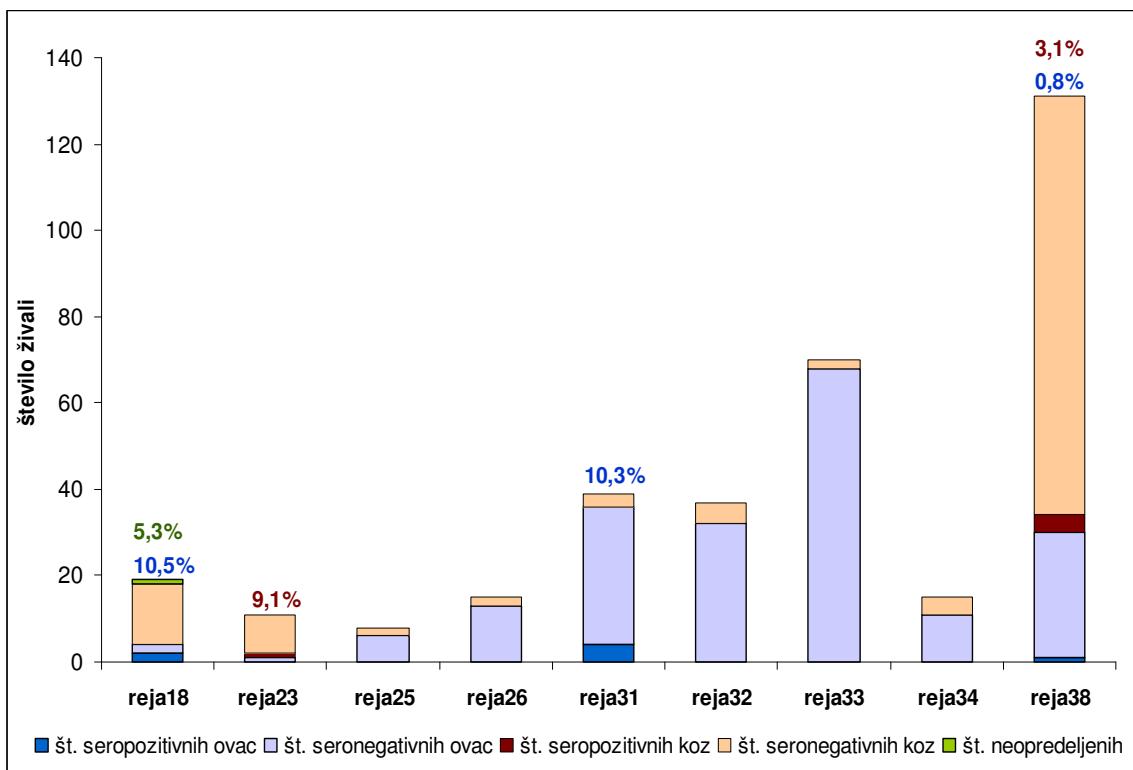
Slika 4-1: Grafični prikaz rezultatov testiranj s testom ELISA v rejah koz. Nad stolpci so z ustrezno barvo prikazani odstotki serološko pozitivnih in neopredeljenih živali v posameznih rejah.

Figure 4-1: Graphical presentation of ELISA test results in goat farms. Percentage of seropositive and seroineterminate animals in individual farms is shown above columns with a corresponding colour.



Slika 4-2: Grafični prikaz rezultatov s testom ELISA v rejah ovac. Nad stolpci so z ustrezno barvo prikazani odstotki serološko pozitivnih in neopredeljenih živali v posameznih rejah.

Figure 4-2: Graphical presentation of ELISA test results in sheep farms. Percentage of seropositive and seroineterminate animals in individual farms is shown above columns with a corresponding colour.



Slika 4-3: Grafični prikaz rezultatov testiranj s testom ELISA v mešanih rejah. Nad stolpci so z ustrezno barvo prikazani odstotki serološko pozitivnih in neopredeljenih živali v posameznih rejah.

Figure 4-3: Graphical presentation of ELISA test results in mixed species farms. Percentage of seropositive and seroineterminate animals in individual farms is shown above columns with a corresponding colour.

Za nadaljnje preiskave smo izbrali 524 živali iz 6 rej, pri katerih smo s testom ELISA dokazali prisotnost protiteles (Tabela 4-1). Izbrali smo rejo 1, rejo 2, rejo 31, rejo 35, rejo 36 in rejo 37. V rejji 1 smo prisotnost protiteles dokazali pri 99 vzorcih koz od skupaj 112 koz (88,4 %). V rejji 2 s 104 kozami je bilo seropozitivnih 40 (38,5 %) živali. V rejji 31 s 36 ovcami in 3 kozami smo dokazali prisotnost protiteles v 4 vzorcih ovac (10,3 %). V rejji 35 s 109 ovcami je bilo seropozitivnih 56 (51,4 %) živali. V tej rejji je bil rezultat testiranja 3 vzorcev neopredeljen (2,8 %). V rejji 36 s 70 ovcami smo dokazali prisotnost protiteles v 38 vzorcih (54,3 %). Rezultat testiranja enega vzorca v tej rejji je bil neopredeljen (1,4 %). V rejji 37 z 90 kozami je bilo seropozitivnih 83 živali (92,2 %).

Tabela 4-1: Rezultat testiranj 524 vzorcev serumov s testom ELISA v izbranih šestih rejah.

Table 4-1: ELISA test results of 524 serum samples in selected six farms.

| Oznaka reje | Št. živali v rej | Št. (%) pozitivnih / neopredeljenih z ELISA |
|-------------|------------------|---|
| Reja 1      | 112              | 99 (88,4%)                                  |
| Reja 2      | 104              | 40 (38,5%)                                  |
| Reja 31     | 39               | 4 (10,3%)                                   |
| Reja 35     | 109              | 56 (51,4%) / 3 (2,8%)* <sup>1</sup>         |
| Reja 36     | 70               | 38 (54,3%) / 1 (1,4%)* <sup>2</sup>         |
| Reja 37     | 90               | 83 (92,2%)                                  |

\*<sup>1</sup> V dveh vzorcih izmed treh neopredeljenih s testom ELISA smo z metodo LTR-PCR in PCR v realnem času pomnožili DNA SRLV.

\*<sup>1</sup> SRLV DNA was amplified with the LTR-PCR and the real time PCR in two out of three ELISA indeterminant samples.

\*<sup>2</sup> V vzorcu, ki je bil s testom ELISA neopredeljen, smo z metodo LTR-PCR in PCR v realnem času pomnožili DNA SRLV.

\*<sup>2</sup> SRLV DNA was amplified with the LTR-PCR and the real time PCR in ELISA indeterminant sample.

## 4.2 Rezultati testa WB in testa SU5 ELISA

V izbranih 6 rejah smo s potrditvenima testoma WB in SU5 ELISA pregledali vzorce serumov tistih živali, pri katerih smo s testom ELISA dokazali prisotnost protiteles oziroma je bil rezultat neopredeljen in hkrati nismo dokazali prisotnosti nukleinske kisline SRLV s klasičnimi metodami PCR: LTR-PCR in *gag*-PCR. Skupaj smo pregledali 93 vzorcev. V vseh vzorcih, pri katerih je bil rezultat testa ELISA pozitiven, smo pozitiven rezultat potrdili vsaj z enim potrditvenim testom ali z obema potrditvenima testoma. Rezultat potrditvenih testov vzorca 35-100s, ki je bil v testu ELISA neopredeljen, je bil negativen (Tabela 4-2).

Tabela 4-2: Rezultati testiranj 93 serumskih vzorcev s testom WB in s testom SU5 ELISA v izbranih šestih rejah.  
 Table 4-2: WB and SU5 ELISA test results of 93 serum samples in selected six farms.

| Oznaka živali* | Rezultat WB | Rezultat SU5 ELISA/serotip |
|----------------|-------------|----------------------------|
| <b>Reja 1</b>  |             |                            |
| 1-3g           | +           | -                          |
| 1-13g          | +           | +/B                        |
| 1-15g          | +           | +/B                        |
| 1-31g          | +           | +/B                        |
| 1-53g          | +           | -                          |
| 1-57g          | -           | +/B                        |
| 1-75g          | -           | +/B                        |
| 1-93g          | +           | +/B                        |
| 1-102g         | +           | +/B                        |
| <b>Reja 2</b>  |             |                            |
| 2-13g          | +           | +/A                        |
| 2-14g          | +           | -                          |
| 2-24g          | +           | +/A                        |
| 2-43g          | +           | +/A                        |
| 2-54g          | +           | -                          |
| 2-56g          | +           | +/A                        |
| 2-57g          | +           | +/A                        |
| 2-76g          | +           | +/A                        |
| 2-81g          | +           | +/A                        |
| 2-92g          | +           | +/A                        |
| 2-94g          | +           | +/A                        |
| 2-98g          | +           | +/A                        |
| 2-99g          | +           | +/A                        |
| <b>Reja 35</b> |             |                            |
| 35-2s          | +           | +/A                        |
| 35-16s         | -           | +/A                        |
| 35-19s         | -           | +/A                        |
| 35-36s         | -           | +/A                        |
| 35-51s         | +           | +/A                        |
| 35-68s         | -           | +/A                        |
| 35-79s         | -           | +/A                        |
| 35-80s         | -           | +/A                        |
| 35-84s         | -           | +/A                        |
| 35-91s         | -           | +/A                        |
| 35-95s         | +           | +/A                        |
| 35-100s        | -           | -                          |
| 35-106s        | -           | +/A                        |
| 35-107s        | -           | +/A                        |
| 35-108s        | -           | +/A                        |
| 35-109s        | +           | +/A                        |
| <b>Reja 36</b> |             |                            |
| 36-16s         | -           | +/A                        |
| 36-29s         | +           | +/A                        |
| 36-49s         | -           | +/A                        |
| 36-63s         | +           | +/A                        |
| 36-64s         | +           | +/A                        |
| <b>Reja 37</b> |             |                            |
| 37-2g          | +           | +/B                        |
| 37-5g          | +           | +/B                        |
| 37-6g          | +           | +/B                        |
| 37-8g          | +           | -                          |

| Oznaka živali* | Rezultat WB | Rezultat SU5 ELISA/serotip |
|----------------|-------------|----------------------------|
| 37-9g          | +           | +/B                        |
| 37-10g         | +           | +/B                        |
| 37-11g         | +           | +/B                        |
| 37-12g         | +           | +/B                        |
| 37-13g         | +           | +/B                        |
| 37-14g         | +           | +/B                        |
| 37-16g         | +           | +/B                        |
| 37-17g         | +           | -                          |
| 37-19g         | +           | +/B                        |
| 37-21g         | +           | +/B                        |
| 37-26g         | +           | +/B                        |
| 37-27g         | +           | +/B                        |
| 37-28g         | +           | +/B                        |
| 37-29g         | +           | +/B                        |
| 37-30g         | +           | +/B                        |
| 37-33g         | +           | +/B                        |
| 37-36g         | +           | +/B                        |
| 37-38g         | +           | +/B                        |
| 37-39g         | +           | +/B                        |
| 37-42g         | +           | +/B                        |
| 37-44g         | +           | +/A                        |
| 37-45g         | +           | +/B                        |
| 37-47g         | +           | +/B                        |
| 37-48g         | +           | +/B                        |
| 37-49g         | +           | +/B                        |
| 37-51g         | +           | +/B                        |
| 37-52g         | +           | +/B                        |
| 37-54g         | +           | +/B                        |
| 37-55g         | +           | +/B                        |
| 37-56g         | +           | -                          |
| 37-57g         | +           | +/B                        |
| 37-64g         | +           | +/B                        |
| 37-67g         | +           | +/B                        |
| 37-68g         | +           | -                          |
| 37-69g         | +           | +/B                        |
| 37-71g         | +           | -                          |
| 37-74g         | +           | +/B                        |
| 37-76g         | +           | +/B                        |
| 37-79g         | +           | +/B                        |
| 37-80g         | +           | +/B                        |
| 37-81g         | +           | +/B                        |
| 37-82g         | +           | -                          |
| 37-83g         | +           | +/B                        |
| 37-84g         | +           | +/B                        |
| 37-87g         | +           | +/B                        |
| 37-90g         | +           | +/B                        |

\*Slovenski virusni sevi so označeni s številko reje, sledi ji številka živali, in oznako živalske vrste (g = koza, angl. goat; s = ovca, angl. sheep).

(-) = negativno, (+) = pozitivno, A = genetska skupina A, B = genetska skupina B

\*Slovenian viral strains are indicated by farm origin and animal number, followed by the animal species (s, sheep; g, goat).

(-) = negative, (+) = positive, A = genetic group A, B = genetic group B

## 4.3 Rezultati metode PCR

### 4.3.1 Pomnoževanje odseka na regiji LTR

V izbranih 6 rejah smo z metodo LTR-PCR pregledali vzorce polne krvi vseh 524 živali (Tabela 4-3, Tabela 4-4). V reji 1 s 112 kozami smo dokazali prisotnost DNA SRLV v 71 vzorcih (63,4 %). V tej reji je bilo seropozitivnih 99 živali in v 71,7 % le-teh smo dokazali tudi DNA SRLV (71 vzorcev). V nobenem od vzorcev seronegativnih živali nismo pomnožili DNA SRLV. V reji 2 s 104 kozami smo dokazali prisotnost DNA SRLV v skupaj 25 vzorcih (24 %). V tej reji je bilo seropozitivnih 40 živali in v 60 % le-teh smo dokazali tudi DNA SRLV (24 vzorcev). V enem vzorcu seronegativne živali smo dokazali DNA SRLV. V reji 31 s 36 ovcami in 3 kozami smo dokazali DNA SRLV v 4 vzorcih ovac (10,3 %). Tudi seropozitivne ovce v tej reji so bile 4 in pri teh smo dokazali tudi DNA SRLV. V nobenem od vzorcev seronegativnih živali nismo dokazali DNA SRLV. V reji 35 s 109 ovcami smo dokazali DNA SRLV v skupaj 43 vzorcih (39,4 %). V tej reji je bilo seropozitivnih 56 živali in v 67,9 % le-teh smo dokazali tudi DNA SRLV (38 vzorcev). Pri 2 izmed 3 serološko neopredeljenih vzorcih živali smo pomnožili DNA SRLV. Prav tako smo DNA SRLV pomnožili pri 3 vzorcih seronegativnih živali. V reji 36 s 70 ovcami smo dokazali DNA SRLV v skupaj 33 vzorcih (47,1 %). V tej reji je bilo seropozitivnih 38 živali in v 81,6 % le-teh smo dokazali tudi DNA SRLV (31 vzorcev). V enem vzorcu živali, pri kateri je bil rezultat testa ELISA neopredeljen, smo pomnožili DNA SRLV. Prav tako smo DNA SRLV pomnožili pri enem vzorcu serološko negativne živali. V reji 37 z 90 kozami smo dokazali DNA SRLV v le 4 vzorcih (4,4 %). V tej reji je bilo 83 seropozitivnih živali in v 4 vzorcih (4,8 %) le-teh smo dokazali DNA SRLV. V nobenem od vzorcev seronegativnih živali nismo pomnožili DNA SRLV.

Od skupaj 323 pregledanih vzorcev seropozitivnih živali<sup>1</sup> smo DNA SRLV dokazali v 175 vzorcih (54 %). Prav tako smo DNA SRLV dokazali v 5 vzorcih seronegativnih živali.

Specifičnost produktov PCR pomnoženih z metodo LTR-PCR v vzorcih seronegativnih živali smo potrdili z določitvijo nukleotidnega zaporedja.

<sup>1</sup> Med serološko pozitivne živali smo uvrstili tudi tiste, pri katerih je bil rezultat testa ELISA neopredeljen in pri katerih smo potrdili prisotnost DNA SRLV z metodo LTR-PCR in z metodo PCR v realnem času.

#### 4.3.2 Pomnoževanje odseka na genu *gag*

V izbranih 6 rejah smo z metodo *gag*-PCR na prisotnost DNA SRLV pregledali vzorce tistih živali, pri katerih smo s testom ELISA dokazali protitelesa in pri katerih z metodo LTR-PCR nismo pomnožili DNA SRLV (Tabela 4-3, Tabela 4-4). Takih vzorcev je bilo skupaj 148. Vzorce ovac smo testirali s testom *gag*MVV-PCR, medtem ko smo vzorce koz testirali s testom *gag*CAEV-PCR. V tistih rejah, pri katerih smo s filogenetskimi analizami ugotovili prisotnost virusov genetskih skupin A in B, smo v primeru negativnega rezultata pri serološko pozitivnih živalih vzorce ovac testirali tudi s testom *gag*CAEV-PCR in vzorce koz s testom *gag*MVV-PCR.

V reji 1 smo s testom *gag*CAEV-PCR dokazali DNA CAEV v 19 vzorcih (17 %). V enem vzorcu (1 %) iz reje 2 smo s testom *gag*CAEV-PCR pomnožili DNA CAEV. V reji 35 pa smo s testom *gag*MVV-PCR dokazali DNA MVV v 3 vzorcih (2,8 %) in v reji 36 v 2 vzorcih (2,9 %). V reji 37 smo s testom *gag*CAEV-PCR dokazali DNA CAEV v 29 vzorcih (32,2 %).

Z metodo *gag*-PCR smo dokazali DNA SRLV v dodatnih 54 vzorcih. Z metodo *gag*-PCR in LTR-PCR skupaj smo DNA SRLV dokazali v 229 vzorcih seropozitvnih živali (71 %).

Tabela 4-3: Rezultat testiranj 524 vzorcev polne krvi z metodo LTR-PCR in z metodo *gag*-PCR v izbranih šestih rejah. Prikazano je število pozitivnih oziroma odstotek pozitivnih glede na število vseh živali.

Table 4-3: LTR-PCR and *gag*-PCR results of 524 whole blood samples in selected six farms. Number of positives or percentage of positives concerning the number of all animals is shown.

| Oznaka<br>reje | Št. živali<br>v reji | Pozitivni z ELISA /<br>negativni z LTR-PCR |  |   |  | Št. (%) pozitivnih z<br>LTR-PCR in<br><i>gag</i> -PCR |
|----------------|----------------------|--|--|---|--|---|
|                |                      | Št. (%)<br>pozitivnih z<br>LTR-PCR         | Št. (%)<br>pozitivnih z<br><i>gag</i> CAEV-PCR | Št. (%)<br>pozitivnih z<br><i>gag</i> MVV-PCR |  |   |
| Reja 1         | 112                  | 71 (63,4%)                                 | 19 (17%)                                       | 0   |  | 90 (80,4%)  |
| Reja 2         | 104                  | 25 (24%)                                   | 1 (1%)   | 0   |  | 26 (25%)  |
| Reja 31        | 39                   | 4 (10,3%)                                  | /  | /   |  | 4 (10,3%)   |
| Reja 35        | 109                  | 43 (39,4%)                                 | 0  | 3 (2,8%)                                      |  | 46 (41,8%)  |
| Reja 36        | 70                   | 33 (47,1%)                                 | 0  | 2 (2,9%)                                      |  | 35 (50%)  |
| Reja 37        | 90                   | 4 (4,4%)                                   | 29 (32,2%)                                     | 0   |  | 33 (36,7%)  |

(/) = nismo testirali

(/) = not tested

Tabela 4-4: Rezultat testiranj 524 vzorcev polne krvi z metodo LTR-PCR in z metodo *gag*-PCR v izbranih šestih rejah. Prikazano je število pozitivnih oziroma odstotek pozitivnih glede na število seropozitivnih živali in število pozitivnih oziroma odstotek pozitivnih, ki so bili seronegativni.

Table 4-4: LTR-PCR and *gag*-PCR results of 524 whole blood samples in selected six farms. Number of positives or percentage of positives concerning the number of seropositive animals and number of positives or percentage of positives concerning the number of seronegative animals is shown.

| Oznaka<br>reje | Pozitivni z ELISA         |                                 | Negativni z<br>ELISA                               |                                 |
|----------------|---------------------------|---------------------------------|--|---------------------------------|
|                | Št. pozitivnih<br>z ELISA | Št. (%) pozitivnih<br>z LTR-PCR | Št. (%) pozitivnih z<br>LTR-PCR in <i>gag</i> -PCR | Št. (%) pozitivnih<br>z LTR-PCR |
| Reja 1         | 99                        | 71 (71,7%)                      | 90 (90,9%)   | 0                               |
| Reja 2         | 40                        | 24 (60%)                        | 25 (62,5%)   | 1 (1%)                          |
| Reja 31        | 4                         | 4 (100%)                        | 4 (100%)   | 0                               |
| Reja 35        | 58*                       | 40 (69%)                        | 43 (74,1%)   | 3 (2,8)                         |
| Reja 36        | 39*                       | 32 (82,1%)                      | 34 (87,2%)   | 1 (1,4%)                        |
| Reja 37        | 83                        | 4 (4,8%)                        | 33 (39,8%)   | 0                               |

\* Med serološko pozitivne živali smo uvrstili tudi tiste, pri katerih je bil rezultat testa ELISA neopredeljen in pri katerih smo potrdili prisotnost DNA SRLV z metodo LTR-PCR in z metodo PCR v realnem času.

\* ELISA indeterminate animals which were LTR-PCR and real time PCR positive were classified as seropositive.

## 4.4 Ugotavljanje filogenetskih odnosov

V izbranih 6 rejah smo 82 slovenskim sevom virusov SRLV določili nukleotidna zaporedja odseka na genu *gag*, ki kodira protein matriksa (*gagMA*), in odseka na genu *pol* (regiji 1,2 kb *pol*).

### 4.4.1 Filogenetske analize odseka na genu *gagMA*

Nukleotidno zaporedje odseka na genu *gag* smo določili 77 sevom virusov SRLV. Nukleotidna zaporedja slovenskih sevov SRLV in 22 nukleotidnih zaporedij sevov SRLV, dostopnih v genski banki, smo prevedli v aminokislinska zaporedja in jih poravnali ter jih nato prevedli nazaj v nukleotidna zaporedja. Upoštevali smo le zaporedja, ki kodirajo protein MA (gen *gagMA*), in tako pridobili 444 nukleotidov dolgo (vključno z delecijami) poravnano zaporedij. Parameter  $\alpha$  smo izračunali s programom PhyML z metodo ML. Njegova vrednost je bila 0,862.

Nukleotidna zaporedja virusnih sevov SRLV posameznih podtipov znotraj genetskih skupin, ki so dostopna v genski banki, smo združili v skupine. Prav tako smo v skupine združili slovenske virusne seve, ki so na filogenetskem drevesu tvorili gruče. Kadar smo imeli na razpolago le en virusni sev določenega podtipa, smo ga v izračunu matrike genetskih razdalj obravnavali kot skupino. Za posamezne pare skupin nukleotidnih zaporedij smo na podlagi modela *p*-distance izračunali matriko povprečnih genetskih razdalj med skupinami in znotraj posamezne skupine. Genetske razdalje smo izrazili v odstotkih kot povprečne razlike med skupinami (Tabela 4-5 in Tabela 4-6) in znotraj skupin.

Filogenetska drevesa smo izračunali na podlagi 99 poravnanih nukleotidnih zaporedij. Filogenetska drevesa smo določili z metodo povezovanja s sosedom (NJ) in z metodo največjega verjetja (ML) ter evolucijskim modelom Tamura-Nei z uporabo parametra  $\alpha$ . Topologiji obeh dreves sta bili podobni. Prikazano je filogenetsko drevo, ki smo ga poiskali z uporabo metode NJ. Na drevesu smo zaradi poenostavitve prikazali le po 5 virusnih sevov iz posameznih rej, in sicer iz reje 1, reje 2, reje 35, reje 36 in reje 37 (Slika 4-4).

Na podlagi filogenetske analize smo ugotovili, da slovenske seve SRLV, ki so prisotni v dveh rejah koz (reja 1 in reja 37), in 2 seva iz reje 2, uvrščamo v genetsko skupino B. Ti virusni sevi tvorijo dve gruči znotraj podtipa B1. Eno gručo tvorita dva seva iz reje 2 skupaj s sevi iz reje 1. Nukleotidna zaporedja teh sevov se med seboj v povprečju razlikujejo za 1,8 %. Ta gruča virusnih sevov je najbolj sorodna virusnim sevom podtipa B1 iz Italije s kodami GenBank DQ190019 in DQ190033 (Slika 4-4) in se od njih v povprečju razlikuje za 6,6 %. Od vseh analiziranih sevov podtipa B1 se v povprečju razlikuje za 11,3 %. Znotraj genetske skupine B pa je najbolj oddaljena od podtipa B3, od katerega se v povprečju razlikujejo za 20,3 %. Drugo gručo znotraj podtipa B1 pa tvorijo virusni sevi iz reje 37, ki se med seboj v povprečju razlikujejo za 2,7 %. Od najbolj sorodnih virusnih sevov podtipa B1 se v povprečju razlikujejo za 12,3 % in se znotraj genetske skupine B najbolj razlikujejo od sevov podtipa B3, in sicer za 21,6 %. Gruči slovenskih virusnih sevov SRLV znotraj podtipa B1 se med seboj v povprečju razlikujeta za 15,5 % in na filogenetskem drevesu nista statistično podprtji. Na filogenetskem drevesu smo odkrili, da 6 virusnih sevov, s katerimi so okužene koze iz reje 2, spada v genetsko skupino A, znotraj katere tvorijo lastno podskupino z visoko statistično podporo z vrednostjo 98. Ti sevi se med seboj v povprečju razlikujejo za 5 %. Teh virusnih

sevov nismo mogli uvrstiti v nobenega izmed že znanih podtipov znotraj genetske skupine A. Skupina teh virusnih sevov se od najbolj sorodnega podtipa A2 v povprečju razlikuje za 17,7 % in je znotraj genetske skupine A najbolj oddaljena od podtipa A8, od katerega se razlikuje za 21,9 %.

Na podlagi filogenetske analize smo ugotovili, da slovenske virusne seve SRLV, ki so prisotni v dveh rejah ovac (reja 35 in reja 36), uvrščamo v genetsko skupino A. Ti virusni sevi tvorijo eno gručo in se med seboj v povprečju razlikujejo za 7 %. Na filogenetskem drevesu se povezujejo z angleškim referenčnim virusnim sevom MVV EV1 podtipa A1, od katerega se v povprečju razlikujejo za 13 %, vendar brez statistične podpore. Od najbolj sorodnih virusnih sevov podtipa A1 in A2 se v povprečju razlikujejo za 13,3 % (A1) in 13,7 % (A2). Gruča teh virusnih sevov je znotraj genetske skupine A najbolj oddaljena od sevov podtipa A8, od katerih se razlikuje za 20,5 %. Ta gruča slovenskih virusnih sevov se od skupine 6 slovenskih virusnih sevov iz reje 2 v povprečju razlikuje za 15,9 %. V nobenem vzorcu živali iz reje 31 nismo pomnožili provirusne DNA na odseku gena *gag*.

Slovenske seve SRLV smo želeli primerjati tudi s sevi SRLV iz Poljske, ki so jih Olech in sodelavci (2012) uvrstili v dva nova podtipa A12 in A13. Nukleotidna zaporedja teh virusnih sevov, ki so dostopna v genski banki, so nekoliko krajsa od nukleotidnih zaporedij, ki smo jih v naši raziskavi določili slovenskim sevom SRLV. Ker smo želeli slovenske seve SRLV primerjati tudi s sevi SRLV iz Poljske, smo nukleotidna zaporedja poravnali, kot je opisano zgoraj, in v poravnavo vključili tudi seve SRLV iz Poljske. Poravnana nukleotidna zaporedja smo porezali in pridobili 360 nukleotidov dolgo (vključno z delecijami) poravnavo zaporedij, ki kodira le del proteina MA, na podlagi katere smo izračunali matriko genetskih razdalj in pripravili filogensko analizo, kot je opisano zgoraj. Na filogenetskem drevesu smo odkrili, da slovenskih sevov SRLV ne uvrščamo niti v podtip A12 niti v podtip A13, kamor spadajo sevi SRLV iz Poljske (ni prikazano). Gruča slovenskih virusnih sevov, s katerimi so okužene ovce iz reje 35 in reje 36, se v povprečju razlikuje od podtipa A12 za 15 % in od podtipa A13 za 14,8 %. Podskupina 6 slovenskih virusnih sevov, s katerimi so okužene koze iz reje 2, pa se v povprečju razlikuje od podtipa A12 za 18,9 % in od podtipa A13 za 19,5 %.

Ko smo analizirali 444 nukleotidov dolgo poravnava zaporedij, smo pri sevu 37-85g odkrili 12 nukleotidov dolgo insercijo, ki ustreza mestu od 923 do 934 na genomu referenčnega seva CAEV Cork. Ta insercija pa ne vpliva na filogenetski odnos tega seva do drugih sevov SRLV, ki so prisotni v isti rejji, saj na filogenetskem drevesu tvorijo eno skupno gručo.

Tabela 4-5: Genetske razdalje v genu *gagMA*. Prikazane so razdalje med skupinami slovenskih sevov SRLV iz izbranih šestih rej in skupinami podtipov v genetskih skupinah A in B ter genetskih skupin C in E. Genetske razdalje so izračunane z modelom *p*-distance in izražene v odstotkih.

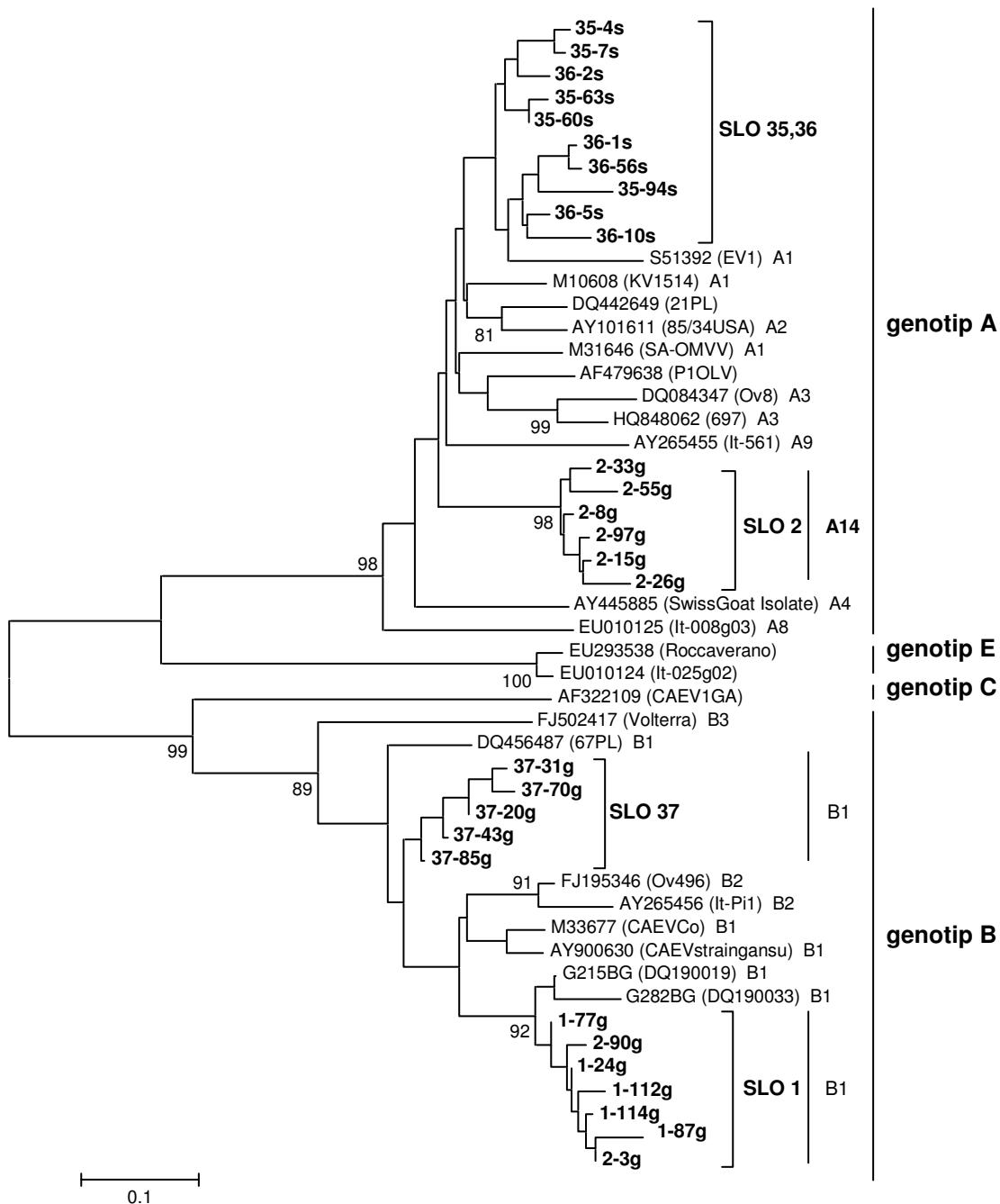
Table 4-5: The genetic distances of the *gagMA* gene comparing groups of Slovenian SRLV strains from selected 6 farms to groups of subtype A and B SRLV strains and genotype C, D and E SRLV strains. The genetic distances were computed using *p*-distance model and are presented as a mean value and expressed as percentage.

| Genotip oz. podtip | Reja 1 | Reja 37 | Reja 2 | Reja 35 in 36 |
|--------------------|--------|---------|--------|---------------|
| A1                 | 37,9   | 36,5    | 18,3   | 13,3          |
| A2                 | 40,4   | 39,4    | 17,7   | 13,7          |
| A3                 | 35,9   | 35,5    | 20,9   | 17,2          |
| A4                 | 37,7   | 36,6    | 20,5   | 17,0          |
| A8                 | 39,5   | 37,8    | 21,9   | 20,5          |
| A9                 | 40,4   | 37,8    | 20,0   | 18,2          |
| P1OLV              | 39,2   | 37,8    | 18,9   | 14,6          |
| B1                 | 11,3   | 12,3    | 37,2   | 38,0          |
| B2                 | 16,5   | 13,8    | 37,4   | 37,7          |
| B3                 | 20,1   | 21,6    | 38,1   | 36,3          |
| C                  | 31,5   | 29,2    | 38,6   | 38,6          |
| E                  | 37,0   | 36,6    | 32,8   | 32,3          |

Tabela 4-6: Matrika genetskih razdalj v genu *gagMA* med skupinami slovenskih sevov SRLV iz izbranih šestih rej. Genetske razdalje so izračunane z modelom *p*-distance in izražene v odstotkih.

Table 4-6: The genetic distances matrix of the *gagMA* gene between groups of Slovenian SRLV strains from selected six farms. The genetic distances were computed using *p*-distance model and are expressed as percentage.

|               | Reja 1 | Reja 37 | Reja 2 | Reja 35 in 36 |
|---------------|--------|---------|--------|---------------|
| Reja 1        |        | 15,5    | 37,1   | 37,8          |
| Reja 37       |        | 15,5    | 36,3   | 37,1          |
| Reja 2        |        | 37,1    | 36,3   | 15,9          |
| Reja 35 in 36 |        | 37,8    | 37,1   | 15,9          |



Slika 4-4: Filogenetsko drevo v genu *gagMA* po metodi NJ, 1000 samovzorčenj. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami po modelu Tamura-Nei z uporabo parametra  $\alpha$ . Merilo prikazuje razmerje med številom substitucij in dolžino vej. Prikazane so statistične podpore posameznih cepitev, ki so večje od 60. Slovenski sevi SRLV so označeni krepko. Imena slovenskih sevov SRLV so prikazana s številko reje in številko živali ter vrsto živali (s, ovca, angl. sheep; g, koza, angl. goat). Sevi, pridobljeni iz genske banke, so označeni s kodo GenBank in imenom seva v oklepaju, ki mu sledi oznaka podtipa, v katerega je sev uvrščen.

Figure 4-4: NJ phylogenetic tree of the *gagMA* gene, 1000 replicates. Branch lengths are proportional to genetic distances and were computed using Tamura-Nei gamma distance model. Scale bar presents the proportion between the number of substitutions and branch length. Only bootstrap values above 60 are shown. Sequences from this study are shown in bold and their sequence names are indicated by farm origin and animal number, followed by the animal species (s, sheep; g, goat). Database derived sequences are indicated by GenBank accession numbers and sequence names in parenthesis, followed by the subtype affiliation.

#### 4.4.2 Filogenetske analize odseka na genu *pol*

Nukleotidno zaporedje odseka na genu *pol* (regiji 1,2 kb *pol*) smo določili 76 sevom SRLV ter izvedli poravnavo zaporedij po postopku, opisanem pod točko 4.4.1, v katero smo vključili tudi 27 nukleotidnih zaporedij sevov SRLV, dostopnih v genski banki. Pridobili smo 1104 nukleotidov dolgo (vključno z delecijami) poravnavo zaporedij. Parameter  $\alpha$  smo izračunali s programom PhyML z metodo ML. Njegova vrednost je bila 0,73.

Matriko genetskih razdalj smo izračunali, kot je opisano pod točko 4.4.1. Genetske razdalje smo izrazili, kot je opisano pod točko 4.4.1 (Tabela 4-7 in Tabela 4-8).

Filogenetska drevesa smo izračunali na podlagi 103 poravnanih nukleotidnih zaporedij. Filogenetska drevesa smo pripravili, kot je opisano pod točko 4.4.1. Topologiji obeh dreves sta bili podobni. Prikazano je filogenetsko drevo, ki smo ga pripravili z uporabo metode NJ. Na drevesu smo zaradi poenostavitve prikazali le po 5 virusnih sevov iz posameznih rej, in sicer iz reje 1, reje 2, reje 35, reje 36 in reje 37 (Slika 4-5).

Filogenetska analiza regije 1,2 kb *pol* je potrdila uvrstitev slovenskih virusnih sevov SRLV, ki so prisotni v dveh rejah koz (reja 1 in reja 37), in 2 seva iz reje 2, v genetsko skupino B in obstoj dveh gruč teh virusnih sevov znotraj podtipa B1. Eno gručo tvorita dva seva iz reje 2 skupaj s sevi iz reje 1, ki ima v regiji 1,2 kb *pol* visoko statistično podporo z vrednostjo 98. Virusni sevi znotraj te gruče se v tej regiji med seboj v povprečju razlikujejo za 3,7 %. Ta gruča virusnih sevov je najbolj sorodna virusnim sevom podtipa B1 in se od njih v povprečju razlikuje za 11,0 %. Ta gruča virusnih sevov pa je znotraj genetske skupine B najbolj oddaljena od podtipa B3, od katerega se v povprečju razlikuje za 23,8 %. Drugo gručo znotraj

podtipa B1 tvorijo virusni sevi iz reje 37, ki ima v regiji 1,2 kb *pol* visoko statistično podporo z vrednostjo 99. Ti virusni sevi se med seboj v povprečju razlikujejo za 3,8 %. Od najbolj sorodnih virusnih sevov podtipa B1 se v povprečju razlikuje za 12,6 %. Gruča teh virusnih sevov je znotraj genetske skupine B najbolj oddaljena od podtipa B3, od katerega se v povprečju razlikuje za 23,5 %. Gruči slovenskih sevov SRLV znotraj podtipa B1 se v regiji 1,2 kb *pol* med seboj v povprečju razlikujeta za 8,2 %. Na filogenetskem drevesu regije 1,2 kb *pol* smo odkrili, da en virusni sev (37-88g), s katerimi je okužena koza iz reje 37, spada v genetsko skupino A. Provirusne DNA tega virusnega seva na odseku gena *gag* nismo uspeli pomnožiti. Virusni sev 37-88g se je od gruče ostalih virusnih sevov, s katerimi so okužene koze v reji 37 in spadajo v genetsko skupino B, v povprečju razlikoval za 24,5 %. V primerjavi z ostalimi virusnimi sevi znotraj genetske skupine A je virusni sev 37-88g najbolj soroden podtipoma A2 in A3, od katerih se v povprečju razlikuje za 15,2 % (A2) in 15,8 % (A3) ter najbolj oddaljen od podtipa A1, od katerega se v povprečju razlikuje za 19,8 %.

Izmed 6 virusnih sevov, s katerimi so okužene koze iz reje 2 in so v filogenetskem drevesu gena *gag* tvorile lastno podskupino znotraj genetske skupine A, smo v regiji 1,2 kb *pol* uspešno pomnožili provirusno DNA le enega seva (2-97g). Podskupine teh virusnih sevov, ki so se v genu *gagMA* od najbolj sorodnega podtipa A2 v povprečju razlikovali za 17,7 %, nismo mogli uvrstiti v nobenega izmed že znanih podtipov znotraj genetske skupine A. Prav tako smo virusni sev 2-97g v regiji 1,2 kb *pol* uvrstili v genetsko skupino A, znotraj katere je najbolj soroden sevom podtipa A2, od katerih se v povprečju razlikuje za 16,3 %. Znotraj genetske skupine A pa je sev 2-97g najbolj oddaljen od podtipa A1, od katerega se v povprečju razlikuje za 19,9 %. Tudi v regiji 1,2 kb *pol* tega virusnega seva ne moremo uvrstiti v nobenega izmed že znanih podtipov znotraj genetske skupine A.

Tudi na podlagi filogenetske analize v regiji 1,2 kb *pol* smo ugotovili, da slovenske seve SRLV, ki so prisotni v dveh rejah ovac (reja 35 in reja 36), uvrščamo v genetsko skupino A. Ti virusni sevi tvorijo eno gručo, ki ima v genu *pol* visoko statistično podporo z vrednostjo 100 in se v tej regiji med seboj v povprečju razlikujejo za 3,3 %. V tej regiji so najbolj sorodni virusnim sevom podtipa A5, od katerega se v povprečju razlikujejo za 14,1 %. Znotraj genetske skupine A pa je gruča teh sevov najbolj oddaljena od podtipa A3, od

katerega se v povprečju razlikuje za 19,3 %. Ta gruča slovenskih virusnih sevov se od seva 2-97g v povprečju razlikuje za 19,8 %, od seva 37-88g pa za 21,9 %.

V regiji 1,2 kb *pol* smo uspeli pomnožiti tudi provirusno DNA 4 virusnih sevov, s katerimi so okužene ovce v reji 31. V filogenetskem drevesu so se ti virusni sevi uvrstili v genetsko skupino A, znotraj katere tvorijo lastno podskupino z visoko statistično podporo z vrednostjo 100. Ti virusni sevi se med seboj v povprečju razlikujejo za 1,3 % in jih ne moremo uvrstiti v nobenega izmed že znanih podtipov znotraj genetske skupine A. Podskupina teh virusnih sevov se od vseh ostalih virusnih sevov genetske skupine A, ki so dostopni v genski banki, in tudi slovenskih virusnih sevov znotraj te genetske skupine razlikuje od 21,0 % do 23,4 %.

V filogenetsko analizo regije 1,2 kb *pol* smo vključili tudi seve SRLV s Finskega in iz Španije, ki spadajo v genetsko skupino A, vendar niso uvrščeni v noben podtip znotraj te genetske skupine. Slovenski sevi SRLV, uvrščeni v genetsko skupino A, se od teh v povprečju razlikujejo od 17,6 % do 23,1 %.

Tabela 4-7: Genetske razdalje v regiji 1,2 kb *pol*. Prikazane so razdalje med skupinami slovenskih sevov SRLV iz izbranih šestih rej in skupinami podtipov v genetskih skupinah A in B ter genetskih skupin C, D in E. Genetske razdalje so izračunane z modelom *p*-distance in izražene v odstotkih.

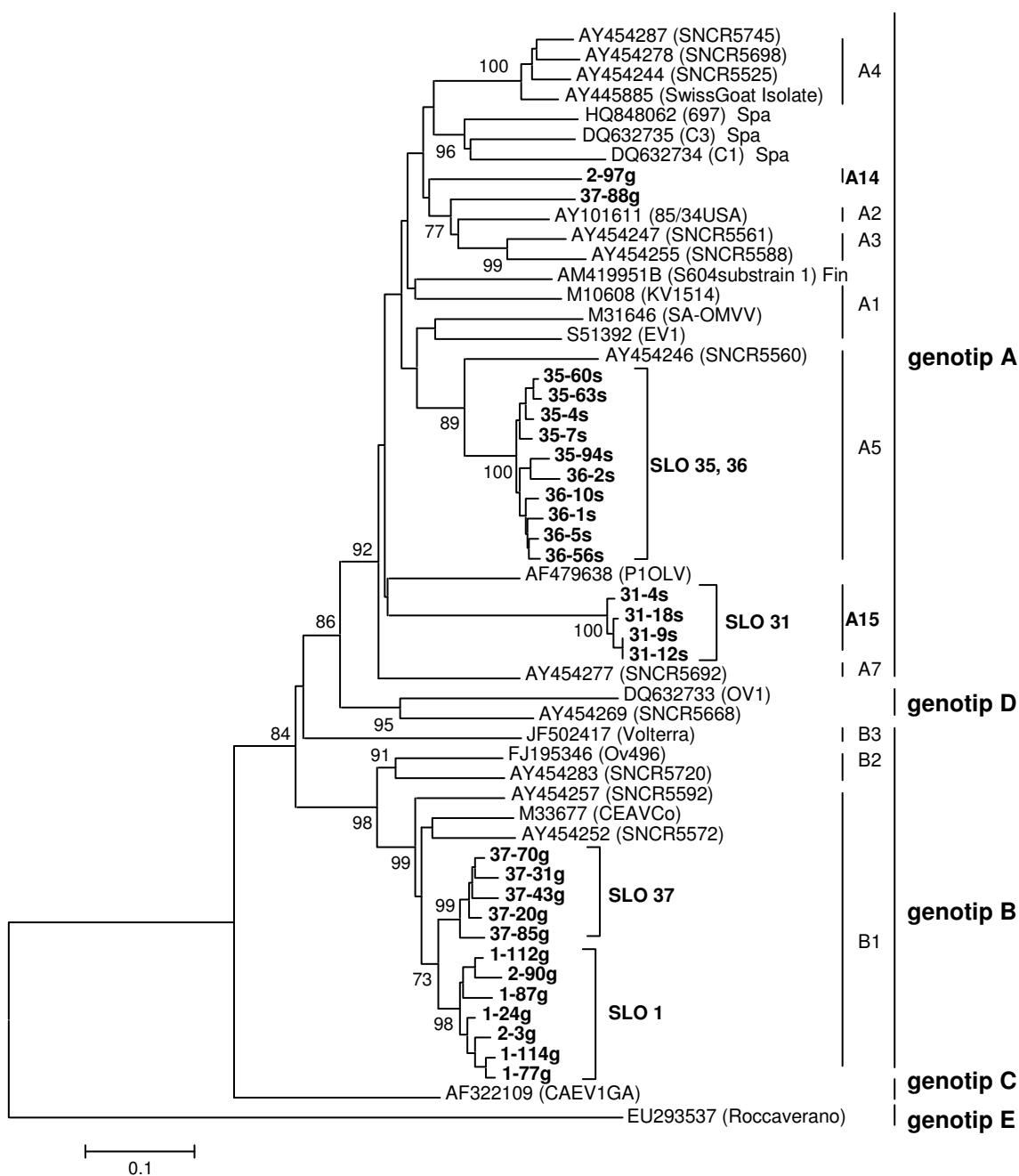
Table 4-7: The genetic distances of the 1.2 kb *pol* fragment comparing groups of Slovenian SRLV strains from selected six farms to groups of subtype A and B SRLV strains and genotype C, D and E SRLV strains. The genetic distances were computed using *p*-distance model and are presented as a mean value and expressed as percentage.

| Genotip oz.<br>podtip | Reja 1 | Reja 37 | 37-88g | 2-97g | Reja 31 | Reja 35 in 36 |
|-----------------------|--------|---------|--------|-------|---------|---------------|
| A1                    | 24,8   | 24,7    | 19,8   | 19,9  | 23,0    | 17,5          |
| A2                    | 23,3   | 23,1    | 15,2   | 16,3  | 23,2    | 18,2          |
| A3                    | 23,5   | 23,5    | 15,8   | 17,7  | 23,1    | 19,3          |
| A4                    | 23,9   | 24,0    | 17,5   | 18,7  | 22,9    | 18,7          |
| A5                    | 24,4   | 23,7    | 18,4   | 17,4  | 22,5    | 14,1          |
| A7                    | 24,3   | 23,7    | 18,0   | 18,1  | 22,3    | 18,7          |
| P1OLV                 | 24,0   | 24,3    | 18,1   | 18,8  | 21,0    | 18,2          |
| Španija               | 24,0   | 24,3    | 18,4   | 19,7  | 23,1    | 19,3          |
| Finska                | 24,5   | 25,3    | 18,9   | 18,1  | 22,8    | 17,6          |
| D                     | 23,9   | 24,5    | 24,2   | 23,8  | 25,3    | 23,8          |
| B1                    | 11,0   | 12,6    | 25,5   | 24,8  | 26,8    | 24,6          |
| B2                    | 15,7   | 16,8    | 24,4   | 24,5  | 26,6    | 23,7          |
| B3                    | 23,8   | 23,5    | 24,3   | 24,8  | 26,1    | 25,0          |
| C                     | 25,7   | 26,0    | 26,8   | 26,2  | 28,4    | 26,8          |
| E                     | 38,8   | 38,2    | 40,0   | 39,2  | 40,8    | 39,1          |

Tabela 4-8: Matrika genetskih razdalj v regiji 1,2 kb *pol* med skupinami slovenskih sevov SRLV iz izbranih šestih rej. Genetske razdalje so izračunane z modelom *p*-distance in izražene v odstotkih.

Table 4-8: The genetic distances matrix of the 1.2 kb *pol* fragment between groups of Slovenian SRLV strains from selected six farms. The genetic distances were computed using *p*-distance model and are expressed as percentage.

|               | Reja 1 | Reja 37 | 37-88g | 2-97g | Reja 31 | Reja 35 in 36 |
|---------------|--------|---------|--------|-------|---------|---------------|
| Reja 1        |        | 8,2     | 23,7   | 25,1  | 26,6    | 23,8          |
| Reja 37       |        | 8,2     | 24,5   | 24,2  | 26,9    | 23,5          |
| 37-88g        |        | 23,7    | 24,5   | 18,4  | 23,4    | 21,9          |
| 2-97g         |        | 25,1    | 24,2   | 18,4  | 23,4    | 19,8          |
| Reja 31       |        | 26,6    | 26,9   | 23,4  |         | 21,9          |
| Reja 35 in 36 |        | 23,8    | 23,5   | 21,9  | 19,8    | 21,9          |



Slika 4-5: Filogenetsko drevo v regiji 1,2 kb *pol* po metodi NJ, 1000 samovzorčenj. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami po modelu Tamura-Nei z uporabo parametra  $\alpha$ . Merilo prikazuje razmerje med številom substitucij in dolžino vej. Prikazane so statistične podpore posameznih cepitev, ki so večje od 60. Slovenski sevi SRLV so označeni krepko. Imena slovenskih sevov SRLV so prikazana s številko reje in številko živali ter vrsto živali (s, ovca, angl. sheep; g, koza, angl. goat). Sevi, pridobljeni iz genske banke, so označeni s kodo GenBank in imenom seva v oklepaju, ki mu v primeru, da ni uvrščen v podtip, sledi oznaka države (Spa: Španija, Fin: Finska).

Figure 4-5: NJ phylogenetic tree of the 1.2 kb *pol* fragment, 1000 replicates. Branch lengths are proportional to genetic distances and were computed using Tamura-Nei gamma distance model. Scale bar presents the

proportion between the number of substitutions and branch length. Only bootstrap values above 60 are shown. Sequences from this study are shown in bold and their sequence names are indicated by farm origin and animal number, followed by the animal species (s, sheep; g, goat). Database derived sequences are indicated by GenBank accession numbers and sequence names in parenthesis, followed by the subtype affiliation or with country abbreviations (Fin: Finland, Spa: Spain).

## **4.5 Rezultati razvoja metode PCR v realnem času za določanje CAEV in MVV**

Za sočasno določanje CAEV in MVV in razlikovanje med njimi smo zasnovali metodo PCR v realnem času, ki je sestavljena iz dveh testov: test CAEV za specifično določanje SRLV genetske skupine B in test MVV za specifično določanje SRLV genetske skupine A. Testa za določanje CAEV in MVV smo zasnovali na odseku gena *gagMA*.

### **4.5.1 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sond ter optimizacija metode PCR v realnem času**

Izbrali smo en par začetnih oligonukleotidov in sond (Tabela 3-7), ki so specifični za CAEV oziroma genetsko skupino B (test CAEV), s katerimi pomnožujemo 113 nukleotidov dolg odsek. Izbrali smo 3 pare začetnih oligonukleotidov in sond, ki so specifični za MVV oziroma genetsko skupino A (test MVV). Na podlagi optimizacije testa MVV smo nato izbrali en par začetnih oligonukleotidov (Tabela 3-8), s katerim smo dosegli najbolj optimalno pomnoževanje odseka v dolžini 101 nukleotid. Ker smo obe sondi TaqMan označili s fluorescentnim poročevalskim barvilm FAM, je razlikovanje med virusi MVV in CAEV mogoče le z izvedbo v dveh ločenih jamicah. Prav tako smo oba testa optimizirali tako, da je omogočeno sočasno določanje virusov MVV in CAEV, in sicer z izbiro enakih temperturnih pogojev pomnoževanja.

Po postopku optimizacije smo za oba testa izbrali najuspešnejše kombinacije koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond. Za test CAEV smo izbrali 600 nM koncentracijo pozitivno usmerjenega začetnega oligonukleotida CAEVMA F, 400 nM koncentracijo negativno usmerjenega začetnega oligonukleotida CAEVMA R in 200 nM koncentracijo sonde CAEV MA. Za test MVV smo izbrali 800 nM koncentracijo pozitivno in negativno usmerjenega

začetnega oligonukleotida MVVMA F1 in MVVMA R3 in 150 nM koncentracijo sonde MVV MA. Za oba testa smo izbrali enako temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov in podaljševanja verige DNA, in sicer 56 °C.

## 4.5.2 Rezultati vrednotenja razvite metode PCR v realnem času

### 4.5.2.1 Analitična specifičnost in občutljivost

S testom CAEV smo uspešno pomnožili referenčni virusni sev CAEV Co, virusni sev podtipa B2 in dva slovenska virusna seva podtipa B1. S testom MVV smo uspešno pomnožili referenčni virusni sev MVV 1514, virusna seva podtipov A3, A4 in slovenske virusne seve 4 različnih podtipov genetske skupine A. Ko smo produkte pomnoževanja preverili na 2-odstotnem agaroznem gelu, smo ugotovili, da so specifične velikosti. Tudi določena nukleotidna zaporedja produktov so bila specifična.

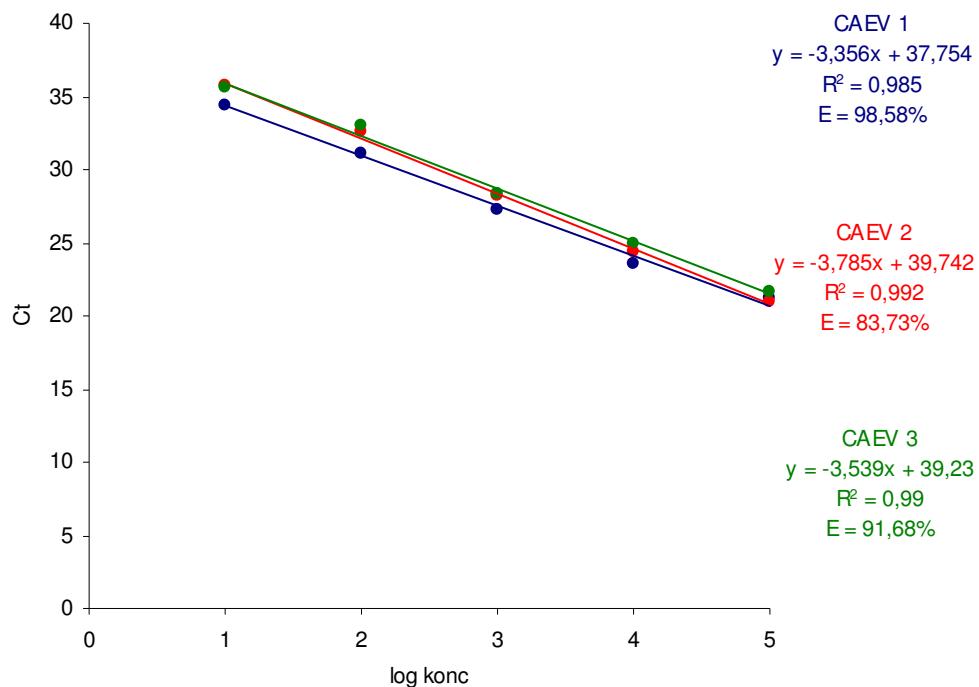
Za preverjanje specifičnosti obeh testov smo seve CAEV in MVV navzkrižno testirali. Seve CAEV smo testirali s testom MVV in seve MVV s testom CAEV. V obeh testiranjih nismo zaznali pomnoževanja DNA SRLV.

Mejo detekcije smo pri obeh testih določili s plazmidom, v katerega smo vstavili ustrezен produkt PCR. Občutljivost testa CAEV je bila 26 molekul plazmidne DNA. Občutljivost testa MVV je bila 72 molekul plazmidne DNA.

### 4.5.2.2 Učinkovitost reakcije

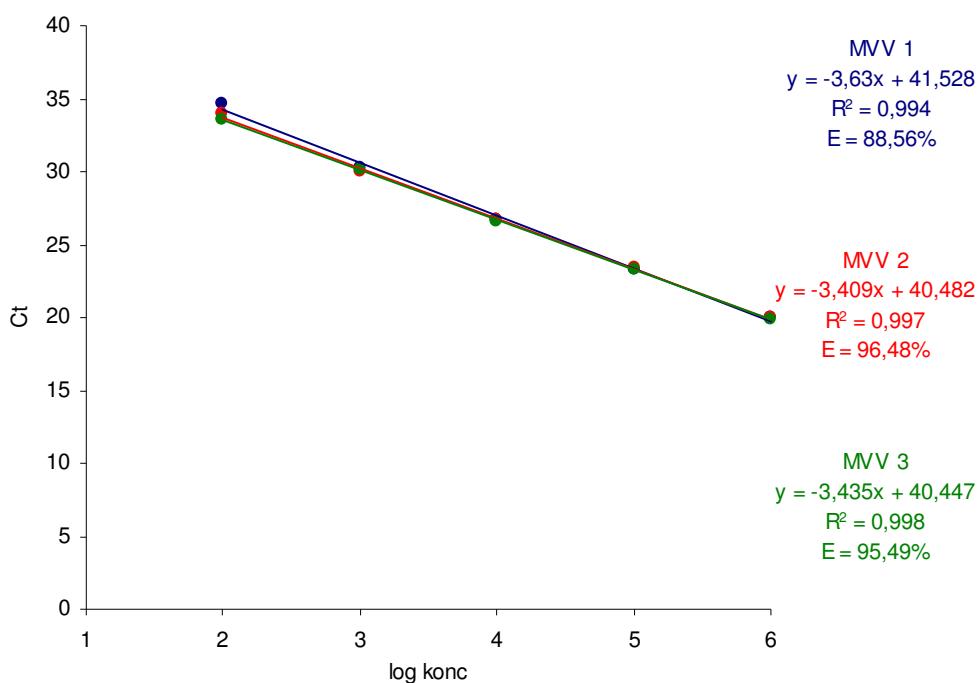
Za vse tri ponovitve testa CAEV in testa MVV, ki smo jih izvedli z izolirano DNA referenčnih sevov virusov MVV 1514 in CAEV Co, smo pridobili standardno krivuljo, iz katere smo dobili naklon ( $s$ ) in koeficient korelacije ( $R^2$ ) linearne regresijske premice, ter izračunali učinkovitost pomnoževanja ( $E$ ). Učinkovitost pomnoževanja testa CAEV je bila od 83,73 do 98,58-odstotna,  $R^2$  pa je bil višji od 0,985. Reakcija je bila linearna v območju vseh zaporednih redčin (Slika 4-6). Učinkovitost pomnoževanja testa MVV je bila od 88,56 do

96,48-odstotna,  $R^2$  pa je bil višji od 0,994. Reakcija je bila linearna v območju vseh zaporednih redčin (Slika 4-7).



Slika 4-6: Linearne regresijske premice redčin izolirane DNA referenčnega seva CAEV Co za tri ponovitve testa CAEV.

Figure 4-6: Linear regression lines derived from 3 repeats of serial dilutions of reference virus strain CAEV Co DNA using the CAEV assay.



Slika 4-7: Linearne regresijske premice redčin izolirane DNA referenčnega seva MVV KV1514 za tri ponovitve testa MVV.

Figure 4-7: Linear regression lines derived from 3 repeats of serial dilutions of reference virus strain MVV KV1514 DNA using the MVV assay.

#### 4.5.2.3 Ponovljivost in obnovljivost reakcije

Za vse tri ponovitve testa CAEV in testa MVV, ki smo jih izvedli z izolirano DNA referenčnih sevov MVV 1514 in CAEV Co, smo izračunali koeficiente variacije (KV) za vsako posamezno redčino znotraj enega testiranja in med testiranjami.

Koeficienti variacije znotraj treh posameznih poskusov za test MVV so bili za posamezne serijske redčine do redčine  $10^{-3}$  nižji od 10 %. Pri največji redčini  $10^{-4}$ , ki ustreza teoretičnemu številu kopij 100, pa so v dveh poskusih presegli 34 %. V enem poskusu je bil tudi v neredčenem vzorcu KV nekoliko višji, in sicer 23,29 %. Ti rezultati kažejo na dobro ponovljivost reakcije, razen v dveh poskusih pri največji redčini, pri kateri je bila ponovljivost nekoliko slabša (Tabela 4-9). Koeficient variacije za test MVV za posamezne redčine med testiranjami ni presegel 30 % in kaže na dobro obnovljivost reakcij med testiranjami (Tabela 4-10).

Tabela 4-9: Lastnosti delovanja testa MVV znotraj posameznih testiranj.

Table 4-9: Intra-assay performance of the MVV assay.

| Test MVV                |           |                 |                                      |               |
|-------------------------|-----------|-----------------|--------------------------------------|---------------|
| Teoretično<br>št. kopij | Redčina   | Povprečni<br>Ct | Povprečno<br>izračunano<br>št. kopij | KV %          |
| Poskus 1                |           |                 |                                      |               |
| $10^6$                  | /         | 20              | 853389                               | <b>8,67%</b>  |
| $10^5$                  | $10^{-1}$ | 23,29           | 105939                               | <b>9,25%</b>  |
| $10^4$                  | $10^{-2}$ | 26,69           | 12190                                | <b>3,14%</b>  |
| $10^3$                  | $10^{-3}$ | 30,29           | 1248                                 | <b>6,60%</b>  |
| $10^2$                  | $10^{-4}$ | 34,65           | 83                                   | <b>37,84%</b> |
| Poskus 2                |           |                 |                                      |               |
| $10^6$                  | /         | 20,04           | 1008108                              | <b>23,29%</b> |
| $10^5$                  | $10^{-1}$ | 23,40           | 102693                               | <b>9,62%</b>  |
| $10^4$                  | $10^{-2}$ | 26,66           | 11365                                | <b>1,43%</b>  |
| $10^3$                  | $10^{-3}$ | 30,07           | 1136                                 | <b>5,75%</b>  |
| $10^2$                  | $10^{-4}$ | 34,01           | 79                                   | <b>1,35%</b>  |
| Poskus 3                |           |                 |                                      |               |
| $10^6$                  | /         | 19,83           | 1007657                              | <b>7,96%</b>  |
| $10^5$                  | $10^{-1}$ | 23,32           | 97177                                | <b>9,14%</b>  |
| $10^4$                  | $10^{-2}$ | 26,64           | 10483                                | <b>7,21%</b>  |
| $10^3$                  | $10^{-3}$ | 30,16           | 990                                  | <b>7,14%</b>  |
| $10^2$                  | $10^{-4}$ | 33,59           | 103                                  | <b>34,05%</b> |

Tabela 4-10: Lastnosti delovanja testa MVV med testiranjem.

Table 4-10: Inter-assay performance of the MVV assay.

| Test MVV                |           |                 |                                      |               |
|-------------------------|-----------|-----------------|--------------------------------------|---------------|
| Teoretično<br>št. kopij | Redčina   | Povprečni<br>Ct | Povprečno<br>izračunano<br>št. kopij | KV %          |
| $10^6$                  | /         | 19,96           | 956385                               | <b>15,76%</b> |
| $10^5$                  | $10^{-1}$ | 23,34           | 101936                               | <b>8,93%</b>  |
| $10^4$                  | $10^{-2}$ | 26,66           | 11223                                | <b>8,03%</b>  |
| $10^3$                  | $10^{-3}$ | 30,17           | 1125                                 | <b>11,44%</b> |
| $10^2$                  | $10^{-4}$ | 34,08           | 88                                   | <b>29,45%</b> |

Koeficienti variacije treh posameznih poskusov za test CAEV so bili v primerjavi s testom MVV višji in kažejo na nekoliko slabšo ponovljivost. Koeficient variacije znotraj treh posameznih poskusov za test CAEV je bil pri večini serijskih redčin vseh treh poskusov višji

od 15 % in je dosegel tudi skoraj 40 %. Pri največji redčini  $10^{-4}$ , ki ustreza teoretičnemu številu kopij 10, pa je v dveh poskusih presegel 46 %. Ti rezultati kažejo na slabšo ponovljivost reakcije (Tabela 4-11). Koeficient variacije za test CAEV za posamezne redčine med testiranji do redčine  $10^{-2}$  ni presegel 28 % in v območju teh redčin kaže na dobro obnovljivost reakcij med testiranji (Tabela 4-12). Pri redčinah  $10^{-3}$  in  $10^{-4}$  pa je bil KV 35,18 % in 36,03 %, kar kaže na nekoliko slabšo obnovljivost med testiranji.

Tabela 4-11: Lastnosti delovanja testa CAEV znotraj posameznih testiranj.

Table 4-11: Intra-assay performance of the CAEV assay.

| Test CAEV               |           |                 |                                      |              |
|-------------------------|-----------|-----------------|--------------------------------------|--------------|
| Teoretično<br>št. kopij | Redčina   | Povprečni<br>Ct | Povprečno<br>izračunano<br>št. kopij | KV %         |
| Poskus 1                |           |                 |                                      |              |
| $10^5$                  | /         | 21,22           | 87689                                | <b>38,76</b> |
| $10^4$                  | $10^{-1}$ | 23,55           | 17265                                | <b>18,81</b> |
| $10^3$                  | $10^{-2}$ | 27,33           | 1463                                 | <b>13,65</b> |
| $10^2$                  | $10^{-3}$ | 31,15           | 66                                   | <b>39,76</b> |
| 10                      | $10^{-4}$ | 34,4            | 11                                   | <b>46,69</b> |
| Poskus 2                |           |                 |                                      |              |
| $10^5$                  | /         | 20,96           | 94514                                | <b>31,38</b> |
| $10^4$                  | $10^{-1}$ | 24,41           | 11326                                | <b>17,53</b> |
| $10^3$                  | $10^{-2}$ | 28,16           | 1160                                 | <b>20,64</b> |
| $10^2$                  | $10^{-3}$ | 32,58           | 79                                   | <b>17,85</b> |
| 10                      | $10^{-4}$ | 35,73           | 13                                   | <b>58,26</b> |
| Poskus 3                |           |                 |                                      |              |
| $10^5$                  | /         | 21,71           | 92044                                | <b>30,09</b> |
| $10^4$                  | $10^{-1}$ | 24,91           | 11230                                | <b>16,01</b> |
| $10^3$                  | $10^{-2}$ | 27,94           | 1193                                 | <b>3,18</b>  |
| $10^2$                  | $10^{-3}$ | 33,06           | 55                                   | <b>1,84</b>  |
| 10                      | $10^{-4}$ | 35,56           | 11                                   | <b>2,3</b>   |

Tabela 4-12: Lastnosti delovanja testa CAEV med testiranji.

Table 4-12: Inter-assay performance of the CAEV assay.

| Test CAEV               |                  |                 |                                      |              |
|-------------------------|------------------|-----------------|--------------------------------------|--------------|
| Teoretično<br>št. kopij | Redčina          | Povprečni<br>Ct | Povprečno<br>izračunano<br>št. kopij | KV %         |
| 10 <sup>5</sup>         | /                | 21,39           | 91881                                | <b>27,61</b> |
| 10 <sup>4</sup>         | 10 <sup>-1</sup> | 24,38           | 12775                                | <b>26,24</b> |
| 10 <sup>3</sup>         | 10 <sup>-2</sup> | 27,94           | 1213                                 | <b>13,19</b> |
| 10 <sup>2</sup>         | 10 <sup>-3</sup> | 32,07           | 80                                   | <b>35,18</b> |
| 10                      | 10 <sup>-4</sup> | 35,21           | 11                                   | <b>36,03</b> |

#### 4.5.2.4 Kontrola inhibicije

Z metodo PCR v realnem času smo za test MVV in za test CAEV testirali izolirane genomske DNA posameznih suspenzij levkocitov z dodanim virusom MVV oziroma CAEV. Vsak vzorec smo testirali v dveh ponovitvah. Za test MVV so bile vrednosti Ct od 25,01 do 25,45. Največja razlika med posameznimi vrednostmi je tako bila 0,44 Ct in KV je bil 0,42 %, kar kaže, da je bil postopek izolacije ustrezен in ni prišlo do inhibicije reakcije. Za test CAEV so bile vrednosti Ct od 27,09 do 27,31. Največja razlika med posameznimi vrednostmi je tako bila 0,22 Ct in KV je bil 0,20 %, kar kaže, da je bil postopek izolacije ustrezен in ni prišlo do inhibicije reakcije.

#### 4.5.3 Diagnostična specifičnost

Z novo razvito metodo PCR v realnem času smo s testom MVV in testom CAEV pregledali vzorce polne krvi živali iz treh rej, v katerih so bile vse živali seronegativne. V nobenem od vzorcev teh seronegativnih živali nismo pomnožili DNA SRLV. Ugotovili smo, da je novo razvita metoda PCR v realnem času 100-odstotno specifična.

#### 4.5.4 Rezultati testiranja metode PCR v realnem času na kliničnih vzorcih

Z novo razvito metodo PCR v realnem času za določanje MVV in CAEV smo pregledali vseh 323 vzorcev polne krvi seropozitivnih živali<sup>2</sup> iz šestih izbranih rej. Pregledali smo tudi pet vzorcev seronegativnih živali iz treh rej, v katerih smo z metodo LTR-PCR dokazali DNA SRLV, in en vzorec živali, katerega rezultat testa ELISA je bil neopredeljen in pri katerem z metodo LTR-PCR nismo dokazali DNA SRLV. Testirali smo tudi 51 vzorcev od serološko negativnih živali, pri katerih z metodo LTR-PCR nismo pomnožili DNA SRLV. Rezultati so predstavljeni v Tabeli 4-13, Tabeli 4-14 in Tabeli 4-15.

V reji 1 smo dokazali DNA SRLV v 89 vzorcih seropozitivnih koz, ki jih je v tej reji bilo 99, kar je 89,9 %. V reji 1 je bilo vseh živali 112, prisotnost DNA SRLV pa smo dokazali v 79,5 % vzorcev. V reji 2 s 40 seropozitivnimi kozami smo od le-teh prisotnost DNA SRLV dokazali v 27 vzorcih (67,5 %). V tej reji smo v enem vzorcu seronegativne živali z LTR-PCR pomnožili DNA SRLV. V tem vzorcu je tudi z metodo PCR v realnem času prišlo do pomnoževanja DNA SRLV. V reji 2 je bilo vseh živali 104, DNA SRLV pa smo dokazali v 28 vzorcih oziroma v 26,9 % vzorcev. V reji 31 s 4 seropozitivnimi ovcami smo dokazali DNA SRLV v vseh 4 vzorcih (100 %). V tej reji je bilo skupaj 39 živali in v 10,3 % vzorcev smo dokazali DNA SRLV. V reji 35 s 56 seropozitivnimi ovcami smo dokazali DNA SRLV v 41 vzorcih seropozitivnih živali (73,2 %). V 2 izmed 3 serološko neopredeljenih vzorcih živali v tej reji smo pomnožili DNA SRLV z LTR-PCR in PCR v realnem času. V 3 vzorcih seronegativnih živali smo pomnožili DNA SRLV z LTR-PCR in PCR v realnem času. V reji 35 je bilo 109 živali in v 46 vzorcih (42,2 %) smo dokazali DNA SRLV. V reji 36 z 38 seropozitivnimi ovcami smo dokazali DNA SRLV v 33 vzorcih seropozitivnih živali (86,8 %). V enem vzorcu živali, pri kateri je bil rezultat testa ELISA neopredeljen, smo pomnožili DNA SRLV z LTR-PCR in PCR v realnem času. DNA SRLV smo uspešno pomnožili z LTR-PCR in PCR v realnem času tudi pri enem vzorcu serološko negativne živali. V reji 36 je bilo 70 živali in v 35 vzorcih (50 %) smo dokazali DNA SRLV. V reji 37 s 83 seropozitivnimi kozami smo dokazali DNA SRLV v 57 vzorcih seropozitivnih živali (68,7 %). V tej reji je bilo 90 živali in v 63,3 % vzorcev smo dokazali DNA SRLV.

<sup>2</sup> Med serološko pozitivne živali smo uvrstili tudi tiste, pri katerih je bil rezultat testa ELISA neopredeljen in pri katerih smo potrdili prisotnost DNA SRLV z metodo LTR-PCR in z metodo PCR v realnem času.

V nobenem izmed 51 vzorcev seronegativnih živali nismo pomnožili DNA SRLV.

Tabela 4-13: Rezultat testiranj 380 vzorcev polne krvi z metodo PCR v realnem času v izbranih šestih rejah. Prikazano je število pozitivnih s testom MVV in testom CAEV v posameznih rejah.

Table 4-13: Real time PCR results of 380 whole blood samples in selected six farms. Number of positives with the MVV and CAEV assay in individual farms is shown.

| Oznaka reje | Št. pozitivnih s PCR v realnem času |                              |
|-------------|-------------------------------------|------------------------------|
|             | Št. pozitivnih s testom MVV         | Št. pozitivnih s testom CAEV |
| Reja 1      | /                                   | 89                           |
| Reja 2      | 25                                  | 3                            |
| Reja 31     | 4                                   | /                            |
| Reja 35     | 46                                  | /                            |
| Reja 36     | 35                                  | /                            |
| Reja 37     | 1                                   | 56                           |

(/) = nismo testirali

(/) = not tested

Tabela 4-14: Rezultat testiranj 380 vzorcev polne krvi z metodo PCR v realnem času v izbranih šestih rejah. Prikazano je število pozitivnih oziroma odstotek pozitivnih glede na število vseh živali.

Table 4-14: Real time PCR results of 380 whole blood samples in selected six farms. Number of positives or percentage of positives concerning the number of all animals is shown.

| Oznaka reje | Št. živali v rejji | Št. (%) pozitivnih s PCR v realnem času |
|-------------|--------------------|---|
| Reja 1      | 112                | 89 (79,5%)                              |
| Reja 2      | 104                | 28 (26,9%)                              |
| Reja 31     | 39                 | 4 (10,3%)                               |
| Reja 35     | 109                | 46 (42,2%)                              |
| Reja 36     | 70                 | 35 (50%)                                |
| Reja 37     | 90                 | 57 (63,3%)                              |

Tabela 4-15: Rezultat testiranj 380 vzorcev polne krvi z metodo PCR v realnem času v izbranih šestih rejah. Prikazano je število pozitivnih oziroma odstotek pozitivnih glede na število seropozitivnih živali in število pozitivnih oziroma odstotek pozitivnih, ki so bili seronegativni.

Table 4-15: Real time PCR results of 380 whole blood samples in selected six farms. Number of positives or percentage of positives concerning the number of seropositive animals and number of positives or percentage of positives concerning the number of seronegative animals is shown.

| Oznaka reje | Št. (%) pozitivnih z ELISA | Pozitivni z ELISA                       | Negativni z ELISA                       |
|-------------|----------------------------|---|---|
|             |                            | Št. (%) pozitivnih s PCR v realnem času | Št. (%) pozitivnih s PCR v realnem času |
| Reja 1      | 99                         | 89 (89,9%)                              | 0                                       |
| Reja 2      | 40                         | 27 (67,5%)                              | 1 (1%)                                  |
| Reja 31     | 4                          | 4 (100%)                                | 0                                       |
| Reja 35     | 58*                        | 43 (74,1%)                              | 3 (2,8%)                                |
| Reja 36     | 39*                        | 34 (87,2%)                              | 1 (1,4%)                                |
| Reja 37     | 83                         | 57 (68,7%)                              | 0                                       |

\* Med serološko pozitivne živali smo uvrstili tudi tiste, pri katerih je bil rezultat testa ELISA neopredeljen in pri katerih smo potrdili prisotnost DNA SRLV z metodo LTR-PCR in z metodo PCR v realnem času.

\* ELISA indeterminate animals which were LTR-PCR and real time PCR positive were classified as seropositive.

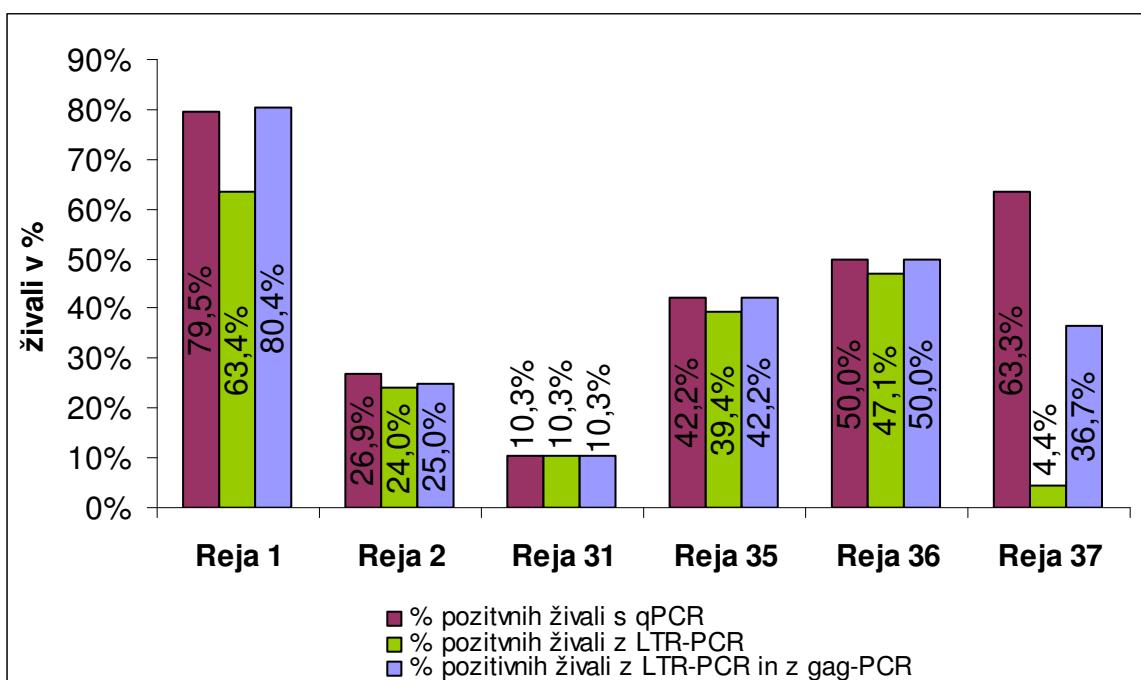
#### 4.5.4.1 Diagnostična občutljivost

Pregledali smo 323 vzorcev serološko pozitivnih živali oziroma 222 vzorcev serološko pozitivnih koz in 101 vzorec serološko pozitivnih ovac. Med serološko pozitivne živali smo uvrstili tudi tiste, pri katerih je bil rezultat testa ELISA neopredeljen in pri katerih smo potrdili DNA SRLV z metodo LTR-PCR in z metodo PCR v realnem času. Izmed vseh pregledanih vzorcev smo z novo razvito metodo PCR v realnem času DNA SRLV pomnožili v 254 vzorcih oziroma v 79 % vzorcev. S to metodo smo DNA SRLV pomnožili v 173 vzorcih koz (78 %) in v 81 vzorcih ovac (80 %).

#### 4.5.5 Primerjava metode PCR v realnem času z metodama LTR-PCR in gag-PCR

Primerjali smo rezultate metode PCR v realnem času z rezultati metode LTR-PCR in tudi s skupnimi rezultati metod LTR-PCR in gag-PCR (Slika 4-8). V reji 1 smo z metodo PCR v realnem času dokazali nukleinsko kislino SRLV v 16,1 % več vzorcih kot z metodo LTR-

PCR, medtem ko smo skupaj z metodama LTR-PCR in *gag*-PCR dokazali 0,9 % več pozitivnih vzorcev kot z metodo PCR v realnem času. V reji 2 smo z metodo PCR v realnem času ugotovili 2,9 % več pozitivnih vzorcev kot z metodo LTR-PCR in 1,9 % več pozitivnih vzorcev kot z obema metodama LTR-PCR in *gag*-PCR skupaj. V reji 31 smo z vsemi metodami dokazali enako število pozitivnih vzorcev. V reji 35 smo z metodo PCR v realnem času dokazali 2,8 % več pozitivnih vzorcev kot z metodo LTR-PCR, medtem ko smo skupaj z metodama LTR-PCR in *gag*-PCR dokazali enako število pozitivnih vzorcev kot z metodo PCR v realnem času. V reji 36 smo z metodo PCR v realnem času ugotovili 2,9 % več pozitivnih vzorcev kot z metodo LTR-PCR in enako število pozitivnih vzorcev kot z obema metodama LTR-PCR in *gag*-PCR skupaj. V reji 37 smo z metodo PCR v realnem času ugotovili 58,8 % več pozitivnih vzorcev kot z metodo LTR-PCR in 26,6 % več pozitivnih vzorcev kot z obema metodama LTR-PCR in *gag*-PCR skupaj.



Slika 4-8: Grafični prikaz primerjave rezultatov metode LTR-PCR, metod LTR-PCR in *gag*-PCR skupaj ter metode PCR v realnem času.

Figure 4-8: Graphical presentation of results comparing the LTR-PCR method and the LTR-PCR method together with the *gag*-PCR method with the real time PCR.

#### **4.5.6 Primerjava diagnostične občutljivosti metode PCR v realnem času z metodama LTR-PCR in gag-PCR**

Primerjali smo rezultate metode PCR v realnem času z rezultati metode LTR-PCR in tudi s skupnimi rezultati metod LTR-PCR in *gag*-PCR. Upoštevali smo odstotek vzorcev serološko pozitivnih živali, pri katerih smo pomnožili DNA SRLV. Med serološko pozitivne živali smo uvrstili tudi tiste, pri katerih je bil rezultat testa ELISA neopredeljen in pri katerih smo potrdili prisotnost DNA SRLV z metodo LTR-PCR in z metodo PCR v realnem času. Izmed vseh vzorcev serološko pozitivnih živali smo z novo razvito metodo PCR v realnem času DNA SRLV pomnožili v 79 % vzorcev. Z metodo LTR-PCR smo DNA SRLV pomnožili v 175 vzorcih oziroma v 54 % vzorcev, medtem ko smo skupaj z metodo LTR-PCR in metodo *gag*-PCR DNA SRLV pomnožili v 229 vzorcih oziroma v 71 % vzorcev. Novo razvita metoda PCR v realnem času je bila bolj občutljiva kot metoda LTR-PCR in tudi kot metodi LTR-PCR in *gag*-PCR skupaj.

## 5 RAZPRAVA

V diagnostiki SRLV se uporabljo predvsem serološke metode za dokaz specifičnih protiteles, med katerimi se v zadnjih letih najpogosteje uporablja test ELISA in manj pogosto tudi test AGID. Test ELISA in test AGID služita predvsem kot presejalna testa in sta edina testa, ki sta za določanje okužb z virusi SRLV predpisana s strani Mednarodnega urada za kužne bolezni (OIE) (OIE, 2008a). Nekateri laboratoriji uporabljajo v diagnostiki SRLV tudi test WB (Herrmann-Hoesing, 2010), ki služi kot potrditveni test. Skupina švicarskih raziskovalcev je razvila test SU5 ELISA. Ta poleg dokazovanja prisotnosti protiteles proti virusoma MVV in CAEV omogoča tudi serotipizacijo (Mordasini in sod., 2006). Ker lahko od okužbe živali do tvorbe specifičnih protiteles preteče tudi več mesecev, nekatere živali pa ostanejo tudi serološko negativne (Peterhans in sod., 2004), je za določanje živali, pozitivnih na SRLV, priporočljivo, da se poleg detekcije specifičnih protiteles dokaže tudi virus oziroma virusno nukleinsko kislino. Številni avtorji poročajo o uporabi metode PCR in RT-PCR za dokazovanje virusne nukleinske kisline. V zadnjem času se v diagnostiki SRLV uveljavlja tudi metoda PCR v realnem času (Herrmann-Hoesing, 2010).

V okviru doktorskega dela smo za ugotavljanje specifičnih protiteles proti SRLV kot presejalni test uporabili test ELISA. Pregledali smo vse serumske vzorce živali, vključene v raziskavo. S testom ELISA smo pregledali 1538 serumskih vzorcev živali iz 36 rej drobnice. Nato smo za nadaljnje raziskave izbrali 524 živali iz šestih rej, v katerih smo ugotovili seropozitivne živali, in sicer tri reje koz, dve reji ovac in eno mešano rejo. Vzorce polne krvi teh živali smo testirali s klasičnimi metodami PCR, da bi potrdili okužbo s SRLV. Najprej smo uporabili metodo LTR-PCR, s katero smo pregledali vzorce polne krvi vseh živali. Nato smo vzorce polne krvi seropozitivnih živali, v katerih z metodo LTR-PCR nismo uspeli pomnožiti DNA SRLV, pregledali še z metodo *gag*-PCR. Serumske vzorce seropozitivnih živali, pri katerih z obema prej omenjenima metodama PCR v vzorcih polne krvi nismo uspeli pomnožiti DNA SRLV, smo nato pregledali še s testom WB in testom SU5 ELISA. V izbranih šestih rejah smo opravili tudi filogenetske analize v odseku gena *gagMA* in odseku gena *pol*. Predvidevali smo, da so v Sloveniji prisotni sevi SRLV genetske skupine A in B, ter v izbranih šestih rejah s filogenetskimi analizami te genotipe SRLV tudi ugotovili. Razvili

smo novo metodo PCR v realnem času za specifično določanje MVV in CAEV in razlikovanje med njima. Začetne oligonukleotide in sonde smo na podlagi pridobljenih nukleotidnih zaporedij slovenskih sevov SRLV in sevov, pridobljenih iz genske banke, načrtovali v regiji gena *gagMA*. Novo razvito metodo smo testirali na vzorcih polne krvi živali iz izbranih šestih rej.

## 5.1 Serološki testi

S testom ELISA smo pregledali vseh 1538 serumskih vzorcev živali, ki smo jih vključili v raziskavo. Ugotovili smo, da je odstotek seropozitivnih koz (32,1 %) višji kot odstotek seropozitivnih ovac (24,8 %) ter da je odstotek rej koz, v katerih smo ugotovili seropozitivne živali (76,2 %), višji kot odstotek rej ovac (66,7 %) in mešanih rej (44,4 %), v katerih smo ugotovili seropozitivne živali. Tudi odstotek seropozitivnih živali v posameznih rejah je bil najvišji v rejah koz, in sicer je dosegel tudi 92,2 % (Slika 4-1). V posameznih rejah ovac je bil najvišji odstotek seropozitivnih živali 55 % (Slika 4-2), medtem ko je v mešanih rejah dosegel le 10,5 % (Slika 4-3). Rezultat testa ELISA je bil neopredeljen pri petih živalih v dveh rejah koz (Slika 4-1), pri štirih živalih v dveh rejah ovac (Slika 4-2) in pri eni kozi v eni mešani rej (Slika 4-3). Neopredeljene rezultate testa ELISA pri štirih vzorcih smo z molekularnimi metodami potrdili pri treh vzorcih, rezultat vzorca ene živali pa je bil negativen. Prav tako je bil rezultat vzorca te živali negativen pri testiranju s testom WB in testom SU5 ELISA. V izbranih šestih rejah smo vse vzorce, pri katerih je bil rezultat testa ELISA pozitiven in pri katerih z molekularnimi metodami v vzorcih polne krvi nismo uspeli pomnožiti DNA SRLV, pregledali še s potrditvenima testoma WB in SU5 ELISA. Pozitiven rezultat testa ELISA smo pri teh vzorcih potrdili vsaj z enim ali z obema potrditvenima testoma. S testom SU5 ELISA smo uspešno določili tudi genotip SRLV. Test WB se je izkazal za manj zanesljivega pri določanju protiteles proti virusom MVV (Tabela 4-2).

## 5.2 Metode PCR

V okviru doktorskega dela smo za dokazovanje DNA SRLV najprej uvedli klasično metodo PCR, in sicer metodo LTR-PCR. To metodo so sicer Extramiana in sodelavci (2002) razvili za dokazovanje MVV pri ovkah. Rezultate so primerjali z rezultati testa AGID in ELISA in poročali o 83,5-odstotni občutljivosti te metode, ki je bila boljša v primerjavi s predhodno

objavljenimi. Kasneje so to metodo uporabili tudi številni drugi avtorji (Karanikolaou in sod., 2005; Leginagoikoa in sod., 2006; Benavides in sod., 2006a; Benavides in sod., 2006b; Benavides in sod., 2007). V okviru doktorskega dela smo jo za dokazovanje DNA SRLV uvedli tudi mi. V izbranih šestih rejah smo z metodo LTR-PCR pregledali vzorce polne krvi vseh 524 živali. Po prvih rezultatih testiranj, ki smo jih opravili na referenčnih virusnih sevih MVV KV1514 in CAEV Co ter sevih SRLV, prisotnih v dveh rejah koz, se je metoda LTR-PCR izkazala za primerno tako za dokazovanje MVV kot CAEV, saj smo v reji 1 s filogenetskimi analizami ugotovili prisotnost sevov CAEV podtipa B1 in v reji 2 predvsem sevov MVV, ki smo jih uvrstili v nov podtip A14 (Slika 4-4 in Slika 4-5). V reji 1 smo z metodo LTR-PCR pomnožili DNA SRLV v 71,7 % vzorcev seropozitivnih koz. V reji 2 pa smo DNA SRLV pomnožili pri 60 % seropozitivnih koz in v enem vzorcu seronegativne koze (Tabela 4-4). Testiranje s to metodo smo nato nadaljevali v ostalih štirih rejah. V tretji reji koz, v kateri smo odkrili prisotnost sevov CAEV podtipa B1 in tudi sevov MVV (Slika 4-4 in Slika 4-5), smo z metodo LTR-PCR le pri 4,8 % seropozitivnih živali pomnožili DNA SRLV (Tabela 4-4). Filogenetska analiza sevov CAEV podtipa B1, ki so prisotni v tej reji, je razkrila, da se ti razlikujejo od sevov CAEV podtipa B1 iz reje 1 ter na filogenetskem drevesu tvorijo svojo gručo (Slika 4-4 in Slika 4-5). Verjetno je vzrok za tako slabo občutljivost metode LTR-PCR v tej reji neujemanje med tarčnim nukleotidnim zaporedjem provirusnih genomov in zaporedjem začetnih oligonukleotidov. V dveh rejah ovac, v katerih smo s filogenetsko analizo odkrili prisotnost sevov SRLV genetske skupine A, ki na filogenetskem drevesu tvorijo skupno gručo (Slika 4-4 in Slika 4-5), smo z metodo LTR-PCR pomnožili DNA SRLV pri 69 % in 82,1 % seropozitivnih živali. V teh dveh rejah ovac smo z metodo LTR-PCR pomnožili DNA SRLV pri štirih seronegativnih živalih (Tabela 4-4). V mešani reji, v kateri so bile seropozitivne le štiri ovce in v kateri smo s filogenetsko analizo ugotovili prisotnost sevov SRLV genetske skupine A (Slika 4-5), smo z metodo LTR-PCR pomnožili DNA SRLV pri vseh seropozitivnih živali (Tabela 4-4).

Povzamemo lahko, da je bila metoda LTR-PCR bolj učinkovita za dokazovanje sevov SRLV pri ovcah. Za zelo nezanesljivo se je izkazala pri dokazovanju sevov SRLV podtipa B1 iz ene reje koz. Sevi SRLV iz te reje so se filogenetsko razlikovali od sevov SRLV podtipa B1 iz drugih dveh rej koz. Vendar smo tudi pri testiranju sevov SRLV pri ovcah ugotovili nižjo občutljivost metode LTR-PCR od občutljivosti, o kateri so poročali Extramiana in sodelavci

(2002), ki so to metodo tudi razvili. Tak rezultat je verjetno posledica dejstva, da so slovenski sevi SRLV genetsko drugačni od sevov SRLV, ki so jih testirali Extramiana in sodelavci (2002), ali pa je posledica nizkega provirusnega bremena, zaradi katerega DNA SRLV nismo uspeli pomnožiti.

Vzorce seropozitivnih živali, pri katerih z metodo LTR-PCR nismo uspeli pomnožiti DNA SRLV, smo testirali tudi z metodo *gag*-PCR. Metodo *gag*-PCR smo prvenstveno uvedli za pomnoževanje DNA SRLV v okviru filogenetskih analiz. V treh rejah koz smo z metodo *gag*-PCR oziroma s testom *gag*CAEV-PCR pomnožili DNA SRLV v dodatnih vzorcih, in sicer se je v eni reji število pozitivnih vzorcev povečalo za 1 %, v drugi reji za 17 % in v tretji reji za 32,2 %. V dveh rejah ovac pa smo z metodo *gag*-PCR oziroma s testom *gag*MVV-PCR pomnožili DNA SRLV v dodatnih 2,8 % oziroma 2,9 % vzorcev (Tabela 4-3). Test *gag*CAEV-PCR je metoda ugnezdene PCR in test *gag*MVV-PCR metoda polugnezdene PCR, pri katerih se z drugim pomnoževanjem že v osnovi doseže večja občutljivost kot pri sami metodi PCR brez dodatnega pomnoževanja (OIE, 2008b; Herrmann-Hoesing, 2010). V reji 37, v kateri smo z metodo LTR-PCR pomnožili DNA SRLV v le 4,8 % vzorcev, z metodo *gag*-PCR pa v dodatnih 32,2 % vzorcev, je manjše število pozitivnih rezultatov z metodo LTR-PCR posledica neujemanja začetnih oligonukleotidov s tarčnim zaporedjem provirusnega genoma, saj so metodo LTR-PCR prvenstveno razvili za določanje DNA MVV in test *gag*CAEV-PCR za določanje DNA CAEV.

Ugotovili smo, da je metoda PCR manj zanesljiva kot test ELISA, vendar pa lahko z metodo PCR dokažemo prisotnost virusne nukleinske kisline pred serokonverzijo. Podobno so ugotovili tudi številni drugi avtorji (Extramiana in sod., 2002; de Andrés in sod., 2005; Karanikolaou in sod., 2005; Gil in sod., 2006; Reina in sod., 2009; Barquero in sod., 2011).

### 5.3 Filogenetske analize

Shah in sodelavci (2004) so opisali obširno filogenetsko študijo in reklassifikacijo virusov SRLV. Številnim sevom SRLV, izoliranim pri ovcah in kozah iz Švice, so določili nukleotidna zaporedja. Uporabili so približno 1,8 kb dolgo zaporedje v genih *gag* in *pol* (regija 1,8 kb *gag-pol*) in približno 1,2 kb dolgo zaporedje v genu *pol* (regija 1,2 kb *pol*). Na podlagi teh

nukleotidnih zaporedij ter zaporedij sevov SRLV, dostopnih v genski banki, so opravili filogenetske analize in predlagali uvrstitev SRLV v štiri genetske skupine, in sicer od A do D. Na podlagi analize genetskih razdalj med posameznimi genetskimi skupinami in med posameznimi podtipi so ugotovili, da so razlike med posameznimi genetskimi skupinami v regijah 1,8 kb *gag-pol* in 1,2 kb *pol* večje od 25 %. Razdalje med posameznimi vejami oziroma podtipi znotraj genetskih skupin A in B pa so se gibale od 17 % do 24 % v regiji 1,8 kb *gag-pol* in od 15 % do 26 % v regiji 1,2 kb *pol*. V naslednjih letih so bile opravljene številne filogenetske analize SRLV in objavljena nova delna nukleotidna zaporedja kot tudi nova zaporedja celotnih genomov SRLV, ki so prisotna po Evropi in svetu. V Italiji so Grego in sodelavci (2007) določili dva nova podtipa znotraj genetske skupine A v genu *gag*, in sicer podtip A8 in A9. Prav tako so ti raziskovalci pri kozah odkrili nove seve SRLV, ki so jih uvrstili v novo genetsko skupino E. Kasneje so Reina in sodelavci (2010) pri kozah v Italiji določili še dodatna nukleotidna zaporedja sevov SRLV genetske skupine E v genu *gag* in zaporedje celotnega virusnega genoma seva Seui ter to genetsko skupino razdelili v dva podtipa: E1 in E2. Pisoni in sodelavci (2010) so prav tako v Italiji odkrili nov podtip A10 pri kozah. Nukleotidna zaporedja teh sevov so določili v odseku gena *pol*, ki kodira reverzno transkriptazo, in v odseku gena *env*. Teh nukleotidnih zaporedij sicer niso mogli primerjati z nukleotidnimi zaporedji podtipov A8 in A9, ki so bila določena v genu *gag*, ampak so kljub temu predlagali uvrstitev v nov podtip A10. Tudi Giammarioli in sodelavci (2011) so določili nukleotidna zaporedja sevov SRLV v regiji *gag-pol* pri ovcah in kozah in jih uvrstili v nov podtip A11, kljub temu da jih niso mogli primerjati s podtipi A6 in A10. Bertolotti in sodelavci (2011) so določili nukleotidna zaporedja v odsekih genov *gag* in *pol* številnih sevov SRLV pri ovcah v Italiji in tudi zaporedja celotnih virusnih genomov dveh izolatov SRLV pri ovcah, ki so ju imenovali Fonni in Volterra. Uvrstili so ju v nov podtip znotraj genetske skupine B, in sicer podtip B3. Pred kratkim so Olech in sodelavci (2012) na Poljskem opisali dva nova podtipa znotraj genetske skupine A, in sicer podtip A12 in A13. Nukleotidna zaporedja sevov SRLV, ki spadajo v ta dva podtipa, so določili v odsekih genov *gag* in *env*. Tudi na Finskem (Laamanen in sod., 2007), v Grčiji (Angelopoulou in sod., 2005) in na Norveškem (Gjerset in sod., 2007) so opisali seve SRLV znotraj genetske skupine A, ki se zelo razlikujejo od že znanih sevov, vendar jih zaradi nizke statistične podpore na filogenetskih drevesih niso uvrstili v nove podtipe.

V okviru naše raziskave smo slovenskim sevom virusov SRLV določili nukleotidna zaporedja na genu *gagMA* in v regiji 1,2 kb *pol*. Gena *gagMA* sicer Shah in sodelavci (2004) niso vključili v filogenetsko reklassifikacijo in naj ne bi bila informativna za filogenetske analize, kot opisuje Rolland s sodelavci (2002). Kljub temu pa številne študije opisujejo filogenetske odnose na podlagi gena *gagMA* (Pisoni in sod., 2006; Kuzmak in sod., 2007; Erhouma in sod., 2008). Filogenetske analize, ki smo jih opravili v okviru naše raziskave (Slika 4-4 in Slika 4-5), so pokazale podobno topologijo filogenetskih dreves obeh genomskeh regij, le da gruče sorodnih slovenskih sevov SRLV v genu *gagMA* niso bile statistično podprtne. Nasprotno so imele gruče in podskupine sorodnih slovenskih sevov SRLV v regiji 1,2 kb *pol* visoko statistično podporo. Izjema so bili slovenski sevi SRLV iz reje 2, ki so imeli visoko statistično podporo v genu *gagMA*. Slovenskih sevov SRLV pa z vsemi že opisanimi podtipi genetske skupine A nismo mogli primerjati v obeh regijah. S sevi SRLV podtipov A6, A10 in A11 pa jih nasploh nismo mogli primerjati, saj njihova nukleotidna zaporedja niso določena v nobeni od genomskeh regij, ki smo jih analizirali v naši raziskavi.

Na podlagi filogenetskih analiz smo ugotovili, da so slovenski sevi SRLV zelo heterogeni in da ovčji sevi SRLV spadajo v genetsko skupino A ter kozji sevi SRLV v gentsko skupino A in B.

Analizirali smo nukleotidna zaporedja kozjih sevov SRLV iz treh rej in ugotovili, da sevi SRLV iz le ene reje koz, in sicer iz reje 1, spadajo izključno v podtip B1, medtem ko smo v ostalih dveh rejah koz ugotovili prisotnost sevov SRLV tako genetske skupine A kot genetske skupine B. Ugotovili smo, da spadata kozja seva SRLV 2-3g in 2-90g v reji 2 v podtip B1 in tvorita gručo skupaj s kozjimi sevi SRLV prisotnimi v reji 1. Vzroka okužbe z enakimi sevi SRLV v teh dveh rejah ne poznamo. Za natančnejšo epidemiološko študijo bi morali od rejcev pridobiti več podatkov. Zanimivo je tudi grupiranje teh sevov s kozjimi sevi SRLV iz severne Italije (Pisoni in sod., 2006), kar kaže na epidemiološko povezavo med temi virusnimi sevi. Znano je, da slovenski rejci koz kupujejo živali v Italiji. Ostalih šest nukleotidnih zaporedij iz reje 2 (2-8g, 2-15g, 2-26g, 2-33g, 2-55g in 2-97g), ki jih nismo mogli uvrstiti v nobenega izmed že znanih podtipov, pa tvori svojo podskupino z visoko statistično podporo znotraj genetske skupine A. Ta podskupina sevov SRLV se v genu *gagMA* od ostalih sevov SRLV genetske skupine A razlikuje za najmanj 17,7 % (Tabela 4-5).

V regiji 1,2 kb *pol* pa smo nukleotidno zaporedje virusa SRLV (2-97g) določili le pri eni kozi. Tudi v regiji 1,2 kb *pol* se je to nukleotidno zaporedje od ostalih zaporedij sevov SRLV razlikovalo za najmanj 16,3 % (Tabela 4-7). Ti virusni sevi se od ostalih sevov SRLV v povprečju razlikujejo za več kot 17 % v genu *gag* in za več kot 15 % v regiji 1,2 kb *pol*, zato na podlagi visoke statistične podpore podskupine teh virusnih sevov predlagamo njihovo uvrstitev v nov podtip A14. Tudi v reji 37 smo ugotovili prisotnost sevov SRLV genetskih skupin A in B. Večino sevov SRLV v tej reji smo uvrstili v podtip B1, le en kozji virusni sev (37-88g) smo v filogenetski analizi uvrstili v genetsko skupino A. Temu sevu smo nukleotidno zaporedje določili le v regiji 1,2 kb *pol*. Od najbolj sorodnih sevov SRLV podtipov A2 in A3 se je ta sev razlikoval približno enako in za več kot 15 % (Tabela 4-7) ter bi lahko spadal v nov, še neuvrščen podtip znotraj genetske skupine A. V regiji gena *gagMA* DNA tega virusnega seva nismo uspeli pomnožiti.

Analizirali smo nukleotidna zaporedja ovčjih sevov SRLV iz treh rej in ugotovili, da vsi spadajo v genetsko skupino A. Ovčji sevi SRLV iz reje 35 in reje 36 so na filogenetskem drevesu tvorili skupno gručo in so bili v genu *gagMA* najbolj sorodni podtipoma A1 in A2, od katerih so se razlikovali za 13,3 % in 13,7 % (Tabela 4-5). Na podlagi filogenetske analize v regiji 1,2 kb *pol* pa smo te seve SRLV uvrstili v podtip A5. Analiza genetskih razdalj je razkrila, da se ti virusni sevi v tej regiji od podtipov A1 in A2 razlikujejo za 17,5 % in 18,2 %, od podtipa A5 pa za 14,1 % (Tabela 4-7). V genu *gagMA* nukleotidno zaporedje podtipa A5 ni bilo na voljo.

Na podlagi filogenetske analize v regiji 1,2 kb *pol* smo znotraj genetske skupine A odkrili podskupino sevov SRLV, ki jo tvorijo širje ovčji sevi iz reje 31 (31-4s, 31-9s, 31-12s in 31-18s). Ta podskupina ima visoko statistično podporo in se od ostalih sevov SRLV razlikuje za več kot 21 % (Tabela 4-7). Kljub temu da filogenetske analize teh sevov v genu *gagMA* nismo mogli izvesti, predlagamo uvrstitev teh sevov SRLV v nov podtip A15. Dejstvo, da v genu *gagMA* DNA teh sevov SRLV nismo uspeli pomnožiti, le še potrjuje, da se ti virusni sevi zelo razlikujejo od ostalih sevov SRLV.

Podobno, kot je bilo že prej opisano, smo tudi mi ugotovili prisotnost sevov MVV oziroma genetske skupine A pri kozah in potrdili možnost naravnega navzkrižnega prenosa SRLV med vrstami (Leroux in sod., 1995; Leroux in sod., 1997; Castro in sod., 1999; Rolland in sod., 2002; Shah in sod., 2004; Pisoni in sod., 2005; Germain in Valas, 2006; Gjerset in sod., 2007; Grego in sod., 2007; Kuzmak in sod., 2007; Laamanen in sod., 2007; Glaria in sod., 2009).

#### **5.4 Razvoj metode PCR v realnem času**

Za dokazovanje SRLV so v zadnjih desetih letih razvili le nekaj testov PCR v realnem času in RT-PCR v realnem času. Uporabili so jih za različne namene, na primer: analiza transkripcije virusa v okuženih celičnih kulturah (Gudmundsson in sod., 2003), karakterizacija rastnih značilnosti virusnih sevov (Barros in sod., 2004) in študija virusne perzistence pri okuženih kozah (Ravazzolo in sod., 2006). V teh testih so za načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sond uporabili le en virusni izolat ali le en molekulski klon virusov SRLV. Carozza in sodelavci (2010) pa so s testoma PCR v realnem času in RT-PCR v realnem času določali virusno breme in virusne transkripte pri ovkah, ki so jih eksperimentalno okužili z virusnim sevom MVV EV1. Za načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sond so uporabili soglasno nukleotidno zaporedje, pridobljeno na osnovi poravnave več molekulskih klonov virusa MVV EV1.

Do zdaj sta objavljena le dva opisa metode PCR v realnem času za uporabo v diagnostične namene. Brinkhoff in sodelavci (2008) so za diagnostiko SRLV razvili PCR v realnem času z uporabo interkalirajočega barvila SYBR Green. Za določanje SRLV so izbrali dve regiji, in sicer regijo LTR in regijo leader-*gag*. Začetni oligonukleotidi, ki so jih uporabili v testu LTR, pa so enaki kot začetni oligonukleotidi, ki smo jih v naši študiji uporabili za pomnoževanje DNA SRLV s klasično metodo LTR-PCR in jih je opisal Extramiana s sodelavci (2002). Začetne oligonukleotide, ki so jih uporabili v testu leader-*gag*, so načrtovali na podlagi poravnave 11 nukleotidnih zaporedij sevov SRLV, ki so jih pridobili iz genske banke. Testirali so provirusno DNA, izolirano iz levkocitov vzorcev periferne krvi koz in ovac. Uporabili so vzorce živali, ki so izvirale iz Nizozemske in še štirih drugih evropskih držav, vendar virusnih sevov SRLV, s katerimi so bile te živali okužene, niso filogenetsko opredelili. Oba testa so delno validirali in jima določili analitično specifičnost na podlagi uporabe

programa BLAST ter diagnostično specifičnost in občutljivost. Niso pa poročali o ponovljivosti in obnovljivosti testov in prav tako ne o meji detekcije obeh testov. Test, s katerim so pomnoževali DNA SRLV v regiji leader-*gag*, se je izkazal za bolj občutljivega kot test, s katerim so pomnoževali DNA SRLV v regiji LTR. Rezultate obeh testov so primerjali z rezultati testa ELISA. Občutljivost testov so izrazili kot odstotek pozitivnih vzorcev od vseh vzorcev seropozitivnih živali. Ugotovili so, da je pri testiranju živali iz Nizozemske občutljivost testa leader-*gag* pri kozah 82-odstotna in pri ovcah 88-odstotna, medtem ko je občutljivost testa LTR pri kozah 40-odstotna in pri ovcah 83-odstotna. Ko pa so testirali vzorce iz drugih evropskih držav, so ugotovili, da je občutljivost testa slabša. Občutljivost testa leader-*gag* je bila pri kozah 63-odstotna in pri ovcah 85-odstotna, medtem ko je bila občutljivost testa LTR pri kozah 23-odstotna in pri ovcah 25-odstotna. Z obema testoma so zaznali pomnoževanje DNA SRLV tudi v vzorcih seronegativnih živali, ki so izvirale iz seropozitivnih rej. Poročali so, da je diagnostična specifičnost metode 100-odstotna, saj so bili vzorci vseh živali iz akreditiranih seronegativnih rej negativni. Pomanjkljivost pri razvoju in interpretaciji rezultatov te metode je, da ni znana filogenetska opredelitev sevov SRLV, ki so jih uporabili za testiranje. Slabost te metode je tudi uporaba barvila SYBR Green, saj moramo biti zaradi nespecifične vezave barvila v vse nastale dvojnovijačne DNA zelo pazljivi pri interpretaciji rezultatov. Barvilo se veže tudi v nespecifične produkte PCR, kot so dimeri začetnih oligonukleotidov, ki običajno postanejo številnejši v poznejših ciklih, ko pomnoževanje že doseže plato. Specifičnost vezanega barvila določimo na koncu pomnoževanja z analizo talilne krivulje, ki predstavlja disociacijsko krivuljo fluorescence (Kubista in sod., 2006; Mackay, 2007). Talilna krivulja produkta PCR je odvisna od deleža GC, dolžine in nukleotidnega zaporedja, zato lahko produkte PCR razlikujemo glede na različen vrh temperature denaturacije (Ririe in sod., 1997). Zaradi teh značilnosti je uporaba barvila SYBR Green za pomnoževanje DNA v regiji leader-*gag* virusov SRLV neprimerna. Nukleotidno zaporedje virusov SRLV namreč po naših analizah v regiji leader-*gag* ni ohranjeno, temveč celo zelo heterogeno. To zaporedje vsebuje tudi delecije oziroma insercije, kar vpliva na interpretacijo rezultatov na podlagi analize talilne krivulje. Razlikovanje med specifičnimi in nespecifičnimi produkti PCR le glede na analizo talilnih krivulj je zato nezanesljivo. Avtorji tudi poročajo o različnih vrhovih temperature denaturacije produktov PCR v regiji leader-*gag*. Le dve kratki zaporedji v regiji leader-*gag* sta ohranjeni in so jih avtorji tudi uporabili za načrtovanje začetnih oligonukleotidov. Ti dve zaporedji pa ne

ustrezata priporočilom za načrtovanje začetnih oligonukleotidov, kar lahko neugodno vpliva na delovanje metode.

Herrmann-Hoesing in sodelavci (2007) so razvili in validirali metodo PCR v realnem času za določanje ameriških sevov MVV, ki poleg detekcije omogoča tudi kvantifikacijo. Temelji na specifičnem pomnoževanju odseka na regiji gena *env* z uporabo hidrolizirajoče sonde TaqMan. Začetne oligonukleotide in sonde so načrtovali na podlagi soglasnega nukleotidnega zaporedja, pridobljenega na osnovi poravnave molekulskih klonov virusa OPPV, s katerim so bile naravno okužene ovce. Testirali so krvne vzorce ovac, ki izvirajo iz ameriške zvezne države Idaho, in določali provirusno DNA, izolirano iz levkocitov. Rezultate metode PCR v realnem času so primerjali z rezultati testa cELISA in jih izrazili kot pozitivno in negativno skladnost v odstotkih. Ugotovili so, da je pozitivna skladnost 96,2-odstotna in negativna skladnost 97,7-odstotna. Tudi s to metodo PCR v realnem času so ugotovili pomnoževanje DNA SRLV v vzorcih seronegativnih živali, kar se odraža v 97,7-odstotni negativni skladnosti. S to metodo so detektirali provirusno breme od 1 do 62.700 kopij na mikrogram DNA. Analizirali so tudi ponovljivost reakcije znotraj enega testiranja in obnovljivost reakcije med testiranji. Niso pa poročali o učinkovitosti pomnoževanja te metode. Pri testiranju vzorcev ovac, ki so imele virusno breme nad 100 kopij/ $\mu$ g DNA, je bila ponovljivost reakcije dobra. Slabša je bila ponovljivost reakcije pri testiranju vzorcev ovac, ki so imele virusno breme pod 100 kopij/ $\mu$ g DNA. Koeficienti variacije so bili nižji za ponovljivost kot za obnovljivost reakcije. Ugotovili so tudi, da pri testiranju vzorcev ovac, ki so imele virusno breme pod 100 kopij/ $\mu$ g DNA, pomnoževanja DNA SRLV niso zaznali, če so v reakciji uporabili manj kot 1  $\mu$ g DNA. Ko so s to metodo testirali celično kulturo GSM, okuženo s sevom CAEV-63, do pomnoževanja DNA SRLV ni prišlo. Predvidevali so, da je ta metoda specifična le za MVV, kar bi morali dokazati s testiranjem vzorcev koz okuženih s sevi CAEV.

Številne pomanjkljivosti teh diagnostičnih metod za dokazovanje SRLV so nas vodile k razvoju nove metode PCR v realnem času, s katero bi lahko določili čim širši nabor sevov SRLV genetske skupine A in B, ki bi nam omogočala tudi razlikovanje med sevi MVV in CAEV. De Andrés s sodelavci (2005) predлага, da je zaradi stalnega spreminjanja virusnega

genoma, ki je v procesu pomnoževanja podvržen visoki stopnji mutacij, treba diagnostične metode prilagoditi sevom SRLV, prisotnim na določenem geografskem področju. Tako smo se pri razvoju nove metode PCR v realnem času osredotočili predvsem na določanje sevov SRLV genetskih skupin A in B, prisotnih v Sloveniji. Želeli smo razviti metodo PCR v realnem času, ki bi ločevala med sevi MVV in CAEV, saj je znano, da pogosto prihaja tudi do navzkrižnega prenosa teh virusov med vrstami. Tudi v naši študiji smo s filogenetskimi analizami ugotovili pri kozah prisotnost sevov SRLV, ki spadajo tako v genetsko skupino A kot v genetsko skupino B (Slika 4-4 in Slika 4-5).

V okviru naše raziskave smo razvili metodo PCR v realnem času za sočasno specifično določanje CAEV in MVV in za razlikovanje med njima, ki smo jo zasnovali na regiji gena *gagMA*. Metoda je sestavljena iz dveh testov: test CAEV za specifično določanje virusov SRLV genetske skupine B in test MVV za specifično določanje virusov SRLV genetske skupine A. Na podlagi poravnave 11 nukleotidnih zaporedij sevov CAEV, dostopnih v genski banki, in 36 nukleotidnih zaporedij slovenskih sevov CAEV smo izbrali en par začetnih oligonukleotidov in sond, ki so specifični za CAEV oziroma genetsko skupino B, s katerimi pomnožujemo 113 nukleotidov dolg odsek. Prav tako smo poravnali devet nukleotidnih zaporedij sevov MVV, dostopnih v genski banki, in 49 nukleotidnih zaporedij slovenskih sevov MVV ter izbrali en par začetnih oligonukleotidov in sond, ki so specifični za MVV oziroma genetsko skupino A, s katerim pomnožujemo odsek, ki je dolg 101 nukleotido. Da bi zagotovili detekcijo čim širšega nabora virusnih sevov SRLV, smo v oba negativno usmerjena začetna oligonukleotida in sond CAEV MA vključili degenerirane baze. Obe sondi TaqMan smo označili s fluorescentnim poročevalskim barvilm FAM, zato je razlikovanje med virusi MVV in CAEV mogoče le z izvedbo v dveh ločenih reakcijah. Metodo smo optimizirali tako, da je omogočeno sočasno določanje virusov MVV in CAEV, in sicer z izbiro enakih temperturnih pogojev pomnoževanja. S postopkom optimizacije smo določili tudi najbolj optimalne koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond. Izvedli smo tudi validacijo metode in pri tem sledili smernicam, ki jih je predlagal Bustin s sodelavci (2009) in katere naj bi upoštevali vsi avtorji, ki poročajo o razvoju novih metod PCR v realnem času (angl. The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments, MIQE). Pri validaciji metode smo se ravnali tudi po priporočilih OIE (OIE, 2008b).

Določili smo analitično specifičnost metode. S testom CAEV smo testirali virusne seve, ki spadajo v genetsko skupino B, in pri vseh uspešno pomnožili DNA SRLV. S testom MVV smo testirali virusne seve, ki spadajo v genetsko skupino A, in prav tako pri vseh uspešno pomnožili DNA SRLV. Metodo smo zasnovali tudi za ločevanje med virusnimi sevi SRLV genetske skupine A in B, zato smo s testom MVV navzkrižno testirali referenčni sev CAEV Co, sev podtipa B2 in slovenske seve SRLV podtipa B1. S testom CAEV smo navzkrižno testirali referenčni sev MVV KV1514 in slovenske seve štirih različnih podtipov znotraj genetske skupine A. Pri nobenem od teh testiranj nismo pomnožili DNA SRLV.

Določili smo tudi diagnostično specifičnost novo razvite metode PCR v realnem času. Testirali smo vzorce polne krvi živali iz rej, v katerih so bile vse živali seronegativne. V nobenem od vzorcev nismo pomnožili DNA SRLV. Ti rezultati kažejo, da je novo razvita metoda PCR v realnem času 100-odstotno specifična in hkrati omogoča tako določanje virusnih sevov SRLV genetske skupine A in B kot ločevanje med njimi.

Za določanje analitične občutljivosti smo pripravili dva standarda in pri tem uporabili produkta PCR referenčnih virusnih sevov MVV KV1514 in CAEV Co, ki smo ju vstavili v plazmidni vektor. Ugotovili smo, da je analitična občutljivost testa CAEV 26 molekul plazmidne DNA. Test se je izkazal za nekoliko bolj občutljivega kot test MVV, za katerega smo ugotovili, da je analitična občutljivost 72 molekul plazmidne DNA.

Določili smo tudi ponovljivost in obnovljivost reakcij obeh testov. Rezultati testiranj so pokazali, da je ponovljivost testa MVV pri redčinah s teoretičnim številom kopij nad 100 na splošno dobra, saj KV ne presega 24 %. Ponovljivost tega testa je nekoliko slabša pri redčini, ki ustreza teoretično izračunanemu številu kopij 100, saj je KV v enem izmed treh poskusov nekoliko nad 34 % in v drugem skoraj 38 % (Tabela 4-9). Obnovljivost testa MVV je na splošno dobra, saj KV ne presežejo 30 % (Tabela 4-10). Ugotovili smo, da je tako ponovljivost kot obnovljivost testa CAEV nekoliko slabša kot pri testu MVV. Koeficient variacije testa CAEV je pri večini redčin, ki ustrezo teoretičnemu številu kopij nad 10, višji od 15 % in doseže tudi skoraj 40 %. Pri redčini, ki ustreza teoretičnemu številu kopij 10, pa v enem izmed treh poskusov preseže 46 % in v drugem nekoliko preseže 58 %. Ti rezultati

kažejo na slabšo ponovljivost reakcije (Tabela 4-11). Koeficienti variacije za test CAEV pa kažejo na boljšo obnovljivost, saj do redčine, ki ustreza teoretičnemu številu kopij 100, ne preseže 28 %. Pri redčinah, ki ustrezano teoretičnemu številu kopij pod 100, pa je KV 35,18 % in 36,03 %, kar kaže na nekoliko slabšo obnovljivost med testiranji (Tabela 4-12).

Delovanje novo razvite metode smo ovrednotili z določanjem učinkovitosti pomnoževanja reakcije. Učinkovitost pomnoževanja testa CAEV in testa MVV je sicer nekoliko variirala in je bila v nekaterih poskusih nižja, kot je priporočeno za kvantitativne metode PCR v realnem času (Nolan in sod., 2006). Iz standardne krivulje linearne regresije smo poleg naklona za izračun učinkovitosti reakcije določili tudi  $R^2$ , ki pove, kako dobro se dobljene vrednosti prilegajo standardni krivulji linearne regresije (Raymaekers in sod., 2009). Ugotovili smo, da je bila vrednost  $R^2$  v vseh poskusih obeh testov nad 0,985, kar kaže na dobro prileganje. Metoda ima tudi širok linearni razpon, saj je bila reakcija obeh testov linearna v območju vseh zaporednih redčin, torej od teoretičnega števila kopij  $10^6$  do  $10^2$  za test MVV in od teoretičnega števila kopij  $10^5$  do 10 za test CAEV (Slika 4-6 in Slika 4-7). Nismo pa mogli določiti, ali je reakcija linearna tudi pri večjem številu kopij, saj uporabljenih virusnih sevov MVV in CAEV nismo uspeli pomnožiti v višjem titru.

Ugotavljali smo tudi ustrezost postopka izolacije DNA in morebitno inhibicijo reakcije. Pripravili smo suspenzijo levkocitov, v katero smo dodali celice, okužene z virusom MVV oziroma CAEV, in iz katere smo izolirali genomsko DNA. Z metodo PCR v realnem času smo nato za test MVV in za test CAEV testirali izolirane genomske DNA posameznih suspenzij. Na podlagi vrednosti Ct in KV smo ugotovili, da je bil postopek izolacije ustrezen in ni prišlo do inhibicije reakcije, saj je bil KV za test MVV 0,42 % in za test CAEV 0,20 %.

Diagnostično občutljivost novo razvite metode PCR v realnem času smo določili tako, kot so opisali Brinkhoff in sodelavci (2008) in Herrmann-Hoesing in sodelavci (2007) ter številni drugi avtorji, ki so testirali klasične metode PCR (Celer in sod., 2000; Extramiana in sod., 2002; Karanikolaou in sod., 2005). Testirali smo vzorce seropozitivnih živali in na podlagi deleža vzorcev, v katerih smo uspešno pomnožili DNA SRLV, od vseh testiranih izrazili diagnostično občutljivost v odstotkih. Ugotovili smo, da je diagnostična občutljivost metode

79-odstotna. Brinkhoff in sodelavci (2008) so podali občutljivost metode posebej za koze in ovce. Če na enak način interpretiramo rezultate mi, pa je občutljivost metode za koze 78-odstotna in za ovce 80-odstotna. Taka občutljivost je sicer nekoliko slabša, kot so opisali Brinkhoff in sodelavci (2008), vendar rezultati niso neposredno primerljivi, saj nismo uporabili enakega testa ELISA in istih vzorcev. Poleg tega pa Brinkhoff in sodelavci (2008) niso poročali o filogenetski klasifikaciji sevov SRLV, ki so jih testirali. Velika genetska heterogenost virusov SRLV je eden izmed razlogov za slabšo občutljivost metod PCR in PCR v realnem času. Še bolj na občutljivost teh metod vpliva nizko virusno breme v krvi okuženih živali (de Andrés in sod., 2005), saj lahko le vsak  $1 \times 10^6$  monocit nosi vgrajen provirusni genom (Zhang in sod., 2000), medtem ko prostega virusa v plazmi ne najdemo (Herrmann-Hoesing, 2010). Občutljivost novo razvite metode PCR v realnem času je prav tako slabša kot poroča Herrmann-Hoesing s sodelavci (2007). Ta skupina raziskovalcev je testirala le ovce, okužene s sorodnimi sevi Dubois OPPV, ki tvorijo svoj klad znotraj ameriškega podtipa A2 in ki ga imenujejo OPPV (Herrmann in sod., 2004).

Rezultate testiranj z novo razvito metodo PCR v realnem času smo primerjali z rezultati klasičnih metod PCR, ki smo jih v okviru raziskave že prej uvedli za dokazovanje DNA SRLV in za filogenetske analize, in sicer metode LTR-PCR in *gag*-PCR. Pri primerjavi z metodo LTR-PCR, njena občutljivost je bila 54-odstotna, smo ugotovili, da je novo razvita metoda PCR v realnem času precej bolj občutljiva, saj je bila njena občutljivost 79-odstotna. Tudi pri primerjavi z metodo LTR-PCR in metodo *gag*-PCR, katerih skupna občutljivost je bila 71-odstotna, smo ugotovili, da je novo razvita metoda PCR v realnem času bolj občutljiva.

Razvili smo novo metodo PCR v realnem času za specifično določanje MVV in CAEV in hkrati za razlikovanje med njima. Taka metoda do zdaj še ni bila opisana. Metodo smo zasnovali za določanje SRLV genetskih skupin A in B, saj smo v Sloveniji ugotovili prisotnost le-teh genetskih skupin. S to metodo smo testirali filogenetsko raznolike seve SRLV. Poleg slovenskih sevov SRLV smo testirali tudi seve SRLV, ki smo jih pridobili iz tujih laboratorijev, in sicer referenčni sev MVV KV 1514 podtipa A1, referenčni virusni sev CAEV Co podtipa B1 ter virusne seve podtipov A3, A4 in B2. Uspešno smo pomnožili DNA predstavnikov vseh testiranih podtipov. Ni nam uspelo pomnožiti DNA SRLV vseh

seropozitivnih živali, ki smo jih testirali. To je najverjetnejše posledica nizkega provirusnega bremena v krvi okuženih živali.

Novo razvita metoda predstavlja dodatno orodje za potrditev okužbe z virusi SRLV. Primerna je tudi za zgodnje odkrivanje okužb z virusi SRLV pri živalih, ki še niso razvile specifičnih protiteles.

## 6 ZAKLJUČKI

- Ugotovili smo, da je odstotek seropozitivnih koz (32,1 %) višji kot odstotek seropozitivnih ovac (24,8 %).
- Odstotek rej koz, v katerih smo ugotovili seropozitivne živali (76,2 %), je višji kot odstotek rej ovac (66,7 %) in mešanih rej (44,4 %), v katerih smo ugotovili seropozitivne živali.
- Odstotek seropozitivnih živali v posameznih rejah je bil najvišji v rejah koz.
- Pozitiven rezultat testa ELISA smo potrdili z molekularnimi metodami oziroma vsaj z enim ali z obema serološkima potrditvenima testoma. S testom SU5 ELISA smo uspešno določili tudi genotip SRLV. Test WB se je izkazal za manj zanesljivega pri določanju protiteles proti virusom MVV.
- Ugotovili smo, da je metoda PCR manj zanesljiva kot metoda ELISA, vendar nam omogoča dokazati prisotnost virusne nukleinske kisline pred serokonverzijo.
- Na podlagi filogenetskih analiz smo ugotovili, da so slovenski sevi SRLV zelo heterogeni ter da ovčji sevi SRLV spadajo v genetsko skupino A in kozji sevi SRLV v gentsko skupino A in B.
- V dveh rejah koz smo ugotovili prisotnost SRLV tako genetske skupine A kot genetske skupine B.
- Kozji virusni sevi iz reje 2, ki spadajo v genetsko skupino A, se od ostalih sevov SRLV v povprečju razlikujejo za več kot 17 % v genu *gag* in za več kot 15 % v genu *pol*. Na

podlagi visoke statistične podpore podskupine teh virusnih sevov, predlagamo njihovo uvrstitev v nov podtip A14.

- Kozji virusni sev iz reje 37, ki spada v genetsko skupino A, se od ostalih sevov SRLV v genu *pol* v povprečju razlikuje za več kot 15 % in bi lahko spadal v nov podtip znotraj genetske skupine A. Ta virusni sev pa na filogenetskem drevesu nima statistične podpore in ga nismo uvrstili v nov podtip.
- Ovčji virusni sevi iz reje 31, ki spadajo v genetsko skupino A, se od ostalih sevov SRLV v genu *pol* v povprečju razlikujejo za več kot 21 %. Ta podskupina ima na filogenetskem drevesu visoko statistično podporo. Kljub temu da filogenetska analiza teh sevov v genu *gagMA* ni bila mogoča, predlagamo uvrstitev teh sevov SRLV v nov podtip A15.
- Ugotovili smo prisotnost sevov MVV oziroma genetske skupine A pri kozah in potrdili možnost naravnega navzkrižnega prenosa SRLV med vrstami.
- V okviru raziskave smo razvili novo metodo PCR v realnem času za sočasno specifično določanje CAEV in MVV in razlikovanje med njima. Temelji na specifičnem pomnoževanju odseka na genu *gagMA* z uporabo hidrolizirajoče sonde TaqMan. Taka metoda do zdaj še ni bila opisana.
- Novo razvita metoda PCR v realnem času je sestavljena iz testa CAEV za specifično določanje virusov SRLV genetske skupine B in test MVV za specifično določanje virusov SRLV genetske skupine A. Ker smo obe sondi TaqMan označili s fluorescentnim poročevalskim barvilom FAM, je razlikovanje med virusi MVV in CAEV mogoče le z izvedbo v dveh ločenih reakcijah. Sočasno določanje virusov MVV in CAEV pa je omogočeno z izbiro enakih temperturnih pogojev pomnoževanja.
- Novo razvita metoda PCR v realnem času je 100-odstotno specifična in hkrati omogoča tako določanje virusnih sevov SRLV genetske skupine A in B kot ločevanje med njimi.

- Analitična občutljivost novo razvite metode PCR v realnem času je 26 molekul plazmidne DNA virusa CAEV in 72 molekul plazmidne DNA virusa MVV. Diagnostična občutljivost metode je 79 %.
- Delovanje novo razvite metode PCR v realnem času smo ovrednotili z določanjem ponovljivosti in obnovljivosti reakcije obeh testov ter z določanjem učinkovitosti pomnoževanja reakcije. Določili smo tudi R<sup>2</sup> in linearni razpon metode.
- Ponovljivost testa MVV je pri redčinah s teoretičnim številom kopij nad 100 na splošno dobra in nekoliko slabša pri redčini, ki ustreza teoretično izračunanemu številu kopij 100. Obnovljivost testa MVV je na splošno dobra. Ponovljivost in obnovljivost testa CAEV sta nekoliko slabša kot pri testu MVV. Koeficienti variacije za test CAEV pa kažejo na boljšo obnovljivost kot ponovljivost reakcije.
- Učinkovitost pomnoževanja je za test CAEV variirala med 83,73 % in 98,58 %, R<sup>2</sup> pa je bil višji od 0,985. Učinkovitost pomnoževanja testa MVV je bila od 88,56-odstotna do 96,48-odstotna, R<sup>2</sup> pa je bil višji od 0,994. Reakcija obeh testov je bila linearna v območju vseh zaporednih redčin.
- Rezultate testiranj z novo razvito metodo PCR v realnem času smo primerjali z rezultati metod LTR-PCR in *gag*-PCR. Pri primerjavi z metodo LTR-PCR, njena občutljivost je bila 54-odstotna, smo ugotovili, da je novo razvita metoda PCR v realnem času veliko bolj občutljiva, saj je bila občutljivost le-te 79-odstotna. Tudi pri primerjavi z metodo LTR-PCR in metodo *gag*-PCR, katerih skupna občutljivost je bila 71-odstotna, smo ugotovili, da je novo razvita metoda PCR v realnem času bolj občutljiva.
- Novo razvita metoda PCR v realnem času predstavlja dodatno orodje za potrditev okužbe z virusi SRLV. Primerna je tudi za zgodnje odkrivanje okužb z virusi SRLV pri živalih, ki še niso razvile specifičnih protiteles.

## 7 POVZETEK

Lentivirusi drobnice (angl. small ruminant lentiviruses, SRLV) so razširjeni v mnogih državah po svetu in tudi v Sloveniji. Na podlagi filogenetskih analiz so SRLV razvrstili v pet genetskih skupin, in sicer od A do E. Klasične diagnostične metode za določanje SRLV temeljijo predvsem na dokazovanju specifičnih protiteles s testom AGID ali s testom ELISA. Metoda PCR za dokaz provirusnega genoma v levkocitih je najpogosteje uporabljena molekularna metoda v diagnostiki SRLV. V zadnjem času se uveljavlja tudi metoda PCR v realnem času.

Namen doktorskega dela je bil določiti genotipe in odkriti morebitne nove genotipe oziroma podtipe med slovenskimi sevi SRLV ter s filogenetskimi analizami ugotoviti sorodnost med sevi SRLV, ki so razširjeni v Sloveniji, in sevi SRLV v sosednjih državah ter širše po svetu. Namen dela je tudi bil ugotoviti morebiten navzkrižen prenos sevov SRLV med živalskimi vrstami. Ugotovljene genetske lastnosti virusnih sevov nam lahko služijo tudi pri razvoju nove, hitrejše in bolj specifične metode PCR v realnem času, s katero lahko izboljšamo obstoječo molekularno diagnostiko okužb s SRLV. Ob tem je bil namen doktorskega dela razviti novo metodo PCR v realnem času z uporabo hidrolizirajočih sond TaqMan za specifično določanje MVV in CAEV ter hkrati za razlikovanje med njima. Taka metoda do zdaj še ni bila opisana.

V okviru doktorskega dela smo za ugotavljanje specifičnih protiteles proti SRLV kot presejalni test uporabili test ELISA. Pregledali smo vse serumske vzorce živali, ki smo jih vključili v raziskavo. S testom ELISA smo pregledali 1538 serumskih vzorcev živali iz 36 rej drobnice. Ugotovili smo, da je odstotek seropozitivnih koz (32,1 %) višji kot odstotek seropozitivnih ovac (24,8 %) in da je odstotek rej koz, v katerih smo ugotovili seropozitivne živali (76,2 %), višji kot odstotek rej ovac (66,7 %) in mešanih rej (44,4%), v katerih smo ugotovili seropozitivne živali. Tudi odstotek seropozitivnih živali v posameznih rejah je bil najvišji v rejah koz. Za nadaljnje raziskave smo izbrali 524 živali iz šestih rej, v katerih smo ugotovili seropozitivne živali, in sicer tri reje koz, dve reji ovac in eno mešano rejo. Vzorce polne krvi teh živali smo testirali s klasičnimi metodami PCR, da bi potrdili okužbo s SRLV. Najprej smo uporabili metodo LTR-PCR in z njo pregledali vzorce polne krvi vseh živali.

Nato smo vzorce polne krvi seropozitivnih živali, v katerih z metodo LTR-PCR nismo uspeli pomnožiti DNA SRLV, pregledali še z metodo *gag*-PCR. Z metodo LTR-PCR smo DNA SRLV pomnožili v 175 vzorcih oziroma v 54 % vzorcev, medtem ko smo skupaj z metodo LTR-PCR in metodo *gag*-PCR DNA SRLV pomnožili v 229 vzorcih oziroma v 71 % vzorcev. V petih vzorcih seronegativnih živali iz treh rej smo z metodo LTR-PCR dokazali DNA SRLV. Ugotovili smo, da je metoda PCR manj zanesljiva kot ELISA, vendar nam omogoča dokazati prisotnost virusne nukleinske kisline pred serokonverzijo.

Serumske vzorce seropozitivnih živali, pri katerih z obema prej omenjenima metodama PCR v vzorcih polne krvi nismo uspeli pomnožiti DNA SRLV, smo nato pregledali še s potrditvenima testoma WB in SU5 ELISA. Pozitiven rezultat testa ELISA smo potrdili vsaj z enim ali z obema potrditvenima testoma. S testom SU5 ELISA smo uspešno določili tudi genotip SRLV. Ugotovili smo, da je test WB manj zanesljiv pri določanju protiteles proti MVV kot pri določanju protiteles proti CAEV.

V izbranih šestih rejah smo 82 slovenskim sevom SRLV določili nukleotidna zaporedja v odseku gena *gagMA* in odseku gena *pol* in opravili filogenetske analize. Predvidevali smo, da so v Sloveniji prisotni sevi SRLV genetske skupine A in B ter v izbranih šestih rejah s filogenetskimi analizami te genotipe SRLV tudi ugotovili. Ugotovili smo tudi, da so slovenski sevi SRLV zelo heterogeni ter da ovčji sevi SRLV spadajo v genetsko skupino A in kozji sevi SRLV v gentsko skupino A in B. V dveh rejah koz smo ugotovili prisotnost SRLV tako genetske skupine A kot genetske skupine B. Kozji virusni sevi iz reje 2, ki spadajo v genetsko skupino A, se od ostalih sevov SRLV na nukleotidnem nivoju v povprečju razlikujejo za več kot 17 % v genu *gagMA* in za več kot 15 % v genu *pol*. Na podlagi visoke statistične podpore podskupine teh virusnih sevov na filogenetskem drevesu predlagamo njihovo uvrstitev v nov podtip A14. Kozji virusni sev iz reje 37, ki spada v genetsko skupino A, se od ostalih sevov SRLV v genu *pol* na nukleotidnem nivoju v povprečju razlikuje za več kot 15 % in bi lahko spadal v nov podtip znotraj genetske skupine A. Ta virusni sev pa na filogenetskem drevesu nima statistične podpore in ga nismo uvrstili v nov podtip. Ovčji virusni sevi iz reje 31, ki spadajo v genetsko skupino A, se od ostalih sevov SRLV v genu *pol* v povprečju razlikujejo za več kot 21 %. Ta podskupina ima na filogenetskem drevesu visoko statistično podporo. Kljub temu da filogenetska analiza teh sevov v genu *gagMA* ni bila mogoča, predlagamo

uvrstitev teh sevov SRLV v nov podtip A15. Ugotovili smo prisotnost sevov MVV oziroma genetske skupine A pri kozah in potrdili možnost naravnega navzkrižnega prenosa SRLV med vrstami.

Razvili smo novo metodo PCR v realnem času za specifično določanje MVV in CAEV ter razlikovanje med njima. Začetne oligonukleotide in sonde smo na podlagi pridobljenih nukleotidnih zaporedij slovenskih sevov SRLV in sevov, pridobljenih iz genske banke, načrtovali v regiji gena *gagMA*. Metoda je sestavljena iz testa za specifično določanje SRLV genetske skupine B oziroma CAEV (test CAEV) in iz testa za specifično določanje SRLV genetske skupine A oziroma MVV (test MVV). Ker smo obe sondi TaqMan označili s fluorescentnim poročevalskim barvilom FAM, je razlikovanje med virusi MVV in CAEV mogoče le z izvedbo v dveh ločenih reakcijah. Sočasno določanje virusov MVV in CAEV pa je omogočeno z izbiro enakih temperaturnih pogojev pomnoževanja. V okviru validacije novo razvite metode smo določali analitično in diagnostično specifičnost. Za preverjanje analitične specifičnosti metode smo s testom CAEV testirali referenčni virusni sev CAEV Co, virusni sev podtipa B2 in dva slovenska virusna seva podtipa B1. S testom MVV smo testirali referenčni virusni sev MVV 1514, virusna seva podtipov A3, A4 in slovenske virusne seve štirih različnih podtipov genetske skupine A. Za preverjanje specifičnosti obeh testov smo seve CAEV in MVV tudi navzkrižno testirali. Seve CAEV smo testirali s testom MVV in seve MVV s testom CAEV. Za določanje diagnostične specifičnosti metode smo s testom MVV in testom CAEV pregledali vzorce polne krvi živali iz treh rej, v katerih so bile vse živali seronegativne. Ugotovili smo, da je metoda 100-odstotno specifična in hkrati omogoča tako določanje virusnih sevov SRLV genetske skupine A in B kot ločevanje med njimi. Določali smo tudi analitično in diagnostično občutljivost metode. Analitično občutljivost oziroma mejo detekcije smo pri obeh testih določili s plazmidom, v katerega smo vstavili ustrezni produkt PCR, pridobljen s pomnoževanjem DNA referenčnih sevov CAEV in MVV. Metodo smo testirali na vzorcih polne krvi živali iz izbranih šestih rej in določili diagnostično občutljivost. Ugotovili smo, da je analitična občutljivost testa CAEV 26 molekul plazmidne DNA virusa CAEV in testa MVV 72 molekul plazmidne DNA virusa MVV, medtem ko je diagnostična občutljivost metode 79-odstotna. Delovanje metode smo ovrednotili z določanjem ponovljivosti in obnovljivosti reakcije obeh testov ter z določanjem učinkovitosti pomnoževanja reakcije. Določili smo tudi  $R^2$  in linearni razpon metode. Ponovljivost testa

MVV je pri redčinah s teoretičnim številom kopij nad 100 na splošno dobra in nekoliko slabša pri redčini, ki ustreza teoretično izračunanemu številu kopij 100. Obnovljivost testa MVV je na splošno dobra. Ponovljivost in obnovljivost testa CAEV sta nekoliko slabša kot pri testu MVV. Koeficienti variacije za test CAEV pa kažejo na boljšo obnovljivost kot ponovljivost reakcije. Učinkovitost pomnoževanja je za test CAEV variirala med 83,73 % in 98,58 %,  $R^2$  pa je bil višji od 0,985. Učinkovitost pomnoževanja testa MVV je bila od 88,56-odstotna do 96,48-odstotna,  $R^2$  pa je bil višji od 0,994. Reakcija obeh testov je bila linearна v območju vseh zaporednih redčin.

Rezultate testiranj z novo razvito metodo PCR v realnem času, ki smo jih opravili na vzorcih polne krvi živali iz izbranih šestih rej, smo primerjali z rezultati metod LTR-PCR in *gag*-PCR. Pri primerjavi z metodo LTR-PCR, katere občutljivost je bila 54-odstotna, smo ugotovili, da je novo razvita metoda PCR v realnem času precej bolj občutljiva, saj je bila občutljivost le-te 79-odstotna. Tudi pri primerjavi z metodo LTR-PCR in metodo *gag*-PCR, katerih skupna občutljivost je bila 71-odstotna, smo ugotovili, da je novo razvita metoda PCR v realnem času bolj občutljiva. V vseh petih vzorcih seronegativnih živali, v katerih smo z metodo LTR-PCR dokazali DNA SRLV, smo le-to dokazali tudi z novo razvito metodo PCR v realnem času. Novo razvita metoda predstavlja dodatno orodje za potrditev okužbe z virusi SRLV. Primerna je tudi za zgodnje odkrivanje okužb s SRLV pri živalih, ki še niso razvile specifičnih protiteles.

## 8 SUMMARY

Small ruminant lentiviruses (SRLV) are spread throughout the world, including Slovenia. Phylogenetic analysis divides SRLV into five genotypes, A to E. Detection of specific antibodies using AGID and ELISA is the most commonly used means of diagnosing SRLV infection. The most frequent molecular method for detecting the provirus genome is PCR, using peripheral blood leucocytes as target cells. Real time PCR has also recently been used.

The aim of this study was to determine the genotypes and subtypes of SRLV strains circulating in Slovenia. Phylogenetic analysis was used to establish the relationship among Slovenian SRLV strains and to compare them with other SRLV strains circulating around the world. The study also aimed to evaluate cross-species infections of SRLV. Based on the genetic characteristics of viral strains, a new, faster and more specific real-time PCR can be developed in order to improve molecular diagnostics regarding SRLV infections. A further aim of the study was to develop a new real-time PCR method using TaqMan probes for specific detection of MVV and CAEV and simultaneous differentiation between them. Such a method has not to date been described.

Within the framework of the study, the ELISA test was used as a screening test for the detection of specific antibodies against SRLV. All 1538 serum samples from the 36 flocks used in this study were tested. It was established that the percentage of seropositive goats (32.1%) was higher than the percentage of seropositive sheep (24.8%) and that the percentage of seropositive goat flocks (76.2%) was higher than the percentage of seropositive sheep flocks (66.7%) and mixed flocks (44.4%). The percentage of seropositive animals was also highest in goat flocks. Five hundred and twenty four animals from 6 seropositive flocks, 3 goat flocks, 2 sheep flocks and 1 mixed flock, were used for further examination. Classic PCR methods were used for testing whole blood samples to confirm SRLV infection. Whole blood samples from all animals were first examined with LTR-PCR. Whole blood samples from seropositive animals that were negative with LTR-PCR were then examined with *gag*-PCR. Amplification of SRLV DNA with LTR-PCR was successful in 175 samples (54%), while amplification was successful using LTR-PCR and *gag*-PCR in 229 samples (71%). SRLV DNA was amplified in five samples from seronegative animals from 3 flocks using LTR-

PCR. It was established that PCR is less reliable than ELISA. However, PCR is able to detect viral nucleic acid prior to seroconversion.

WB and SU5 ELISA were used as confirmatory tests for examination of serum samples from seropositive animals that were negative using the aforementioned PCR methods. The ELISA positive result was confirmed with at least one of the confirmatory tests or with both. SU5 ELISA was also used to define the SRLV genotype. It was established that WB is less reliable for the detection of MVV antibodies than for the detection of CAEV antibodies.

Nucleotide sequences of 82 Slovenian SRLV strains from the 6 selected flocks were determined in the *gagMA* gene region and the *pol* gene region and phylogenetic analyses were conducted. The assumption that Slovenian SRLV strains belong to genotypes A and B was confirmed in the selected 6 flocks. It was established that Slovenian SRLV strains are highly heterogeneous, with ovine strains belonging to genotype A and caprine strains to genotypes A and B. Virus sequences from genotype A and B were found to circulate within two goat flocks. Goat virus strains from flock 2, which belong to genotype A, differed at the nucleotide level from all other SRLV strains by more than 17% in relation to the *gagMA* gene and by more than 15% in relation to the *pol* gene. Based on the high bootstrap support of this cluster on the phylogenetic tree, we propose classifying this virus strain to a new subtype A14. The goat virus strain from flock 37, belonging to genotype A, differed at the nucleotide level from all other SRLV strains by more than 15% in relation to the *pol* gene. This virus strain could not be classified to a new subtype due to no statistical support on the phylogenetic tree. A sheep virus strain from flock 31, which belongs to genotype A, differed at the nucleotide level from all other SRLV strains by more than 21% in relation to the *pol* gene. Despite the lack of sequence information concerning the *gagMA* gene and based on the high bootstrap support of this cluster on the phylogenetic tree, we propose classifying this virus strain to a new subtype A15. Goat virus strains belonging to genotype A or to MVV strains were also found in this study, which confirms the possibility of cross-species virus transmissions.

A new real time PCR method for specific detection of MVV and CAEV and differentiation between them was developed. The primers and probes were designed in the *gagMA* gene region based on nucleotide sequences from Slovenian strains and nucleotide sequences retrieved from GenBank. Two assays were designed, namely a CAEV assay for specific detection of genotype B SRLV strains and MVV assay for specific detection of genotype A SRLV strains. Since both TaqMan probes were labeled with the fluorescent reporter dye FAM, differentiation between MVV and CAEV was only possible using two separate reactions. The same annealing temperatures for both assays enabled simultaneous detection of MVV and CAEV. The analytical and diagnostic specificity were evaluated. The analytical specificity of the CAEV assay was evaluated with the reference virus strain CAEV Co, virus subtype B2 strain and with two Slovenian B1 strains. The reference virus strain MVV KV1514, virus subtype A3, A4 strains and Slovenian strains of 4 different subtypes belonging to genotype A were tested with the MVV assay. For cross reactivity, the genotype A strains were tested with the CAEV assay and the genotype B strains were tested with the MVV assay. The diagnostic specificity was evaluated by testing whole blood samples from animals from 3 seronegative flocks with the CAEV and MVV assay. It was established that the method is 100% specific and enables detection of genotype A and B SRLV strains as well as differentiation between them. The analytical and diagnostic sensitivity were also evaluated. The analytical sensitivity, or the limit of detection, was determined using two plasmid standards that were prepared with PCR products. The PCRs were performed using reference virus strains CAEV Co and MVV KV1514. The diagnostic sensitivity of the method was tested using whole blood samples from animals from the 6 selected flocks. It was established that the analytical sensitivity of the CAEV and MVV assay was 26 and 72 plasmid molecules, respectively, while the diagnostic sensitivity was 79%. The repeatability and reproducibility, together with the efficiency of the reaction, were determined to evaluate the performance of the method.  $R^2$  and the dynamic range were also determined. When using the MVV assay, dilutions with theoretical copy number above 100 showed overall good repeatability, while the dilution with theoretical copy number 100 was slightly worse. The reproducibility of the MVV assay was generally good. The CAEV assay exhibited slightly worse repeatability and reproducibility than the MVV assay, with the coefficient of variance showing better reproducibility than repeatability. The efficiency of the CAEV assay varied between 83.73% and 98.58%, with  $R^2$  being higher than 0.985. The efficiency of the MVV assay varied

between 88.56% and 96.48%, with  $R^2$  being higher than 0.994. Both assays had a wide dynamic range, detecting all serial dilutions.

Comparison of testing the whole blood samples from the 6 selected flocks with the new real time PCR and LTR-PCR together with *gag*-PCR showed a better performance of real time PCR. Real time PCR showed a sensitivity of 79%, which is better than the sensitivity of LTR-PCR and LTR-PCR together with *gag*-PCR, which showed a sensitivity of 54% and 71%, respectively. The new real time PCR also detected all of the 5 samples from seronegative animals that were LTR-PCR positive. The new real time PCR can serve as an additional tool for confirming infection with SRLV and is also useful for early detection of infected animals prior to seroconversion.

## 9 ZAHVALE

Mentorju prof. dr. Jožetu Gromu in somentorici prof. dr. Darji Barlič-Maganji se zahvaljujem za vso strokovno pomoč, vodenje in nasvete pri nastajanju doktorskega dela.

Za podporo in pomoč se zahvaljujem tudi vsem svojim sodelavcem z Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo. Za pomoč pri laboratorijskem delu in izčrpne razprave pa se še posebno zahvaljujem sodelavkam in prijateljicam z virologije.

Sodelavcem s Klinike za prežvekovalce z ambulatorno klinikou in predvsem prof. dr. Tomažu Zadniku se zahvaljujem za pomoč pri odvzemu vzorcev.

Iskreno zahvalo za strokovno pomoč, koristne nasvete in izvedbo testov WB in SU5 ELISA namenjam dr. Giuseppe Berthoniju in njegovim sodelavcem z Inštituta za veterinarsko virologijo Univerze v Bernu (Švica).

Zahvaljujem se članom komisije, prof. dr. Petru Hostniku, prof. dr. Tomažu Zadniku in prof. dr. Mariu Poljaku za natančen pregled in predloge za izboljšanje doktorskega dela.

Za natančen pregled citirane literature se zahvaljujem vodji Centra za informatiko in knjižnico na Veterinarski fakulteti mag. Brigit Grečs-Smole. Za lektoriranje doktorskega dela se zahvaljujem lektorici Vidi Meško in lektorju Martinu Cregeenu.

Najlepša in iskrena hvala pa moji družini, ki me vedno vzpodbuja in mi stoji ob strani.

## 10 LITERATURA

- Adams DS, Crawford TB, Klevjer-Anderson P. A pathogenetic study of the early connective tissue lesions of viral caprine arthritis-encephalitis. *Am J Pathol* 1980; 99(2): 257–78.
- Adams DS, Gorham JR. The gp135 of caprine arthritis encephalitis virus affords greater sensitivity than the p28 in immunodiffusion serology. *Res Vet Sci* 1986; 40: 157–60.
- Agnarsdóttir G, Thorsteinsdóttir H, Oskarsson T, et al. The long terminal repeat is a determinant of cell tropism of maedi-visna virus. *J Gen Virol* 2000; 81(8):1901–5.
- Ali Al Ahmad MZ, Fieni F, Guiguen F, et al. Cultured early goat embryos and cells are susceptible to infection with caprine encephalitis virus. *Virology* 2006; 353(2): 307–15.
- Ali Al Ahmad MZ, Fieni F, Pellerin JL, et al. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. *Theriogenology* 2008; 69(4): 473–80.
- Alvarez V, Arranz J, Databuit-Test M, et al. Relative contribution of colostrum from maedi-visna virus (MVV) infected ewes to MVV-seroprevalence in lambs. *Res Vet Sci* 2005; 78(3): 237–43.
- Anderson LW, Klevjer-Anderson P, Liggett HD. Susceptibility of blood-derived monocytes and macrophages to caprine arthritis-encephalitis virus. *Infect Immun* 1983; 41: 837–40.
- Andrésdóttir V, Tang X, Agnarsdóttir G, et al. Biological and genetic differences between lung- and brain-derived isolates of maedi-visna virus. *Virus Genes* 1998; 16(3): 281–93.
- Andrésson OS, Elser JE, Tobin GJ, et al. Nucleotide sequence and biological properties of a pathogenic proviral molecular clone of neurovirulent visna virus. *Virology* 1993; 193(1): 89–105.
- Angelopoulou K, Karanikolaoub K, Papanastasopouloub M, et al. First partial characterization of small ruminant lentiviruses from Greece. *Vet Microbiol* 2005; 109: 1–9.
- Angelopoulou K, Poutahidis T, Brellou GD, Greenland T, Vlemmas I. A deletion in the R region of long terminal repeats in small ruminant lentiviruses is associated with decreased pathology in the lung. *Vet J* 2008; 175(3): 346–55.
- Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5(2): 209–19.
- Banks KL, Adams DS, McGuire TC, Carlson J. Experimental infection of sheep by caprine arthritis-encephalitis virus and goats by progressive pneumonia virus. *Am J Vet Res* 1983; 44(12): 2307–11.
- Barber SA, Bruett L, Clements JE. Involvement of a membrane-associated serine/threonine kinase complex in cellular binding of visna virus. *Virology* 2000; 274(2): 321–30.

Barquero N, Arjona A, Domenech A, et al. Diagnostic performance of PCR and ELISA on blood and milk samples and serological survey for small ruminant lentiviruses in central Spain. *Vet Rec* 2011; 168(1): 20.

Barros SC, Ramos F, Duarte M, Fagulha T, Cruz B, Fevereiro M. Genomic characterization of a slow/low maedi visna virus. *Virus Genes* 2004; 29(2): 199–210.

Beerens N, Berkhout B. The tRNA primer activation signal in the human immunodeficiency virus type 1 genome is important for initiation and processive elongation of reverse transcription. *J Virol* 2002; 76: 2329–39.

Belak S. Molecular diagnosis of viral diseases, present trends and future aspects: A view from the OIE collaborating centre for the application of polymerase chain reaction methods for diagnosis of viral disease in veterinary medicine. *Vaccine* 2007; 25: 5444–52.

Benavides J, García-Pariente C, Ferreras MC, Fuertes M, García-Marín JF, Pérez V. Diagnosis of clinical cases of the nervous form of Maedi-Visna in 4- and 6-month-old lambs. *Vet J* 2007; 174(3): 655–8.

Benavides J, Gómez N, Gelmetti D, et al. Diagnosis of the nervous form of Maedi-Visna infection with a high frequency in sheep in Castilla y Leon, Spain. *Vet Rec* 2006a; 158(7): 230–5.

Benavides J, Fuertes M, García-Pariente C, Ferreras MC, García Marín JF, Pérez V. Natural cases of visna in sheep with myelitis as the sole lesion in the central nervous system. *J Comp Pathol* 2006b; 134(2-3): 219–0.

Berkhout B. Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1996; 54: 1–34.

Berkhout B. Multiple biological roles associated with the repeat (R) region of the HIV-1 RNA genome. *Adv Pharmacol* 2000; 48: 29–73.

Bertolotti L, Mazzei M, Puggioni G, et al. Characterization of new small ruminant lentivirus subtype B3 suggests animal trade within the Mediterranean Basin. *J Gen Virol* 2011; 92: 1923–29.

Bertoni G, Blacklaws B. Small ruminant lentiviruses and cross-species transmission. In: Desport M, ed. *Lentiviruses and macrophages, molecular and cellular interactions*. Norfolk: Caister Academic Press, 2010: 277–306.

Blacklaws BA, Berriatua E, Torsteinsdóttir S, et al. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet Microbiol* 2004; 101(3): 199–208.

Blacklaws BA. Small ruminant lentiviruses: immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2012; 35(3): 259–69.

Brinkhof JMA, van Maanen C, Wigger R, Peterson K, Houwers DJ. Specific detection of small ruminant lentiviral nucleic acid sequences located in the proviral long terminal repeat and leader-gag regions using real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2008; 147: 338–44.

Brinkhof JMA, van Maanen C. Detection and control of lentiviral infections in sheep and goats. *Vet Sci Tomorrow* 2010; 2010(1): e review, 26 January (18 str.) <http://www.vetscite.org/publish/articles/000090/index.html> (21. maj 2013)

Bruett L, Barber SA, Clements JE. Characterization of a membrane-associated protein implicated in visna virus binding and infection. *Virology* 2000; 271(1): 132–41.

Bulgin MS. Ovine progressive pneumonia, caprine arthritis-encephalitis, and related lentiviral diseases of sheep and goats.

*Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1990; 6: 691–704.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25(2): 169–93.

Bustin SA. A-Z of quantitative PCR. La Jolla: International university line, 2004: 882 str.

Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *J Mol Endocrinol* 2005; 34: 597–601.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55(4): 611–22.

Carrozza ML, Mazzei M, Bandecchi P, et al. Development and comparison of strain specific gag and pol real-time PCR assays for the detection of Visna/maedi virus. *J Virol Methods* 2010; 165(2): 161–67.

Castro RS, Greenland T, Leite RC, Gouveia A, Mornex JF, Cordier G. Conserved sequence motifs involving the tat reading frame of Brazilian caprine lentiviruses indicate affiliations to both caprine arthritis-encephalitis virus and visna-maedi virus. *J Gen Virol* 1999; 80 (7):1583–9.

Celer V Jr, Celer V, Nejedlá E, Bertoni G, Peterhans E, Zanoni RG. The detection of proviral DNA by semi-nested polymerase chain reaction and phylogenetic analysis of Czech maedi-visna isolates based on gag gene sequences.

*J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2000; 47(3): 203–15.

Chebloune Y, Sheffer D, Karr BM, Stephens E, Narayan O. Restrictive type of replication of ovine/caprine lentiviruses in ovine fibroblast cell cultures. *Virology* 1996; 222: 21–30.

Cheevers WP, Roberson S, Klevjer-Anderson P, Crawford TB. Characterization of caprine arthritis-encephalitis virus: a retrovirus of goats. *Arch Virol* 1981; 67(1):111–7.

- Cheevers WP, Stem TA, Knowles DP, McGuire TC. Precursor polypeptides of caprine arthritis-encephalitis lentivirus structural proteins. *J Gen Virol* 1988a; 69(3): 675–81.
- Cheevers WP, Knowles DP, McGuire TC, Cunningham DR, Adams DS, Gorham JR. Chronic disease in goats orally infected with two isolates of the caprine arthritis-encephalitis lentivirus. *Lab Invest* 1988b; 58: 510–7.
- Clements JE, Zink MC. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9(1): 100–17.
- Cork LC, Hadlow WJ, Crawford TB, Gorham JR, Piper RC. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *J Infect Dis* 1974; 129(2): 134–41.
- Cork LC. Differential diagnosis of viral leukoencephalomyelitis of goats. *J Am Vet Med Assoc* 1976; 169(12): 1303–6.
- Cork LC, Narayan O. The pathogenesis of viral leukoencephalomyelitis-arthritis of goats. I. Persistent viral infection with progressive pathologic changes. *Lab Invest* 1980; 42(6): 596–602.
- Crane SE, Clements JE, Narayan O. Separate epitopes in the envelope of visna virus are responsible for fusion and neutralization: biological implications for anti-fusion antibodies in limiting virus replication. *J Virol* 1988; 62: 2680–5.
- Crawford TB, Adams DS, Cheevers WP, Cork LC. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science* 1980a; 207(4434): 997–9.
- Crawford TB, Adams DS, Sande RD, Gorham JR, Henson JB. The connective tissue component of the caprine arthritis-encephalitis syndrome. *Am J Pathol* 1980b; 100(2): 443–54.
- Crawford TB, Adams DS. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *J Am Vet Med Assoc* 1981; 178(7): 713–9.
- Crespo H, Reina R, Glaria I, et al. Identification of the ovine mannose receptor and its possible role in Visna/Maedi virus infection. *Vet Res* 2011; 42(1): 28.
- Dalziel RG, Hopkins J, Watt NJ, Dutia BM, Clarke HA, McConnell I. Identification of a putative cellular receptor for the lentivirus visna virus. *J Gen Virol* 1991; 72 (8):1905–11.
- Davis JL, Clements JE. Characterization of a cDNA clone encoding the visna virus transactivating protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(2): 414–8.
- Dawson M. The detection of precipitating antibodies to lentivirus antigens in goat sera using two immunodiffusion assays. In: Sharp JM, Hoff-Jørgensen R, eds. *Slow viruses in sheep, goats and cattle*. Report EUR 8076. Luxembourg: Commission of the European Communities, 1985; 233–8.

de Andrés D, Klein D, Watt NJ, et al. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Vet Microbiol* 2005; 107(1/2): 49–62.

Deng P, Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Brogden KA. Ultrastructure and frequency of mastitis caused by ovine progressive pneumonia virus infection in sheep. *Vet Pathol* 1986; 23(2): 184–9.

Desrosiers RC. Nonhuman lentiviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2007: 2215–43.

Dickson J, Ellis T. Experimental caprine retrovirus infection in sheep. *Vet Rec* 1989; 125(26/27): 649.

Ellis JA, Russell HI, Du CW. Effect of selected cytokines on the replication of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and ovine lentiviruses in pulmonary macrophages. *Vet Immunol Immunopathol* 1994; 40: 31–47.

Erhouma E, Guiguen F, Chebloune Y, et al. Small ruminant lentivirus proviral sequences from wild ibexes in contact with domestic goats. *J Gen Virol* 2008; 89: 1478–84.

Extramiana AB, Gonzalez L, Cortabaria N, Garcia M, Juste RA. Evaluation of a PCR technique for the detection of maedi-visna proviral DNA in blood, milk and tissue samples of naturally infected sheep. *Small Ruminant Res* 2002; 44: 109–18.

Fredericks DN, Relman DA. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 475–86.

Freed EO, Martin MA. HIVs and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2007: 2107–85.

Gallaher WR, Ball JM, Garry RF, Griffin MC, Montelaro RC. A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1989; 5(4): 431–40.

Gendelman HE, Narayan O, Molineaux S, Clements JE, Ghotbi Z. Slow, persistent replication of lentiviruses: role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 7086–90.

Gendelman HE, Narayan O, Kennedy-Stoskopf S, et al. Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *J Virol* 1986; 58: 67–74.

Georgsson G, Nathanson NP, Pálsson PA, Pétursson G. The pathology of visna and maedi in sheep. *Front Biol* 1976; 44: 61–96.

Georgsson G, Houwers DJ, Pálsson PA, Pétursson G. Expression of viral antigens in the central nervous system of visna-infected sheep: an immunohistochemical study on

experimental visna induced by virus strains of increased neurovirulence. *Acta Neuropathol* 1989; 77: 299–306.

Germain K, Valas S. Distribution and heterogeneity of small ruminant lentivirus envelope subtypes in naturally infected French sheep. *Virus Res* 2006; 120(1/2): 156–62.

Giammarioli M, Bazzucchi M, Puggioni G, et al. Phylogenetic analysis of small ruminant lentivirus (SRLV) in Italian flocks reveals the existence of novel genetic subtypes. *Virus Genes* 2011; 43(3): 380–4.

Gil A, Rola M, Kužmak J. Application of PCR technique in diagnosis of small ruminant lentivirus infection in sheep and goats. *Pol J Vet Sci* 2006; 9(4): 213–7.

Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002; 30: 503–12.

Gjerset B, Storset AK, Rimstad E. Genetic diversity of small-ruminant lentiviruses: characterization of Norwegian isolates of Caprine arthritis encephalitis virus. *J Gen Virol* 2006; 87: 573–80.

Gjerset B, Jonassen CM, Rimstad E. Natural transmission and comparative analysis of small ruminant lentiviruses in the Norwegian sheep and goat populations. *Virus Res* 2007; 125(2): 153–61.

Glaria I, Reina R, Crespo H, et al. Phylogenetic analysis of SRLV sequences from an arthritic sheep outbreak demonstrates the introduction of CAEV-like viruses among Spanish sheep. *Vet Microbiol* 2009; 138(1/2): 156–62.

Goff SP. Retroviridae: the retroviruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2007: 1999–2069.

Grego E, Bertolotti L, Quasso A, et al. Genetic characterization of small ruminant lentivirus in Italian mixed flocks: evidence for novel genotype circulating in local goat population. *J Gen Virol* 2007; 88: 3423–7.

Grom J, Barlic-Maganja D, Hostnik P. Maedi-visna virus infections of sheep and CAEV infections of goats. In: The 6<sup>th</sup> congress of Mediterranean federation for health and production of ruminants: proceedings. Postojna: Slovenian Buiatric Association, 1998: 158–60.

Grossi P, Giudice C, Bertoletti I, et al. Immunohistochemical detection of the p27 capsid protein of caprine arthritis–encephalitis virus (CAEV) in bone-marrow cells of seropositive goats. *J Comp Pathol* 2005; 133: 197–200.

Gu X, Zhang J. A simple method for estimating the parameter of substitution rate variation among sites. *Mol Biol Evol* 1997; 14: 1106–13.

Gudmundsson B, Bjarnadóttir H, Kristjansdóttir S, Jonsson JJ. Quantitative assays for maedi-visna virus genetic sequences and mRNA's based on RT-PCR with real-time FRET measurements. *Virology* 2003; 307(1): 135–42.

Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 2003; 52(5): 696–704.

Gunson RN, Collins TC, Carman WF. Practical experience of high throughput real time PCR in routine diagnostic virology setting. *J Clin Virol* 2006; 35: 355–67.

Haase AT. Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature* 1986; 322: 130–6.

Harmache A, Bouyac M, Audoly G, et al. The vif gene is essential for efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goat synovial membrane cells and affects the late steps of the virus replication cycle. *J Virol* 1995a; 69(6): 3247–57.

Harmache A, Vitu C, Russo P, et al. The caprine arthritis encephalitis virus tat gene is dispensable for efficient viral replication in vitro and in vivo. *J Virol* 1995b; 69(9): 5445–54.

Harmache A, Russo P, Guiguen F, et al. Requirement of caprine arthritis encephalitis virus vif gene for in vivo replication. *Virology* 1996; 224: 246–55.

Harris RS, Liddament MT. Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(11): 868–77.

Heckert RA, McNab WB, Richardson SM, Briscoe MR. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goat serum. *Can J Vet Res* 1992; 56(3): 237–41.

Herrmann LM, Cheevers WP, Marshall KL, et al. 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* 2003a; 10(5): 862–5.

Herrmann LM, Cheevers WP, McGuire TC, et al. 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* 2003b; 10(2): 267–71.

Herrmann LM, Hötzl I, Cheevers WP, On Top KP, Lewis GS, Knowles DP. Seven new ovine progressive pneumonia virus (OPPV) field isolates from Dubois Idaho sheep comprise part of OPPV clade II based on surface envelope glycoprotein (SU) sequences. *Virus Res* 2004; 102(2): 215–20.

Herrmann LM, McGuire TC, Hötzl I, Lewis GS, Knowles DP. Surface envelope glycoprotein is B-lymphocyte immunodominant in sheep naturally infected with ovine progressive pneumonia virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12(6): 797–800.

Herrmann-Hoesing LM, White SN, Lewis GS, Mousel MR, Knowles DP. Development and validation of an ovine progressive pneumonia virus quantitative PCR. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14(10): 1274–8.

Herrmann-Hoesing LM. Diagnostic assays used to control small ruminant lentiviruses. *J Vet Diagn Invest* 2010; 22(6): 843–55.

Hess JL, Pyper JM, Clements JE. Nucleotide sequence and transcriptional activity of the caprine arthritis-encephalitis virus long terminal repeat. *J Virol* 1986; 60(2): 385–93.

Hess JL, Small JA, Clements JE. Sequences in the visna virus long terminal repeat that control transcriptional activity and respond to viral trans-activation: involvement of AP-1 sites in basal activity and trans-activation. *J Virol* 1989; 63(7): 3001–15.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993; 11(9): 1026–30.

Hoff-Jorgensen R. Diagnostic methods. In: Pétursson G, Hoff-Jorgensen R, eds. Maedi-visna and related diseases. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990: 75–81.

Holmes RK, Malim MH, Bishop KN. APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing? *Trends Biochem Sci* 2007; 32(3): 118–28.

Hotzel I, Cheevers WP. Host range of small-ruminant lentivirus cytopathic variants determined with a selectable caprine arthritis-encephalitis virus pseudotype system. *J Virol* 2001; 75: 7384–91.

Hotzel I, Cheevers WP. A maedi-visna virus strain K1514 receptor gene is located in sheep chromosome 3p and the syntenic region of human chromosome 2. *J Gen Virol* 2002a; 83: 1759–64.

Hotzel I, Cheevers W. Differential receptor usage of small ruminant lentiviruses in ovine and caprine cells: host range but not cytopathic phenotype is determined by receptor usage. *Virology* 2002b; 301: 21–31.

Houwers DJ, Gielkens AL. An ELISA for the detection of maedi-visna antibody. *Vet Rec* 1979; 104(26): 611.

Houwers DJ, Gielkens AL, Schaake J Jr. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to maedi-visna virus. *Vet Microbiol* 1982; 7(3): 209–19.

Houwers DJ, Schaake J Jr. An improved ELISA for the detection of antibodies to ovine and caprine lentiviruses, employing monoclonal antibodies in a one-step assay. *J Immunol Methods* 1987; 98(1): 151–4.

- Houwers DJ, Pekelder JJ, Akkermans JW, van der Molen EJ, Schreuder BE. Incidence of indurative lymphocytic mastitis in a flock of sheep infected with maedi-visna virus. *Vet Rec* 1988; 122(18): 435–7.
- Houwers DJ, Nauta IM. Immunoblot analysis of the antibody response to ovine lentivirus infections. *Vet Microbiol* 1989; 19(2): 127–39.
- Kalinski H, Yaniv A, Mashiah P, Miki T, Tronick SR, Gazit A. rev-like transcripts of caprine arthritis encephalitis virus. *Virology* 1991; 183(2): 786–92.
- Karanikolaou K, Angelopoulou K, Papanastasopoulou M, Koumpati-Artopiou M, Papadopoulos O, Koottopoulos G. Detection of small ruminant lentiviruses by PCR and serology tests in field samples of animals from Greece. *Small Rumin Res* 2005; 58: 181–7.
- Kennedy-Stoskopf S, Narayan O, Strandberg JD. The mammary gland as a target organ for infection with caprine arthritis-encephalitis virus. *J Comp Pathol* 1985; 95: 609–17.
- Klevjer-Anderson P, Adams DS, Anderson LW, Banks KL, McGuire TC. A sequential study of virus expression in retrovirus-induced arthritis of goats. *J Gen Virol* 1984; 65(9): 1519–25.
- Knowles D Jr, Cheevers W, McGuire T, Stem T, Gorham J. Severity of arthritis is predicted by antibody response to gp135 in chronic infection with caprine arthritis-encephalitis virus. *J Virol* 1990; 64(5): 2396–8.
- Knowles DP Jr, Evermann JF, Shropshire C, et al. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus. *J Clin Microbiol* 1994; 32(1): 243–5.
- Kreuzer KA, Bohn A, Lass U, Peters UR, Schmidt CA. Influence of DNA polymerases on quantitative PCR results using TaqMan probe format in the LightCycler instrument. *Mol Cell Probes* 2000; 14: 57–60.
- Krieg A, Peterhans E. Caprine arthritis-encephalitis in Switzerland: epidemiologic and clinical studies. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1990; 132(7): 345–52.
- Kristbjörnsdóttir HB, Andrésdóttir V, Svansson V, Torsteinsdóttir S, Matthíasdóttir S, Andrésson OS. The vif gene of maedi-visna virus is essential for infectivity in vivo and in vitro. *Virology* 2004; 318(1): 350–9.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27(2-3): 95–125.
- Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, et al. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 655–61.
- Kuzmak J, Rola M, Gallay K, Chebloun Y. Molecular characterization of lentiviruses from goats from Poland based on gag gene sequence analysis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2007; 30(4): 211–23.

Kwang J, Keen J, Cutlip RC, Littledike ET. Evaluation of an ELISA for detection of ovine progressive pneumonia antibodies using a recombinant transmembrane envelope protein. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5(2): 189–93.

Laamanen I, Jakava-Viljanen M, Sihvonen L. Genetic characterization of maedi-visna virus (MVV) detected in Finland. *Vet Microbiol* 2007; 122(3/4): 357–65.

LaRue RS, Lengyel J, Jónsson SR, Andrésdóttir V, Harris RS. Lentiviral Vif degrades the APOBEC3Z3/APOBEC3H protein of its mammalian host and is capable of cross-species activity. *J Virol* 2010; 84(16): 8193–201.

Lee WC, McConnell I, Blacklaws BA. Electron microscope studies of the replication of a British isolate of maedi visna virus in macrophages and skin cell lines. *Vet Microbiol* 1996; 49: 93–104.

Leginagoikoa I, Daltabuit-Test M, Alvarez V, et al. Horizontal maedi-visna virus (MVV) infection in adult dairy-sheep raised under varying MVV-infection pressures investigated by ELISA and PCR. *Res Vet Sci* 2006; 80(2): 235–41.

Lerondelle C, Godet M, Mornex JF. Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. *Vet Res* 1999; 30: 467–74.

Leroux C, Vuillermoz S, Mornex JF, Greenland T. Genomic heterogeneity in the pol region of ovine lentiviruses obtained from bronchoalveolar cells of infected sheep from France. *J Gen Virol* 1995; 76(6): 1533–7.

Leroux C, Chastang J, Greenland T, Mornex JF. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Arch Virol* 1997; 142(6): 1125–37.

Lin FH, Papini M. Evidence for two forms of RNA-dependent DNA polymerase in visna virus. *Biochim Biophys Acta* 1979; 561(2): 383–95.

Lyall JW, Solanky N, Tiley LS. Restricted species tropism of maedivisna virus strain EV-1 is not due to limited receptor distribution. *J Gen Virol* 2000; 81: 2919–27.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 1292–305.

Mackay IM. Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization. Norfolk: Caister Academic Press, 2007: 454 str.

Malashkevich VN, Singh M, Kim PS. The trimer-of-hairpins motif in membrane fusion: visna virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 8502–6.

McNeilly TN, Tennant P, Luján L, Pérez M, Harkiss GD. Differential infection efficiencies of peripheral lung and tracheal tissues in sheep infected with visna/maedi virus via the respiratory tract. *J Gen Virol* 2007; 88(2): 670–9.

McNeilly TN, Baker A, Brown JK, et al. Role of alveolar macrophages in respiratory transmission of visna/maedi virus. *J Virol* 2008; 82(3): 1526–36.

Mordasini F, Vogt HR, Zahno ML, et al. Analysis of the antibody response to an immunodominant epitope of the envelope glycoprotein of a lentivirus and its diagnostic potential. *J Clin Microbiol* 2006; 44(3): 981–91.

Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990; 262: 56–61, 64–5.

Murphy BG, Hotzel I, Jasmer DP, Davis WC, Knowles D. TNFalpha and GM-CSF-induced activation of the CAEV promoter is independent of AP-1. *Virology* 2006; 352: 188–99.

Münk C, Landau NR. Production and use of HIV-1 luciferase reporter viruses. *Curr Protoc Pharmacol* 2003; Chapter 12: Unit 12.5.: e Figure 12.5.1 <http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/CPUnit/refId-ph1205.html> (21. maj 2013)

Narayan O, Wolinsky JS, Clements JE, Strandberg JD, Griffin DE, Cork LC. Slow virus-replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna viruses of sheep and goats. *J Gen Virol* 1982; 59: 345–56.

Narayan O, Kennedy-Stoskopf S, Sheffer D, Griffin DE, Clements JE. Activation of caprine arthritis encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infect Immun* 1983; 41: 67–73.

Narayan O, Cork LC. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. *Rev Infect Dis* 1985; 7: 89–98.

Narayan O, Clements JE. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J Gen Virol* 1989; 70(7): 1617–39.

Niesalla H, McNeilly TN, Ross M, Rhind SM, Harkiss GD. Experimental infection of sheep with visna/maedi virus via the conjunctival space. *J Gen Virol* 2008; 89(6): 1329–37.

Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 2006; 1(3): 1559–82.

Norman S, Smith MC. Caprine arthritis-encephalitis: review of the neurologic form in 30 cases. *J Am Vet Med Assoc* 1983; 182(12): 1342–5.

Olech M, Rachid A, Croisé B, Kuźmak J, Valas S. Genetic and antigenic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in Poland. *Virus Res* 2012; 163(2): 528–36.

Oliver RE, Gorham JR, Parish SF, Hadlow WJ, Narayan O. Ovine progressive pneumonia: pathologic and virologic studies on the naturally occurring disease. *Am J Vet Res* 1981; 42(9): 1554–9.

Oliver RE, McNiven RA, Julian AF, Poole WS. Experimental infection of sheep and goats with caprine arthritis-encephalitis virus. *N Z Vet J* 1982; 30(10): 158–9.

Oskarsson T, Hreggvidsdóttir HS, Agnarsdóttir G, et al. Duplicated sequence motif in the long terminal repeat of maedi-visna virus extends cell tropism and is associated with neurovirulence. *J Virol* 2007; 81(8): 4052–7.

O'Sullivan BM, Eaves FW, Baxendell SA, Rowan KJ. Leukoencephalomyelitis of goat kids. *Aust Vet J* 1978; 54(10): 479–3.

Pálsson PA. Maedi and visna in sheep. *Front Biol* 1976; 44: 17–43.

Pálsson PA. Maedi / visna of sheep in Iceland. Introduction of the disease to Iceland, clinical features, control measures and eradication. In: Sharp J, Hoff-Jörgensen R, eds. Slow viruses in sheep, goats and cattle. Report EUR 8076. Luxembourg: Commission of the European Communities, 1985: 3–19.

Pearl LH, Taylor WR. A structural model for the retroviral proteases. *Nature* 1987; 329(6137): 351–4.

Peluso R, Haase A, Stowring L, Edwards M, Ventura P. A Trojan Horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes. *Virology* 1985; 147: 231–6.

Pépin M, Vitu C, Russo P, Mornex JF, Peterhans E. Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Vet Res* 1998; 29(3/4): 341–67.

Peterhans E, Greenland T, Badiola J, et al. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet Res* 2004; 35(3): 257–74.

Peterson K, Brinkhof J, Houwers DJ, Colenbrander B, Gadella BM. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology* 2008; 69(4): 433–42.

Pétursson G, Nathanson N, Georgsson G, Panitch H, Pálsson PA. Pathogenesis of visna. I. Sequential virologic, serologic, and pathologic studies. *Lab Invest* 1976; 35(4): 402–12.

Pétursson G. Maedi-visna: etiology and immune response. In: Pétursson G, Hoff-Jorgensen R, eds. Maedi-visna and related diseases. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 1990: 55–74.

Pétursson G, Turelli P, Matthíasdóttir S, et al. Visna virus dUTPase is dispensable for neuropathogenicity. *J Virol* 1998; 72(2): 1657–61.

Pisoni G, Quasso A, Moroni P. Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: evidence for natural transmission from goats to sheep. *Virology* 2005; 339: 147–52.

Pisoni G, Bertoni G, Boettcher P, Ponti W, Moroni P. Phylogenetic analysis of the gag region encoding the matrix protein of small ruminant lentiviruses: comparative analysis and molecular epidemiological applications. *Virus Res* 2006; 116(1/2): 159–7.

Pisoni G, Moroni P, Turin L, Bertoni G. Compartmentalization of small ruminant lentivirus between blood and colostrum in infected goats. *Virology* 2007; 369: 119–30.

Pisoni G, Bertoni G, Manarolla G, et al. Genetic analysis of small ruminant lentiviruses following lactogenic transmission. *Virology* 2010; 407: 91–9.

Pravilnik o izvajjanju sistematičnega spremeljanja stanja kužnih bolezni in cepljenj živali v letu 2005. Ur List RS 2004; 142: 16872 (30.12.2004).

Pyper JM, Clements JE, Gonda MA, Narayan O. Sequence homology between cloned caprine arthritis encephalitis virus and visna virus, two neurotropic lentiviruses. *J Virol* 1986; 58(2): 665–70.

Querat G, Audoly G, Sonigo P, Vigne R. Nucleotide sequence analysis of SA-OMVV, a visna-related ovine lentivirus: phylogenetic history of lentiviruses. *Virology* 1990; 175(2): 434–47.

Ravazzolo AP, Nenci C, Vogt HR, et al. Viral load, organ distribution, histopathological lesions and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology* 2006; 350: 116–27.

Raymaekers M, Smets R, Maes B, Cartuyvels R. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *J Clin Lab Anal* 2009; 23(3): 145–51.

Reina R, Mora MI, Glaria I, et al. Molecular characterization and phylogenetic study of maedi visna and caprine arthritis encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Res* 2006; 121(2): 189–98.

Reina R, Berriatua E, Luján L, et al. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. *Vet J* 2009; 182(1): 31–7.

Reina R, Bertolloti L, Dei Giudici S, et al. Small ruminant lentivirus genotype E is widespread in Sarda goat. *Vet Microbiol* 2010; 144: 24–31.

Rimstad E, East N, DeRock E, Higgins J, Pedersen NC. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus using recombinant gag proteins. *Arch Virol* 1994; 134(3-4): 345–56.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997; 245: 154–60.

Rolland M, Mooney J, Valas S, Perrin G, Mamoun RZ. Characterisation of an Irish caprine lentivirus strain--SRLV phylogeny revisited. *Virus Res* 2002; 85: 29–39.

- Rosati S, Kwang J, Tolari F, Keen J. A comparison of whole virus and recombinant transmembrane ELISA and immunodiffusion for detection of ovine lentivirus antibodies in Italian sheep flocks. *Vet Res Commun* 1994; 18(1): 73–80.
- Ryan S, Tiley L, McConnell I, Blacklaws B. Infection of dendritic cells by the Maedi-Visna lentivirus. *J Virol* 2000; 74: 10096–103.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4: 406–5.
- Saman E, Van Eynde G, Lujan L, et al. A new sensitive serological assay for detection of lentivirus infections in small ruminants. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6(5): 734–40.
- Saltarelli M, Querat G, Konings DA, Vigne R, Clements JE. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology* 1990; 179(1): 347–64.
- Sargan DR, Bennet ID. A transcriptional map of visna virus: definition of the second intron structure suggests a rev-like gene product. *J Gen Virol* 1989; 70(8): 1995–2006.
- Sargan DR, Bennet ID, Cousens C, et al. Nucleotide sequence of EV1, a British isolate of maedi-visna virus. *J Gen Virol* 1991; 72(8): 1893–903.
- Schoborg RV, Saltarelli MJ, Clements JE. A Rev protein is expressed in caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) - infected cells and is required for efficient viral replication. *Virology* 1994; 202: 1–15.
- Seroude V, Audoly G, Gluschkof P, Suzan M. Viral and cellular specificities of caprine arthritis encephalitis virus Vif protein. *Virology* 2002; 292(1): 156–61.
- Shah C, Böni J, Huder JB et al. Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and world-wide propagation through livestock trade. *Virology* 2004; 319: 12–26.
- Sherman L, Gazit A, Yaniv A, Dahlberg JE, Tronick SR. Nucleotide sequence analysis of the long terminal repeat of integrated caprine arthritis encephalitis virus. *Virus Res* 1986; 5(2/3): 145–55.
- Sigurdardóttir B, Thormar H. Isolation of a viral agent from the lungs of sheep affected with Maedi. *J Infect Dis* 1964; 114: 55–60.
- Sigurdsson B, Grimsson H, Pálsson PA. Maedi, a chronic, progressive infection of sheep's lungs. *J Infect Dis* 1952; 90(3): 233–41.
- Sigurdsson B, Pálsson PA, Grimsson H. Visna, a demyelinating transmissible disease of sheep. *J Neuropathol Exp Neurol* 1957; 16(3): 389–403.

Sigurdsson B, Pálsson PA. Visna of sheep; a slow, demyelinating infection. *Br J Exp Pathol* 1958; 39(5): 519–28.

Sigurdsson B, Thormar H, Pálsson PA. Cultivation of visna virus in tissue culture. *Arch Virol* 1960; 10(3): 368–81.

Small JA, Bieberich C, Ghotbi Z, Hess J, Scangos GA, Clements JE. The visna virus long terminal repeat directs expression of a reporter gene in activated macrophages, lymphocytes, and the central nervous systems of transgenic mice. *J Virol* 1989; 63(5): 1891–6.

Smith VW, Dickson J, Coackley W, Carman H. Response of merino sheep to inoculation with a caprine retrovirus. *Vet Rec* 1985; 117(3): 61–3.

Sonigo P, Alizon M, Staskus K, et al. Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell* 1985; 42(1): 369–82.

Stormann KD, Schlecht MC, Pfaff E. Comparative studies of bacterially expressed integrase proteins of caprine arthritisencephalitis virus, maedi-visna virus and human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* 1995; 76: 1651–63.

Stowring L, Haase AT, Pétursson G, et al. Detection of visna virus antigens and RNA in glial cells in foci of demyelination. *Virology* 1985; 141: 311–8.

Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 1993; 10: 512–26.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011; 28: 2731–9.

Tang YW, Procop GW, Persing DH. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clin Chem* 1997; 43: 2021–38.

Telesnitsky A, Goff SP. Reverse transcriptase and the generation of retroviral DNA. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, eds. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19383/> (30. avgust 2012).

Terpstra C, De Boer GF. Precipitating antibodies against maedi-visna virus in experimentally infected sheep. *Arch Gesamte Virusforsch* 1973; 43(1): 53–62.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4673–80.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(24): 4876–82.

Thormar H. Maedi-visna virus and its relationship to human immunodeficiency virus. AIDS Rev 2005; 7(4): 233–45.

Thrusfield M. Veterinary epidemiology. 2nd ed. Cambridge: Blackwell Science, 1995: 178–98.

Toft N, Akerstedt J, Tharaldsen J, Hopp P. Evaluation of three serological tests for diagnosis of maedi-visna virus infection using latent class analysis. Vet Microbiol 2007; 120(1/2): 77–86.

Tong-Starksen SE, Sepp T, Pagtakhan AS. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus long terminal repeat by gamma inter-feron. J Virol 1996; 70: 595–9.

Toohey KL, Haase AT. The rev gene of visna virus is required for productive infection. Virology 1994; 200(1): 276–80.

Torsteinsdóttir S, Andrésdóttir V, Arnarson H, Pétursson G. Immune response to maedi-visna virus. Front Biosci 2007; 12: 1532–43.

Turelli P, Pétursson G, Guiguen F, Mornex JF, Vigne R, Quérat G. Replication properties of dUTPase-deficient mutants of caprine and ovine lentiviruses. J Virol 1996; 70(2): 1213–7.

Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. Adv Physiol Educ 2005; 29: 151–9.

Varea R, Monleon E, Pacheco C, et al. Early detection of maedivisna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. J Vet Diagn Invest 2001; 13: 301–7.

Vigne R, Filippi P, Querat G, et al. Precursor polypeptides to structural proteins of visna virus. J Virol 1982; 42: 1046–56.

Villet S, Faure C, Bouzar BA, et al. Lack of trans activation function for maedi visna virus and caprine arthritis encephalitis virus Tat proteins. Virology 2003a; 307(2): 317–27.

Villet S, Bouzar BA, Morin T, Verdier G, Legras C, Chebloune Y. Maedi-visna virus and caprine arthritis encephalitis virus genomes encode a Vpr-like but no Tat protein. J Virol 2003b; 77(17): 9632–8.

Vogt VM. Retroviral virions and genomes. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, eds. Retroviruses. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19454/> (30. avgust 2012)

von Bodungen U, Lechner F, Pfister H, et al. Immunohistology of the early course of lentivirus-induced arthritis. Clin Exp Immunol 1998; 111(2): 384–90.

Walker NJ. A technique whose time has come. Science 2002; 296(5567): 557–9.

Wilkerson MJ, Davis WC, Baszler TV, Cheevers WP. Immunopathology of chronic lentivirus-induced arthritis. Am J Pathol 1995; 146(6): 1433-43.

Willey RL, Bonifacino JS, Potts BJ, Martin MA, Klausner RD. Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(24): 9580–4.

Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RW, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler<sup>TM</sup>: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 1997 22: 176-81.

Woodard JC, Gaskin JM, Poulos PW, MacKay RJ, Burridge MJ. Caprine arthritis-encephalitis: clinicopathologic study. *Am J Vet Res* 1982; 43(12): 2085–96.

World organisation for animal health (OIE). Caprine arthritis-encephalitis & Maedi-visna. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees), 6<sup>th</sup> ed. Paris: Office International des Epizooties, 2008a: 983–991.

World organisation for animal health (OIE). Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees), 6<sup>th</sup> ed. Paris: Office International des Epizooties, 2008b: 46–55.

Zanoni R, Pauli U, Peterhans E. Detection of caprine arthritis-encephalitis- and maedi-visna viruses using the polymerase chain reaction. *Experientia* 1990; 46(3): 316–9.

Zanoni RG, Vogt HR, Pohl B, Böttcher 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(10): 662–9.

Zanoni RG. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *J Gen Virol* 1998; 79: 1951–61.

Zhang Z, Watt NJ, Hopkins J, Harkiss G, Woodall CJ. Quantitative analysis of maedi-visna virus DNA load in peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *J Virol Methods* 2000; 86(1): 13–20.

Zhang Z, Harkiss GD, Hopkins J, Woodall CJ. Granulocyte macrophage colony stimulating factor is elevated in alveolar macrophages from sheep naturally infected with maedi-visna virus and stimulates maedi-visna virus replication in macrophages in vitro. *Clin Exp Immunol* 2002; 129: 240–6.

Zink MC, Yager JA, Myers JD. Pathogenesis of caprine arthritis encephalitis virus. Cellular localization of viral transcripts in tissues of infected goats. *Am J Pathol* 1990; 136: 843–54.