

Problemy w diagnostyce lentiwirusów małych przeżuwaczy (SRLV)

Monika Olech

z Zakładu Anatomii Patologicznej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Lentiwirusy małych przeżuwaczy (ang. small ruminant lentiviruses – SRLV) to grupa wirusów w obrębie rodzaju *Lentivirus*, rodziny *Retroviridae*, do której należą dwa blisko spokrewnione wirusy: wirus choroby maedi visna (ang. maedi-visna virus – MVV) i wirus zapalenia stawów i mózgu kóz (ang. caprine arthritis-encephalitis virus-CAEV). Początkowo uważano, że wirus MVV zakaża wyłącznie owce, a wirus CAEV wyłącznie kozy. Jednak badania molekularne wykazały, że wirusy te są w stanie pokonać barierę gatunkową i wywołać zakażenie zarówno u owiec, jak i kóz. Możliwość pokonywania przez te wirusy bariery gatunkowej sprawiła, że nie są one uważane za gatunkowo specyficzne, lecz tworzą obecnie jedną grupę wirusów, określaną jako SRLV. SRLV charakteryzują się dużą zmiennością genetyczną. SRLV można podzielić na pięć grup genetycznych (A–E). Do grupy A należą wirusy spokrewnione z wirusem MVV, natomiast do grupy B wirusy blisko spokrewnione z wirusem CAEV. W grupie A można wyróżnić 27 podtypów (A1–A27), natomiast w grupie B pięć podtypów (B1–B5). Wirusy należące do grupy A i B są szeroko rozpowszechnione w populacji kóz i owiec na całym świecie, podczas gdy pozostałe trzy genotypy są mniej powszechne (1). Do grupy C, D i E należą szczepy, które znacznie różnią się zarówno od MVV, CAEV, jak i między sobą. Do grupy C należą szczepy izolowane wyłącznie w Norwegii, do grupy D szczepy izolowane wyłącznie w Szwajcarii i Hiszpanii, a do grupy E szczepy izolowane wyłącznie we Włoszech (2). W Polsce nie prowadzi się systematycznych badań dotyczących zakażeń SRLV, jednak badania serologiczne przeprowadzone w 2013 i 2017 r. wykazały, że średni odsetek stad owiec i kóz z odczynami dodatnimi wynosił, odpowiednio, 33,3 i 72% (3, 4). Wykazano, że SRLV izolowane od owiec i kóz z Polski są wysoce zróżnicowane i należą do podtypów A1, A5, A12, A13, A16, A17, A18, A23, A24, A27, B1 i B2 (1).

Genom wirusa składa się z dwóch liniowych cząsteczek jednoniciowego RNA, które są przekształcane w dwuniciowy DNA przez odwrotną transkryptazę (RT), a następnie genom wirusa jest integrowany z genomowym DNA gospodarza jako prowirus. Zakażenie SRLV wywołuje przewlekłe nieuleczalne choroby zapalne, znane jako maedi-visna (MV) oraz zapalenie stawów i mózgu kóz (CAE), które są na liście chorób podlegających obowiązkowi zgłaszania. Objawy kliniczne choroby u przewlekłe zakażonych zwierząt obejmują głównie zapalenie płuc, zapalenie gruczołu mlekowego i zapalenie stawów. Zapalenie wymienia jest

Difficulties in the diagnostics of small ruminant lentiviruses (SRLV)

Olech M., Department of Pathological Anatomy, National Veterinary Research Institute in Puławy

Small ruminant lentiviruses (SRLVs), it is a group, which include, maedi-visna virus (MVV), and caprine arthritis encephalitis virus (CAEV). They cause multisystemic, chronic infections and inflammatory lesions in the affected goats and sheep. SRLVs have a worldwide distribution. Since there are no vaccines or effective drugs available against SRLVs infection, and control of the disease relies mainly on the identification and elimination of infected animals. Therefore, the broad use of sensitive and specific diagnostic tests is immensely important. The diagnosis is based either on the detection of SRLV-specific antibodies using serological tests, or on detection of the viral genome by molecular assays. However, early and definitive diagnosis is complicated and a "gold standard" test with broad applicability have not been developed yet. Major obstacles in the development of effective diagnostic tests are high genetic variability of SRLVs associated with frequent mutations, recombination, and interspecies transmission. Then, the measurement of humoral immune responses of small ruminants in terms of late seroconversion and intermittent and epitope-specific antibody production. The purpose of this article is to provide an overview of the methods routinely used to diagnose infected animals and to discuss current and future prospects, challenges and limitations in SRLV diagnosis.

Keywords: SRLV, MVV, CAEV, sheep, goats, diagnosis, ELISA, PCR.

powszechne u obu gatunków zwierząt, zapalenie płuc występuje głównie u zakażonych owiec, natomiast zapalenie stawów występuje głównie u zakażonych kóz. Jednak większość zakażeń zwierząt jest zwykle bezobjawowa z powodu powolnej i postępującej infekcji. Zarówno zwierzęta z objawami, jak i niewykazujące objawów choroby są nosicielami wirusa przez całe życie, a wirus obecny w ich wydzielinach, mleku i siarce jest głównym źródłem infekcji dla potomstwa i innych zwierząt w stadzie (2, 5). W licznych badaniach wykazano, że występowanie zakażeń SRLV przynosi wymierne straty ekonomiczne. Związane jest to m.in. ze zwiększoną śmiertelnością, stratami w produkcji mleka, rodzeniem słabych jagniąt (spadek masy ciała) oraz stratami pośrednimi powstałymi na skutek wtórnych zakażeń bakteryjnych (2, 6).

Obecnie nie są dostępne żadne szczepionki ani skuteczne leki przeciwko zakażeniom SRLV, a zwalczanie choroby polega głównie na identyfikacji i eliminacji zakażonych zwierząt. Dlatego tak duże znaczenie przywiązuje się do stosowania czułych i swoistych testów diagnostycznych. Diagnostyka SRLV opiera się głównie na wykrywaniu przeciwciał specyficznych dla SRLV za pomocą testów

serologicznych albo na wykrywaniu genomu wirusa za pomocą testów molekularnych. Jednak opracowanie skutecznych testów diagnostycznych dla SRLV jest trudnym zadaniem ze względu na ich dużą zmienność genetyczną związaną z występowaniem mutacji, rekombinacji, transmisji międzygatunkowej oraz humoralnej odpowiedzi immunologicznej małych przeżuwaczy w zakresie późnej serokonwersji, przerywanej i specyficznej dla epitopów produkcji przeciwciał. Nie ma złotego standardu w diagnostyce zakażeń SRLV. Zwiększający się odsetek próbek przysyłanych do Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach do badań w kierunku SRLV świadczy o większej świadomości właścicieli stad dotyczącej zagrożeń związanych z zakażeniami SRLV. Z tego powodu celowe wydaje się przybliżenie wiedzy na temat metod rutynowo stosowanych do diagnostyki SRLV, a także omówienie obecnych i przyszłych perspektyw, wyzwań oraz ograniczeń w diagnostyce zakażeń SRLV.

Test immunodyfuzji w żelu agarowym – AGID (ang. agar gel immunodiffusion) i test ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)

W przypadku lentiwirusów małych przeżuwaczy przeciwciała nie chronią przed chorobą, lecz są głównym wskaźnikiem infekcji. Dwa najczęściej stosowane testy do wykrywania swoistych przeciwciał przeciwko SRLV to test immunodyfuzji w żelu agarowym (AGID – agar gel immunodiffusion) i test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Oba są zalecane przez Światową Organizację Zdrowia Zwierząt (WOAH; 7). Czulość testu AGID zależy zarówno od użytego szczepu wirusa, jak i zastosowanego antygeny wirusowego. Najczęściej stosowanymi antygenami są białko kapsydu MVV p25 lub CAEV p28 (CA) oraz białko glikoproteiny otoczkowej gp135 (SU) uzyskane z supernatantów hodowli komórkowych zakażonych określonym wirusem. Badania przeprowadzone przez Michiels i wsp. (8) zasugerowały, że użycie zarówno p28/p25, jak i p135 jako antygeny mogłoby zwiększyć czulość testu AGID, ponieważ humoralna odpowiedź immunologiczna zmienia się w zależności od stadium zakażenia. Przeciwciała przeciwko białku kapsydu (p28/p25) są obecne we wczesnym stadium zakażenia, podczas gdy przeciwciała przeciwko gp135 dominują w późniejszym etapie zakażenia (20–33 tygodnie po zakażeniu). Jednak do tej pory test AGID wykorzystujący p28/p25 i p135 jako antygen nie został opracowany. Obecnie szczep CAEV-63 i MVV WLC1 (7) są stosowane do produkcji testów AGID. Użycie lokalnych szczepów wirusa mogłoby jednak poprawić skuteczność diagnostyczną metody. Jednak takie podejście jest pracochłonne i kosztowne. AGID jest czasochłonną metodą, ponieważ wyniki są zwykle odczytywane po 24–48-godzinnej inkubacji, a do wizualnej interpretacji linii precypityn utworzonych w żelu agarowym wymagany jest wyspecjalizowany personel. Co więcej, niska czulość AGID nie sprzyja jego powszechnemu stosowaniu jako rutynowej metody przesiewowej i obecnie metoda ta

została praktycznie zastąpiona przez testy ELISA. AGID jest jednak przydatny do potwierdzenia pozytywnych wyników testu ELISA ze względu na jego wysoką specyficzność.

ELISA jako technika prosta, szybka, specyficzna i czuła znalazła zastosowanie na dużą skalę. Opracowano wiele testów ELISA do diagnostyki SRLV. Większość z tych testów to testy pośrednie wykorzystujące cały wirus lub rekombinowane albo syntetyczne peptydy wirusa jako antygen. W nielicznych testach kompetycyjnych (konkurencyjnych) kombinacje przeciwciał monoklonalnych są wykorzystywane do konkurowania z przeciwciałami surowicy o wiązanie z antygenem wirusowym. Wadą pośrednich testów ELISA jest konieczność rozcieńczenia surowicy w celu zmniejszenia liczby wyników fałszywie dodatnich. Natomiast konkurencyjne testy ELISA charakteryzują się wysoką czułością ze względu na stosowanie nierozcieńczonych próbek surowicy. Swoistość tych testów jest jednak niższa niż pośrednich testów ELISA. Znaczącą zaletą testów ELISA w porównaniu z innymi metodami serologicznymi jest możliwość ich stosowania w różnych próbkach biologicznych, takich jak surowica krwi, osocze oraz mleko (9). Spośród tych próbek mleko wydaje się być najbardziej niejednoznaczny matrycą, biorąc pod uwagę fakt, że kilka czynników może negatywnie wpływać na wiarygodną diagnozę, a mianowicie postępująca redukcja przeciwciał w trakcie laktacji oraz występowanie fałszywie dodatnich wyników w przypadkach zapalenia gruczołu mlekowego oraz zwiększonej zawartości tłuszczu w mleku (10, 11).

Większość diagnostycznych testów pośrednich ELISA wykorzystuje jako antygen rekombinowane białko kapsydu p25/p28 (CA), glikoproteiny otoczkowej gp135 (SU) lub białko transbłonowe gp46 (TM) albo pochodzące od nich syntetyczne peptydy. W niektórych testach antygeny te są stosowane oddzielnie, podczas gdy w innych testach antygeny SU gp135 i TM gp46 stosowane są w połączeniu z antygenami CA (p25/p28). Jak wykazały badania, użycie jako antygeny mieszaniny białek pochodzących z kapsydu i otoczki skutkowało wyższą czułością i swoistością testów ELISA (12, 13). Dlatego też użycie takich testów ma kluczowe znaczenie dla identyfikacji seropozytywnych zwierząt na wszystkich etapach zakażenia. Zmienność antygenowa SRLV, która odzwierciedla wysoką zmienność genetyczną tych wirusów, oraz ograniczenia w antygenowej reaktywności krzyżowej między grupami/podtypami SRLV zdecydowanie ograniczają skuteczność diagnostyczną testów ELISA opracowanych na bazie pojedynczego szczepu (14, 15). Swoistość takich testów ELISA jest zwykle wysoka, ale czulość wykazuje dużą zmienność. W związku z tym badania wykonane różnymi testami ELISA często prowadzą do uzyskania sprzecznych wyników. Na przykład badania przeprowadzone za pomocą testu Small Ruminant Lentivirus Antibody Test Kit (cELISA, VMRD, Pullman, WA, USA) wykorzystującego rekombinowane białko szczepu należącego do grupy B SRLV oraz testu Eradikit SRLV Screening (In3 Diagnostic, Torino, Włochy) opracowanego na bazie szczepów reprezentujących zarówno genotyp A,

jak i B wykazały 164 sprzecznych wyników. Większą liczbę seropozytywnych zwierząt stwierdzono przy użyciu testu cELISA w porównaniu z testem Eradikit, identyfikując, odpowiednio, 15,3% i 21% więcej zakażonych kóz i owiec (16). Innym przykładem jest test CAEV/MVV Total Ab (IDEXX Switzerland AG, Bielefeld-Bern, Szwajcaria), który nie był w stanie wykryć zwierząt zakażonych szczepami należącymi do podtypu A4 (14). Większość dostępnych na rynku testów ELISA nie jest także w stanie wykryć zakażeń wywołanych przez szczepy należące do grupy E, co jest spowodowane małym podobieństwem sekwencji aminokwasowych pomiędzy szczepami należącymi do grupy E i B (CAEV) lub A (MVV; 17). Dlatego obecnie część komercyjnie dostępnych testów ELISA wykorzystuje jako antygen białka pochodzące od szczepów reprezentujących różne grupy/podtypy SRLV. W teście INGEZIM Maedi ELISA (Ingenasa, Eurofins, Madrit, Hiszpania), LSIVet Ruminant Maedi-Visna/CAEV kit (LSI, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), ID Screen® MVV/CAEV Indirect (IDvet, Grabels, Francja) stosowane są specyficzne peptydy pochodzące ze szczepów SRLV należących do grupy A i B, podczas gdy Eradikit SRLV Screening (In3 Diagnostic, Torino, Włochy) wykorzystuje peptydy pochodzące ze szczepów reprezentujących genotypy A, B i E. Jednak nadal nie istnieje test ELISA, który mógłby wykryć wszystkie szczepy SRLV, a wiele zakażonych zwierząt pozostaje niezdiagnozowanymi nosicielami wirusa. Badania przeprowadzone przez Echeverria i wsp. wykazały, że zastosowanie kilku testów ELISA może zwiększyć wskaźnik wykrywalności zwierząt seropozytywnych nawet o 50% (18). Dlatego przy wyborze testu ELISA należy zawsze brać pod uwagę homologię między szczepem użytym w teście a szczepem występującym w badanej populacji/regionie. Zastosowanie więcej niż jednego testu jest szczególnie zalecane, gdy sekwencje antygenowe wirusów krążących w badanym obszarze są nieznanne.

Chociaż ELISA jest najczęściej stosowanym testem serologicznym, większość z nich nie została zwalidowana w odniesieniu do standardowych testów referencyjnych, takich jak radioimmunoprecypitacja (RIPA) lub western blot, zgodnie z zaleceniami OIE (rozdz. 1.1.6. *Zasady i metody walidacji testów diagnostycznych dla chorób zakaźnych*). Biorąc pod uwagę brak złotego standardu, ocena czułości i swoistości jest bardzo trudna, a dane walidacyjne zgłaszane przez producentów powinny być interpretowane z ostrożnością. Ponadto niektóre badania wykazały, że testy ELISA mogą mieć różną czułość i specyficzność dla próbek pochodzących od owiec i kóz. Przykładem są badania wykonane przez Cardinaux i wsp., którzy wykazali inną czułość i swoistość testu cELISA (VMRD, Inc., Pullman, USA) dla surowic pochodzących od owiec i kóz, pomimo faktu, że oba gatunki były zakażone tym samym podtypem wirusa (14). Różnice w reaktywności sugerują, że występują różnice genetyczne między owcami i kozami w ich zdolności do wywoływania skutecznej odpowiedzi przeciwciał. Co więcej, wirus wydaje się podlegać także różnej presji selekcyjnej po zakażeniu

międzygatunkowym, co dodatkowo utrudnia diagnostykę SRLV. Analiza humoralnej odpowiedzi immunologicznej po zakażeniu eksperymentalnym wykazała, że odpowiedź przeciwciał rozwijała się szybciej u owiec i kóz zakażonych wirusem należącym do grupy B (CAEV) niż u owiec i kóz zakażonych wirusem należącym do grupy A (MVV). Kozy i owce były tak samo podatne na zakażenie szczepem należącym do grupy B, podczas gdy kozy były mniej podatne na zakażenie szczepem należącym do grupy A niż owce (19).

Jakkolwiek przeciwciała powinny być wykrywalne po 4–6 miesiącach od zakażenia, to do serokonwersji (pojawienia się wykrywalnego poziomu przeciwciał) może dojść po dłuższym czasie lub zakażone zwierzęta mogą w ogóle nie wykazywać serokonwersji. Jest to związane ze zjawiskiem latentności, charakterystycznym dla lentiwirusów, któremu towarzyszy brak ekspresji białek wirusowych i syntezy przeciwciał przy stałej obecności w organizmie prowirusowego DNA. Dlatego jednokrotne badanie nie jest wiarygodne. Zwierzęta zarażone po urodzeniu mają przeciwciała matczyne (poprzez spożycie siary/mleka) przez co najmniej dwa lub trzy miesiące. Dlatego w praktyce przyjmuje się, że po raz pierwszy zwierzęta takie mogą być zbadane testem ELISA dopiero po ukończeniu szóstego miesiąca życia. Ponadto miana przeciwciał wykazują znaczne wahania w ciągu życia zwierzęcia. W niektórych przypadkach testy ELISA nie są w stanie wykryć zwierząt z niskim mianem przeciwciał. Dlatego nie zaleca się wykonywania badań serologicznych u zwierząt w ciąży – miano przeciwciał w ciąży spada, co może być przyczyną fałszywie ujemnych wyników (20).

Reakcja łańcuchowa polimerazy – PCR (ang. polymerase chain reaction)

W celu bezpośredniego stwierdzenia obecności wirusa najczęściej wykorzystywana jest metoda PCR, wykrywająca zarówno prowirusowe DNA, jak i RNA wirusa. Jednak możliwość wykrycia wirusowego RNA SRLV poprzez zastosowanie PCR z odwrotną transkrypcją (RT-PCR) jest prawie zerowa, ponieważ genom SRLV jest wbudowany w genom komórek gospodarza w postaci prowirusowego DNA, a wolne cząstki wirusa rzadko występują we krwi i innych płynach. Oprócz konwencjonalnej metody PCR służącej do wykrywania SRLV pojawiły się warianty tej techniki, nested PCR i semi-nested PCR, polegające na wykonaniu następujących po sobie dwóch reakcji amplifikacji. Produkt amplifikacji uzyskany w pierwszej reakcji PCR (amplifikowany jest większy fragment DNA) stanowi matrycę, która jest użyta w drugiej reakcji PCR przy użyciu specjalnie zaprojektowanych starterów komplementarnych do sekwencji znajdującej się wewnątrz powielanego fragmentu DNA (nested) lub też jeden ze starterów jest taki jak w pierwszym PCR, a drugi jest zlokalizowany wewnątrz pierwszego produktu (semi-nested). Takie postępowanie pozwoliło na zwiększenie czułości metody PCR bez obniżania przy tym jej

specyficzności. Metodą PCR o największej czułości jest jednak metoda real-time PCR (PCR w czasie rzeczywistym). Real-time PCR jest techniką zautomatyzowaną, szybką i pozwala na zmniejszenie ryzyka wystąpienia reakcji krzyżowych. Analiza przebiegu reakcji i odczyt sygnału są możliwe dzięki zastosowaniu specjalnych sond molekularnych wyznakowanych fluorescencyjnie. Metoda real-time PCR umożliwia monitorowanie przebiegu reakcji już w trakcie analizy, w odróżnieniu od klasycznej reakcji PCR, przy której analizować można wyłącznie produkt końcowy. Ponadto real-time PCR umożliwia dokładne określenie liczby kopii produktu reakcji, podczas gdy PCR z klasycznym rozdziałem na żelu pozwala jedynie na wykazanie obecności produktu PCR lub jego braku. Mimo wielu zalet tej techniki jej zastosowanie w rutynowej diagnostyce SRLV nie jest jednak powszechne.

Główną zaletą metod PCR w porównaniu z metodami serologicznymi jest możliwość stwierdzenia zakażenia u osobników przed pojawieniem się u nich swoistych przeciwciał (2). PCR pozwala również na testowanie młodych zwierząt, u których na skutek picia mleka/siary występują przeciwciała matczyne. PCR jest zatem najlepszą metodą do testowania zwierząt poniżej jednego roku życia (2, 21). Niemniej jednak niski poziom wirerii u zakażonych zwierząt może utrudniać wykrycie prowirusowego DNA, co może skutkować pojawieniem się fałszywie ujemnych wyników. Może to być związane z niską liczbą zakażonych monocytów, które są głównym miejscem replikacji wirusa. Wagter i wsp. wykazali, że słabo dodatnie serologicznie zwierzęta były PCR ujemne, gdy DNA przygotowano z pełnej krwi, ale PCR dodatnie, gdy DNA ekstrahowano z frakcji monocytów. Zatem wyższe stężenie monocytów w materiale wyjściowym poprawia czułość PCR (22). Użycie różnego materiału do badań może dać rozbieżne wyniki. Przykładem są badania wykonane przez Extramiana i wsp., którzy wykazali, że czułość testu PCR różniła się w zależności od rodzaju użytych próbek (83,5% dla PBL, 66,7% dla próbek mleka i 89,6% dla próbek tkanek, w tym śledziony, mózgu, węzłów chłonnych, gruczołu sutkowego, płuc; 23). Uzyskiwanie rozbieżnych wyników może być związane z występowaniem zjawiska „kompartymentalizacji” SRLV, tj. obecności różnych subpopulacji wirusa w różnych narządach lub tkankach u jednego zwierzęcia (24, 25). Podobnie jak w przypadku HIV może to być związane z adaptacją genomu wirusa do różnych typów komórek gospodarza (tzw. dryft genetyczny), ze względu na różnice w presji selekcyjnej. Dlatego ważnym aspektem wykrywania SRLV metodą PCR jest wybór odpowiedniego materiału do badań. Do wykrywania SRLV metodą PCR wykorzystuje się głównie DNA ekstrahowane z leukocytów krwi obwodowej (PBL) i komórek jednojądrzastych (PBMC). Pośmiertnie mogą być także pobrane wycinki płuc, mózgu, gruczołu mlekowego i stawów. Skrzepy krwi, które są dostępne w probówkach używanych do pobierania próbek surowicy, nie są odpowiednim materiałem do badań.

Pokonywanie bariery międzygatunkowej przez SRLV ma także wpływ na efektywność testów PCR.

Badanie przeprowadzone przez Michiels i wsp. wykazały bowiem, że większość próbek pochodzących z narządów kóz zakażonych SRLV należącym do grupy B (CAEV) dało wynik dodatni metodą PCR. Natomiast po heterologicznym zakażeniu owiec szczepem należącym do grupy B wirus nie został wykryty w żadnym z narządów. Podobną sytuację stwierdzono u zwierząt zakażonych szczepem należącym do grupy A (MVV). Wirus został zidentyfikowany w prawie wszystkich narządach zakażonych owiec i tylko w błonie maziowej zakażonych kóz (19).

Opracowanie powszechnych testów ELISA do wykrywania SRLV jest bardzo trudne ze względu na dużą zmienność genetyczną tych wirusów. Wiele z opisanych dotychczas metod PCR zostało opracowanych w celu wykrycia określonego szczepu SRLV, lecz nie są one skuteczne w wykrywaniu wszystkich podtypów SRLV (16, 26). Problem zmienności genetycznej SRLV może być tylko częściowo złagodzony poprzez zastosowanie zdegenerowanych starterów rozszerzających zakres wykrywania i poprawiających czułość metody PCR (27). Wysoka zmienność genetyczna SRLV komplikuje także wybór regionów konserwatywnych do projektowania starterów. Obecnie amplifikacji poddawane są różne obszary genomu SRLV, tj. gen *gag*, *pol*, *env* czy LTR. Uważa się, że sekwencje LTR i *pol* są bardziej konserwatywne niż sekwencje genu *gag*, podczas gdy sekwencje genu *env* charakteryzują się największą zmiennością (28). PCR oparty na różnych fragmentach genomu może dawać rozbieżne wyniki. Carrozza i wsp. wykazali, że część próbek, które dały wynik pozytywny przy użyciu starterów zaprojektowanych do amplifikacji fragmentu genu *gag*, było negatywne przy użyciu starterów dla fragmentu genu *pol* (29). Marinho i wsp. wykazali, że więcej zwierząt zakażonych SRLV byli w stanie wykryć, stosując startery specyficzne dla fragmentu LTR niż dla fragmentu genu *gag* (30). Jednak badania przeprowadzone przez Brinkhof i wsp. oraz Leginagoikoa i wsp. dały odwrotne wyniki (31, 32). Podobną sytuację zaobserwowano także, wykorzystując startery służące do amplifikacji fragmentu genu *pol* i LTR. Niektórzy autorzy wykazali, że PCR amplifikujący fragment genu *pol* miał niższą czułość w porównaniu z PCR specyficznym dla fragmentu LTR (30, 33). Barquero i wsp. wykazali jednak przeciwne wyniki, tj. że *pol*-PCR ma wyższą czułość niż LTR-PCR (11). Wyniki te sugerują, że multipleks PCR umożliwiający wykrycie kilku fragmentów DNA w jednej próbce byłby idealnym narzędziem do wykrywania zakażeń wywołanych SRLV. Jednak opracowanie takiego testu do diagnostyki SRLV jest wielkim wyzwaniem. Jak do tej pory Marinho i wsp. opracowali duplex-PCR umożliwiający jednoczesne wykrycie fragmentu genu *pol* i LTR SRLV. Jak wykazano, test ten pozwolił na dokładniejszą diagnozę w porównaniu z pojedynczym PCR (30).

Niezgodność wyników otrzymanych metodą PCR z testami serologicznymi (AGID i ELISA) może wynosić od 87,5 do 100% (2). Sugeruje to, że PCR nie powinien być traktowany jako alternatywa dla serologii, ale jako test uzupełniający diagnozę wykrywania

SRLV. Sukces w unikaniu rozprzestrzeniania się infekcji SRLV zależy w dużej mierze od wczesnego wykrycia i uboju zakażonych zwierząt w stadzie. Dlatego połączenie testów serologicznych i PCR jest niezbędne do optymalnego wykrywania zwierząt zakażonych SRLV.

Piśmiennictwo

- Olech M., Kycko A., Kuźmak J.: Molecular Characterization of Small Ruminant Lentiviruses Isolated from Polish Goats with Arthritis, *Viruses*. 2022, **14**(4), 735.
- Ramírez H., Reina R., Amorena B., de Andrés D., Martínez H.A.: Small ruminant lentiviruses: genetic variability, tropism and diagnosis, *Viruses*. 2013, **5**(4), 1175–207.
- Olech M., Osiński Z., Kuźmak J.: Bayesian estimation of seroprevalence of small ruminant lentiviruses in sheep from Poland, *Prev Vet Med*. 2017, **147**, 66–78.
- Kaba J., Czopowicz M., Ganter M., Nowicki M., Witkowski L., Nowicka D., Szaluś-Jordanow O.: Risk factors associated with seropositivity to small ruminant lentiviruses in goat herds, *Res Vet Sci*. 2013, **94**(2), 225–227.
- Grego E., Reina R., Lanfredini S., Tursi M., Favole A., Profiti M., Lungu M.M., Perona G., Gay L., Stella M.C., De Meneghi D.: Viral load, tissue distribution and histopathological lesions in goats naturally and experimentally infected with the Small Ruminant Lentivirus Genotype E (subtype E1 Roccaverano strain), *Res Vet Sci*. 2018, **118**, 107–114.
- Martínez-Navalón B., Peris C., Gómez E.A., Peris B., Roche M.L., Caballero C., Goyena E., Berriatua E.: Quantitative estimation of the impact of caprine arthritis encephalitis virus infection on milk production by dairy goats, *Vet J*. 2013, **197**(2), 311–317.
- Manual for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, chapter 2.7.2./3. Caprine arthritis and maedi visna. OIE, 2017.
- Michiels R., Van Mael E., Quinet C., Adajd N.R., Cay A.B., De Regge N.: Comparative Analysis of Different Serological and Molecular Tests for the Detection of Small Ruminant Lentiviruses (SRLVs) in Belgian Sheep and Goats, *Viruses* 2018, **10**(12), 696.
- Brinkhof J.M., Houwers D.J., Moll L., Dercksen D., van Maanen C.: Diagnostic performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing, *Vet. Microbiol.* 2010, **142**(3–4), 193–198.
- Adajd N.R., Vicca J., Michiels R., De Regge N.: (Non-)Sense of Milk Testing in Small Ruminant Lentivirus Control Programs in Goats. Comparative Analysis of Antibody Detection and Molecular Diagnosis in Blood and Milk, *Viruses*. 2019, **12**(1), E3.
- Barquero N., Gomez-Lucia E., Arjona A., Toulal C., Heras Al., Fernández-Garayzabal J.F., Domenech A.: Evolution of specific antibodies and proviral DNA in milk of small ruminants infected by small ruminant lentivirus, *Viruses* 2013, **5**(10), 2614–223.
- Brinkhof J., van Maanen C.: Evaluation of five enzyme-linked immunosorbent assays and an agar gel immunodiffusion test for detection of antibodies to small ruminant lentiviruses, *Clin. Vaccine Immunol.* 2007, **14**(9), 1210–1214.
- Celer V. Jr., Celer V.: Detection of antibodies to ovine lentivirus using recombinant capsid and transmembrane proteins, *J. Vet. Med. B-Infect. Dis Vet. Public Health* 2001, **48**(2), 89–95.
- Cardinaux L., Zahno M.L., Deubelbeiss M., Zanoni R., Vogt H.R., Bertoni G.: Virological and phylogenetic characterization of attenuated small ruminant lentivirus isolates eluding efficient serological detection, *Vet. Microbiol.* 2013, **162**(2–4), 572–581.
- Lacerenza D., Giammarioli M., Grego E., Marini C., Profiti M., Rutili D., Rosati S.: Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant lentivirus genotypes, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006, **112**(3–4), 264–271.
- Acevedo Jiménez G.E., Tórtora Pérez J.L., Rodríguez Murillo C., Arellano Reynoso B., Ramírez Álvarez H.: Serotyping versus genotyping in infected sheep and goats with small ruminant lentiviruses, *Vet. Microbiol.* 2021, **252**: 108931.
- Grego E., Bertolotti L., Quasso A., Profiti M., Lacerenza D., Muz D., Rosati S.: Genetic characterization of small ruminant lentivirus in Italian mixed flocks: evidence for a novel genotype circulating in a local goat population, *J. Gen. Virol.* 2007, **88**, 3423–3427.
- Echeverría I., de Miguel R., Asín J., Rodríguez-Largo A., Fernández A., Pérez M., de Andrés D., Luján L., Reina R.: Replication of Small Ruminant Lentiviruses in Aluminum Hydroxide-Induced Granulomas in Sheep: a Potential New Factor for Viral Dissemination, *J. Virol.* 2020, **95**(2), e01859–20.
- Michiels R., Roels S., Vereecke N., Mathijs E., Mostin L., De Regge N.: Species-Specific Humoral Immune Responses in Sheep and Goats upon Small Ruminant Lentivirus Infections Inversely Correlate with Protection against Virus Replication and Pathological Lesions, *Int. J. Mol. Scienc.* 2021, **22**(18), 9824.
- Czopowicz M., Szaluś-Jordanow O., Mickiewicz M., Witkowski L., Moroz A., Markowska-Daniel I., Reczyńska D., Bagnicka E., Kaba J.: Fall in antibody titer to small ruminant lentivirus in the periparturient period in goats, *Small Ruminant Res.* 2017, **147**, 37–40.
- de Andrés D., Klein D., Watt N.J., Berriatua E., Torsteinsdottir S., Blacklows B.A., Harkiss G.D.: Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses, *Vet. Microbiol.* 2005, **107**(1–2), 49–62.
- Wagter L.H., Jansen A., Bleumink-Pluym N.M., Lenstra J.A., Houwers D.J.: PCR detection of lentiviral GAG segment DNA in the white blood cells of sheep and goats, *Vet. Res. Commun.* 1998, **22**(5), 355–362.
- Extramiana A. B., Gonzalez L., Cortabaria N., Garcia M., Juste R.A.: Evaluation of a PCR technique for the detection of maedi-visna proviral DNA in blood, milk and tissue samples of naturally infected sheep, *Small Rumin. Res.* 2002, **44**, 109–118.
- Ramírez H., Reina R., Bertolotti L., Cenoz A., Hernández M.M., San Román B., Glaría I., de Andrés X., Crespo H., Jáuregui P., Benavides J., Polledo L., Pérez V., García-Marín J.F., Rosati S., Amorena B., de Andrés D.: Study of compartmentalization in the visna clinical form of small ruminant lentivirus infection in sheep, *BMC Vet Res.* 2012, **26**, 8:8.
- Olech M., Kuźmak J.: Compartmentalization of Subtype A17 of Small Ruminant Lentiviruses between Blood and Colostrum in Infected Goats Is Not Exclusively Associated to the env Gene, *Viruses* 2019, **11**(3), 270.
- Kalogianni A.I., Stavropoulos I., Chaintoutis S.C., Bossis I., Gelasakis A.I.: Serological, Molecular and Culture-Based Diagnosis of Lentiviral Infections in Small Ruminants, *Viruses* 2021, **13**(9), 1711.
- Eltahir Y.M., Dovas C.I., Papanastassopoulou M., Koumbati M., Giadinis N., Verghese-Nikolakaki S., Koptopoulos G.: Development of a semi-nested PCR using degenerate primers for the generic detection of small ruminant lentivirus proviral DNA, *J. Virol. Methods* 2006, **135**(2), 240–246.
- Minguijón E., Reina R., Pérez M., Polledo L., Villoria M., Ramírez H., Leginagoikoa I., Badiola J. J., García-Marín J. F., de Andrés D., Luján L., Amorena B., Juste R.A.: Small ruminant lentivirus infections and diseases, *Vet. Microbiol.* 2015, **181**(1–2), 75–89.
- Carrozza M.L., Mazzei M., Bandecchi P., Fraissier C., Pérez M., Suzan-Monti M., de Andrés D., Amorena B., Rosati S., Andrésdottir V., Lujan L., Pepin M., Blacklows B., Tolari F., Harkiss G.D.: 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), 161–167.
- Marinho R.C., Martins G.R., Souza K.C., Sousa A.L.M., Silva S.T.C., Nobre J.A., Teixeira M.F.S.: Duplex nested-PCR for detection of small ruminant lentiviruses, *Braz. J. Microbiol.* 2018, **49**, 83–92.
- Brinkhof J.M., van Maanen C., Wigger R., Peterson K., Houwers D.J.: 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**(2), 338–344.
- Leginagoikoa I., Minguijón E., Berriatua E., Juste R.A.: Improvements in the detection of small ruminant lentivirus infection in the blood of sheep by PCR, *J. Virol. Methods* 2009, **56**(1–2), 145–149.
- Alvarez V., Daltabuit-Test M., Arranz J., Leginagoikoa I., Juste R.A., Amorena B., de Andrés D., Luján L., Badiola J.J., Berriatua E.: PCR detection of colostrum-associated Maedi-Visna virus (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs, *Res. Vet. Sc.* 2006, **80**(2), 226–34.

Dr hab. Monika Olech prof. instytutu,
e-mail: monika.olech@piwet.pulawy.pl