

STRESZCZENIE

Możliwość pokonywania bariery gatunkowej przez lentiwirusy sprawiła, że MVV i CAEV nie są już uważane za wirusy gatunkowo swoiste i są określane jako lentiwirusy małych przeżuwaczy tzw. *small ruminant lentiviruses* – SRLV. Według ostatnio przyjętej nomenklatury, wyróżnia się pięć grup genetycznych (A-E) oraz szereg typów SRLV. Jak wykazano, podział taki jest zasadny w aspekcie międzygatunkowej transmisji i ma również bezpośredni związek z opracowaniem nowych testów diagnostycznych z wykorzystaniem determinant antygenowych, typowych dla poszczególnych grup lub typów genetycznych.

Z uwagi na fakt występowania u wszystkich lentiwirusów wysokiego stopnia zmienności genetycznej, pierwszym etapem pracy była analiza takiej zmienności w regionach genów *gag* i *env* SRLV, kodujących główne determinanty antygenowe. Częste mutacje zlokalizowane w sekwencjach tych genów różnych lentiwirusów prowadzą do powstania zmutowanych form tzw. *quasispecies* czyli pseudogatunków, indukujących syntezę przeciwciał o zmienionym powinowactwie, umożliwiając tym samym wymknięcie się spod kontroli układu immunologicznego. W badaniach własnych przy użyciu metody HMA możliwe było przeprowadzenie analizy zmienności fragmentu V1-V2, ogółem 39 próbek. Stwierdzono występowanie różnych profili migracyjnych DNA dla poszczególnych próbek. U owiec jak i kóz wykryto zarówno wirusa należącego do grupy A (MVV) jak i wirusa blisko spokrewnionego ze szczepem CAEV-Cork (grupa B), który naturalnie zakaża kozy. U jednej kozy wykryto dwie pary heterodupleksów typowe dla grupy A i B, co może świadczyć o współinfekcji. W celu potwierdzenia otrzymanych wyników, na podstawie dwóch fragmentów genu *env* (V1-V2, V4-V5) i fragmentu genu *gag* (MA/CA) przeprowadzono filogenetyczną analizę 29 wyselekcjonowanych terenowych izolatów SRLV. Otrzymane wyniki potwierdziły wysoki stopień zmienności genetycznej izolatów SRLV u kóz i owiec w Polsce oraz afiliację tych izolatów do sześciu typów: B1, B2, A1 oraz trzech nowych typów, A12, A13 i A16. Analiza kilkunastu klonów pochodzących od kozy o numerze #90472 i owcy o numerze #0016, wykazała obecność sekwencji należących do grupy A jak i B. Wykazano, że w dwóch stadach owiec i w trzech stadach kóz krążą wirusy reprezentujące zarówno genotyp A jak i genotyp B. Przynależność genetyczna wirusów wyznaczona na podstawie analizy filogenetycznej i analizy metodą heterodupleksów była taka sama. Próbkę DNA, które nie można było zakwalifikować jednoznacznie do określonego genotypu wykorzystując HMA tworzyły nowe klastry na drzewie filogenetycznym. Wyniki przedstawione w tej pracy

potwierdzają, że w naturalnych warunkach SRLV są w stanie pokonać barierę międzygatunkową i równolegle zakażać owce i kozy. Badania potwierdziły także, że w warunkach naturalnych koinfekcja wirusem należącym do grupy A jak i wirusem należącym do grupy B jest możliwa. Analiza sekwencji aminokwasowych izolatów SRLV wykazały, że antygen SU5, indukuje rodzaj typowo specyficznej odpowiedzi immunologicznej. Dlatego użycie tego białka, jako antygen, stwarza możliwość serotypowania wirusów kóz i owiec oraz, że istnieje immunologiczne pokrewieństwo między epitopami białka macierzy i kapsydu wśród danej grupy genetycznej SRLV. Efektywność stosowania testów bazujących na jednym genotypie SRLV jest ograniczona. Dlatego na bazie izolatów reprezentujących typy genetyczne A1, A13, B1 i B2 zostały otrzymane rekombinowane białka kodujące białko kapsydu (CA) i macierzy (MA) oraz domenę SU1 i SU5 glikoproteiny powierzchniowej. Otrzymanie rekombinowanych białek SU1/Gag/SU5 o wysokim stopniu czystości pozwoliło na opracowanie testów ELISA. Walidację nowo opracowanych testów oparto na badaniu 939 surowic referencyjnych, 300 dodatnich i 639 ujemnych, pochodzących od owiec i kóz z terenu Polski i Francji. Czulość i specyficzność testów ELISA zostały wyznaczone na podstawie krzywych ROC. Czulość testów wynosiła od 77,0% do 96%, natomiast swoistość od 94,2% do 97,6%..

Reaktywność badanych surowic była różna dla każdego z badanych antygenów. Pośród 300 surowic TP (trzykrotnie dodatnie), 288 (96%), 279 (93%), 275 (92%) i 231 (77%) wykazało wynik dodatni w teście ELISA z antygenem reprezentującym odpowiednio typ genetyczny B2, B1, A13 i A1. Pośród 639 surowic referencyjnych TN (trzykrotnie ujemnych), 634 (98%), 611 (96%), 601 (94%) i 602 (94,2%) zostało uznanych za ujemne w teście ELISA z antygenem reprezentującym odpowiednio typ B2, B1, A13 i A1. Analiza reaktywności surowic w odniesieniu do gatunku zwierzęcia wykazała, że surowice pochodzące od kóz charakteryzowały się wyższą reaktywnością niż surowice pochodzące od owiec. Kiedy analizowano wyniki w zależności od kraju pochodzenia surowic wykazano, że najczęściej, bo 99,6% i 97,8% surowic reprezentujących panel TP, uzyskanych od zwierząt z terenu Francji, reagowało w teście ELISA z antygenem reprezentującym typ B2 i B1. W badaniu surowic uzyskanych od zwierząt pochodzących z terenu Polski, większość, bo prawie 96% surowic z panelu TP, reagowała z antygenem reprezentującym typ genetyczny A13.

W celu określenia możliwości diagnostycznych nowo opracowanych testów ELISA badaniu poddano 249 próbek surowicy krwi, uzyskanych od 194 owiec pochodzących z 13 stad i 55 kóz z 5 stad, które badano testami ELISA z rekombinowanym białkiem SU1/Gag/SU5 reprezentującym typ genetyczny A13, A1, B1, B2 oraz testem handlowym ID

Screen® MVV-CAEV Indirect Screening test (IDvet). Przy użyciu testu ID Screen® MVV-CAEV dodatni wynik zanotowano ogółem w 32 próbkach (12,8%). Kiedy te same próbki surowicy krwi badano poszczególnymi testami ELISA, dodatni wynik stwierdzono w 37 próbkach (14,8%) z białkiem SU1/Gag/SU5 reprezentującym typ genetyczny A13, z białkiem reprezentującym typ A1 i B2 w 26 próbkach (10,4%). Natomiast z białkiem reprezentującym typ genetyczny B1 dodatni wynik stwierdzono jedynie w 6 próbkach surowicy krwi (2,4%). Pośród 217 próbek ujemnych w teście ID Screen® MVV-CAEV, 16 (6,4%) wykazało reaktywność w przynajmniej jednym z testów ELISA, uwzględniających rekombinowane antygeny. Reaktywność surowic owczych miała charakter swoisty, natomiast surowice kozie ragowały w sposób bardziej kompleksowy.

Uzyskane wyniki wskazują, że testy ELISA opracowane na bazie jednego szczepu nie są w stanie wykryć wszystkich zakażeń wywołanych lentiwirusami małych przeżuwaczy. Istnieje potrzeba użycia testu ELISA wykorzystującego, jako antygen, mieszaninę rekombinowanych białek reprezentujących różne typy genetyczne lub konstrukcję testów uwzględniających warianty wirusa w dominującej formie występujące w populacji zwierząt na danym obszarze. Ma to szczególne znaczenie w trakcie realizacji programów uzdrawiania stad, których skuteczność uzależniona jest od stosowania testów serologicznych.

SUMMARY

Due to the possibility to cross the species barrier by lentiviruses MVV and CAEV are no longer considered to be species specific viruses and are referred as small ruminant lentiviruses - SRLV. According to the recently proposed nomenclature, the SRLV can be subdivided into five genetic groups with subtypes present in A-E. Such division has a direct relationship with the development of new diagnostic tests using antigenic determinants that are typical for particular groups or genetic subtypes.

Lentiviruses are known to possess a high level of genetic variability and a great potential for distribution of mutant genomes known as viral quasi-species. Consequently, the dissemination of viral quasi-species leads to the induction of antibodies with varying avidity which may eventually be able to evade immune systems. The first step of this study was the analysis of *gag* and *env* genes that code for the most relevant antigenic determinants. Using HMA method it was possible to analyze genetic variability of V1-V2 fragment of 39 samples. Obtained results indicate the presence of different HMA patterns among tested samples. In both, sheep and goats a virus belonging to the group A (MVV) or a virus closely related to the strain Cork (group B) has been detected. In one goat two pairs of heteroduplexes typical for groups A and B were detected, which may suggest the dual infection. In order to confirm these results, the phylogenetic analysis of 29 selected SRLV field isolates was performed on the basis of the two fragments of *env* gene (V1-V2, V4-V5) and a fragment of *gag* gene (MA/CA). The results confirmed the high degree of genetic variability of ovine and caprine SRLV isolates from Poland and the clustering of these isolates into six subtypes: B1, B2, A1, and three new subtypes A12, A13 and A16. Analysis of several clones derived from the goat number # 90472 and the sheep number # 0016, revealed the presence of sequences belonging to the group A and B. It has been shown that in two flocks of sheep and in three goat herds a virus strain representing both A and B genotypes circulates. Phylogenetic clustering of Polish sequences was in full agreement with that inferred by HMA. Sequences for which the genetic assignment was unresolved by HMA belonged to the new cluster on the phylogenetic trees. The results presented in this paper confirm that small ruminant lentiviruses are able to overcome the interspecies barrier and simultaneously infect sheep and goats in the natural conditions. These studies have also confirmed that, under natural conditions co-infection with viruses belonging to the group A and B is possible. Analysis of the amino acid sequences of SRLV isolates showed that SU5 immuno-dominant epitope induces a type-specific immune response. Therefore, using this protein as an antigen it is possible to perform SRLV

serotyping, and that there is an immunological relatedness between the MA/CA epitopes among relevant SRLV genetic groups. The results clearly indicated that the efficiency of tests based on a single SRLV genotype is limited. Therefore, on the basis of isolates representing subgroups A1, A13, B1 and B2 recombinant proteins encoding capsid (CA), matrix protein (MA) and domain SU1 and SU5 were obtained. Obtaining high purity recombinant proteins SU1/Gag/SU5 allowed us to develop ELISA tests. Validation of the newly developed tests was based on the study of 300 positive and 639 negative reference sera derived from sheep and goats from Poland and France. Sensitivity and specificity was calculated individually for each recombinant antigen ELISA using receiver operating characteristic (ROC) curve. A diagnostic sensitivity (Se) and specificity (Sp) for each of these tests was calculated with a 95% confidence interval and varied from 77.0% to 96.0% and from 94.2% to 97.6% for Se and Sp, respectively. The ROC curves were also used to assess the overall accuracy of the ELISAs by calculating the area under the curves (AUC). The results showed that the newly developed ELISA tests based on recombinant proteins SU1/Gag/SU5 were highly accurate. The values of AUC varied from 0.916 to 0.990.

The reactivity of tested sera was different for each of the antigens. Considering the 300 sera representing TP (triple positive) group, 288 (96%), 279 (93%), 275 (92%) and 231 samples (77%) were positive by ELISA with antigens representing subtypes B2, B1, A13 and A1, respectively. Out of 639 TN (triple negative) samples, 634 (98%), 611 (96%), 601 (94%) and 602 samples (94,2%) were considered as negative when ELISAs incorporated B1, B2, A13 and A1 antigens, respectively. The results also showed that the goats serum samples have a higher reactivity than sheep sera which is consistent with previous reports (Grego et al. 2002, Rachid et al. 2013). TP sera originating from France reacted positively mainly with B2 (99,6%) and B1 (97,8%) antigen. On the other hand, most of (96%) TP Polish serum samples reacted with A13 antigen.

In order to determine the diagnostic capabilities of the newly developed ELISA tests, 249 serum samples originated from 194 sheep from 13 flocks and 55 goats from 5 herds were tested by ELISA with recombinant protein SU1/Gag/SU5 representing the subtype A13, A1, B1, B2 and by commercial test ID Screen® MVV-CAEV Indirect Screening test (IDvet). Using ID Screen® MVV-CAEV test positive result was observed in 32 samples (12.8%). When these same serum samples were tested by ELISA with recombinant antigens, positive result was found in 37 samples (14.8%) with antigen representing subtype A13, with protein representing subtype A1 and B2 in 26 samples (10.4%). However, with antigen representing subtype B1 positive result was shown only in six serum samples (2.4%). Out of 217 negative

samples in the ID Screen® MVV-CAEV test, 16 (6.4%) showed reactivity in at least one of the ELISA tests with recombinant antigens.

The results indicate that the ELISA tests based on only one strain are not able to detect all genotypes of small ruminant lentiviruses. There is a need to introduce the ELISA test using as an antigen, a mixture of recombinant proteins representing different genotypes or to develop the assays based on genotype-specific antigens derived from strains circulating in the area of interest. This is particularly important during the implementation of eradication programs effectiveness which depends on the use of reliable serological tests.