

ГЛАВА 3.4.10.

**ЭНЗООТИЧЕСКИЙ ЛЕЙКОЗ КРС**

---

**РЕЗЮМЕ**

**Описание болезни:** Энзоотический лейкоз КРС (EBL) – болезнь КРС, вызываемая вирусом лейкоза КРС, членом семейства Retroviridae. КРС может быть инфицирован в любом возрасте, в том числе на стадии эмбриона. Большинство инфекций – субклинические, однако у некоторых КРС (~30%) старше 3 лет развивается персистентный лимфоцитоз, в более редких случаях развивается лимфосаркома (опухоль) в различных внутренних органах. Естественная инфекция была зарегистрирована среди азиатских буйволов и капибар. Клинические признаки, если присутствуют, зависят от пораженных органов. КРС с лимфосаркомой практически неизменно погибает либо внезапно, либо спустя недели или месяцы после возникновения клинических признаков.

**Идентификация возбудителя:** Вирус можно обнаружить в супернатанте культуры после *in-vitro* культивирования мононуклеарных клеток периферийной крови (МКПК), полученной от инфицированных животных, с помощью обнаружения антигена вируса лейкоза КРС, посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) или с помощью электронной микроскопии. Также можно обнаружить провирусную ДНК в МКПК или опухоли у инфицированных животных с помощью ПЦР.

**Серологические исследования:** Среди широко используемых методов обнаружения антител – иммунодиффузия в агаровом геле (AGID) с использованием сыворотки и твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием сыворотки или молока. Данные исследования лежат в основе успешной реализации политики по искоренению болезни во многих странах. Также могут использоваться другие исследования, например, радиоиммуноанализ. В продаже имеются наборы для ИФА и иммунодиффузии в агаровом геле.

**Требования к вакцинам:** Вакцин против вируса лейкоза КРС не существует.

**А. ВВЕДЕНИЕ**

Существует несколько причин развития лимфосаркомы у КРС, однако единственная точно известная причина – ретровирус, вирус лейкоза КРС (ВЛ КРС), который вызывает энзоотический лейкоз КРС. Термин “спорадический лейкоз КРС” (SBL) обычно используют в отношении молодых животных (телят), а также кожной и тимической лимфомы, которая определяется возрастом инфицированного животного и распределением опухолей. Причина спорадического лейкоза КРС неизвестна. Существуют также лимфосаркоматозные состояния, которые не входят ни в категорию спорадический лейкоз КРС, ни в категорию энзоотический лейкоз КРС, т.е. зрелая многоочаговая лимфома со спорадическим появлением неизвестной этиологии. Термин

“лейкоз” или “энзоотический лейкоз КРС” следует использовать только в отношении лимфом, вызванных инфекцией вирусом лейкоза КРС (Gillet *et al.*, 2007).

Несмотря на то, что животное может быть инфицировано вирусом лейкоза КРС в любом возрасте, опухоли (лимфосаркомы) наблюдаются обычно у особей старше 3 лет. Инфекции, как правило, носят субклинический характер; только у 30-70% инфицированного КРС развивается персистентный лимфоцитоз и у 0,1-10% инфицированных животных образуются опухоли. Признаки зависят от места появления опухолей и могут включать расстройство пищеварения, отсутствие аппетита, потерю в весе, слабость и общее снижение тонуса, а также иногда неврологические манифестации. Поверхностные лимфатические узлы могут быть заметно увеличены и прощупываться под кожей или при ректальном исследовании. При вскрытии в лимфатических узлах и многих тканях обнаруживается инфильтрат опухолевых клеток. Наиболее часто поражены такие органы как сычуг, правое ушко предсердия, селезенка, кишечник, печень, почки, книжка, легкие и матка. Восприимчивость КРС к персистентному лимфоцитозу, а также, возможно, к развитию опухолей, предопределена генетически.

Доказательства роли вируса в иммунологической дисфункции или в повышенном проценте выбраковки противоречивы. Результаты двух масштабных исследований указывают на средний спад в производстве молока (в расчете на корову) среди положительных и отрицательных на вирус лейкоза КРС стад на 2,5% и 2,7% соответственно (Emanuelsson *et al.*, 1992; Ott *et al.*, 2003). Кроме того, сообщается, что у положительных на вирус лейкоза КРС коров степень оплодотворения на 7% ниже, чем у отрицательных. Также среди положительных на вирус лейкоза КРС стад отмечается повышенный процент выбраковки и более высокая подверженность другим болезням инфекционной этиологии, например, маститу, диарее и пневмонии (Emanuelsson *et al.*, 1992). Таким образом, несмотря на отсутствие клинических признаков в течение длительного периода субклинической инфекции, экономические потери, вызванные инфекциями персистентного вируса лейкоза КРС, остаются значительными.

Вирус можно обнаружить *in-vitro* путем культивирования мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК). Вирус присутствует в МКПК и клетках опухоли, поскольку провирус интегрируется в ДНК инфицированных клеток. Вирус также обнаруживают в клеточных фракциях различных биологических жидкостей (назальная и бронхиальная жидкость, слюна, молоко). Естественная передача зависит от передачи инфицированных клеток, например, во время отела. Искусственная передача возникает, в частности, по причине использования игл и хирургического инструмента, контаминированного кровью, или перчаток, использованных для ректального осмотра, и т.д. Латеральная передача при, отсутствии данных факторов, обычно происходит медленно (Monti *et al.*, 2005). В регионах с большим количеством кровососущих насекомых, особенно слепней, вирус может передаваться механическим путем. Вирусные антигены и провирусную ДНК можно идентифицировать в сперме, молоке и молозиве инфицированных животных (Dus Santos *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 1983). Тем не менее, естественная передача через данные секреты не доказана.

Возможно, вирус лейкоза КРС присутствовал в Европе в 19 веке, откуда он распространился на американский континент в первой половине 20 века, откуда он,

вероятно, распространился обратно в Европу и впервые был занесен в другие страны в ходе импорта КРС из Северной Америки (Johnson & Kaneene, 1992). Некоторые страны официально признаны благополучными по инфекции вирусом лейкоза КРС.

Было проведено несколько исследований с целью определения возможности вируса лейкоза КРС вызывать болезнь у людей, особенно через употребление молока от инфицированных коров (Burmeister *et al.*, 2007; Perzova *et al.*, 2000). Тем не менее, убедительные доказательства передачи отсутствуют, и в настоящее время считается, что вирус лейкоза КРС не представляет опасности для человека.

## **В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ**

### **1. Идентификация возбудителя**

Вирус лейкоза КРС – экзогенный ретровирус, который принадлежит роду *Deltaretrovirus* подсемейства *Orthoretrovirinae* семейства *Retroviridae*. Структурно и функционально он связан с Т-лимфотропными вирусами приматов 1, 2 и 3 (STLV-1, -2, -3) и с Т-лимфотропными вирусами человека 1 и 2 (HTLV-1 и -2). Основными целевыми клетками вируса лейкоза КРС являются В лимфоциты (Beyer *et al.*, 2002; Gillet *et al.*, 2007). Вирусная частица состоит из одноцепочечной РНК, нуклеопротеина р12, капсидного (сердцевидного) белка р24, трансмембранного гликопротеина gp30, оболочечного гликопротеина gp51 и нескольких ферментов, включая обратную транскриптазу. Провирусная ДНК, которая образуется после обратной транскрипции вирусного генома, произвольно интегрируется в ДНК клетки хозяина, где персистирует, не производя при этом вирусного потомства. При культивировании инфицированных клеток *in-vitro* (как правило, путем совместного культивирования МКПК с индикаторными клетками) инфекционный вирус легче всего произвести путем стимуляции митогенами.

#### **1.1. Выделение вируса**

От 1,5 мл периферической крови в этилен-диамин-тетрауксусной кислоте (ЭДТК) отделяют мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), используя фиколл/натрий метризоат градиент плотности, культивируют с  $2 \times 10^6$  клетками легких плода КРС (FBL) и затем выращивают в течение 3-4 дней в 40 мл минимальной питательной среды (MEM), содержащей 20% телячью сыворотку. Вирус вызывает образование синтиция в клеточном монослое FBL клеток. При отсутствии клеток легких плода КРС можно приготовить суточные культуры путем культивирования МКПК в 24-луночных планшетах в течение 3 дней (Miller *et al.*, 1985). После этого с помощью радиоиммуноанализа (РИА), твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), иммуноблоттинга или иммунодиффузии в агаровом геле (AGID) в супернатанте культур можно обнаружить антигены р 24 и gp51. Наличие частиц или провируса вируса лейкоза КРС можно продемонстрировать путем проведения электронной микроскопии и ПЦР, соответственно.

## 1.2. Обнаружение нуклеиновой кислоты с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Использование полимеразной цепной реакции (ПЦР) для обнаружения провируса вируса лейкоза КРС описано во многих работах (Beier *et al.*, 1998; Blankenstein *et al.*, 1998; Belak & Ballagi-Pordany, 1993; Rola & Kuzmak, 2002; Teifke & Vahlenkamp, 2008; Venables *et al.*, 1997). Использование праймеров, созданных для соответствующих *gag*, *pol* и *env* участков генома, имело переменный успех. В настоящее время гнездовая ПЦР с последующим гель-электрофорезом является наиболее быстрым и чувствительным методом. Описанные методы основаны на последовательностях праймеров из гена *env*, кодирующих антиген gp51. Данный ген хорошо сохраняется, а ген и антиген в целом присутствуют у всех инфицированных животных в ходе всего периода инфекции. Данный метод может быть использован только в тех лабораториях, которые располагают помещениями для молекулярной вирусологии. Для обеспечения достоверности результатов необходимо соблюдать обычные меры предосторожности и процедуры контроля (смотрите Главу 1.1.6 *Принципы и методы валидации диагностических исследований инфекционных болезней*).

ПЦР в основном проводят в дополнение к серологическим методам для подтверждения. Обнаружение инфекции вирусом лейкоза КРС у отдельных животных с помощью ПЦР может быть целесообразным в следующих случаях:

- Молодые телята с колостральными антителами;
- Случаи опухолей, для дифференциации спорадической и инфекционной лимфомы;
- Опухолевые ткани из подозрительных случаев, отобранные на бойне;
- Новые инфекции до развития антител к вирусу лейкоза КРС;
- Случаи слабоположительных или сомнительных результатов ИФА;
- Систематический скрининг КРС на станциях по исследованию потомства (перед ввозом в центры по искусственному осеменению);
- КРС, используемый для производства вакцин, для гарантии их свободы от вируса лейкоза КРС.

### 1.2.1. Чувствительность и надежность метода

#### *i) Аналитическая чувствительность*

Несмотря на то, что гнездовая ПЦР теоретически обладает чувствительностью в одну целевую молекулу, на практике аналитическая чувствительность составляет примерно 5-10 целевых молекул провирусной ДНК.

#### *ii) Ложно-положительные результаты*

Высокая чувствительность гнездовой ПЦР может вызвать проблемы, связанные с ложно-положительными результатами по причине контаминации между образцами (Belak & Ballagi-

Pordany, 1993). Чтобы свести к минимуму данный риск, в протокол были включены некоторые специальные процедуры, такие как использование вытяжных шкафов с ламинарным потоком воздуха, отдельных помещений для различных этапов производства, использование в ходе каждого исследования новых перчаток или специальных открывалок для пробирок, а также отрицательных контролей (например, воды в качестве контрольного раствора).

*iii) Ложно-отрицательные результаты*

Необходимо отметить, что инфицировать можно лишь небольшую часть МКПК, что ограничивает чувствительность испытания. Наличие в некоторых образцах ингибиторов может привести к возникновению ложно-отрицательных результатов. Чтобы этого избежать в ходе каждого испытания используют хотя бы один положительный контроль. Кроме того, во время тестирования необходимо использовать внутренние контроли (имитаторы), которые добавляют к каждому образцу. Имитатор – это модифицированная целевая молекула с теми же праймерами, что и реальная цель, однако он генерирует продукт ПЦР другого размера, который можно визуализировать с помощью гель-электрофореза. Имитатор добавляют в низкой концентрации, что облегчает амплификацию реальной цели (Ballagi-Pordany & Belak, 1996). Тем не менее, существует возможность, что имитатор будет конкурировать с реальной целью. Таким образом, может понадобиться анализ каждого образца с имитатором и без него.

**1.2.2. Приготовление образца**

МКПК отделяют от образцов крови в этилен-диамин-тетрауксусной кислоте (ЭДТК), используя метод разделения фиколл-пак. В качестве альтернативы можно использовать лейкоцитарную пленку или даже цельную кровь, например, когда образцы заморожены.

Опухоли и опухолевые ткани необходимо суспендировать в 10% суспензию.

**1.2.3. Экстрагирование ДНК**

Для достижения оптимальной чувствительности необходимо очистить общую ДНК. Для исследования подходят различные методы очистки, которые свободно имеются в продаже.

Чтобы свести к минимуму риск контаминации в ходе всех этапов следует соблюдать особые меры предосторожности (Belak & Ballagi-Pordany, 1993).

#### 1.2.4. Процедура гнездовой ПЦР

Опубликовано несколько протоколов по проведению ПЦР для обнаружения провирусных последовательностей вируса лейкоза КРС (Beier *et al.*, 1998; Rola & Kuzmak, 2001; Teifke & Vahlenkamp, 2008; Venables *et al.*, 1997). В качестве примера приводится подробное описание двух ПЦР, одна из которых была разработана Belak & Bellagi-Pordany *et al.* (1993), а другая- Fetcher *et al.*, 1996. Участок вируса лейкоза КРС, используемый в качестве цели, - ген *gp5 (env)*. Последовательность, используемая для создания праймеров, доступна в GenBank, номер доступа K02120.

##### 1.2.4.1. Метод, разработанный Belak & Bellagi-Pordany (1993)

###### i) Строение праймера и последовательности

Олиго	Последовательность	Положение в K02120
OBLV1A	(5'-CTT-TGT-GTG-CCA-AGT-CTC-CCA-GAT-ACA-3')	5029
OBLV6A	(5'-CCA-ACA-TAT-AGC-ACA-GTC-TGG-GAA-GGC-3')	5442
OBLV3	(5'-CTG-TAA-ATG-GCT-ATC-CTA-AGA-TCT-ACT-GGC-3')	5065
OBLV5	(5'-GAC-AGA-GGG-AAC-CCA-GTC-ACT-GTT-CAA-CTG-3')	5376

Размер продукта ПЦР<sup>I</sup>: 440 пар оснований; Размер продукта ПЦР<sup>II</sup>: 341 пар оснований; размер продукта-имитатора: 761 пара оснований.

###### ii) Реакционные смеси

Реакционные смеси смешивают (за исключением образцов ДНК и имитатора) перед добавлением в отдельные реакционные пробирки. На пять образцов необходимо включить один отрицательный контроль (H<sub>2</sub>O, прошедшая двойную дистилляцию) и один положительный контроль. Общие объемы смесей рассчитывают путем умножения указанных объемов на общее число образцов, включая контроли, плюс один. Полимеразу Taq используют в готовом разведении 1/10.

Образцы ДНК и имитатор<sup>1</sup> (Ballagi-Pordany & Belak, 1996) добавляют в отдельных лабораторных помещениях: помещение 1 для приготовлений ДНК и имитаторов, лабораторное помещение 2 для продуктов ПЦР<sup>II</sup>, чтобы минимизировать риск контаминации.

а) Реагенты, добавляемые в чистом лабораторном помещении

Данную смесь можно приготовить заранее и хранить при температуре 4°C до 1 месяца.

Реагенты на реакцию	Реакция ПЦР <sup>I</sup>	Реакция ПЦР <sup>II</sup>
H <sub>2</sub> O, прошедшая двойную дистилляцию (стандартизированная)	21 μл	21 μл
10 × ПЦР буфер (Perkin Elmer)	5 μл	5 μл
дНТФ (10 мМ)	4 × 1 μл	4 × 1 μл
Альбумин бычьей сыворотки (1 мг/мл)	5 μл	5 μл
<i>Праймеры (10 нмоль/μл):</i>		
OBLV1A	1,5 μл	-
OBLV6A	1,5 μл	-
OBLV3	-	1,5 μл
OBLV5	-	1,5 μл
Всего:	38 μл	38 μл

Следующее необходимо добавить непосредственно перед началом ПЦР

Реагенты на реакцию	Реакция ПЦР <sup>I</sup>	Реакция ПЦР <sup>II</sup>
MgCl <sub>2</sub> (25 мМ)	5 μл	5 μл
Taq полимераза (1 единица/реакция)	2 μл	2 μл
Минеральное масло	2 капли	2 капли
Всего:	45 μл	45 μл

<sup>1</sup> Можно получить у Dr S. Belák, Шведский университет сельскохозяйственных наук, факультет медико-биологических наук и ветеринарного здравоохранения, почтовый ящик 7063, 750 07 Упасала, Швеция.

b) Реагенты, добавляемые в лабораторном помещении 1 (ДНК) или 2 (ПЦР<sup>I</sup>)

Реагенты на реакцию	Реакция ПЦР <sup>I</sup>	Реакция ПЦР <sup>II</sup>
Образец ДНК* (или вода*)	5 $\mu$ л	-
Продукт ПЦР <sup>I</sup>	-	5 $\mu$ л
Всего:	50 $\mu$ л	50 $\mu$ л

iii) Термопрофили ПЦР

Термопрофиль ПЦР<sup>I</sup>

- 5  $\times$  94°C/45 секунд, 60°C/60 секунд, 72°C/90 секунд
- 30  $\times$  94°C/45 секунд, 55°C/60 секунд, 72°C/90 секунд
- 1  $\times$  72°C/420 секунд  $\geq$ 20°C

Термопрофиль ПЦР<sup>II</sup>

- 5  $\times$  94°C/45 секунд, 58°C/60 секунд, 72°C/90 секунд
- 30  $\times$  94°C/45 секунд, 53°C/60 секунд, 72°C/90 секунд
- 1  $\times$  72°C/420 секунд  $\geq$ 20°C

iv) Лабораторная процедура

Реагенты для ПЦР<sup>I</sup> смешивают, как описано в этапе ii, при добавлении в каждую пробирку образца ДНК используют новые перчатки или открывашку. Образцы помещают на лед. Термоблок нагревают до 80°C. Образцы помещают в термоблок и запускают программу ПЦР (этап iii).

Реагенты для ПЦР<sup>II</sup> смешивают, как описано в этапе ii, при добавлении в каждую пробирку продукта ПЦР<sup>I</sup> используют новые перчатки или открывашку. Образцы помещают на лед. Термоблок нагревают до 80°C. Образцы помещают в термоблок и запускают программу ПЦР<sup>II</sup> (этап iii).

v) Электрофорез в агарозном геле

Продукты ПЦР<sup>II</sup> переносят в помещение, где проводят электрофорез. Примерно 10-15  $\mu$ л образцов и 23  $\mu$ л загрузочного буфера загружают на 2% агарозный гель, содержащий 0,01% бромид этидия (в качестве альтернативы имеются более безопасные продукты для визуализации продуктов ПЦР, например, RedSafe<sup>TM</sup> или GelRed<sup>TM</sup>). Электрофорез



проводят, используя 0,5 × Трис/борат/ЭДТК (ТБЭ) буфер, при 90 миллиампер в течение 2 часов. Для контроля размера продуктов амплификации рекомендуется использовать лэддер из 100 пар оснований. Анализ продуктов ПЦР производится с помощью УФ освещения.

vi) Интерпретация результатов

a) Положительные образцы должны иметь продукты ПЦР ожидаемого размера (341 пара оснований), подобно положительному контролю.

b) Отрицательные образцы не должны иметь продуктов ПЦР ожидаемого образца (341 пара оснований), однако продукт-имитатор (144 пары оснований) должен присутствовать.

c) Неясные результаты: исследование необходимо повторить, если положительные контроли (имитатор или внешний положительный контроль) являются отрицательными, или если отрицательный контроль (вода) является положительным.

vii) Подтверждающее исследование

Для подтверждающей идентификации в отношении продуктов ПЦР можно провести секвенирование, гибридизацию с содержащим метку зондом или анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (Fetcher *et al.*, 1997).

**1.2.4.2. Метод, разработанный Fechner *et al.*, (1996)**

i) Строение праймера и последовательности

Олиго	Последовательность	Положение
BLV-env-1	TCT-GTG-CCA-AGT-CTC-CCA-GAT-A	5032-5053
BLV-env-2	AAC-AAC-AAC-CTC-TGG-GAA-GGG	5629-5608
BLV-env-3	CCC-ACA-AGG-GCG-GCG-CCG-GTT-T	5099-5121
BLV-env-4	GCG-AGG-CCG-GGT-CCA-GAG-CTG-G	5542-5521

Размер продукта ПЦР BLV-env-1/ BLV-env-2 составляет 598 пар оснований. Размер продукта ПЦР BLV-env-3/ BLV-env-4 – 444 пары оснований.

ii) Реакционные смеси

Реакционные смеси смешивают (за исключением образцов ДНК) перед добавлением в отдельные реакционные пробирки. На пять

образцов необходимо включить один отрицательный контроль (H<sub>2</sub>O, прошедшая двойную дистилляцию) и один положительный контроль. Общие объемы смесей рассчитывают путем умножения указанных объемов на общее число образцов, включая контроли, плюс один.

Первую ПЦР можно провести, используя 50μл объема реакционной смеси. Для одной реакции исследование оптимизируют до 5 μл (10×) ПЦР буфера, 20 μл ДНК (~1 μг ДНК), по 1,25 μл каждого из env-специфических праймеров BLV-env-1 и BLV-env-2 (20 пмоль/μл), 0,15 дНТФ (каждый по 25 мМ), 3 μл MgCl<sub>2</sub> (25 мМ), 0,25 μл Taq полимеразы (1,25 Е) и 19,1 μл дистиллированной H<sub>2</sub>O. Для реакции используют следующий температурный режим: 2 минуты при температуре 94°C; 30 циклов по 30 секунд при температуре 95°C, 30 секунд при температуре 58°C и 60 секунд при температуре 72°C; после этого 4 минуты температуры 72°C.

Гнездовую ПЦР можно провести, используя 50μл объема реакционной смеси. Для одной реакции исследование оптимизируют до 3 μл продукта ПЦР, полученного в ходе первой ПЦР, 5 μл (10×) ПЦР буфера, по 1,25 μл каждого из env-специфических праймеров BLV-env-3 и BLV-env-4 (20 пмоль/μл), 0,15 дНТФ (каждый по 25 мМ), 0,25 μл Taq полимеразы (1,25Е) и 36,1 μл дистиллированной H<sub>2</sub>O. Для реакции используют следующий температурный режим: 2 минуты при температуре 94°C; 30 циклов по 30 секунд при температуре 95°C, 30 секунд при температуре 58°C и 60 секунд при температуре 72°C; после этого 4 минуты температуры 72°C.

### iii) Лабораторная процедура

Смешивают реагенты для ПЦР для проведения первой или гнездовой ПЦР и при добавлении образцов ДНК в каждую пробирку используют новые перчатки или открывашку. Образцы помещают на лед. Термоблок нагревают до 94°C. Образцы помещают в термоблок и запускают соответствующую программу ПЦР.

### iv) Электрофорез в агарозном геле

Примерно 10 μл продуктов гнездовой ПЦР и 20 μл загрузочного буфера загружают на 2% агарозный гель, содержащий 0,01% бромид этидия. Электрофорез проводят, используя 0,5 × Трис/борат/ЭДТК (ТБЭ) буфер, при 90 миллиампер в течение 2 часов. Для контроля размера продуктов амплификации рекомендуется использовать лэддер из 100 пар оснований. Анализ продуктов ПЦР производится с помощью УФ освещения.

### v) Интерпретация результатов

- a) Положительные образцы должны иметь продукты ПЦР ожидаемого размера (444 пары оснований), подобно положительному контролю.
  - b) Отрицательные образцы не должны иметь продуктов ПЦР ожидаемого образца (444 пары оснований).
  - c) Исследование необходимо повторить, если положительный контроль оказался отрицательным, или если отрицательный контроль (вода) стал положительным.
- vi) Подтверждающее исследование

Для подтверждающей идентификации в отношении продуктов ПЦР можно провести секвенирование, гибридизацию с содержащим метку зондом или анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (Fetcher *et al.*, 1997).

## 2. Серологические тесты

КРС остается инфицированным вирусом на всю жизнь, что обеспечивает персистентную выработку антител. Впервые антитела можно обнаружить спустя 3-16 недель после инфицирования. Материнские антитела могут исчезнуть через 6-7 месяцев. Невозможно различить пассивно переданные антитела и антитела, которые выработались во время активной инфекции. При этом активную инфекцию можно подтвердить путем обнаружения провируса вируса лейкоза КРС с помощью ПЦР. Пассивные антитела могут защитить телят от инфекции. В околородовый период у коров могут иметься сывороточные антитела, которые невозможно обнаружить с помощью иммунодиффузии в агаровом геле по причине смещения антител из циркуляции внутри коровы в колострум. Таким образом, при проведении иммунодиффузии в агаровом геле отрицательные результаты в отношении сыворотки, отобранной в этот период времени (2-6 недель до и 1-2 недели после отела) не являются безусловно достоверными, и тест необходимо повторить. Однако, иммунодиффузию в агаровом геле можно провести на данной стадии, используя колострум первой фазы.

Проще всего обнаружить антитела, направленные на gp51 и p24 вируса. В большинстве случаев иммунодиффузия в агаровом геле и ИФА при рутинном использовании обнаруживают антитела к гликопротеину gp51, поскольку они появляются раньше. Опубликованы методы проведения данных тестов (Dimmock *et al.*, 1987; Европейская Комиссия, 2009). ИФА, как правило, обладают более высокой чувствительностью по сравнению с иммунодиффузией в агаровом геле.

Слабые положительные и отрицательные референтные сыворотки МЭБ для проведения ИФА доступны в лиофилизированной облученной форме в Референтной лаборатории МЭБ в Германии (смотрите Таблицу в Части 4 данного Руководства по наземным животным). Калибровка данных сывороток основана на использовании аккредитованной референтной сыворотки МЭБ, которая имеет название E05, валидированной против бывшей референтной сыворотки E4 с помощью иммунодиффузии в агаровом геле и ИФА.

## **2.1. Твердофазный иммуноферментный анализ (тест, предписанный для международной торговли)**

Можно провести как непрямой, так и блокирующий ИФА. Тесты для проведения обоих анализов имеются в продаже; могут потребоваться разные наборы для образцов молока или сыворотки. Некоторые ИФА достаточно чувствительны для проведения с использованием объединенных образцов. ИФА проводят на микропланшетах для твердофазной экстракции. Планшеты сенсibilизируют антигеном вируса лейкоза КРС либо напрямую, либо с помощью иммобилизованного поликлонального или моноклонального антитела (MAb). Антиген готовят из супернатанта культуры клеток персистентно инфицированных вирусом лейкоза КРС линий клеток. Наиболее широко в коммерческих тестах используются клетки почек эмбриона овцы (FLK) (Van der Maaten & Miller, 1976). С 2004 года доступна новая линия клеток, продуцирующая вирус лейкоза КРС, PO714, которая является свободной от других вирусных инфекций и содержит провирус бельгийской подгруппы (Beier *et al.*, 2004). Антиген используют в заранее установленном разведении (т.е. 1/10) в фосфатно-буферном растворе (ФБР). Что касается наборов, имеющих в продаже – в некоторых планшеты уже сенсibilизированы. В образцы молока могут быть добавлены консерванты, чтобы предотвратить его скисание. Образцы с консервантами остаются пригодными для использования до 6 недель при условии хранения при температуре 4°C.

### **2.1.1. Блокирующий твердофазный иммуноферментный анализ – ИФА сыворотка**

Описанный метод подходит для обнаружения антител как в единичных, так и в объединенных образцах сыворотки.

#### **2.1.1.1. Процедура тестирования**

##### **i) Сенсibilизация планшета**

Все лунки покрывают антителом к вирусу лейкоза КРС, заранее разведенным в буфере для сенсibilизации (100  $\mu$ л/лунка), планшет запечатывают и инкубируют в течение 18 часов при температуре 4°C. Проводят процедуру промывки (стандартная промывка), которая представляет собой три цикла промывки путем заполнения лунок до краев с замачиванием на 3 минуты между промывками, затем планшет промакивают. Добавляют антиген вируса лейкоза КРС, заранее разбавленный в промывочном буфере (100  $\mu$ л/лунка), планшет запечатывают и инкубируют в течение 2 часов при температуре 37°C. Проводят цикл стандартной промывки.

ii) Подготовка и добавление образцов и контролей

Положительные и отрицательные контрольные сыворотки заранее разводят (1/2) в промывочном буфере и раствор добавляют в четыре лунки на один контроль (100 мкл/лунка). Для исследования объединенных образцов можно объединить 80 сывороток, развести (1/2), используя промывочный буфер, и затем раствор добавляют в две лунки (100 мкл/лунка) на образец. Единичные образцы разводят 1/100, используя промывочный буфер, и затем раствор добавляют в две лунки (100 мкл/лунка) на образец. После распределения образцов по лункам планшет запечатывают и инкубируют в течение 18 часов при температуре 4°C. Планшет быстро промывают путем заполнения лунок и их немедленного опустошения.

iii) Подготовка и добавление конъюгатов и субстрата

Предварительно разведенное биотинилированное антитело добавляют в лунки (100 мкл/лунка) – предварительно разбавляют, используя промывочный буфер + 10% фетальную телячью сыворотку – планшет запечатывают и инкубируют на качающемся столе в течение 1 час при температуре 37°C. Проводят процедуру стандартной промывки, как описано выше. Авидин, конъюгированный с пероксидазой, предварительно разводят в промывочном буфере и раствор добавляют в лунки (100 мкл/лунка). Планшет запечатывают и инкубируют на качающемся столе в течение 30 минут при температуре 37°C. Проводят процедуру стандартной промывки. Во все лунки планшета добавляют по 100 мкл субстрата ортофенилендиамина, планшет покрывают и оставляют в темном месте на 9 минут. Реакцию останавливают с помощью 0,5М серной кислоты (100 мкл/лунка).

### 2.1.1.2. Считывание и интерпретация результатов

ИФА ридер обнуляют вхолостую и затем считывают абсорбцию при длине волны в 490 нм. Для ридеров с двойной длиной волны используют референтный фильтр между 620 нм и 650 нм. Результаты считывают в течение 60 минут после добавления стоп-раствора.

Абсорбция отрицательного контроля должна составлять  $1,1 \pm 0,4$ ; если абсорбция ниже 0,7 – необходимо увеличить время проявления цвета, описанного в этапе iii) выше (подготовка и добавление конъюгатов и субстрата). Наоборот время необходимо сократить, если абсорбция превышает 1,5. Абсорбция положительного контроля должна быть ниже, чем абсорбция отрицательного контроля  $\times 0,25$ .

Образец является положительным, когда абсорбция каждой из двух тестовых лунок идентична или ниже средней абсорбции четырех отрицательных лунок  $\times 0,5$ .

Образец является отрицательным, когда абсорбция каждой из двух тестовых лунок идентична или выше средней абсорбции четырех отрицательных лунок  $\times 0,65$ .

Если четыре образца дают значения между абсорбцией и отрицательным контролем  $\times 0,5$  и  $\times 0,65$  – рекомендуется провести повторное исследование животного, используя образец, отобранный спустя 1 месяц.

### **2.1.1.3. Чувствительность твердофазного иммуноферментного анализа**

Чувствительность ИФА в отношении к объединенным образцам молока можно проверить с помощью слабых положительных и референтных сывороток МЭБ. Исследование должно дать положительный результат на референтные сыворотки МЭБ E05, разведенные в отрицательном молоке в 250 раз больше, чем количество индивидуальных образцов молока в пуле (Директива ЕС 88/406). Например, для пула из 60 образцов молока E05 необходимо развести  $1/250 \times 60 = 1/15000$ . Что касается индивидуальных образцов молока, положительные референтные сыворотки МЭБ E05, разведенные  $1/250$  в отрицательном молоке, должны быть положительными.

При исследовании объединенных образцов сыворотки референтная сыворотка МЭБ E05 должна быть положительной при разведении в 10 раз превышающем количество индивидуальных сывороток в пуле. Например, для пула в 50 индивидуальных образцов референтная сыворотка МЭБ, разведенная  $1/500$  в отрицательной сыворотке, должна дать положительный результат. В исследованиях, где образцы сыворотки тестируются отдельно, референтная сыворотка МЭБ E05, разведенная  $1/10$ , должна быть положительной.

### **2.1.2. Непрямой твердофазный иммуноферментный анализ – ИФА молока**

Описанный метод подходит для обнаружения антител в объединенных образцах молока.

#### **2.1.2.1. Контроли**

В каждое исследование должен быть включен сильный положительный, слабый положительный, отрицательный контроль молока и контроль разбавителя. Сильный положительный контроль готовят путем разведения референтной сыворотки МЭБ E05  $1/25$  в отрицательном молоке. Слабый положительный контроль готовят путем разведения в отрицательном молоке референтной сыворотки МЭБ E05 в 25 раз больше числа индивидуальных образцов молока в

пуле, подлежащем исследованию. Для разведения контролей референтных сывороток МЭБ используют не пастеризованное снятое консервированное молоко.

#### **2.1.2.2. Пример процедуры тестирования**

- i) Образцы молока хранят, не трогая, в холодильнике до тех пор, пока не образуется определенный слой сливок (24-48 часов) или, в качестве альтернативы, центрифугируют при 2000 об/мин в течение 10 минут. Перед началом тестирования необходимо удалить слой сливок.
- ii) Планшет сенсibiliзируют в шахматном порядке антигеном вируса лейкоза КРС и контролем отрицательного антигена. 100  $\mu$ л тестового образца добавляют к 100  $\mu$ л промывочного буфера в планшете, чтобы получить разведение  $\frac{1}{2}$ , помещают в две лунки с контролем антигена и в две лунки с антигеном вируса лейкоза КРС.
- iii) Планшет запечатывают и перемешивают на шейкере.
- iv) Планшет инкубируют в течение 14-18 часов при температуре 2-8°C.
- v) В каждую лунку добавляют по 300  $\mu$ л промывочного растворителя, затем сливают. После этого в каждую лунку добавляют по 200  $\mu$ л промывочного растворителя, встряхивают в течение 10 секунд и сливают. Наконец, добавляют по 300  $\mu$ л промывочного растворителя, замачивают на 3 минуты и сливают.
- vi) В каждую лунку добавляют по 200  $\mu$ л аффинно очищенного конъюгата антибовинного IgG с пероксидазой хрена, разведенного в промывочном растворителе, и инкубируют планшет в течение 90 минут при комнатной температуре.
- vii) Планшет промывают путем добавления в каждую лунку по 300  $\mu$ л промывочного растворителя; затем содержимое удаляют и снова добавляют по 300  $\mu$ л промывочного растворителя. Оставляют замачиваться на 3 минуты, затем содержимое сливают. Повторяют этапы vi и vii.
- viii) В планшет добавляют 200  $\mu$ л субстрата ABTS (2,2'-азинобис-[3-этилбензотиазолин-6-сульфониевая кислота]) (предварительно подогретого до 25 °C) и инкубируют в течение 20 минут при комнатной температуре в темноте. Реакцию можно остановить путем добавления 50  $\mu$ л останавливающего раствора.

### 2.1.2.3. Считывание и интерпретация результатов

ИФА ридер обнуляют вхолостую и затем считывают абсорбцию при длине волны в 405 нм. Все планшеты должны быть считаны в течение 2 часов после добавления останавливающего раствора. Считывание абсорбции лунок, содержащих отрицательный антиген, вычитают из считываний лунок с положительным антигеном. Следует усреднить два значения чистой абсорбции для каждого тестового образца. То же самое применяется в отношении параллельных слабоположительных контролей. Репликации должны быть в пределах 0,1 оптической единицы друг от друга.

Чтобы тест считался действительным, усредненная чистая абсорбция слабоположительных контролей должна составлять 0,2-0,6 оптических единиц. Чистая абсорбция сильноположительных контролей должна быть >1,0 оптических единиц. Чистая абсорбция отрицательных контролей и контроля разбавителя должна быть ниже, чем нижний предел неопределенного диапазона.

Если предположить, что все вышеперечисленные критерии соблюдены:

i) Тестовые образцы являются положительными, если значение их чистой абсорбции выше или равно значению чистой абсорбции слабоположительного контроля.

ii) Тестовые образцы являются неопределенными, если значение их чистой абсорбции составляет 75% или ниже значения чистой абсорбции слабоположительного контроля.

т.е. если чистая абсорбция слабоположительного контроля = 0,40

нижний предел неопределенного диапазона =  $0,40 \times 0,750 = 0,30$

неопределенный диапазон в данном примере будет 0,30-0,39

образцы  $\geq 0,40$  считаются положительными.

iii) Тестовые образцы являются отрицательными, если значение их чистой абсорбции ниже нижнего предела “неопределенного” диапазона ( $< 0,30$  в примере).



## **2.2. Иммунодиффузия в агаровом геле (тест, предписанный для международной торговли)**

Иммунодиффузия в агаровом геле (AGID) – специфический, но не очень чувствительный тест, который проводят с целью обнаружения антител в образцах сыворотки, полученных от отдельных животных. Данный метод не подходит для исследования молока (за исключением первых колострумов) по причине недостаточной специфичности и чувствительности. Иммунодиффузию в агаровом геле легко проводить, и данный метод является чрезвычайно полезным и эффективным при реализации схем искоренения. Референтные сыворотки включены в коммерческие наборы для AGID.

### **2.2.1. Агаровый гель**

В 0,2М Tris буфере, рН 7,2, готовят 0,8-1,2% раствор агара или агарозы с 8,5% NaCl. Одним из способов приготовления агара является растворение 24,23 г Tris металима в 1 литре дистиллированной воды и доведения до рН 7,2 с 2,5М HCl. Хлористый натрий (85 г) растворяют в 250 мл Tris/HCl и доводят до 1 литра. Добавляют агарозу (8 г) и нагревают смесь в варочном автоклаве в режиме 4,55 кг/см<sup>2</sup> в течение 10 минут. Смесь делят на аликвоты по 15 мл, которые затем хранят при температуре 4°C в течение 6 недель.

### **2.2.2. Антиген**

Антиген должен содержать специфический гликопротеин gp51 вируса лейкоза КРС. Антиген готовят в подходящей системе культуры клеток, такой как перманентно инфицированные монослой клеток почек эбриона овцы. Клетки, используемые для производства антигена вируса лейкоза КРС, должны быть свободными от нецитопатического вируса вирусной диареи КРС и ретровирусов КРС, вируса подобного иммунодефициту КРС (лентивируса) и синцитиального вируса КРС (спумавируса). После 3-4 дней культивирования при температуре 37°C ростовую среду заменяют поддерживающей средой. Клетки собирают через 7 дней, используя стандартный раствор трипсин/версен. Суспензию клеток центрифугируют при 500 g в течение 10 минут. Клетки ресуспендируют в ростовой среде; 30% клеток возвращают в сосуд для культивирования, а оставшиеся сливают. Собирают супернатанты со всех культур. С помощью доступных методов супернатанты концентрируют в 50-100 раз. Это можно осуществить путем концентрации в мешках Вискинга, погруженных в полиэтиленгликоль, или путем осаждения сульфатом аммония и последующей ультрафильтрации, или путем осаждения в полиэтиленгликоле с последующим обессоливанием и сепарацией по

размерам в колонке с полиакриламидными шариками. Антиген содержит преимущественно gp51, но может также содержать p24.

Антиген можно стандартизировать для гликопротеина gp51 путем титрации против референтной сыворотки МЭБ Е05 следующим образом: готовят двукратное разведение антигена. Наивысшее разведение, которое при исследовании против неразбавленной референтной сыворотки МЭБ Е05 дает линию преципитации, равноотстоящую от антигена и сыворотки, будет содержать одну единицу. В исследовании используется две единицы антигена.

### **2.2.3. Известная положительная контрольная сыворотка**

Положительную контрольную сыворотку получают от естественно или экспериментально инфицированных животных (КРС или овец). Образовавшаяся линия преципитации должна представлять собой четкую линию между лунками с антигеном и лунками с контрольной сывороткой. В исследование в качестве индикатора чувствительности необходимо включить разведение контрольной положительной сыворотки, которое дает слабоположительный результат.

### **2.2.4. Известная отрицательная контрольная сыворотка**

Используют сыворотку от неинфицированных животных (КРС, овец).

### **2.2.5. Тестовые сыворотки**

Подходят сыворотки от любых видов животных.

### **2.2.6. Процедура тестирования**

i) Агар растапливают путем нагревания на водяной бане и разливают по чашкам Петри (15 мл на чашку диаметром 8,5 см). Заполненные планшеты оставляют для остывания при температуре 4°C примерно на 1 час, прежде чем вырезать в агаре отверстия. Для того, чтобы вырезать шестигранник, состоящий из шести лунок вокруг центральной лунки, используют пробойник. Могут быть использованы различные размеры лунок; одна удовлетворительная модель, например, включала лунки диаметром 6,5 мм, а расстояние между лунками составляло 3 мм. Для получения наиболее достоверных результатов планшеты с агаром используют в тот же день, когда агар был розлит и вырезан.

ii) Антиген помещают в центральные лунки шестигранника. Тестовые сыворотки помещают поочередно с положительной контрольной сывороткой во внешние лунки. В каждом планшете должен быть один контрольный паттерн с положительной контрольной сывороткой, слабоположительной контрольной

сывороткой и отрицательной контрольной сывороткой на месте тестовых сывороток.

iii) Планшеты выдерживают при комнатной температуре (20-27°C) в закрытой влажной камере, а результаты считывают через 24, 48 и 72 часа.

iv) *Интерпретация результатов:* тестовая сыворотка является положительной, если она формирует специфическую линию преципитации с антигеном и линию идентичности с контрольной сывороткой. Тестовая сыворотка является отрицательной, если она не образует специфическую линию с антигеном и сгибает линию контрольной сыворотки. Могут появиться неспецифические линии; они не сливаются и не отклоняют линии, сформированные положительным контролем. Тестовая сыворотка является слабоположительной, если она сгибает линию контрольной сыворотки по направлению к лунке с антигеном, не образуя при этом видимой линии преципитации с антигеном; реакция считается неуверенной, если в результате считывания не ясно каков результат, положительный или отрицательный. Тест считается недействительным, если контроли не дают ожидаемых результатов. Можно концентрировать сыворотки, дающие неоднозначные или слабоположительные результаты, и провести повторное тестирование.

### **С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ**

Несмотря на успехи в исследованиях экспериментальных вакцин, в продаже по-прежнему отсутствуют вакцины для контроля энзоотического лейкоза КРС.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

BALLAGI-PORDANY A. & BELAK S. (1996). The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. *Mol. Cell. Probes*, 10, 159–164.

BEIER D., BLANKENSTEIN P. & FECHNER H. (1998). Chances and limitations for the use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of bovine leukemia virus (BLV) infection in cattle. *Dtsch Tierartzl. Wochenschr.*, 105, 408–412.

BEIER D., RIEBE R., BLANKENSTEIN P., STARICK E., BONDZIO A. & MARQUARDT O. (2004). Establishment of a new bovine leucosis virus producing cell line. *J. Virol. Methods*, 121, 239–246.

BEYER J., KÖLLNER B., TEIFKE J.P., STARICK E., BEIER D., REIMANN I., GRUNWALD U. & ZILLER M. (2002). Cattle infected with bovine leukaemia virus may not only develop persistent B-cell lymphocytosis but also persistent Bcell lymphopenia. *J. Vet. Med. [B]*, 49, 270–277.

- BLANKENSTEIN P., FECHNER H., LOOMAN A.C., BEIER D., MARQUARDT O. & EBNER D. (1998). Polymerase Kettenreaktion zum Nachweis von BLV-provirus – praktikable Ergänzung zur BLV-Diagnostik? Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr., 111, 180–186.
- BELAK S. & BALLAGI-PORDANY A. (1993). Experiences on the application of the polymerase chain reaction in a diagnostic laboratory. Mol. Cell. Probes, 7, 241–248.
- BURMEISTER T., SCHWARTZ S., HUMMEL M., HOELZER D. & THIEL E. (2007). No genetic evidence for involvement of Deltaretroviruses I adult patients with precursor and mature T-cell neoplasms. Retrovirology, 4, 11.
- DIMMOCK C.K., RODWELL B.J. & CHUNG Y.S. (1987). Enzootic bovine leucosis. Pathology, Virology and Serology. Australian standard diagnostic techniques for animal disease. No. 49. Australian Agricultural Council.
- DUS SANTOS M.J., TRONO K., LAGER I. & WIGDOROVITZ A. (2007). Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. Vet. Microbiol., 119, 10–18.
- EMANUELSSON U., SCHERLING K. & PETTERSSON H. (1992). Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. Prev. Vet. Med., 12, 121–131.
- EUROPEAN COMMISSION (2009). Commission Decision of 15 December 2009 amending Annex D to Council Directive 64/432/EEC as regards the diagnostic tests for enzootic bovine leucosis (2009/976/EU): Official Journal of the European Union L 336, 36-41.
- FECHNER H., BLANKENSTEIN P., LOOMAN A.C., ELWERT J., GEUE L., ALBRECHT C., KURG A., BEIER D., MARQUARDT O. & EBNER D. (1997). Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. Virology, 237, 261–269.
- GILLET N., FLORINS A., BOXUS M., BURTEAU C., NIGRO A., VANDERMEERS F., BALON H., BOUZAR A.-B., DEFOICHE J., BURNY A., REICHERT M., KETTMANN R. & WILLEMS L. (2007). Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. Retrovirology, 4, 18.
- JOHNSON R. & KANEENE J.B. (1992). Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. Vet. Bull., 62, 287–312.
- MILLER L.D., MILLER J.M., VAN DER MAATEN M.J. & SCHMERR M.J.F. (1985). Blood from bovine leukaemia virusinfected cattle: antigen production correlated with infectivity. Am. J. Vet. Res., 46, 808–810.
- MONTI G.E., SCHRIJVER R. & BEIER D. (2005). Genetic diversity and spread of bovine leukaemia virus isolates in Argentine dairy cattle. Arch. Virol., 150, 443–458.
- OTT S.L., JOHNSON R. & WELLS S.J. (2003). Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herdlevel productivity on US dairy farms. Prev. Vet. Med., 61, 249–262.

PERZOVA R.N., LOGHRAN T.P., DUBE S., FERRER J., ESTEBAN E. & POIESZ B.J. (2000). Lack of BLV and PTLV DNA sequences in the majority of patients with large granular lymphocyte leukaemia. *Br. J. Haematol.*, 109, 64–70.

ROLA M. & KUZMAK J. (2002). The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR-ELISA. *J. Virol. Methods*, 99, 33–40.

ROMERO C.H., CRUZ G.B. & ROWE C.A. (1983). Transmission of bovine leukaemia virus in milk. *Trop. Anim. Health Prod.*, 15, 215–218.

TEIFKE J.P. & VAHLENKAMP T.W. (2008). Detection of bovine leukemia virus (BLV) in tissue samples of experimentally infected cattle. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.*, 121, 263–269.

VAN DER MAATEN M.J. & MILLER J.M. (1976). Replication of bovine leukaemia virus in monolayer cell cultures. *Bibl. Haematol.*, 43, 360–362.

VENABLES C., MARTIN T.C. & HUGHES S. (1997). Detection of bovine leukosis virus proviral DNA in whole blood and tissue by nested polymerase chain reaction. Fourth International Congress of Veterinary Virology, Edinburgh, UK, Abstracts, 202.

\*

\* \*

**NB:** Существуют Референтные лаборатории МЭБ по энзоотическому лейкозу КРС (смотрите Таблицу в Части 4 данного *Руководства по наземным животным* или найдите наиболее актуальный список на веб-сайте МЭБ:

<http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения более подробной информации о диагностических тестах и реагентах для энзоотического лейкоза КРС, пожалуйста, свяжитесь с Референтной лабораторией МЭБ