

ГЛАВА 3.4.14

ЗЛОКАЧЕСТВЕННАЯ КАТАРАЛЬНАЯ ЛИХОРАДКА

РЕЗЮМЕ

Определение болезни: Злокачественная катаральная лихорадка (ЗКЛ) является острым, генерализованным и обычно смертельным заболеванием, поражающим многие виды Artiodactyla. Болезнь чаще всего поражает виды животных подсемейства Bovinae и семейства Cervidae, но также встречается у домашних свиней, а также жирафов и видов антилоп, относящихся к подсемейству Tragelaphinae. ЗКЛ характеризуется скоплениями лимфоцитов в нелимфоидных органах, васкулитом и гиперплазией Т-лимфоцитов в лимфоидных органах. Болезнь возникает после заражения некоторыми герпесвирусами рода Macavirus. Наиболее полно описанными из них являются герпесвирус-1 бубалов (AlHV-1) и герпесвирус-2 овец (OvHV-2). AlHV-1, который передается зараженными латентной формой болезни антилопами гну, вызывает болезнь у крупного рогатого скота в регионах Африки и у различных видов жвачных животных в зоологических коллекциях мира. OvHV-2, который распространен среди домашних овец в виде субклинической формы заражения, является причиной ЗКЛ в большинстве регионов мира. В обеих формах болезни животные, имеющие клинические проявления болезни, не являются источниками инфекции, так как вирус выделяется только естественными хозяевами, гну и овцами, соответственно.

Описание болезни: ЗКЛ обычно появляется спорадически и поражает несколько животных, хотя и AlHV-1, и OvHV-2 могут приводить к эпизоотиям. Существует заметная градиция восприимчивости к форме OvHV-2 ЗКЛ, начиная от относительно устойчивых Bos taurus и B. indicus, водных буйволов, североамериканских бизонов и многих видов оленей до чрезвычайно восприимчивых оленя Пера Давида и бантенгов. Болезнь может иметь широкий спектр клинических проявлений, начиная от острой формы, когда наблюдаются минимальные изменения перед наступлением смерти, до более выраженных случаев, характеризующихся высокой температурой, двусторонним помутнением роговицы, обильными катаральными истечениями из глаз и ноздрей, некрозом тканей в области морды и эрозией буккального эпителия. Диагноз обычно ставят путем изучения характерных гистопатологических изменений, хотя предпочтительной опцией в любой форме заболевания является обнаружение вирусной ДНК.

Идентификация возбудителя: AlHV-1 может быть выделен у животных, пораженных клинической формой болезни, с использованием лейкоцитов периферической крови или суспензий лимфоидных клеток, но жизнеспособность клеток должна быть сохранена во время обработки, так как инфекция не может быть восстановлена из мертвых клеток. Вирус также может быть выделен у антилоп гну из лейкоцитов периферической крови, либо из клеточных суспензий других органов. Большинство однослойных культур, полученных от жвачных животных, вероятно, восприимчивы, и развивают цитопатическое действие (ЦПД). Первичные изоляты обычно продуцируют многоядерное ЦПД, в котором вирусный антиген может быть идентифицирован с помощью иммунофлуоресценции или иммуноцитохимии с использованием подходящих антисывороток или моноклональных антител. Возбудитель OvHV-2 никогда не выделялся в культуре, хотя линии лимфобластоидных клеток, передающихся через среду пораженных животных, содержат OvHV-2-специфическую ДНК. В ходе эксперимента оба возбудителя перенесли на кроликов и хомячков, у которых развились поражения, характерные для ЗКЛ.

Вирусную ДНК выявили в клиническом материале животных, пораженных вызванной как AlHV-1, так и OvHV-2 ЗКЛ, с использованием полимеразной цепной реакции, которая

становится предпочтительным методом диагностики обеих форм заболевания.

Серологические исследования: У инфицированных антилоп гну, естественных хозяев, вырабатываются соответствующие антитела к АИHV-1, которые могут быть выявлены во множестве анализов, включая реакцию вируснейтрализации, иммуноблоттинг, иммуноферментный анализ (ИФА) и реакцию иммунофлуоресценции. Антитела к ОвHV-2 могут быть выявлены с использованием АИHV-1 в качестве источника антигена. У домашних овец постоянно присутствуют антитела, выявляемые посредством реакции иммунофлуоресценции, ИФА или иммуноблоттинга. Тем не менее, выработка антител у животных, пораженных клинической формой болезни, ограничена, причем нейтрализующие антитела не вырабатываются, и таким образом, выявление зависит от использования иммунофлуоресценции, ИФА или иммуноблоттинга, хотя антитела не всегда присутствуют у животных, пораженных более острой формой, например, у оленей.

Требования к вакцинам: В настоящее время вакцина против данной болезни отсутствует.

А. ВВЕДЕНИЕ

1. Описание болезни

Злокачественная катаральная лихорадка (ЗКЛ) - это, как правило, смертельное заболевание крупного рогатого скота и многих других видов парнокопытных животных, которое возникает после заражения некоторыми герпесвирусами рода *Macavirus*. Шесть герпесвирусов признаны вызывающими ЗКЛ, наиболее полно описанными из которых являются герпесвирус-1 бубалов (АИHV-1) и герпесвирус-2 овец (ОвHV-2). ЗКЛ характеризуется системной лимфопролиферацией и обычно является смертельным заболеванием, при этом, при аутопсии с проведением полимеразной цепной реакции (ПЦР) с вирус-специфичными праймерами в крови и большинстве тканей обнаруживаются инфицированные клетки. Естественные хозяева этих вирусов, включая антилоп гну (виды *Caprochaetes* подсемейства *Alcelaphinae*) для АИHV-1 и домашних овец для ОвHV-2, не имеют клинических проявлений после заражения, хотя экспериментально доказано, что большие дозы ОвHV-2 вызывали клинические признаки поражения ЗКЛ при инокуляции овцам, ранее не использовавшимся в экспериментах (Li et al., 2005b).

Клинические признаки ЗКЛ сильно различаются и варьируют от скоротечных до хронических с наиболее очевидными проявлениями, развивающимися в более затяжных случаях. В скоротечной форме клинические признаки не обнаруживаются, либо за 12-24 часов до наступления смерти может развиваться депрессия, сопровождаемая диареей и дизентерией. В целом, симптомы обычно включают развитие высокой температуры, увеличение серозного слезотечения и отделения носового экссудата, который при прогрессировании вызывает обильное слизеотделение. Животные могут терять аппетит, может снижаться удой молока. Характерной особенностью является развитие прогрессирующего двустороннего помутнения роговицы, начинающегося с периферии. В некоторых случаях появляются поражения кожи (характеризующиеся образованием язв и экссудацией), которые вследствие некроза эпидермиса могут образовывать затвердевшие струпы, которые часто ограничены промежностью, выменем и сосками. Слюноотделение, вызванное гиперемией, может проявляться на ранней стадии и прогрессировать до эрозии языка, твердого нёба, десен и, как правило, кончиков буккальных сосочков. Поверхностные лимфатические узлы могут увеличиваться, а суставы конечностей могут отекать.

Признаки поражения нервной системы, такие как гиперестезия, отсутствие координации, нистагм и прижимание головы, могут наблюдаться при отсутствии других клинических признаков или как часть более широкого и характерного синдрома. Кроме того, недавно был описан ряд случаев ЗКЛ с дерматологическими проявлениями у оленей Сика, инфицированных герпесвирусом-2 коз (СрHV-2, Foyle et al., 2009 и источники, использованные в нем). Эти случаи проявлялись в виде кожных поражений в сочетании с лимфоцитарным васкулитом, характерным для ЗКЛ, причем СрHV-2 обнаруживали

методами ПЦР и секвенирования ДНК.

ЗКЛ, связанный с антилопами гну, встречается в животноводческих районах Восточной Африки, где скотоводы используют районы выпаса гну, а на юге Африки – районы совместного выпаса гну и крупного рогатого скота (КРС). Болезнь, однако, может также поражать множество других видов жвачных животных в зоологических коллекциях мира, и поэтому, помимо антилоп подсемейств *Alcelaphinae* и *Hippotraginae*, рекомендуется рассматривать всех жвачных животных в качестве восприимчивых.

ЗКЛ, связанный с овцами, встречается во всем мире у КРС и других видов, обычно возникает спорадически и поражает только одно или несколько животных. Однако иногда наблюдаются случаи поражения нескольких животных, и это, по-видимому, связано с определенными стадами овец, которые могут продолжать передавать болезнь в течение ряда лет. Болезнь также может поражать и вызывать значительные потери у североамериканских бизонов (*Bison bison*), благородных оленей (*Cervus elaphus*), других видов оленей и буйволов (*Bubalus bubalis*) и оленя Пера Давида (*Elaphurus davidianus*) и бантенгов (*Bos javanicus*). OvHV-2 также является причиной возникновения ЗКЛ в зоологических коллекциях, где случаи заболевания были зарегистрированы у различных видов, включая жирафа.

Доклады из нескольких стран, в частности из Норвегии, о том, что болезнь поражает домашних свиней, недавно были подтверждены обнаружением вирусной ДНК у пораженных животных (Loken et al., 1998; Syrjala et al., 2006). Экспериментальное заражение свиней с OvHV-2 также было задокументировано (Li et al., 2012). Признаки очень схожи с теми, которые наблюдаются у КРС, пораженного острой формой болезни.

У более резистентных видов, наблюдается затяжная инфекция и более выраженные поражения, тогда как у более восприимчивых видов течение болезни имеет тенденцию быть короче, а клинические признаки менее выражены. Умеренная форма болезни, описанная в 1930 году, была рассмотрена с некоторым скептицизмом, поскольку болезнь могла быть подтверждена только выявлением гистологических изменений, при проведении аутопсии. Однако недавние исследования с использованием молекулярных и серологических методов, по-видимому, подтверждают, что некоторые инфицированные животные могут восстанавливаться после умеренных или даже довольно тяжелых клинических проявлений (Michel et al., 1994). Некоторые исследования показывают, что значительное количество животных могут быть инфицированы, без развития клинических проявлений болезни.

Макроскопические патологические изменения отражают степень тяжести клинических признаков, но обычно они широко распространены и могут затрагивать большинство систем органов. Эрозии и кровоизлияния могут присутствовать во всем желудочно-кишечном тракте, а в более острых случаях могут быть связаны с геморрагическим содержимым кишечника. В целом, лимфатические узлы увеличены, хотя степень поражения лимфатических узлов варьирует у каждого животного. В дыхательных путях часто наблюдаются катаральные скопления, эрозии и образование дифтеритной пленки. В мочевом тракте часто присутствуют характерные эхимотические кровоизлияния эпителиальной оболочки мочевого пузыря, особенно у бизонов.

Гистологические изменения послужили основанием для подтверждения случаев поражения ЗКЛ и характеризуются эпителиальной дегенерацией, васкулитом, гиперплазией и некрозом лимфоидных органов, а также распространенными междоузельными скоплениями лимфоцитов в нелимфоидных органах. Васкулит, как правило, присутствует и может быть обнаружен в венах, артериях, артериолах и венулах мозга. Он характеризуется инфильтрацией лимфоцитами адвентициальной оболочки и средой, часто ассоциированной с фибриноидной дегенерацией. В мозге также может наблюдаться негнойный менингоэнцефалит с лимфоцитарной периваскулярной инфильтрацией и заметным увеличением количества клеток спинномозговой жидкости.

Гиперплазия лимфатических узлов характеризуется расширением лимфобластоидных клеток в паракортексе, тогда как дегенеративные поражения обычно связаны с

фолликулами.

Пространственное накопление лимфоидных клеток в нелимфоидных органах, в частности, в почечной коре и перипортальных областях печени, является типичным, а в случае почки может быть очень обширным с развитием множественных увеличенных белых очагов, диаметром 1-5 мм.

Патологические особенности ЗКЛ, независимо от вовлеченного возбудителя, по существу, похожи. Однако помимо гистологического исследования, методы, доступные для диагностики болезней, вызванных АНВ-1 и ОвНВ-2, как правило, специфичны для вируса и указаны ниже для каждого вируса.

2. Причинный патоген

Болезнь, вызываемая АНВ-1, ограничивается теми районами Африки, где обитают гну, и зоологическими коллекциями в других районах, и упоминается как ЗКЛ, связанная с гну (WA-). Форма болезни, вызываемая ОвНВ-2, присутствует во всем мире везде, где практикуется овцеводство, и описывается как ЗКЛ, связанная с овцами (SA-). Обе формы болезни могут иметь широкий спектр клинических проявлений, хотя характерные гистопатологические изменения очень схожи во всех случаях. Эти два вируса относятся к группе близкородственных жвачных макавирусов, которые заражают три подсемейства *Bovidae* (Полорогие) (*Alcelaphinae*, *Hippotraginae* (и *Caprinae*); все, вероятно, могут вызвать типичную ЗКЛ. В редких случаях вирусы этой группы, отличные от АНВ-1 и ОвНВ-2, были идентифицированы как возбудители ЗКЛ.

3. Борьба с болезнью

В настоящее время борьба с болезнью основана на отделении естественных хозяев от восприимчивых видов, что осуществляется в зависимости от видов животных. Животные, пораженные ЗКЛ, никогда не передают или редко передают инфекцию; следовательно, только естественные хозяева могут действовать как источник инфекции. Гну являются относительно эффективными переносчиками инфекции, и поэтому в смешанных коллекциях важно их отделить. Скотоводы должны разделять КРС и гну, и пастбища от мест последнего выпаса гну, особенно в период отела.

В отношении ОвНВ-2 требование об отделении овец зависит от восприимчивости видов. Таким образом, в случае оленя Пера Давида и бантенгов, необходимо обеспечить строгое разделение и избегать контакта через фомиты. В равной степени необходимо предпринять все разумные усилия для отделения зубров и оленей от овец, хотя лани (*Dama dama*), по-видимому, являются более устойчивым к ЗКЛ. Обычно КРС содержится с овцами без принятия мер предосторожности для защиты от передачи болезни.

4. Требования в отношении зоонозного риска и биобезопасности

Болезнь наблюдалась только у чувствительных к ЗКЛ видов животных, как описано выше, и только после контакта с видами-хозяевами. Неспособность ЗКЛ-восприимчивых видов к распространению бесклеточного вируса делает их конечными хозяевами вируса. Поэтому требования к биобезопасности должны сосредоточиться на отделении восприимчивых хозяев от других видов в пределах территории, особенно для тех, которые считаются особенно восприимчивыми, таких как бизоны, олени или бантенги.

5. Дифференциальная диагностика

Клинические признаки формы «голова и глаза» ЗКЛ схожи с клиническими признаками других болезней, вызывающих поражения ротовой полости (Holliman, 2005). Таким образом, при подозрении на ЗКЛ в ходе потенциальной дифференциальной диагностики могут рассматриваться ВВД КРС, чума КРС, ящур, катаральная лихорадка и везикулярный стоматит. . Окончательный диагноз ЗКЛ может быть подтвержден дополнительными данными, такими как обнаружение ДНК вируса ЗКЛ, вирус-специфичный иммунный ответ и / или результаты гистопатологических исследований, указывающие на ЗКЛ.

В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Таблица 1. Методы исследований, для диагностики злокачественной катаральной лихорадки и их цели

Метод	Цель			
	Виды естественных хозяев		Животные с клиническими признаками болезни	Все животные
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельных животных	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции - надзор
Идентификация возбудителя¹				
ПЦР	+	+	+++	++
Выделение вируса	+(AHSV-1)	+(AHSV-1)	+(AHSV-1)	+(AHSV-1)
Выявление иммунного ответа				
кИФА	+++	+++	++	+++
Вируснейтрализация	+(AHSV-1)	+(AHSV-1)	-	-
IFAT	+	+	+	-
Иммунопероксидазный тест	+	+	+	-

Обозначения: +++ = рекомендуемый метод; ++ = подходящий метод; + = может использоваться в некоторых ситуациях, однако стоимость, надежность или другие факторы ограничивают его применение; - = не подходит для данной цели.

Несмотря на то, что не все тесты, включенные в категории +++ или ++, прошли официальную валидацию, однако установившаяся практика и факт широкого применения при отсутствии сомнительных результатов, делают их приемлемыми.

ПЦР = полимеразная цепная реакция; кИФА = конкурентный иммуноферментный анализ; IFAT = реакция непрямой иммунофлуоресценции.

Следует обратить внимание, что выделение вируса и нейтрализация вируса были задокументированы только в отношении AHSV-1.

Следует подчеркнуть, что вирусный возбудитель SA-MCF не может быть стабильно выделен, а доказательства наличия OvHV-2 основаны на: (а) наличии антител в сыворотках всех домашних овец, которые перекрестно реагируют с антигенами AHSV-1 при проведении реакции непрямой иммунофлуоресценции (IFA), твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) и / или иммуноблотов (Hart et al., 2007, Li et al., 2001), но не в случае реакций нейтрализации; (b) выработке антител, вступающих в перекрестную реакцию с AHSV-1 при проведении IFA и конкурентного иммуноферментного анализа (кИФА) у большинства представителей КРС с SA-ЗКЛ и экспериментально зараженных животных; (с) обнаружении и клонировании ДНК из лимфобластоидных клеточных линий, полученных в ходе естественного заражения SA-ЗКЛ, которые перекрестно гибридизуются с ДНК AHSV-1, но отличаются от нее; (d) обнаружении посредством ПЦР ампликонов, уникальных для OvHV-2, в периферической крови и пораженных тканях животных с SA-ЗКЛ. Не так давно OvHV-2, собранный из назальных выделений овец, использовали для заражения кроликов, КРС и бизонов, индуцируя ЗКЛ с характерными клиническими признаками и гистопатологией (Li et al., 2011; Taus et al., 2006)).

Диагностика ЗКЛ, основанная на клинических признаках и макроскопическом патологическом исследовании, не может быть надежной, поскольку они могут

¹ Рекомендуется сочетание методов идентификации возбудителей, применяемых в отношении одного и того же клинического образца

существенно отличаться. Гистологическое исследование различных тканей, в том числе, предпочтительно, почек, печени, мочевого пузыря, буккального эпителия, роговицы / конъюнктивы и мозга, необходимо для постановки более точного диагноза. Однако в настоящее время может быть предпринята попытка выявления антитела к вирусу и / или вирусной ДНК, и такой метод становится все более предпочтительным.

Большинство лабораторных исследований для выявления вирус-специфических антител полагались на один аттенуированный изолят (WC11), который в лабораторных условиях подвергали множественным пассированиям в качестве источника вирусного антигена и ДНК (Plowright et al., 1960). В настоящее время имеется полная нуклеотидная последовательность вирулентного вируса низкого пассажа (C500), которая станет основой для дальнейших исследований этого вируса (Ensser et al., 1997). В лабораторных условиях пассаж штамма AINV-1 C500 приводит к аттенуации вирулентности и способности размножаться бесклеточным образом, сопровождаясь изменениями генома (Wright et al., 2003). Данный высокопассированный производный AINV-1 C500 использовали в качестве кандидатной вакцины против ЗКЛ у гну, и в качестве источника антигена для серологического анализа (Haig et al., 2008; Russell et al., 2012).

1. Идентификация возбудителя

1.1. Клинически инфицированные животные

1.1.1. Выделение

Характерной особенностью ЗКЛ является отсутствие детектируемого вирусного антигена или герпесвирус-специфическая цитология в пределах поражений. Подтверждение инфицирования путем выделения вируса на сегодняшний день может быть выполнено только в отношении AINV-1, а попытки выделить вирус, вызывающий болезнь, у животных с клиническими проявлениями SA-ЗКЛ заканчиваются неудачно. Однако были получены линии лимфобластоидных клеток от пораженного КРС и оленей, некоторые из которых переносят ЗКЛ после инокуляции экспериментальным животным (Reid et al., 1989).

Как правило, инфекционная активность AINV-1 явно связана с клетками, и поэтому выделение может быть произведено только из клеточных суспензий либо лейкоцитов периферической крови, лимфатических узлов, либо других пораженных тканей. Клеточные суспензии готовят в тканевой культуральной жидкости, приблизительно 5×10^6 клеток / мл и инокулируют в предварительно сформированные однослойные клеточные культуры. Широко использовались бычьи тиреоидные клетки, однако вероятно, что большинство первичных и низкопассированных однослойных клеточных культур, полученных от жвачных животных, будут служить подходящим клеточным субстратом для выделения вируса. После инкубации в течение 36-48 часов, культуральную среду меняют, и проводят исследование монослоя под микроскопом ($\times 40$) для подтверждения цитопатического действия (ЦПД). Они имеют характерный вид многоядерных очагов внутри монослоев, которые затем постепенно стягиваются, образуя плотные тела с отделимыми цитоплазматическими процессами. За этим следует повторный рост обычных монослоев. Для визуализации ЦПД может потребоваться до 21 дня, и оно редко сохраняется до 7 дня. Инфекционная активность на этом этапе имеет тенденцию быть в значительной степени связанной с клеткой, и поэтому при любом дальнейшем пассировании или при хранении должны использоваться методы, обеспечивающие жизнеспособность клетки. Специфичность изолята определяют с использованием специфичных антисывороток или моноклональных антител (МАт) при проведении флуоресцентного анализа или иммуноцитохимического исследования.

1.1.2. Вирусная ДНК

Характерно, что в пораженных тканях может быть обнаружено очень немного вирусной ДНК, поэтому необходимо амплифицировать вирусный геном либо с использованием традиционной культуры, либо методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Была опубликована полная последовательность изолята С500 АНВ-1 и двух изолятов ОвНВ-2, что позволило разработать праймеры для реакций ПЦР из консервативных участков генома (Ensser et al., 1997; Hart et al., 2007; Taus et al., 2007). Для АНВ-1 и ОвНВ-2 были разработаны гнездовая ПЦР и ПЦР в реальном времени (Baxter et al., 1993; Flach et al., 2002; Hussy et al., 2001; Traul et al., 2005), в то время как ПЦР для выявления пан-герпесвируса (VanDevanter et al., 1996) использовали для идентификации СрНВ-2 у оленей Сика, пораженных ЗКЛ (Foyle et al., 2009), и ЗКЛ-ассоциированного вируса у белохвостых оленей (Li et al., 2000)). Данный анализ нацелен на последовательность генов вирусной ДНК-полимеразы и используется для проведения филогенетического сравнения АНВ-1 и родственных вирусов (Li et al., 2005a).

1.1.2.1. Протоколы ПЦР

Данные протоколы основаны на опубликованных анализах гнездовой ПЦР, предназначенных для выявления ОвНВ-2 (Baxter et al., 1993) или для дифференцирования АНВ-1 и ОвНВ-2 (Flach et al., 2002) в образцах ДНК естественных хозяев или видов животных, пораженных ЗКЛ. При использовании методов выделения ДНК следует избегать органической экстракции, так как могут сохраниться остатки, ингибирующие ПЦР. Методы экстракции геномной ДНК на основе диоксида кремния широко используются и являются надежными. Методы экстракции ДНК из образцов фиксированной ткани подлежат валидации перед использованием в данных исследованиях. Примерный протокол приведен ниже, однако оптимальные условия реакции подлежат валидации для каждой системы ферментов и буферов. Протоколы ПЦР в реальном времени для обнаружения ДНК вируса ЗКЛ (Traul et al., 2005; Hussy et al., 2001) не приведены, поскольку они должны быть оптимизированы для каждого набора реактивов и каждой используемой системы анализа.

1.1.2.2. Протокол 1: Полугнездовая ПЦР для обнаружения ДНК ОвНВ-2 (Baxter et al., 1993))

i) Праймеры

Название	Длина	Последовательность
556	30 mer	5'-AGT CTG GGT ATA TGA ATC CAG ATG
555	28 mer	5'-TTC TGG GGT AGT GGC GAG CGA AGG
755	30 mer	5'-AAG ATA AGC ACC AGT TAT GCA TCT

ii) Первичная амплификация (размер продукта 422 пар оснований)

Перед ПЦР составляют мастер-микс, включающий все компоненты, за исключением матричной ДНК. Затем его распределяют в пробирки для проведения ПЦР, содержащие исследуемую или контрольную ДНК. Данный метод минимизирует ошибки пипетирования при анализе большого количества образцов. Мастер-микс содержит (для каждой реакции): 10 × ПЦР-буфер, 5 мкл; MgCl₂ (25 мМ), 1 мкл; смесь dNTP (1 мМ), 5 мкл; праймер 556 (10 мкМ), 1 мкл; праймер 755 (10 мкМ), 1 мкл; ДНК-полимеразу Taq (5 мкг / мкл), 0,125 мкл; и безнуклеазную воду; 31,875 мкл; в общем объеме 45 мкл на реакцию. Образцы по 5 мкл,

содержащие до 1 мкг исследуемой или контрольной ДНК, помещают в пробирки для проведения ПЦР и добавляют по 45 мкл мастер-микса в каждую пробирку. Затем пробирки используют для ПЦР в соответствии с протоколом, используя ПЦР-машину с нагретой крышкой. При использовании ПЦР-машины без нагретой крышки для предотвращения испарения, поверх каждой реакции ПЦР следует наслаивать минеральное масло.

Рекомендуемые условия циклирования: включение при горячем запуске при 95°C в течение 15 минут; затем 15 циклов при 94°C в течение 60 секунд, при 60°C в течение 60 секунд и при 72°C в течение 60 секунд; с конечным расширением при 72°C в течение 10 минут. Условия следует регулировать в соответствии с Taq-полимеразой и используемым термоциклером.

iii) Вторичная амплификация (размер продукта 238 bp)

Мастер-микс для вторичной амплификации включает (для каждой реакции): 10 × ПЦР-буфер, 5 мкл; MgCl₂ (25 mM), 1 мкл; смесь dNTP (1 mM), 5 мкл; праймер 556 (10 мкМ), 1 мкл; праймер 555 (10 мкМ), 1 мкл; Taq-полимеразу ДНК (5 мкг / мкл), 0,125 мкл; и безнуклеазную воду, 33,875 мкл; общим объемом 48 мкл. Образцы по 2 мкл каждого продукта первичной амплификации помещают в пробирки для ПЦР и к каждой пробирке добавляют по 48 мкл основной смеси. Условия циклизации для вторичной ПЦР такие же, как и для первичной ПЦР, за исключением того, что используют 30 циклов амплификации. После амплификации приблизительно по 10 мкл каждой вторичной реакции ПЦР следует запускать на 1,8% агаровом геле для визуализации продуктов ПЦР.

1.1.2.3. Протокол 2: : Полугнездовая ПЦР для обнаружения ДНК AINV-1 и OvHV-2 (Flach et al., 2002)

i) Праймеры

Название	Длина	Последовательность*
Праймер POL1	24-mer	5'-GGC (CT)CA (CT)AA (CT)CT ATG CTA CTC CAC-3'
Праймер POL2	21-mer	5'-ATT (AG)TC CAC AAA CTG TTT TGT-3'
Праймер OHVPol	20-mer	5'-AAA AAC TCA GGG CCA TTC TG-3'
Праймер AINVPol	20-mer	5'-CCA AAA TGA AGA CCA TCT TA-3'

*базовые позиции в круглых скобках являются дегенеративными: олигонуклеотид будет содержать любое из двух указанных оснований в этих позициях.

Праймеры POL1 и POL2 нацелены на сегмент гена ДНК-полимеразы, который сохраняется как в OvHV-2, так и в AINV-1, усиливая фрагмент 386 пар оснований. OHVPol и AINVPol являются специфическими праймерами для OvHV-2 и AINV-1 соответственно, которые усиливают продукты 172 пар оснований.

ii) Первичная амплификация

Мастер-микс, на реакцию: 10 × буфер, 2,5 мкл; MgCl₂ (25 mM), 0,5 мкл; смесь dNTP (1 mM), 2,5 мкл; праймер POL1 (10 мкМ), 1 мкл; праймер POL2 (10 мкМ), 1 мкл; ДНК -полимераза Taq (5 мкг / мкл), 0,125 мкл;

безнуклеазная вода, 12,375 мкл (до 25 мкл). Образцы по 5 мкл, содержащие до 1 мкг исследуемой или контрольной ДНК, помещают в пробирки для проведения ПЦР и в каждую пробирку добавляют 20 мкл мастер-микса. Затем пробирки используют в ПЦР в соответствии со следующим протоколом: активация горячим пуском при 95°C в течение 15 минут; затем 25 циклов при 94°C в течение 60 секунд, при 60°C в течение 60 секунд и при 72°C в течение 60 секунд; с конечным расширением при 72°C в течение 10 минут. Условия следует регулировать в соответствии с Taq-полимеразой и используемым термоциклером.

iii) Вторичная амплификация

Мастер-микс, на реакцию: 10 × буфер, 2,5 мкл; MgCl₂ (25 мМ), 0,5 мкл; смесь dNTP (1 мМ), 2,5 мкл; праймер ANVpol или ONVpol (10 мкМ), 1 мкл; праймер POL2 (10 мкМ), 1 мкл; ДНК-полимераза Taq (5 мкг / мкл), 0,125 мкл; безнуклеазная вода, 12,375 мкл (до 25 мкл). Образцы по 2 мкл каждого продукта первичной амплификации помещают в ПЦР-пробирки и в каждую пробирку добавляют по 23 мкл мастер-микса. Условия циклизации для вторичной ПЦР такие же, как и для первичной ПЦР, за исключением того, что используют 30 циклов амплификации. После амплификации ПЦР следует проводить на 1,8% агаровом геле с использованием приблизительно по 10 мкл каждой вторичной реакции.

1.2. Естественные хозяева

Практически все антилопы гну, живущие в диких условиях, инфицированы ANHV-1 до достижения 6-месячного возраста, вирус интенсивно распространяется в течение перинатального периода. Виды *Connochaetes taurinus taurinus*, *C.t. albojubatus* и *C. gnu*, предположительно, заражены одним и тем же вирусом. Инфекция также, по-видимому, сохраняется в большинстве групп гну, содержащихся в зоологических коллекциях. Однако возможно, что инфекция отсутствовала у животных, которые были изолированы до 6 месячного возраста, или живут небольшими группами. Естественная инфекция была успешно подтверждена методом гибридизации *in-situ* на срезах ткани легких у телят *C.t. taurinus* в Южной Африке (Michel et al., 1997).

После инфицирования существует короткий период, когда вирус выделяется в бесклеточной форме и может быть выделен из носовых смывов. Вирус также может быть выделен из лейкоцитов крови в этот период, но в случае более старых животных это менее вероятно, за исключением случаев, если иммунитет животного не будет ослаблен как следствие стресса или фармакологического вмешательства. Кроме того, вирус может быть выделен путем создания культур тканей у явно здоровых животных, и это было достигнуто в монослойных культурах как почек, так и клеток щитовидной железы, полученных от взрослых животных.

Домашние овцы являются естественными хозяевами OvHV-2 и, вероятно, все популяции овец инфицированы вирусом в отсутствие какого-либо клинического проявления. Однако исследования динамики инфекции в стадах овец приводили к противоречивым результатам, а некоторые предполагают, что продуктивное заражение происходит в первые недели жизни ягненка, в то время как другие предполагают, что заражение большинства ягнят не происходит до 3-месячного возраста, а выделение инфекционного вируса происходит в период между 5 и 6 месяцами (Li et al., 2004). Имеются также данные о том, что некоторые ягнята могут заразиться в утробе матери, в то время как другие исследования показывают, что удаление ягнят от матерей в течение первой недели позволяет вырастить животных, свободных от вируса. Следовательно, могут быть значительные изменения в динамике инфекции у разных стад. Однако косвенные доказательства наличия ЗКЛ у восприимчивых видов свидетельствуют о том, что перинатальные стада овец являются основным источником инфекции, в то время как периодические вспышки инфекции может возникать у овец всех возрастов.

В дополнение к домашним овцам, домашние козы и другие члены подсемейства *Caprinae* имеют антитела, реагирующие с АИHV-1, аналогично сывороткам овец. Это означает, что эти виды инфицированы вирусами, подобными OvHV-2. В ходе ПЦР было обнаружено, что некоторые козы являются OvHV-2-положительными, в то время как сообщалось о нескольких случаях ЗКЛ, вызванных CpHV-2 (Foyle et al., 2009). Другие крупные антилопы подсемейств *Alcelaphinae* и *Hippotraginae* также инфицированы близкородственными по антигенным свойствам гаммагерпесвирусами (Li et al., 2005a), но доказательства того, что они могут распространяться на другие виды и вызывать ЗКЛ, отсутствуют, за исключением редких случаев инфицирования животных, содержащихся в неволе.

2. Серологические исследования

2.1. Клинически инфицированные животные

Иммунный ответ клинически пораженных животных ограничен, при этом нейтрализующие антитела не вырабатываются. Антитела к OvHV-2 были обнаружены только с использованием антигена АИHV-1 в качестве источника. Антитела к АИHV-1 могут быть выявлены у 70-80% клинически инфицированного КРС с помощью реакции иммунофлуоресценции (РИФ) или методом иммунопероксидазного анализа (ИПТ), но может отсутствовать у инфицированных оленей или животных, у которых развивается острая или скоротечная форма болезни. Первым тестом, разработанным для обнаружения антител к OvHV-2, был ИФА (Li et al., 1994) с использованием МАт (15-А), который нацелен на эпитоп, который, по-видимому, консервативен для всех вирусов ЗКЛ и, вероятно, также применим в отношении животных, инфицированных АИHV-1 (Li et al., 2005a). Тест использовали для обнаружения антител в сыворотке диких и домашних жвачных животных в Северной Америке и, предположительно, он имеет некоторые достоинства (раздел В.2.4) (Li et al., 2001). Сравнительное исследование ЗКЛ-диагностики методами гистопатологии, ИФА и OvHV-2-специфической ПЦР показало, что большинство особей КРС, гистопатологически классифицированных как ЗКЛ-положительные, также имели обнаруживаемые уровни ЗКЛ-специфических антител и ДНК OvHV-2 в крови (Muller-Doblies et al., 1998). Также был разработан прямой ИФА на основе антигенов WC11, а результаты анализа успешно коррелировали с параллельными испытаниями с использованием ИФА (Fraser et al., 2006).

2.2. Естественные хозяева

Антитела, по-видимому, последовательно развиваются у гну после заражения и могут быть идентифицированы с помощью реакции нейтрализации с использованием бесклеточного изолята WC11 или посредством реакции иммунофлуоресценции, а также путем использования изолята WC11 и анти-бычьего IgG, который, как было показано, реагирует с IgG гну. Штамм вируса ЗКЛ Minnesota, который неотличим от штамма WC11 АИHV-1, используют для производства антигенов для проведения ИФА.

Антитела к OvHV-2 были обнаружены только с использованием АИHV-1 в качестве источника антигена. В ходе исследования реакции сыворотки овец на структурные белки АИHV-1 в иммуноблоттинге реакционная способность различных сывороток резко различалась, указывая на то, что отдельные овцы реагировали по-разному в отношении распознавания антителом перекрестно реагирующих эпитопов АИHV-1.

До сих пор не было попытки стандартизировать тест РИФ и ИПТ, но два нижеуказанных метода приведены в качестве примеров. ИФА доступен в виде коммерческого набора.

2.2.1. Реакция непрямой иммунофлуоресценции

РИФ менее специфична, чем реакция вируснейтрализации; ее можно использовать для демонстрации нескольких разновидностей «ранних» и «поздних» антигенов в монослоях, инфицированных АНВ-1. Антитела, реагирующие в РИФ или IPT, вырабатываются у КРС и экспериментально инфицированных кроликов во время инкубационного периода, а затем в ходе клинического течения болезни, хотя перекрестные реакции с некоторыми другими герпесвирусами КРС, а также с ОвНВ-2, уменьшают дифференциальное диагностическое значение. Обнаружение таких перекрестно реагирующих антител иногда может быть полезным для поддержки диагноза SA-ЗКЛ.

2.2.1.1. Приготовление фиксированных предметных стекол

АНВ-1 (штамм WC11) инокулируют в новые или свежеконфлюировавшие культуры клеток. Неинокулированные контрольные культуры обрабатывают параллельно. Примерно через 4 дня - когда ожидается появление первых признаков ЦПД, но до того, как станет очевидным проявление ЦПД, культуры обрабатывают следующим образом: среду удаляют, промывают с помощью ФБР, клетки удаляют раствором трипсин-версина, клетки центрифугируют при приблизительно 800g в течение 5 минут, надосадочную жидкость сливают и клетки ресуспендируют в 10 мл фосфатно-буферного солевого раствора (ФБР) на каждый пластиковый флакон с клеточной культурой объемом 800 мл. По капле исследуемой клеточной суспензии вносят в две лунки многолуночного предметного стекла, покрытого политетрафторэтиленом; высушивают на воздухе и фиксируют в ацетоне. Капли окрашивают положительной стандартной сывороткой и конъюгированным анти-IgG согласно видам. Частоту положительных и отрицательных клеток определяют под флуоресцентным микроскопом. Клеточную суспензию корректируют, добавляя неинфицированные клетки и / или ФБР для получения подходящей концентрации, которая при появлении на предметном стекле будет образовывать один слой клеток с четко определенными положительными клетками на фоне отрицательных клеток. Скорректированную положительную клеточную суспензию и контрольные отрицательные суспензии распределяют на многолуночных предметных стеклах желаемым образом и высушивают на воздухе. Закрепляют в ацетоне в течение 10 минут. Промывают, высушивают и хранят на силикагеле в герметичном контейнере при -70°C .

Альтернативной процедурой, которую легче оценить, является подготовка монослоев инфицированных и неинфицированных клеток в пробирках Лейтона или слайд-камерах. Клеточные монослои инфицируют в диапазоне от 150 до 200 ТЦД₅₀ (50% 50% средняя инфицирующая тканевую культуру доза) вируса, разведенного среде культур клеток. Инфицированные и неинфицированные предметные стекла фиксируют в ацетоне и хранят, как указано выше, при -70°C .

2.2.1.2. Процедура исследования

- i) Предметные стекла дегидратируют в течение 5 минут с помощью ФБР, промывают в дистиллированной воде и высушивают на воздухе.

Сыворотку разводят 1/20 в ФБР. Образцы, которые дают высокое фоновое окрашивание, могут быть повторно протестированы при более высоких разведениях. Разведенные жидкости наносят в одну ЗКЛ-положительную лунку клетки и одну отрицательную контрольную лунку для каждого образца. Необходимо включать положительную и отрицательную контрольные сыворотки. В идеальных условиях исследование подтверждают путем титрования положительного контроля для

определения его конечной точки.

- ii) Инкубируют во влажной камере при 37°C в течение 30 минут.
- iii) Сливают жидкость с ореолов. Предметные стекла дважды промывают в двух ФБР, по 5 минут в каждом.
- iv) Предметные стекла промывают в ФБР в течение 1 помешивая, а затем высушивают на воздухе.
- v) Наносят конъюгат флуоресцеин изотиоцианата (FITC) против кроличьего антибычьего IgG в заданном рабочем разведении.
- vi) Инкубируют при 37°C в течение 20 минут, с предметных стекол сливают жидкость и промывают в двух ФБР, по 10 минут в каждом.
- vii) Окрашивают синим Эванса 1/100 000 в течение 30 секунд и промывают в ФБР в течение 2 минут. Окунают в дистиллированную воду, высушивают и промывают в ФБР / глицерине (50/50).
- viii) Исследуют под флуоресцентным микроскопом для выявления специфического связывания антитела с инфицированными клетками.

2.2.2. Иммунопероксидазный анализ

Разведение АНВ-1, выращенного на культуре клеток бычьей носовой раковины (ВТ), содержащее приблизительно 10^3 ЦПД₅₀ готовят в обработанной трипсином суспензии ВТ клеток и высевают в пробирки Лейтона, содержащие покровные стекла, по 1,6 мл на пробирку, или на четырехкамерные предметные стекла, по 1,0 мл на камеру.

Культуры клеток наблюдают в течение 4-6 дней для выявления ЦПД, и при появлении признаков ЦПД культуры фиксируют ацетоном. Перед фиксацией с предметных стекол снимают пластиковые камеры, но не прокладки и применяют ацетон (например, тип UltimAR, не способствующий деградации прокладки). Зафиксированные клетки хранят при -70°C.

2.2.2.1. Процедура исследования

- i) Готовят ИРТ разбавитель (21,0 г NaCl и 0,5 мл твина 20 добавляют к 1 л 0,01 М ФБСР, рН 7,2) и промывочную жидкость (0,5 мл твина 20 добавляют к 1 л 0,01 М ФБР, рН 7,2).
- ii) Исследуемую сыворотку разводят 1/20 в ИРТ разбавителе, и наносят 150-200 мкл на зафиксированное покровное стекло или предметное стекло с вирусом.
- iii) Покровное стекло инкубируют во влажной камере при 37°C в течение 30 минут.
- iv) Покровное стекло трижды окунают в промывочную жидкость.
- v) 150-200 мкл разбавленного (1/5000 в ИРТ разбавителе) бычьего IgG, меченого пероксидазой, наносят на покровное стекло или предметное стекло.
- vi) Покровное стекло или предметное стекло инкубируют во влажной камере при 37°C в течение 30 минут.
- vii) Покровное стекло трижды окунают в промывочную жидкость.

- viii) Субстрат АЕС (3-амино-9-этилкарбазол, 20 мг/ мл в диметилформамиде) разводят в дистиллированной воде (5 мл дистиллированной воды, 2 капли 50 мМ натрий-ацетатного буфера рН 5,0, 2 капли перекиси водорода (30%) и 3 капли АЭК) и наносят на покрывное стекло или предметное стекло.
- ix) Инкубируют во влажной камере при 37°C в течение 8-10 минут.
- x) Покровное стекло окунают в дистиллированную воду, высушивают на воздухе и устанавливают на стеклянное покрывное стекло. Предметные стекла считают сухими.
- xi) Предметное стекло считают под световым микроскопом. Наличие красновато-коричневого цвета в ядрах инфицированных клеток указывает на положительную реакцию.

2.2.3. Реакция вируснейтрализации

Были разработаны тесты для обнаружения антител к АНВ-1 как в естественно зараженном резервуаре, так и индикаторных хозяевах. Первый из них - РВНс использованием бесклеточного вируса штамма WC11, в другом используется изолят бубала (АНВ-2). Также можно использовать аттенуированный штамм АНВ-1 С500. Эти вирусы имеют перекрестно-реактивные антигены, и поэтому в реакции можно использовать любой из штаммов. Тест является трудоемким, но может быть выполнен на микротитрационных планшетах с использованием клеток низкого пассажа или клеточных линий. Основными областями применения является изучение области и степени естественного заражения вирусом гамма-герпеса в живой природе, среди видов, живущих в неволе и зоопарках и, в меньшей степени, в поголовьях овец. Он также оказался полезен при попытках разработки вакцины, включая недавно разработанную вакцину против АНВ-1, которая индуцировала нейтрализующие антитела в плазме крови КРС и носовых выделениях (Haig et al., 2008). РВН непригодна в качестве диагностического теста для клинически инфицированных животных, поскольку вируснейтрализующие антитела, не вырабатываются у клинически восприимчивых видов.

АНВ-1 (например, штамм WC11) выращивают в первичных или вторичных клеточных культурах почек КРС, щитовидной железы, семенников или другого подходящего типа клеток. Вирус хранится в аликвотах при -70°C. Содержимое титруют для определения разведения, которое даст 100 ТЦД₅₀ в 25 мкл в условиях теста.

2.2.3.1. Процедура исследования

- i) Сыворотку инактивируют в течение 30 минут на водяной бане при 56°C.
- ii) Готовят двойные разведения исследуемой сыворотки в среде культур клеток в диапазоне от 1/2 до 1/16 с использованием 96-луночного плоскодонного микротитрационного планшета для клеточных культур, по четыре лунки на каждое разведение и по 25 мкл на лунку. В тест также включают положительные и отрицательные контрольные сыворотки. Стандартные сыворотки отсутствуют, однако готовят и титруют в соответствующем диапазоне внутренние положительные стандарты.
- iii) В каждую лунку вносят по 25 мкл вируса АНВ-1 при разведении в культуральной среде, рассчитанном для получения 100 ТЦД₅₀ на лунку.
- iv) Инкубируют в течение 1 часа при 37°C. Остаточный вирусный запас также инкубируют.
- v) Оставшийся вирус в четырех десятикратных разведениях подлежит

обратному титрованию при использовании 25 мкл на лунку, но не менее четырех лунок на разведение.

- vi) Добавляют 50 мкл суспензии клеток бычьей почки в объеме 3×10^5 клеток / мл на лунку.
- vii) Планшеты инкубируют в увлажненной атмосфере CO₂ при 37°C в течение 7-10 дней.
- viii) Планшеты считывают под микроскопом на предмет выявления ЦПД. Тест валидируют посредством обратного титрования вируса (который должен давать значение 100 ТЦД₅₀ в допустимом диапазоне от 30 до 300) и контрольных сывороток. Стандартная положительная сыворотка должна давать титр в пределах $0,3 \log_{10}$ единиц от ее предопределенного среднего.
- ix) Результаты исследуемой сыворотки определяют методом Спирмена-Кербера как разведение сыворотки, нейтрализующее вирус в 50% лунок.
- x) Отрицательная сыворотка не должна иметь нейтрализующего действия при исследовании с использованием самого низкого разведения (1/2 эквивалента к разведению 1/4 на стадии нейтрализации).

2.2.4. Конкурентный иммуноферментный анализ (ИФА)

Для выявления антител к OvHV-2 (Li et al., 1994, 2001) был разработан ИФА с использованием МАт (15-А), направленного на эпитоп из комплекса гликопротеинов, который, по-видимому, консервативен для всех ЗКЛ-вирусов. МАт был получен для изолята вируса Minnesota, который неотличим от штамма WC11 AHSV-1. Тест был использован для обнаружения антител в сыворотке диких и домашних жвачных животных в Северной Америке, и было обнаружено антитело к следующим патогенным вирусам: AHSV-1, AHSV-2, OvHV-2, CpHV-2, а также герпесвирус неизвестного происхождения, который, согласно наблюдениям, вызывал классический ЗКЛ у белохвостого оленя, а также вирусы ЗКЛ-группы, до сегодняшнего дня не зарегистрированные в качестве патогенных, такие как вирусы, переносимые антилопой Бейза, мускусным быком, и другие (Li et al., 2005a). Преимущество ИФА заключается в том, что данный тест работает быстрее и эффективнее РИФ или ИРТ. Дополнительные данные валидации станут доступными, как только его использование будет расширено на большее количество в других частях мира. Одно из сопоставлений между ИФА, ПЦР и гистопатологической диагностикой SA-ЗКЛ (Muller-Doblies et al., 1998) показало, что эти три подхода имели хорошую сопоставимость.

Полный набор реагентов для ИФА, включая предварительно сенсibilизированные планшеты, меченые МАт, и контрольные сыворотки, имеются в продаже. Для лабораторий, желающих подготовить свои собственные сенсibilизированные антигеном планшеты, предоставляется следующий протокол. ИФА планшеты сенсibilизируют 50 мкл раствора, содержащего 0,2 мкг полуочищенных вирусных антигенов MCF (Minnesota или WC11 изоляты AHSV-1) в 50 мМ карбоната / бикарбонатного буфера (pH 9,0) на лунку при температуре 4°C (39°F) в течение 18-20 часов. Сенсibilизированные планшеты блокируют при комнатной температуре (21-25 °C, 70-77 °F) в течение 2 часов с использованием 0,05 М ФБР, содержащего 2% сахарозы, 0,1 М глицина, 0,5% бычьего сывороточного альбумина и 0,44% NaCl (pH 7,2). После блокировки лунки опорожняют, и планшеты сушат в среде с низкой влажностью при 37°C в течение 18 часов, запечатывают в полиэтиленовые пакеты с сиккативом и хранят при 4 °C (Li et al., 2001). МАт 15-А конъюгируют с пероксидазой хрена с использованием стандартного метода периодатного окисления.

2.2.4.1. Процедура исследования

- i) Положительные и отрицательные контрольные образцы и исследуемые образцы разводят (либо сыворотку, либо плазму) 1/5 буфером для разведения (ФБР, содержащим 0,1% твина 20, рН 7,2).
- ii) 50 мкл разведенных контрольных или исследуемых образцов добавляют на сенсibilизированный антигеном планшет (четыре лунки для отрицательного контроля и две лунки для положительного контроля). Лунку А1 оставляют пустой и используют в качестве заготовки для планшетного ридера.
- iii) Планшет накрывают парафильмом и инкубируют в течение 60 минут при комнатной температуре (21-25 ° С, 70-77 ° F).
- iv) Используя промывочный флакон, планшет трижды промывают промывочным буфером (такой же, как буфер для разведения: ФБР содержащий 0,1% твина 20, рН 7,2).
- v) Готовят свежий 1 × пероксидазный конъюгат антител в буфере для разведения в соответствии с предыдущим титрованием/ оптимизацией для каждого препарата конъюгата или инструкциями производителя.
- vi) 50 мкл разбавленного пероксидазного конъюгата антител добавляют в каждую лунку с образцами. Планшет накрывают парафильмом и инкубируют в течение 60 минут при комнатной температуре (21-25 ° С, 70-77 ° F).
- vii) Планшет трижды промывают промывочным буфером.
- viii) В каждую лунку с образцами добавляют 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Инкубируют в течение 60 минут при комнатной температуре (21-25° С, 70-77° F). Раствор из лунок не удаляют.
- ix) В каждую лунку добавляют 100 мкл стоп-раствора (0,18 М серной кислоты). Раствор из лунок не удаляют.
- x) Оптическую плотность (ОП) на ИФА планшете определяют при 450 нм.
- xi) Расчет % ингибирования:

$$100 - \frac{\text{Образец ОП (Среднее значение)} \times 100}{\text{Среднее отрицательное контрольное значение ОП}} = \% \text{ ингибирования}$$

- xii) *Интерпретация результатов:* если показатель ингибирования исследуемого образца составляет или превышает 25%, он считается положительным. Если показатель ингибирования исследуемого образца составляет менее 25%, он считается отрицательным.
- xiii) *Валидация теста:* среднее значение ОП отрицательного контрольного образца должно находиться в диапазоне между 0,40 и 2,10. Среднее значение положительного контрольного образца должно иметь показатель ингибирования более 25%.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

В настоящее время вакцина против данной болезни не зарегистрирована.

Вакцинация против ЗКЛ может быть рассмотрена для использования в отношении тех выращиваемых видов животных, которые имеют более высокую подверженность или чувствительность к ЗКЛ, такие как КРС в регионах Восточной и Южной Африки, где распространено разведение гну, бантенги, зубры в Северной Америке, выращиваемые на Земле олени и восприимчивые виды в зоологических коллекциях. Вакцинация хозяев, таких как гну или овцы, по-видимому, не будет коммерчески целесообразной, что также относится к большинству стад КРС, которые подвержены риску заболевания спорадической SA-ЗКЛ. Многочисленные попытки создать защитную вакцину против АНВ-1 не имели успеха. Однако недавние исследования, направленные на стимулирование высоких титров нейтрализующего антитела в носовых выделениях КРС, дали обнадеживающие результаты (Haig et al., 2008). Эта живая аттенуированная вакцина индуцировала защиту в случае интраназального экспериментального введения патогена АНВ-1. Было также обнаружено, что защита сохраняется в течение не менее 6 месяцев (Russell et al., 2012). Этот подход, вероятно, станет целью дальнейших исследований, включая полевые испытания.

Поскольку ОвНВ-2 не может быть успешно размножен в лабораторных условиях, попытки разработки вакцины не предпринимались. Тем не менее, недавняя работа по разработке системы заражения КРС вирусом ОвНВ-2 с использованием вируса из носовых выделений овец (Taus et al., 2006) позволяет тестировать кандидатные вакцины против ОвНВ-2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- BAXTER S.I.F., POW I., BRIDGEN A. & REID H.W. (1993). PCR detection of the sheep-associated agent of malignant catarrhal fever. *Arch. Virol.*, **132**, 145–159.
- ENSSER A., PFLANZ R. & FLECKSTEIN B. (1997). Primary structure of the alcelaphine herpes virus 1 genome. *J. Virol.*, **71**, 6517–6525.
- FLACH E.J., REID H., POW I. & KLEMT A. (2001). Gamma-herpesvirus carrier status of captive artiodactyls. *Res. Vet. Sci.*, **73**, 93–99.
- FOYLE K.L., FULLER H.E., HIGGINS R.J., RUSSELL G.C., WILLOUGHBY K., ROSIE W.G., STIDWORTHY M.F. & FOSTER A.P. (2009). Malignant catarrhal fever in sika deer (*Cervus nippon*) the UK. *Vet. Rec.*, **165**, 445–447.
- FRASER S.J., NETTLETON P.F., DUTIA B.M., HAIG D.M. & RUSSELL G.C. (2006). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against malignant catarrhal fever viruses in cattle serum. *Vet. Microbiol.*, **116**, 21–28.
- HAIG D.M., GRANT D., DEANE D., CAMPBELL I., THOMSON J., JEPSON C., BUXTON D. & RUSSELL G.C. (2008). An immunisation strategy for the protection of cattle against alcelaphine herpesvirus-1-induced malignant catarrhal fever. *Vaccine*, **35**, 4461–4468.
- HART J., ACKERMAN M., JAYAWARDANE G., RUSSELL G., HAIG D.M., REID H. & STEWART J.P. (2007). Complete sequence and analysis of the ovine herpesvirus 2 genome. *J. Gen. Virol.*, **88**, 28–39.
- HOLLIMAN A. (2005) Differential diagnosis of diseases causing oral lesions in cattle. *In Practice* **27**, 2–13.
- HUSSY D., STAUBER N., LEUTENEGGER C.M., RIDER S. & ACKERMAN M. (2001).

Quantitative fluorogenic PCR assay for measuring ovine herpesvirus 2 replication in sheep. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **8**, 123–128.

LI H., BROOKING A., CUNHA C.W., HIGHLAND M.A., O'TOOLE D., KNOWLES D.P. & TAUS N.S. (2012). Experimental induction of malignant catarrhal fever in pigs with ovine herpesvirus 2 by intranasal nebulization. *Vet. Microbiol.*, **159**, 485–489.

LI H., CUNHA C.W., GAILBREATH K.L., O' TOOLE D., WHITE S.N., VANDERPLASSCHEN A., DEWALS B., KNOWLES D.P. & TAUS N.S. (2011). Characterization of ovine herpesvirus 2-induced malignant catarrhal fever in rabbits. *Vet. Microbiol.*, **150**, 270–277.

LI H., GAILBREATH K., FLACH E.J., TAUS N.S., COOLEY J., KELLER J., RUSSELL G.C., KNOWLES D.P., HAIG D.M., OAKS J.L., TRAU D.L. & CRAWFORD T.B. (2005a). A novel subgroup of rhadinoviruses in ruminants. *J. Gen. Virol.*, **86**, 3021–3026.

LI H., KARNEY G., O'TOOLE D. & CRAWFORD T.B. (2008). Long distance spread of malignant catarrhal fever virus from feedlot lambs to ranch bison. *Can. Vet. J.*, **49**, 183–185.

LI H., MCGUIRE T.C., MULLER-DOBLIES U.U. & CRAWFORD T.B. (2001). A simpler, more sensitive competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to malignant catarrhal fever virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 361–364.

LI H., O'TOOLE D., KIM O., OAKS L. & CRAWFORD T.B. (2005b). Malignant catarrhal fever-like disease in sheep after intranasal inoculation with ovine herpesvirus-2. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 171–175.

LI H., SHEN D.T., KNOWLES D.P., GORHAM J. & CRAWFORD T. (1994). Competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for antibody in sheep and other ruminants to a conserved epitope of malignant catarrhal fever virus. *Clin. Microbiol.*, **32**, 1674–1679.

LI H., TAUS N.S., LEWIS G.S., KIM O., TRAU D.L. & CRAWFORD T.B. (2004). Shedding of ovine herpesvirus 2 in sheep nasal secretions: the predominant mode for transmission. *J. Clin. Microbiol.*, **42** (12), 5558–5564.

LI H., DYER N., KELLER J. & CRAWFORD T.B. (2000). Newly recognized herpesvirus causing malignant catarrhal fever in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 1313–1318.

LOKEN T., ALEKSANDERSEN M., REID H. & POW I. (1998). Malignant catarrhal fever caused by ovine herpesvirus-2 in pigs in Norway. *Vet. Rec.*, **143**, 464–467.

MICHEL A.L. & ASPELING I.A. (1994). Evidence of persistent malignant catarrhal fever infection in a cow, obtained by nucleic acid hybridisation. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, **65**, 26–27.

MICHEL A.L., VAN DER LUGT J.J., BENGIS R.G. & DE VOS V. (1997). Detection of AHV-1 DNA in lung sections from blue wildebeest (*Connochaetes taurinus*) calves by *in situ* hybridisation. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **64**, 169–172.

MULLER-DOBLIES U.U., LI H., HAUSER B., ADLER H. & ACKERMANN M. (1998). Field validation of laboratory tests for clinical diagnosis of sheep-associated malignant catarrhal fever. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 2970–2972.

PLOWRIGHT W., FERRIS R.D. & SCOTT G.R. (1960). Blue wildebeest and the aetiological agent of bovine catarrhal fever. *Nature*, **188**, 1167–1169.

REID H.W., BUXTON D., POW I. & FINLAYSON J. (1989). Isolation and characterisation of lymphoblastoid cells from cattle and deer affected with 'sheep-associated' malignant catarrhal fever. *Res. Vet. Sci.*, **47**, 90–96.

RUSSELL G.C., BENAVIDES J., GRANT D., TODD H., DEANE D., PERCIVAL A., THOMSON J., CONNELLY M. & HAIG D.M. (2012). Duration of protective immunity and antibody responses in cattle immunised against alcelaphine herpesvirus-1-induced malignant catarrhal fever. *Vet. Res.* **43**, 51.

TAUS N.S., HERNDON D.R., TRAU D.L., STEWART J.P., ACKERMANN M., LI H., KNOWLES D.P., LEWIS G.S. & BRAYTON K.A. (2007). Comparison of ovine herpesvirus 2 genomes isolated from domestic sheep (*Ovis aries*) and a clinically affected cow (*Bos bovis*). *J. Gen. Virol.*, **88**, 40–45.

TAUS N.S., OAKS J.L., GAILBREATH K., TRAU D.L., O'TOOLE D. & LI H. (2006) Experimental aerosol infection of cattle (*Bos taurus*) with ovine herpesvirus 2 using nasal secretions from infected sheep. *Vet. Microbiol.*, **116**, 29–36.

TRAU D.L., ELIAS S., TAUS N.S., HERRMANN L.M., OAKS J.L. & LI H. (2005). A real-time PCR assay for measuring alcelaphine herpesvirus-1 DNA. *J. Virol. Methods*, **129**, 186–190.

TRAU D.L., LI H., DASGUPTA N., O'TOOLE D., ELDRIDGE J.A., BESSER T.E. & DAVIES C.J. (2007). Resistance to malignant catarrhal fever in American bison (*Bison bison*) is associated with MHC class IIa polymorphisms. *Anim. Genet.*, **38** (2), 141–146.

VANDEVANTER D.R., WARRENER P., BENNET L., SCHULTZ E.R., COULTER S., GARBER R.L. & ROAS, T.M. (1996). Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 1666–1671.

WRIGHT H., STEWART J.P., IRERI R.G., CAMPBELL I., POW I., REID H.W. & HAIG D.M. (2003). Genome re-arrangements associated with loss of pathogenicity of the γ -herpesvirus alcelaphine herpesvirus-1. *Res. Vet. Sci.*, **75**, 163–168.

*
* *