

Глава 3.7.12.

Скрепи

Резюме

Описание болезни: *Скрепи – это нейродегенеративное заболевание овец и коз. Так называемая «атипичная» скрепи клинически, патологически, биохимически и эпидемиологически не связана с «классической» скрепи, вероятно, представляет собой неконтагиозное и спонтанное дегенеративное состояние взрослых овец и, редко, коз. В данной главе описаны испытания для исследования обоих состояний с целью их дифференциации.*

Классическая скрепи характеризуется вакуолярными изменениями центральной нервной системы (ЦНС). Впервые она была определена как клиническое расстройство более 250 лет назад. В настоящее время, скрепи классифицируют как трансмиссивную губкообразную энцефалопатию (ТГЭ) или прионную болезнь, которая характеризуется накоплением аномальной формы мембранного гликопротеина носителя (прионный белок или PrP) именуемой PrP^{Sc}, в ЦНС. У животных некоторых генотипов накопление PrP^{Sc} также обнаруживают в лимфоретикулярных тканях. Полиморфизмы гена PrP связывают с восприимчивостью к скрепи. В качестве средства для борьбы со скрепи осуществляли выращивание резистентных к болезни животных, однако полностью резистентных к инфекции генотипов, по всей видимости, нет.

Атипичная скрепи, недавно идентифицированное состояние, имеет несколько клинических и патологических характеристик, аналогичных классической скрепи, однако, считается, что она не передается во внелабораторных условиях. Эпидемиология согласуется с состоянием, имеющим спорадический характер. Таким образом, надзор за классической скрепи выявляет единичные случаи атипичной скрепи. Сообщалось о случае возникновения атипичной скрепи у овец с генотипами PrP, имеющих относительную устойчивость к классической скрепи.

Классическая скрепи эндемична во многих странах, куда ее часто заносят с импортом. Австралия и Новая Зеландия сохраняют свободу от классической скрепи, благодаря жестким ограничениям на импорт и другим мерам. Классическая скрепи передается потомству от больных самок в период вскармливания и, потенциально, in utero. Она также может передаваться горизонтально незараженным овцам и козам. Инфицированный материал может сохраняться на пастбищах или в зданиях. Плодные оболочки являются источником инфекции, и молоко от клинически зараженных животных также может передавать болезнь. Инкубационный период от первичного заражения до проявления клинических признаков обычно составляет более 1 года и может иногда превышать коммерческий жизненный цикл животного. Большинство случаев заражения возникает между 2 и 5 годами жизни. Клиническое проявление болезни развивается, только

если возбудитель проникает в ЦНС. Сообщают, что атипичная скрепи, в случае клинического проявления, развивается главным образом у взрослых особей, и географическое распределение указывает на возникновение спонтанной инфекции, несмотря на то, что заражение было осуществлено в порядке эксперимента.

Идентификация возбудителя: классическую форму болезни распознают по клиническим признакам, которые могут изменяться, однако обычно, она возникает неожиданно, начинаясь с поведенческих нарушений, которые развиваются в более явные неврологические признаки, включая возникновение зуда и нарушения координации. У больных животных плохое физическое состояние. При атипичной скрепи может наблюдаться атаксия. Диагноз подтверждается наличием вакуолизации или выявлением PrPSc в изучаемых областях головного мозга. Выявление PrPSc в ходе иммунологического анализа в образцах ткани головного мозга дает основание для проведения экспресс-тестов, которые часто используются в программах активного надзора. В ходе экспериментальных исследований овец и коз накопление PrPSc в ткани головного мозга может не выявляться в течение нескольких месяцев после контрольного заражения, таким образом, отрицательный результат теста необязательно соответствует тому, что животное не заражено.

Выявление PrPSc в лимфоретикулярных тканях в течение инкубационного периода классической скрепи у некоторых животных представляет собой средство доклинического диагностирования болезни и может оказаться полезным в целях надзора. Его также можно проводить с использованием ткани, взятой путем биопсии. Однако этот метод не подходит для атипичной скрепи или части случаев заражения классической скрепи. Таким образом, он может использоваться исключительно для подтверждения наличия заражения и не может использоваться для подтверждения его отсутствия.

Распознаваемые в настоящее время формы скрепи могут с переменной эффективностью передаваться ряду диких и PrP трансгенных лабораторных мышей путем введения им инфицированной ткани головного мозга, однако длительный инкубационный период не позволяет сделать ее эффективной диагностической процедурой.

Серологические тесты: В настоящее время данные о том, что заражение скрепи вызывает какой-либо специфичный иммунный ответ, отсутствуют. Таким образом, диагностических тестов для обнаружения специфичных антител не существует.

Требования к вакцинам и диагностическим биопрепаратам: Биологические препараты отсутствуют.

А. ВВЕДЕНИЕ

Классическая скрепи (также «баранья трясучка», «почесуха овец») – возникающая в естественных условиях, прогрессирующая, летальная, инфекционная, нейродегенеративная болезнь овец и коз впервые была описана более 250 лет назад и зарегистрирована в Европе, Северной Америке, Азии и Африке. Доказательства каузальной зависимости между классической или атипичной формами скрепи с ТГЭ человека отсутствуют. Она представляет собой архетип трансмиссивных губкообразных энцефалопатий (ТГЭ). Установлено, что прионные болезни со сходной патологией наблюдаются в естественных условиях у некоторых видов животных, включая человека (Hornlimann, 2006). Их определяют по постоянному накоплению аномальной изоформы (PrPSc) нормального клеточного белка (PrPC) в

центральной нервной системе (ЦНС) и выявлению вариабельного PrPSc в других тканях, например, в лимфоретикулярной системе (ЛРС), а также в других тканях/жидкостях организма.

Атипичная скрепи (также известная как Nor98) также является нейродегенеративной болезнью овец и коз и впервые была описана в Норвегии в 1998 году (Benestad et al., 2008). Аналогично классическому варианту, она связана с накоплением аномального прионного белка, однако, в отличие от классической скрепи, не было доказано, что она передается контактным животным в естественных условиях. Активный надзор с использованием иммунохимических экспресс-методов также подтверждает ее широкое распространение в Европе. Описаны также случаи ее возникновения на Фолклендских островах (Epstein et al., 2005), в Северной Америке (Loiacono et al., 2009), в Австралии и Новой Зеландии (Kittelberger et al., 2010). Хотя эпидемиология не указывает на трансмиссию в естественных условиях (Benestad et al., 2008), и болезнь не рассматривается как трансмиссивная форма с точки зрения перспективы здоровья животных, она может передаваться в условиях эксперимента (Simmons et al., 2011). В ходе ретроспективных исследований, начиная с 1980-х годов, были идентифицированы случаи заболевания, предшествующие активному надзору. Атипичную скрепи идентифицировали у генотипов овец, которые считались относительно резистентными к классической скрепи, и у коз.

Различные изоформы аномального болезнь-специфичного прионного белка (PrPSc), теперь считаются возбудителями прионных болезней. Описание болезни основывается на ряде характеристик фенотипа хозяина, например, клинических признаках, гистопатологическом профиле и иммунопатологии, биохимических характеристиках PrPSc, например, чувствительность к протеазе и сайт разрезания, и, при необходимости, биологические характеристики у испытуемых грызунов.

1. Клинические признаки

Клинические признаки классической скрепи (Konold & Phelan, 2014) обычно начинаются внезапно, часто с проявлением изменений поведения, которые становятся очевидными только после проведения повторных инспекций. Эти слабовыраженные признаки, которые могут включать явную дезориентацию, отделение от стада и неподвижный взгляд, развиваются в более определенное неврологическое заболевание, часто характеризующееся проявлением признаков прурита и атаксии или отсутствием координации при движении. Как прурит, так и атаксия обычно появляются внезапно и преобладают в клиническом течении болезни. Смерть может наступать через продолжительный период слабого проявления неврологических признаков или даже без проявления продромальных признаков. Эти клинические признаки в отдельности не являются болезнь-специфичными, и подозрение на клиническое заболевание следует подтверждать дополнительными исследованиями.

Прурит распознают, главным образом, по следующим симптомам: животные трутся о предметы, кусают себя и царапают задними конечностями или рогами. Это приводит к интенсивному выпадению шерсти, в частности, на грудной клетке, боках, задних конечностях и на основании хвоста. Персистенция прурита часто приводит к локальным повреждениям кожи, наносимым самим животным. Это может наблюдаться на облысевших участках, на затылке, морде, ушах и конечностях. «Кусательный рефлекс» часто заменяется

расцарапыванием спины и может также быть выражен характерными для овец движениями. У некоторых овец или коз, пораженных скрепи, могут, однако, и не проявляться явные признаки прурита. Атаксия или шаткость походки могут быть выражены в виде затруднений при позиционировании задних конечностей при поворачивании, качания задней части туловища и вскидывания передних конечностей или мелкой рысцы. Животные спотыкаются и падают, однако, быстро встают. Все эти признаки прогрессируют до возникновения слабости и принятия лежачего положения. Другие признаки скрепи могут включать скрежетание зубами (бруксизм), опускание головы, тремор головы или тела и, редко, судороги и нарушение зрения. В большинстве случаев наблюдается ухудшение физического состояния или потеря веса. При атипичной скрепи среди клинических признаков преобладает атаксия при отсутствии прурита. Также наблюдается движение по кругу.

Видеоклипы с демонстрацией клинических признаков скрепи можно просмотреть на сайтах Референтной лаборатории ЕС по ТГЭ, TSE-LAB-NET (<http://www.tse-lab-net.eu/>).

Развитие клинических проявлений болезни многообразно, длительность может составлять от недели до нескольких месяцев с неизбежным летальным исходом. У некоторых животных и у различных пород овец клинические признаки проявляются по-разному. Такие вариации могут наблюдаться в связи с влиянием генотипа хозяина и в зависимости от штамма возбудителя. Факторы окружающей среды также могут оказывать влияние на течение болезни. По этой причине клиническая диагностика отдельных случаев заболевания скрепи может быть затруднена. Клинические признаки могут, особенно на ранней стадии болезни, иметь сходство с некоторыми другими болезнями взрослых мелкого рогатого скота, включая эктопаразитизм, псевдобешенство (болезнь Ауески), бешенство, церебральный листериоз, прогрессирующую пневмонию овец (меди-висна), токсемию при суягности (кетоз), гипомagneмию и химическую и растительную интоксикации.

2. Генетические факторы хозяина

Экспрессия болезни зависит от штамма возбудителя и переменных параметров хозяев. У овец различные генотипы PrP связывают с относительной восприимчивостью к ТГЭ. Полиморфизмы в кодонах 136 и 171 имеют особенное значение при определении общей восприимчивости овец к классической скрепи, тогда как вариации в кодонах 141 и 154 влияют на восприимчивость овец к атипичной скрепи. У коз генотип PrP также влияет на восприимчивость к болезни. Механизмы, посредством которых штамм и характеристики хозяина оказывают влияние на фенотип болезни, до сих пор понятны не полностью. (См. последние обзоры EFSA [2014].)

3. Характеризация штамма

Традиционно, характеристика штамма основывалась на проведении биологического анализа на грызунах. Возможность отличать скрепи от губкообразной энцефалопатии КРС (ГЭ КРС) является крайне важной для мелкого рогатого скота, в связи с зоонозным характером ГЭ КРС и возможным влиянием контаминированного корма на мелкий рогатый скот в прошлом. С этой целью при молекулярном типировании в иммуногистохимическом анализе (ИГХ) или вестерн-блоттинге используется дифференциальное связывание антигенной детерминанты PrP^{Sc}.

4. Надзор

В связи с известным несовершенством начального (пассивного) надзора и с отсутствием активных надзорных компонентов, статус классической скрепи неизвестен во многих странах. Объективно, для установления статуса свободы поголовья овец в стране от заражения, необходим постоянный и масштабный активный надзор. В некоторых странах классическую скрепи никогда не регистрировали на фоне общего и/или целенаправленного надзора, тогда как в других странах в течение длительных периодов поддерживается свобода от заражения, благодаря жесткой профилактической политике и мониторингу. Классическая скрепи обычно возникает у овец 2-5-летнего возраста. У овец до 1 года случаи заражения классической скрепи наблюдаются редко. Значимую часть случаев заражения атипичной скрепи регистрируют у овец старше 5 лет. Иногда у овец идентифицируют смешанные инфекции классической и атипичной скрепи. В некоторых случаях заражения скрепи, коммерческий жизненный цикл овец может быть слишком коротким или заражение происходит на слишком поздней стадии жизни животного для того, чтобы болезнь успела развиваться. Классическую и атипичную скрепи регистрировали у коз, классическую скрепи - у содержащихся в неволе муфлонов (*Ovis musimon*). Болезнь поражает большинство пород овец. Классическая скрепи может передаваться от самки потомству в период с отлучения от вскармливания и потенциально, *in utero* (Spiropoulos et al., 2014). Инфекция может также передаваться горизонтально несвязанным животным, даже при отсутствии прямого контакта (Dexter et al., 2009). Известно, что плодные оболочки являются источником заражения, а молоко также может переносить инфекцию. (Konold et al., 2013). Также риск представляют пастбища и сооружения, где ранее находились зараженные животные (Gough et al., 2015; Hawkins et al., 2015). Животные, в инкубационный период развития болезни и даже животные, у которых не развиваются клинические признаки, также могут являться источником заражения для других.

5. Биологическая безопасность

Биологическая опасность для человека в результате проведения диагностических исследований в отношении скрепи представляется ограниченной, однако, лабораторные исследования с использованием контаминированного материала должны осуществляться на соответствующем уровне биологической безопасности и контаминации, определенном анализом биологического риска. (см. Главу 1.1.4 Биобезопасность и биозащита: Стандарт для управления биологическим риском в ветеринарных лабораториях и в вивариях). Хотя было обнаружено, что болезнь Крейтцфельда-Якоба (БКЯ) у человека наблюдается с не более высокой частотой, чем у людей, работающих при непосредственном контакте с возбудителем скрепи, максимальная химическая и физическая устойчивость к возбудителю скрепи и тот факт, что она передается в экспериментальных условиях путем инъектирования широкому ряду млекопитающих, включая гуманизированных трансгенных мышей (Cassard et al., 2014) и обезьян (Comou et al., 2015), предполагают целесообразность для проведения профилактических мероприятий против заражения человека.

В. Методы диагностики

Таблица 1. Методы исследований для проведения диагностики и их цели

Метод	Цель					
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельных животных до перемещения	Содействие политике искоренения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции - надзор	Иммунный статус у отдельных животных или популяции после вакцинации
Идентификация возбудителя						
Гистопатология	n/a	n/a	–	+	–	n/a
Иммуногистохимия	n/a	n/a	++	+++	++	n/a
Вестерн-блоттинг	n/a	n/a	++	+++	++	n/a
Экспресс-тесты	n/a	n/a	+++	+	+++	n/a

Обозначения: +++ = рекомендованный метод; ++ = подходящий метод; + = может использоваться в некоторых случаях, однако стоимость, надежность или иные факторы значительно ограничивают его применение; – = не подходит для данной цели; n/a = не применяется. Несмотря на то, что не все тесты, включенные в категории +++ или ++ прошли официальную валидацию, но установившаяся практика и факт широкого применения при отсутствии сомнительных результатов, делает их приемлемыми. ИГХ = иммуногистохимия.

Болезнь-специфичная, частично резистентная к протеазе, неправильно свернутая изоформа (PrP^{Sc}) мембранного белка PrP^C имеет ключевое значение в патогенезе ТГЭ. Согласно прионной гипотезе, PrP^{Sc} является принципиальным и единственным компонентом возбудителя инфекции, а подтверждение диагноза также достигается путем иммуногистохимического (ИГХ) или иммунохимического выявления PrP^{Sc} в ткани головного мозга. По определению, специфичное проявление инфекционности зависит от экспериментальной трансмиссии, но этические соображения и длительные инкубационные периоды, связанные с ТГЭ, подразумевают, что данный критерий трансмиссивности не используется в рутинной диагностике. Однако биологическая характеристика трансмиссии является важным экспериментальным компонентом определения любых возникающих фенотипических вариантов скрепи и для использования характерных методов для дифференцирования случаев заражения скрепи от ГЭ КРС у овец или коз.

Лабораторная диагностика классической скрепи зависит, главным образом, от иммунодетекции PrP^{Sc}, хотя более традиционные методы патологической гистологии все еще могут использоваться для выявления вакуольных очаговых поражений ЦНС (Gavier-Widen *et al.*, 2005). Гистопатологическое исследование, традиционно основывающееся на изучении отдельной секции продолговатого мозга, взятой на уровне задвижки (самая ранняя последовательная нейроанатомическая структура для морфологических вакуольных изменений [Wood *et al.*, 1997]), все еще действительно для подтверждения классической скрепи, однако, не выявляет атипичную скрепи (Moore *et al.*, 2008).

Однако обнаружение PrP^{Sc} с помощью ИГХ или методов иммунодетекции, проводящихся на ткани продолговатого мозга, повышают диагностическую чувствительность, а активный надзор за крупными популяциями теперь проводится с использованием экспресс-тестов для выявления PrP^{Sc} (см. ниже). Выявлению PrP^{Sc} предшествует вакуолизация и проявление клинических признаков, что делает иммунологические тесты более

чувствительными. Поскольку подозрительные клинические случаи заражения скрепи должны, при наличии пригодных образцов, подвергаться изучению сначала гистологическим методом для определения морфологических изменений, диагностические критерии теперь должны включать демонстрацию PrPSc в ЦНС.

При атипичной скрепи продолговатый мозг претерпевает минимальные изменения, тогда как гораздо более однородные и выраженные поражения обычно можно идентифицировать в ткани мозжечка, таламуса и базальном ядре. В связи с этим, принимая во внимание практические и логистические факторы отбора образцов для надежной диагностики и классификации, следует, как минимум, проводить исследования продолговатого мозга и мозжечка.

Некоторые имеющиеся в продаже экспресс-методы для выявления PrPSc, изначально внедренные для диагностики ГЭ КРС, также были одобрены для проведения диагностики скрепи, а другие методы были специально разработаны и одобрены для использования на пробах от мелких жвачных. Данные экспресс-тесты представляют собой методы на основе вестерн-блоттинга или твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) и обеспечивают предварительный скрининг, после которого образцы, давшие положительные или неопределенные результаты, подлежат исследованию с помощью подтверждающих методов ИГХ или вестерн-блоттинга. Было доказано, что все указанные методы способны обнаруживать скрепи в соответствующих образцах (EFSA, 2005a; EFSA, 2012). Аналитическая чувствительность данных наборов рассматривается Европейской комиссией и ссылки на информацию относительно производительности современных утвержденных тестов можно найти в TSE-LAB-NET. Перечень таких тестов, одобренных для использования Европейской комиссией, находится в Приложении X Постановления № 999/2001 (ЕК) с внесенными изменениями.

Отсутствие характерных гистологических изменений или невыявление PrPSc не являются подтверждением отсутствия болезни. Согласованность результатов множественных диагностических методов обеспечивает наивысший уровень точности. При проведении надзорных мероприятий с целью получения подтверждения в отношении незараженности скрепи в популяциях мелких жвачных животных, может потребоваться применение ряда диагностических критериев и использование, как минимум, двух лабораторных методов (гистопатологический и ИГХ, или иммуноблоттинг) на правильно отобранной ткани ЦНС (минимальный размер продолговатого мозга и мозжечка) для сохранения высокой степени надежности отрицательных результатов.

Во многих странах в последние годы пассивный надзор за классической скрепи, включающий исследование ЦНС материала от животных с подозрительными клиническими признаками, дополняется активным надзором, имеющим целью посмертного скринирования здоровых отбракованных взрослых особей и павшего скота (заболевших или умерших животных, также называемых животными, находящимися в группе риска) с использованием экспресс-методов. При классической скрепи существует также возможность применения методов анализа, которые опираются не только на исследование ЦНС ткани от мертвых животных для обнаружения пораженных особей, но и на обнаружение наличия PrPSc в лимфоретикулярной ткани у многих животных с целью обеспечения условий демонстрации зараженных животных путем биопсии небных миндалин, третьего века, поверхностных

лимфатических узлов или, в последнее время, лимфоретикулярной ткани слизистой оболочки прямой кишки (Gonzalez et al., 2006). Однако следует отметить, что не все животные с классической скрепи имеют выявляемые лимфоретикулярные поражения, и PrPSc еще не была выявлена в лимфоретикулярных тканях овец и коз с атипичной скрепи (Benestad et al., 2008). Однако исследование лимфоретикулярной ткани предоставляет возможность выявлять некоторых инфицированных классической скрепи животных, на относительно ранних стадиях латентного периода, до того, как результат исследования ЦНС ткани станет положительным.

Вследствие комплексной эпидемиологии скрепи, часть популяции, намеченная для проведения процедуры отбора образцов, а также ткани, подлежащие исследованиям, различаются по целям исследований. Надзор за распространением болезни может ограничивать исследования ЦНС тканей взрослых овец и коз по вышеуказанным причинам. Однако при проведении исследований для оценки степени распространения болезни следует принимать во внимание ряд факторов, включая многоуровневость овцеводства, дозы и уровни заражения в определенных стадах, частоту возникновения болезни и относительный уровень поражения лимфоретикулярной системы у различных генотипов, а также влияние сочетания генотипа / штамма возбудителя в инкубационный период.

Необходимость дифференцировать скрепи и возможную ГЭ КРС у овец и коз требует разработки диагностических методов с возможностью распознавания возбудителей, вызывающих такие инфекции. Конформация PrP, специфичного к болезни, продуцируемого у зараженных ГЭ КРС овец, отличается от таковой, выявляемой методами вестерн-блоттинга или ИГХ с использованием эпитоп-специфичных антител (краткое изложение приведено в EFSA [2005b]). В Европейском Союзе стратегия такого разграничения включает исследование источников ЦНС материала после первичного выявления путем активного или пассивного надзора (первичный скрининг) в процедуре первичной, вторичной и третичной фаз, включая метод вестерн-блоттинга, способного провести такое разграничение с последующим экспертным рассмотрением и дополнительным исследованием биохимическими и иммуногистохимическими методами любых случаев заражения, в которых первичная дискриминация вызвала сомнения, и в заключение, если классификация до сих пор не может исключить ГЭ КРС, перенос мышинной культуры на стандартизированную панель культур трансгенных мышей, как описано в EURL Discriminatory Testing Handbook, (Руководство по дискриминантным исследованиям Референтной лаборатории ЕС), представленном на странице TSE-LAB-NET. Интерпретация in-vitro методов (вестерн-блоттинг или ИФА) зависит от различий между ГЭ КРС и скрепи на N-терминальном участке рестрикции для расщепления PrPSc протеиназой К. Метод ИГХ in-situ зависит от распределения и эпитоп-специфичного мечения моделей PrPSc в ткани головного мозга и лимфоретикулярных тканях. Новые методы in-vitro, как например, конверсия, индуцированная вибрацией (QuIC) (Ortu et al., 2012), циклическая амплификация неправильной укладки белка (PMCA), используются все больше и больше для повышения диагностической чувствительности, хотя в настоящее время они не получили официального одобрения. В данных методах PrP используется в качестве субстрата, и множественные циклы агрегации белков для достижения усиления даже очень малого количества PrPSc, PMCA, в частности, демонстрирует некоторый потенциал для дифференцирования штамма-возбудителя (Gough et al., 2014).

Контроль качества (QC), обеспечение качества (QA) и соответствующие положительные и отрицательные контрольные образцы являются неотъемлемой частью исследований. В Референтной лаборатории МЭБ можно получить консультации и контрольные материалы.

1. Идентификация возбудителя

1.1 Отбор и подготовка образцов

Вопросы, связанные с ГЭ КРС в популяции мелких жвачных, и проблемы распознавания атипичной скрепи оказали влияние на стратегии отбора образцов и методы диагностики. Хотя комплексные методы отбора образцов и многократных тестирований обеспечивают надежнейшую сопряженность для данных и будущих неопределенностей в диагностике прионных болезней мелких жвачных, действующие факторы также определяют, что является практичным и экономичным. Соответствующая реализация программ пассивного и активного надзора и применение диагностических методов оказывают дополнительное влияние на стратегию отбора проб. Исходя из вышеизложенного, выбор и рекомендации методов постоянно пересматриваются.

Что касается программ стандартной диагностики, для проведения последовательных биохимических исследований отобранный ЦНС материал либо хранят в свежеприготовленном или замороженном виде, либо фиксируют для гистологических препаратов. При проведении программ идентификации возможных заражений ГЭ КРС в популяциях мелких жвачных, все образцы следует отбирать в асептических условиях с использованием стерильного одноразового инструментария или инструментов, стерилизованных при условиях, установленных для деконтаминации прионов (См. Главу 2.4.5. Губкообразная энцефалопатия КРС). Не следует допускать перекрестной контаминации при проведении аутопсии / отборе образцов. Таким образом, при проведении следующих процедур, когда производится отбор образцов сырой ткани для биохимических методов, следует резервировать аликвотную пробу для проведения исследований по переносу. Хотя во многих случаях болезнь может быть подтверждена на аутолизированном или субоптимальном фиксированном материале, такие образцы могут свидетельствовать только об ограниченном подтверждении отсутствия скрепи.

1.1.1. Подозрительные клинические случаи

Овцы с подозрением на клиническую форму классической или атипичной скрепи (выявленную при пассивном контроле) подлежат убою путем внутривенного введения барбитурата, головной мозг извлекают целиком, используя стандартные методы аутопсии сразу после смерти животного. Рекомендуется извлечение мозга целиком для проведения патологического исследования с целью дифференцирования возможных проявлений прионной болезни и дифференциальной диагностики неприонных расстройств, связанных с нарушением мозговой деятельности. Методы отбора образцов ткани головного мозга для проведения методов обнаружения PrP требуют наличия свежеприготовленной ткани, а для проведения гистологических методов – основаны на знании диагностической чувствительности каждого теста для различных участков головного мозга и на понимании, что одна и та же область не может использоваться для проведения исследований как для свежеприготовленной / замороженной ткани, так и для фиксированной ткани.

Рекомендуется следующий протокол, однако, он может изменяться с целью соответствия каким-либо линейкам тестов. Дополнительную информацию можно найти в материалах Референтной лаборатории МЭБ (см. сайт МЭБ для получения обновленного перечня).

Первоначально верхнюю часть продолговатого мозга с задвижкой помещают в 10% формолсолевой раствор, который не менее чем в 10 раз превышает объем (см. главу 2.4.5, Рисунок 1) образца, для фиксации, и выдерживают в течение 3-5 дней перед обработкой для проведения гистопатологического или ИГХ исследований. Образец не должен быть заморожен. Для выявления PrPSc образцы свежеприготовленной ткани берут с целью незамедлительного тестирования или хранят в замороженном виде (-20°C или ниже) до экстракции протеина. Образцы должны, если возможно, содержать 5 г ткани. Исходно их берут из задней части продолговатого мозга и, при необходимости, дополняют стволовой частью мозга, ростральной по отношению к образцу продолговатый мозг – задвижка. Взятие части ткани из пробы для приведения в соответствие множественных биохимических методов можно провести путем гемисекции в срединной плоскости или путем изготовления поперечных срезов. При отборе образцов возможен вариант, имеющий отношение к нижней части среза, для соответствия требованиям экспресс-тестов на уровне задвижки, для отбора образцов для экспресс-тестов. При наличии головного мозга целиком, рассматривают дополнительные свежесобранные образцы с целью минимизации ложноотрицательной диагностики, учитывая возможность, что может наблюдаться штамм-специфическая направленность других частей головного мозга. Например, при атипичной скрепи, области мозжечка, таламуса и базального ганглия имеют достаточный объем для проведения тестирования, а продолговатый мозг – не имеет (Benestad et al., 2008; Moore et al., 2008).

Остальную часть ткани головного мозга фиксируют в 10% формолсолевом растворе, который приблизительно в 10 раз превышает объем материала, в течение 1 недели, а затем, для проведения гистологического процессинга в твердом парафине, поперечно разрезают для получения блоков. Исходного образца отдельного блока продолговатого мозга может быть вполне достаточно для ИГХ и морфологической диагностики (см. Главу 2.4.5, Рис. 1). Требования к патологической характеристике или морфологической диагностике могут быть выполнены путем взятия дополнительных участков стволовой части мозга и, при необходимости, репрезентативных блоков всех главных участков мозга. Срезы 5 мкм толщиной окрашивают гематоксилином и эозином и исследуют сначала на наличие морфологических изменений и, при необходимости, на выявление PrPSc методом ИГХ, как указано ниже.

1.1.2 Отбор образцов для активного контроля с использованием экспресс-методов

Для проведения экспресс-тестов, методы изъятия стволовой части мозга через большое затылочное отверстие с использованием специального ложкообразного инструмента разработаны для овец и аналогичны методам, используемым для КРС при отборе образцов для диагностики ГЭ КРС (см. главу 2.4.5, Рисунок 2). Не будучи идеальным, метод также может использоваться для исследования клинически подозрительных случаев. Минимальным требуемым образцом ткани является стволовая часть мозга на уровне задвижки. Для обнаружения атипичной скрепи образец мозжечка также извлекают ложкой

через большое затылочное отверстие после извлечения стволовой части мозга. Часть мозгового ствола подвергают гемисекции в срединной плоскости с целью использования одной половины (свежеприготовленной/замороженной) для проведения экспресс-теста и половины (фиксированной) для гистопатологии. Или же фиксируют целый коронарный срез, включая задвижку, и для проведения экспресс-теста берут аналогичный смежный хвостовой срез продолговатого мозга. Ранее использование цельных корональных срезов рекомендовали для установления симметрии морфологических изменений, но при использовании молекулярных экспресс-методов наблюдается конкуренция испытаний для оптимальных участков диагностического контроля на задвижке. В некоторых наборах экспресс-тестов используют метод корового отбора образцов с целью получения соответствующей массы материала из области задвижки. При проведении гемисекции области задвижки стволовой области мозга утрачивается возможность оценить симметрию вакуолярных поражений, этот недостаток компенсирует ИГХ, обеспечивая большую специфичность для выявления PrPSc. Однако если принять этот метод или метод корового отбора образцов, важно убедиться, что контралатеральная область-мишень не нарушается. Дорсальное ядро блуждающего нерва (оптимальная целевая область для случаев заражения классической скрепи) – это узкая колонка, которая находится близко к срединной линии (см. главу 2.4.5, рисунок 3). Варианты также зависят от специального инструмента для отбора образцов, прилагающегося производителем к тест-наборам.

Для проведения всех методов отбора образцов важно, чтобы операторы прошли обучение, а обучение включало инструктаж по общей и поперечной нейроанатомии стволовой области мозга и точному расположению целевых областей, аккумулирующих болезнь-специфичную PrPSc.

Для дифференцирования случаев заражения классической и атипичной скрепи необходимо, чтобы участки мозжечка были зафиксированными и свежеприготовленными / замороженными.

1.2. Гистологическое исследование

Морфологические изменения ЦНС – это изменения, присущие губкообразной энцефалопатии, включающие, главным образом, вакуолизацию тел нейронов и окружение нейропилем, сопровождающиеся переменным и обычно, менее заметным глиозом (прежде всего, астроцитарная реакция). Обычно, поражения имеют двусторонне симметричное распределение. Схемы распределения вакуолей разнообразны, также наблюдаются другие изменения. При классической скрепи поражения обычно наиболее очевидны в стволовой области мозга и часто затрагивают дорсальное ядро блуждающего нерва. Следует внимательно толковать отдельные результаты гистопатологии, поскольку также может наблюдаться случайная вакуолизация нейронов в ткани головного мозга явно здоровых овец, несмотря на низкую частоту встречаемости (Hornlimann, 2006). Прямая взаимозависимость между степенью тяжести проявления клинических признаков и патологическими изменениями отсутствует. Не следует отвергать клиническую диагностику случаев с подозрением на скрепи при невозможности обнаружить значительные вакуолярные изменения в ткани головного мозга, исследование следует подтверждать тестами на выявление аккумуляции форм PrP, специфичных к болезни. Это

справедливо для атипичной скрепи, при которой вакуолизация в стволовой части мозга отсутствует. В таких случаях вакуолизация, если она вообще наблюдается, в целом ограничивается молекулярным слоем коры мозжечка, коры головного мозга и базального ганглия.

Несмотря на такое разнообразие, в большинстве случаев может быть достаточно гистологического исследования срезов продолговатого мозга у задвижки, для подтверждения диагноза клинически ожидаемой классической скрепи (Gavier-Widen et al., 2005; Wood et al., 1997). Отсутствие поражений можно с уверенностью устанавливать путем исследования ряда областей, репрезентативных для всего головного мозга.

1.3. Выявление форм PrP, специфичных к болезни

Методы подтверждения аккумуляции форм PrP, специфичного к болезни, на определенных целевых участках теперь обеспечивают принципиальный метод к диагностике как классической, так и атипичной скрепи (Gavier-Widen et al., 2005). При подозрении на клинические случаи заболевания, рекомендуется комбинированное использование ИГХ и вестерн-блоттинга с целью подтверждения диагноза. При подозрении на наличие болезни проведение ИГХ на тканевых срезах для подтверждения аккумуляции PrPSc следует осуществлять параллельно со стандартной гистологией. Комбинированное использование ИГХ и вестерн-блоттинга также рекомендуют использовать, когда гистологические поражения имеют среднюю степень тяжести и считаются сомнительными. В ходе программ активного надзора первичную диагностику обычно проводят с использованием методов экспресс-тестирования и, в случае получения положительных или неопределенных результатов, также следует проводить подтверждающие исследования. В настоящее время используют широкий диапазон антисывороток и моноклональных антител для выявления PrP иммунохимическими методами, причем некоторые имеются в продаже. Рекомендации к методам испытаний и реактивам можно найти в материалах Референтных лабораторий МЭБ по скрепи, дополнительная информация находится на их интернет-сайтах (см. главу 2.4.5).

1.3.1. Иммуногистохимические методы

Аккумуляция специфичных к болезни PrPSc в ткани головного мозга пораженного скрепи животного подтверждается путем проведения ИГХ на стандартном материале, фиксированном в формалине, с применением ряда методов демаскирования антигенных детерминант и с использованием соответствующих антител к PrP. Распознавание морфологических иммуномеченых конфигураций, специфичных к болезни, их клеточных связей и моделей нейроанатомической дистрибуции являются основой для проведения подтверждающей диагностики при классическом (Ryder et al., 2001) и атипичном (Benestad et al., 2008) типах скрепи. В качестве примера: Метод, используемый в Референтной лаборатории ЕС по ТГЭ и перечень антител, подтвержденных для использования в ИГХ, находится по следующей ссылке: <http://www.tse-lab-net.eu/documents/tse-oie-rl-prp.pdf>. Учитывая уровень обеспеченности материально-техническими ресурсами национальных референтных лабораторий и эффективность метода ИГХ, возможно различие методологий в разных лабораториях, что обусловлено соответствующими квалификационными испытаниями и уровнем обеспечения качества.

Если результаты гистопатологического исследования и ИГХ нельзя получить, например, вследствие плохого состояния образца, (т.е. крайне автолизированные случаи), то последним вариантом исследования становятся методы экспресс-тестирования. Аналогичным образом, данные методы можно также использовать в ситуациях, когда, иногда при ошибках при проведении аутопсии, ЦНС материал, предназначенный для фиксации и проведения гистологических исследований, был заморожен. ИГХ методы также могут применяться на таких образцах, когда они последовательно фиксированы, но возможность идентификации анатомических структур снижена, что означает, что любой «отрицательный» результат подлежит уточнению. С учетом изменений метод выявления путем вестерн-блоттинга также может с успехом применяться при использовании тканей, фиксированных формалином (Kunkle et al., 2008).

1.3.2. Методы вестерн-блоттинга

Все методы вестерн-блоттинга зависят от экстрагирования детергентом с последующей обработкой К-протеиназой - ферментом для расщепления любого нормального белка клетки хозяина (PrP^c). Это оставляет только PrP^{Sc} (процессированные, частично имеющие резистентную к протеазе форму аномального прионного белка [PrP^{Sc}]), которые способны связываться со специфичным антителом, что является сигналом выявления в положительных образцах ткани головного мозга. При диагностике, основанной на выявлении PrP^{Sc} путем вестерн-блоттинга для случаев заражения классической скрепи, необходимо наличие иммуномеченых полос, соответствующих белкам с молекулярной массой в диапазоне от 17 kDa (негликозилированный PrP^{Sc}) до 27 kDa (дигликозилированный PrP^{Sc}), только в дорожках образцов скрепи, обработанных протеиназой К, и чтобы дорожки контрольных образцов позволяли проводить соответствующие сравнения. Опубликованы некоторые чувствительные методы вестерн-блоттинга для выявления PrP^{Sc} классической скрепи овец (Arsac et al., 2007; Stack, 2004; Stack et al., 2006).

Что касается случаев заражения атипичной скрепи и скрепи Nor98, то при проведении вестерн-блоттинга визуализируют множественные полосы в диапазоне приблизительно от 11 до 31 kDa. Поскольку PrP^{Sc} атипичной скрепи менее устойчива к расщеплению К-протеиназой, чем PrP^{Sc} классической скрепи, в методах, оптимизированных для выявления атипичной скрепи, используют сниженную концентрацию данного фермента при проведении данной процедуры (Arsac et al., 2007; Benestad et al., 2008).

Оригинальный метод, используемый для диагностики ГЭ КРС, именуемый «Метод вестерн-блоттинга МЭБ» (Stack et al., 2006) основывается на экстрагировании детергентом большого количества свежеприготовленного материала ткани головного мозга (обычно, 2-4 г) с последующим ультрацентрифугированием для получения концентрата PrP, в конце применяется обработка К-протеиназой. Данный метод также позволяет выявлять образцы с классической и атипичной скрепи.

Подробные протоколы по вестерн-блоттингу представлены на TSE-LAB-NET.

1.3.3. Экспресс-тестирование

Экспресс-методы иммунодиагностики для выявления PrPSc в ткани головного мозга мелких жвачных были разработаны и оценены для использования в диагностике (EFSA, 2005a; 2012), все они имеются в продаже. Следует упомянуть об инструкциях производителей, которые подлежат утверждению перед использованием, а также проведению последующего контроля качества. Обычно, отклонение от методов испытаний, производимых на коммерческой основе, недопустимо и использование таких методов не рекомендуется без проведения оценки и соответствующей документации (см. Рекомендации по валидации, Глава 3.6.8 *Сопоставимость анализов после внесения изменений в валидированный метод исследований*).

Экспресс-тесты зависят от оптимизации реактивов, используемых для экстрагирования и расщепления и специфичных антител для выявления. Для испытаний необходимо использовать свежесобранную ткань головного мозга, которые берут из стволовой области мозга на уровне задвижки или просто задней части задвижки, что позволяет максимально увеличить чувствительность метода диагностики классической скрепи. Ткань мозжечка также следует исследовать для обеспечения максимального уровня диагностической чувствительности для атипичной скрепи. В большинстве экспресс-тестов используют менее 0,5 г материала - разработано множество инструментов для отбора образцов для получения точного количества материала. Однако рекомендуется использовать не менее 1 г исходного образца для проведения возможных дополнительных исследований. При наличии достаточного количества ткани некоторые лаборатории используют метод вестерн-блоттинга (см. Раздел В.1.2.3 выше) для подтверждения слабоположительных результатов у образцов, которые первоначально были исследованы с использованием экспресс-теста. Увеличенное количество или концентрация PrPres, экстрагированных путем ультрацентрифугирования из большего количества аликвотных проб ткани головного мозга, могут обеспечить повышенный уровень чувствительности.

В настоящее время основным направлением развития чувствительных диагностических исследований для выявления скрепи или других ТГЭ является усовершенствование существующих методов и разработка новых методов выявления болезнь-специфичных форм PrP. Достижение устойчивых результатов методов экспресс-тестирования для первичной диагностики является основным, в частности, с учетом возможности тестов распознавать фенотипы как классической, так и атипичной скрепи, а также ГЭ КРС у мелких жвачных. Точный отбор образцов существенно влияет на общую диагностическую чувствительность.

1.4. Прочие диагностические испытания

Что касается ГЭ КРС у крупного рогатого скота (см. главу 2.4.5), исследования, которые могут эффективно применяться на живых животных для выявления случаев заражения скрепи на ранних стадиях инкубирования, остаются невыясненными, несмотря на несколько направлений научных исследований. Отслеживание неприонных белковых биомаркеров, включая методы метаболомики или протеомики, могут иметь перспективы, однако существуют ограничения, включая доступность ткани, подлежащей испытанию, и специфичность метода испытаний. Методы, использующие амплификацию белков *in-vitro*, подтверждают высокую чувствительность для выявления некоторых прионных болезней

(Castilla et al., 2006; Orru et al., 2012), но еще не получили официальную оценку с целью применения в рамках систем надзора, установленных на законодательном уровне, хотя некоторые уже успешно проводятся в надзорных мероприятиях на человеке (Lacroux et al., 2014; Orru et al., 2014).

2. Серологические исследования

Поскольку иммунный ответ на возбудитель скрепи не выявлен, проведение серологических испытаний нецелесообразно.

3. Генетический скрининг на резистентность

Стратегии борьбы и ликвидации скрепи, основанные на генетическом отборе по резистентности к классической скрепи у овец, успешно проводят в некоторых странах. Отбор осуществляется по определению общих полиморфизмов гена PrP овец. В качестве вспомогательного средства для борьбы с классической скрепи: племенное поголовье, в частности, баранов, соответствующего генотипа PrP, может быть отобрано для продуцирования прогени при пониженном риске развития болезни (пересмотрен Европейским агентством по безопасности продовольствия (EFSA) в 2014 г.). Такие услуги по генотипированию доступны на коммерческой основе в Северной Америке и в некоторых странах Европы. Исследование проводят с использованием ДНК, экстрагированной из лейкоцитов, получаемых из образцов крови, обработанных этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТК). (Может использоваться другая ткань, такая как кожа [например, полученная с использованием перфоратора для взятия проб тканей ушной раковины], а также и другие ткани, такие как ткани головного мозга, для скрининга отбракованных популяционных групп.) Отбор племенного поголовья может проводиться на большинстве животных, резистентных к скрепи, т.е. на животных с генотипами, которые кодируют аланин на обоих аллелях в 136 кодоне, аргинин на обоих аллелях в 154 кодоне и аргинин на обоих аллелях в 171 кодоне (т.н. ARR/ARR животные), тем самым снижая частоту возникновения классической скрепи в отдельных стадах. Однако данные животные не всегда встречаются в стадах, а у некоторых пород данный генотип фактически отсутствует.

Программы разведения поголовья с отбором ARR/ARR овец, однако, не гарантируют резистентность к атипичной скрепи. Решения о целесообразности таких программ должны учитывать тщательную оценку текущей ситуации по скрепи в государстве/регионе/на местном уровне, возможность замещения резистентных овец, политику импорта овец, доступность оборудования для проведения испытаний и целесообразность и поддержку овцеводства; и особенно, желание овцеводов серьезно относиться к данной программе в течение длительного периода.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ И ДИАГНОСТИЧЕСКИМ БИОПРЕПАРАТАМ

Биопрепараты отсутствуют.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ARSAC J.N., ANDREOLETTI O., BILHEUDE J.M., LACROUX C. BENESTAD S.L. & BARON T. (2007). Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98 cases, France and Norway. *Emerg Infect Dis.*, 13, 58–65.
- BENESTAD S.L., ARSAC J-N., GOLDMANN W. & NOREMARK M. (2008). Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics and epidemiology. *Vet. Res.*, 39, 19.
- CASSARD H., TORRES J.M., LACROUX C., DOUET J.Y., BENESTAD S.L., LANTIER F., LUGAN S., LANTIER I., COSTES P., ARON N., REINE F., HERZOG L., ESPINOSA J.C., BERINGUE V. & ANDREOLETTI O. (2014). Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions. *Nat. Commun.*, 5, 5821.
- CASTILLA J., SAA P., MORALES R., ABID K., MAUNDRELL K. & SOTO C. (2006). Protein misfolding cyclic amplification for diagnosis and prion propagation studies. *Methods Enzymol*, 412, 3–21.
- COMOY E.E., MIKOL J., LUCCANTONI-FREIRE S., CORREIA E., LESCOUτρα-ETCHEGARAY N., DURAND V., DEHEN C., ANDREOLETTI O., CASALONE C., RICHT J.A., GREENLEE J.J., BARON T., BENESTAD S.L., BROWN P. & DESLYS J.P. (2015). Transmission of scrapie prions to primate after an extended silent incubation period. *Sci. Rep.*, 5, 11573. doi: 10.1038/srep11573.
- DEXTER G., TONGUE S., HEASMAN L., BELLWORTHY S., DAVIS A., MOORE S.J., SIMMONS M.M., SAYERS R., SIMMONS H.A. & MATTHEWS D. (2009). The evaluation of exposure risks for natural transmission of scrapie within an infected flock. *BMC Vet. Res.*, 5, 38
- EPSTEIN V., POINTING S. & HALFACRE S. (2005). Atypical scrapie in the Falkland Islands. *Vet. Rec.*, 157, 667–668.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2005a). Evaluation of rapid post-mortem TSE tests intended for small ruminants. *EFSA Scientific Report*, 49, 1–16.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2005b). Opinion on classification of atypical transmissible spongiform encephalopathy (TSE) cases in small ruminants. *EFSA J.*, 276, 1–30.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2012). Scientific Opinion on the evaluation of new TSE rapid tests submitted in the framework of the Commission Call for expression of interest 2007/S204-247339. *EFSA J.*, 10 (5), 2660
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2014). Scientific Opinion on the scrapie situation in the EU after 10 years of monitoring and control in sheep and goats. *EFSA J.*, 12 (7), 3781
- GAVIER-WIDEN D., STACK M.J., BARON T., BALACHANDRAN A. & SIMMONS M. (2005). Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 17, 509–527.
- GONZALEZ L., DAGLEISH M.P., BELLWORTHY S., SISO S., STACK M.J., CHAPLIN M.J., DAVIS L.A., HAWKINS S.A.C., HUGHES J. & JEFFREY M. (2006). Postmortem diagnosis of preclinical and clinical scrapie in sheep by the detection of disease-associated PrP in their rectal mucosa. *Vet. Rec.*, 158, 325–331.

GOUGH K.C., BAKER C.A., SIMMONS H.A., HAWKINS S.A. & MADDISON B.C. (2015). Circulation of prions within dust on a scrapie affected farm. *Vet. Res.*, 46, 40.

GOUGH K.C., BISHOP K. & MADDISON B.C. (2014). Highly sensitive detection of small ruminant bovine spongiform encephalopathy within transmissible spongiform encephalopathy mixes by serial protein misfolding cyclic amplification. *J. Clin. Microbiol.*, 52, 3863–3868.

HAWKINS S.A., SIMMONS H.A., GOUGH K.C. & MADDISON B.C. (2015). Persistence of ovine scrapie infectivity in a farm environment following cleaning and decontamination. *Vet. Rec.*, 176 (4), 99.

HORNLMANN B. (2006). *Prions in Humans and Animals*, Hornlimann B., Riesner, D. & Kretzschmar H., eds. de Gruyter, Berlin, Germany.

KITTELBERGER R., CHAPLIN M.J., SIMMONS M.M., RAMIREZ-VILLAESCUSA A., MCINTYRE L., MACDIARMID S.C., HANNAH M.J., JENNER J., BUENO R., BAYLISS D., BLACK H., PIGOTT C.J. & O'KEEFE J.S. (2010). Atypical scrapie/Nor98 in a sheep from New Zealand. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 22, 863–875.

KONOLD T., MOORE S.J., BELLWORTHY S.J., TERRY L.A., THORNE L., RAMSAY A., SALGUERO F.J., SIMMONS M.M. & SIMMONS H.A. (2013). Evidence of effective scrapie transmission via colostrum and milk in sheep. *BMC Vet. Res.*, 9, 99.

KONOLD T. & PHELAN L. (2014). Clinical examination protocol to detect atypical and classical scrapie in sheep. *J. Vis. Exp.*, 83:e51101. doi: 10.3791/51101.

KUNKLE R.A., NICHOLSON E.M., LEBEPE-MAZUR S., ORCUTT D.L., SRINIVAS M.L., GREENLEE J.J., ALT D.P. & HAMIR A.N. (2008). Western blot detection of PrP Sc in archived paraffin-embedded brainstem from scrapie-affected sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20, 522–526.

LACROUX C., COMOY E., MOUDJOU M., PERRET-LIAUDET A., LUGAN S., LITAISE C., SIMMONS H., JAS-DUVAL C., LANTIER I., BERINGUE V., GROSCHUP M., FICHET G., COSTES P., STREICHENBERGER N., LANTIER F., DESLYS J.P., VILETTE D. & ANDREOLETTI O. (2014). Preclinical detection of variant CJD and BSE prions in blood. *PLoS Pathog.*, 10:e1004202.

LOIACONO C.M., THOMSEN B.V., HALL S.M., KIUPEL M., SUTTON D., O'ROURKE K., BARR B., ANTHENILL L. & KEANE D. (2009). Nor98 scrapie identified in the United States. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 21, 454–463.

MOORE S.J., SIMMONS M.M., CHAPLIN M.J. & SPIROPOULOS J. (2008). Neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in naturally occurring atypical scrapie cases in Great Britain. *Acta Neuropathologica*, 116, 547–559.

ORRU C.D., BONGIANNI M., TONOLI G., FERRARI S., HUGHSON A.G., GROVEMAN B.R., FIORINI M., POCCHIARI M., MONACO S., CAUGHEY B. & ZANUSSO G. (2014). A test for Creutzfeldt-Jakob disease using nasal brushings. *N. Engl. J. Med.*, 371 (6), 519–529.

ORRU C.D., WILHAM J.M., VASCELLARI S., HUGHSON A.G. & CAUGHEY B. (2012). New generation QuIC assays for prion seeding activity. *Prion*, 6, 147–152. doi: 10.4161/pri.19430.

RYDER S.J., SPENCER Y.I., BELLERBY P.J. & MARCH S.A. (2001). Immunohistochemical detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep. *Vet. Rec.*, 148, 7–13.

SIMMONS M.M., MOORE S.J., KONOLD T., THURSTON L., TERRY L.A., THORNE L., LOCKEY R., VICKERY C., HAWKINS S.A.C., CHAPLIN M.J. & SPIROPOULOS J. (2011). Experimental oral transmission of atypical scrapie to sheep. *Emerg. Infect. Dis.*, 17, 848–854.

SPIROPOULOS J., HAWKINS S.A., SIMMONS M.M. & BELLWORTHY S.J. (2014). Evidence of in utero transmission of classical scrapie in sheep. *J. Virol.*, 88 (8), 4591–4594. doi: 10.1128/JVI.03264-13. Epub 2014 Jan 22.

STACK M.J. (2004). Western Immunoblotting Techniques for the Study of Transmissible Spongiform Encephalopathies. In: *Techniques in Prion Research*, Lehmann S. & Grassi J., eds. Birkhauser Verlag, Switzerland, 97–116.

STACK M., JEFFREY M., GUBBINS S., GRIMMER S., GONZALEZ L., MARTIN S., CHAPLIN M., WEBB P., SIMMONS M., SPENCER Y., BELLERBY P., HOPE J., WILESMITH J. & MATTHEWS D. (2006). Monitoring for bovine spongiform encephalopathy in sheep in Great Britain, 1998–2004. *J. Gen. Virol.*, 87, 2099–2107.

WOOD J.L.N., MCGILL I.S., DONE S.H. & BRADLEY R. (1997). Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982–1991. *Vet. Rec.*, 140, 167–174.

*

* *

NB: Существуют Референтные лаборатории МЭБ по скрепи (смотри таблицу в Части 4 данного Руководства по наземным животным или обратитесь к веб-сайту МЭБ за самым последним списком: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>). Для получения дальнейшей информации по диагностическим тестам и реактивам в отношении скрепи следует обращаться в Референтные лаборатории МЭБ.