

АРТРИТ-ЭНЦЕФАЛИТ КОЗ И БОЛЕЗНЬ МЕДИ-ВИСНА

РЕЗЮМЕ

Артрит-энцефалит коз (АЭК) и меди-висна (МВ) представляют собой персистирующие лентивирусные инфекции коз и овец. Их часто объединяют в одну группу лентивирусных болезней мелких жвачных животных (SRLV). Меди-висна известна также под названием прогрессирующей пневмонии овец (ППО). Филогенетический анализ, в ходе которого сравнивались нуклеотидные последовательности вируса меди-висна (MVV) и вируса артрита-энцефалита коз (CAEV), показал, что они являются близкородственными лентивирусами. Одним из путей передачи CAEV и MVV служат молоко и молозиво. Источник горизонтального распространения данных инфекций в отсутствие лактации остается неизвестным, однако известно, что патогенные вирусы содержатся в легочном секрете и экскрементах. Лентивирусы овец найдены в большинстве стран мира, занимающихся овцеводством. Заметными исключениями являются Австралия и Новая Зеландия. Наиболее широкое распространение АЭК получил в промышленно развитых странах, что, по всей видимости, совпадает с международными перемещениями европейских пород молочных коз. Клиническое и субклиническое течение болезни меди-висна и артрита-энцефалита коз сопряжено с появлением в легких, суставах, вымени и центральной нервной системе прогрессирующих, воспалительных поражений, связанных с реакцией мононуклеарных клеток. Для обоих видов - хозяев возбудителей заболеваний характерно наличие индуративного мастита, и его экономическая значимость может быть недооценена. Затрудненное дыхание, в сочетании с физическим истощением, вызванные прогрессирующей пневмонией, являются преимущественными клиническими проявлениями заболевания у овец, тогда как у коз основным клиническим признаком болезни служит полиартрит. Однако большинство инфицированных лентивирусом коз и овец не выказывают практически никаких признаков заболевания, оставаясь при этом постоянными переносчиками вируса и сохраняя способность передавать инфекцию с молозивом и молоком и через выделения из органов дыхания. Наиболее практичным и надежным способом подтверждения диагноза в случае болезни меди-висна или артрита-энцефалита коз является комбинация серологических исследований и клинической оценки. Хотя серология представляет собой наиболее экономичный метод диагностики инфекции у персистентно инфицированных и при этом клинически здоровых овец, необходимо осознавать возможность получения ошибочных результатов тестов. Частота ошибок зависит от нескольких факторов, включая, в числе прочих: 1) формат исследования, 2) степень гомологии штамма вируса, используемого в исследовании, и штаммов, присутствующих у исследуемых популяций, и 3) вирусный антиген, используемый в исследовании.

Идентификация возбудителя: Можно предпринять попытку изоляции вируса из материала, взятого у живых животных с клинической и субклинической формами заболевания, путем совместного культивирования лейкоцитов периферической крови или молока с надлежащими культурами клеток овец или коз, например, клеток хориоидного сплетения (MVV) или синовиальной мембраны (CAEV). Процесс изоляции вируса отличается высокой специфичностью, но имеет уязвимые моменты. После вскрытия трупов изоляцию вируса лучше всего проводить путем культивирования эксплантатов пораженных тканей, например, легкого, хориоидного сплетения, синовиальной мембраны или вымени. Кроме того, при вскрытии из легких могут быть получены альвеолярные макрофаги, которые затем культивируются совместно с восприимчивыми клетками. Характерные цитопатические эффекты включают появление рефрактильных звездчатых клеток и синцития. Присутствие MVV или CAEV может быть подтверждено методами иммуномечения и электронной микроскопией.

Методы распознавания нуклеиновых кислот: Описано множество стандартных и несколько количественных тестов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), предназначенных для обнаружения провирусов MV и CAE. Упомянутые тесты используются в рутинной практике многих лабораторий для целей быстрого выявления, определения количеств и идентификации штаммов лентивирусов, поражающих мелких жвачных животных. Клонирование и/или секвенирование продуктов ПЦР является самым прямым методом подтверждения специфичности результатов ПЦР.

Серологические исследования: У большинства инфицированных овец и коз присутствуют специфические антитела, поддающиеся обнаружению при помощи ряда различных серологических тестов. Два наиболее часто

используемых метода это иммунодиффузия в агаровом геле и иммуноферментный анализ (ИФА). Также проводятся вестерн-блоттинг и радиоиммунопреципитация, но только в специализированных лабораториях. В стадах молочных коз целесообразно осуществлять анализ молока на наличие антител. Период времени с момента инфицирования до развития сероконверсии может быть относительно продолжительным и непредсказуемым и измеряться месяцами, а не неделями. Однако после сероконверсии гуморальный иммунный ответ обычно сохраняется, и серопозитивные козы и овцы рассматриваются в качестве носителей вируса.

Требования к вакцинам: Доступных вакцин не существует.

А. ВВЕДЕНИЕ

Артрит-энцефалит коз (АЭК) и меди-висна овец (МВ) представляют собой персистирующие лентивирусные инфекции, вызываемые близкородственными лентивирусами (Minguijón *et al.*, 2015; Peterhans *et al.*, 2004). Меди-висна известна также под названием прогрессирующей пневмонии овец (ППО). Овцы могут быть экспериментально инфицированы вирусом АЭК, а козы поддаются экспериментальному заражению вирусом МВ. Кроме того, филогенетический анализ, в ходе которого сравнивались нуклеотидные последовательности вируса меди-висна (MVV) и вируса артрита-энцефалита коз (CAEV), показал наличие четких признаков существования и эпидемиологическую важность межвидовой передачи рассматриваемых вирусов между козами и овцами, не продемонстрировав, однако, с достаточной четкостью, что один вирус произошел от другого (Shah *et al.*, 2004a; 2004b). МВ и АЭК характеризуются пожизненной персистенцией возбудителя в моноцитах и макрофагах хозяина и различной продолжительностью времени, проходящего с момента инфицирования до развития серологически выявляемого иммунного ответа в виде образования антител к вирусу. Большинство инфицированных овец и коз не выказывают клинических признаков заболевания, но остаются персистентно инфицированными и сохраняют способность передавать вирус (Adams *et al.*, 1983; Crawford *et al.*, 1980).

Меди-висна это исландское название, представляющее собой описание двух клинических синдромов, проявляющихся у овец, инфицированных MVV. «Меди» означает «затрудненное дыхание» и описывает болезнь, связанную с прогрессирующей интерстициальной пневмонией; «висна» означает «уменьшение массы» или «истощение» - признаки, связанные с паралитическим менингоэнцефалитом. Первичным признаком инфицирования MVV является прогрессирующее поражение легких, тогда как хронический полиартрит с синовитом и бурситом является первичным клиническим проявлением заражения CAEV. Энцефалит поражает, в первую очередь, козлят в возрасте 2-6 месяцев после инфицирования CAEV, но необходимо проведение тщательной дифференциальной диагностики с целью исключения других синдромов или инфекций. Индуративный мастит присутствует при обоих синдромах. Легкие овец, пораженных вирусом меди-висна, не спадаются после удаления из грудной клетки и часто несут на себе отпечатки ребер. Легкие и лимфатические узлы увеличены (в 2–3 раза по сравнению с нормальным весом). Очаги поражения равномерно распределены в легких, которые равномерно обесцвечены или испещрены серо-бурыми точками и имеют плотную консистенцию. Диагностика респираторного заболевания, вызываемого CAEV и MVV, была пересмотрена Чакраборти и другими авторами (Chakraborty *et al.* (2014)). Вымя при болезни меди-висна диффузно уплотнено, при этом может наблюдаться увеличение связанных с ним лимфоузлов.

Если предполагаемой причиной клинических признаков являются АЭК или МВ, то подтверждение диагноза можно получить путем сочетания клинического обследования с выделением и идентификацией вируса или же путем серологического исследования и, при необходимости, гистологического анализа образцов соответствующих тканей, взятых при вскрытии. К числу тканей, подлежащих исследованию, относятся: легкие, которые исследуют на наличие прогрессирующей интерстициальной пневмонии; головной и спинной мозг, исследуемые на наличие признаков менингоэнцефалита; вымя (индуративный мастит); пораженные суставы и синовиальная оболочка (артрит); а также почки (васкулит) (Crawford & Adams, 1981). Характер воспалительной реакции во всех органах одинаков и представляет собой интерстициальную реакцию мононуклеарных клеток, иногда в сочетании с крупными скоплениями лимфоцитов и формированием фолликулов.

В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Таблица 1: Существующие методы диагностики артрита-энцефалита коз и болезни меди-висна и их назначение

Метод	Назначение					
	Отсутствие вируса в популяции	Отсутствие вируса у отдельного животного перед перемещением	Роль в программах по борьбе с заболеванием	Подтверждение клинических случаев	Распространенность инфекции (эпиднадзор)	Иммунный статус отдельного животного или популяции (после вакцинации)
Идентификация возбудителя						
Изоляция вируса	–	–	–	+	–	–

Обнаружение антигена	–	–	–	+	–	–
ПЦР	+	+	++	++	++	–
Выявление иммунного ответа						
AGID	+	+++	++	+++	+++	+
РСК	–	–	–	–	–	–
ИФА	+++	+++	+++	+	+++	+
РВН	–	–	–	–	–	+++
РНИФ	–	+	–	–	+	–

Условные обозначения: +++ = рекомендуемый метод; ++ = пригодный метод, но может требоваться дальнейшая валидация; + = возможно использование в некоторых случаях, но затраты, надежность или иные факторы существенно ограничивают его применение; – = неприменим для данной цели; n/a = цель неприменима

ПЦР = полимеразная цепная реакция; AGID = иммунодиффузия в агаровом геле; РСК = реакция связывания комплемента; ИФА = иммуноферментный анализ; РВН = реакция вируснейтрализации; РНИФ = реакция непрямо́й иммунофлуоресценции.

1. Идентификация возбудителя

Изоляция и характеристика MVV и CAEV обычно не проводится в целях рутинной диагностики. Вследствие персистирующего характера данных инфекций установление положительного статуса антител является достаточным для выявления носителей вируса. Однако вследствие того, что сероконверсия наступает через продолжительное время после заражения, у недавно инфицированных животных могут наблюдаться отрицательные результаты серологических исследований.

Ниже изложены два метода изоляции MVV и CAEV. В одном из них используется материал живых животных, а во втором – образцы тканей, взятые при вскрытии.

1.1. Изоляция вируса из образцов, взятых у живых животных

1.1.1. Вирус меди-висна

ДНК провируса МВ содержится в циркулирующих моноцитах и макрофагах тканей. Изоляция вируса из материала живых животных требует, таким образом, приготовления препаратов лейкоцитов из периферической крови или из молока в период лактации, с соблюдением асептики, и их последующего культивирования совместно с индикаторными клетками. Для данной цели обычно используют клетки хориоидного сплетения овцы (SCP). Индикаторные клетки получают в виде первичной эксплантной культуры из материала плода или новорожденных ягнят, свободных от вируса. Количество клеток может быть многократно увеличено после трех или четырех пассажей для целей хранения в жидком азоте. Восстановленные клетки SCP пригодны для совместного культивирования, включающего до 10-15 пассажей. Хотя рост клеток продолжается и далее в течение достаточно длительного времени, их восприимчивость к MVV может снизиться.

Препараты лейкоцитов, имеющие вид лейкоцитарной пленки, могут быть приготовлены из периферической крови путем центрифугирования гепаринизированных, цитрированных или обработанных этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) образцов в течение 15 минут при 1000 **g**. Клетки отсасывают, суспендируют в сбалансированном солевом растворе Хенкса (HBSS), а затем очищают центрифугированием при 400 **g** на подушке подходящей плотности в течение 40 минут. Клетки на границе раздела удаляют одно-двукратным промыванием в HBSS с вращением при 100 **g** в течение 10 минут, и оставшийся клеточный осадок ресуспендируют в среде до концентрации, примерно равной 10⁶ клеток/мл. Клетки культивируют, как правило, в течение 10-12 дней в тефлоновых пакетах, а затем добавляют к промытому монослою начавших сливаться клеток SCP во флаконе с площадью поверхности роста, равной 25 см².

Аналогичным образом лейкоциты могут быть получены из молока центрифугированием, последующим промыванием с вращением и ресуспендированием, и затем добавлены к монослойным культурам клеток SCP.

Рассматриваемые культуры следует поддерживать в атмосфере с 5%-м содержанием CO₂ при 37°C, меняя среду и, по мере необходимости, проводя пассирование. Их проверяют на наличие цитопатического эффекта (ЦПЭ), который характеризуется появлением рефрактивных звездообразных клеток с процессами дендритного роста в сочетании с формированием синцития. Культуры поддерживают в течение нескольких недель, по прошествии этого времени они считаются неинфицированными. Если подозревают развитие ЦПЭ, необходимо получить культуры на предметном стекле, которые фиксируют и ищут свидетельства присутствия вирусного антигена иммуномечением, как правило, методом реакции непрямо́й иммунофлуоресценции, или же используют непрямо́й иммунопероксидазный анализ. В дополнение, клетки любых подозрительных монослоев осаждают центрифугированием и готовят препараты для

идентификации любых характерных лентивирусных частиц при помощи трансмиссионной электронной микроскопии. Обратная транскриптаза в супернатанте клеточной культуры указывает на присутствие ретровирусов.

1.1.2. Вирус артрита-энцефалита коз

Процедура изоляции CAEV проводится согласно тем же принципам, что и изоляция MVV. Первоначально CAEV был выделен путем эксплантации синовиальной мембраны коз, пораженных артритом (Crawford & Adams, 1981). Наиболее подходящими для приготовления препаратов лейкоцитов образцами, получаемыми от живых коз, инфицированных CAEV, являются образцы периферической крови, молока и, возможно, аспират синовиальной жидкости. Клетки синовиальной мембраны коз (GSM) могут служить в качестве индикаторных клеток. Если существуют подозрения на развитие ЦПЭ, следует провести тесты на обнаружение вирусного антигена, как описано выше.

1.2. Изоляция вируса из образцов тканей, взятых при вскрытии

1.2.1. Вирус артрита-энцефалита коз и вирус меди-висна

Образцы тканей, включая легкие, синовиальные мембраны, вымя, и т.д., отбирают как можно более свежими с соблюдением асептики и помещают в стерильный HBSS или среду для культивирования клеток и тонко измельчают скальпелем в чашке Петри. Отдельные фрагменты отбирают пипеткой Пастера и переносят во флаконы на 25 см², примерно 20–30 фрагментов на один флакон, и на каждый фрагмент наносят каплю питательной среды. Затем флаконы инкубируют при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂ и оставляют нетронутыми на несколько дней, чтобы отдельные эксплантаты прикрепилась к пластику. Можно аккуратно добавить свежую среду, после чего на фрагментах будет постепенно нарастать клеточная масса. Когда разросшихся клеток будет достаточно, культуры обрабатывают трипсином, что ведет к образованию клеточных монослоев. Последние проверяют на наличие ЦПЭ, и любые подозрения на рост вируса подтверждаются таким же образом, как при совместном культивировании.

Адгезивные культуры макрофагов легко получить из материала, образующегося при промывании легких (посмертный бронхоальвеолярный лаваж). Данные культуры в течение 1-2 недель подвергаются тестированию на продуцирование вируса методами серологического анализа, электронной микроскопии или исследования активности обратной транскриптазы. Изоляция вируса может осуществляться путем совместного культивирования макрофагов и клеток SCP или GSM, как описано выше для лейкоцитов.

1.3. Методы распознавания нуклеиновых кислот

Методы распознавания нуклеиновых кислот могут применяться для обнаружения, количественной оценки и идентификации ДНК провирусов MB и АЭК. Для этого используют стандартную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с последующим саузенр-блоттингом, гибридизацией *in situ* или клонированием и/или секвенированием продуктов ПЦР (Alvarez *et al.*, 2006; Herrmann-Hoesing *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 1992). Стандартная методика анализа на основе ПЦР для обнаружения ДНК провирусов MB и АЭК в клетках и тканях используется в ходе рутинной деятельности многих лабораторий и, как правило, применяется в качестве дополнительного теста для определения инфекционного статуса тех животных, которые не могут быть однозначно диагностированы по результатам серологического исследования (Deandres *et al.*, 2005). В некоторых лабораториях используют ПЦР в реальном времени или количественную ПЦР, и указанные тесты, помимо определения инфекционного статуса, также обеспечивают количественную оценку провирусов MB и АЭК у животного (Alvarez *et al.*, 2006; De Regge & Cay, 2013; Herrmann-Hoesing *et al.*, 2007). Кроме того, молекулярные методы, такие как ПЦР, клонирование и секвенирование, позволяют получить информацию о специфических штаммах MVV и CAEV, циркулирующих в стране или в регионе. Данные сведения могут влиять на выбор метода серологического исследования и используемых соответствующих антигенов вирусов MV и CAE. Результаты глобального филогенетического анализа провирусных ДНК штаммов возбудителей лентивирусных заболеваний мелких жвачных животных (SRLV) позволяют предположить, что в некоторых регионах вирус MB мог естественным образом инфицировать коз, а вирус АЭК естественным образом инфицировать овец (Shah *et al.*, 2004a; 2004b). Недавно для обнаружения провируса АЭК была применена петлевая изотермическая амплификация (LAMP) (Balbin *et al.*, 2014). В ходе LAMP используются 4–6 праймеров, амплифицирующих 6–8 сегментов гена-мишени (Notomi *et al.*, 2000). В будущем молекулярные диагностические тесты в сочетании с филогенетическим анализом провирусов MB и АЭК могут применяться для отслеживания передачи возбудителя.

Важным аспектом при использовании ПЦР является вопрос специфичности. Из-за возможности амплификации неродственных последовательностей из геномной ДНК хозяина (ложноположительные результаты), амплифицированный продукт должен пройти проверку посредством метода гибридизации, или сравнения характера расщепления рестриктазами, или секвенирования. Секвенирование обеспечивает наиболее надежное подтверждение специфичности в ходе валидации результатов тестов, основанных на методе ПЦР, и рекомендовано МЭБ. Чувствительность подобных тестов может быть повышена путем использования гнездовой ПЦР, но специфичность гнездовой ПЦР подлежит проверке методами гибридизации, сравнения карт рестрикции, или секвенирования.

2. Серологические исследования

Инфекции овец и коз, вызываемые лентивирусом, часто носят персистирующий характер, поэтому обнаружение антител представляет собой ценный инструмент выявления носителей вируса. Близкое антигенное родство MVV и CAEV не является препятствием для определения гетерологичных антител в ходе некоторых серологических тестов (Knowles *et al.*, 1994).

Тестами, наиболее часто используемыми для целей серологической диагностики лентивирусной инфекции мелких жвачных животных, являются иммунодиффузия в агаровом геле (AGID) и иммуноферментный анализ (ИФА). Метод AGID был впервые разработан и описан в 1973 году (Terpstra & De Boer, 1973), а ИФА в 1982 году (Houwens *et al.*, 1982). Метод AGID отличается специфичностью, воспроизводимостью и простотой осуществления, но для интерпретации результатов требуется определенный опыт. ИФА это экономичный количественный метод, который можно автоматизировать, что позволяет применять его для анализа большого числа образцов сыворотки. Чувствительность и специфичность обоих методов зависит от штамма вируса, используемого в ходе анализа, препарата вирусного антигена, и эталона сравнительного исследования. Эталонами, используемыми для оценки чувствительности и специфичности новых тестов на основе AGID и ИФА, являются вестерн-блоттинг и/или радиоиммунопреципитация.

2.1. Иммунодиффузия в агаровом геле

Два вирусных антигена МВ и АЭК имеют особую важность с точки зрения рутинных серологических исследований: поверхностный гликопротеин вирусной оболочки, обычно именуемый SU или gp135, и нуклеокапсидный протеин, носящий название CA или p28. Оба антигена присутствуют в препаратах антигена, состоящих из субстрата, отобранного из инфицированных клеточных культур, с концентрацией, увеличенной примерно 50-кратно путем диализа против полиэтиленгликоля. К примеру, для проведения AGID в Соединенных Штатах обычно используется штамм вируса меди-висна WLC-1 (Cutlip *et al.*, 1977)¹, тогда как в Канаде для аналогичной цели используют полевой штамм MVV (Simard & Briscoe, 1990b).

Важно помнить, что чувствительность метода AGID, применяемого для распознавания антител к CAEV, зависит как от штамма вируса, так и от используемого вирусного антигена (Adams & Gorham, 1986; Knowles *et al.*, 1994). Доказано, что тест на основе AGID, в котором используется CAEV gp135, имеет более высокую чувствительность по сравнению с тестом, использующим CAEV p28 (Adams & Gorham, 1986). Кроме того, было продемонстрировано, что, по сравнению с радиоиммунопреципитацией, чувствительность метода AGID в отношении обнаружения антител к CAEV была на 35% выше в случае использования антигена вируса АЭК, чем антигена вируса МВ (Knowles *et al.*, 1994). Наиболее вероятное объяснение этих различий в способности антигенов CAEV и MVV распознавать антитела к CAEV заключается в следующем: если в случае радиоиммунопреципитационного анализа для получения положительного результата требуется связывание антителом только одного эпитопа, то преципитация в агаровом геле требует множественных взаимодействий «эпитоп – антитело». Хотя степень идентичности нуклеотидной последовательности гена оболочки CAEV и MVV составляет 73–74,4%, подобного родства может быть недостаточно для образования надлежащего антитела к взаимно общим эпитопам CAEV и MVV с формированием в результате не поддающихся определению линий преципитации при использовании антигена вируса MVV. Если используется подходящий антиген, AGID имеет высокую результативность. В сравнении с иммунопреципитацией, AGID, применяемая для обнаружения антител к CAEV с использованием антигена CAEV, характеризуется показателем чувствительности, равным 92%, и специфичностью, составляющей 100% (Knowles *et al.*, 1994). AGID, применяемая для обнаружения антител к MVV с использованием антигена MVV, имеет показатели чувствительности и специфичности, равные, соответственно, 99,3% и 99,4%.

У взрослых овец, персистентно инфицированных MVV, и у взрослых коз, персистентно инфицированных CAEV, основной иммунный ответ в виде образования антител, согласно результатам иммунопреципитации, направлен против антигена gp135. Ответная реакция против p28 обычно присутствует в более низких титрах. Для коз, инфицированных CAEV, получены данные, позволяющие сделать предположение о выработке у части особей антител к gp135 в отсутствие ответной реакции на p28, и наоборот (Rimstad *et al.*, 1994). Однако для валидации результатов теста необходимы стандартные сыворотки, дающие линии преципитации как для антител к gp135, так и для антител к p28.

Гелевая среда состоит из 0,7–1% агарозы в 0,05 М Трис-буфере, pH 7,2, с 8,0% NaCl. Тест удобно проводить в пластиковых чашках Петри или в пластиковых поддонах с площадью основания 10 см². Характер расположения и размер лунок будет определять число сывороток, тестируемых в каждой чашке. Могут быть использованы различные варианты расположения лунок, но обычно это шестиугольное расположение с одной лункой в центре: например, чередующиеся большие (5 мм в диаметре) и маленькие (3 мм в диаметре) периферические лунки на расстоянии 2 мм друг от друга и от центральной лунки с антигеном, имеющей 3 мм в диаметре. Большие периферические лунки предназначены для тестируемых сывороток, а маленькие – для стандартных сывороток. Слабоположительный контроль должен быть в обязательном порядке включен в каждый тест. Чашки инкубируют в течение ночи при 20–25°C во влажной камере, а затем проверяют на наличие линий преципитации. Возможно инкубирование чашек при 2–8°C в течение последующих 24 часов для получения более четких линий преципитации.

¹ Данный вирус получил распространение благодаря д-ру Ховарду Лемкулу (Dr Howard Lehmkuhl) из Национального центра заболеваний животных Министерства сельского хозяйства США (P.O. Box 70, Ames, Iowa, USA).

Важным аспектом, который необходимо учитывать, является наличие опытного персонала для интерпретации результатов AGID. Интерпретация зависит от используемого антигена. Примеры методик для проведения AGID с использованием препаратов различных антигенов, а также руководство по интерпретации результатов можно найти у Адамса и соавторов (Adams *et al.*, 1983).

2.2. Иммуноферментный анализ

На данный момент описано свыше 30 методик на основе ИФА, предназначенных для обнаружения антител к MVV и CAEV в сыворотке овец и коз, соответственно (Deandres *et al.*, 2005). В большинстве методик применяется непрямой иммуноферментный анализ (н-ИФА), но три методики основаны на конкурентном ИФА (к-ИФА) с использованием моноклональных антител (Herrmann *et al.*, 2003; Houwers & Schaake, 1987). В половине методик с н-ИФА задействованы очищенные цельновирионные препараты, в другой половине – рекомбинантные белковые и/или синтетические пептидные антигены. Некоторые разновидности ИФА продемонстрировали высокую чувствительность и специфичность в сопоставлении с такими эталонами, как вестерн-блоттинг и радиоиммунопреципитация (Rosati *et al.*, 1994; Saman *et al.*, 1999). В сравнении с методом радиоиммунопреципитации, одна разновидность к-ИФА, применявшаяся в США, продемонстрировала высокие показатели чувствительности и специфичности как для овец, так и для коз, что позволяет говорить о возможности использования данного теста для мониторинга как MVV, так и CAEV в Соединенных Штатах (Herrmann *et al.*, 2003). Метод ИФА в течение нескольких лет используется в некоторых европейских странах в рамках программ контроля и ликвидации болезни меди-висна среди поголовья овец и артрита-энцефалита среди поголовья коз (Motha & Ralston, 1994; Répin *et al.*, 1998). Для подтверждения положительных результатов ИФА используется AGID вследствие своей высокой специфичности.

Препараты антигена, содержащие целые вирионы, получают дифференциальным центрифугированием надосадочных жидкостей, полученных из инфицированных клеточных культур и в результате обработки очищенного вируса детергентами. Данные препараты наносят на микропланшеты (Dawson *et al.*, 1982; Simard & Briscoe, 1990a; Zanon *et al.*, 1994). Цельновирионные препараты должны содержать как gp135, так и p28. Рекомбинантные антигены или синтетические пептиды обычно получают из целых или неполных сегментов гена gag или гена оболочки. Они могут использоваться совместно (Power *et al.*, 1995; Rosati *et al.*, 1994; Saman *et al.*, 1999). Таким образом, получаемые в клетках *Escherichia coli* рекомбинантные продукты, являющиеся производными гена gag или гена оболочки, слитые с антигеном, представляющим собой гибридный белок, содержащий глутатион-S-трансферазу, обеспечивают постоянный источник антигена для международного распространения и стандартизации.

Методом ИФА можно исследовать также молоко и молозиво, и в ходе некоторых исследований проводилась оценка парных выборок сыворотки и молока. Поскольку молоко и молозиво – один из путей передачи CAEV, исследование образцов молока на наличие антител к CAEV или MVV не позволяет получить своевременную информацию для предотвращения передачи вируса, в частности, недавно появившемуся на свет потомству.

ИФА проводят при комнатной температуре (~25°C) в лабораториях, имеющих необходимое оборудование (ИФА-спектрофотометр для считывания микропланшетов) и реагенты. Он удобен для скрининга большого количества образцов, поскольку это надежный количественный метод обнаружения у овец и коз антител к лентивирусам мелких жвачных животных (SRLV). Для проведения ИФА требуется сравнительно чистый антиген. Недостатком некоторых разновидностей ИФА является то, что многие методики не прошли оценку, основанную на сравнении с эталоном, таким как вестерн-блоттинг или радиоиммунопреципитация. Метод должен пройти валидацию в соответствии с положениями Главы 1.1.6 «*Принципы и методы валидации диагностических испытаний, предназначенных для выявления инфекционных заболеваний*» в сравнении с такими эталонами, как вестерн-блоттинг или радиоиммунопреципитация. К настоящему моменту только один вид ИФА соответствует указанным стандартам (Zanon *et al.*, 1994).

В случае н-ИФА лунки микропланшета обрабатывают антигеном. Разведенные образцы сыворотки помещают в лунки, где они реагируют с антигенами, связанными с твердофазным носителем. Несвязавшийся материал удаляют промыванием по окончании надлежащего инкубационного периода. Конъюгат (например, Ig к антителам мелких жвачных животных, меченые пероксидазой хрена) реагирует со специфическими антителами, связанными с антигеном. Непрореагировавший конъюгат удаляют промыванием по окончании надлежащего инкубационного периода. Добавляют ферментный субстрат. Степень конверсии субстрата пропорциональна количеству связанных антител. Через определенное время реакцию прекращают и измеряют интенсивность окрашивания при помощи спектрофотометрии. Недостаток н-ИФА состоит в том, что, как правило, тестируемые образцы сывороток должны быть разведены в соотношении 1/50 или выше с целью снизить процент ложноположительных результатов.

В конкурентном ИФА, разработанном для обнаружения SRLV, с захватом gp135 или p28 в качестве антигена, использовались специфические моноклональные антитела (MAb) (Freveiro *et al.*, 1999; Herrmann *et al.*, 2003; Houwers & Schaake, 1987; Ozyoruk *et al.*, 2001). К-ИФА решает проблему чистоты препарата антигена, поскольку специфичность данного теста зависит от эпитопа моноклональных антител. В ходе к-ИФА образцы сыворотки, содержащие антитела к SRLV, ингибируют связывание меченых энзимами моноклональных антител с антигеном SRLV на поверхности пластиковых лунок. Детекция связывания меченого энзимом конъюгата MAb осуществляется добавлением энзимного субстрата; количественное определение основано на последующем формировании окрашенного продукта. Интенсивное окрашивание свидетельствует о том, что блокирование связывания меченых энзимом MAb идет слабо или отсутствует, и, следовательно, антитела к SRLV в исследуемом образце сыворотки отсутствуют. Напротив, слабое окрашивание вследствие ингибирования связывания меченого энзима MAb с

антигеном, закрепленным на твердой фазе, показывает наличие в исследуемой сыворотке антител к SRLV. Формат к-ИФА требует, чтобы содержащиеся в сыворотке антитела связывались либо со специфическим эпитопом MAб, либо в непосредственной близости от него.

2.2.1. Материалы и реагенты

Микротитрационные планшеты на 96 плоскостных лунок с антигеном SRLV, иммобилизованным заранее или непосредственно перед проведением теста; спектрофотометр (с фильтрами на 405, 450, 490 и 620 нм); инкубатор на 37°C с увлажнением; 1-, 8- и 12-канальные пипетки со сменными пластиковыми наконечниками; шейкер для планшетов (опционально); холодильник; морозильная камера.

Положительные и отрицательные контрольные сыворотки; конъюгат (например, меченый пероксидазой антииммуноглобулин мелких жвачных); десятикратная концентрация растворителя (например, фосфатно-солевой буфер/Tween); дистиллированная вода; 10× раствор для промывания; субстрат или хромоген (например, ABTS [2,2-азино-ди (3-этил-бензотиазолин) сульфоновая кислота] или ТМБ [3,3,5,5-тетраметилбензидин]); стоп-реагент (например, детергент, серная кислота).

2.2.2. Непрямой ИФА: протокол исследования

- i) Получают нужное разбавление образцов сыворотки, включая контрольные сыворотки (например, 1/20), и вносят 0,1-0,2 мл в каждую лунку (в двух параллельных анализах в случае двухфазного ИФА). Контрольными сыворотками служат положительная и отрицательная сыворотки, предоставленные производителем, и стандартная положительная сыворотка из лаборатории с целью сравнения титров для разных тестов.
- ii) Накрывают планшет крышкой и инкубируют при комнатной температуре или при 37°C в течение 30–90 минут. Удаляют содержимое и трижды промывают раствором для промывания при комнатной температуре.
- iii) Помещают в лунки надлежащее разведение свежеприготовленного конъюгата (0,1 мл на лунку). Накрывают каждый планшет и инкубируют согласно описанию в п. ii. Вновь трижды промывают.
- iv) Добавляют в каждую лунку 0,1 мл свежеприготовленного или готового к использованию раствора хромогенного субстрата (например, ABTS в цитратно-фосфатном буфере, pH 5,0, и 30% раствор H₂O₂ [0,1 мкл/мл]).
- v) Встряхивают планшет; после инкубирования прекращают реакцию, внося в каждую лунку стоп-реагент (например, 0,1 мл серной кислоты).
- vi) При помощи ИФА-спектрофотометра для считывания микропланшетов для каждой лунки измеряют величину поглощения при 405 нм (ABTS) или 450–620 нм (ТМБ). Значения поглощения используют для вычисления результатов теста.
- viii) Интерпретация результатов

Для коммерческих наборов существует прилагаемая к набору инструкция, содержащая указания по интерпретации результатов и критерии соответствия.

Для индивидуальных процедур и реагентов, используемых в лаборатории, необходима разработка и валидация собственных критериев оценки. Пример приведен ниже:

Для каждой исследуемой сыворотки вычисляют среднее значение поглощения (Ab) образца сыворотки и положительной (Ab_{pos}) и отрицательной (Ab_{neg}) контрольных сывороток, и выражают его в процентах:

$$\frac{Ab - Ab_{neg}}{Ab_{pos} - Ab_{neg}} \times 100$$

Если исследуемая сыворотка имеет среднее значение поглощения <30%, она расценивается как отрицательная; величина 30-40% считается сомнительным результатом, а >40% - положительным.

2.2.3. Конкурентный ИФА: протокол исследования

- i) Помещают 0,05 мл неразведенной сыворотки и положительной/отрицательной контрольных сывороток в лунку планшета с иммобилизованным антигеном.
- ii) Инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре.
- iii) Удаляют содержимое лунок и троекратно промывают планшет раствором для промывания.
- iv) Добавляют в каждую лунку 0,05 мл разбавленного конъюгата антител с пероксидазой. Хорошо перемешивают и инкубируют в течение 30 минут при комнатной температуре.
- v) После 30-минутного инкубирования удаляют содержимое лунок и повторяют процедуру промывания,

описанную в п. iii.

- vi) Добавляют 0,05 мл раствора субстрата (например, ТМБ) в каждую лунку. Перемешивают и накрывают планшет алюминиевой фольгой. Не удаляют содержимое лунок.
- vii) Добавляют 0,05 мл стоп-реагента в каждую лунку. Перемешивают. Не удаляют содержимое лунок.
- viii) Сразу после добавления стоп-реагента при помощи ИФА-спектрофотометра для считывания микропланшетов измеряют величину поглощения (при 620, 630 или 650 нм).
- ix) Интерпретация результатов

Для индивидуальных процедур и реагентов, используемых в лаборатории, необходима разработка и валидация собственных критериев оценки. Пример приведен ниже:

Вычисление: $100 - [(Ab \text{ образца} \times 100) / (\text{Среднее } Ab \text{ отрицательного контроля})] = \% \text{ ингибирования.}$

Для образцов козьей сыворотки: если ингибирование, которое вызывает исследуемый образец, превышает 33,2%, результат считается положительным; если величина ингибирования <33,2%, то результат отрицательный.

Для образцов овечьей сыворотки: если ингибирование, которое вызывает исследуемый образец, превышает 20,9%, результат считается положительным; если величина ингибирования <20,9% то результат отрицательный.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

Доступных вакцин не существует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ADAMS D.S. & GORHAM J.R. (1986). The gp135 of caprine arthritis encephalitis virus affords greater sensitivity than the p28 in immunodiffusion serology. *Res. Vet. Sci.*, **40**, 157–160.

ADAMS D.S., KLEVJER-ANDERSON P., CARLSON J.L., MCGUIRE T.C. & GORHAM J.R. (1983). Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 1670–1675.

ALVAREZ V., ARRANZ J., DALTABUIT M., LEGINAGOIKOA I., JUSTE R.A., AMORENA B., DE ANDRES D., LUJAN L.L., BADIOLA J.J. & BARRIATUA E. (2006). PCR detection of colostrum-associated Maedi-Visna virus (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs. *Res. Vet. Sci.*, **80**, 226–234.

BALBIN M.M., BELOTINDOS L.P., ABES N.S. & MINGALA C.N. (2014). Caprine arthritis encephalitis virus detection in blood by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting the proviral gag region. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **79**, 37–42.

CHAKRABORTY S., KUMAR A., TIWARI R., RAHAL A., MALIK Y., DHAMA K., PAL A. & PRASAD M. (2014). Advances in diagnosis of respiratory diseases of small ruminants. *Vet. Med. Int.*, Article ID 508304, 16 pp.

CRAWFORD T.B. & ADAMS D.S. (1981). Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **178**, 713–719.

CRAWFORD T.B., ADAMS D.S., CHEEVERS W.P. & CORK L. C. (1980). Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science*, **207**, 997–999.

CUTLIP R.C., JACKSON T.A. & LAIRD O.A. (1977). Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. *Am. J. Vet. Res.*, **38**, 1081–1084.

DAWSON M., BIRONT P. & HOUWERS D.J. (1982). Comparison of serological tests used in three state veterinary laboratories to identify maedi-visna virus infection. *Vet. Rec.*, **111**, 432–434.

DEANDRES D., KLEIN D., WATT N.J., BERRIATUA E., TORSTEINSDOTTIR S., BLACKLAWS B.A. & HARKISS G.D. (2005). Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.*, **107**, 49–62.

DE REGGE N. & CAY B. (2013). Development, validation and evaluation of added diagnostic value of a q(RT)-PCR for the detection of genotype A strains of small ruminant lentiviruses. *J. Virol. Methods*, **194**, 250–257.

HERRMANN L.M., CHEEVERS W.P., MCGUIRE T.C., ADAMS D.S., HUTTON M.M., GAVIN W.G. & KNOWLES D.P.A. (2003). A competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA) for detection of serum antibodies to caprine

arthritis-encephalitis virus (CAEV): a diagnostic tool for successful eradication. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **10**, 267–271.

HERRMANN-HOESING L.M., WHITE S.N., LEWIS G.S., MOUSEL M.R. & KNOWLES D.P. (2007). Development and validation of an ovine progressive pneumonia virus quantitative PCR. *Clin. Vacc. Immunol.*, **14**, 1274–1278.

- HOUWERS D.J., GIELKENS A.L.J. & SCHAAKE J. (1982). An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to maedi-visna virus. *Vet. Microbiol.*, **7**, 209.
- HOUWERS D.J. & SCHAAKE J. (1987). An improved ELISA for the detection of antibodies to ovine and caprine lentiviruses, employing monoclonal antibodies in a one-step assay. *J. Immunol. Methods*, **98**, 151–154.
- JOHNSON L.K., MEYER A.L. & ZINK M.C. (1992). Detection of ovine lentivirus in seronegative sheep by *in situ* hybridization, PCR and cocultivation with susceptible cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **65**, 254–260.
- KNOWLES D.P., EVERMANN J.F., SCHROPSHIRE C., VANDER SCHALIE J., BRADWAY D., GEZON H.M. & CHEEVER W.P. (1994). Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine-arthritis encephalitis virus. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 243–245.
- MINGUIJÓN E., REINA R., PÉREZ M., POLLEDO L., VILLORIA M., RAMÍREZ H., LEGINAGOIKOA I., BADIOLA J.J., GARCÍA-MARÍN J.F., DE ANDRÉS D., LUJÁN L., AMORENA B. & JUSTE R.A. (2015). Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Vet. Microbiol.*, **181**, 75–89.
- MOTHA M.J. & RALSTON J.C. (1994). Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAE in milk. *Vet. Microbiol.*, **38**, 359–367.
- NOTOMI T., OKAYAMA H., MASUBUCHI, H., YONEKAWA, T., WATANABE, K., AMINO N. & HASE T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, **28** (12): E63.
- OZYORUK F., CHEEVERS W.P., HULLINGER G.A., MCGUIRE T.C., HUTTON M. & KNOWLES D.P. (2001). Monoclonal antibodies to conformational epitopes of the surface glycoprotein of caprine arthritis-encephalitis virus: potential application to competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in goat sera. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **8**, 44–51.
- PETERHANS E., GREENLAND T., BADIOLA J., HARKISS G., BERTONI G., AMORENA B., ELIASZEWICZ M., JUSTE R., KRASSNIG R., LAFONT J.P., LENIHAN P., PETURSSON G., PRITCHARD G., THORLEY G., VITUC., MORNEX J.F. & PÉPIN M. (2004). Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet. Res.*, **35**, 257–274.
- POWER C., RICHARDSON S., BRISCOE M. & PASICK J. (1995). Evaluation of two recombinant Maedi-Visna virus proteins for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to ovine lentiviruses. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **2**, 631–633.
- RIMSTAD E., EAST N., DEROCK E., HIGGINS J. & PEDERSEN N.C. (1994). Detection of antibodies to caprine arthritis/encephalitis virus using recombinant gag proteins. *Arch. Virol.*, **134**, 345–356.
- ROSATI S., KWANG J., TOLARI F. & KEEN J.E. (1994). A comparison of whole virus and recombinant transmembrane ELISA and immunodiffusion for detection of ovine lentivirus antibodies in Italian sheep flocks. *Vet. Res. Commun.*, **18**, 73–80.
- SAMAN E., VAN EYNDE G., LUJAN L., EXTRAMANIA B., HARKISS G., TOLARI F., GONZALEZ L., AMORENA B., WATT N.J. & BADIOLA J.J. (1999). A new sensitive serological assay for detection of lentivirus infections in small ruminants, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **6**, 734–740.
- SHAH C., BÖNI J., HUDER J.B., VOGT H.R., MÜLHERR J., ZANONI R., MISEREZ R., LUTZ H. & SCHÜPBACH J. (2004a). Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Virology*, **319**, 12–26.
- SHAH C., HUDER J.B., BÖNI J., SCHÖNMANN M., MÜLHERR J., LUTZ H. & SCHÜPBACH J. (2004b). Direct evidence for natural transmission of small ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and vice versa. *J. Virol.*, **78**, 7518–7522.
- SIMARD C.L. & BRISCOE M.R. (1990a). An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to maedi-visna virus in sheep. A simple technique for production of antigen using sodium dodecyl sulfate treatment. *Can. J. Vet. Res.*, **54**, 446–450.

SIMARD C.L. & BRISCOE M.R. (1990b). An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to Maedi-visna virus in sheep. Comparison to conventional agar gel immunodiffusion test. *Can. J. Vet. Res.*, **54**, 451–456.

TERPSTRA C. & DE BOER G.F. (1973). Precipitating antibodies against maedi-visna virus in experimentally infected sheep. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, **43**, 53–62.

ZANONI R.G., VOGT H.R., POHL B., BOTTCHE J., BOMMELI W. & PETERHANS E. (1994). An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small-ruminant lentiviruses. *J. Vet. Med. B*, **41**, 662–669.

*

* *

Примечание: Действуют референтные лаборатории МЭБ по артриту-энцефалиту коз и болезни меди-висна (см. Таблицу в части 4 настоящего *Руководства по заболеваниям наземных животных* или веб-сайт МЭБ, где размещена обновленная версия списка: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения дальнейшей информации в отношении методов диагностики, реагентов и вакцин против артрита-энцефалита коз и болезни меди-висна обращайтесь в справочные лаборатории МЭБ.

ПРИМЕЧАНИЕ: Документ по артриту-энцефалиту коз впервые принят в 1990 году, документ по болезни меди-висна впервые принят в 1989 году.
Последнее обновление принято в 2017 году.

