

## ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ЛОШАДЕЙ

Н.Н. ГЕРАСИМОВА, О.Л. КОЛБАСОВА, С.Ж. ЦЫБАНОВ,  
А.В. ЛУНИЦИН, Д.В. КОЛБАСОВ

Инфекционная анемия лошадей (ИНАН) — вирусная болезнь однокопытных, вызываемая РНК-содержащим вирусом из рода *Lentivirus* семейства *Retroviridae*. Она сопровождается поражением органов кроветворения и проявляется рецидивирующей или постоянной лихорадкой, анемией и нарушением функций сердечно-сосудистой системы. Своевременная диагностика ИНАН — единственный надежный способ контроля заболевания. Для этой цели предложены различные серологические и молекулярно-генетические методы. Серологические методы исследования при ИНАН имеют определенные недостатки. С их помощью невозможно выявить больных животных до начала сероконверсии, кроме того, зарегистрированы случаи иммунодефицитного состояния лошадей, при котором вирусспецифические антитела образуются в количестве, недостаточном для их обнаружения. В настоящей работе представлены данные по сравнительной оценке различных серологических и молекулярно-генетических методов диагностики инфекционной анемии лошадей при экспериментальном воспроизведении инфекции у восприимчивого животного. Использовали соответственно реакцию диффузионной преципитации (РДП), иммуноферментный анализ (ИФА) и способы обнаружения фрагментов генома вируса ИНАН с помощью гнездовой ПЦР с этапом обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) и электрофоретической детекцией, а также ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Разработанные тест-системы для ПЦР-диагностики основаны на амплификации фрагментов *gag*-гена вируса ИНАН с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров. При исследовании проб крови, взятой на 2-е сут после экспериментального заражения, получен положительный ответ в гнездовой ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией и в ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Далее геном вируса ИНАН выявлялся методом ОТ-ПЦР до конца срока наблюдения, составлявшего 35 сут. Специфические антитела в сыворотке крови обнаруживали методом РДП, начиная с 30-х, ИФА — с 21-х сут после инфицирования. Таким образом, ПЦР можно эффективно применять в качестве специфичного экспресс-метода для выявления генома вируса ИНАН в период до начала сероконверсии с последующей верификацией другими лабораторно-диагностическими методами. Для предлагаемых отечественных тест-систем и рекомендованных методик исследования подтверждены преимущества использования ПЦР-диагностики на ранних сроках заболевания ИНАН.

**Ключевые слова:** инфекционная анемия лошадей, экспериментальное воспроизведение инфекции, ОТ-ПЦР, серодиагностика.

Инфекционная анемия лошадей (ИНАН) — вирусная болезнь однокопытных, сопровождающаяся поражением органов кроветворения и проявляющаяся рецидивирующей или постоянной лихорадкой, анемией и нарушением функций сердечно-сосудистой системы (1-4). В естественных условиях болеют лошади всех возрастов, пони, ослы, мулы и лошаки (5, 6). У жеребят болезнь часто заканчивается смертью (3, 7). В связи с угрожающими последствиями вспышек этого заболевания реализуются программы по его искоренению (8, 9). Возбудитель ИНАН — РНК-содержащий вирус из рода *Lentivirus* семейства *Retroviridae* (3, 4, 10).

При ИНАН формируется нестерильный иммунитет, то есть иммунитет, поддерживаемый присутствием возбудителя в организме. В ответ на действие вируса в крови лошадей появляются антитела к различным антигенным детерминантам возбудителя (3).

В настоящее время диагностика инфекционной анемии основана на выявлении специфических антител к вирусу. Разработаны наборы для реакции диффузной преципитации (РДП) и иммуноферментного анализа (ИФА). Из серологических методов диагностики ИНАН «золотым» стандартом считается РДП (тест Коггинса) (7, 11).

Однако перечисленные методы исследования при ИНАН имеют

определенные недостатки. Так, с помощью серологических реакций невозможно выявить больных животных до начала сероконверсии. Описано иммунодефицитное состояние лошадей, при котором вирусоспецифические антитела образуются в количестве, недостаточном для их обнаружения. В этих случаях результаты, полученные иммунологическими методами, будут интерпретированы как ложноотрицательные (12).

Кроме серологических методов, рекомендуется и прямое обнаружение генома вируса ИНАН. Для диагностики заболевания до начала сероконверсии чаще всего используется ПЦР. За рубежом описаны и с успехом применяются различные протоколы на основе ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) (2, 4, 13). Ряд авторов и официальных документов признают молекулярно-генетические методы незаменимыми при ранней диагностике ИНАН (12, 14), также они рекомендованы руководством World Organization for Animal Health (Международное эпизоотическое бюро, Париж) (14).

Особо следует отметить, что своевременная диагностика ИНАН — единственный надежный способ контроля этого заболевания, так как средств для его специфического лечения и профилактики пока не разработано (1, 3).

Целью наших исследований была сравнительная оценка различных методов диагностики инфекционной анемии лошадей при экспериментальном воспроизведении инфекции у восприимчивого животного.

*Методика.* Опыты проводились на базе вивария Всероссийского НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии (ВНИИВВиМ). Для экспериментального заражения животного (жеребенок в возрасте 9 мес) использовали 10 % суспензию селезенки от серопозитивной лошади, вынужденно убитой при вспышке ИНАН в Нижегородской области в 2011 году. Материал вводили внутривенно в объеме 10,0 см<sup>3</sup>. После контрольного заражения ежедневно проводили термометрию и клинический осмотр жеребенка для выявления отклонений от физиологической нормы.

Отбор проб крови выполняли ежедневно с 1-х по 4-е сут после заражения и далее через день по 35-е сут после заражения (срок наблюдения). Сыворотку крови отбирали на 2-е, 7-е, 14-е, 21-е, 28-е, 30-е и 35-е сут после заражения.

Обнаружение РНК вируса ИНАН в образцах биологического материала осуществляли постановкой гнездовой ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией и ОТ-ПЦР в режиме реального времени (15, 16). Гнездовую ОТ-ПЦР проводили на приборе Palm Cycler («Corbett Research», Австралия), ОТ-ПЦР в режиме реального времени — в амплификаторе RotorGene-6000 («Corbett Research», Австралия) в соответствии с инструкцией (15, 16).

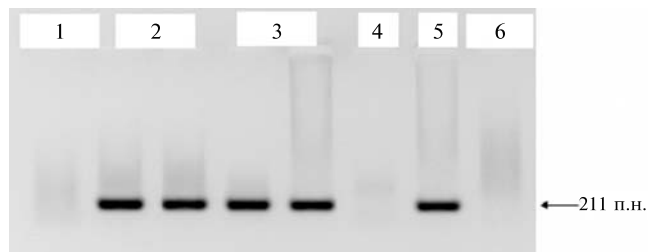
Серологические исследования проводили с использованием коммерческого «Набора для диагностики инфекционной анемии лошадей в реакции диффузионной преципитации» («Щелковский биокомбинат», Россия) и «Тест-системы для выявления антител к вирусу инфекционной анемии лошадей непрямым иммуноферментным методом в сыворотке крови лошадей» («IDvet», Франция) согласно инструкциям производителей.

*Результаты.* Перед началом эксперимента отобрали сыворотку крови восприимчивого животного и проверили ее на наличие антител к вирусу ИНАН. С помощью набора для диагностики инфекционной анемии лошадей в РДП сыворотка была оценена как серонегативная.

В период наблюдения у животного отмечались признаки, харак-

терные для ИНАН: лихорадка, сильная жажда, угнетение, незначительная потеря живой массы. Начиная с 10-х сут после заражения, регистрировали повышение температуры тела выше физиологической нормы. К 15-м сут после контрольного заражения значение этого показателя составило 40,9 °С, после чего началось его снижение до физиологической нормы.

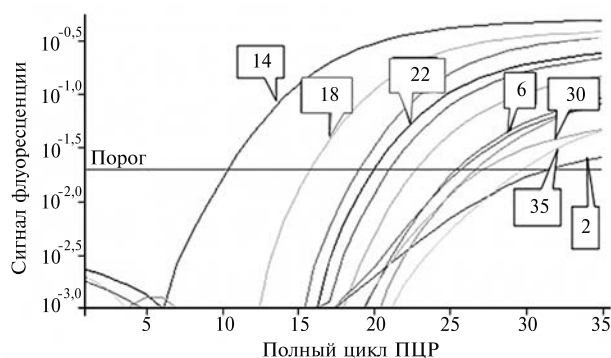
При определении генома вируса в пробах крови применялись тест-системы, разработанные во ВНИИВВиМ. Метод основан на амплификации фрагментов *gag*-гена вируса ИНАН с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров (10, 11).



**Рис. 1.** Результаты амплификации специфического фрагмента генома вируса инфекционной анемии лошадей при исследовании образцов крови экспериментально зараженного жеребенка в возрасте 9 мес при использовании гнездовой ПЦР с этапом обратной транскрипции (ОТ-ПЦР): 1 — 1-е сут после заражения, 2 — 2-е сут

после заражения, 3 — 35-е сут после заражения, 4 — отрицательный контроль реакции, 5 — положительный контроль реакции, 6 — отрицательный контроль амплификации.

При исследовании проб крови, взятой на 2-е сут после инфицирования, получен положительный ответ в гнездовой ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией (рис. 1) и в ОТ-ПЦР в режиме реального времени (рис. 2). Далее геном вируса ИНАН выявлялся с помощью обоих вариантов ПЦР до конца срока наблюдения, составлявшего 35 сут.



**Рис. 2.** Результаты амплификации специфического фрагмента генома вируса инфекционной анемии лошадей при исследовании образцов крови экспериментально зараженного жеребенка в возрасте 9 мес с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени (цифры 2, 6, 14, 18, 22, 30, 35 — время после заражения, сут).

Специфические антитела к вирусу ИНАН с помощью набора для диагностики инфекционной анемии лошадей в РДП обнаруживали, начиная с 30-х сут после заражения, при использовании тест-системы для выявления антител к вирусу ИНАН непрямым ИФА — с 21-х сут после заражения и до конца эксперимента. Это согласуется с данными литературы о том, что специфические антитела начинают вырабатываться и достигают концентраций, необходимых для выявления серологическими методами, лишь на 14-35-е сут (3).

Таким образом, проведенные исследования подтверждают, что ПЦР можно эффективно применять в качестве специфичного экспресс-метода для выявления генома вируса ИНАН в период до начала сероконверсии с последующей верификацией с помощью других лабораторно-диагностических методов. Полученные данные свидетельствуют об эффективности использования ПЦР при детекции вируса ИНАН, начиная уже со 2-х сут после заражения животного.

## EXPERIENCE OF USING SEROLOGICAL AND MOLECULAR TESTS TO DETECT EQUINE INFECTIOUS ANEMIA VIRUS IN HORSE

N.N. Gerasimova, O.L. Kolbasova, S.Zh. Tsybanov, A.V. Lunitsin, D.V. Kolbasov

All-Russian Institute of Veterinary Virology and Microbiology, Russian Academy of Agricultural Sciences,  
Pokrov, Petushinskii Region, Vladimir Province, 601120 Russia, e-mail gerasimova-nadya-88@yandex.ru,  
vniivvim@niiv.petush.elcom.ru

Received March 31, 2014

doi: 10.15389/agrobiologia.2014.6.81eng

### Abstract

Equine infectious anemia in horses is caused by equine infectious anemia virus (EIAV, *Lentivirus*, *Retroviridae*), affecting hematopoietic organs. The symptoms of the disease are relapsing or continued fever, anemia and a disturbance of cardiovascular functions. Duly virus detection is the only effective way to control infection. Serological methods used to indicate EIAV have some limitations. For instance, they did not allow identifying infected animals prior to seroconversion. Also an immunodeficiency can really occur when the content of virus specific antibodies is too low to be indicated. Here we report the results of comparative study of different serological and molecular techniques for diagnosis of equine infectious anemia in experimentally inoculated susceptible 9 month old foal. In the experiment, there were used the kits for agar gel immunodiffusion assay (Russia) and ELISA (France) as serological tests, and our own developed test-systems for viral RNA detection by nested reverse transcription polymerase chain reaction with electrophoretic control and by real-time RT-PCR. Developed PCR-tests is based on amplification of EIAV *gag*-gene fragment using specific oligonucleotide primers. In blood, the viral RNA were detected by both test-systems from 2 days after animal inoculation until the end of observation at day 35. Specific antibodies were detected in diffuse precipitation reaction from 30 day and in ELISA from day 21 after animal inoculation. Thus, PCR-analysis could be used as an express test for detecting EIAV genome prior to seroconversion, and then other diagnostic methods should be further applied to verify the RCR data. The developed Russian test-systems and investigation techniques confirm the benefits of the PCR diagnosis in the early stages of the EIA.

Keywords: equine infectious anemia, experimental infection, PCR, serodiagnostics.

### REFERENCES

1. Arkhipov N.I., Bakulov I.A., Sokovykh L.I. *Medlennye infektsii zhivotnykh* [Slow infections of animals]. Moscow, 1987.
2. Yurov K.P., Alekseenkova S.V., Yurov G.K., Yarnykh E.V. *Metodicheskie rekomendatsii po bor'be s infektsionnoi anemiey loshadei* [Recommendations on control of equine infectious anemia]. Moscow, 2010.
3. Yurov K.P., Zablotskii V.T., Kosminkov N.E. *Virusnye bolezni loshadei* [Viral diseases of horses]. Moscow, 2010.
4. Nagarajan M.M., Simard C. Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, 2001, 94: 97-109 (doi: 10.1016/S0166-0934(01)00283-X).
5. Tashjian R.J. Transmission and clinical evaluation of an equine infectious anemia herd and their offspring over a 13-year period. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1984, 184(3): 282-288.
6. Spyrou V., Papanastassopoulou M., Psychas V., Billinis Ch., Koumbati M., Vlemmas J., Koptopoulos G. Equine infectious anemia in mules: virus isolation and pathogenicity studies. *Vet. Microbiol.*, 2003, 95(1-2): 49-59 (doi: 10.1016/S0378-1135(03)00151-2).
7. Bicout D.J., Carvalho R., Chalvet-Monfray K., Sabatier P. Distribution of equine infectious anemia in horses in the north of Minas Gerais State, Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2006, 18(5): 479-482 (doi: 10.1177/104063870601800511).
8. More S.J., Aznar I., Myers T., Leadon D.P., Clegg A. An outbreak of equine infectious anaemia in Ireland during 2006: the modes of transmission and spread in the Kildare cluster. *Equine Vet. J.*, 2008, 40(7): 709-711 (doi: 10.2746/042516408X363297).
9. Brangan P., Bailey D.C., Larkin J.F., Myers T., More S.J. Management of the national programme to eradicate equine infectious anaemia from Ireland during 2006: a review. *Equine Vet. J.*, 2008, 40(7): 702-704 (doi: 10.2746/042516408X363314).
10. Cook S.J., Cook R.F., Montelaro R.C., Issel C.J. Differential responses of *Equus*

- caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. *Vet. Microbiol.*, 2001, 79(2): 93-109 (doi: 10.1016/S0378-1135(00)00348-5).
11. Coggins L., Norcross N.L., Nusbaum S.R. Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. *Am. J. Vet. Res.*, 1972, 33: 11-18.
  12. Alekseenkova S.V., Yurov G.K., Yurov K.P. *Rossiiskii veterinarnyi zhurnal*, 2011, 3: 37-39.
  13. Cook R.F., Cook S.J., Li F., Montelaro R.C., Issel C.J. Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV). *J. Virol. Methods*, 2002, 105: 171-179 (doi: 10.1016/S0166-0934(02)00101-5).
  14. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.5.6. Equine infectious anemia* ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.05.06\\_EIA-2013](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.06_EIA-2013)).
  15. Gerasimova N.N., Baryshnikova E.I., Kolbasova O.L., Tsybanov S.Zh. *Metodicheskie polozheniya po vyyavleniyu genoma virusa bolezni infektsionnoi anemii loshadei metodom gnezdovoi OT-PTSR* [Methodical guidance on detection of equine infectious anemia virus genome by nested RT-PCR]. Pokrov, 2012.
  16. Gerasimova N.N., Panferova A.V., Kolbasova O.L., Tsybanov S.Zh. *Metodicheskie polozheniya po vyyavleniyu RNK i pDNK virusa infektsionnoi anemii loshadei metodom OT-PTSR v rezhime real'nogo vremeni* [Methodical guidance on detection of RNA and pDNA of equine infectious anemia virus by real time RT-PCR]. Pokrov, 2013.