Animal & Plant Health Agency

Обнаружение вирусных заболеваний лошадей -

Аспекты отбора проб

Обучение лабораторным методам исследования болезней лошадей
29 – 30 ноября 2021 года

Фалько Стейнбэк

**Группа вирусологии млекопитающих,
APHA, Вейбридж, Великобритания**

Animal & Plant Health Agency

Агентство по охране здоровья животных и растений APHA

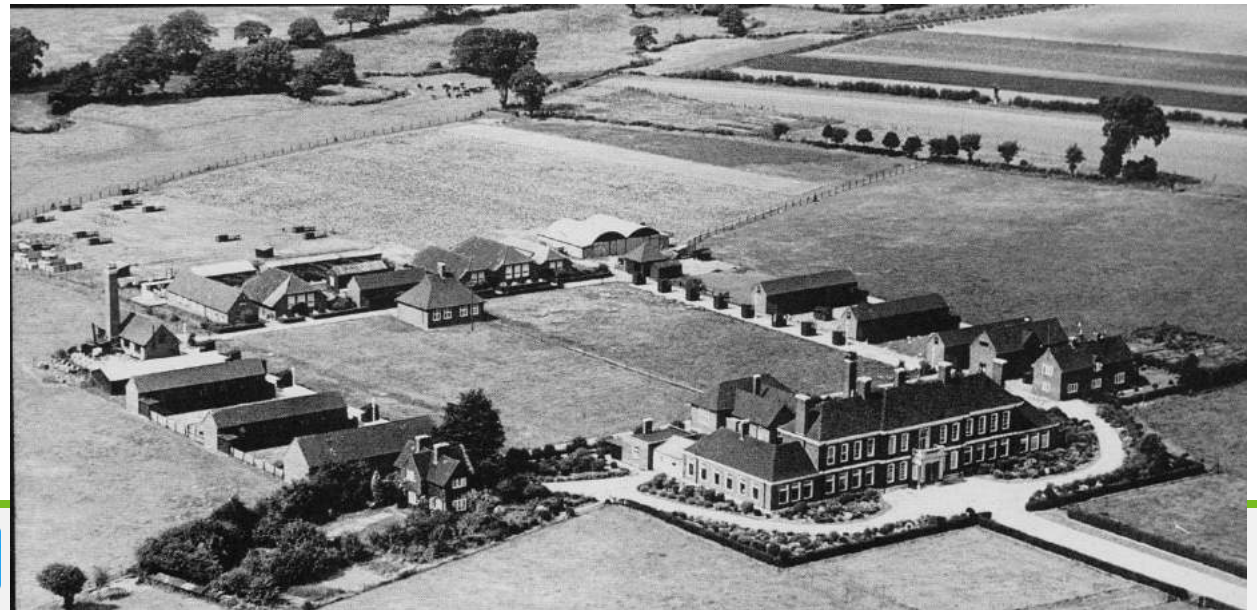
Animal & Plant Health Agency

Краткая история APHA

1917 - Открывается Институт Аддлстоуна
1922 - Создана Служба ветеринарных расследований (CBP/VIS)
1990 - Открыта Центральная ветеринарная лаборатория (ЦВЛ/CVL)
1995 – Создано Агентство ветеринарных лабораторий (АВЛ/VLA)
теперь включает «региональные лаборатории»

2011 **- Создано агентство AHVLA после слияния АВЛ и агентства по охране агентства здоровья животных**

2014 – APHA - после слияния AHVLA и FERA

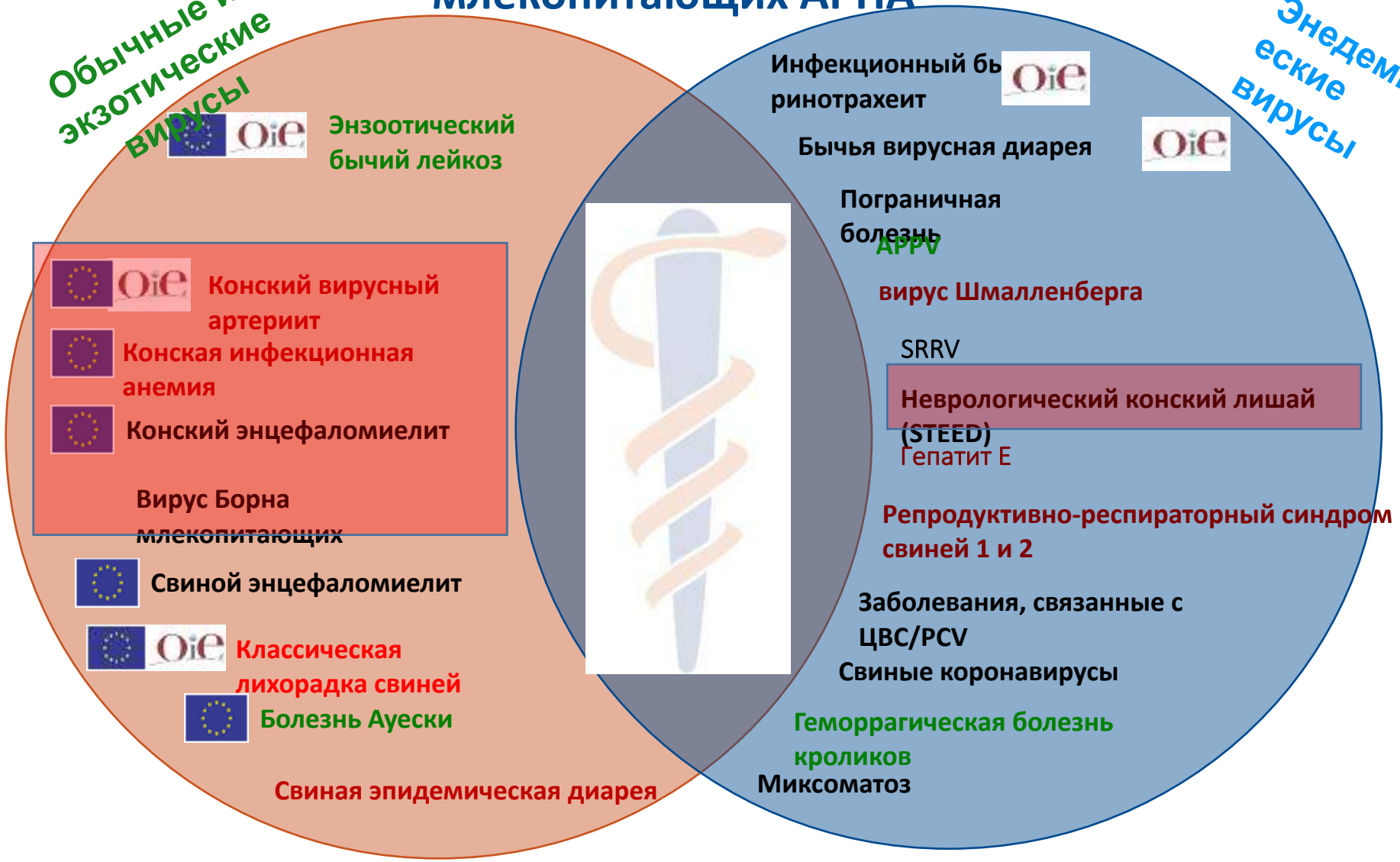


Animal & Plant Health Agency

- Специализированные ведомства для:
  - **Научной работы**
  - Исследований животных
  - Крупномасштабных тестов
  - Производство реагентов и продуктов

Animal & Plant Health Agency

Вирусология млекопитающих APHA



Animal & Plant Health Agency

Лошади имеют собственные заболевания, но также являются переносчиками зоонозных инфекций

- **Вирусные заболевания**
  - Вирус Западного Нила
  - Бешенство
  - Вирус везикулярного стоматита
  - Вирусы энцефалита лошадей (VEEV, EEE, WEE)
  - Вирус болезни Борна

  - Вирусный артериит лошадей (EVA)
  - Вирус инфекционной анемии лошадей
  - Грипп лошадей
  - Ринопневмонит лошадей (EHV-1/-4)
  - Вирус африканской болезни лошадей
  - Лошадиная оспа

- **Бактериальные заболевания**
  - Burkholderia mallei (мыт)
  - Bacillus antracis
  - Taylorella equigenitalis (CEM/Контагиозный конский метрит)

- **паразитарные болезни**
  - Trypanosoma equiperdum (Подседал)
  - Trypanosoma evansi (Surra); [DD T. brucei]
  - Theileria equi (Пироплазмоз)
  - Babesia caballi (Пироплазмоз)

Animal & Plant Health Agency

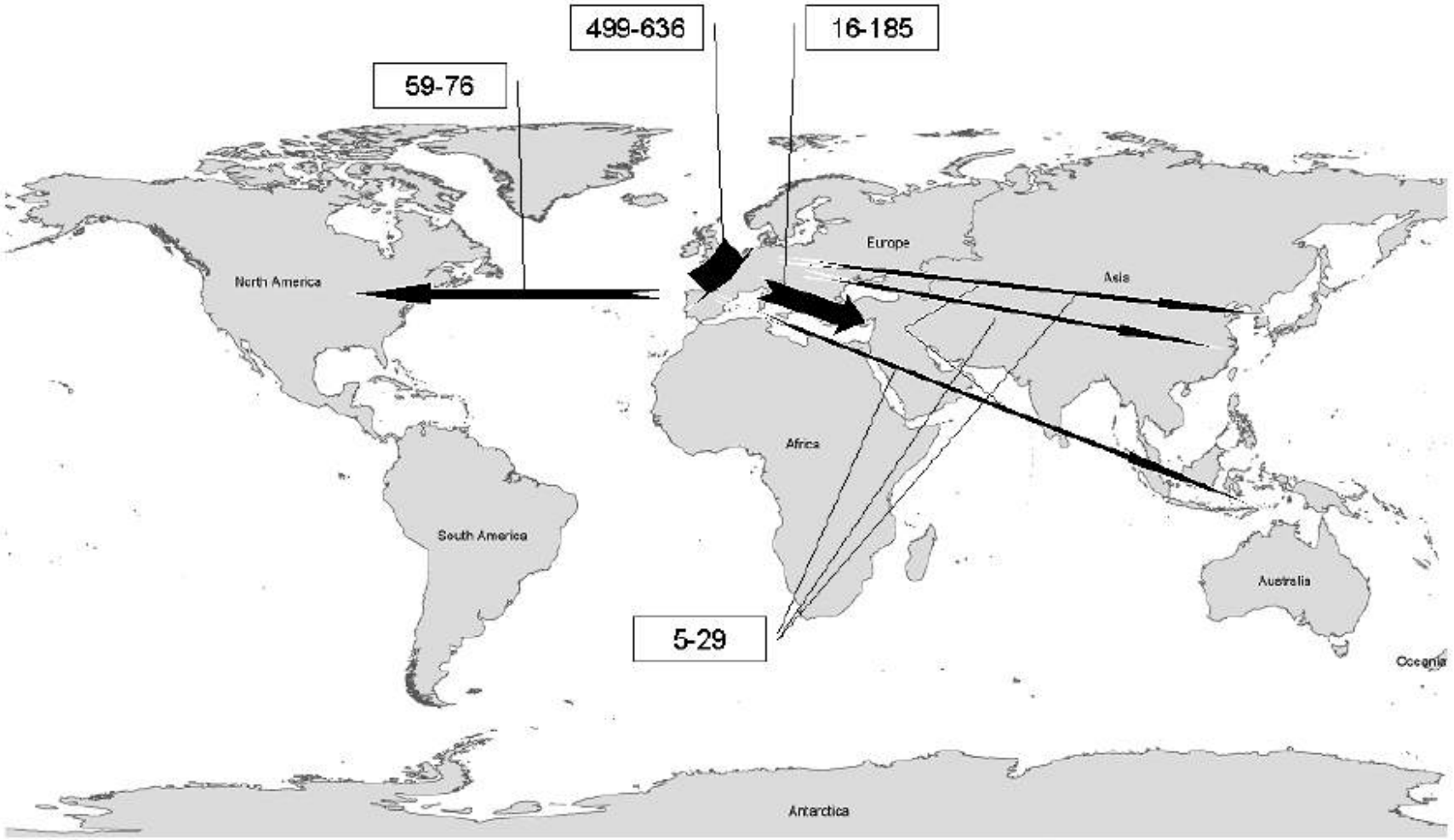


Fig 2: Worldwide movements of racehorses between 2001 and 2006. The figure shows the range of the number of movements during that time period, the thickness of the arrows indicate the number of movements in 2006.

Herholz et al., EVJ, 2008

Animal & Plant Health Agency

Ни одно другое живое животное не путешествует так много и далеко, как лошади.

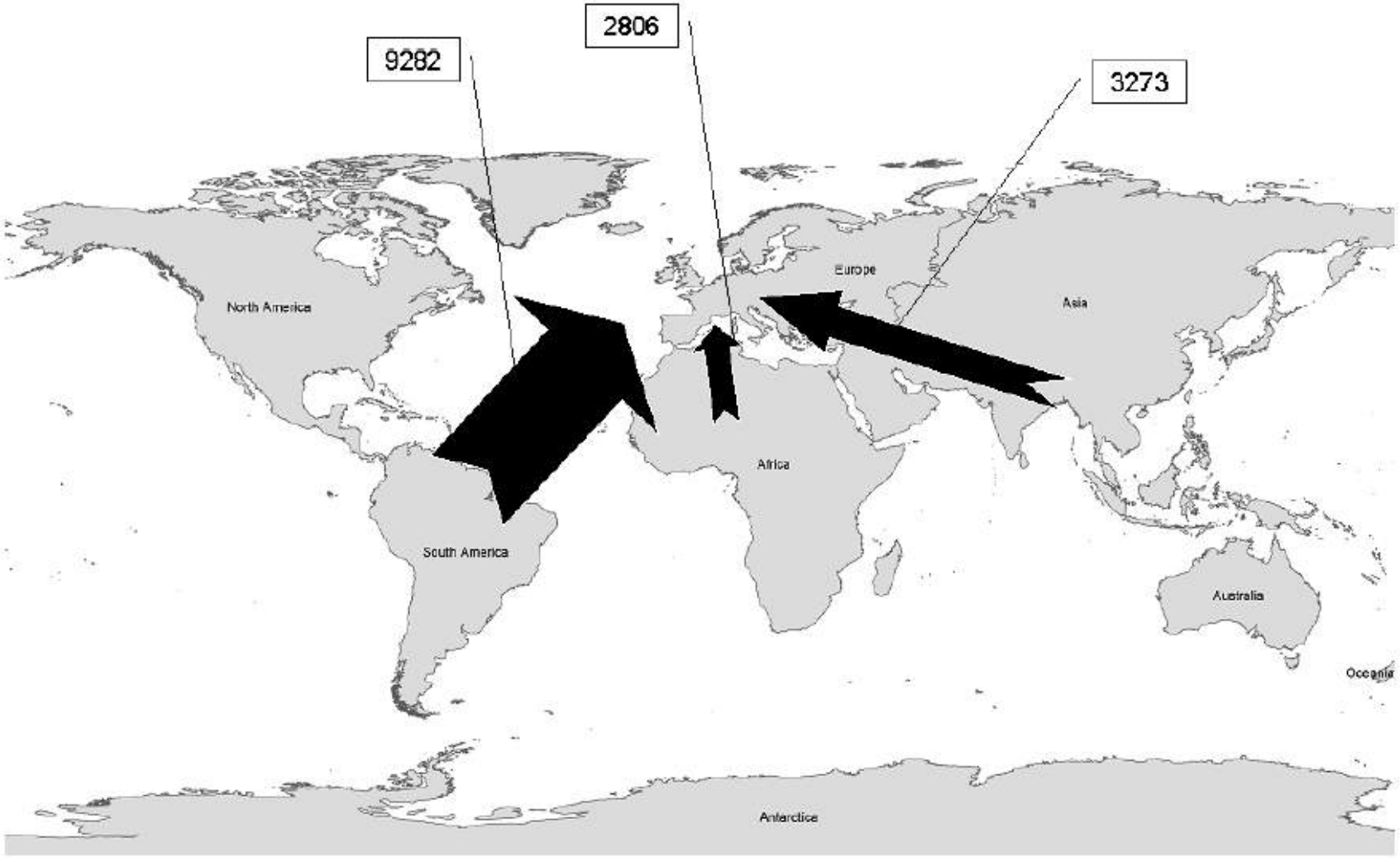
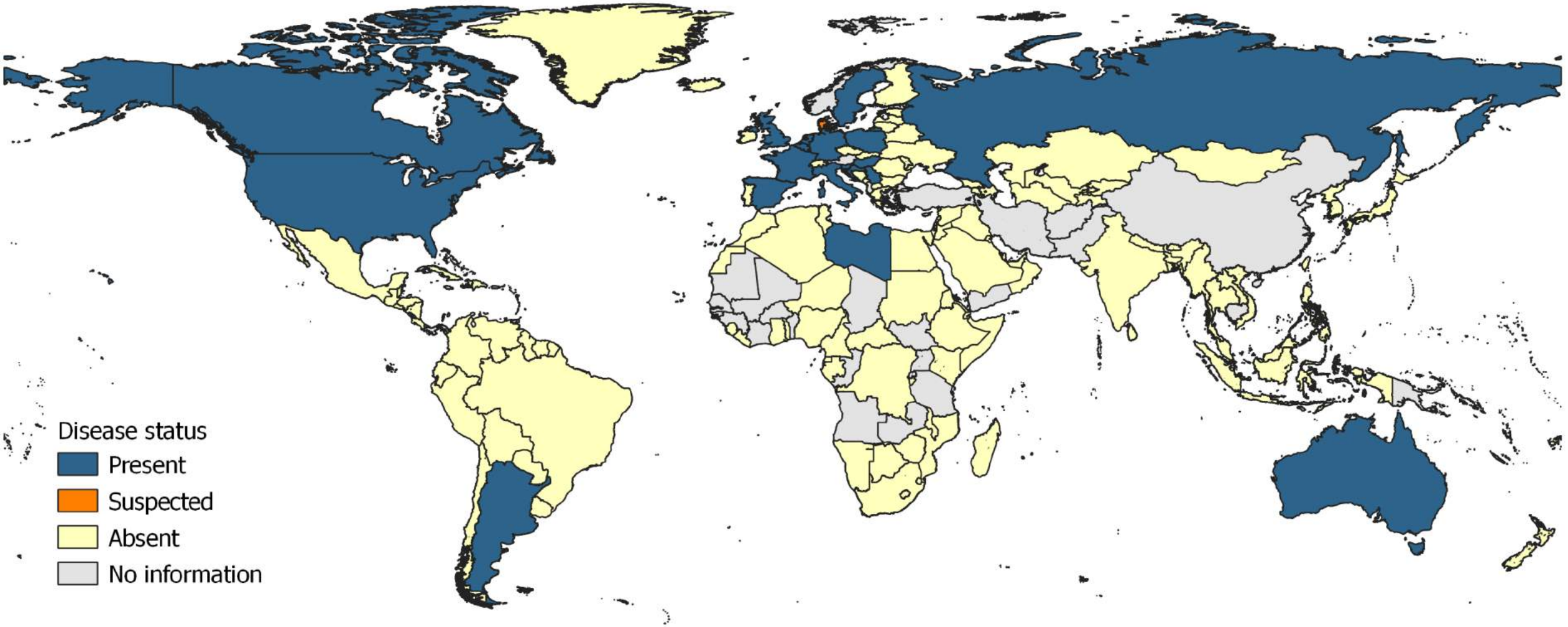


Fig 3: Movement of horses from Africa, Asia and South America to Europe. The figures and the thickness of the arrows represent the sum of movements during that time period (TRACES data from 2004 to summer 2007, Table 3).

Animal & Plant Health Agency

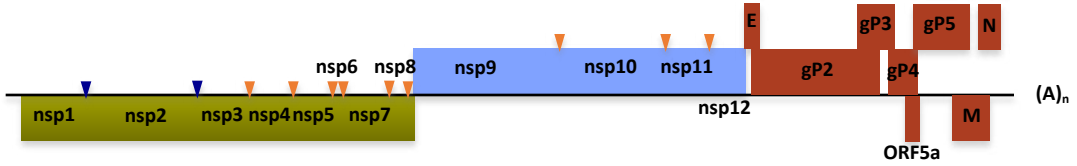
EAV (Вирусный артериит лошадей) 2016-2020



Вирус конского артериита (Nidovirales)

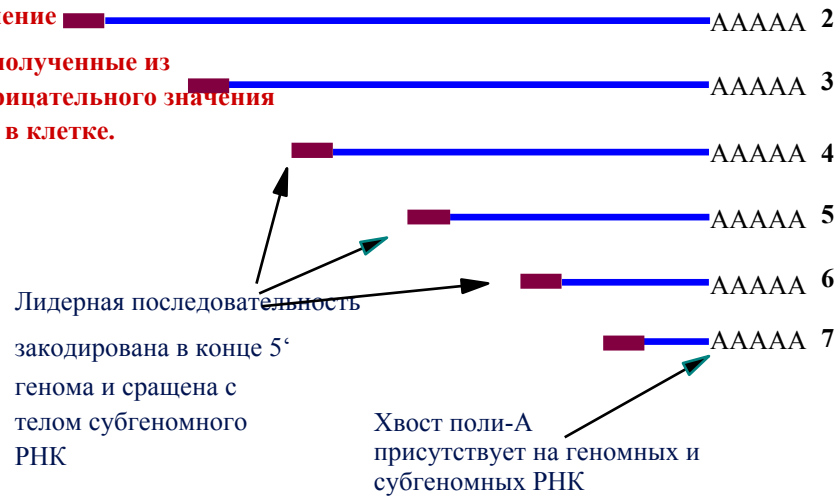
Геномная РНК

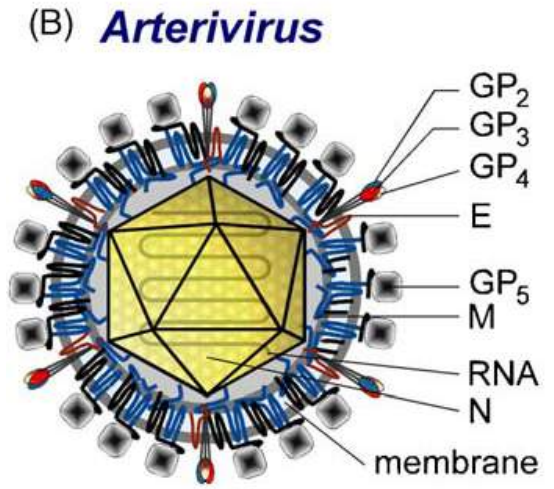
положительное направление, приблиз. 12.7kB



Положительное значение

Субгеномные РНК, полученные из промежуточного, отрицательного значения РНК, синтезируемая в клетке.





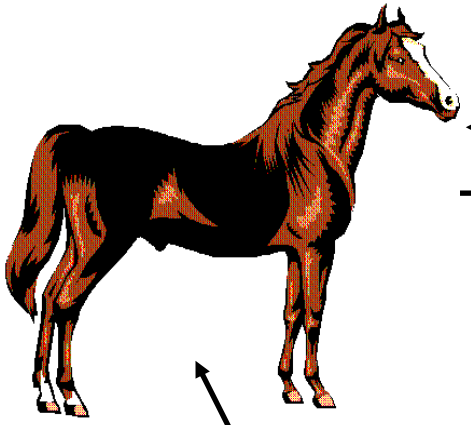
Связанные с вирусом PPCC/PRRSV

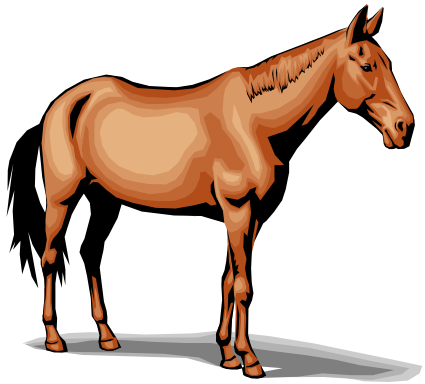
Animal & Plant Health Agency

Клиническая картина и регулирование в Великобритании

- **Инкубация ≈ 7 дней - без признаков**
- **Признаки значительно различаются - больше у старых и молодых**
  - **Лихорадка**
  - **Отек**
    - **ноги, грудина, мошонка/молочная железа, челюсть, периорбитальная область**
    - **кожные бляшки с крапивницей**
    - **тяжелый двусторонний конъюнктивит и слезотечение**
  - **Инфекция верхних дыхательных путей**
  - **Депрессия/анорексия**
  - **Кожная сыпь, в основном на шее**
  - **Аборт**
  - **Смерть молодых, старых и животных с ослабленным иммунитетом**
- **Информация о подозрениях на клинический случай или животных-носителей (жеребцов) доводится до сведения властей**

Animal & Plant Health Agency





Пути передачи

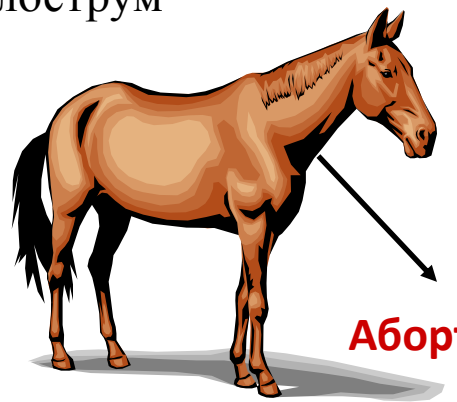
искусственный или естественный

Стойкость

Может быть транзиторным или на протяжении всей жизни

Кобыла выделяет большое количество вируса - дыхательные пути, моча, колострум

Через дыхательные пути



Аборт

Animal & Plant Health Agency

B. DIAGNOSTIC TECHNIQUES

OIE

Table 1. Test methods available for the diagnosis of equine viral arteritis and their purpose

Method	Purpose					
	Population freedom from infection	Individual animal freedom from infection	Efficiency of eradication policies	Confirmation of clinical cases	Prevalence of infection - surveillance	Immune status in individual animals or populations post-vaccination
Virus isolation	–	+++	–	+++	–	–
Agar gel immunodiffusion	–	–	–	–	–	–
Complement fixation	–	–	–	+++	–	–
Enzyme-linked immunosorbent assay	+	++	+	++	+++	+
Polymerase chain reaction	–	+++	–	+++	–	–
Virus neutralisation	+	+++	+	+++	+++	+++

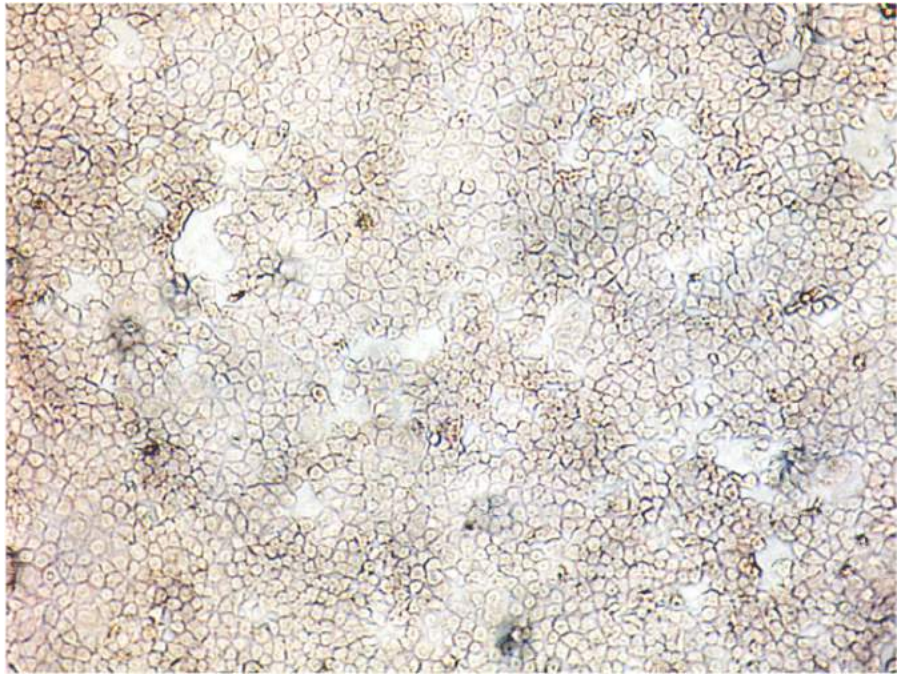
Key: +++ = recommended method; ++ = suitable method; + = may be used in some situations, but cost, reliability, or other factors severely limits its application; – = not appropriate for this purpose.

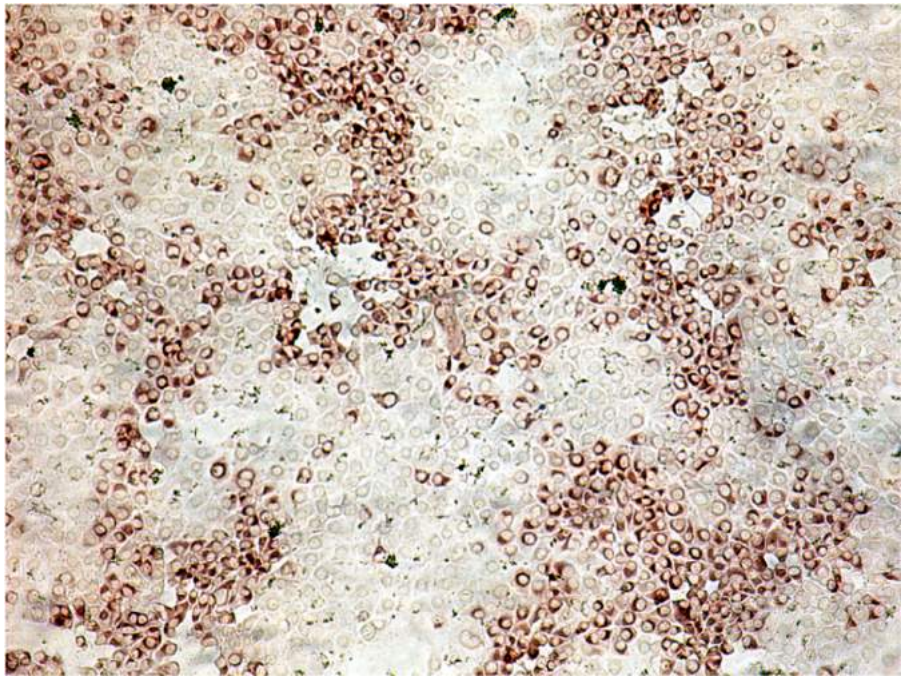
Although not all of the tests listed as category +++ or ++ have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable.

Руководство по наземным животным

Animal & Plant Health Agency

Методы, применяемые для исследований EVA





Выделение вируса (RK-13)

Animal & Plant Health Agency

Великобритания 2011 (62)

- **Ввезен из континента примерно ~3 года назад**
- **Протестирован до разведения**
  - **SNT 1:4096**
- **VI отрицательный**
- **PCR/qPCR положительный**
  - **ORF 1; -5; -7**

- анализ спермы на наличие nAbs
  - Включает инактивацию (вируса) и отрицательную контрольную сперму для удаления из-за ингибирующих факторов

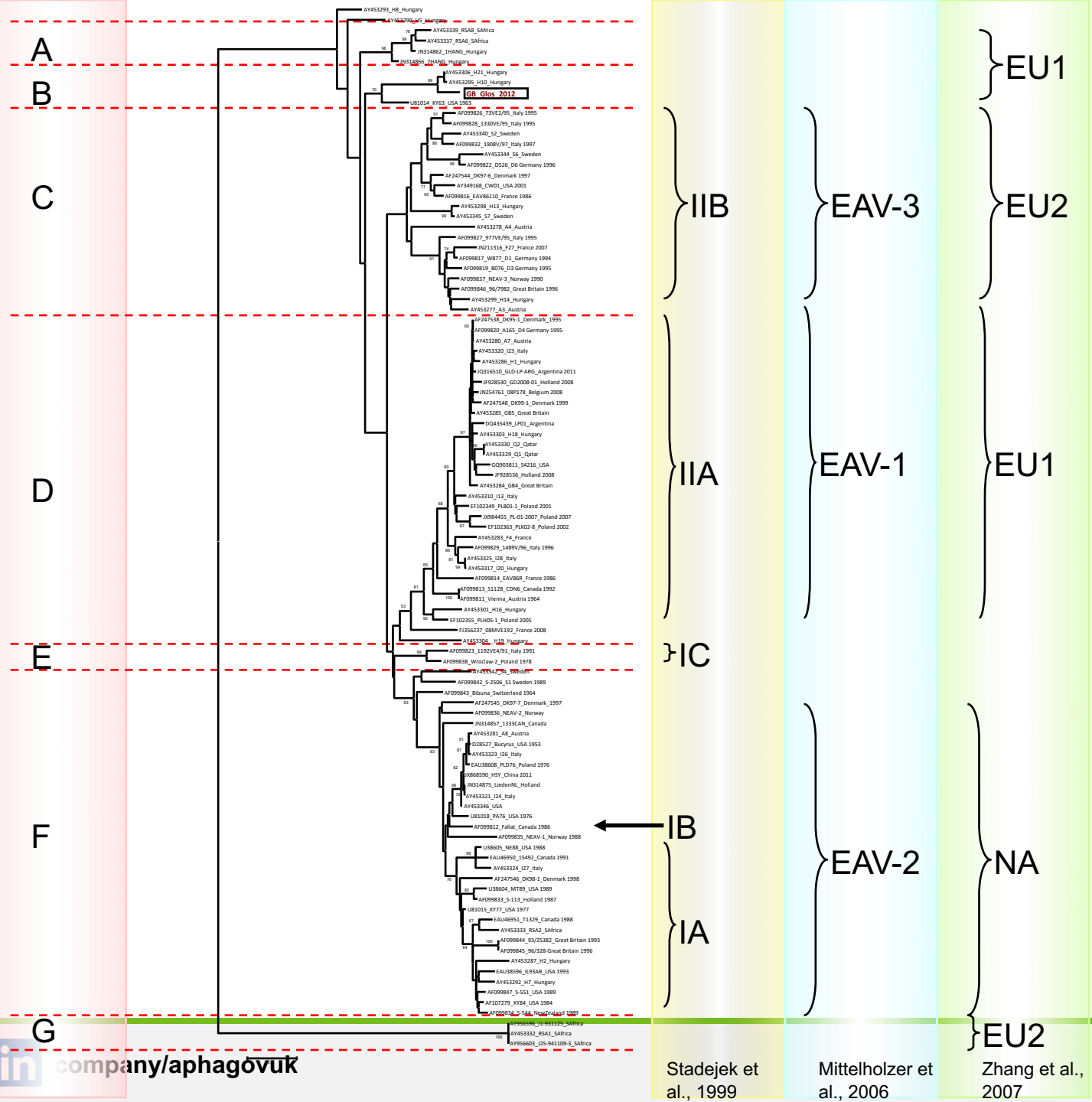
Animal & Plant Health Agency

nAbs в сперме - не уникальное явление

Лошадь	Сыворотка VN-титр	Сперма VN-титр
1715	>2048	64
No2 2010	3072	32
62/167	4096	256

Animal & Plant Health Agency

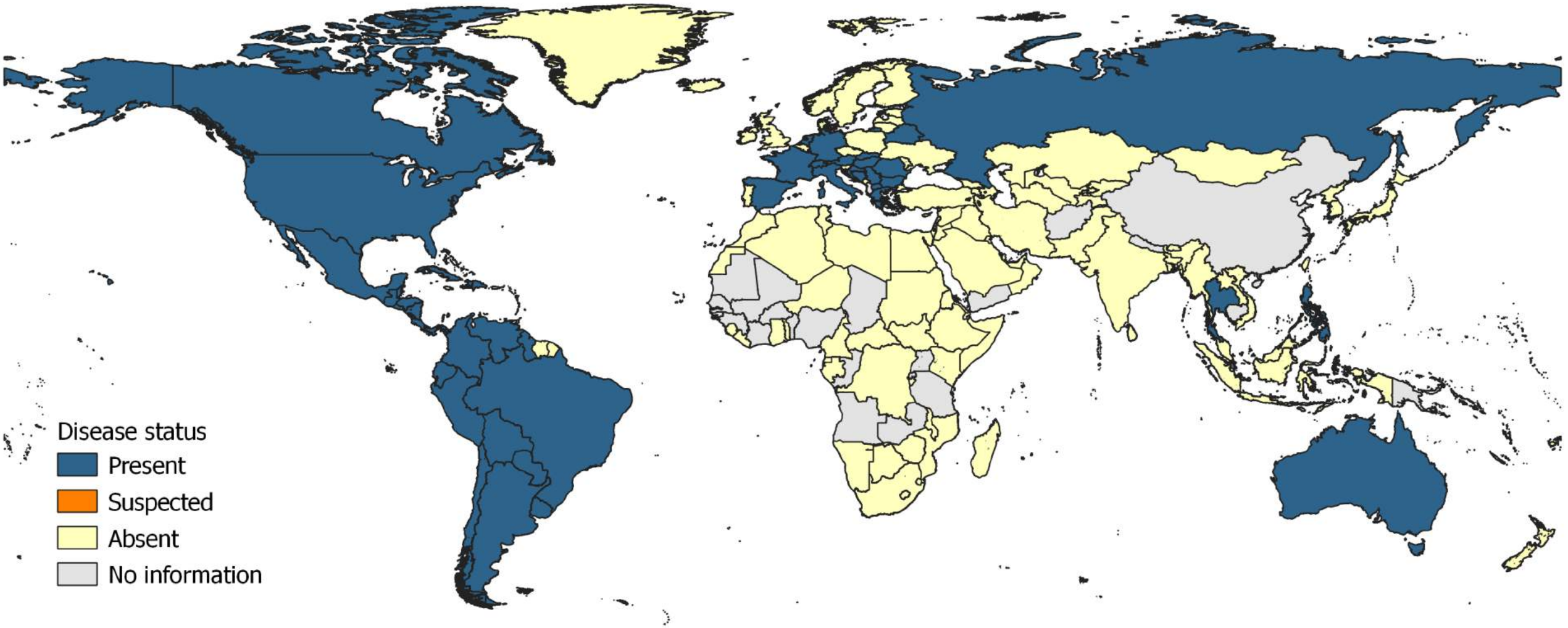
ORF5



Steinbach F, et al. (2015)
Virus research, **202**: 144-150
doi.org/10.1016/j.virusres.2014.12.009

Animal & Plant Health Agency

EIA (инфекционная анемия лошадей) 2016-2020



Animal & Plant Health Agency

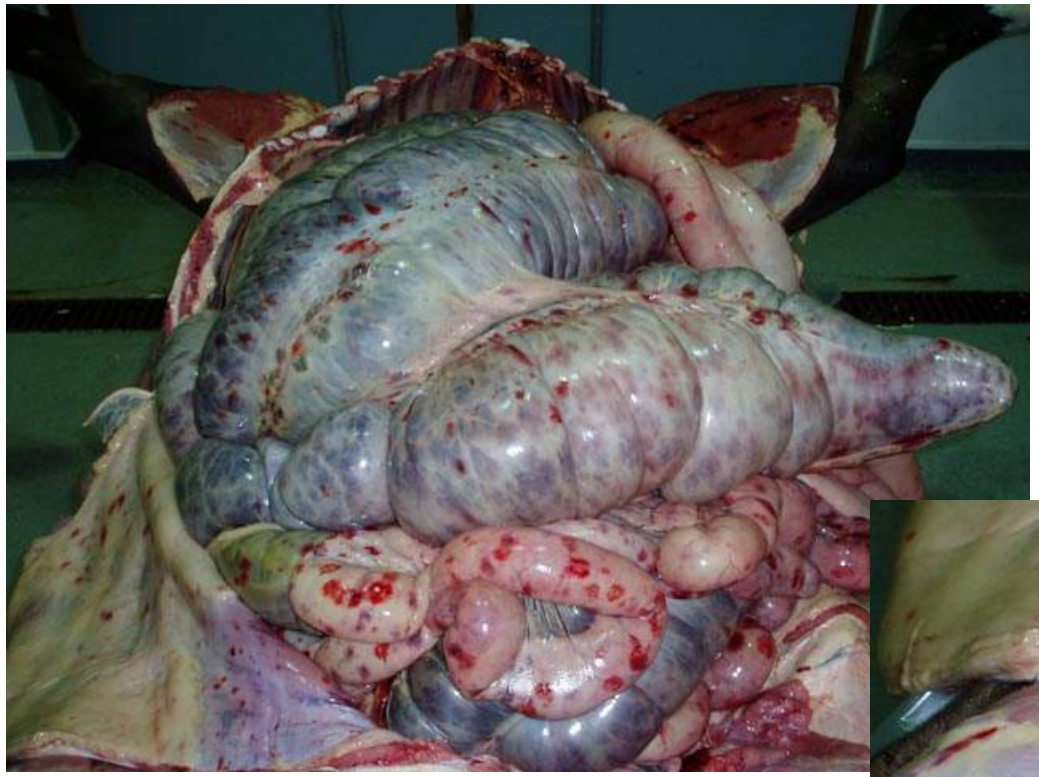
Заболевание:

- **Инфекционное и потенциально смертельное (только для лошадей) вирусное заболевание для лошадиных (лошади, ослы, мулы).**
- Повышенная распространенность в теплой влажной среде.
- Торранс (Канада) ввел термин **«болотная лихорадка»** в 1903 г.
- **Острые, хронические** и скрытые формы

Баки - 35-летний (2006 г.) мерин с положительной реакцией на инфекционную анемию лошадей (EIA), который с 1984 года живет на ферме Малден-Брук в Уэст-Бойлстоне, штат Массачусетс.

Animal & Plant Health Agency

Результаты вскрытия

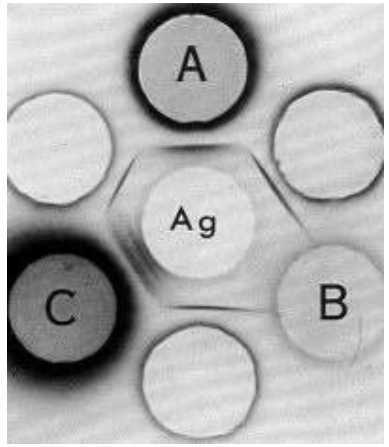


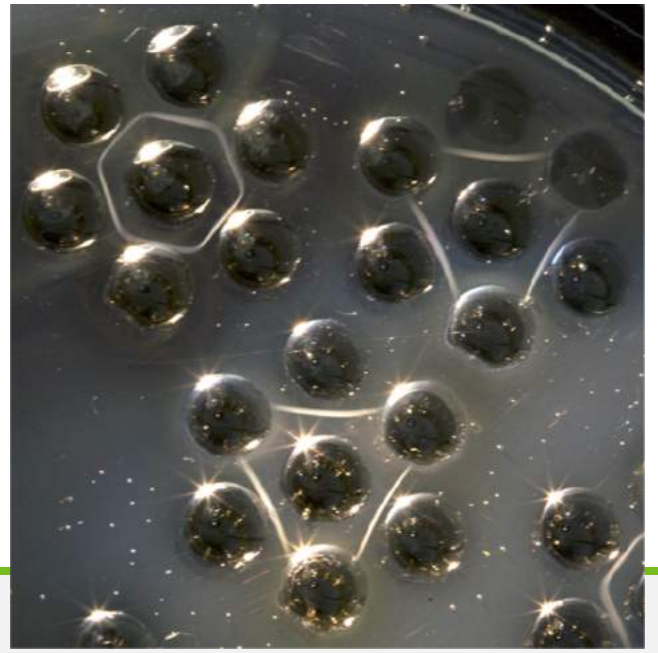
Пример из Германии, 2006 г.

Animal & Plant Health Agency

Лабораторные тесты

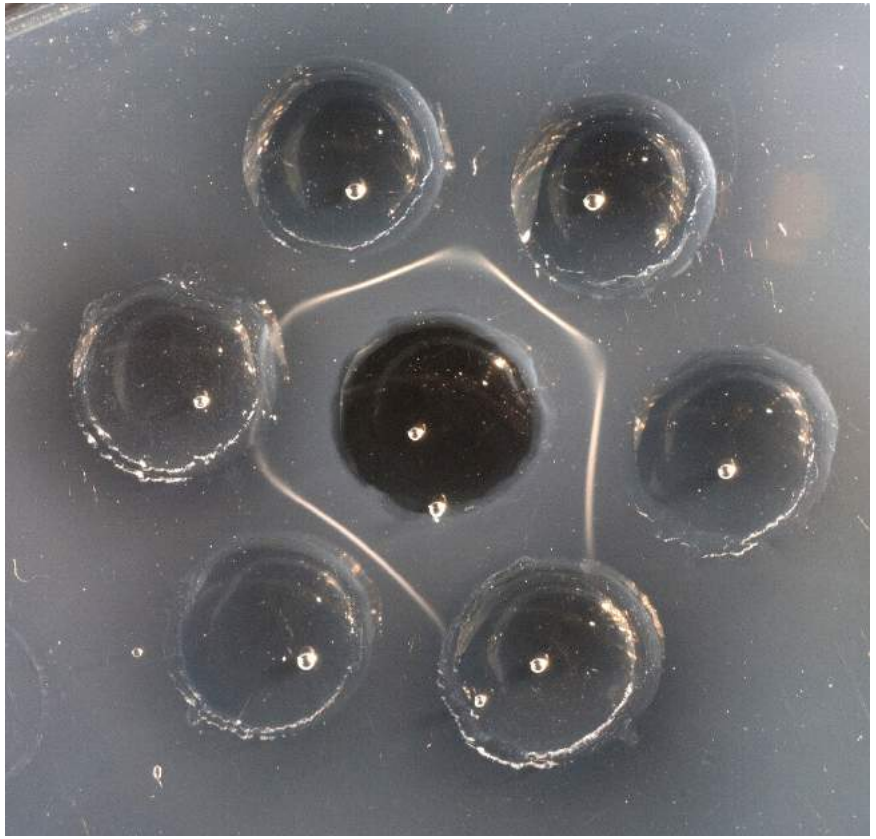
- Тест **Коггинса** -
  старый, безопасный, запоздалый, отнимающий много времени
- **ИФА -** некоторые валидированы
- **Вестерн-блот -** необходимое дополнение
- **ПЦР** - интересная проблема

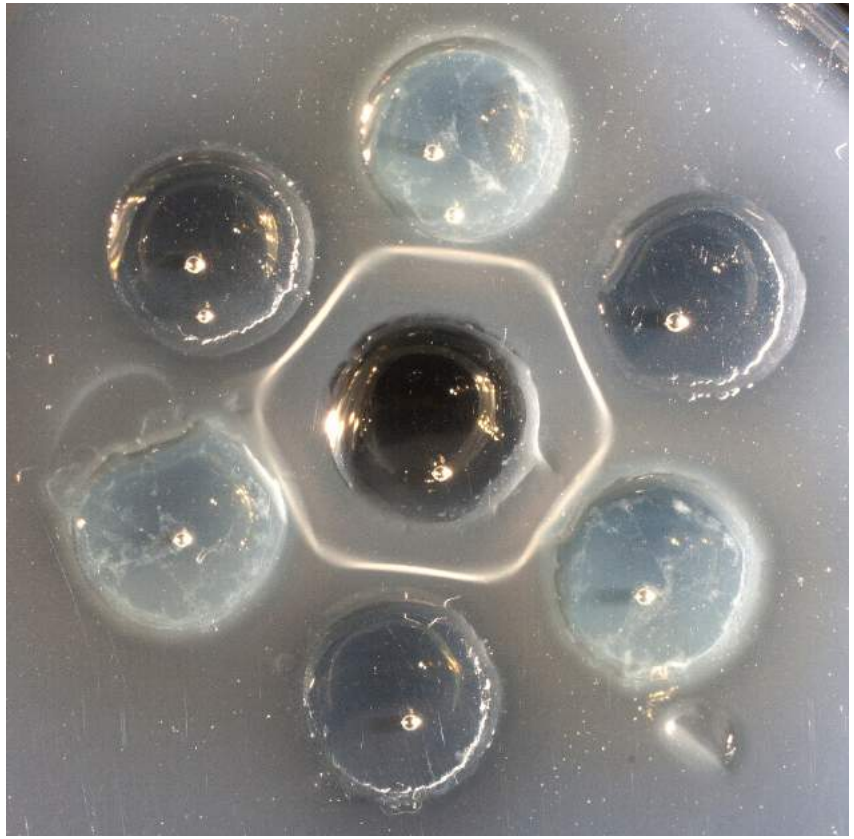




Animal & Plant Health Agency

Коггинс





контрольный **случай**

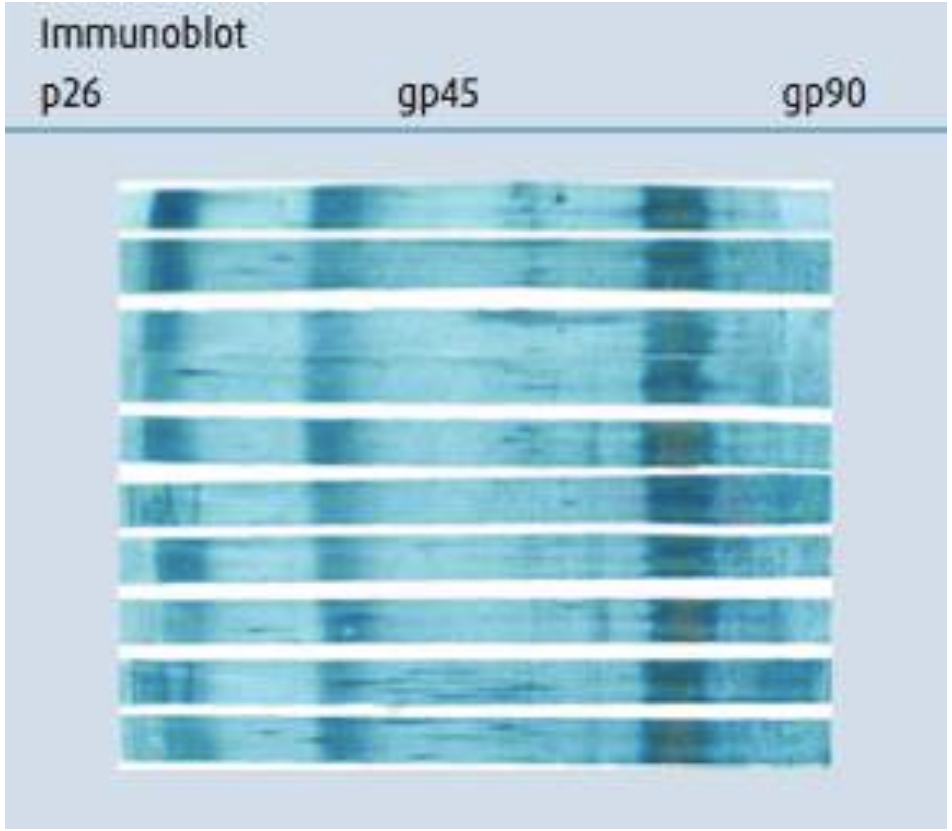
Animal & Plant Health Agency

Иммуноферментный анализ (ELISA):

- Несколько ИФА в настоящее время одобрены различными национальными органами США и Европы и доступны на международном уровне. Например:
  - Конкурентный ИФА и неконкурентный anti-p26 Abs.
  - В другом неконкурентном ИФА используются антигены p26 core и gp45 (вирусный трансмембранный белок).
- Положительный результат ИФА должен быть подтвержден с помощью теста AGID поскольку были отмечены отдельные ложноположительные результаты при использовании ИФА.
- При наличии расхождений между двумя методами результаты также могут быть подтверждены методом иммуноблота

Animal & Plant Health Agency

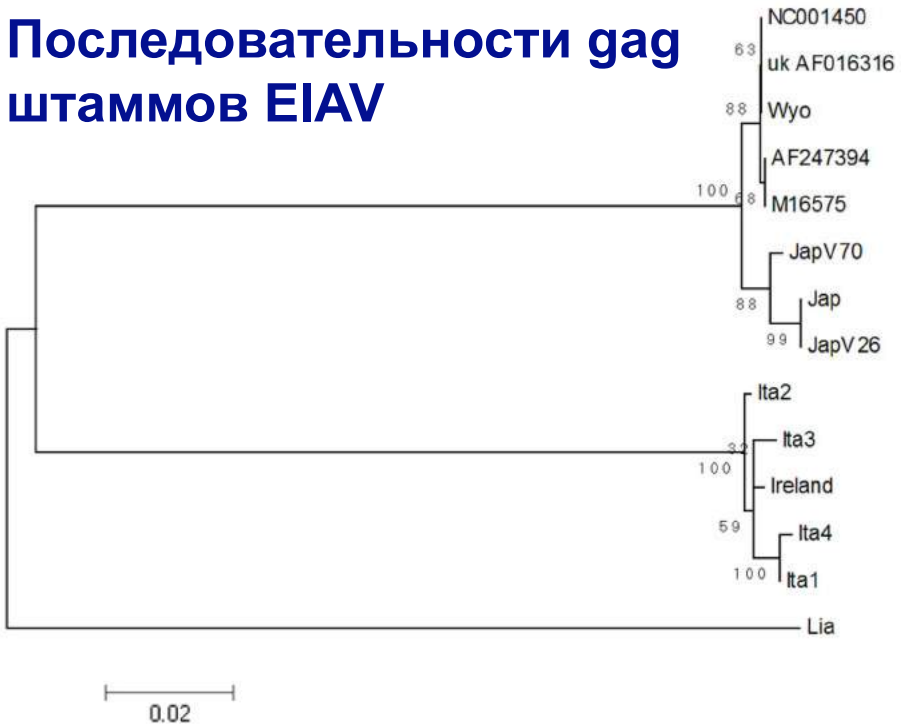
Иммуноблот



Animal & Plant Health Agency

Генетическое разнообразие

Последовательности gag штаммов EIAV



Долгосрочные не прогрессирующие (LTNPs) ВИЧ

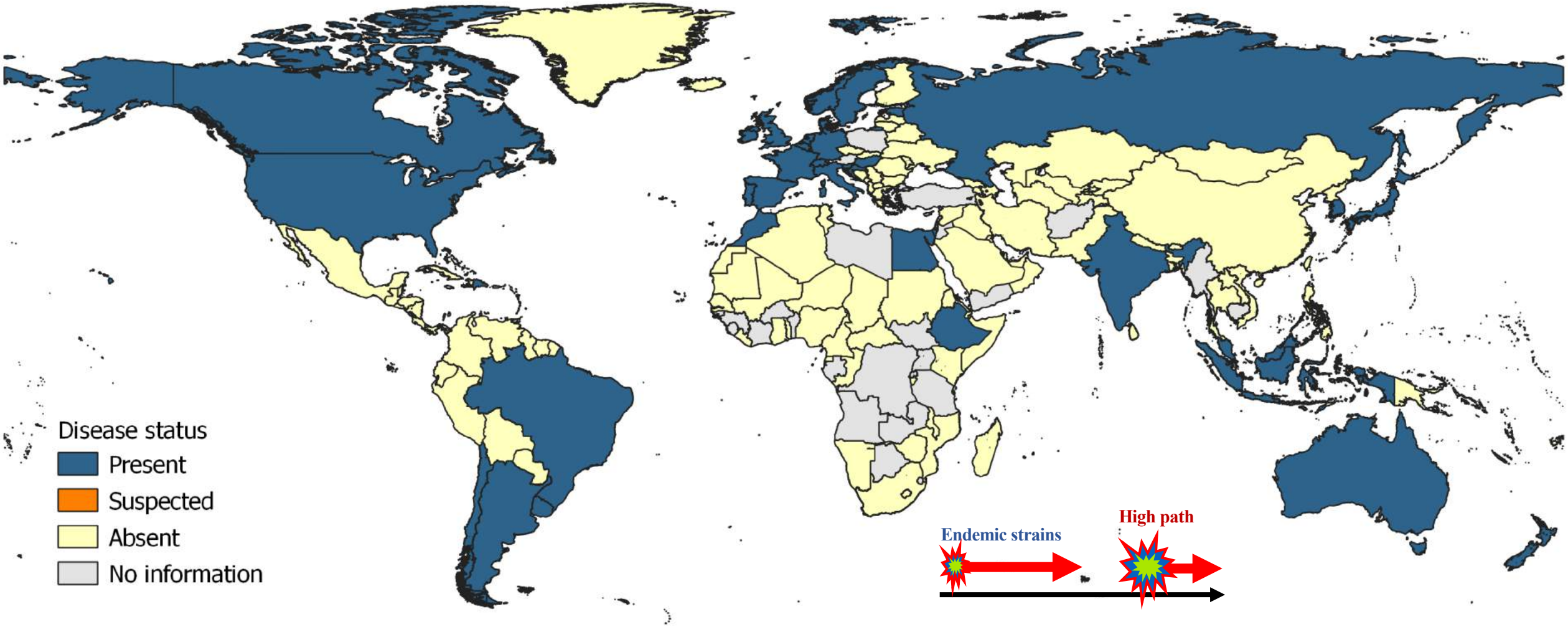
Виремичные контролеры имеют низкую, но легко измеряемую вирусную нагрузку

Элитные контроллеры подавляют до крайне низких уровней

Уровень обнаружения должен быть очень низким ……

Animal & Plant Health Agency

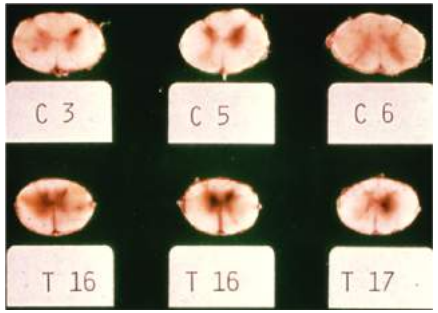
EHV-1 (вирус конского герпеса) 2016-2020



Animal & Plant Health Agency

Нейротропная инфекция EHV-1

Миелоэнцефалопатия вируса герпеса лошадей



Тяжесть клинических признаков различна

инкоординация задних конечностей до квадриплегии - паралича

- задержка мочи и кала
- потеря чувствительности в области промежности и хвоста

Чоудхури и др., 1986 г.
Вызванные герпесвирусом лошади типа 1 (EHV-1) аборты и параличи на племенной ферме липиццанеров. Событие, которое угрожало гибелью разведению липиццанеров в Австрии (1983)
30 случаев абортов и перинатальной смертности на племенной ферме липиццанеров в Австрии 10 кобыл умерли после того, как у них проявились нарушения центральной нервной системы, атаксия и паралич
2007:
ВИРУС ГЕРПЕСА ЛОШАДЕЙ (ВГЛ) УБИВАЕТ 40 ЛУЧШИХ ПОЛО-ПОНИ В НИГЕРИИ!
2021
Вспышка EHV-1 на соревнованиях по конкуру в Испании унесла жизни нескольких животных и нарушила календарь соревнований Международной федерации конного спорта (FEI)

Animal & Plant Health Agency

В ряде публикаций было высказано предположение, что одноточечная мутация в ДНК-полимеразе (ORF30) герпесвируса лошадей 1 (EHV-1) определяет нейровирулентность

Nugent et al., Журнал вирусологии, апрель 2006, стр. 4047–4060

Анализ вариаций штаммов герпесвируса лошадей 1 выявил точечную мутацию ДНК-полимеразы, тесно связанную со вспышками нейропатогенных и ненейропатогенных заболеваний

Гипотеза: Было высказано предположение, что в поле циркулируют различные штаммы EHV-1, отличающиеся по патогенной способности. Для изучения этой гипотезы необходимо было выявить генетические маркеры, позволяющие идентифицировать подгруппы родственных штаммов

Результаты Результаты показывают [А] существование нескольких основных генетических подгрупп EHV-1 ....., что соответствует предложению о циркуляции различных штаммов EHV-1 в полевых условиях. . [Б] что некоторые группы штаммов географически ограничены, и их выделяют преимущественно из ..... Северной Америки или Европы. .....

[В] вариации одной аминокислоты ДНК-полимеразы сильно связаны со вспышками неврологических и не неврологических заболеваний.

Animal & Plant Health Agency

Дополнительные отчеты

USDA-APHIS (2007) Миелоэнцефалопатия вируса герпеса лошадей: Потенциально новая болезнь **http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/cei/taf/emergingdiseasenotice_files/ehv.pdf. Accessed 21 Jan 2008**

Гудман, Л. Б., А. Лорегиан, Г. А. Перкинс, Дж. Нуджент, Э. Л. Баклс, Б. Меркорелли, Дж. Х. Кайдд, Г. Палу, К. К. Смит, Н. Остерридер и Н. Дэвис-Пойнтер. 2007.
Точечная мутация в полимеразе герпесвируса определяет нейропатогенность.
PLoS Pathog **3:**e160

авторское резюме

В нашем докладе представлены доказательства прямой причинно-следственной связи между генотипом штаммов EHV-1 и их нейровирулентностью, и тем самым дано долгожданное объяснение загадки различных клинических исходов после инфекции EHV-1. Мы доказали, что изменение одной аминокислоты в ключевом вирусном ферменте, ДНК-полимеразе, которая сохраняется у всех герпесвирусов, делает вирус неспособным вызывать неврологическое заболевание.

ПРОБЛЕМА: наблюдаемые клинические признаки были очень слабыми…..

Animal & Plant Health Agency

Goodman et al.

Table 1. Neurologic Grades, CSF Cytology, and qPCR

N=8 per group !

Animal ID	Group	Days Postinfection	Neurologic Grade	CSF Color	Nucleated Cells/ µl CSF	Differential Cell Count	CSF Total Protein (mg/dl)	CSF Viral Genome Copies/ml
Reference[a]	N/A	N/A	N/A	Clear	<6	No abnormalities	<100	0
4	D	7	2	Clear	5	75% lymphocytes; 25% macrophages	45	174
4	D	16	2	Yellow	56 LS; 24 AO	AO: 86% lymphocytes; 14% macrophages	215 LS; 139 AO	2,821 LS; 9,450 AO
9	D	16	1	Clear	2	53% macrophages; 47% lymphocytes	67	<5
42	D	9	0	Clear	0	No abnormalities	20	<5
228	D	7	0	Clear	9	80% small lymphocytes; 20% macrophages; few red blood cells	50	168
120	N	15	0	Clear	1	No abnormalities	67	<5
263	N	15	0	Clear	9	70% lymphocytes; 29% macrophages; 1% neutrophils	73	100
263	N	19	0	Light yellow	13	LS: 52% lymphocytes; 40% macrophages; 8% neutrophils	233	120 LS; <5 AO

Xanthochromia, elevated nucleated cell count, and elevated protein levels are typical (but not specific) for EHV-1 myeloencephalopathy [38]. Samples were collected from the lumbosacral (LS) space in the standing horse, and additional postmortem samples were collected from the atlantooccipital (AO) space. The four veterinarian reviewers' consensus hind limb neurologic grades are reported according to the scale from Mayhew et al. [39], with a grade 2 representing moderate pelvic limb signs, grade 1 representing mild signs, and grade 0 within normal limits. Grades for horses not listed in this table were zero.

*

* Ab4 не вызывает неврологических симптомов

Chong & Duffus 1992 1/4 животных с легкими неврологическими симптомами (SPF)

Lunn et al., 1991 etc SPF жеребята без неврологических симптомов

Sutton G, Normand C, Carnet F, Couroucé A, Garvey M, Castagnet S, et al. Вариант вируса герпеса лошадей и новый маркер для эпидемиологического надзора, Европа , 2021. Возникновение инфекционных заболеваний. 2021;27(10):2738-2739. https://doi.org/10.3201/eid2710.210704

Animal & Plant Health Agency

Последующее заявление о «консенсусе»

Table 1. Key question about D/N_{752} strains

Is there a particular EHV-1 strain that causes neurological disease?	No DNA_{pol} (ORF30) variants carrying the D_{752} marker are associated with most neurological disease outbreaks
Are all outbreaks of neurological disease caused by D_{752} viruses?	No D_{752} viruses are more commonly isolated from horses that suffered from neurological disease than N_{752}
Are N_{752} viruses nonpathogenic?	No N_{752} viruses are isolated from the majority of abortion outbreaks and a minority of neurological disease outbreaks worldwide
What proportion of horses carry D_{752} viruses?	Not known Available data suggest that 5–20% of EHV-1 viruses have the D_{752} genotype, but this data has been generated from a small number of studies
Is D/N_{752} testing useful?	Debatable Knowing the D/N_{752} genotype of an EHV-1 isolate is not relevant to the prevention and control of EHV-1 abortion outbreaks If an EHV-1 outbreak is associated with neurological signs, strict disease control measures should be imposed regardless of D/N_{752} genotype If an active EHV-1 infection, as evidenced by viremia and/or shedding, is diagnosed as D_{752} positive, even in the absence of neurological signs, it is possible that there could be an increased risk of a neurological disease outbreak. However, no study to date has properly tested this relationship The most important reason to perform this testing is to increase our knowledge about EHV-1 epidemiology

J Vet Intern Med 2009;23:450–461

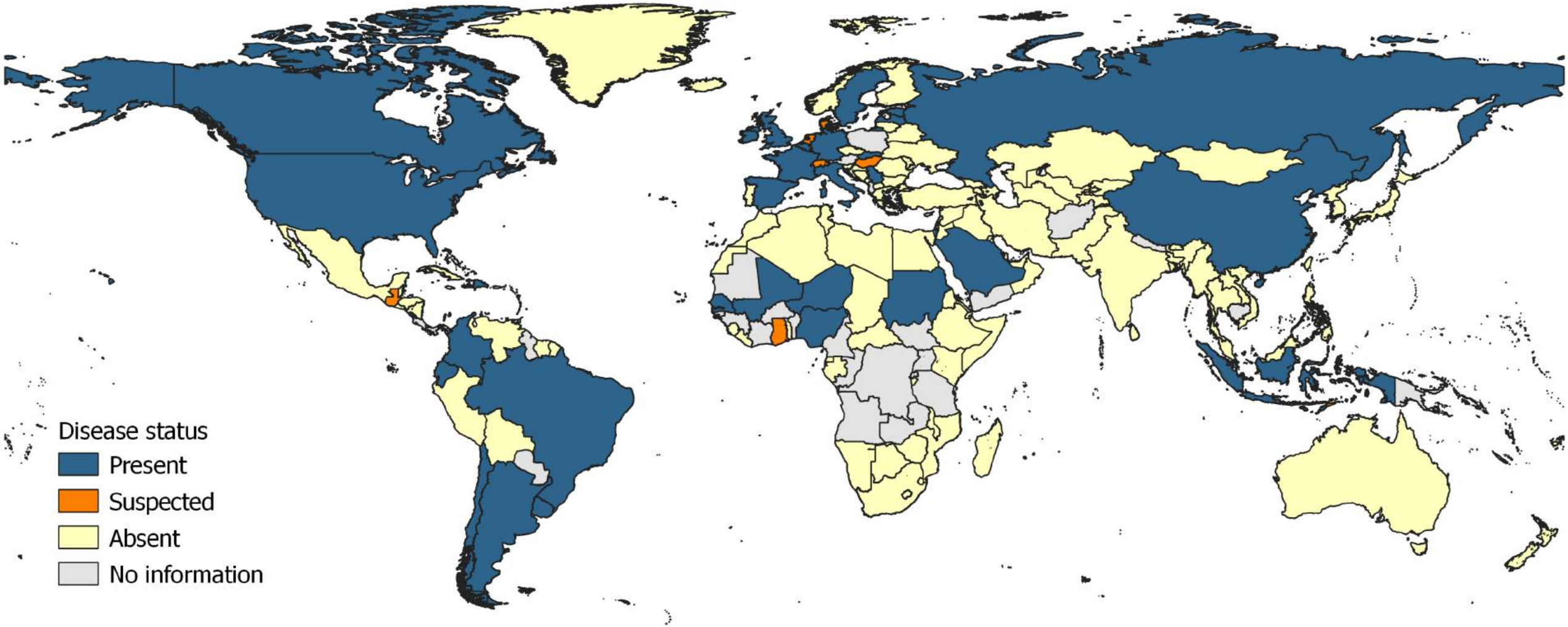
Animal & Plant Health Agency

Выводы

- **Предыдущее исследование генотипов EHV-1 описало вариации штаммов и выявило точечную мутацию в ORF 30, которая была связана с анамнестическим сообщением о неврологических симптомах**
- **Кредо: существует (скорее всего) прямая зависимость между патогенностью штаммов, количеством вызванных абортов и появлением неврологических симптомов**
- ***“Результаты наших экспериментальных исследований инфекции показывают, что вариант последовательности N752 ДНК Pol EHV-1, по сравнению с вариантом D752, имеет сниженный общий патогенный потенциал и способность вызывать неврологические признаки.”***
- **Вариант D752, вероятно, был на подъеме.**
- **Однако в настоящее время анализ мутации ORF30, по-видимому, имеет ограниченную диагностическую ценность, поскольку она описывает только потенциальную возможность**
- **Нельзя не дооценивать влияние факторов хозяина !**

Animal & Plant Health Agency

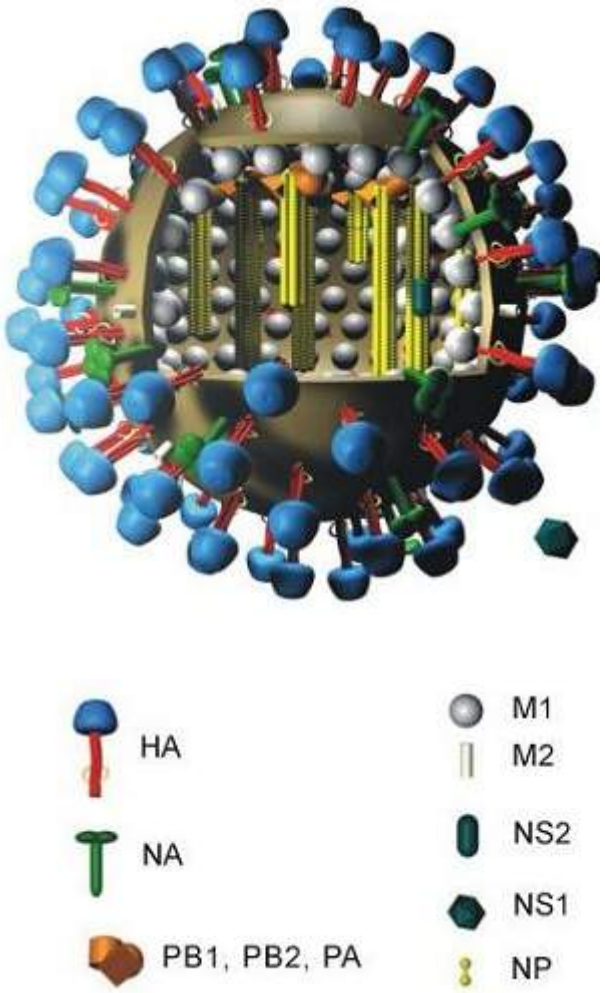
EIV (вирус конского гриппа) 2016-2020



Animal & Plant Health Agency

Структура

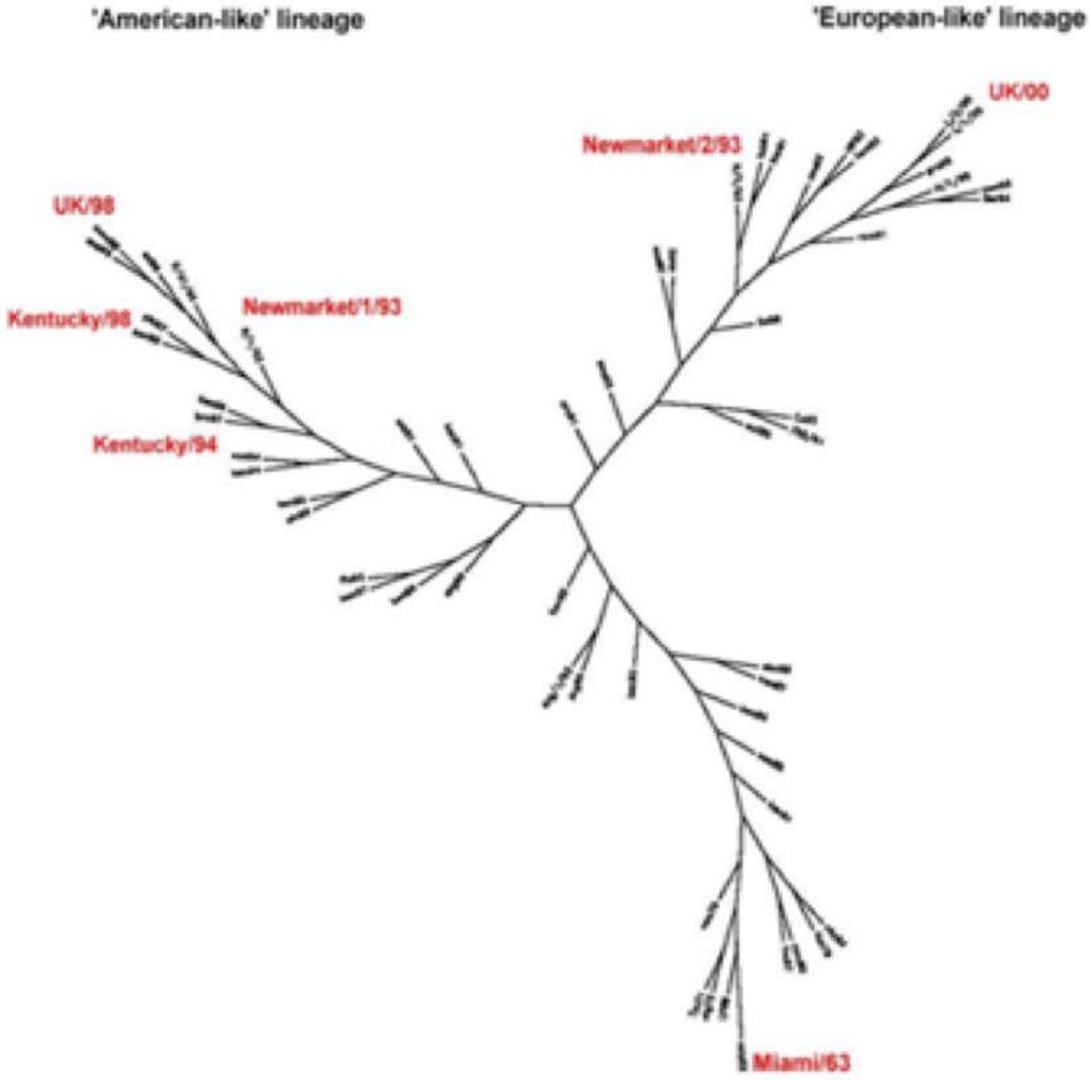
- Сегментированный геном РНК с отрицательной цепью
- 8 сегментов гена, 10 генов
- На поверхности находятся два гликопротеина гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA).
- Два матриксных белка
- Два неструктурных белка
- Три белка, входящие в состав РНК-полимеразы
- Нуцелопротеин



Animal & Plant Health Agency

Филогенетическое дерево по гриппу лошадей H3N8 с 1963 года по настоящее время

- Вирусы гриппа лошадей относятся к подтипам H7N7 и H3N8, в настоящее время циркулируют вирусы H3N8
- В конце 1980-х годов последовательности гемагглютинина вируса разошлись на две отдельные ветви - американскую и европейскую сублинии.
- Американская ветвь подразделяется далее, образуя "вариант американской" подлинии, и большинство вирусов, циркулирующих в Великобритании, принадлежат к этой ветви. Они несколько отличаются от тех, что встречаются в Северной Америке, которые также относятся к этой ветви.



Animal & Plant Health Agency

Передача

- Болезнь распространяется очень быстро (24-72 часа) среди восприимчивых лошадей, находящихся в контакте, вызывая высокую заболеваемость.
- Передаче гриппа часто способствует сочетание вакцин, успешно ослабляющих клинические признаки, но не предотвращающих выделение вирусов.
  - Может быть связано с изменением потенции вакцины
  - Плохая реакция на прививку
  - Антигенный дрейф или сочетание этих факторов
  - Лошадиный грипп имеет большое значение для международного перемещения лошадей и включен в список регистрируемых заболеваний МЭБ.

Disease	Risk of undetected presence in the subpopulation	Risk of introduction into the subpopulation	Risk of transmission within and from subpopulation
EI	Yes* (Subclinical infection in partially immune horses)	Yes (Effective airborne transmission, risk increased during air transportation)	Yes (Pre-symptomatic shedding ; asympatomatic shedding in partially immune horses ; air-borne transmission not excluded within the subpopulation)

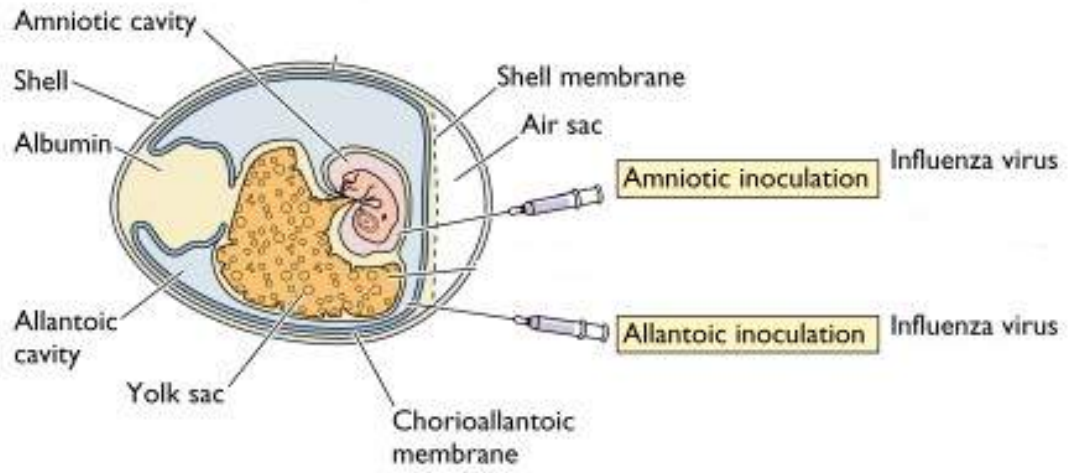
Animal & Plant Health Agency

Диагностические тесты - RT-qPCR

- *Антиген в носовых выделениях может быть обнаружен непосредственно с помощью иммуноферментного анализа с захватом антигена (ELISA) с использованием моноклонального антитела против нуклеопротеина. (Cook et al., 1988; Livesay et al., 1993).*
- Анализ ПЦР в реальном времени для обнаружения матричного гена был описан Spackman et al. 2002.
- Протестирован на выявление всех 16 типов HA и NA.
- Проверили чувствительность и специфичность в отношении VI и HI, которые оказались сопоставимыми.
- Этот метод используется во многих лабораториях, включая APHA, для выявления гриппа

Animal & Plant Health Agency

Диагностические тесты - выделение вируса

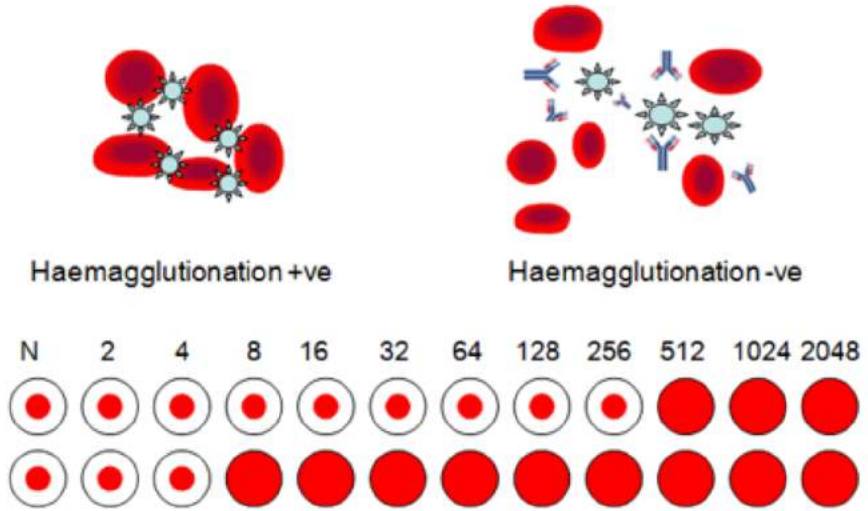


- Традиционно лошадиный грипп диагностируется путем выделения вируса из носоглоточных мазков в развивающихся куриных эмбрионах
- Бывший "золотой стандарт" МЭБ:
- …… но для достижения результата может потребоваться до нескольких дней
- Необходимы последующие действия через, например, HI

Animal & Plant Health Agency

Диагностические тесты - на основе гемагглютинации

- Тест на ингибирование гемагглютинации (HI) и основан на распознавании вируса панелью эталонных антител.
- Вирусы гриппа связываются с эритроцитами с помощью молекулы гемагглютинина и агглютинируют их. Этот процесс легко наблюдать, если смешать вирус и эритроциты в правильных пропорциях и высеять в 96-луночный планшет.
- Путем последовательного разведения специфических антител и добавления их к вирусу можно блокировать это взаимодействие и измерить, насколько тесно вирус связан с антисыворотками и предыдущими штаммами.
- На диаграмме ниже верхний ряд лунок показывает сильное взаимодействие между вирусом и антисывороткой (титр = 256), нижний ряд - слабое взаимодействие (титр = 4).



Animal & Plant Health Agency

Подведение итогов

Методы обнаружения новых и появляющихся вирусов

ПЦР, специфичные для пан-вирусов

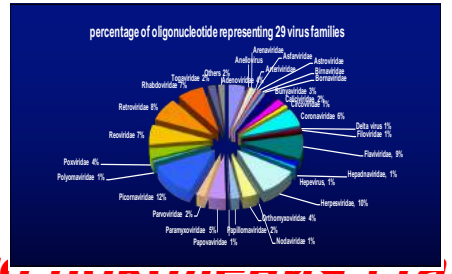
пан-Герпес

пан-ПестиВирус

пан-флавивирус

и т.д.

Микрочип



Секвенирование следующего поколения (также известное как "глубокое")

Animal & Plant Health Agency | Asiantaeth Iechyd Anifeiliaid a Phlanhigion

Выражение благодарности:

Defra **SV3300**

APHA **Отдел вирусологии, ASU**

OGL

© Crown copyright 2021

Эта информация лицензирована в соответствии с Open Government Licence v3.0.
Чтобы ознакомиться с этой лицензией, посетите www.nationalarchives.gov.uk/doc/open-government-licence/

Все запросы, касающиеся данной публикации, следует направлять по адресу : [falko.steinbach@APHA.gov.uk]