

ГЛАВА 2. 4. 5.

ГУБКООБРАЗНАЯ ЭНЦЕФАЛОПАТИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

РЕЗЮМЕ

Описание болезни: Губкообразная энцефалопатия КРС (ГЭ КРС) – это смертельное нейрологическое заболевание взрослого КРС, которое было впервые распознано в Великобритании и идентифицировано как имеющее классическую (ГЭ КРС –тип С) и атипическую форму. Как ГЭ КРС типа С, так атипичная форма, Азии и странах Тихого океана. ГЭ КРС – это трансмиссивная губкообразная энцефалопатия, или прионная болезнь. Архетип этой группы – это скрепи овец и коз (смотри Главу 2.7.12. Скрепи).

Эпизоотия ГЭ КРС типа С возникла в результате перорального попадания в организм животного прионов, содержащихся в белке животных, с мясокостной мукой и заменителями молока, входящих в состав кормов для животных. В результате контрольных мер, эпизоотия ГЭ КРС типа С находится в стадии затухания.

В экспериментальных условиях была продемонстрирована передача всех форм ГЭ КРС животным. Также считается, что возбудитель ГЭ КРС типа С является общим источником трансмиссивной губкообразной энцефалопатии (ТГЭ) у нескольких других видов полорогих и у видов кошачьих, передаваемой с пищей. Есть свидетельства причинно-следственной связи между возбудителем ГЭ КРС типа С и вариантом трансмиссивной губкообразной энцефалопатии человека – болезнью Крейтцфельдта-Якоба. Рекомендации по безопасной работе с материалом, инфицированным ГЭ КРС, теперь учитывают, что ГЭ КРС – это зооноз, и манипуляции с потенциально контаминированным материалом должны осуществляться при соответствующем уровне биобезопасности и контаминации, который определяется посредством анализа биорисков.

Идентификация возбудителя: Клинические признаки ГЭ КРС типа С имеют наиболее острое проявление у крупного рогатого скота 4-5 летнего возраста во время пика эпизоотии. Клиническое течение болезни различно, но болезнь может длиться до нескольких месяцев. Если явные клинические признаки являются четкими, то дифференциальную диагностику можно не проводить. Начальные клинические признаки могут быть малозаметными и в основном поведенческими и могут привести к уничтожению инфицированного животного до того, как возникнет подозрение на ГЭ

КРС. В странах с законодательной политикой по болезни животных с клиническим подозрением необходимо убивать, мозг исследовать, а трупы уничтожать. Сейчас в большинстве стран инфицированных животных, умерщвленных до проявления клинических признаков, выявляют посредством активного надзора на бойнях, а посредством скрининга павших животных обнаруживают животных, у которых могут быть нераспознанные клинические признаки. Для диагностики живых животных в настоящее время диагностического теста нет.

Специфичная для болезни, частично протеазоустойчивая изоформа мембранного белка PrP^C, ранее обозначаемая PrP^{Sc}, имеет важное значение в патогенезе этих болезней. В соответствии с прионной гипотезой PrP^{Sc} является важным или единственным компонентом инфекционного возбудителя. Подтверждение диагноза проводится посредством применения иммуногистохимических и/или иммунохимических методов исследования ткани мозга с целью обнаружения PrP^{Sc}. Считается, что атипичные формы ГЭ КРС возникают спонтанно во всех популяциях КРС в небольшом количестве, и они были идентифицированы только у взрослого КРС. Они были обнаружены во многих странах, но это были случайные обнаружения при проведении интенсивного надзора в отношении ГЭ КРС типа С. Установление различия между атипичными фенотипами классической ГЭ КРС основано на паттерне бэндинга вестерн-блота и характеристики биопробы.

Во многих странах имеются коммерческие диагностические наборы для проведения диагностики ГЭ КРС; подобным образом некоторое количество анти-PrP антител образуют основу многих диагностических методов. Некоторые можно купить или приобрести в референтных лабораториях МЭБ или других лабораториях имеющих действующие программы надзора по ТГЭ.

Серологические методы: *На ТГЭ не были обнаружены специфические иммунные ответы.*

Требования для вакцин и диагностических биопрепаратов: *В настоящее время вакцин нет.*

А. ВВЕДЕНИЕ

Для получения последней информации по распространению болезни, пожалуйста, проконсультируйтесь с базой данных в области ветеринарии Всемирной организации МЭБ (http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/wahidhome/Home)

1. Описание болезни

ГЭ КРС – это смертельная прионная болезнь КРС, которая может сопровождаться такими клиническими признаками болезней центральной нервной системы как боязливость, повышенная возбудимость, атаксия. Подтверждающий анализ полагается на патологоанатомическое иммуногистохимическое исследование и иммунохимическое обнаружение неправильно упакованных прионных белков в мозге.

Передача классического ГЭ КРС (ГЭ КРС типа С) происходит посредством кормления мясокостной мукой и кормами, содержащими мясокостную муку, контаминированными прионами ГЭ КРС. (Wells & Wilesmith, 1995). Не существует доказательств горизонтальной передачи и существует мало данных относительно вертикальной передачи (Prince et al., 2003). Эпизоотологические данные и экспериментальные исследования передачи показали, что инкубационный период составляет, по крайней мере, 2 года и может продолжаться больше десятилетия. Болезнь обычно имеет форму от подострой до хронической и у пораженных животных наблюдаются прогрессирующие неврологические признаки. Эффективного лечения не существует и инфицированные животные неизбежно умрут, если болезнь оставить развиваться своим ходом. Клинический ГЭ КРС типа С возникает у взрослого КРС (от 20 до 22 лет в Соединенном Королевстве). Во время основной эпизоотии случаи наблюдались среди молочного КРС 4-6 лет. Далее влияние эффективных мер по контролю было отражено в повышении возраста проявления клинических признаков болезни. ГЭ КРС характеризуется постепенным проявлением признаков и обычно медленным течением (Konold et al., 2004; Wilesmith et al., 1992). Иногда случай характеризуется острыми признаками и быстрым ухудшением состояния, хотя периодичность наблюдения является значительным фактором в определении ранних клинических признаков. Имеющиеся признаки, несмотря на то, что они могут быть переменными, обычно включают изменение поведения, темпераменте, повышенную реакцию и отсутствие координации. Инфицированные коровы могут неохотно вступать на площадку для доения или могут сильно лягаться во время доения, что часто является первым наблюдаемым признаком. У сухостойных коров в особенности наблюдается отсутствие координации задних конечностей и слабость, которые являются первыми клиническими признаками, которые можно заметить. Наиболее распространенными неврологическими признаками являются тревожность, атаксия задних конечностей и повышенная чувствительность к касаниям и звукам. Повторяющиеся старт-реакции на внешние стимулы наблюдаются довольно часто и помогают в клинической диагностике при подозрении на случаи ГЭ КРС (Konold et al., 2004). Инфицированные коровы иногда стоят с низко опущенной головой и вытянутой шеей, согнутой спиной или широко-

расставленными задними конечностями. Также может наблюдаться тремор головы. Нарушения походки, такие как дискоординация или гиперметрия обычно характерны для задних конечностей и их легко увидеть, когда животное пасется на пастбище. С развитием признаков со стороны двигательной системы общая слабость, в результате которой животное падает и находится в лежачем положении, может стать доминирующим признаком клинической картины. По мере развития болезни общие клинические признаки, такие как потеря веса и снижение удоев молока обычно сопровождают клинические признаки. Во время эпизоотии в Великобритании изменений в картине ГЭ КРС типа С не наблюдалось (Konold et al., 2004; Wilesmith et al., 1992). Клинические признаки в основном схожи с признаками, наблюдаемыми в других странах, где имели место случаи ГЭ КРС типа С. Продолжительное течение болезни, в течение нескольких недель или месяцев, в итоге потребует проведения выбраковки в целях обеспечения благополучия. Однако государственная стратегия по определению статуса по ГЭ КРС страны требует обязательной нотификации и проведения диагностического расследования случаев с клиническим подозрением, их отбраковки и исследования мозга после наступления смерти. В начале заболевания признаки могут быть едва уловимыми, переменными и не специфичными и таким образом могут помешать клинической диагностике при первоначальном исследовании. При дальнейшем наблюдении таких равнозначных случаев вместе с соответствующими клиническими патологическими процедурами для исключения дифференциального диагноза, особенно метаболических нарушений, будет установлено значительное развитие признаков. Едва заметные признаки могут иногда усугубляться после стресса, вызванного, например, транспортировкой. Видео о КРС, инфицированном ГЭ КРС, можно загрузить с сайта Референтной лаборатории МЭБ по ГЭ КРС в Великобритании¹, которая также предоставляет DVD или видео кассеты по запросу. Мало известно о клинических проявлениях атипичной ГЭ КРС, возникающей в естественной среде, так как все эти случаи были обнаружены посредством активного надзора павшего скота или внешне здорового КРС и корреляция между данными лабораторной диагностики и историей клинических случаев отсутствует. Интересной общей чертой является то, что случаи атипичной ГЭ КРС были в основном обнаружены у КРС старше 8 лет. Данные, полученные в результате экспериментального внутрицеребрального заражения КРС помогают прийти к выводу о том, что клинические признаки ГЭ КРС типа Н и L могут включать признаки, которые наблюдаются при ГЭ

¹ Лаборатория является также Референтной лабораторией ЕС по трансмиссивной губкообразной энцефалопатии Европейской Комиссии (EURL). Все веб ресурсы: <http://www.tse-lab-net.eu/> isoform of a host-encoded protein (PrPC).

КРС типа С, но слабость и затрудненное вставание являются заметными клиническими признаками клинического у этих животных (Konold et al., 2012).

2. Возбудитель

Если не выделен возбудитель заболевания, то болезнь можно подтвердить только после вскрытия посредством кумуляции в центральной нервной системе (ЦНС) нетипичного прионного белка (PrP^{Sc}, PrP^d или PrP^{res}), частично устойчивого к протеазе. Прионная гипотеза предлагает, что возбудитель полностью состоит из PrP^{Sc}, который способен индуцировать конверсию PrP^c. Характеристика патологических и биологических исследований показала, что эпизоотия была обусловлена одним штаммом и основой для определения случая ГЭ КРС были неизменно характерная нейропатология и молекулярные профили PrP^{Sc} у клинически пораженных животных. С 2003г. в отчетах о вариантной патологии (Casalone et al., 2004) и/или молекулярных характеристиках у взрослых животных из разных стран сообщалось о вариации штамма возбудителя (Biacabe et al., 2004; Casalone et al., 2004). До настоящего времени было обнаружено приблизительно 100 случаев атипичной ГЭ КРС, которые отличаются по своим молекулярным профилям, выявленным посредством Вестерн иммуноблоттинга, от профилей, выявленных во время эпидемии ГЭ КРС типа С (Beringue et al., 2006; Lombardi et al., 2008; Okada et al., 2011). Две атипичные формы определены как АГЭ (амилоидная губкообразная энцефалопатия КРС), или L-тип, и ГЭ КРС типа Н на основании более низкой или более высокой массы негликозилированного фрагмента PrP^{Sc}, выявленного посредством Вестерн иммуноблоттинга, по сравнению с ГЭ КРС типа С (Casalone et al., 2004; Jacob et al., 2007).

3. Риск зоонозных заболеваний и требования к биобезопасности

Появление варианта болезни Крейтцфельда — Якоба (vCJD) у людей имело причинную связь с пероральным проникновением ГЭ КРС типа С (Bruce et al., 1997). Не известно связаны ли атипичные формы с формами прионных болезней людей. Рекомендуемые правила предосторожности при работе с возбудителем основаны на предположении о том, что все формы ГЭ КРС являются зоонозными. Биозащита при вскрытии и работе с тканями должна быть основана на рисках и соответствовать государственным регламентам; любая процедура, подразумевающая использование аэрозолей должна выполняться при соответствующем уровне биологической безопасности и защиты, который определяется посредством анализа биологических рисков (Смотри Главу 1.1.4 Биобезопасность и биозащита: Стандарт по управлению биологическими рисками в ветеринарной лаборатории и помещениях для животных), и лаборатория должна соответствовать государственным регламентам по биологической защите и биологической

безопасности для защиты персонала от контакта с патогенным организмом. Физическую инактивацию рекомендуют проводить посредством автоклавирования 30 фунт/дюйм² (208 Кпа или 2,2 бар) при температуре 134°C-138°C в течение 18 минут. Однако полную инактивацию можно не достичь при определенных условиях, например, когда исследуемый материал имеет форму мацерата с высоким титром или, когда возбудитель защищен сухим органическим веществом. Дезинфекцию потенциального фомита выполняют с использованием натрий гипохлорита, содержащего 2% хлор, или 2 N гидроксид натрия в течении более 1 часа при температуре 20°C на поверхностях или в течении ночи на оборудовании.

4. Дифференциальная диагностика

Для дифференциальной диагностики необходимо учитывать все типы неврологических болезней КРС, включая инфекционный энцефалит, метаболические нарушения (кетоз, гипомagneзиемия), токсикозы, неоплазию и травмы.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 1 Методы тестирования доступные для диагностики губкообразной энцефалопатии КРС и их задачи

Метод	Задача					
	Свобода популяции от инфицирования	Свобода отдельного животного от инфекции до перемещения	Вклад в стратегию эрадикации	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции-надзор	Иммунный статус отдельных животных или популяции после вакцинации
	Идентификация агента ²					
Иммуногистохимия	N/A	N/A	++	+++	++	N/A
Вестерн-блоттинг	N/A	N/A	++	+++	++	N/A

Метод	Задача					
	Свобода популяции от инфицирования	Свобода отдельного животного от инфекции до перемещения	Вклад в стратегию эрадикации	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции-надзор	Иммунный статус отдельных животных или популяции после вакцинации
Методы экспресс скрининга	N/A	N/A	+++	+	+++	N/A
Гистопатология	N/A	N/A	+	+	+	N/A

² Рекомендуются применение комбинации методов идентификации возбудителя на одном и том же образце.

Ключ: +++ = рекомендованный метод; ++ = подходящий метод; + = может использоваться в некоторых ситуациях, но стоимость, надежность и другие факторы серьезно ограничивают его применение; – = не подходит для данной цели; n/a = не применяется. Хотя не все исследования, перечисленные как категория +++ или ++ были формально валидированы, характер их рутинного применения и тот факт, что они широко использовались без сомнительных результатов, делают их приемлимыми для использования.

1. Идентификация возбудителя

Метода, способного подтвердить присутствие ГЭ КРС у живых животных, не существует. Идентификацию возбудителя начинают с клинического подозрения на болезнь или посмертной демонстрации гистопатологических изменений и скоплений PrP^{Sc} в подозрительных животных или неподозрительных животных посредством активного надзора. Природа возбудителя остается гипотетической и поэтому его нельзя выделить с целью проведения диагностики. Однако PrP^{Sc} повсеместно считается сообразным маркером болезни и все современные методы диагностики, за исключением клинического исследования и гистопатологии, основаны на обнаружении данного белка.

В отсутствии методов выделения возбудителя *in vitro*, болезнь можно подтвердить посредством обнаружения ТГЭ-специфичной вакуолизации с помощью гистопатологического исследования разных частей мозга.

Гистопатологические диагностические исследования, основанные на исследовании одной части продолговатого мозга (на уровне обекса), были валидированы в противоположность более обширному исследованию стволовой области мозга. Этот упрощенный подход позволил осуществить пробоотбор из стволовой области мозга через большое затылочное отверстие с использованием специальных инструментов вместо удаления целого мозга.

Однако иммунохимические методы обнаружения PrP, специфичного к болезни, включая методы иммуногистохимии и Вестерн-блоттинга рекомендуются для подтверждения диагноза и улучшения диагностической чувствительности в ранних или аутолизированных случаях. Применение более быстрых методов *in-vitro*, таких как иммуноферментный анализ ИФА с целью обнаружения PrP^{Sc}, привело к разнообразию «экспресс» тестов, которые сейчас являются основными инструментами скрининга для активного надзора. При использовании таких тестов проводят предварительную диагностику. Положительные или неопределенные результаты данных тестов подлежат исследованию посредством подтверждающих методов иммуногистохимии и Вестерн-блоттинга. В настоящее время использование экспресс тестов является основной методикой обнаружения случаев болезни и их широкое использование для подтверждения было одобрено при условии, что одним из используемых тестов является Вестерн-блоттинг (<http://www.tse-lab-net.eu/documents/tse-oieguide.pdf>). Все известные в настоящее время формы ГЭ КРС можно обнаружить с использованием данных методов, хотя полной

оценки чувствительности и специфичности атипичных форм (типов L и H) не проводилось.

Использование конкретного метода будет зависеть от области его использования. Области использования могут быть различными: от подтверждения клинического диагноза до скрининга здоровых популяций для выявления скрытой или доклинической стадии болезни. Принятое патологическое определение случая также будет отличаться в зависимости от того, будет ли использоваться диагноз для подтверждения случая или для скрининга популяции. Необходимо быть осторожными при интерпретации данных диагностических исследований с использованием методологий, которые не позволяют делать сравнение с описанными здесь стандартами для подтверждающей диагностики. Без соответствующего сравнения с ранее опубликованными критериями, определяющими фенотип ГЭ КРС, и при отсутствии исследований трансмиссии, результаты диагностических исследований, которые указывают на идентификацию нового штамма, являются преждевременными.

Контроль качества (КК) и обеспечение качества (ОК) являются неотъемлемыми частями процедур тестирования и за консультацией можно обратиться в референтные лаборатории МЭБ. Независимо от того, идентифицируют ли инфицированных ГЭ КРС животных посредством пассивного или активного надзора, хорошей практикой является обнаружение и подтверждение болезни с использованием комбинации, по крайней мере, двух методов. Первоначальный тест может быть одним из описанных ниже подтверждающих тестов или экспресс тестом, но для подтверждения положительных или неопределенных результатов первоначального теста важно проводить второе тестирование. В том случае, когда наблюдается противоречие между результатами первого и второго тестирования, необходимо проводить дальнейшие тесты с использованием иммуногистохимии или Вестерн-блоттинга или образцы необходимо отправлять в референтную лабораторию МЭБ для принятия решения.

1.1. Подготовка образцов

Статус страны по ГЭ КРС, должное выполнение программ пассивного и активного надзора и применяющиеся диагностические методы будут оказывать влияние на стратегию пробоотбора.

При всех обстоятельствах пассивного надзора за нейрологической болезнью взрослого крупного рогатого скота, если распространение ГЭ КРС в рамках страны или штата не установлено или имеет низкую инцидентность, очень важно следовать стандартному нейрпатологическому подходу, при котором

осуществляется отбор образцов целого головного мозга и исследуются репрезентативные области всего головного мозга. КРС с подозрениями на болезнь должен быть умерщвлен путем внутривенной инъекции концентрированного раствора барбитурата после введения седативного препарата, при необходимости. Мозг необходимо удалить как можно быстрее после смерти, используя при этом стандартные методы. Не существует макроскопических повреждений, связанных с ГЭ КРС, поэтому если при извлечении мозга они имеются, то пробы нужно брать непосредственно из них для того, чтобы облегчить дифференциальную диагностику.

Необходимо быть осторожным, чтобы сохранить соответствующие зафиксированные образцы и свежие образцы мозга для обнаружения PrP^{Sc} с использованием иммуногистохимических и иммунохимических исследований. Отклонение от данного подхода, заключающегося в отборе и сохранении целого мозга, может помешать проведению соответствующей характеристики случая с целью подтверждения того, является ли он типичным для ГЭ КРС или нет. Гистопатологические и иммуногистохимические исследования сначала выполняются на одном срезе блока (0,5-1,0 см в ширину) у обекса продолговатого мозга (Рис. 1.а и в., уровни А-А, представляющие центр блока для исследования), который должен быть зафиксирован в течение минимум 3-5 дней (в зависимости от толщины блока) в 4% растворе формальдегида (то есть 10% формол-солевом фиксаторе или 10% нормальном буферном формалине [NBF]). Для снижения инфекционности зафиксированные ткани можно поместить в 98% муравьиную кислоту на один час для снижения прионной инфекционности, затем промыть в течение 30 минут в водопроводной воде. Необходимо отметить, что это может уменьшить количество дальнейших исследований, которые могли бы использоваться для классификации за исключением случаев, когда свежий замороженный материал является также доступным. Последующую гистологическую обработку следует проводить в отношении нервных тканей посредством традиционных методов помещения в воск. (Пример соответствующих методов обработки можно найти на TSE-LAB-NET (<http://www.tse-lab-net.eu/documents/tse-oie-rl-prp.pdf>.)

Свежий материал, предназначенный для использования в иммунологических тестах для обнаружения PrP^{Sc}, сначала следует брать в виде полусреза

продолговатого мозга до уровня обекса или полного коронарного среза (2-4 г), непосредственно роstralного или каудального по отношению к блоку обекса, отбираемого для фиксации. Все остальные области мозга должны быть разделены плоскостным парамедиальным разрезом (3-5 мм от середины). Меньшую часть сохраняют для проведения иммунохимических методов для обнаружения PrP^{Sc} (например, иммуноблот) и хранят в замороженном виде до начала тестирования (в том случае, если тестирование не проводилось непосредственно после отбора образцов). После отбора образцов из области обекса для фиксации и пробоотбора свежей ткани большую часть ткани мозга в неизменном виде помещают в приблизительно 4-6 литров 10% формалинового фиксатора, который следует менять дважды в неделю. После двухнедельной фиксации, если необходимо дальнейшее исследование, мозг можно разрезать на коронарные срезы. Время фиксации может быть сокращено посредством разрезания свежего ствола мозга (отделенного от остальной части мозга) на маленькие коронарные срезы подобно первоначальному удалению области обекса, но оставляя интактными оставшиеся, важные с диагностической точки зрения, площади сечения на уровнях ножек мозжечка и роstralной части холмы (Рис. 1а и b, уровни В – В и С-С соответственно). В зависимости от некоторых других факторов (температуры, перемешивания, толщины блока ткани и использования микроволн) время фиксации для этих маленьких частей мозга может быть сокращено. Однако оценка влияния ускоренных процессов фиксации подобного типа на последующие протоколы иммуногистохимических исследований должна удовлетворять стандартам сравнительных испытаний. Другие части мозга, зафиксированные в формалине, можно использовать для проведения дифференциальной диагностики после завершения стандартной двухнедельной фиксации.

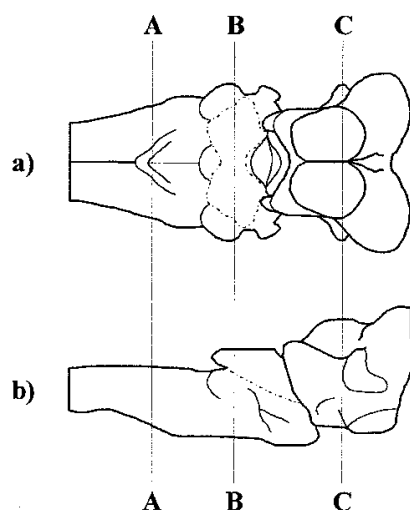


Рисунок 1. Стволовая часть головного мозга после удаления мозжечка а) вид сзади и б) вид сбоку. Рекомендованные уровни разрезов: А-А = продолговатый мозг, у обекса; В-В = продолговатый мозг через каудальные ножки мозжечка; С-С = средний мозг через ростральные холмы

Когда ГЭ КРС зарегистрирована у местной популяции КРС в определенной стране и существуют доказательства того, что локализация поражений и другие аспекты фенотипа болезни соответствуют аспектам, описанным для классической ГЭ КРС, то с целью подтверждения и мониторинга адекватным, хотя и не идеальным, методом является извлечение только ствола головного мозга.

Это можно сделать через большое затылочное отверстие без удаления свода черепа (Рисунок 2). Этот метод уменьшит количество необходимого фиксатора, а также требуемого времени и оборудования, и тем самым снизит затраты и повысит безопасность. Основные области-мишени для проведения гистологических исследований, тем не менее, можно сохранять. Данный метод позволяет отбирать и исследовать большое количество образцов для проведения пассивного и активного надзора на бойнях и в отношении павших животных. Ствол головного мозга разрезают через большое затылочное отверстие, не вскрывая череп, с использованием специального инструмента в виде неглубокой ложки с острыми краями. Такие инструменты имеются в продаже. Возможно, что различные формы инструмента предполагают различные варианты используемых методов, поэтому важно, чтобы после утверждения используемого оборудования специалисты прошли обучение. Обучение должно включать информацию о распределении PrP^{Sc} на срезах стволовой части мозга и необходимости точного отбора образцов и сохранения областей-мишеней для диагностики (Смотри ниже).

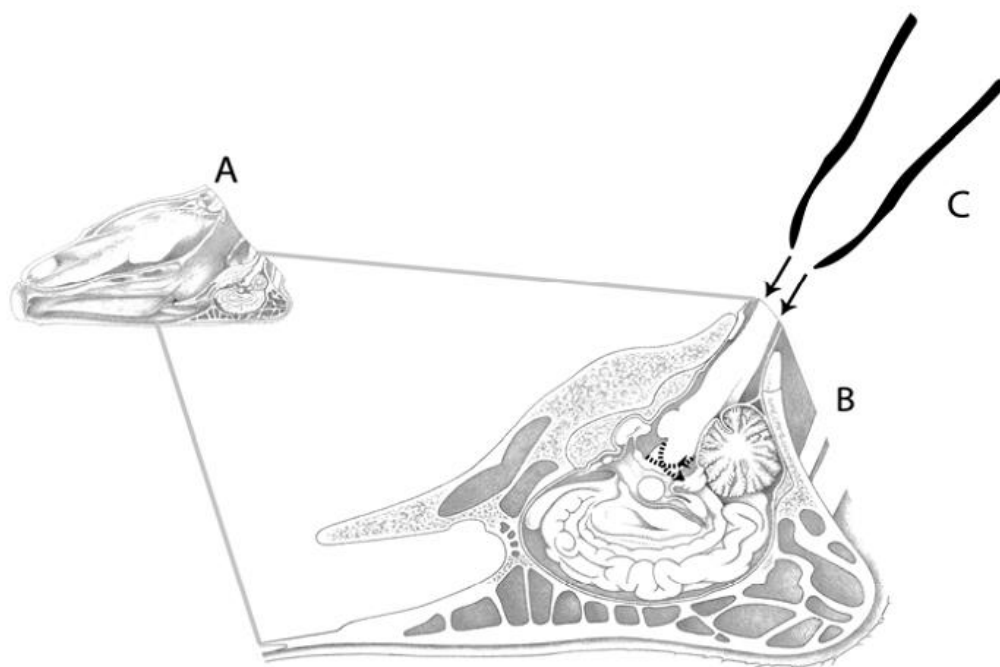


Рисунок 2. После отделения головы от тела посредством разрезания между позвонками позвоночника и затылочного мышелока черепа, его помещают на подставку лицевой стороной вверх (А) так, чтобы в большом затылочном отверстии был виден каудальный конец стволовой части мозга (продолговатый мозг) (Смотри В, развернутый рисунок черепа). Инструмент (С) вводят через большое затылочное отверстие между твёрдой мозговой оболочкой и лицевой/дорсальной частью (в зависимости от подхода) продолговатого мозга и продвигают рострально, так чтобы выпуклость чаши инструмента касалась кости черепа, и продвигают из стороны в сторону вращательными движениями. Таким образом, отделяют корешки черепно-мозгового нерва, стараясь не повредить при этом ткань мозга. Инструмент продвигают рострально в данном направлении на, приблизительно, 7 см и затем резко поворачивают под углом (т.е. к дорсальной/лицевой части стволовой части мозга, в зависимости от подхода), чтобы разрезать и отделить стволовую часть мозга (с фрагментами мозжечка) от остальной части мозга. Затем инструмент, который находится в положении под углом, вынимают из черепа и извлекают ткань через большое затылочное отверстие.

Когда индексный случай идентифицируют посредством проведения активного надзора, необходимые области мозга для проведения полной фенотипической

характеристики, вероятнее всего, получить будет невозможно. В большинстве стран отбирают только стволочную часть мозга даже перед первичным подтверждением ГЭ КРС. Следует предусмотреть, чтобы образцы, отобранные у животных, в рамках активного надзора сохранялись до получения результатов первоначального тестирования. Это позволит провести полный отбор образцов мозга животных с положительными реакциями в ретроспективе с целью характеристики случаев. Это является особенно важным, если используются внутренние тесты, не подлежащие внешнему контролю качества, и в тех случаях, когда заявление об идентификации новых фенотипов сделано при отсутствии прямого сравнения с описанными здесь методами. В тех случаях, когда в качестве инструмента первичного надзора используются экспресс методы иммунологических исследований, необходимо обеспечить материал для проведения дальнейших морфологических (включая иммуногистохимию) и молекулярных исследований, которые позволят идентифицировать фенотип болезни в ситуации, когда диагностика ГЭ КРС в стране вообще не проводилась.

1.1.1. Отбор стволочной части мозга при активном надзоре с использованием экспресс методов тестирования

Отбор образцов ткани головного мозга и ее обработка с целью использования в любом экспресс тесте должны выполняться точно в соответствии с инструкцией поставщика или производителя метода тестирования или набора. Процедуры проведения методов отличаются друг от друга и их нельзя менять без результатов валидации вариантной методологии, проведенной производителем. С целью демонстрации скоплений PrP^{Sc} и оценки отбора образцов для проведения экспресс-тестов предпочтительный для иммуноанализа образец должен быть отобран из области, находящейся в 1,0 см или в пределах 1,0 см рострально или каудально от обекса исходя из каудально-ростральной зоны ключевых целевых точек (Рис. 3). Выбор целевой точки должен учитывать последующий метод подтверждения. Если положительные результаты потребуют подтверждения, то, по крайней мере, полусрез продолговатого мозга на уровне обекса нужно сохранять интактным с целью фиксации для проведения иммуногистохимии/гистологии (как описано выше). Отбор образцов продолговатого мозга рострально или каудально от обекса для экспресс-тестирования не оказывает отрицательного влияния на гистологические и иммуногистохимические методы исследования. Однако

для получения адекватных образцов для проведения экспресс-тестирования и подтверждающего тестирования отбор образцов полусреза продолговатого мозга на уровне обекса является более предпочтительным. Несмотря на то, что в результате теряется возможность оценить симметрию любых гистологических поражений (в частности вакуоляцию), данный подход наименее всего может отрицательно повлиять на проведение наиболее важного иммуногистохимического исследования. Если все-таки выбирают приготовление полусреза, то важно принять меры, чтобы на целевые точки каждого образца не было отрицательного воздействия. Например, ядро одиночного пучка и дорсальное двигательное ядро черепного нерва (целевые области поражений, вызванные ГЭ КРС) являются маленькими и расположены относительно близко к срединной линии (Рисунок 3). Если образцы ткани аутолизуют до той степени, когда анатомическая ориентация невозможна, неидентифицированную аликвоту все же можно взять и протестировать. Положительный результат в таких случаях является действительным результатом. Но отрицательный результат тестирования нельзя истолковывать как индикатор отрицательного животного. Его необходимо интерпретировать с особой осторожностью и сообщать о нем нужно с соответствующим заключением.

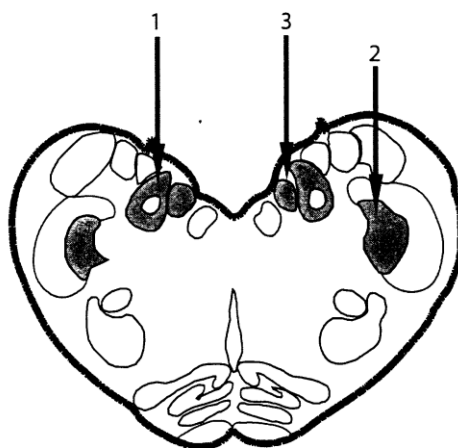


Рисунок 3. Поперечный разрез стволовой части головного мозга на уровне обекса, показывающий ключевые целевые точки для диагностики с помощью гистопатологии и иммуногистохимии при ГЭ КРС. Здесь продемонстрированы ядро одиночного пучка (1), ядро спинномозгового пути тройничного нерва (2) и дорсальное ядро блуждающего нерва (3). Из этого следует, что материал, отобранный для проведения экспресс-теста, должен также включать репрезентации данных зон.

Результатом неточного приготовления полусреза может быть полная потеря целевой области для проведения подтверждающего тестирования и угроза проведению программы надзора. Неправильное применение специальных инструментов для отбора образцов может также быть причиной неаккуратного отбора образцов из целевых областей. Внедрение данных подходов требует четкой стратегии и программы мониторинга с целью обучения и контроля качества процедур отбора образцов, включая анатомическую ориентацию, а не только вес образца. Из-за специфически целевого распределения PrP^{sc} размер образцов и расположение должно соответствовать описанию, данному в диагностических наборах. Если указаний нет, то для проведения всех подтверждающих тестов нужно отбирать, по крайней мере, 0,5 г из диагностических целевых областей, как показано на рисунке 3. Рабочие характеристики исследования могут быть поставлены под угрозу по причине аутолиза, а именно из-за потери способности обеспечивать включение целевых областей в образец, отобранный для диагностики.

1.2. Диагностическое исследование

1.2.1. Гистологическое исследование

Гистопатология уже давно не является единственным методом для проведения исследований подозрительных животных или скрининга здоровых популяций. Однако осведомленность о гистопатологических изменениях является важным фактором для облегчения обнаружения случаев, когда проводится плановые диагностические гистологические исследования головного мозга КРС, образцы которого были отобраны для других исследований, помимо ГЭ КРС.

Для проведения дифференциальной диагностики осуществляют приготовление срезов продолговатого мозга-обекса толщиной 5 мкм, которые окрашивают гематоксилином и эозином (H&E). Если качество ткани позволяет, то гистопатологическое исследование срезов, окрашенных H&E, может подтвердить характерные невропатологические изменения ГЭ КРС (Simmons et al., 1996; Wells & Wilesmith, 1995), по которым болезнь была впервые распознана как губкообразная энцефалопатия. Эти изменения включают в основном губкообразные изменения и неврональную вакуолизацию; они являются сходными со всеми другими ТГЭ, но при ГЭ КРС

частая периодичность неврпаренхимальной вакуоляции в определенных анатомических ядрах продолговатого мозга на уровне обекса может быть использована для проведения гистопатологической диагностики одного среза продолговатого мозга. Так же, как и у других видов вакуолярные изменения в мозге КРС, особенно вакуоли в части нейрона, которая содержит ядро, красного или окуломоторного ядра среднего мозга, были обнаружены случайно (Gavier-Widen *et al.*, 2001). При проведении гистопатологической диагностики нельзя полагаться только на вакуоляцию нейрона, особенно в данных анатомических локализациях. Независимо от гистопатологической диагностики рекомендуется применять иммуногистохимию в плановой диагностике дополнительно, так как неопубликованные факты говорят о том, что, по крайней мере, 5 % клинических подозрительных случаев (которые являются отрицательными при исследовании среза, окрашенного Н&Е, с целью обнаружения вакуолярных изменений около обекса) можно диагностировать с использованием иммуногистохимии. Ясно, что исследования продолговатого мозга-обекса не позволяют проводить полное неврпатологическое исследование для дифференциальной диагностики, они также не позволяют проводить полную фенотипическую характеристику любой ТГЭ. Именно по этой причине рекомендуется удалять головной мозг из животных с подозрениями целиком. До сих пор информации для описания специфичных гистопатологических характеристик ГЭ КРС типа Н и L нет. Итальянские исследования имеют некоторую информацию по гистологии АГЭ КРС (L-тип ГЭ КРС) (Cassalone *et al.*, 2004). При пассивном надзоре было обнаружено несколько атипичных случаев ГЭ КРС и при активном надзоре не является возможным получить мозг целиком с целью получения знаний по данному вопросу. Плохое состояние мозга павшего КРС, где и были в основном идентифицированы атипичные случаи, также исключает проведение полного гистологического исследования из-за действия аутолиза. Была описана конечная патология при ГЭ КРС типов L и Н у небольшого количества животных после внутрицеребрального заражения (Konold *et al.*, 2014; Okada *et al.*, 2011).

1.2.2. Обнаружение специфичных для болезни форм PrP

Универсальное применение методов обнаружения PrP обеспечивает специфическими средствами диагностики болезни независимо от

морфологических изменений, выявленных посредством гистопатологии. Многие лаборатории уже дополняют или заменили гистопатологическое исследование иммуногистохимией и/или другими методами обнаружения PrP. Обнаружение скопления белков PrP^{Sc} является предпочтительным методом для программ надзора и подтверждающей диагностики. Применение иммуногистохимии в отношении PrP на материале, который был заморожен до фиксации, является возможным (но не нежелательным) (Debeer *et al.*, 2002). Замораживание до фиксации не скажется отрицательно на иммунореактивности образца, но может оказать отрицательное воздействие на соответствующую идентификацию целевых областей. Положительный случай будет иметь иммуномечение, по крайней мере, в одной из диагностических целевых областей (Casalone *et al.*, 2006). Чтобы диагностировать случай как отрицательный, должна быть возможность идентификации наличия целевых областей и подтверждения того, что «цикл» иммуногистохимии был проведен технически успешно с использованием соответствующих контролей. Если специфического для болезни иммуномечения не наблюдается и целевые области идентифицировать невозможно, то случай нужно классифицировать как «неподтвержденный» в отличие от отрицательного. Оба варианта Н и L типов демонстрируют скопление PrP^{Sc} в продолговатом мозге на уровне мозга (Casalone *et al.*, 2006; Gavier-Widen *et al.*, 2008). Охват и морфологические характеристики иммуномечения в осевой части нервной системы отличаются от классического ГЭ КРС. Общей чертой вариантных форм является наличие небольших многочисленных бляшко-подобных осадков. Различия в стволе мозга (обексе) не всегда видны и на них нельзя полагаться, чтобы эффективно дифференцировать или классифицировать случаи.

1.2.2.1. Иммуногистохимические методы

Иммуногистохимические исследования для обнаружения скоплений PrP^{Sc} проводят в таком же зафиксированном формалином и погруженном в парафин материале, используемом для гистопатологической диагностики. В иммуногистохимических исследованиях для обнаружения PrP^{Sc} с целью диагностики ГЭ КРС успешно применялись

различные протоколы. Несмотря на то, что стандартизированный метод иммуногистохимии является наиболее предпочтительным, более важным является определение надежных методов, имеющих стандартные результаты, контроль которых осуществляется на основе участия в сличительных испытаниях и сравнения с результатами стандартизованного образцового метода, применяемого в референтной лаборатории. Общий метод для гистопатологического исследования все еще успешно использует аутолизированные ткани, где проведение морфологической оценки уже является невозможным (Monleon *et al.*, 2003). Однако необходимо изучить анатомию образца, для того, чтобы определить, имеются ли целевые области. Это важно для постановки отрицательного диагноза, а также для точной интерпретации неопределенного иммуномечения. Метод обнаружения скоплений PrP^{Sc} при помощи иммуногистохимии так же чувствителен, как и метод вестерн-блоттинга для обнаружения скопления PrP^{Sc} (Schaller *et al.*, 1999). В комбинации с хорошими гистологическими препаратами иммуногистохимия позволяет обнаружить скопления PrP^{Sc} и, как и вакуолярная патология, имеет типичный вид и картину распределения. Она позволяет проводить одновременную оценку или подтверждать фенотип болезни. Существующие методы можно получить, обратившись в референтные лаборатории МЭБ.

По сравнению с диагностикой скрепи овец ограниченное обнаружение PrP^{Sc} в лимфоидных тканях при ГЭ КРС не дает возможности использования таких тканей для проведения доклинического анализа с использованием методов биопсии.

1.2.2.2. Метод Вестерн-блоттинга

Методы Вестерн-блоттинга проводят на свежих (незафиксированных) тканях и их можно успешно применять даже в том случае, если ткань аутолизирована (Hayashi *et al.*, 2004). Иммуноблоттинг скрепиассоциированных фибрилл (Stack *et al.*, 2004) был первым таким методом, который

применяли для диагностики ГЭ КРС. Он имеет чувствительность, сходную с чувствительностью иммуногистохимических методов и наряду с иммуногистохимией остается предпочтительным методом для подтверждения ГЭ КРС. Он является высокочувствительным методом, при применении которого используют большую массу (в идеале 2-4 г.) исходного материала и который предполагает несколько этапов концентрации PrP^{Sc}. В настоящее время доступны альтернативные методы, требующие меньше временных и денежных затрат. При их проведении используется меньше материала, и они являются более практичными. Несколько методов Вестерн-иммуноблоттинга доступны на TSE-LAB-NET³ в других референтных лабораториях МЭБ по ГЭ КРС. Несмотря на то, что методологию Вестерн-блоттинга сейчас применяют во всем мире, аналитическая чувствительность методов, используемых в разных лабораториях, имеет значительные различия при ее использовании для обнаружения PrP^{Sc}. Там, где применение собственных методов является более предпочтительным, чем применение опубликованных методов, важно, чтобы они прошли оценку на соответствие своей цели, и чтобы их валидировали по согласованию с референтной лабораторией МЭБ.

МЭБ и государственные референтные лаборатории создали методы Вестерн-блоттинга для установления различия между вариантами Н и L и классической ГЭ КРС. Различие основано на четком расщеплении N-конечной протеазы К, реактивности антител и паттерне гликозилирования PrP^{res} (Jacob *et al.*, 2007). Подробный протокол, включая критерии диагностики были выпущены референтной лабораторией Европейского Союза и доступен онлайн на A TSE-LAB-NET⁴.

1.2.2.3. Экспресс-методы тестирования

³ <http://www.tse-lab-net.eu/>

⁴ <http://www.tse-lab-net.eu/documents/tse-rl-blot.pdf>.

Были разработаны экспресс Вестерн-блоттинг, анализ бокового потока и методы ИФА, которые позволяют проводить скрининг большого количества образцов головного мозга и которые являются коммерчески доступными. Проведение таких методов занимает несколько часов (смотри оценки ЕС экспресс-тестов для обнаружения ГЭ КРС в группах отрицательных и положительных по результатам иммуногистохимии образцов⁵). Оцененные и утвержденные в ЕС тесты для контроля ГЭ КРС перечислены в Приложении С, Главе X Регламента по ТГЭ (ЕС 999/2001 и последующие поправки).

С алгоритмом проведения данных тестов можно познакомиться на сайте референтной лаборатории МЭБ в Великобритании⁶.

В то время как многие страны и рабочая группа МЭБ по тестированию на ГЭ КРС признают разрешение, выданное ЕС, в качестве индикатора эффективности теста, другие создали свои собственные механизмы оценки, в частности, Соединенные Штаты Америки, Канада и Япония (Протоколы Канады по надзору за ГЭ КРС⁷; Национальная лаборатория по исследованиям в области ветеринарии, Министерство сельского хозяйства, лесных и рыбных хозяйств, краткое описание нормативной системы по ветеринарным препаратам Японии⁸).

МЭБ имеет процедуру выдачи разрешения, а протоколы таких оценок размещены на сайте МЭБ: Валидация и сертификация диагностических тестов⁹, и процедура выдачи разрешений ЕС была признана в качестве золотого стандарта для дальнейшей оценки в соответствии с допустимой чувствительностью и специфичностью.

Относительная чувствительность экспресс-тестов, иммуногистохимии и других подтверждающих методов не

⁵ <http://www.tse-lab-net.eu/test.html>

⁶ <http://www.tse-lab-net.eu/documents/tse-oie-guide.pdf>

⁷ <http://www.inspection.gc.ca/english/animal/diseases/bseesb/surv/protoce.shtml>

⁸ <http://www.maff.go.jp/nval/english/pdf/outline130325.pdf>

⁹ <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/certification-of-diagnostic-tests/background-information/>

была полностью установлена, так как, по определению, все тесты не могут быть использованы в отношении идентичных образцов и распределение Pr^{PSc} анатомически различно.

(В качестве компромисса можно использовать гомогенаты ткани или смеси измельченных тканей, что позволит получить некоторую информацию в отношении определенных видов тестов). Признание этого является особенно важным при оценке эффективности экспресс-тестов при проведении исследований животных, не имеющих клинических признаков ГЭ КРС и у которых, вероятнее всего, депонирование Pr^{PSc} ниже, чем у животных с заболеванием на поздней стадии. Экспресс тесты являются инструментом первоначального скрининга животных в течение последних нескольких месяцев инкубационного периода (Arnold *et al.*, 2007), например, при исследовании материала, отобранного во время патологоанатомического исследования животных, подлежащих плановому убою. В странах, где проводится надзор по обнаружению новых случаев возникновения ГЭ КРС и в странах где считается, что средство оценки превалентности ГЭ КРС должно быть независимым от системы нотификации подозрительных случаев, данные скрининг-тесты предлагают эффективный подход. С тех пор как с января 2001 активный скрининг стали использовать в Европе, при помощи данных тестов идентифицируют большинство животных, инфицированных ГЭ КРС и они являются предпочтительными первичными тестами. Однако подтверждение диагностики ГЭ КРС в идеале требует проведения исследований зафиксированного мозга посредством иммуногистохимии или использования соответствующего протокола Вестерн-блоттинга. В 2006 году МЭБ признало, что при использовании в программах активного надзора коммерческие экспресс-методы доказали свою эффективность и стабильность, при условии, что их проводят обученный соответствующим образом персонал.

Конечно, иногда они могут превосходить признанный стандарт сравнения, если обучение сотрудников и опыт применения данного стандарта являются недостаточными. В настоящее время при данных обстоятельствах считается приемлемым для диагностики и практически идеальным для характеристики, если экспресс-тесты используются в комбинации для первичного скрининга в рамках программ активного и пассивного надзора и последующего подтверждения. Однако важно, чтобы первичные и вторичные тесты были совместимыми, и чтобы не возникла опасность получения ложноположительных результатов из-за использования одинаковых реагентов. Таким образом, алгоритм комбинаций предпочтительного теста будет помещен на TSE-LABNET с тем, чтобы помочь тем, кто хочет использовать данный метод вместо гистопатологии и иммуногистохимии или Вестернблоттинга для подтверждения. Комбинация тестов должна включать метод Вестерн-блоттинга для получения полезной дополнительной информации, которая поможет при фенотипической характеристике образца, если исследования зафиксированной ткани не проводится. Подтверждение должно проводиться в национальной референтной лаборатории.

Комбинацию двух экспресс-тестов можно использовать только для подтверждения случая ГЭ КРС. Отрицательный результат вторичного тестирования является недостаточным для определения случая, как отрицательного, если результаты первичного исследования положительные.

Необходимо продолжать проводить исследования животных с подозрением на ГЭ КРС, результаты тестирования которых при помощи экспресс-методов были противоречивыми, используя Вестерн-блоттинг или иммуногистохимию для обнаружения PrP^{Sc}. Если эти методы недоступны, нужно использовать гистопатологию.

Если при помощи гистопатологии нельзя подтвердить первые результаты реакции, то образцы необходимо отправить в референтную лабораторию МЭБ для проведения дальнейших исследований.

Несмотря на то, что программы оценки теста, проводимые в Европе, поддерживали законодательство по надзору за ГЭ КРС, последствия распространяются на другие страны. Последствия ложноположительных или ложноотрицательных результатов настолько велики, что внедрение новых тестов должно сопровождаться тщательной оценкой эффективности теста. Свойства, заявляемые производителями теста, должны быть всегда подкреплены данными, которые, в идеале, прошли независимую оценку. Необходимо обратить внимание на то, что имело место ограничение процесса полной валидации всех вышеуказанных диагностических методов обнаружения ГЭ КРС из-за отсутствия достоверного золотого стандарта и необходимости последующего использования стандартов сравнения, основанных на немногочисленных исследованиях. Таким образом, необходимо продолжать опубликовывать результаты широкомасштабных исследований эффективности испытаний. Пока ни одни из опубликованных данных не сравнивали с утвержденными процедурами валидации тестов для обнаружения других болезней.

1.3. Другие диагностические тесты

Инфекционность ГЭ КРС может быть продемонстрирована путем инокуляции мышечной тканью головного мозга пораженных животных на последней стадии, но биопроба не подходит для рутинной диагностики из-за продолжительного инкубационного периода. Однако этот метод наиболее приближен к «золотому стандарту» в отношении характеристики изолятов, который должен быть основан на вторичных биологических характеристиках типичного хозяина, если отсутствует изолируемый физический возбудитель.

Использование трансгенных мышей, у которых происходит сверхсинтез гена PrP, позволяет проводить биопробы с сокращенным инкубационным периодом ГЭ КРС, но до сих пор это не является практическим инструментом диагностики.

Доказано, что методы, использующие амплификацию белка *in-vitro*, являются очень чувствительными для обнаружения некоторых прионных болезней (Castilla *et al.*, 2006; Orru *et al.*, 2012), including C-type BSE (Murayama *et al.*, 2010), но они еще не прошли формальную оценку на применение в рамках государственных систем надзора, хотя некоторые из них были успешно применены для людей с целью надзора (Lacroux *et al.*, 2014; Orru *et al.*, 2014).

1.4. Доступность диагностических реагентов и наборов

Как было ранее отмечено (Раздел 1.2.5 выше), диагностические наборы были лицензированы для использования во многих странах и реагенты можно найти в продаже или приобрести в референтной лаборатории МЭБ или других лабораториях, работающих по программе надзора за ТГЭ. Предпочтительно, чтобы лаборатории использовали наборы, включенные в список МЭБ, или наборы, которые прошли полноценную оценку и были валидированы соответствующими контрольными органами.

2. Серологические исследования

Инфекционные агенты прионных болезней не индуцируют существенный иммунный ответ в хозяине, поэтому серологические исследования не применяются.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

В настоящее время вакцины не существуют.

Список литературы

- ARNOLD M.E., RYAN J.B.M., KONOLD T., SIMMONS M.M., SPENCER Y.I., WEAR A., CHAPLIN M., STACK M., CZUB S., MUELLER R., WEBB P.R., DAVIS A., SPIROPOULOS J., HOLDAWAY J., HAWKINS S.A.C., AUSTIN A.R. & WELLS G.A.H. (2007). Estimating the temporal relationship between PrP^{Sc} detection and incubation period in experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE) of cattle. *J. Gen. Virol.*, **88**, 3198–3208.
- BERINGUE V., BENCSIK A., LE DUR A., REINE F., LAI T.L., CHENAIS N., TILLY G., BIACABE A.-G., BARON T., VILOTTE J.-L. & LAUDE H. (2006). Isolation from cattle of a prion strain distinct from that causing bovine spongiform encephalopathy. *PLoS Pathogens*, **2**, 956–963.
- BIACABE A.G., LAPLANCHE J.L., RYDER S. & BARON T. (2004). Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep.*, **5** (1), 110–115.
- BRUCE M.E., WILL R.G., IRONSIDE J.W., MCCONNELL I., DRUMMOND D., SUTTIE A., MCCARDLE L., CHREE A., HOPE J., BIRKETT C., COUSENS S., FRASER H. & BOSTOCK C.J. (1997). Transmissions to mice indicate that ‘new variant’ CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, **389**, 498–501.
- CASALONE C., CARAMELLI M., CRESCIO M.I., SPENCER Y.I. & SIMMONS M.M. (2006). BSE immunohistochemical patterns in the brainstem: a comparison between UK and Italian cases. *Acta Neuropathol.*, **111**, 444–449.
- CASALONE C., ZANUSSO G., ACUTIS P., FERRARI S., CAPUCCI L., TAGLIAVINI F., MONACO S. & CARAMELLI M. (2004). Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with sporadic Cruetzfeldt-Jacob disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 3065–3670.
- 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.
- DEBEER S.O.S., BARON T.G.M. & BENCSIK A.A. (2002). Transmissible spongiform encephalopathy diagnosis using PrP immunohistochemistry on fixed but previously frozen brain samples. *J. Histochem. Cytochem.*, **50**, 611–616.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). (2015). EFSA Panel on Biological Hazards: Scientific Opinion on a request for a review of a scientific publication concerning the zoonotic potential of ovine scrapie prions. *EFSA J.*, **13** (8), 4197.

GAVIER-WIDEN D., WELLS G.A.H., SIMMONS M.M., WILESMITH J.W. & RYAN J.B.M. (2001). Histological observations on the brains of symptomless 7-year-old cattle. *J. Comp. Path.*, **124**, 52–59.

HAYASHI H., TAKATA M., IWAMARU Y., USHIKI Y., KIMURA K.M., TAGAWA Y., SHINAGAWA M. & YOKOYAMA T. (2004). Effect of tissue deterioration on postmortem BSE diagnosis by immunobiochemical detection of an abnormal isoform of prion protein. *J. Vet. Med. Sci.*, **66**, 515–520.

JACOB J.G, LANGEVELD J.P.M., BIACABE A.-G., ACUTIS P.-L., POLAK M.P., GAVIER-WIDEN D., BUSCHMANN A., CAMELLI M., CASALONE C., MAZZA M., GROSCHUP M., ERKENS J.H.F., DAVIDSE A., VAN ZIJDERVELD F.G. & BARON T. (2007). Molecular discrimination of atypical Bovine Spongiform Encephalopathy strains in a geographical region spanning a wide area in Europe. *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 1821–1829.

KONOLD T., BONE G.E., CLIFFORD D., CHAPLIN M.J., CAWTHRAW S., STACK M.J. & SIMMONS M.M. (2012). Experimental H-type and L-type bovine spongiform encephalopathy in cattle: observation of two clinical syndromes and diagnostic challenges. *BMC Vet. Res.* **8**, 22.

KONOLD T., BONE G., RYDER S., HAWKINS S.A., COURTIN F. & BERTHELIN-BAKER C. (2004). Clinical findings in 78 suspected cases of bovine spongiform encephalopathy in Great Britain. *Vet. Rec.*, **155**, 659–666.

KONOLD T., PHELAN L.J., CLIFFORD D., CHAPLIN M.J., CAWTHRAW S., STACK M.J. & SIMMONS M.M. (2014). The pathological and molecular but not clinical phenotypes are maintained after second passage of experimental atypical bovine spongiform encephalopathy in cattle. *BMC Vet. Res.* **10**, 243.

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.

LOMBARDI G., CASALONE C., D'ANGELO A., GELMETTI D., TORCOLI G., BARBIERI I., CORONA C., FASOLI E., FARINAZZO A., FIORINI M., GELATI M., IULINI B., TAGLIAVINI F., FERRARI S., CARAMELLI M., MONACO S., CAPUCCI L. & ZANUSSO G. (2008). Intraspecies transmission of BASE induces clinical dullness and amyotrophic changes. *PLoS Pathogens*, **4**(5): e1000075.

MONLEON E., MONZON M., HORTELLS P., VARGAS A., BADIOLA J.J. (2003). Detection of PrP^{Sc} in samples presenting a very advanced degree of autolysis (BSE liquid state) by immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, **51**, 15– 18.

MURAYAMA Y., YOSHIOKA M., MASUJIN K., OKADA H., IWAMARU Y., IMAMURA M., MATSUURA Y., FUKUDA S., ONOE S., YOKOYAMA T. & MOHRI S. (2010). Sulfated dextrans enhance *in vitro* amplification of bovine spongiform encephalopathy PrP(Sc) and enable ultrasensitive detection of bovine PrP(Sc). *PLoS One*, **5**, e13152.

OKADA H., IWAMARU Y., IMAMURA M., MASUJIN K., MATSUURA Y., SHIMIZU Y., KASAI K., MOHRI S., YOKOYAMA T. & CZUB S. (2011). Experimental H-type bovine spongiform encephalopathy characterized by plaques and glial- and stellate-type prion protein deposits. *Vet. Res.*, **42**, 79. doi:10.1186/1297-9716-42-79

ORRÚ 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.

ORRÚ 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.

PRINCE M.J., BAILEY J.A., BARROWMAN P.R., BISHOP K.J., CAMPBELL G.R. & WOOD J.M. (2003). Bovine spongiform encephalopathy. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **22**, 37–60 (English); 61–82 (French); 83–102 (Spanish).

SCHALLER O., FATZER R., STACK M., CLARK J., COOLEY W., BIFFIGER K., EGLI S., DOHERR M., VANDEVELDE M., HEIM D., OESCH B. & MOSER M. (1999). Validation of a Western immunoblotting procedure for bovine PrP^{Sc} detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **98**, 437–443.

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, Basel, Switzerland. ISBN 3-7643-2415-5

SIMMONS M.M., HARRIS P., JEFFREY M., MEEK S.C., BLAMIRE I.W.H. & WELLS G.A.H. (1996). BSE in Great Britain: consistency of the neurohistopathological findings in two random annual samples of clinically suspect cases. *Vet. Rec.*, **138**, 175–177.

WELLS G.A.H. & WILESMITH J.W. (1995). The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathol.*, **5**, 91–103.

WILESMITH J.W., HOINVILLE L.J., RYAN J.B.M. & SAYERS A.R. (1992). Bovine spongiform encephalopathy: aspects of the clinical picture and analyses of possible changes 1986–1990. *Vet. Rec.*, **130**, 197–201.

*

* *

NB: Существуют референтные лаборатории МЭБ по губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота (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/>).

Пожалуйста, обратитесь в референтные лаборатории МЭБ для
получения дальнейшей информации по диагностическим тестам и
реактивам в отношении губкообразной энцефалопатии КРС.