

**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ
ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ**

**ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ З ЛАБОРАТОРНОЇ
ДІАГНОСТИКИ ТА ВЕТЕРИНАРНО-САНІТАРНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ**



**ІНФЕКЦІЙНА АНЕМІЯ КОНЕЙ.
МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ
МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

Київ – 2025

Методичні рекомендації розглянуто та затверджено на засіданні Вченої ради Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (протокол № __ від _____ 2025 р.).

Методичні рекомендації затверджено і прийнято до впровадження в практику державних лабораторій Держпродспоживслужби Науково-методичною радою при Державній службі України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів (протокол № __ від _____ 2025 р.).

Розробники: Піщанський О. В., Алексеєва Г. Б., Поліщук О. Д., Пискун А. В., Васильєва Т. Б., Метолапова Г. М.

Рецензенти:

Корнієнко Л. Є. – доктор ветеринарних наук, професор, головний науковий співробітник науково-дослідного відділу епізоотології та інфекційних хвороб Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ;

Галатюк О. Є. – доктор ветеринарних наук, професор, завідувач кафедри мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології Поліського національного університету, м. Житомир;

Радзиховський М. Л. – доктор ветеринарних наук, професор, професор кафедри ветеринарної епідеміології та охорони здоров'я тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України, м. Київ.

Інфекційна анемія коней. Методи лабораторної діагностики : метод. рекомендації; О. В. Піщанський, Г. Б. Алексеєва, О. Д. Поліщук, А. В. Пискун, Т. Б. Васильєва, Г. М. Метолапова; Київ, ДНДІЛДВСЕ; 2025; 26 с.

У методичних рекомендаціях представлені дані щодо актуальності та аспектів лабораторної діагностики інфекційної анемії коней.

Методичні рекомендації призначені для спеціалістів регіональних, міських, районних та міжрайонних державних лабораторій Держпродспоживслужби, лікарів ветеринарної медицини, наукових співробітників науково-дослідних установ, слухачів факультетів післядипломного навчання, викладачів та студентів вищих навчальних закладів III–IV рівнів акредитації зі спеціальності «Ветеринарна медицина».

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень та скорочень	4
Вступ	5
I. Актуальність проблематики інфекційної анемії коней	6
1.1. Характеристика збудника	6
1.2. Епізоотологічні дані	7
1.3. Патогенез	8
1.4. Клінічні ознаки та перебіг хвороби	9
1.5. Патолого-анатомічні зміни	11
1.6. Діагностика	12
1.6.1. Серологічні методи досліджень	13
1.6.2. Ізоляція вірусу	13
1.6.3. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)	14
1.6.4. Патоморфологічні та гематологічні дослідження	15
1.7. Диференційний діагноз	15
1.8. Профілактика	15
II. Методи серологічної діагностики інфекційної анемії коней.....	17
2.1. Методика постановки реакції дифузної преципітації в агаровому гелі (РДП).....	17
2.2. Методика постановки імуноферментного аналізу (ІФА)	20
Список використаної літератури	23

Перелік умовних позначень та скорочень

EIAV – вірус інфекційної анемії коней;

ВООЗТ (WOAH) – Всесвітня організація охорони здоров'я тварин;

ІНАН (EIA) – інфекційна анемія коней;

ІФА (ELISA) – метод імуноферментного аналізу;

ПЛР (PCR) – полімеразна ланцюгова реакція;

РДП (AGID) – реакція дифузної преципітації.

ВСТУП

Вперше захворювання коней на інфекційну анемію було описане в 1843 році у Франції. Причиною виникнення хвороби вважали кормовий чинник, проте дослідники А. Валле і А. Карре у 1904 році встановили вірусну природу хвороби і виявили, що вірус локалізується у крові та органах хворих коней.

Наразі, інфекційна анемія коней (ІНАН, EIA), раніше відома як «болотна лихоманка» реєструється в усьому світі і належить до інфекцій з глобальним поширенням та вражає однокопитних тварин.

Збудником є вірус інфекційної анемії коней (EIAV) і після інфікування кров коня залишається інфікованою позитивно. Незважаючи на варіабельність рівня антитіл, інфекція викликає стійку імунну відповідь. Тому, всі коні віком понад 12 місяців, що дають позитивні реакції у серологічних тестах, вважаються носіями вірусу та потенційними джерелами інфекції для інших тварин. Рівень віремії та ризик передачі вищі у тварин із клінічними ознаками.

Економічні збитки для конярства значні внаслідок високої летальності при первинному спалаху інфекції (до 80 %), вимушеного забою хворих коней, тривалого карантину та проведення жорстких ветеринарно-санітарних заходів для ліквідації хвороби. Стратегія боротьби з ІНАН полягає у виявленні інфікованих тварин за допомогою лабораторної діагностики, їх ізоляції та вилученні для запобігання поширенню захворювання. Інфекційна анемія коней не становить небезпеки для здоров'я людини, однак лабораторні роботи з патогеном мають проводитися з дотриманням належних заходів біобезпеки відповідно до оцінки біоризиків.

Враховуючи все вищезазначене, ІНАН внесена до переліку хвороб, що підлягають обов'язковій звітності до Всесвітньої організації охорони здоров'я тварин (ВООЗТ), що зазначено у «Кодексі здоров'я наземних тварин».

I. АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМАТИКИ ІНФЕКЦІЙНОЇ АНЕМІЇ КОНЕЙ

1.1. Характеристика збудника

Збудник інфекційної анемії коней (*Equine Infectious Anaemia Virus*, EIAV) – РНК-геномний вірус, що належить до родини *Retroviridae*, підродини *Orthoretrovirinae*, роду *Lentivirus*. До подібних ретровірусів також належать такі патогени, як вірус імунодефіциту людини (HIV-1, HIV-2), імунодефіциту котів, віспи овець, ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби тощо [17].

Зовнішня ліпідна оболонка вірусу утворюється з плазматичних мембран клітин-господарів під час дозрівання частинок. Поверхневі вузлики – це вірусоспецифічні глікопротеїни gp90 і gp4S, які дають змогу вірусу проникати в клітини хазяїна. Вони також діють як потужні імуностимулятори, є варіабельними і змінюються залежно від конкретного штаму вірусу [2, 12].

Найбільш поширений з основних капсидних білків р26 (G-антиген) постійно викликає сильну гуморальну відповідь у більшості інфікованих коней і використовується як основа для більшості серологічних досліджень (РДП та ІФА). Він знаходиться всередині вірусної оболонки і не змінюється істотно у ході мутацій, а тому присутній у всіх штаммах вірусу EIAV [2, 8].

Віріони сферичної форми, діаметром 90–140 нм, вкриті двоконтурною поверхневою оболонкою. Вірус має щільне центральне ядро, що складається із вірусної РНК, чотирьох неглікозильованих структурних нуклеокапсидних білків і вірусної зворотної транскриптази (або РНК-залежної ДНК-полімерази). Останній є ферментом, що каталізує синтез ДНК з використанням РНК як матриці. Ця комплементарна ДНК (кДНК) може бути вмонтована в хромосомну ДНК господаря, де вірус ефективно ховається від захисних механізмів господаря, що дає змогу зберігатися в організмі коня пожиттєво [9, 16].

Збудник є досить стійким у зовнішньому середовищі. За температури (0–2) °C зберігається до двох років, у висушеній крові за кімнатної температури – впродовж 7 міс., гною та сечі – до 2,5 міс, стерильній воді – до 160 діб, у контамінованому сіні та на пасовищах – впродовж 3 міс, у вівсі в осінньо-зимовий період – 8,5 міс, у гноївці – до 2,5 міс, у гною за біотермічного

зnezараження – до 30 діб. Руйнується за кип'ятіння через (1 – 2) хв, за 60 °C – через 30 хв, під дією прямого сонячного проміння – через (1–3) год. Щодо дії дезінфектантів, то 2 %-ий розчин їдкого натру знищує збудник через 5 хв, 3 % емульсії креоліну – через 30 хв, (2–3) % розчину перманганату калію – через 5 хв. У той же час, вірус не інактивується під дією 20 % розчину негашеного та гашеного вапна [15, 21].

1.2. Епізоотологічні дані

Інфекційна анемія коней має глобальне розповсюдження та реєструється виключно серед представників родини коневих (лат. – *Equidae*). Коні, віслюки, мули та поні хворіють незалежно від породи, віку і статі. Джерелом збудника інфекції є клінічно хворі тварини, а також тварини з тривалим (до 18 років) латентним перебігом інфекції під час чергових рецидивів хвороби [6, 17].

Провідними факторами інфікування в природі є кровосисні комахи (сліпні, комарі та мухи з родини *Tabanidae*), які передають вірус від інфікованих до сприйнятливих тварин. Крім того, зараження можливе ятрогенним шляхом (через використання контамінованих голок, шприців, інфузійних систем та інших ветеринарних інструментів) та через трансплацентарне інфікування плода.

Контаміновані виділеннями хворих тварин корми, вода та інші об'єкти зовнішнього середовища також можуть бути факторами передавання збудника, однак істотної ролі в поширенні інфекції не відіграють [6, 9, 17].

Встановлено випадки занесення вірусу в благополучні господарства специфічними сироватками, одержаними від хронічно хворих коней за відсутності ретельного контролю під час відбору та експлуатації продуцентів.

Вірус виділяється з організму із сечею, носовим слизом та кон'юнктивальними виділеннями, молоком, а також з фекаліями, за наявності в них домішок крові. Зараження відбувається через шкіру, слизові оболонки носа, ротової порожнини, зовнішніх статевих органів, кон'юнктиву очей та травний канал. Титр вірусу вищий у коней із клінічними ознаками і ризик передачі від цих тварин вищий, ніж у тварин-носіїв з нижчим титром вірусу [6].

Хвороба перебігає переважно у вигляді ензоотій і лише в роки минулих світових війн набувала характеру епізоотій, що було наслідком масової концентрації кінського поголів'я в арміях воюючих країн.

Інфекційна анемія частіше трапляється в лісисто-болотистих місцевостях у липні-серпні, що пов'язано з сезонним масовим льотом кровосисних комах-переносників. У стійловий період реєструються лише спорадичні випадки, що зумовлюються рецидивами хронічної чи латентної інфекції і пов'язані з неповноцінним раціоном та напруженою роботою тварин [21].

У природних умовах без проведення ветеринарно-санітарних заходів спостерігається певна закономірність перебігу ІНАН. Так, на початку ензоотії виявляються поодинокі випадки захворювання з гострим перебігом. Поступово ензоотія набуває ширшого масштабу, уражаючи в перші (3–4) тижні до (70–80) % поголів'я і, затухаючи, зникає наприкінці (3–4) міс. При цьому, летальність може досягати 70–80 %. У стаціонарно неблагополучних господарствах, якщо в них не вводять нових коней, захворювання з клінічними ознаками не спостерігається і інфекція набуває тривалого латентного перебігу з масовим довгостроковим вірусоносійством [1, 22].

ІНАН є однією із серйозних проблем у конярстві в багатьох країнах світу: США, Китаї, Бразилії, державах південно-східної Азії. Щодо України, то це захворювання з 1986 року до початку 2000-х рр. реєструвалося в 15 областях України. Найбільший відсоток захворюваності відмічався у Волинській, Житомирській і Сумській областях. Окремі випадки захворювання спостерігались у Херсонській, Харківській, Вінницькій, Дніпропетровській областях [22]. Впродовж останніх 25 років реєструються лише спорадичні випадки захворювання. Аналіз одержаних даних свідчить про нерівномірне поширення ІНАН на території України. Найбільш неблагополучні зони – Полісся та Лісостеп.

1.3. Патогенез

Патогенез захворювання вивчений не у повній мірі. Вважається, що розвиток анемії – ключової клінічної ознаки – пов'язаний з пригніченням

процесу утворення еритроцитів (еритропоезу) та масовим їхнім руйнуванням. Цей процес зумовлено як безпосереднім ураженням еритроцитів вірусом, так і їх фагоцитозом клітинами ретикулоендотеліальної системи. Після потрапляння в організм EIAV поширюється з током крові, концентруючись передусім у кістковому мозку та периферичній крові. У результаті інтенсивного розпаду інфікованих еритроцитів їх кількість стрімко зменшується (уже на 5-й день захворювання вона може скласти лише (1,0–3,0) млн/мл). Водночас відзначається зниження гематокриту й рівня гемоглобіну майже вдвічі, що призводить до прогресуючої анемії.

Органи, відповідальні за гемопоез – селезінка та печінка – втрачають здатність ефективно утилізувати надлишок гемоглобіну. У їх тканинах, а також у нирках накопичується гемосидерин. Ураження супроводжується проліферацією лімфоїдних клітин, розвитком мієлоїдної метаплазії у селезінці та печінці, а також втратою функціональної кровотворної тканини й лімфоїдних фолікулів. У нирках розвивається гломерулонефрит. Зниження функцій кровотворних органів у поєднанні з масовим руйнуванням еритроцитів призводить до тяжкої анемії, що нерідко має фатальні наслідки для хворої тварини [5, 6, 17].

1.4. Клінічні ознаки та перебіг хвороби

Клінічно захворювання характеризується періодичними підвищеннями температури, тромбоцитопенією, анемією, стрімкою втратою ваги та набряками у нижніх частинах тіла. З часом розвивається хронічна форма, яка переходить у латентний безсимптомний перебіг [5, 9].

Інкубаційний період зазвичай становить від 1 до 3 тижнів, але може тривати до 3 місяців. У гострих випадках спостерігається гіперемія та збільшення лімфатичних вузлів, селезінки та печінки, які гістологічно інфільтровані незрілими лімфоцитами та плазматичними клітинами. У печінці часто виявляють клітини Купфера, що містять гемосидерин або еритроцити. Збільшену селезінку іноді можна визначити при ректальному дослідженні [17].

Перебіг хвороби може бути надгострий, гострий, підгострий, хронічний та латентний.

Надгостра форма характеризується стрімким розвитком симптомів: раптове підвищення температури тіла до 42 °С, виражена загальна слабкість, пригнічений стан, прискорене дихання, порушення роботи серця. У деяких тварин можуть виникати паралічі задніх кінцівок та ознаки геморагічного ентериту. Перебіг дуже короткий – від кількох годин до (1–2) діб, що завжди завершується летально.

Гостра форма супроводжується високою й сталою гарячкою (41–42 °С), пригніченням, слабким, але частим пульсом, почервонінням, а згодом – жовтушністю слизових оболонок ротової й носової порожнин. На третій повіці й біля вуздечки язика помітні численні крапкові крововиливи. Через ураження серця та нирок у коней виникають набряки у ділянці черева, підгруддя та кінцівок. Можуть спостерігатися симптоми колюк, проноси, а в жеребних кобил – аборти. Попри збереження апетиту, тварини худнуть, стають слабкими, відмічається хитка хода, можливі парези. Гематологічна картина свідчить про лейкопенію й лімфоцитоз, кров рідка й погано згортається. Загибель настає через (2–4) тижні на тлі кахексії та зниження температури тіла.

Підгостра форма триває від одного до трьох місяців і може завершитися загибеллю або перейти в хронічну. Клінічні прояви подібні до гострого перебігу, проте лихоманка має хвилеподібний характер. Під час ремісії температура тіла нормалізується, стан тварини тимчасово покращується. Можливі до 10 рецидивів гарячки тривалістю (3–5) діб, з періодами ремісії впродовж (4–15) діб. Усі тварини, що перехворіли в цій формі, гинуть внаслідок серцевої недостатності та сильного виснаження.

Хронічна форма може тривати від кількох місяців до кількох років. Часто виникає у неблагополучних господарствах. Характеризується періодичними короткочасними (1–3 доби) епізодами гарячки, задишкою, тремором м'язів. У фазі ремісії клінічні симптоми зникають, тварина виглядає здоровою і може працювати. Проте повторно можуть розвиватися набряки в області черева, підгруддя, кінцівок, крововиливи на слизових оболонках. Коні швидко

втомлюються, незважаючи на добрий апетит, худнуть. У крові – ті ж патологічні зміни, що й за гострої форми.

Латентна форма розвивається як продовження хронічної або з початку має безсимптомний перебіг. Триває роками без проявів захворювання. Виявити інфікованих тварин можливо лише серологічними методами (зокрема РДП, ІФА). Такі коні становлять значну епізоотологічну небезпеку, особливо для благополучних господарств. Активізація інфекції можлива за умов ослаблення імунітету через стрес, інтенсивну експлуатацію, паразитарні захворювання або вторинні інфекції.

Перебіг захворювання у значної частини інфікованих тварин проходить без видимих клінічних ознак [6, 7].

1.5. Патолого-анатомічні зміни

Патоморфологічні зміни залежать від форми та тяжкості перебігу хвороби. У тварин, що загинули під час гострої або підгострої форми, при секційному дослідженні виявляють прояви геморагічного діатезу, дегенеративні процеси у внутрішніх органах, численні точкові та плямисті крововиливи, а також серозні або серозно-геморагічні просочення в сполучній тканині. Слизові та серозні оболонки мають бліде або жовтяничне забарвлення. Селезінка збільшена, темно-вишнева, повнокровна, з в'ялою зернистою пульпою. Лімфатичні вузли та нирки набряклі, з ознаками гіперемії та крововиливами. Печінка збільшена, іноді з характерним строкатим (мозаїчним) рисунком. Кров рідка, світло-червоного кольору.

У разі хронічного перебігу виявляється анемія, виражене виснаження, помірна гіперплазія селезінки, яка має малинове або світло-червоне забарвлення. Печінка ущільнена, місцями з «мускатним» візерунком. Лімфатичні вузли збільшені, мають сірувато-білий колір. Нирки значно збільшені, з сіро-жовтим відтінком. Характерною ознакою є наявність пігментних включень у місцях попередніх крововиливів на слизових та серозних оболонках [6, 7].

1.6. Діагностика

Для лабораторної діагностики ІНАН застосовують дві групи методів: для виявлення іфекційного агента (ізоляція вірусу на культурі клітин та ПЛР) та для виявлення імунної відповіді (РДП, ІФА та, рідше, імуноблотинг) [17].

Ефективність застосування різних методів лабораторної діагностики представлена у таблиці 1.

Таблиця 1

Ефективність діагностичних методів (дані ВООЗТ)

Метод	Мета застосування					
	Популяція вільна від інфекції	Окрема тварина неінфікована перед переміщенням	Внесок у політику викорінення інфекції	Підтвердження клінічних випадків	Спостереження за поширеністю інфекції	Перевірка імунного статусу після вакцинації
Виявлення інфекційного агента						
ПЛР	–	+/-	–	+/-	–	–
Ізоляція вірусу	–	–	–	+	–	–
Виявлення імунної відповіді						
РДП	++	++	++	++	++	–
ІФА	++	++	++	+	+	–
Імуноблотинг	–	++	++	++	–	–

Примітка: ++ рекомендований для зазначеної мети, але має певні обмеження; + придатний лише за обмежених обставин; – не придатний для зазначеної мети.

1.6.1. Серологічні методи досліджень.

Провідна роль у діагностиці захворювання належить серологічним методам досліджень. Так, реакція дифузної преципітації в агаровому гелі (РДП, AGID або тест Коггінса) [4] та імуноферментний аналіз (ІФА, ELISA) є точними та надійними методами виявлення EIAV у коней, за винятком випадків ранньої стадії інфекції та у лошат, народжених від інфікованих кобил [10, 19]. У рідкісних випадках можливі хибні результати, коли концентрація вірусу в крові під час гострої фази захворювання настільки висока, що він зв'язує наявні антитіла, або якщо рівень антитіл так і не піднімається до детекційного [18]. Хоча ІФА дозволяє виявляти антитіла дещо раніше та при нижчих концентраціях, ніж РДП, позитивні результати обов'язково підтверджуються за допомогою РДП (пов'язано з можливістю хибнопозитивних результатів за постановки ІФА). Відповідно до даних ВООЗТ, РДП є високоспецифічним тестом, що дозволяє чітко відрізнити EIAV від неспецифічних взаємодій антигену з антитілами. У разі розбіжностей між результатами методів або сумнівних результатів застосовують вестерн-блот (імуноблотинг) для подальшого уточнення [17].

Відповідно до чинної «Інструкції про заходи з профілактики та боротьби з інфекційною анемією коней» діагноз вважається встановленим за наявності позитивних результатів дворазових досліджень саме за РДП з інтервалом 15–30 днів [21].

1.6.2. Ізоляція вірусу.

Ізоляція вірусу, як правило, не є необхідною для встановлення діагнозу. Однак, за потреби виділення EIAV проводять шляхом введення крові від підозрюваних у захворюванні тварин у культури лейкоцитів від здорових коней. Наявність вірусу в культурах підтверджують за допомогою виявлення специфічного антигену за допомогою ІФА, реакції імуофлуоресценції або молекулярно-генетичних методів досліджень. Проте, ізоляція вірусу проводиться вкрай рідко через складність у вирощуванні культур лейкоцитів коней [17].

1.6.3. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

Описано методику гніздової полімеразної ланцюгової реакції для виявлення провірусної ДНК EIAV у периферичній крові коней. Цей метод ґрунтується на використанні праймерів до гена *gag* провірусного геному і відзначається високою чутливістю щодо польових штамів вірусу у лейкоцитах інфікованих коней. Пороговий рівень виявлення становить близько 10 копій цільової ДНК [11].

Також запропоновано методику кількісної зворотної транскрипції в режимі реального часу (real-time RT-PCR). Оскільки ці методи надзвичайно чутливі, рекомендується проводити дослідження у двох паралельних зразках для підтвердження результатів. Через ризик контамінації важливо дотримуватись відповідних лабораторних процедур. Слід враховувати, що можливі невідповідності між послідовністю праймерів та циркулюючими варіантами вірусу, спричинені високим рівнем мутацій, можуть призводити до хибнонегативних результатів ПЛР [3]. Тому, ці методи мають значний потенціал як доповнення до традиційних методів серологічної діагностики ІНАН [23].

Відповідно до даних ВООЗТ, ПЛР рекомендовано застосовувати у наступних випадках:

- 1) суперечливі результати серологічних тестів;
- 2) підозра на інфекцію за негативних або сумнівних серологічних результатів;
- 3) як додатковий метод до серології для підтвердження позитивних результатів;
- 4) для виявлення інфекції на ранніх стадіях, до появи антитіл у сироватці (коні можуть бути серонегативними до 45 днів);
- 5) для контролю відсутності EIAV у тварин, що використовуються для виготовлення сироваток, вакцин або як донори крові;
- 6) для встановлення інфекційного статусу лошади, народженого від інфікованої кобили [17].

1.6.4. Патоморфологічні та гематологічні дослідження.

У разі потреби додатково проводять гематологічні та патоморфологічні дослідження для встановлення стадії розвитку хвороби у серопозитивних коней. Патологічним методом досліджень визначають ступінь ураження органів, а гістологічним – морфофункціональні зміни у них.

1.7. Диференційний діагноз

Диференційна діагностика передбачає необхідність виключення лептоспірозу, ринопневмонії, грипу, а також бабезіозів.

Лептоспіроз диференціюють за результатами досліджень сироваток крові в реакції мікроаглютинації (РМА) та мікроскопії сечі.

Ринопневмонія і грип характеризуються високою контагіозністю, швидким поширенням та гострим перебігом. Виділення збудників хвороби в курячих ембріонах та первинних культурах клітин з наступною ідентифікацією за допомогою серологічних реакцій дає повну можливість достовірного встановлення діагнозу.

У коней з підвищеною температурою необхідно виключити бабезіози. З цією метою проводять мікроскопію мазків крові і лікувальну обробку кровопаразитарним препаратом. На другу добу після лікування у коней, хворих на бабезіоз, температура тіла знижується на 1–1,5°C і через 3–4 дні стабілізується на межі фізіологічної норми. За бабезіозів у крові виявляють відповідних збудників. У коней спостерігають стійку інтенсивну жовтяничність слизових оболонок та набряк легень, чого не буває за ІНАН [14].

1.8. Профілактика

Наразі специфічна профілактика не проводиться. Були розроблені інактивовані та субодиничні вакцини проти EIAV, які були випробувані в різних лабораторіях і показали ефективність лише проти гомологічних штамів вірусу. Ослаблена жива вакцина, розроблена на початку 1970-х років, широко застосовувалась у Китайській Народній Республіці з 1975 по 1990 роки і дала позитивні результати у стримуванні цього захворювання. Із досягненням

низького рівня захворюваності з 1990 року стратегія боротьби з ІНАН змінилася: від вакцинації перейшли до заходів карантинування, щоб уникнути інтерференції антитіл, сформованих унаслідок вакцинації, з результатами діагностичних тестів. Хворих тварин вилучають зі стада [17, 20].

В Україні з метою запобігання хвороби однокопитних тварин піддають дослідженню на ІНАН методом РДП не пізніше, ніж за 30 діб до виведення їх за межі господарства для племінних і користувальних цілей. Усіх новоприбулих коней у період карантинування також обстежують на ІНАН.

Коней, які надходять на біопідприємства для одержання сироваток крові або шлункового соку, досліджують дворазово з інтервалом 30 діб, а далі двічі на рік – навесні, до початку льоту кровосисних комах, і восени – після його закінчення. Кобил, призначених для отримання кумису, досліджують за допомогою РДП перед початком роздоювання.

У разі встановлення діагнозу на інфекційну анемію господарство оголошують неблагополучним щодо цієї хвороби і запроваджують карантинні обмеження. Поголів'я неблагополучного господарства піддають клінічному огляду, термометрії та серологічному дослідженню. Клінічно хворих тварин забивають і відправляють на технічну утилізацію. Коней, що двічі з інтервалом 7–10 діб дали позитивні або сумнівні результати за РДП, однак не мають клінічних ознак хвороби, забивають на санітарній бойні. Визнане придатним для споживання м'ясо відповідно до діючих правил направляють для знезараження проварюванням [21].

Отже, наразі від ІНАН немає ефективного лікування чи специфічної профілактики (вакцини), а контроль цього захворювання здійснюється шляхом діагностики з наступною ідентифікацією, сегрегацією та евтаназією хворих непарнокопитних [17, 21].

II. МЕТОДИ СЕРОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ІНФЕКЦІЙНОЇ АНЕМІЇ КОНЕЙ

2.1. Методика постановки реакції дифузної преципітації в агаровому гелі (РДП)

РДП дозволяє виявляти преципітуючі антитіла, що утворюються у відповідь на інфікування вірусом інфекційної анемії коней. Наявність специфічної реакції підтверджується утворенням преципітаційних ліній між антигеном EIAV і досліджуваною сироваткою, які співпадають за формою й розташуванням із лінією, що утворюється між антигеном і стандартною позитивною сироваткою [17].

Наразі, комерційно доступними є тест-набори від кількох виробників.

Компоненти набору:

1. Антиген – рекомбінантний білок р26.
2. Позитивний контроль – сироватка крові коня, що містить антитіла до EIAV і утворює чітку преципітаційну лінію у гелі на межі із антигеном.
3. Агаровий гель – 1,0% агар Нобеля у борному буфері 0,145 М (9 г H_3BO_3 і 2 г NaOH на літр), рН 8,6 ($\pm 0,2$).

Обладнання:

- термостат з температурою нагріву $+21^{\circ}\text{C}$ ($\pm 5^{\circ}\text{C}$);
- штамп (спеціальний різак для гелю);
- автоматичні піпетки одноканальні;
- одноразові накінецьники на 200 мкл;
- автоклав або мікрохвильова піч;
- ваги лабораторні;
- мірна колба на 250 мл;
- чашка Петрі діаметром 100 мм;
- освітлювальний прилад, який випромінює косо-спрямований інтенсивний пучок світла на темному фоні;
- вортекс;

- контейнер для збирання твердих забруднених відходів;
- контейнер для зливання рідких відходів.

Постановку реакції проводять відповідно до листівок-вкладок до наборів.

Методика постановки відповідно до рекомендацій ВООЗТ:

1. Реакцію проводять у шарі агару, залитого в пластикові чашки Петрі, оскільки скляні можуть призвести до зсуву агару. Для чашок Петрі діаметром 100 мм використовують 15–17 мл 1% агару Нобеля у борному буфері 0,145 М (9 г H_3BO_3 і 2 г NaOH на літр), рН $8,6 \pm 0,2$. За допомогою металевого штампу в агарі вирізають кілька "розеток", кожна з яких складається з шести периферичних лунок, що оточують центральну, однакову за діаметром. Лунки мають діаметр 5,3 мм і розташовані на відстані 2,4 мм одна від одної. Кожна лунка повинна містити однаковий об'єм реагенту та бути повністю, але не надмірно, заповнена.

2. Антиген вносять у центральну лунку, а стандартну позитивну сироватку – у кожную другу зовнішню лунку. Сироватки, які підлягають дослідженню, вносять у три інші зовнішні лунки.

3. Чашки інкубують за кімнатної температури у вологому середовищі (рекомендована температура 18–26°C).

4. Через 24–48 год результати реакції преципітації оцінюють за допомогою вузького пучка інтенсивного косого світла на тлі чорного фону. Референтні (контрольні) лінії повинні бути чітко видимі вже через 24 год. У цей момент сироватки, що мають високий вміст антитіл, можуть також утворювати лінії, які ідентичні з тими, що є між стандартними реагентами. Слабко позитивна реакція може з'явитися через 48 год і проявляється вигином лінії преципітації стандартної сироватки в напрямку лунки з досліджуваною сироваткою. За ІНАН цей вигин виглядає як маленький гачок або заокруглення, що спрямоване в бік досліджуваної лунки. Сироватки з високим титром преципітуючих антитіл утворюють повну лінію ідентичності або ширші, менш чіткі преципітаційні смуги. Такі реакції підтверджують як специфічні для EIAV шляхом попереднього розведення сироватки 1:2 або 1:4 і повторного тестування, після чого утворюється більш чітка лінія. Сироватки без антитіл до EIAV не

утворюють преципітаційних ліній і не впливають на реакції стандартних реагентів. Можливе утворення неспецифічних преципітаційних ліній, які можуть перетинати контрольні лінії та зазвичай не мають лінії ідентичності з контрольними.

Негативний – результат вважається негативним, якщо немає утворення ліній преципітації з антигеном (осад у вигляді білої дуги) та не утворюється зв'язок з позитивним контролем.

Позитивний – результат вважається позитивним, якщо є утворення ліній преципітації з антигеном і осад у вигляді дуги є продовженням дослідного зразка та позитивного контролю.

Сумнівно позитивний – сироватка, що тестується, вважається сумнівною, якщо спостерігаються незначні відхилення ліній (неповна дуга).

Сильно позитивний – лінія дуги преципітації повертається в напрямку лунки з антигеном перш, ніж досягнути лунки з сироваткою, що тестується. Дуга між сироваткою, що тестується та антигеном насичена, широка та розташована близько до центральної лунки.

Неспецифічний – для негативної сироватки лінія дуги перетинає неспецифічні лінії та направлена до лунки з сироваткою, що тестується. Для позитивної сироватки – дуга преципітації не утворює суцільну лінію з еталонною.

5. Інтерпретація результатів: у коней на ранніх стадіях інфекції серологічна реакція в РДП може бути негативною. У таких тварин слід повторно відібрати кров через 3–4 тижні. Для встановлення діагнозу у лоша може знадобитися визначення статусу антитіл у матері. Якщо кобила передала антитіла до ІНАН через молозиво, то слід дочекатися зниження рівня материнських антитіл, що зазвичай триває не менше 6 міс. Послідовне тестування лоша щомісяця дозволяє відслідковувати зниження рівня антитіл. Щоб підтвердити відсутність інфекції у лоша, після початково позитивного результату необхідно отримати негативний результат не раніше, ніж через 2 міс після ізоляції тварини від позитивної матері або інших інфікованих коней. Варто зазначити, що материнські антитіла можуть зберігатися до 12-місячного віку, тому доцільно розглянути альтернативні

методи діагностики, наприклад, ПЛР для виявлення присутності або відсутності вірусу в крові лоша [4, 17].

2.2. Методика постановки імуноферментного аналізу (ІФА)

Діагностичні набори ІФА як і РДП зазвичай спрямовані на виявлення антитіл проти основного капсидного білка р26, а окремі тест-системи додатково виявляють антитіла до глікопротеїну gp45. У цих тестах можуть використовуватись як синтетичні злиті білки, так і рекомбінантні антигени [13, 17].

Реактиви та обладнання для проведення аналізу:

- набір діагностичної імуноферментної тест-системи;
- дистильована вода;
- розчин етилового спирту (70 %);
- вата гігроскопічна;
- фільтрувальний папір;
- одноканальні дозатори з перемінним об'ємом на 1–20 мкл, 50–200 мкл, 200–1000 мкл та накінечники до них;
- багатоканальні дозатори (8-канальні) з перемінним об'ємом на 50 – 200 мкл та накінечники до них;
- мірні циліндри та стакани до них;
- ванночки для реагентів;
- мікропробірки для попереднього розведення (за необхідності);
- термошейкер з температурою 21 – 37 °С;
- вошер для промивання мікропланшетів;
- 96-луночний електрофотометр (імуноферментний аналізатор) з довжиною хвилі 450 – 620 нм;
- вортекс;
- контейнер для збирання твердих забруднених відходів;

- контейнер для зливання відпрацьованих забруднених рідин (деякі компоненти реакції є канцерогенами, тому їхні залишки необхідно обережно відбрати в контейнери для утилізації).

Підготовка до проведення дослідження. Перед початком роботи всі компоненти набору необхідно довести до кімнатної температури (20–25 °C). Після цього реагенти ретельно шутлюються до однорідності за допомогою вортекса або обертальними рухами, з перевертанням вмісту флаконів.

Проведення дослідження. Постановка імуноферментного аналізу, облік та інтерпретація одержаних результатів проводиться згідно листівок-вкладок до діагностичних наборів і включає наступні етапи:

1. Внесення у лунки мікропланшету із сорбованим антигеном досліджуваних проб, а також негативного та позитивного контролів.

***Примітка:** досліджувані зразки та контролі розводяться спеціальними буферними розчинами, що входять до складу тест-наборів, згідно листівок-вкладок.*

2. Відмивання лунок від антитіл та антигенів, що не утворили імунний комплекс, з дотриманням циклів відмивання.

***Примітка:** розчин для відмивання лунок мікропланшету готується із концентрату, що входить до набору тест-системи згідно листівки-вкладки до неї.*

3. Внесення розчину кон'югату.

***Примітка:** розчин кон'югату готується із концентрату, що входить до набору тест-системи згідно листівки-вкладки до неї.*

4. Повторне відмивання лунок мікропланшету.
5. Додавання проявника (субстрату-хромогену чи ферментного субстрату).
6. Зупинення ферментативної реакції стоп-реактивом.

7. Детекція утвореного комплексу шляхом вимірювання оптичної густини вмісту лунок мікропланшету на спектрофотометрі за довжини хвилі, зазначеної у листівці-вкладці.

У разі позитивного результату ІФА, його слід підтверджувати за допомогою РДП, оскільки для ІФА відомі випадки хибнопозитивних реакцій [17].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. An, Q., Li, Y., Sun, Z., Gao, X., & Wang, H. (2024). Spatiotemporal analysis of equine infectious anemia and prediction of risk areas in Europe. *Preventive veterinary medicine*; 230:106281.
2. Brindley, M. A., & Maury, W. (2008). Equine infectious anemia virus entry occurs through clathrin-mediated endocytosis. *Journal of virology*; 82(4):1628–1637.
3. Cappelli, K., Capomaccio, S., Cook, F. R., Felicetti, M., Marenzoni, M. L., Coppola, G., Verini-Supplizi, A., Coletti, M., & Passamonti, F. (2011). Molecular detection, epidemiology, and genetic characterization of novel European field isolates of equine infectious anemia virus. *Journal of clinical microbiology*; 49(1):27–33.
4. Coggins, L., Norcross, N. L., & Nusbaum, S. R. (1972). Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. *American journal of veterinary research*; 33(1):11–18.
5. Cook, R. F., Leroux, C., & Issel, C. J. (2013). Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: a review. *Veterinary microbiology*; 167(1-2):181–204.
6. Equine infectious anemia. In: The Merck veterinary manual, 7th Edition. – Merck and Co, 2022. – 5 p.
7. Flynn K., & Pelzel-McCluskey A. (2019). American Association of Equine Practitioners (AAEP). Equine Infectious Anemia Disease Guidelines; 4 p.
8. Hu, Z., Chang, H., Ge, M., Lin, Y., Wang, X., Guo, W., & Wang, X. (2014). Development of antigen capture ELISA for the quantification of EIAV p26 protein. *Applied microbiology and biotechnology*; 98(21):9073–9081.
9. Malik P., Singha H., & Sarkar S. (2017). Equine Infectious Anemia. In: Emerging and Re-emerging Infectious Diseases of Livestock / J. Bayry; P. 217–2018.
10. McConnico R. S., Issel C. J., Cook S. J., Cook R. F., Floyd C. & Bisson H. (2000). Predictive methods to define infection with equine infectious anemia virus in foals out of reactor mares. *Journal of Equine Veterinary Science*; 20(6):387–392.

11. Nagarajan, M. M., & Simard, C. (2001). Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. *Journal of virological methods*; 94(1-2):97–109.
12. Ostuni, A., Iovane, V., Monné, M., Crudele, M. A., Scicluna, M. T., Nardini, R., Raimondi, P., Frontoso, R., Boni, R., & Bavoso, A. (2023). A double-strain TM (gp45) polypeptide antigen and its application in the serodiagnosis of equine infectious anemia. *Journal of virological methods*; 315:114704.
13. Rodríguez Domínguez, M. C., Montes-de-Oca-Jiménez, R., Vázquez Chagoyan, J. C., Pliego, A. B., Varela Guerrero, J. A., Coroas González, L. I., & Bernabé, S. L. (2021). Evaluation of Equine Infectious Anemia Virus by the Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay EIA-LAB as Screening Tools in Mexico. *Journal of equine veterinary science*; 98:103372.
14. Sack, A., Oladunni, F. S., Gonchigoo, B., Chambers, T. M., & Gray, G. C. (2020). Zoonotic Diseases from Horses: A Systematic Review. Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.); 20(7):484–495.
15. Shen, D. T., Crawford, T. B., Gorham, J. R., & McGuire, T. C. (1977). Inactivation of equine infectious anemia virus by chemical disinfectants. *American journal of veterinary research*; 38(8):1217–1219.
16. Tajima, M., Nakajima, H., & Ito, Y. (1969). Electron microscopy of equine infectious anemia virus. *Journal of virology*; 4(4):521–527.
17. Terrestrial Animal Health Code, Ch. 3.6.6. Equine infectious anaemia (NB: Version adopted in 2019); 7 p.
18. Toma B. (1980). Reponse serologique negative persistante chez une jument infectee. *Recueil de Medecine Veterinaire*; 156:55–63.
19. United States Department of Agriculture (USDA) (2007). Equine Infectious Anemia Uniform Methods and Rules. Animal and Plant Health Inspection Service, USDA; 15 p.
20. Wang, H. N., Rao, D., Fu, X. Q., Hu, M. M., & Dong, J. G. (2017). Equine infectious anemia virus in China. *Oncotarget*; 9(1):1356–1364.
21. Інструкція про заходи з профілактики та боротьби з інфекційною анемією коней № 138/4359 від 07.03.2000 р.

22. Інфекційна анемія та ринопневмонія коней (теоретичне та експериментальне обґрунтування засобів діагностики і профілактики): автореф. дис. д-ра вет. наук: 16.00.03 / Галатюк О. Є.; К., 2000; 38 с.

23. Ланова Г. О. (2022). Методи діагностики інфекційної анемії коней, 22-24 вересня 2022, Київ; *Матеріали міжнародної наукової конференції «Єдине здоров'я – 2022»*; с. 363–365.

ПІЩАНСЬКИЙ Олександр Вікторович

кандидат ветеринарних наук,
директор ДНДІЛДВСЕ

АЛЕКСЕЄВА Галина Борисівна

кандидат ветеринарних наук, старший дослідник,
заступник директора з наукового забезпечення лабораторної діагностики
заразних хвороб тварин ДНДІЛДВСЕ

ПОЛЩУК Олеся Дмитрівна

завідувач науково-дослідного відділу імунологічних досліджень ДНДІЛДВСЕ

ПІСКУН Антон Володимирович

кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник
науково-дослідного відділу імунологічних досліджень ДНДІЛДВСЕ

ВАСИЛЬЄВА Тетяна Борисівна

кандидат ветеринарних наук, науковий співробітник
науково-дослідного відділу імунологічних досліджень ДНДІЛДВСЕ

МЄТОЛАПОВА Галина Миколаївна

молодший науковий співробітник
науково-дослідного відділу імунологічних досліджень ДНДІЛДВСЕ

ІНФЕКЦІЙНА АНЕМІЯ КОНЕЙ.

МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ

Методичні рекомендації

В авторській редакції

Підписано до друку __. __. ____ р. Формат _____
Папір друк. №2. Друк офсетний. Ум. друк. арк. ____
Тираж ____ прим. Зам. №__

Видавець: (назва підприємства)
(поштова адреса видавця)
Тел.: (телефони видавця)
E-mail: (електронна пошта видавця)