

ИНФЕКЦИОННЫЙ ГИДРОПЕРИКАРДИТ

РЕЗЮМЕ

Инфекционный гидроперикардит (известный также под названием каудриоз) – это острое, смертельное, неконтагиозное, инфекционное, клещевое риккетсиозное заболевание жвачных животных, вызываемое возбудителем Ehrlichia ruminantium (ранее Cowdria ruminantium) и передаваемое клещами Amblyomma. Оно распространено почти во всех странах Африки южнее Сахары и на прилегающих к ней островах, а также в странах Карибского бассейна, представляя угрозу американскому материку. Заболевание может вызывать высокую смертность (до 90%) у восприимчивых домашних жвачных животных. Козы и овцы более восприимчивы, чем крупный рогатый скот, и европейские породы обычно более восприимчивы, чем местные африканские породы.

С клинической точки зрения характеризуется как острая болезнь с внезапным повышением температуры до высокой, угнетенным состоянием, признаками нервного расстройства и высокой смертностью. Сопутствующими патологоанатомическими признаками обычно является водянка околосердечной сумки, гидроторакс и отёк лёгких. Острая и сверхострая форма болезни протекают следующим образом: в первом случае наблюдается высокая смертность без многочисленных клинических проявлений, а во втором случае наблюдается более высокий уровень выздоровления.

Выздоровевшие после болезни животные становятся переносчиками инфекции. Некоторые дикие животные могут играть роль резервуара; гривастый замбар, белохвостый олень и газель восприимчивы к данной инфекции и среди них может наблюдаться высокая смертность.

Идентификация агента: *Специфический диагноз инфекционного гидроперикардита базируется на обнаружении колоний E. ruminantium в капиллярных эндотелиальных клетках головного мозга. При отсутствии соответствующих инструментов часть мозжечка можно легко извлечь с помощью кюретки через отверстие головчатой кости после того, как будет отрезана голова, в то время как образец коры головного мозга можно получить через отверстие, сделанное в черепе с помощью молотка и большого гвоздя. Мазки головного мозга готовят методом раздавливания небольшого кусочка коры головного мозга или мозжечка между двумя предметными стёклами микроскопа. Капилляры расплющивают в один клеточный слой, проталкивая одно предметное стекло по другому. Мазки высушивают на воздухе, фиксируют метанолом и окрашивают красителем Гимза. При использовании быстросействующих красителей мазки можно фиксировать и окрашивать в течение 1 минуты. Колонии (кластеры) имеют окраску от красновато-фиолетовой до синей и очень часто располагаются вблизи ядра инфицированной эндотелиальной клетки. Они могут быть в ограниченном количестве и*

их трудно обнаружить, особенно в случаях сверхострой болезни, но они всегда присутствуют в головном мозгу жвачного животного, погибшего от инфекционного перикардита, если это животное не лечили медикаментами. Вероятность выявления колоний низка у животных, которых лечили антибиотиками. Колонии всё ещё можно различить через 2 дня после гибели в головном мозгу, который хранили при комнатной температуре (20-25°C), и можно различить в головном мозгу, который до 34 дней хранили в холодильнике при 4°C.

*Свежую цельную кровь, взятую от животных с подозрением на болезнь, можно вводить внутривенно восприимчивой овце или козе. Развитие клинических признаков и наличие *E. ruminantium* в головном мозгу зараженного животного во время лихорадочной реакции являются диагностическими показателями инфекционного гидроперикардита. Из соображений благополучия животных следует избегать использования данного метода.*

Ehrlichia ruminantium можно выделять из крови инфицированного хозяина с использованием культивирования на эндотелиальных клетках жвачных животных. Когда проявляется цитопатогенное действие в виде бляшек клеточного лизиса, присутствие характерных морул подтверждается с помощью окрашивания клеточного монослоя эозин-метиленсиним или с помощью иммунофлуоресценции или иммунопероксидазного метода с использованием специфической антисыворотки.

*ДНК-зонды и особенно более чувствительная полимеразная цепная реакция (ПЦР) используются для обнаружения присутствия *E. ruminantium* в крови животных с клиническими признаками и у клещей-переносчиков, и в меньшей степени в крови или костном мозгу животных-носителей. Кроме диагностических целей ПЦР широко применяется для изучения генома *E. ruminantium* и проведения эпизоотологических исследований.*

Серологические тесты: *Серологические тесты включают в себя непрямые реакции флуоресцирующих антител, твердофазные иммуноферментные анализы (ИФА) и вестерн-блоттинг. Однако в случае использования целого возбудителя *E. ruminantium* в качестве антигена, во всех этих тестах имеют место перекрёстные реакции с *Ehrlichia spp.* Серология имеет ограниченное диагностическое использование.*

*В одном из недавно разработанных ИФА используется рекомбинирующий антиген, представленный как частичный фрагмент антигенов рекомбинантного главного антигенного протеина 1 (MAP1) - MAP1-B ИФА. Данный тест продемонстрировал разительное улучшение специфичности по сравнению с предшествующими тестами. Хотя данный тест и является более специфичным, тем не менее, он выявляет перекрестно-реагирующие антитела к другим микроорганизмам *Ehrlichia*. Следовательно, доказательство наличия инфекционного гидроперикардита должно основываться на эпидемиологических данных и дополнительных молекулярных исследованиях, указывающих на наличие данного микроорганизма. ИФА сделал интерпретацию результатов серологических тестов более достоверной в регионах, где инфекции *Ehrlichia* встречаются у жвачных животных. Эти тесты могут оказать*

помощь в мониторинге экспериментальных инфекций и в оценке иммунной реакции иммунизированных животных, чья серологическая история до иммунизации известна. Серология имеет очень ограниченное диагностическое применение, так как клинически зараженные животные остаются серонегативными во время лихорадочной реакции и у них происходит сероконверсия после выздоровления.

Серология также не является эффективным исследованием при импортировании. Прежде чем импортировать животных из эндемического района по инфекционному гидроперикардиту, важно изучить эпидемиологические данные, чтобы установить, что стадо и местные клещи не заражены; к тому же необходимо провести повторное ПЦР-исследование, чтобы доказать, что патогенный агент не присутствует в стаде.

Требования к вакцинам и диагностическим биологическим препаратам: До сих пор в некоторых странах применяют иммунизацию против инфекционного гидроперикардита методом «инфицирования и лечения» с использованием инфицированной крови. Вакцина первого поколения, состоящая из инактивированных очищенных элементарных телец *E. ruminantium*, эмульгированных в адьюванте Montanide ISA 50, продемонстрировала многообещающие результаты в экспериментально-контролируемых условиях, и продемонстрировала выраженную защиту в поле. Был аттенуирован дополнительный изолят *Welgevonden*, который дал хорошую защиту; также выраженная защита была получена при использовании ДНК-вакцинации. Однако ни одна из данных новых экспериментальных вакцин не была в полной мере валидирована в полевых условиях. Испытания в полевых условиях показали, что антигенное разнообразие имеет большое значение при составлении эффективных вакцин, и крайне необходимы дальнейшие исследования для выпуска любой вакцины, используемой в полевых условиях.

А. ВВЕДЕНИЕ

Инфекционный гидроперикардит (каудриоз) – это риккетсиозная болезнь домашних и диких жвачных животных, вызываемая возбудителем *Ehrlichia ruminantium* (ранее *Cowdria ruminantium*) и передаваемая *Amblyomma* - клещами (Becker et al., 2002; Dumler et al., 2001; Peter et al., 2002). Название болезни имеет также синонимы - malkopsiekte (африканский), péricardite exsudative infectieuse (французский), hidrocarditis infecciosa (португальский), idropericardite dei ruminanti (итальянский) – и ряд названий на различных африканских языках (Camus & Barre, 1988)). *Ehrlichia ruminantium* классифицируется в отряд Rickettsiales и в подсемейство Anaplasmataceae вместе с родом *Anaplasma*. Несмотря на то, что жвачные животные остаются главной целью данного патогена, в Южной Африке сообщалось о возможном случае заражения собак *E. ruminantium* (1), и совсем недавно было подозрение, что *E. ruminantium* вызвал несколько случаев быстро прогрессирующего смертельного энцефалита у людей (Louw et al., 2005). Однако во всех случаях доказательство присутствия инфекции *E. ruminantium* основывалось на молекулярном обнаружении. Выделение и характеристика инфекционного агента

необходима до того как *E. ruminantium* будет считаться эмерджентным патогеном для других видов животных помимо жвачных, и особенно для человека.

Инфекционный гидроперикардит встречается почти во всех странах Африки южнее Сахары, где есть клещи *Amblyomma*, а также на окружающих островах: Мадагаскар, Реюньон, Маврикий, Занзибар, Коморские острова и Сан-Томе. Болезнь регистрируют также в странах Карибского бассейна (Гваделупа, Мари-Галант и Антигуа) (Pereau et al., 1980), откуда она угрожает американскому материку. Инфицироваться могут все домашние и дикие жвачные животные, но первые являются наиболее восприимчивыми. Местные домашние жвачные животные обычно являются более резистентными к болезни. Дикие животные могут играть роль резервуара, но гривастый замбар, белохвостый олень, газель, индийский олень, используемые для разведения диких животных, по-видимому, являются главными видами диких жвачных животных, в отношении которых инфекционный гидроперикардит имеет значительные экономические последствия (Peter et al., 2002).

Средняя продолжительность инкубационного периода в естественных условиях составляет 2-3 недели, но может варьировать от 10 дней до 1 месяца. В большинстве случаев инфекционный гидроперикардит – это острая фебрильная болезнь с внезапным повышением температуры тела, которая в течение 1-2 дней после начала лихорадки может превышать 41 °С. Она остаётся высокой в течение 4-5 недель с небольшими колебаниями и снижается незадолго до смерти.

Лихорадка сопровождается потерей аппетита, иногда вялостью, диареей, в частности у крупного рогатого скота (Bezuidenhout et al., 1994), и одышкой, характерной для отёка лёгких. Постепенно развиваются признаки нервного расстройства. Животное демонстрирует беспокойство, ходит кругами, производит сосательные движения и стоит неподвижно с тремором поверхностных мышц. Крупный рогатый скот может биться головой о стену или у него может быть агрессивное или беспокойное поведение. В конце концов, животное падает на землю, в этот момент у него можно наблюдать дёрганье конечностей и тоническое сокращение мышц спины и шеи с запрокидыванием головы и вытягиванием конечностей, произвольные ритмические двухфазные движения глаз и жевательные движения. Животное обычно умирает во время или после такого приступа.

В зависимости от породы жвачного животного и от штамма *E. ruminantium* может иметь место подострый инфекционный гидроперикардит с менее выраженными признаками и сверхострый инфекционный гидроперикардит с внезапной смертью.

Наиболее распространёнными макроскопическими поражениями являются водянка околосердечной сумки, гидроторакс, отёк лёгких, гиперемия кишечника, отёк медиастинальных и бронхиальных лимфоузлов (Bezuidenhout et al., 1994), петехиальные кровоизлияния на наружной оболочке сердца и на внутренней оболочке сердца, гиперемия головного мозга и умеренная спленомегалия.

Предварительная диагностика инфекционного гидроперикардита базируется на обнаружении *Amblyomma* - переносчиков, клинических нервных признаков и отёчных жидкостей в окологердечной сумке и грудной клетке при патологоанатомическом исследовании. При постановке диагноза на основании клинических признаков следует принимать во внимание другие заболевания: церебральный бабезиоз крупного рогатого скота и тейлериоз, анаплазмоз, ботулизм, гемонхоз мелких жвачных животных, бешенство и отравление.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

1. Идентификация агента

Во время фебрильной фазы *E. ruminantium* можно легко выделить в культуре крови или плазмы; однако трудно выявить данные микроорганизмы в мазках крови. Типичные колонии *E. ruminantium* можно наблюдать в мазках головного мозга, приготовленных после смерти животного, и это является основанием для диагностирования инфекционного гидроперикардита.

Нет необходимости вскрывать череп. Альтернативный метод (Schreuder, 1980) заключается в отрезании головы перед первым шейным позвонком. Затем вводят кюретку через большое затылочное отверстие между продолговатым мозгом и оболочкой головного мозга. Кюретку поворачивают в направлении головного мозга и извлекают с частью мозжечка. Другой метод заключается в том, что делают отверстие в черепе с помощью молотка и большого гвоздя и отбирают образец коры головного мозга с помощью иглы, прикреплённой к шприцу. Эти методы снижают также опасность для оператора в случаях, если причиной нервных признаков было бешенство.

У живого животного биоптаты головного мозга можно получить асептическим и безвредным способом после местной анестезии, хотя это довольно трудно: крупных и, особенно, рогатых животных требуется фиксировать. Колонии *Ehrlichia* наблюдают в течение фебрильного периода. Этот метод полезен для экспериментальных исследований, но не подходит для рутинной диагностики.

Колонии *E. ruminantium* всё ещё можно наблюдать через 48 часов после смерти животного в головном мозгу, который хранили при комнатной температуре (20-25°C), и до 34 дней в головном мозгу, который хранили в холодильнике при 4°C (Camus & Varre, 1988).

Небольшой фрагмент серого вещества (размером приблизительно со спичечную головку) помещают на предметное стекло микроскопа, раздавливают другим предметным стеклом и, поддерживая давление, предметные стёкла протаскивают одно по другому с целью получения одного слоя клеток. Затем предметные стёкла высушивают на воздухе, фиксируют в метаноле, окрашивают красителем Гимза, разбавленным буфером Sørensen (2,54 г KH_2PO_4 ; 8,55 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; разведённые до 5 литров дистиллированной водой), рН 7,2, и отмывают водопроводной водой. Красители Гимза для быстрого окрашивания

(DiffQuick, RAL555, краситель Филда, краситель CAM's Quick) дают более быстрые результаты, но контраст цветов обычно хуже. Некоторые быстрые красители обеспечивают отличный контраст, например, краситель Нема 3.

Предметные стёкла исследуют под микроскопом при небольшом увеличении (x10 объектив) с целью определения местонахождения церебральных капилляров. Масляно-иммерсионная линза с увеличением, по меньшей мере, x50, эффективна для идентификации колоний риккетсий. Для того чтобы дифференцировать колонии *E. ruminantium* от других гемопаразитов (*Babesia bovis*), некоторых клеток крови (тромбоцитов, гранулоцитов), нормальных внутриклеточных структур (митохондрий, гранул мастоцитов) или структур, вызванных обработкой красителями (преципитатов красителей), т.д., необходим опыт. Специфичность показателей может быть улучшена путём окрашивания фиксированных формалином срезов головного мозга с использованием иммунопероксидазных методов.

Колонии *Ehrlichia* формируются из кластеров гранул (0,2-0,5 мкм), иногда организованных в виде кольца или подковы (1-3 мкм), которые располагаются вблизи ядра внутри эндотелиальной клетки. Гранулы могут быть в ограниченном количестве, особенно в сверхострых случаях, но они всегда присутствуют в головном мозгу животного, погибшего от инфекционного перикардита. Однако, если животное за 48 часов до этого лечить медикаментами (доксциклин или окситетрациклином), гранулы *Ehrlichia* сливаются, очень затрудняя диагностику, а иногда делая её невозможной.

Свежую цельную кровь, взятую от подозрительных животных, можно вводить внутривенно восприимчивой овце или козе. Развитие клинических признаков и наличие *E. ruminantium* в головном мозгу привитого животного являются диагностическими показателями инфекционного гидроперикардита.

Для обнаружения того факта, что организмы *E. ruminantium* создают внутри вакуолеподобную структуру, которая окружена мембраной в цитоплазме эндотелиальной клетки, использовали трансмиссионную электронную микроскопию (Pienaar., 1970). Каждый организм покрыт двойной мембраной. Внутри вакуолеподобной структуры идентифицируют электронно-плотные формы *E. ruminantium* (элементарные тельца), а также промежуточные сетчатые образования.

1.1. Выделение *Ehrlichia ruminantium* с использованием культивирования *in-vitro*

Хотя многочисленные клеточные линии поддерживают рост *E. ruminantium*, выделение не является наиболее предпочтительным тестом, используемым для быстрого подтверждения диагноза каудриоза, так как на проведение этой лабораторной процедуры уходит много времени, и она является трудоемкой. Для быстрой диагностики ПЦР/молекулярная диагностика является предпочтительной. Однако выделение *E. ruminantium* необходимо для типирования штаммов, присутствующих в регионе, с целью претворения в жизнь программ вакцинации. *Ehrlichia ruminantium* можно выделять из крови животных-бациллоносителей

методом культивирования на эндотелиальных клетках жвачных (Smith et al., 1998). Для выделения чаще всего используют эндотелиальные клетки из пупочного канатика, аорты или лёгочной артерии различных видов жвачных (крупный рогатый скот, козы, овцы), несмотря на то, что для рутинного культивирования микроорганизма использовали другие типы эндотелиальных клеток (капилляры головного мозга, циркулирующие эндотелиальные клетки, т.д.). С целью выращивания *E. ruminantium* можно также использовать эндотелиальные клетки от соболя, антилопы канна, буйвола, лесной антилопы и кабана. До сих пор для выделения не была предписана ни одна стандартная клеточная линия.

1.1.1. Процедура выделения

- i) Кровь животного с реакцией (оптимальное время для выявления организма – второй или третий день лихорадочной реакции) собирают в антикоагулянт (гепарин или цитрат натрия, не этилендиаминтетрауксусная кислота) и разводят в соотношении 1/2 в культуральной среде, состоящей из минимальной эссенциальной среды Глазго, обогащённой 10% инактивированной фетальной телячьей сывороткой, 2,95 мг/мл триптоза-фосфатного бульона, 200 мМ L-глутамин и антибиотиками в случае необходимости (пенициллин 100 международных единиц/мл, стрептомицин 100 мкг/мл).
- ii) Культуральную среду сливают с монослоя эндотелиальных клеток и добавляют инфицированную кровь (приблизительно 2 мл на 25-см² флакон). Флакон инкубируют при 37°C на качающейся платформе в течение 2 часов.
- iii) После инкубирования кровь сливают и монослой осторожно отмывают три раза предварительно подогретой культуральной средой. Добавляют свежую культуральную среду, и флакон инкубируют при 37°C. Среду меняют два раза в неделю.

(Применение плазмы вместо крови более эффективно, если она отбирается от животного с лихорадочной реакцией >41°C. В этом случае этапы ii и iii можно заменить следующими процедурами:

- a) Высейте 4 мл плазмы (можно использовать разведенный посевной материал, если имеется ограниченное количество плазмы) на чувствительную культуру эндотелиальных клеток и инкубируйте в течение 1 часа при 37°C на качающейся платформе.

- b) Отмойте плазму питательной средой и затем добавьте 5 мл питательной среды (на 25-см² флакон) и наблюдайте за появлением цитопатогенного действия.

- iv) Монослой регулярно проверяют на появление мелких бляшек клеточного лизиса. Первые бляшки обычно появляются через 2 недели. Когда лизис достигает 80% клеточного слоя, проводят пассирование на неинфицированных клеточных монослоях. Оставшиеся клетки окрашивают эозином/метиленом голубым или Гимза или DiffQuick и исследуют с помощью микроскопа на наличие морул *E. ruminantium*. Альтернативным образом клетки можно окрашивать в непрямой реакции флуоресцирующих антител или иммунопероксидазной реакции с использованием специфической для *E. ruminantium* антисыворотки; иммунопероксидазная реакция не является широко используемым методом.

1.2. Выделение *Ehrlichia ruminantium* с использованием культивирования *in-vivo*

Вполне возможно оценить присутствие инфекционного гидроперикардита в стаде, регионе или стране или выделить штамм *E. ruminantium* путём введения крови или гомогената клещей восприимчивому животному. Однако из соображений благополучия животных использование данного метода не рекомендуется. Кровь от отдельных животных или объединённую в пул кровь медленно вводят в дозе 10 - 100 мл внутривенно восприимчивой козе или овце. Кровь в качестве прививочного материала для определения инфекционного статуса стада будет инфекционной, если имеются клинически инфицированные животные-доноры; однако данный метод редко выявляет инфекцию в животных-носителях/выздоровевших животных. Другой метод заключается в сборе и гомогенизации взрослых клещей *Amblyomma* и, после центрифугирования гомогената, в введении образовавшейся надосадовой жидкости восприимчивым хозяевам. Данный метод более чувствительный, чем кровь от животных с подозрением на болезнь (особенно если кровь от выздоровевших животных), так как концентрация *E. ruminantium* выше в клещах, чем в крови. Однако уровень инфицирования клещами в поле варьируется и иногда бывает низким до 1% (Samus et al., 1996г.). В этом случае для обнаружения инфекции необходимо использовать как можно больше клещей, по меньшей мере, 100 клещей. В обоих случаях прививочный материал с 10% диметил сульфоксидом (конечная концентрация) можно хранить в жидком азоте в течение нескольких лет. Следует иметь в виду, что введение клещевых гомогенатов восприимчивым животным может вызвать анафилаксию, которую можно предупредить одновременным введением адреналина. Развитие клинических признаков и обнаружение циркулирующих риккетсий с помощью молекулярных методов и/или демонстрация *E. ruminantium* в головном мозгу привитого жвачного животного на второй или третий день лихорадки, являются диагностическими показателями инфекционного гидроперикардита. В дополнение к этому подтверждение может

быть достигнуто выделением *in-vitro* на эндотелиальных клетках с использованием плазмы от привитых животных.

2. Молекулярные методы

2.1. Обнаружение *Ehrlichia ruminantium* с использованием ДНК-зондов

Фрагмент геномной ДНК рСS20, специфичный для *E. ruminantium*, был клонирован и использован в качестве зонда нуклеиновых кислот (Mahan et al, 1992; Waghela et al, 1991). Он распознаёт все штаммы *E. ruminantium*, протестированные до последнего времени. Этот зонд, обозначенный рСS20, легко обнаруживает инфекцию у клинически больных животных и животных, экспериментально инфицированных клещами *Amblyomma* (Mahan et al., 1992; 1995b; 2000; Yunker et al., 1993). Однако он недостаточно чувствителен для обнаружения большинства животных-носителей или инфекций низкого уровня у клещей (Peter et al., 2000, 2002). Зонд рСS20 доказал, тем не менее, что он более чувствителен по сравнению с зондами 16S и MAP1 (главный антигенный белок 1) для обнаружения *E. ruminantium* у клещей при гибридизации с амплифицированным полимеразной цепной реакцией (ПЦР) продуктом гомологичного ДНК-фрагмента (Allsopp et al., 1999).

2.2. Обнаружение *Ehrlichia ruminantium* с использованием ПЦР и гнездовой ПЦР

Два праймера – AB128 (5' АСТ-АГТ-АГА-ААТ-ТГС-АСА-АТС-ТАТ-3') и AB129 (5'-ТГА-ТАА-СТТ-ГГТ-ГСГ-ГГА-ААТ-ССТ-Т-3') – были сконструированы из ДНК-последовательности зонда рСS20 (Mahan et al., 1992) для использования в ПЦР.

Данные праймеры амплифицируют фрагмент ДНК в 279 пар оснований, специфичный только к *E. ruminantium*. Гибридизация амплифицированных продуктов ПЦР с меченым зондом рСS20, в качестве дополнительного этапа, приводит к повышению чувствительности анализа в 350 раз по сравнению с использованием зонда нуклеиновых кислот для выявления *E. ruminantium* непосредственно в ДНК, экстрагированной из клещей. С помощью ПЦР обнаруживают низкие уровни инфекции у животных и у клещей, напившихся крови животных-носителей, тогда как реакция гибридизации только с одним зондом рСS20 (без предварительной ПЦР) обычно остаётся отрицательной (Peter et al., 1995). В экспериментальных условиях было выявлено, что предел обнаружения традиционной ПЦР колеблется между 10 и 10² организмами, тогда как после ПЦР/гибридизации он был между 1 и 10 организмами. Было продемонстрировано, что ПЦР/гибридизация обнаруживает 37 штаммов из всех эндемичных областей со специфичностью 98%. Однако чувствительность ПЦР варьируется, колеблясь от 88% до 97% с образцами клещей, содержащими от 10⁷ до 10⁴

организмов, и снижаясь до 61% и 28% с образцами, содержащими 10^3 и 10^2 организмов, соответственно (Peter et al., 2000). Следовательно, уровень 86% положительного тестирования клещей, напившихся крови от клинически реагирующего животного, снижался до 21% в случае клещей, напившихся крови от животных-носителей, из-за более низкого содержания риккетсий у таких животных. ПЦР/гибридизация широко используется для определения эпидемиологии инфекционного гидроперикардита в южной Африке.

Были разработаны две гнездовые ПЦР для выявления низких уровней риккетсий и для того чтобы устранить необходимость в этапе гибридации (Martinez et al., 2004; Semu et al., 2001). В обеих используется участок rCS20 в качестве мишени. В анализе Semu и др. используются два внешних праймера U24 (5'-TTT-CCC-TAT-GAT-ACA-GAA-GGT-AAC-3') и L24 (5'-AAA-GCA-AGG-ATT-GTG-ATC-TGG-ACC-3') и AB128 и AB129 для гнездовой реакции. Чувствительность выявления данного анализа – одна генная копия фрагмента rCS20 или 1 организм. В другой гнездовой ПЦР (Martinez et al., 2004) используется пара внешних праймеров, которая включает смысловой праймер AB128 вместе с антисмысловым праймером AB130. Они амплифицируют фрагмент в 413 пар оснований, применяемый в качестве матрицы во втором раунде ПЦР с использованием AB128 и AB129 в качестве внутренних праймеров. Использование праймеров AB128 и AB129 даёт возможность избежать необходимости повторно проводить полную оценку специфичности теста. Гнездовая ПЦР демонстрирует стократное повышение чувствительности по сравнению с обычной ПЦР и средний предел обнаружения 6 организмов. Прямым следствием этого было повышение уровня обнаружения у диких клещей с 1,7% до 36% в эпизоотологическом исследовании, проведённом в бассейне Карибского моря. Предел обнаружения сравним с пределом обнаружения метода ПЦР/гибридации, который, однако, является гораздо более сложным и продолжительным по времени проведения. Гнездовая ПЦР с rCS20 позволяет на регулярной основе обнаруживать *E. ruminantium* организмы у клещей, в крови, головном мозгу и лёгких инфицированных животных независимо от того, обрабатывались ли образцы в свежем виде или после замораживания или хранения в 70% этаноле.

Одним недостатком гнездовой ПЦР является то, что необходима исключительная осторожность, чтобы не допустить контаминации при многократном открывании пробирок, содержащих первую ПЦР-реакцию при проведении гнездовой реакции.

Параллельно была разработана гнездовая ПЦР, нацеленная на полный полиморфный ген *tar1*, с целью типирования штаммов с использованием полиморфизма рестрикционных фрагментов или секвенирования фрагмента амплификации непосредственно из патологических образцов, которые были положительными в гнездовой ПЦР с rCS20 (Martinez et al., 2004). Дополнительная гнездовая ПЦР нацелена на полиморфный ген *tar1* и

может быть использована для типирования циркулирующих штаммов инфекционного гидроперикардита в целях выбора вакцины и борьбы с болезнью. Проводится анализ ампликонов ПЦР с использованием полиморфизма рестрикционных фрагментов или секвенирования. В полевых условиях наблюдают высокое генетическое разнообразие *E. ruminantium*, которое влияет на разработку вакцин и требует дальнейшего изучения. Нацеленная на *map1* гнездовая ПЦР имеет хорошую производительность, несмотря на то, что её чувствительность слегка ниже чувствительности гнездовой ПЦР с pCS20. Её предел обнаружения оценивался в 60 организмов и только 91% образцов, которые были положительными в гнездовой ПЦР с pCS20, были также положительными в нацеленной на *map1* гнездовой ПЦР; некоторые положительные результаты низкой интенсивности, полученные с помощью гнездовой ПЦР с pCS20, были отрицательными в нацеленной на *map1* гнездовой ПЦР.

Праймеры 32F1 и 32R1, сконструированные из последовательности MAP1 гена *E. ruminantium*, а также дополнительные наборы праймеров, сконструированные для нацеливания на гены *E. ruminantium* MAP1, MAP2, *gltA* и 16SrDNA, применялись в ПЦР для обнаружения патогена в клещах, в крови и костном мозгу овец-носителей и диких африканских копытных животных, но эти методы не были широко апробированы и использованы.

Несмотря на то, что методы ПЦР доказали свою высокую эффективность в обнаружении инфекции у клещей или в образцах от животных, отобранных во время клинической фазы болезни или после смерти, было проведено лишь ограниченное число исследований по оценке их пригодности для здоровых жвачных животных - носителей. Возбудителя *Ehrlichia ruminantium* можно легко обнаружить в крови инфицированных животных как раз перед началом фебрильного периода и в течение нескольких дней после выздоровления (Mahan et al., Semu et al., 2001), но после этого его обнаружение является спорадическим и, вероятно, зависит от уровней риккетсемии. В одном проведённом в Зимбабве исследовании было обнаружено, что только от 3,3% до 26,7% крупного рогатого скота и 23,3% коз были положительными, тогда как данные о клещах, отобранных в этом же регионе, свидетельствовали о том, что учитывая возраст крупного рогатого скота и коз, все из них контактировали или были инфицированы *E. ruminantium* (Mahan et al., 1998b). Было проведено сравнение непрямого MAP1-В ИФА и анализа ПЦР/гибридизация с pCS20, для оценки их относительных уровней обнаружения и чувствительности за период 8 недель (тесты проводят каждые 2 недели); для исследования использовались 15 голов крупного рогатого скота в Зимбабве с фермы, эндемичной по инфекционному гидроперикардиту, где контроль за клещами был минимальным, а уровень инфекции высокий (Simbi et al., 2003). Уровень заражения клещами *E. ruminantium* на данной ферме составлял от 10 до 12%. Эти данные продемонстрировали, что анализ ПЦР с pCS20 более

достоверный в плане выявления инфекции в крови данного крупного рогатого скота по сравнению с выявлением антител при помощи непрямого МАР1-В ИФА. Данные животные не всегда были положительными в ПЦР или положительными к антителам в каждое время тестирования, а некоторые животные были отрицательными в ПЦР в течение всего исследования. Эти данные говорят о том, что уровни риккетсий колеблются от высоких до низких, и что ПЦР выявляет инфекцию, когда уровни высокие. Таким образом, выявление животных-носителей/выздоровевших животных менее достоверно по сравнению с выявлением клинически инфицированных животных. Это указывает на тот факт, что для определения статуса инфекции у субклинических животных рекомендуется повторно тестировать кровь таких животных на *E. ruminantium* при помощи анализа ПЦР с рCS20. Неизвестно, является ли отсутствие обнаружения у большинства животных - бациллоносителей результатом недостаточной чувствительности методов ПЦР для выявления очень низкого уровня риккетсий или результатом скачкообразного высвобождения организмов в циркуляцию. Полезным методом подтверждения статуса подозрительного животного-носителя, чья кровь является отрицательной в ПЦР, считается предоставление незаражённым клещам возможности напитаться крови животного и потом протестировать этих клещей с помощью полугнездовой ПЦР с рCS20. Неизвестно, или клещи просто концентрируют циркулирующие организмы, или также увеличивают их количество, или даже индуцируют высвобождение микроорганизмов в циркуляцию во время насыщения.

2.3. Обнаружение *Ehrlichia ruminantium* с использованием приёма обратного линейного блоттинга

Приём обратного линейного блоттинга был использован для одновременного обнаружения и идентификации видов *Anaplasma* и *Ehrlichia*, которые, как известно, встречаются у жвачных животных, на основе различий в небольшом субъединичном рРНК гене (Bekker et al., 2002). Праймеры 16S8FE и B-GA1B-новый были сконструированы из консервативных доменов и использованы для амплификации фрагмента в 492-498 пар оснований 16S рРНК-гена, перекрывающего варибельную область V1. Видоспецифические олигонуклеотидные зонды были сконструированы в этой V1 петле с целью видоспецифического обнаружения *E. ruminantium*, *E. ovina*, *E. sp.* штамма Omatjenne, *Anaplasma marginale*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. ovis* и *A. phagocytophilum*. Один олигонуклеотидный зонд, перекрёстно реагирующий со всеми видами (захватывающий всех зонд), также служил контролем в том случае, если продукт ПЦР не гибридизировался с каким-либо видоспецифическим зондом. При использовании данного метода видоспецифические зонды ковалентно прикрепляются к гибридизационной мембране, которая гибридизуется с продуктом ПЦР, полученным с помощью праймеров 16S8FE и B-GA1B-новый. Было показано, что продукты ПЦР, полученные из вышеупомянутых

микроорганизмов, связываются только со специфическими олигонуклеотидными зондами. Ни один продукт ПЦР не был обнаружен, и отсутствовала гибридизация, когда использовали ПЦР – приём обратного линейного блоттинга применительно к *Theileria annulata*, *Babesia bigemina* или ДНК млекопитающих. Подобным образом отрицательные контрольные клещи всегда были отрицательными при проведении обратного линейного блоттинга, поскольку можно было обнаружить *Ehrlichia ruminantium* инфекцию у 15-70% клещей, которые сосали кровь у экспериментально инфицированных овец или овец, которые в течение длительного времени являлись носителями. В Мозамбике *E. ruminantium* смогли также обнаружить в крови 12 индикаторных мелких жвачных животных, помещённых в полевых условиях вместе с инфицированными животными; смешанная инфекция была обнаружена у пяти из инфицированных животных, таким образом, была подтверждена бесполезность этого метода для обнаружения смешанных инфекций. Однако чувствительность анализа ещё не определена и поэтому сохраняется необходимость дальнейшей валидации данного метода в крупных эпизоотологических исследованиях.

2.4. Обнаружение *Ehrlichia ruminantium* с использованием ПЦР в реальном времени

Были описаны два метода ПЦР в реальном времени (QPCR) для обнаружения и количественного определения организмов *E. ruminantium*.

В первом тесте был амплифицирован фрагмент в 182 пары оснований из непалиморфного гена *map1-1*, и было проведено обнаружение с использованием метода SYBR Green (Postigo et al., 2002). ДНК из шести различных изолятов была успешно амплифицирована. Указанный уровень выявления был выше, чем 0,1 организм/мкл, но эти данные не подвергались глубокому исследованию. Подсчет *E. ruminantium* под микроскопом после окрашивания по Гимза не дает очень точных результатов. Данный метод не обеспечивает значительного повышения чувствительности обнаружения гнездовой ПЦР, хотя он позволяет определить количество организмов *E. ruminantium*. Вдобавок к ограниченной лабораторной валидации, метод QPCR использовался только в одном исследовании, которое было нацелено на отслеживание кинетики *E. ruminantium* в крови экспериментально зараженных овец. *Ehrlichia ruminantium* была обнаружена только во время реакции гипертермии. Таким образом, QPCR не позволяет повысить обнаружение бессимптомных носителей по сравнению с неколичественной ПЦР.

Вторая ПЦР в реальном времени, основанная на методе SYBR Green, была описана и валидирована для использования в целях характеристики репликации и кинетики высвобождения *E. ruminantium* в культурах эндотелиальных клеток и для последующего использования для контроля процесса серийного производства в биореакторах (Reixoto et al., 2005). Продукт представляет собой фрагмент в 873 пары оснований из *map1*-гена. Внешним стандартом для определения количества *E. ruminantium* является плазмид pCI-нео, содержащий одну копию *map1*-мишени, и это является более точным методом для подсчета организмов по сравнению с

методом, описанным ранее, где стандарт основан на подсчете организмов *E. ruminantium* под микроскопом. Динамический количественный диапазон позволяет провести точные измерения в образцах, содержащих от 10^2 до 10^8 генные копии. Данный метод успешно применялся в отношении четырех различных изолятов, но не был валидирован для использования на диагностических образцах.

2.5. Считывание результатов

Так как *E. ruminantium* представляет из себя облигатную внутриклеточную бактерию, которую невозможно культивировать в бесклеточной среде, а её выделение является сложным и занимает несколько недель, приёмы молекулярного обнаружения – это самые лучшие методы диагностики каудриоза. ПЦР проводить легче, и она более чувствительна по сравнению с ДНК-зондами. При проведении ПЦР различных типов, однако, следует быть очень внимательными, чтобы не допустить перекрёстной контаминации между образцами. В каждый тест следует включать отрицательные и положительные контроли. Так как серология инфекционного гидроперикардита имеет несколько ограничений (см. Раздел В.3.), ПЦР можно использовать для подтверждения того, что сероотрицательные животные, происходящие из эндемического региона, не инфицированы, до того как переводить их в свободный от инфекционного гидроперикардита регион, где есть риск заражения в связи с присутствием потенциальных векторов. Однако, несмотря на интересные результаты экспериментов по обнаружению субклинических носителей, до сих пор нет достаточного количества информации о надёжности обнаружения носителей с помощью ПЦР и необходимо провести более обширные исследования в поле для того, чтобы рекомендовать наилучший протокол для выявления животных-носителей. Тем не менее, из результатов исследований крупного рогатого скота в Зимбабве становится ясно, что выявление инфекции в хозяевах-носителях будет сложным и потребует повторного тестирования для подтверждения статуса инфекции (Simbi et al., 2003). Последние результаты, полученные при использовании ПЦР, гнездовой ПЦР или обратного линейного блоттинга, и QPCR показывают, что прямое обнаружение *E. ruminantium* в крови является надёжным только в течение фебрильной фазы болезни или в приближенный к ней период. Методы на основе ПЦР являются более надёжными при обнаружении инфекции у клещей, и они имеют эпизоотологическую ценность при установлении географического распределения *E. ruminantium*. Кроме того, если это необходимо в эндемических регионах, включение тестирования (первоначально незаражённых) клещей, напившихся крови у животного с подозрением на болезнь, могло бы значительно повысить чувствительность обнаружения носителей в случае неудачного проведения серологических методов и ПЦР на образцах крови. Тем не менее, эта процедура неудобна для рутинных диагностических лабораторий, так как требует содержания колоний клещей и возможностей для экспериментального заражения животных.

3. Серологические тесты

Были описаны различные серологические тесты для диагностики инфекционного гидроперикардита: реакция флуоресцирующих антител с использованием

инфицированной *E. ruminantium* культуры эндотелиальных клеток в качестве антигена, непрямой ИФА, конкурентный ИФА (К-ИФА) и вестерн-блоттинг. В настоящее время реакция флуоресцирующих антител с использованием инфицированных *E. ruminantium* мышинных перитонеальных макрофагов (MIFA) (Du Plessis & Malan, 1987) больше не применяется.

Главным недостатком всех этих тестов является обнаружение ложноположительных реакций из-за общих антигенных детерминант *E. ruminantium* MAP1 (Jongejan & Thielemans, 1989) и наличия схожих протеинов у нескольких видов *Ehrlichia* (Mahan et al., 1993; Semu et al., 2001). Почти все эти тесты более не используются для эпизоотологических исследований или диагностики. В некоторых лабораториях реакция флуоресцирующих антител с использованием инфицированной *E. ruminantium* культуры эндотелиальных клеток в качестве антигена ещё используется, но следует проявлять внимательность при интерпретации результатов по причине проблемы, связанной с ложноположительными реакциями.

С целью преодоления проблемы перекрёстных реакций с *Ehrlichia* были разработаны два ИФА на основе рекомбинантного MAP1 антигена. Первый – это непрямой ИФА, который использует иммуногенную область белка MAP1 (называемую MAP1-B) и даёт гораздо меньше перекрёстных реакций с *Ehrlichia spp.* (MAP1-B ИФА) (Van Vliet et al., 1995). Второй – это конкурентный ИФА, который использует MAP1 ген, клонированный в бакуловирус и моноклональные антитела (МАт) против протеина MAP1 (MAP1 К-ИФА) (Katz et al., 1997). Оба теста существенно повысили специфичность, но они всё ещё демонстрируют некоторую реактивность с сыворотками высокого титра против *E. canis*, *E. chaffeensis* и неклассифицированного возбудителя белохвостого оленя. До сих пор MAP1-B ИФА был наиболее широко применяемым тестом, и он будет описан более подробно. MAP1-B ИФА не выявляет антитела к *E. muris* (Mahan S.M., pers. comm.) возбудителю *Ehrlichia*, который является близкородственным к *E. ruminantium*; данный возбудитель обнаружен у белохвостого оленя в штате Джорджия, США, и передается клещами *Amblyomma americanum* (Loftis et al., 2006). Следовательно, серология в качестве диагностического метода для обнаружения отдельных животных, подвергнутых воздействию конкретно *E. ruminantium*, не является надежным методом. Серологию следует рассматривать на уровне стада, принимая во внимание эпидемиологическую среду и в случае необходимости, дополнительно применять молекулярные методы.

3.1. Непрямая реакция флуоресцирующих антител с использованием инфицированной культуры эндотелиальных клеток в качестве антигена (CIFA-метод) (Martinez et al., 1990)

Для того чтобы приготовить антиген, штамм *E. ruminantium* культивируют в культурах эндотелиальных клеток жвачных. Когда большинство клеток лизировано, оставшиеся прилипшие клепки соскабливают и смешивают с надосадочной жидкостью. Клетки центрифугируют три раза с забуференным фосфатом физиологическим раствором (ЗФР) при 200 g в течение 10 минут. Из отмытой клеточной суспензии 10 мкл помещают в каждую лунку

предметного стекла для иммунофлуоресценции. Предметные стёкла с антигеном высушивают, фиксируют в ацетоне и хранят при -20°C .

3.1.1. Процедура проведения теста

- i) Тестируемые сыворотки разводят в соотношении 1/20 в ЗФР, добавляют в лунки с антигеном и инкубируют в течение 30 минут во влажной камере при 37°C .
- ii) Предметные стёкла затем отмывают в буфере в течение 15 минут.
- iii) Для покрытия лунок добавляют соответствующий антивидовой конъюгат, обычно разведённый в соотношении 1/60. Предметные стёкла инкубируют снова в течение 30 минут при 37°C .
- iv) После второй отмывки предметные стёкла помещают в глицериновый буфер под покровное стекло и исследуют под флуоресцентным микроскопом.
- v) На каждое предметное стекло наносят контрольные положительные и отрицательные сыворотки.

3.2. Твердофазный иммуноферментный анализ на основе MAP1-B (Semu et al., 2001; Van Vliet et al., 1995)

С помощью вектора pQE9 ПЦР фрагмент MAP1-F2R2, который кодирует аминокислоты 47-152 протеина MAP1, включая иммуногенную область MAP1-B, экспрессируется в *Escherichia coli* M15 [pREP4] как белок слияния, содержащий шесть дополнительных гистидиновых остатков. Рекомбинантный MAP1-B очищают Ni^{2+} -NTA агарозой (агароза нитрил триуксусной кислоты) в условиях денатурации, как описано в инструкциях изготовителя. Антиген хранят при 4°C и каждую серию титруют.

Антиген разводят при 0,5 мкг/мл в 0,05 М в натрий карбонатном буфере, pH 9,6, иммобилизируют на полистироловые планшеты путём инкубирования в течение 1 часа при 37°C и хранят до использования при 4°C . Однако в начальных исследованиях концентрация антигена 2 мкл/мл снизила фоновый шум и повысила специфичность (данные не продемонстрированы, Semu et al., 2001).

3.2.1. Процедура проведения теста

- i) Планшеты блокируют на 30 минут добавлением 100 мкл на лунку 0,1 М ЗФР, pH 7,2, обогащённого 0,1% Твин 20 и 3% обезжиренным сухим молоком (PBSTM).
- ii) Планшеты отмывают три раза ЗФР, обогащённым 0,1% Твин 20 (PBST), и два раза дистиллированной водой.
- iii) 100 мкл опытной сыворотки, разведённой в соотношении 1/100 в Твин 20 и обезжиренном сухом молоке, добавляют в двух экземплярах в лунки, которые затем инкубируют в течение 1 часа при 37°C.
- iv) Планшеты отмывают три раза в Твин 20 и два раза в дистиллированной воде.
- v) Конъюгированный с пероксидазой хрена антивидовой IgG, оптимально разведённый в Твин 20 и обезжиренном сухом молоке, добавляют в объёме 100 мкл на лунку, и планшет инкубируют в течение 1 часа при 37°C.
- vi) После отмывки, как это описано в этапе iv, каждую лунку заполняют 100 мкл 0,1 М цитратного буфера, pH 5,5, содержащего 0,5 мг/мл ортофенилен-диамина и 3 мкл/мл 9% H₂O₂.
- vii) Реакцию останавливают через 30 минут инкубирования при комнатной температуре (20-25°C) путём добавления 50 мкл 2N H₂SO₄. Значение оптической плотности считывают при 495 нм. В каждый планшет включают положительные и отрицательные контроли.

3.3. Конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ на основе MAP1 (32)

Антиген рекомбинантного MAP1 готовят следующим образом: 8-дневные личинки насекомых *Trichoplusia ni* инфицируют бакуловирусом, экспрессирующим *map1* ген, и умирающих личинок гомогенизируют (10% [в/о]) в ЗФР, обогащённом 0,001% (о/о) Тритоном X-100.

Анти-MAP1 МАт готовят следующим образом: клетки селезёнки BALB/С мышей, предварительно привитых гомогенатом личинок, сливают с клетками SP2/0. Надосадочные жидкости из клеточных культур гибридомы проверяют на реактивность с MAP1 с использованием иммуноблоттинга и иммунопероксидазного метода. Реактивную клеточную культуру субклонировать, изотипируют и впоследствии используют для получения асцитов.

После разведения в ЗФР в соотношении 1/800 (о/о) антиген иммобилизируют на полистироловые планшеты (Nunc-Immuno Plates PolySorp) инкубированием в течение ночи при 4°С и хранят при –70°С.

3.3.1. Процедура проведения теста

- i) Перед использованием планшеты блокируют в течение 30 минут путём добавления 100 мкл на лунку ЗФР, рН 7,2, обогащённого 0,05% Твин 20 и 5% обезжиренным сухим молоком.
- ii) Планшеты отмывают три раза с использованием ЗФР/Твин, добавляют в двух экземплярах 50 мкл на лунку опытной сыворотки, разведённой в соотношении 1/50 в ЗФР, обогащённом 0,05% Твин 20 и 1% обезжиренным сухим молоком, и планшеты инкубируют в течение 30 минут при 37°С.
- iii) Не прерывая этап отмывки, добавляют 75 мкл на лунку МАт, разведённых в соотношении 1/4000 (о/о) в ЗФР, обогащённом 0,05% Твин 20 и 1% обезжиренным сухим молоком, и планшеты инкубируют ещё в течение 30 минут при 37°С.
- iv) Планшеты отмывают три раза в ЗФР/Твин и добавляют в объёме 50 мкл на лунку конъюгированный с пероксидазой хрена антимишиный IgG, оптимально разведённый в ЗФР. Планшет инкубируют в течение 1 часа при 37°С.
- v) После трёх отмывок вышеуказанным способом в каждую лунку добавляют 100 мкл 0,1М цитратного буфера, рН 5,5, содержащего 0,5 мг/мл О-фенилен диамина и 3 мкл/мл 9% H₂O₂. Через 30 минут инкубирования при комнатной температуре в защищённом от света месте реакцию останавливают путём добавления 50 мкл 2N H₂SO₄ и считывают значение оптической плотности при 495 нм. В каждый планшет включают положительные и отрицательные контроли.

3.4. Считывание результатов

Все серологические тесты, базирующиеся на нерекомбинантных *E. ruminantium* антигенах, такие как реакция иммунофлуоресценции с использованием инфицированной *E. ruminantium* культуры эндотелиальных клеток в качестве антигена, ИФА и вестерн-блоттинг, всё ещё применяются для экспериментальных исследований, но не применяются больше для серо-

эпизоотологических исследований. Было проведено сравнение тестов и при их проведении использовали известные положительные и отрицательные сыворотки к *E. ruminantium* (Du Plessis et al., 1993). Ни в одном тесте против известных отрицательных сывороток не наблюдали ложноположительных реакций. Имеет место хорошая корреляция между тестами, но специфичность у всех пяти тестов низкая из-за перекрёстных реакций с определёнными *Ehrlichia* spp.

Интерпретация результатов различных тестов, проводимых в полевых условиях, затруднена в тех регионах, где *E. ruminantium* инфекции встречаются у жвачных, что, вероятно, имеет место в большинстве регионов Африки, где инфекционный гидроперикардит носит эндемический характер. Такая же ситуация была также выявлена среди животных на фермах без *Amblyomma* - клещей, но инфицированных такими видами клещей, которые неизвестны как векторы *E. ruminantium* (Kokono et al., 2003; Van Vliet et al, 1995).

И MAP1-B ИФА, и MAP1 К-ИФА продемонстрировали высокую специфичность после апробации на 3000 сыворотках жвачных (коз, овец и крупного рогатого скота), отобранных у инфицированных *A.-variegatum* животных с 14 Малых Антильских островов, из которых, как известно, только три были заражены *E. ruminantium* (Mondry et al., 1998). Общая специфичность, определённая исходя из результатов, относящихся к 11 свободным от инфекционного гидроперикардита островам, составляла 98,5% и 99,4% для MAP1 К-ИФА и MAP1-B ИФА, соответственно. Несмотря на то, что всё ещё обнаруживается небольшое количество ложноположительных сывороток, эти тесты, вероятно, смогут решить большое число проблем, связанных со специфичностью более ранних серологических тестов. Однако также было зарегистрировано, но не объяснялось наличие высокого доминирования серотипа в районах, свободных от вектора в Зимбабве или Южной Африке (это может быть вызвано перекрестно реагирующим агентом, не передаваемым *Amblyomma* – клещами), и об этом следует помнить при интерпретации результатов.

Оценка чувствительности тестов более проблематична, так как она требует точного знания статуса большого количества животных, у которых в полевых условиях отбирались образцы. Как уже указывалось ранее, в настоящее время нет простого метода подтверждения того, что животное инфицировано. В экспериментальных условиях чувствительность К-ИФА у коз регистрировалась на уровне 91,6-95,4% для MAP1-B ИФА, и 96,3-96,9% для MAP1 К-ИФА (Mondry et al., 1998). Однако в другом исследовании чувствительность составляла 95% в отношении точки разделения, установленной на 31% и 26,6% положительной контрольной сыворотки для сывороток овец и коз, соответственно (Mboloi et al., 1999). Действительно, подсчёты базируются на ограниченном количестве экспериментально

привитых животных в период времени вскоре после прививки, когда почти все животные всё ещё являются положительными. Чувствительность у крупного рогатого скота ещё ниже и несколько отчётов свидетельствуют о том, что после инфицирования большинство животных становятся сероотрицательными снова менее чем за 6 месяцев, а у некоторых животных даже никогда не происходит сероконверсия (Mahan et al., 1998c; Semu et al., 2001). Это наблюдение совпадает с разницей в превалентности антител, наблюдаемой между мелкими жвачными и крупным рогатым скотом в эпизоотологических исследованиях, которую нельзя объяснить более низкой опасностью заражения последних. Например, на расположенных в эндемических регионах Зимбабве фермах более 90% коз имели антитела в сыворотке по сравнению с 33% крупного рогатого скота, который содержался в тех же условиях (Mahan et al., 1998). Подобные наблюдения были зарегистрированы в бассейне Карибского моря. В дополнение к этому в некоторых районах Зимбабве, которая была обозначена как свободная от инфекционного гидроперикардита страна, имелось значительное количество коз, положительных к MAP1-B антителам; это еще больше усложняет серодиагностику инфекционного гидроперикардита (Kokono et al., 2003).

Серологические тесты полезны для оценки иммунного ответа на инфекционный гидроперикардит у вакцинированных животных. Тесты не следует использовать для скрининга животных перед их импортом в свободные от инфекционного гидроперикардита регионы. Антитела поддерживаются на поддающихся обнаружению уровнях у естественно инфицированных домашних жвачных животных только в течение нескольких месяцев, и циркулирующие антитела исчезают быстрее у крупного рогатого скота, чем у мелких жвачных животных. Таким образом, существует возможность того, что серологически отрицательные животные могут быть переносчиками инфекции. Серологию следует, поэтому, считать диагностическим методом, применяемым на уровне стада, а не на уровне отдельного животного (Peter et al., 2001). При интерпретации результатов диагностической серологии следует принимать во внимание другие эпизоотологические параметры.

Молекулярные методы, такие как ПЦР, могут оказать потенциальную помощь в обнаружении животных-носителей, но этот подход всё ещё имеет существенные недостатки (Смотрите Раздел В.2. «Молекулярные методы»).

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ И ДИАГНОСТИЧЕСКИМ БИОЛОГИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ

В настоящее время ещё нет коммерческих вакцин. Единственным методом иммунизации против инфекционного гидроперикардита остаётся метод «заражения и лечения» с использованием зараженной крови с последующим лечением животных-бациллоносителей тетрациклином (Bezuidenhout et al., 1994). Этот метод до сих пор

используется в нескольких регионах. Однако вполне может быть, что скоро он будет заменён препаратами с использованием аттенуированных или инактивированных организмов, которые дали многообещающие результаты исследований.

1. Инактивированные вакцины

Вакцинация препаратами инактивированных элементарных телец *E. ruminantium*, эмульгированных в масляных адьювантах стала возможна в результате демонстрации того, что восприимчивые козы могут быть защищены инактивированным *Ehrlichia* в адьюванте Фрейнда (Martinez et al., 1994). Эта вакцина также защищала против контрольного заражения овец (Mahan et al., 1995a) при использовании различных штаммов *E. ruminantium* (Mahan et al., 1998) и крупный рогатый скот (Totte et al., 1997) при использовании того же штамма, который применялся на козах. При проведении контрольного заражения иммунизированных коз и овец в лабораторных условиях было показано, что вакцина первого поколения из инактивированного *Ehrlichia* в масляном адьюванте Montanide ISA 50 была также эффективна, как и вакцина с адьювантом Фрейнда (Martinez et al., 1996).

При проведении начального этапа испытания вакцины животных иммунизировали двумя подкожными инъекциями 250-1000 мкг антигена (в зависимости от испытания), эмульгированного (50/50) в адьюванте Montanide ISA 50 в объёме 2 мл. В экспериментальных условиях недавно было показано на козах, что доза вакцины может быть уменьшена до 35 мкг антигена без снижения эффективности защиты (Vachieru et al., 2006). Исходя из начального описания, это представляет собой 28-кратное понижение дозы вакцины от 1 мг до 35 мкг *E. ruminantium* без изменения защитного эффекта. Параллельно был разработан процесс для массового производства *E. ruminantium* (Marcelino et al., 2006). Были установлены и оптимизированы основные параметры для производства *E. ruminantium* в эндотелиальных клетках в биореакторах с механическим перемешиванием. При использовании бессывороточной питательной среды в данных биореакторах, выход продукции *E. ruminantium* достиг 6,5-кратного увеличения по сравнению с традиционными методами. При использовании 2-литровых биореакторов и расчетной эффективной дозы вакцины 30 мкг оценка стоимости одной дозы вакцины составила приблизительно 0,11 евро, что делает ее доступной для стран с ограниченными ресурсами. Испытания эффективности, проводимые с вакцинами, полностью произведенными с использованием процессов массового производства и очищения с последующей консервацией продукта в различных растворах (NaCl и забуференный фосфатом физиологический раствор) и при разных температурах (-20°C, 4°C) продемонстрировали, что эффективность вакцины сохраняется после полного процесса массового производства и консервации (Marcelino et al., 2007).

Полевые испытания инактивированной вакцины, эмульгированной с адьювантом ISA 50 также продемонстрировали защиту овец от естественного полевого контрольного заражения клещами в Зимбабве (Mahan et al., 1998a). В результате широкомасштабных полевых испытаний, проведенных в Восточной и Южной Африке, было достигнуто значительное снижение смертности среди крупного рогатого скота, коз и овец при

использовании либо прототипного штамма из Зимбабве (штамм Mbizi), либо местного штамма из районов проведения эксперимента (Mahan et al., 2001). Однако в трех из четырех районов, вакцина, приготовленная из местного изолята, была менее эффективна, чем прототипная вакцина с Mbizi; это указывает на недостаточный охват антигенного репертуара изолятов, присутствующих в каждом районе. Отсутствие перекрестной защиты между изолятами *E. ruminantium* в связи с несовпадением антигенного состава является установленным фактом, но сложность структуры популяции *E. ruminantium* в поле была недооценена. Недавно в результате широкомасштабных полевых испытаний, проведенных в нескольких системах фермерских хозяйств в Западной Африке, было продемонстрировано, что в ограниченных географических районах может присутствовать более 10 генотипов с различными свойствами перекрестной защиты, и они могут значительно влиять на защиту, которую дают инактивированные вакцинные препараты (неопубликованные данные).

Инактивированная вакцина со штаммом Mbizi разрабатывается для коммерческого производства в южноафриканской компании Onderstepoort Biological Products (Mahan S.M., pers. comm.). Данные инактивированные вакцины не предотвращают инфицирование, но они предотвращают или уменьшают количество смертельных случаев среди вакцинированных животных при контрольном заражении живым вирулентным штаммом. Однако преимуществом является то, что можно объединить несколько полевых штаммов для того чтобы вакцина имела более широкую перекрестную защиту.

Главной проблемой остаётся характеристика уровня разнообразия штаммов в регионе, где применяется надлежащая технологии приготовления вакцины. Эта информация будет также важна для вакцин нового поколения, которые будут разработаны в будущем.

2. Аттенуированные вакцины

Заражение жвачных живыми штаммами *E. ruminantium* индуцирует сильную длительную защиту против гомологичного изолята. Это является основой для инфицирования и лечения с использованием вирулентных изолятов. Изоляты с аттенуированной вирулентностью, которые не требуют лечения животных, были бы идеальными, но имеется ограниченное количество таких аттенуированных изолятов. Был получен аттенуированный изолят Senegal, который дает 100% защиту при летальном контрольном заражении гомологичными изолятами, но очень низкую защиту при контрольном заражении гетерологичными изолятами. Изолят Gardel, который также дает значительный уровень перекрестной защиты с несколькими изолятами (но далеко не полный) также был аттенуирован. Недавно был аттенуирован третий изолят под названием Welgevonden из Южной Африки, который продемонстрировал полную защиту против четырех гетерологичных изолятов в экспериментальных условиях (Zweygarth et al., 2005). Главным недостатком аттенуированных вакцин является их чрезмерная лабильность, поэтому необходимо хранить их в жидком азоте и рассылать в замороженном состоянии. К тому же их следует вводить внутривенно.

3. Рекомбинантные вакцины

В нескольких отчетах продемонстрирована частичная защита мышей при использовании *map1* ДНК-вакцинации и повышение защиты при помощи вакцинации по протоколу прайм (плазмид)–буст (рекомбинантный MAP1) (Nyika et al., 2002). Однако защита жвачных животных никогда не была продемонстрирована с использованием данной стратегии. И наоборот, сообщалось о значительной защите овец при экспериментальном контрольном заражении гомологичными и гетерологичными изолятами в результате вакцинации плазмидами с использованием смеси из четырех открытых рамок считывания из локуса 1H12 генома *E. ruminantium* (Collins et al., 2003). С тех пор не было описано новых результатов. Вероятно, рекомбинантных вакцин не будет в наличии в ближайшем будущем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ALLSOPP M.T.E.P. & ALLSOPP B.A. (2001). Novel Ehrlichia genotype detected in dogs in South Africa. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 4204–4207.
- ALLSOPP M.T.E.P., HATTINGH C.M., VOGEL S.W. & ALLSOPP B.A. (1999). Evaluation of 16S, *map1* and *pCS20* probes for detection of Cowdria and Ehrlichia species. *Epidemiol. Infect.*, 122, 323–328.
- BEKKER C.P., DE VOS S., TAOUFIK A., SPARAGANO O.A. & JONGEJAN F. (2002). Simultaneous detection of Anaplasma and Ehrlichia species in ruminants and detection of Ehrlichia ruminantium in Amblyomma variegatum ticks by reverse line blot hybridization. *Vet. Microbiol.*, 89, 223–238.
- BEZUIDENHOUT J.D., PROZESKY L., DU PLESSIS J.L. & VAN AMSTEL S.R. (1994). Chapter 35: Heartwater. In: *Infectious Diseases of Livestock, with special reference to Southern Africa*, Coetzer J.A.W., Thomson G.R., Tustin R.C. & Kriek N.P.J., eds. Oxford University Press, Oxford, UK, Vol. 1, 351–370.
- CAMUS E. & BARRE N. (1988). Le diagnostic de la cowdriose à partir d'écrasement de cerveau. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 41, 247–252.
- CAMUS E., BARRE N., MARTINEZ D. & UILENBERG G. (1996). Heartwater (cowdriosis). A Review, Second Edition. Office International des Epizooties (World Organisation for Animal Health, Paris, France, pp. 177.
- COLLINS E.N., PRETORIUS A., VAN KLEEF M., BRAYTON K.A., ZWEYGARTH E. & ALLSOPP B. (2003). Development of improved vaccines for heartwater. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 990, 474–484.
- DUMLER J.S., BARBET A.F., BEKKER C.P., DASCH G.A., PALMER G.H., RAY S.C., RIKIHISA Y. & RURANGIRWA F.R. (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 2145–2165.

DU PLESSIS J.L., BEZUIDENHOUT J.D., BRETT M.S., CAMUS E., JONGEJAN F., MAHAN S.M. & MARTINEZ D. (1993). The serodiagnosis of heartwater: a comparison of five tests. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 46, 123–129.

DU PLESSIS J.L. & MALAN L. (1987). The application of the indirect fluorescent antibody test in research on heartwater. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 54, 319–325.

JONGEJAN F. & THIELEMANS J.C. (1989). Identification of an immunodominant antigenically conserved 32-kilodalton protein from *Cowdria ruminantium*. *Infect. Immun.*, 57, 3243–3246.

KATZ J.B., DEWALD R., DAWSON J.E., CAMUS E., MARTINEZ D. & MONDRY R. (1997). Development and evaluation of a recombinant antigen, monoclonal antibody-based competitive ELISA for heartwater serodiagnosis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 9, 130–135.

KOKONO O., HOVE T., GEYSEN D. & MAHAN S. (2003). Detection of antibodies to the *Ehrlichia ruminantium* MAP1-B antigen in goat sera from three communal land areas of Zimbabwe by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 70, 231–235.

LOUW M., ALLSOPP M.T.E.P. & MEYER E.C. (2005). *Ehrlichia ruminantium*, an emerging human pathogen – a further report. *S. Afr. Med. J.*, 95, 948–950.

LOFTIS A.D., REEVES W.K., TROUGHTON D.R., SPURLOCK J.P., MAHAN S.M., LEVIN M.L. & DASCH G. (2006). Transmission of an *Ehrlichia* sp. closely related to *Ehrlichia ruminantium*, the causative agent of heartwater by *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) from Georgia, USA. *J. Vector Biol.*, 31, 213–223.

MAHAN S.M., ANDREW H.R., N. TEBELE, BURRIDGE M.J. & BARBET A. (1995a). Immunisation of sheep against heartwater with inactivated *Cowdria ruminantium*. *Res. Vet. Sci.*, 58, 46–49.

MAHAN S.M., KUMBULA D., BURRIDGE M.J. & BARBET A.F. (1998a). The inactivated *Cowdria ruminantium* vaccine for heartwater protects against heterologous strains and against laboratory and field tick challenge. *Vaccine*, 16, 1203–1211.

MAHAN S.M., PETER T.F., SEMU S.M., SIMBI B.H., NORVAL R.A. & BARBET A.F. (1995b). Laboratory reared *Amblyomma hebraeum* and *Amblyomma variegatum* ticks differ in their susceptibility to infection with *Cowdria ruminantium*. *Epidemiol. Infect.*, 115, 345–353.

MAHAN S.M., PETER T.F., SIMBI B.H. & BURRIDGE M.J. (1998b). PCR detection of *Cowdria ruminantium* infection in ticks and animals from heartwater-endemic regions of Zimbabwe. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 849, 85–87.

MAHAN S.M., PETER T.F., SIMBI B.H., KOCAN K., CAMUS E., BARBET A.F. & BURRIDGE M.J. (2000). Comparison of efficacy of American and African *Amblyomma* ticks as vectors of heartwater (*Cowdria ruminantium*) infection by molecular analyses and transmission trials. *J. Parasitol.*, 86, 44–49.

MAHAN S.M., SEMU S.M., PETER T.F. & JONGEJAN F. (1998c). Evaluation of the MAP1-B ELISA for cowdriosis with field sera from livestock in Zimbabwe. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 849, 259–261.

MAHAN S.M., SMITH G.E., KUMBULA D., BURRIDGE M.J. & BARBET A. (2001). Reduction in mortality from heartwater in cattle, sheep and goats exposed to field challenge using an inactivated vaccine. *Vet. Parasitol.*, 97, 295–308.

MAHAN S.M., TEBELE N., MUKWEDEYA D., SEMU S., NYATHI C.B., WASSINK L.A., KELLY P.J., PETER T. & BARBET A.F. (1993). An immunoblotting diagnostic assay for

heartwater based on the immunodominant 32-kilodalton protein of *Cowdria ruminantium* detects false positives in field sera. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 2729–2737.

MAHAN S.M., WAGHELA S.D., MCGUIRE T.C., RURANGIRWA F.R., WASSINK L.A. & BARBET A.F. (1992). A cloned DNA probe for *Cowdria ruminantium* hybridizes with eight heartwater strains and detects infected sheep. *J. Clin. Microbiol.*, 30, 981–986.

MARCELINO I., SOUSA MARCOS F.Q., VERISSIMO C., CUNHA A.E, CARRONDO M.J.T. & ALVES P. (2006). Process development for the mass production of *Ehrlichia ruminantium*. *Vaccine*, 24, 1716–1725

MARCELINO I., VACHIÉRY N., AMARAL A.I., ROLDAO A., LEFRANÇOIS T., CARRONDO M.J., ALVES P.M. & MARTINEZ D. (2007). Effect of the purification process and the storage conditions on the efficacy of an inactivated vaccine against heartwater. *Vaccine*, 25, 4903–4913.

MARTINEZ D., MAILLARD J.C., COISNE S., SHEIKBOUDOU C & BENSAID A. (1994). Protection of goats against heartwater acquired by immunisation with inactivated elementary bodies of *Cowdria ruminantium*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 41, 153–163.

MARTINEZ D., PEREZ J.M., SHEIKBOUDOU C., DEBUS A. & BENSAID A. (1996). Comparative efficacy of Freund's and Montanide ISA50 adjuvants for the immunisation of goats against heartwater with inactivated *Cowdria ruminantium*. *Vet. Parasitol.*, 67, 175–184.

MARTINEZ D., SWINKELS J., CAMUS E. & JONGEJAN F. (1990). Comparaison de trois antigènes pour le sérodiagnostic de la cowdriose par immunofluorescence indirecte. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 43, 159–166.

MARTINEZ D., VACHIERY N., STACHURSKI F., KANDASSAMY Y., RALINIAINA M., APRELON R. & GUEYE A. (2004). NestedPCR for detection and genotyping of *Ehrlichia ruminantium*. Use in genetic diversity analysis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1026, 106–113.

MBOLOI M.M., BEKKER C.P.J., KRUITWAGEN C., GREINER M. & JONGEJAN F. (1999). Validation of the indirect MAP1- B Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of experimental *Cowdria ruminantium* infection in small ruminants. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 6, 66–72.

MONDRY R., MARTINEZ D., CAMUS E., LIEBISCH A., KATZ J.B., DEWALD R., VAN VLIET A.H.M. & JONGEJAN F. (1998). Validation and comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to *Cowdria ruminantium* infection. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 849, 262–272.

NYIKA A., BARBET A.F., BURRIDGE M.J. & MAHAN S.M. (2002). DNA vaccination with *map1* gene followed by protein boost augments protection against challenge with *Cowdria ruminantium*, the agent of heartwater. *Vaccine*, 20, 1215–1225.

PERREAU P., MOREL P.C., BARRE N. & DURAND P. (1980). Existence de la cowdriose (heartwater) à *Cowdria ruminantium* chez les ruminants des Antilles françaises (La Guadeloupe) et des Mascareignes (La Réunion et Ile Maurice). *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 33, 21–22.

PETER T.F., BARBET A.F., ALLEMAN A.R., SIMBI B.H., BURRIDGE M.J. & MAHAN S.M. (2000). Detection of the agent of heartwater, *Cowdria ruminantium*, in *Amblyomma* ticks by PCR: validation and application of the assay to field ticks. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 1539–1544.

PETER T.F., BURRIDGE M.J. & MAHAN S.M. (2002). *Ehrlichia ruminantium* infection (heartwater) in wild animals. *Trends Parasitol.*, 18, 214–218.

PETER T.F., DEEM S.L., BARBET A.F., NORVAL R.A.I., SIMBI B.H., KELLY P.J. & MAHAN S.M. (1995). Development and evaluation of PCR assay for detection of low levels of

- Cowdria ruminantium infection in Amblyomma ticks not detected by DNA probe. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 166–172.
- PETER T.F., O'CALLAGHAN C.J., MEDLEY G.F., PERRY B.D., SEMU S.M. & MAHAN S.M. (2001). Population-based evaluation of the Ehrlichia ruminantium MAP 1B indirect ELISA. *Exp. Appl. Acarol.*, 25, 881–897.
- PIENAAR J.G. (1970). Electron microscopy of Cowdria (Rickettsia) ruminantium (Cowdry, 1926) in the endothelial cells of the vertebrate host. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 37, 67–78.
- PEIXOTO C.C., MARCELINO I., VACHIERY N., BENSAID A., MARTINEZ D., CARRONDO M.J.T. & ALVES P. (2005). Quantification of Ehrlichia ruminantium by real time PCR. *Vet. Microbiol.*, 107, 273–278.
- POSTIGO M., BELL-SAKYI L., PAXTON E. & SUMPTION K. (2002). Kinetics of experimental infection of sheep with Ehrlichia ruminantium cultivated in ticks and mammalian cell lines. *Exp. Appl. Acarol.*, 28, 187–193.
- SCHREUDER B.E.C. (1980). A simple technique for the collection of brain samples for the diagnosis of heartwater. *Trop. Anim. Health Prod.*, 12, 25–29.
- SEMU S.M., PETER T.F., MUKWEDEYA D., BARBET A.F., JONGEJAN F. & MAHAN S.M. (2001). Antibody responses to Map 1B and other Cowdria ruminantium antigens are down regulated in cattle challenged with tick-transmitted heartwater. *Clin. Diag. Immunol. Lab.*, 8, 388–396.
- SIMBI B.H., PETER T.F., BURRIDGE M.J. & MAHAN S.M. (2003). Comparing the detection of exposure to Ehrlichia ruminantium infection on a heartwater-endemic farm by the pCS20 polymerase chain reaction assay and an indirect MAP1B enzyme linked immunosorbant assay. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 70, 231–235.
- SMITH G.E., ANDERSON E.C., BURRIDGE M.J., PETER T.F. & MAHAN S.M. (1998). Growth of Cowdria ruminantium in tissue culture endothelial cell lines from wild African mammals. *J. Wildl. Dis.*, 34, 297–304.
- SWEYGARTH E, JOSEMANS A.I., VAN STRIJP M.F., LOPZE-ROBELLAR L, VAN KLEEF M. & ALLSOPP B.A. (2005). An attenuated Ehrlichia ruminantium (Welgevonden stock) vaccine protects small ruminants against virulent heartwater challenge. *Vaccine*, 23, 1695–1702.
- TOTTE P., MCKEEVER D., MARTINEZ D. & BENSAID D. (1997). Analysis of T-cell responses in cattle immunised against heartwater by vaccination with killed elementary bodies of Cowdria ruminantium. *Infect. Immun.*, 65, 236–241.
- VACHIERY N., LEFRANCOIS T., ESTEVES I., MOLIA S., SHEIKBOUDOU C., KANDASSAMY Y. & MARTINEZ D. (2006). Optimisation of the inactivated vaccine dose against heartwater and in vitro quantification of Ehrlichia ruminantium challenge material. *Vaccine*, 24, 4747–4756.
- VAN VLIET A.H.M., VAN DER ZEIJST B.A.M., CAMUS E., MAHAN S.M., MARTINEZ D. & JONGEJAN F. (1995). Use of a specific immunogenic region on the Cowdria ruminantium MAP1 protein in a serological assay. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 2405–2410.
- WAGHELA S.D., RURANGIRWA F.R., MAHAN S.M., YUNKER C.E., CRAWFORD T.B., BARBET A.F., BURRIDGE M.J. & MCGUIRE T.C. (1991). A cloned DNA probe identifies Cowdria ruminantium in Amblyomma variegatum ticks. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 2571–2577.
- YUNKER C.E., MAHAN S.M., WAGHELA S.D., MCGUIRE T.C., RURANGIRWA F.R., BARBET A.F. & WASSINK L.A. (1993). Detection of Cowdria ruminantium by means of a

DNA probe, pCS20 in infected bont ticks, *Amblyomma hebraeum*, the major vector of heartwater in southern Africa. *Epidemiol. Infect.*, 110, 95–104

NB: Имеется Справочная лаборатория МЭБ по инфекционному гидроперикардиту (см. 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, свяжитесь с референтными лабораториями МЭБ для получения дальнейшей информации по диагностическим тестам, реагентам и вакцинам против гидроперикардита.