

ГЛАВА 3.1.21.

ИНФЕКЦИЯ *TRYPANOSOMA EVANSI* (СУРРА)

РЕЗЮМЕ

Определение болезни: *Trypanosoma evansi* вызывает трипаносомоз, известный как «сурра». Он поражает большое количество диких и домашних видов животных в Африке, Азии и Центральной и Южной Америке. Основными видами хозяев в различных географических регионах являются разные животные, но в основном поражаются верблюды, лошади, буйволы и КРС, хотя другие животные, включая диких животных, также восприимчивы к возбудителю. Это болезнь, передающаяся членистоногими; также есть подозрения, что в передаче инфекции от хозяина к хозяину участвуют несколько видов питающихся кровью мух, включая *Tabanids* и *Stomoxes*, действуя как механические векторы. В Бразилии летучие мыши-вампиры также могут участвовать в уникальном виде биологической передачи.

Описание болезни: Общие клинические признаки инфекций *T. evansi*: лихорадка, напрямую связанная с паразитемией наряду с прогрессирующей анемией, ухудшение состояния и усталость не являются достаточными патогномоничными симптомами для диагностики болезни. Чередование эпизодов лихорадки и паразитемии происходит во время течения болезни. У лошадей иногда наблюдается отек, особенно в нижних частях тела, уртикарные бляшки и петехиальные кровотечения в серозных мембранах. У буйволов и верблюдов регистрировали аборт. Признаки со стороны нервной системы часто наблюдаются у лошадей. Болезнь приводит к иммунодефициту, который может иметь важное значение в сочетании с другими болезнями или во время кампаний по вакцинации (например, против ящура и геморрагической септицемии).

Идентификация возбудителя: Общие клинические признаки инфекции *T. evansi* не достаточно патогномоничны для постановки диагноза. Необходимы лабораторные методы выявления паразитов. На ранней стадии инфекции или в острых случаях, когда в крови содержится большое количество паразитов, трипаносомы можно обнаружить с помощью исследования мазков крови, окрашенных мазков крови или материалов из лимфоузлов. В хронических случаях или когда уровень паразитов в крови невысок, необходимо исследование толстых мазков крови, а также использование методов концентрации паразитов и заражения лабораторных грызунов. У внешне здоровых носителей (животных без клинических признаков) паразиты обнаруживаются редко, и наилучший результат дает заражение мышей. Существует несколько пар праймеров, направленных на подрод (*Trypanozoon*) или видоспецифичные последовательности ДНК паразитов (*T. evansi*), которые используются для диагностики методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР более чувствительна, чем паразитологическое исследование, но может давать ложноположительные результаты при низком уровне паразитов в крови; в таких случаях подозрение на потенциальных носителей можно подтвердить только с помощью серологических тестов.

Серологические тесты: Инфекция индуцирует выработку специфичного гуморального ответа; в лабораторной и полевой практике используются различные тесты для обнаружения антител. Некоторые тесты прошли частичную валидацию, но находятся в процессе крупномасштабной оценки и стандартизации. Наиболее значимые тесты включают: реакцию иммунофлуоресценции, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) и реакцию агглютинации на диагностических карточках (САТТ/*T. evansi*). В полевых условиях можно использовать только реакцию агглютинации на диагностических

карточках. Тесты на раннее выявление антигена, выполняемые сразу после отбора, пока отсутствуют. Оценки прогностической ценности показывают, что ИФА для обнаружения IgG скорее классифицирует неинфицированных животных, в то время как реакция агглютинации на карточках правильно классифицирует истинно инфицированных животных. Таким образом, ИФА подойдет для подтверждения благополучного статуса животных до перемещения или во время карантина. Реакцию агглютинации на карточках можно использовать для анализа проб от отдельных животных с целью лечения их трипаноцидными препаратами. Для объявления статуса благополучия рекомендуется серийное тестирование – реакция агглютинации на карточках и ИФА с последующим повторным тестированием проб с подозрением и, желательнее, с завершением в реакции ПЦР. В зонах, где распространены *T. cruzi*, *T. equiperdum* или трипаносомы, передающиеся мухами це-це, в случае применения серологического теста могут возникать перекрестные реакции.

Рекомендации для вакцин: против этой болезни не существует вакцин.

А. ВВЕДЕНИЕ

Заражение *Trypanosoma evansi* вызывает болезнь, которую в Индии называют «сурра», а также Эль Дебаб, Эль Гафар, Табурит или Мбори в Северной Африке, Маль де Кадерас или Мурина в Латинской Америке. Сурра имеет характерные клинические признаки, которые, однако, не являются достаточно патогномичными, поэтому диагноз следует подтверждать лабораторными методами (Dia et al., 1997a). У восприимчивых животных, таких как верблюды (дромадеры и бактрианы), лошади, буйволы, КРС и свиньи, болезнь проявляется лихорадкой, напрямую связанной с паразитемией, а также прогрессирующей анемией, ухудшением состояния и усталостью. Такие повторяющиеся эпизоды приводят к лихорадке (у лошадей температура может повышаться до 44°C [Gill, 1977]) перемежающейся паразитемией в крови во время течения болезни. Иногда наблюдается отек, особенно в нижних частях тела, грубая шерсть у верблюдов, уртикарные бляшки и петехиальные кровотечения в серозных оболочках. В запущенных случаях паразиты проникают в центральную нервную систему (ЦНС), что может привести к возникновению нервных признаков (прогрессирующий паралич задней части и, в редких случаях, паралич верхних и нижних конечностей), чаще у лошадей, а также у других видов хозяев, прогрессирующих до полного лежачего положения и смерти. У буйволов и верблюдов регистрировали аборт (Gutierrez et al., 2005; Lohr et al., 1986), также есть указания на то, что болезнь приводит к иммунодефицитным состояниям (Dargantes et al., 2005b; Onah et al., 1998).

Патогенность различных штаммов и восприимчивости разных видов хозяев может сильно отличаться. Болезнь может протекать в острой и хронической форме, и в последнем случае может персистировать в течение нескольких месяцев и даже лет. Инфекция часто приводит к смертельному исходу у верблюдов и лошадей, но также может быть фатальной для буйволов, КРС, лам и собак, однако, у этих видов инфекции могут развиваться в легкой или субклинической форме. Дикие животные, такие как олени, капибары и носухи могут заражаться и болеть (иногда до смертельного исхода), однако, они также могут играть роль резервуара инфекции. Животные, подверженные стрессу – плохое питание, беременность, работа – более восприимчивы к болезни.

С биологической точки зрения *T. evansi* очень близка *T. equiperdum*, возбудителю дурины (Brun et al., 1998; Claes et al. 2003), а морфологически подобна более узким формам видов, передаваемых мухами це-це: *T. brucei brucei*, *T. b. gambiense* и *T. b. rhodesiense*. Большинство молекулярных характеристик указывают на то, что различные штаммы *T. evansi*, выделенные в Азии, Африке и Южной Америке, очень гомогенные и могут иметь

одно происхождение (Ventura et al., 2002), но некоторые работы позволяют предположить, что *T. evansi*, возможно, возникла из *T. brucei* в некоторых случаях (Jensen et al., 2008; Lai et al., 2008). Молекулярная характеристика с использованием методов с произвольно амплифицированной полиморфной ДНК и методов ДНК-фингерпринтов с обработкой ДНК рестрикционными эндонуклеазами показали, что изоляты *T. evansi* и *T. equiperdum* образовали группу с высокой степенью схожести. Отмечались трудности с дифференциацией *T. equiperdum* от других *Trypanozoon spp.* (Claes et al., 2005; Zablotskij et al., 2003), и даже ставилось под сомнение само существование *T. equiperdum*.

Как и все патогенные трипаносомы *T. evansi* покрыт плотным белковым слоем, состоящим из одного белка, который называется варибельным поверхностным гликопротеином. Он действует как главный иммуноген и индуцирует образование специфичных антител. Паразиты могут ускользать от последствий таких иммунных реакций, переключая варибельный поверхностный гликопротеин – феномен, известный как антигенная вариация.

Подозрение на сурру в полевых условиях может возникнуть в случае повышенной температуры и/или анемии. Анемия – это надежный индикатор заражения трипаносомами, который не является патогномоничным сам по себе. С другой стороны, у животных с субклинической инфекцией легкой степени паразиты в крови могут присутствовать, хотя признаков анемии может и не быть (Dargantes et al., 2005a).

В энзоотических областях можно проводить рутинную диагностику с использованием паразитологических методов, в то время как серологические наблюдения лучше осуществлять методом ИФА. Для выявления отдельных животных с целью лечения трипаноцидными препаратами можно использовать реакцию агглютинации на диагностических карточках.

Для определенного подтверждения инфекции у животных с подозрением на заражение (например, для импорта в свободные от болезни территории), самым лучшим тестом является заражение мышей. Однако проведение тестов на животных должно быть сведено к минимуму и использование животных должно полностью обосновано.

Для объявления статуса благополучия по болезни на индивидуальном уровне рекомендуется проводить серийные тесты в реакции агглютинации на карточках и ИФА с интервалом 40 дней. Однако необходимо определить условия для импорта животных из инфицированных в неинфицированные зоны, включая статус фермы-экспортера, статус экспортируемых животных, применение диагностического протокола и, возможно, профилактическое применение лечебной терапии.

В зонах, где присутствуют *T. cruzi*, *T. equiperdum* или трипаносомы, передающиеся мухами це-це, при использовании любых серологических тестов могут возникать перекрестные реакции. В таких условиях невозможно установить точный статус животных в отношении трипаносомоза.

МЭБ разработало монографию по международным стандартам для трипаноцидных препаратов.

1. Риск зоонозных заболеваний и требования к биобезопасности

Нет данных о том, что *Trypanosoma evansi* имеет зоонозный потенциал. Манипуляции с ним необходимо производить в лабораториях в соответствии с принципами, изложенными в главе 1.1.3. *Биобезопасность и биоазащита в ветеринарных микробиологических лабораториях и вивариях.*

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

1. Идентификация возбудителя

Классические прямые паразитологические методы для диагностики трипаносомоза, а именно: микроскопическое исследование крови или материала из лимфоузлов – не обладают высокой чувствительностью, но некоторые методы, включая обогащение пробы, заражение грызунов и методы с использованием ДНК, могут повысить чувствительность. В регионах, где встречаются другие *Trypanozoon spp.*, кроме *T. evansi*, невозможна специфическая идентификация методом микроскопического исследования; в данном случае для видоспецифической диагностики применяются молекулярные методики.

1.1. Прямое микроскопическое исследование

1.1.1. Отбор проб крови

Trypanosoma evansi – это паразит крови и тканей. В случае с другими трипаносомами, рекомендуется, чтобы кровь для диагностических целей отбирали из периферической ушной или хвостовой вены, даже если яремная вена лучше подходит из практических соображений. Однако нужно понимать, что методом исследования крови заражение можно выявить только у менее чем 50% инфицированных животных.

Периферическую кровь получают путем прокалывания малой вены в ухе или хвосте. Более глубокие пробы отбирают из более крупной вены с помощью шприца. Область границы уха или кончика хвоста очищают с помощью спирта, просушивают, а затем протыкают вену подходящим инструментом (ланцет, иголка). Необходимо убедиться, что инструменты стерилизованы или воспользоваться одноразовыми инструментами, чтобы избежать ятрогенной передачи инфекции с остаточной кровью.

1.1.2. Сырые мазки крови

Небольшую каплю крови (2-3 мкл) помещают на чистое предметное стекло и накрывают сверху покровным стеклом, чтобы размазать кровь в виде монослоя клеток. Изучают под световым микроскопом (увеличение в 200 раз) для обнаружения подвижных трипаносом. Улучшенную визуализацию можно получить с темнопольной или фазово-контрастной микроскопией (увеличение в 200-400 раз). Чувствительность данного метода достаточно низкая, примерно 10 трипаносом на мкл, что часто наблюдается только на ранней или острой стадии заражения.

1.1.3. Окрашенные толстые мазки

Большую каплю крови (10 мкл) помещают в центр предметного стекла микроскопа и размазывают с помощью зубочистки или кончика другого стекла, чтобы покрыть область примерно 1,0-1,25 см в диаметре. Высушивают на воздухе в течение часа или более, защищая стекло от насекомых. Помещают стекло в горизонтальное положение и окрашивают незафиксированный мазок красителем Гимза (одна капля коммерческого красителя Гимза + 1 мл фосфатно-буферного раствора, рН 7,2) на 25 минут. После промывки и высушивания мазки изучают при помощи светового микроскопа с 500-кратным увеличением с погружением в масло. Преимущество метода толстых мазков состоит в том, что он концентрирует каплю крови на небольшой площади, и, таким образом, требуется меньше времени для обнаружения паразитов, которые становятся более видимыми благодаря гемолизу нефиксированных красных клеток. Недостатком

является то, что во время этого процесса трипаносомы могут быть повреждены, и поэтому данный метод не подходит для идентификации видов паразитов в случае смешанных инфекций.

1.1.4 Окрашенные тонкие мазки

Небольшую каплю крови (3-5 мкл) помещают на одном конце чистого предметного стекла микроскопа и растягивают в тонкую пленку обычным образом. Быстро сушат на воздухе, фиксируют метиловым спиртом на 1 минуту и оставляют для высушивания. Окрашивают мазки в красителе Гимза (одна капля Гимза + 1 фосфатно-буферного раствора, рН 7,2) на 25 минут. Сливают краситель, промывают стекло в водопроводной воде и высушивают. В настоящее время чаще всего используют быстрые красители¹, которые позволяют фиксировать и окрашивать в течение нескольких секунд. Затем стекла промывают водопроводной водой и высушивают. Изучают при 400-1000-кратном увеличении с погружением в масло. Этот метод позволяет проводить детальные морфологические исследования и определять вид *Trypanosoma*, но обладает слишком низкой чувствительностью (может выявлять паразитов в количестве более 500,000 трипаносом/мл крови).

1.1.5. Биопсия лимфоузлов или жидкости из отека

Пробы обычно получают из окологлопаточных или околбедренных (ниже подвздошной кости) лимфоузлов. Путем пальпации выбирают подходящий лимфоузел и очищают место с помощью спирта. Протыкают лимфоузел подходящей иглой и набирают материал из лимфоузла в шприц, присоединенный к игле. Откачивают лимфу на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и исследуют так же, как свежие препараты крови. Фиксированные тонкие или толстые мазки можно также хранить для исследования позднее. Такие же исследования можно проводить с жидкостью, отобранной из отека.

1.2. Методы концентрации

У большинства хозяев *T. evansi* может вызывать инфекцию с легкими клиническими признаками или бессимптомную инфекцию со статусом носительства и низким уровнем паразитов в крови, что затрудняет демонстрацию паразитов. В данных обстоятельствах необходимо применение методов концентрации, поскольку они позволяют повысить чувствительность микроскопического исследования.

1.2.1. Метод центрифугирования гематокрита (также известный как техника Ву или НСТ)

Кровь (70 мкл) собирают в две капиллярные пробирки с гепарином (75 × 1,5 мм). Закрывают один конец пластицином и центрифугируют при 3000 g в течение 5 минут (обычно 12 000 оборотов в минуту в машине для центрифугирования гематокрита). Капиллярную трубку исследуют, и показатель гематокрита выражают в виде процента осажденных эритроцитов к общему объему крови – это позволяет оценить анемию у животного. Затем капиллярную трубку помещают в желобок, сделанный из кусочков стекла, приклеенных к предметному стеклу. Трипаносомы – это крупные клетки, которые концентрируются в месте слияния лейкоцитарной пленки и плазмы, что можно наблюдать под микроскопом при 100-200-кратном увеличении.

¹ Например, Diff-Quick®, RAL555®

Чтобы вызвать светопреломление клеток для повышения видимости движущихся трипаносом, нужно установить условия освещенности; это можно сделать, опустив положение светового конденсатора или поместив конденсатор источника света в промежуточное положение. Специально созданные камеры считывания для метода концентрации гематокрита можно получить в Справочной лаборатории МЭБ по сурре в Институте тропической медицины (ИТМ)². Чем свежее образец, тем выше чувствительность, поскольку явные движения паразитов делают их более видимыми. С помощью этого метода можно обнаружить около 50-200 трипаносом/мл крови (Desquesnes и Tresse, 1996). Лейкоцитарную пленку также можно собрать в микропробирку и заморозить; образец можно также приготовить для исследования методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

1.1.2. Темнопольная/фазово-контрастная микроскопия лейкоцитарной пленки (также известный как метод Мюррея)

Этот метод очень похож на предыдущий. Кровь собирают в капиллярные пробирки с гепарином и центрифугируют, как описано выше. Царапают пробирку алмазом для резки стекла и разламывают ее на 0,5 мм ниже уровня лейкоцитарной пленки – таким образом, верхняя часть содержит небольшой верхний слой эритроцитов, лейкоцитарную пленку (лейкоциты и тромбоциты) и немного плазмы.

Частично сливают содержимое данной части на предметное стекло, стараясь не слить более 5-8 мкл плазмы, однако, лейкоцитарная пленка должна попасть (небольшой диск лейкоцитарной пленки должен быть виден невооруженным глазом), прижимают покровное стекло, чтобы размазать лейкоцитарную пленку, и изучают в темнопольном, фазово-контрастном или подобном микроскопе при преломляющих условиях, описанных ранее, с 200-500-кратным увеличением. Трипаносомы в основном присутствуют на периферии толстой лейкоцитарной пленки.

Оба метода: и метод Ву, и техника Мюррея позволяют оценить уровень анемии путем измерения объема клеточного осадка и могут использоваться при наблюдении за стадом из группы риска. Показатель гематокрита может использоваться в качестве индикатора (например, когда <24% у КРС), чтобы выбрать дополнительную выборку проб для передачи на исследования более дорогими анализами ПЦР (Desquesnes et al., 1999).

1.2.3. Метод отделения трипаносом с помощью анионообменной хроматографии в мини-колонках с последующим центрифугированием

Когда пробу крови от животных, инфицированных трипаносомами, накапливающимися в слюнных железах, прогоняют через подходящую колонку из диэтиламиноэтил-целлюлозы (например, Ватман DE 52) для анионообменной хроматографии, клетки крови хозяина, которые более негативно заряжены, чем трипаносомы, могут адсорбироваться на анионообменный фильтр (при pH и условиях ионной силы, адаптированных к виду хозяина), пока трипаносомы элюируются, сохраняя жизнеспособность и инфекционность (Lanham и Godfrey, 1970). Этот метод в основном используется для очистки паразитов от крови (например, для приготовления антигенов паразитов), но разработаны миниатюрные

² Лаборатория диагностики паразитарных болезней, Институт тропической медицины, Nationalestraat 155, B-2000 Антверпен, Бельгия. pbuscher@itg.be; fclaes@itg.be

системы, особенно для диагностики трипаносомоза у людей (Lumdsen et al., 1981). Упрощенный полевой метод для обнаружения низкого уровня паразитемии разработан Sachs, 1984. Чувствительность этого метода можно повысить примерно в 10 раз путем использования препаратов из лейкоцитарной пленки, а не из цельной крови (Reid et al., 2001).

i) Приготовление фосфатно-буферного раствора с глюкозой, рН 8

Безводный Na_2HPO_4 (13,48 г); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,78 г); NaCl (4,25 г); дистиллированная вода (1 литр). Растворы различной ионной силы готовят путем разведения исходного фосфатно-буферного раствора, рН 8 и добавления глюкозы для поддержания подходящей концентрации. Для крови мышей, домашних и диких жвачных и собак, добавляют 4 части фосфатно-буферного раствора к шести частям дистиллированной воды и корректируют концентрацию глюкозы до 1%. Для крови свиней и кроликов добавляют три части фосфатно-буферного раствора к семи частям дистиллированной воды и корректируют окончательную концентрацию глюкозы до 1,5%. Фосфатно-буферный раствор с глюкозой должен быть стерильным (однако, фосфатно-буферный раствор нужно автоклавировать перед добавлением глюкозы).

ii) Уравновешивание диэтиламиноэтил-целлюлозы

Суспендируют 500 г диэтиламиноэтил-целлюлозы в 2 литрах дистиллированной воды. Смешивают в течение 20 минут с помощью магнитной мешалки при низкой скорости. Корректируют рН до 8 фосфорной кислотой. Оставляют для оседания в течение 30 минут. Отбрасывают надосадочную жидкость, содержащую самые мелкие гранулы. Повторяют процедуру три раза. Хранят уравновешенную концентрированную суспензию диэтиламиноэтил-целлюлозы (суспензия твёрдых частиц в жидкости) при 4°C в течение небольшого периода времени или в мелких аликвотах при -20°C для более длительного хранения.

iii) Упаковывание сбалансированной диэтиламиноэтил-целлюлозы

2 мл шприц без поршня помещают в штатив для пробирок с гибкой пробиркой, которую можно закрыть зажимом, действующим как кран. Помещают диск фильтровальной бумаги Ватман № 41 и увлажняют путем добавления нескольких капель фосфатно-буферного раствора с глюкозой. Переносят 2-2,5 мл суспензии уравновешенной целлюлозы в шприц и оставляют для осаждения на 5 минут перед элюированием буфера. Высота осадка должна быть примерно 3 см. Промывают и уравновешивают колонку 2 мл ФБР с глюкозой, стараясь не нарушить поверхность.

iv) Адсорбирование элюата трипаносом из крови

Осторожно переносят 100-300 мкл гепаринизированной крови (или предпочтительно лейкоцитарной пленки) на поверхность целлюлозной колонки; оставляют для проникновения в целлюлозу, но не позволяют целлюлозе высохнуть перед тем, как вылить на элюирующий буфер. Постепенно добавляют 1,5 мл ФБР с глюкозой и начинают сбор элюата в суживающуюся к низу пипетку Пастера с запечатанным концом. Целлюлозная колонка должна оставаться влажной на протяжении всей процедуры. Заполненную пипетку,

защищенную пластиковым наконечником, помещают в пробирку и центрифугируют при 525 g (или до 1000 g) в течение 10 минут. Исследуют дно пробирки под микроскопом (100-200-кратное увеличение) с использованием специального удерживающего устройства. Или собирают элюат в 50 мл пластиковые пробирки с коническим дном, центрифугируют при 1000 g, а осадок изучают методом темнопольной микроскопии.

Похожий метод, используемый для КРС, свиней и коз, также называют методом анионообменной хроматографии в миниатюре (Gutierrez et al., 2004a; Reid et al., 2001; Sachs, 1984). Кроме того, большие объемы крови или лейкоцитарной пленки можно переносить в большие колонки для приготовления антигена для реакции непрямой иммунофлуоресценции, реакции агглютинации на диагностических карточках или для твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

1.3. Заражение животных

Из-за того, что все больше внимания уделяется упразднению использования животных в биологическом тестировании, заражение животных должно быть сведено к минимуму, кроме того, оно должно быть полностью оправдано. Лабораторных животных можно использовать для выявления субклинических (непатентных инфекций) у одомашненных животных. *Trypanosoma evansi* обладает широким спектром инфекционности для мелких грызунов, поэтому часто используют крыс и мышей. Заражение грызунов не обладает 100% чувствительностью (Monzon et al., 1990), но дополнительно повысить его эффективность можно путем использования лейкоцитарной пленки. С помощью такой процедуры можно обнаружить даже 1,25 *T. evansi*/мл крови (Reid et al., 2001). Этот метод подходит тогда, когда необходим способ обнаружения с высокой чувствительностью.

Крысам или мышам внутрь брюшины вводят гепаринизированную кровь (1-2 мл или 0,25-0,5 мл, соответственно). Заражают минимум 2 животных. У животных берут кровь из хвоста каждые 48 часов для выявления паразитов в крови. Инкубационный период до появления паразитов и их вирулентность зависят от штамма трипаносом, их концентрации в инокуляте и штамма используемых лабораторных животных; однако в большинстве случаев инкубационный период очень короткий (5 ± 2 дня), но в редких случаях может продлиться до 2 недель (Monzon et al., 1990). Чувствительность данной системы культивирования *in vivo* можно повысить путем использования лабораторных животных со сниженным иммунитетом. С целью снижения иммунитета использовали такие препараты, как циклофосфамид или гидрокортизона ацетат, рентгеновское излучение или удаление селезенки. Такая процедура оправдана только в случаях, когда обнаружение потенциально инфицированного хозяина имеет большую важность (например, импорт на благополучную территорию).

1.4. Обнаружение ДНК трипаносом

Обнаружение незначительных количеств ДНК трипаносом – это возможное средство выявления животных с активными инфекциями, так как ДНК паразитов остается в крови хозяина не более 24-48 часов после уничтожения трипаносом (Desquesnes, 1997b).

1.4.1 ДНК зонды

Для обнаружения ДНК трипаносом в инфицированной крови или ткани использовались специальные ДНК зонды, хотя теперь они применяются нечасто, поскольку требуются дополнительные оценки (Basagoudanavar et

al., 2001; Reid et al., 2001; Viseshakul и Panyim, 1990). Чаще предпочитают методы ПЦР, которые регулярно используют в некоторых лабораториях.

1.4.2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Используется полимеразная цепная реакция (ПЦР) на основании последовательностей ДНК различных таксономических уровней. На данный момент золотым стандартом для обнаружения подвидов *Trypanozoon* являются праймеры NRP или TBR (Masiga et al., 1992; Moser et al., 1989). Опубликованы также другие праймеры, которые в настоящее время проходят оценку; некоторые из них специфичны для *Trypanozoon* (Desquesnes et al., 2001; Holland et al., 2001; Wuyts et al., 1994), а другие для *T. evansi* ± *T. equiperdum* (Artama et al., 1992; Claes et al., 2004; Panyim et al., 1993) (оценка последних очень затруднена ввиду отсутствия коллекций референтных штаммов). На данный момент наиболее чувствительный тест – это реакция с сателлитной ДНК с использованием TBR праймеров (Masiga et al., 1992); в настоящее время проводится сравнение чувствительности других праймеров при различных условиях, включая эксперименты с лабораторными грызунами, однако их можно валидировать только с достаточным количеством полевых проб от естественных хозяев. Рекомендуется использовать TBR праймеры хотя бы в первом случае и, при необходимости, для анализа проб на территориях и от видов хозяев, потенциально инфицированных другими *Trypanozoon*, такими как *T. brucei brucei*, подтверждение присутствия определенного вида можно получить с более специфичными праймерами, такими как TEPAN (Panyim et al., 1993) или TE2249/2250 (Artama et al., 1992). На стадии разработки находятся другие праймеры, специфичные для штаммов RoTat (Claes et al., 2004; Verloo et al., 2001) или не RoTat (Ngaira et al., 2005), и другие методы, такие как опосредованная петлей изотермальная амплификация (LAMP) (Thekisoe et al., 2005) и Taqman (Taylor et al., 2008), однако после этого им нужно будет еще пройти оценку и валидацию.

Подготовка ДНК – это важный этап, определяющий успех и чувствительность ПЦР. ДНК можно получать из простой крови (обычно собранной с антикоагулянтом) или лучше из лейкоцитарной пленки, что позволяет повышать чувствительность теста (Desquesnes и Davila, 2002; Majiwa et al., 1994). Существуют несколько классических методов, таких как приготовление по протоколу Chelex (Solano et al., 1999), коммерческие наборы и подготовка с фенол-хлороформом (Maciel et al., 2009). Также можно использовать кровь, консервированную 1/1 в 70% спирте или на сухой фильтровальной бумаге (Desquesnes, 2004; Holland et al., 2002; Omanwar et al., 1999).

Поскольку чувствительность ПЦР зависит от количества имеющейся ДНК, она пропорциональна уровню паразитемии. Таким образом, ПЦР обладает большей чувствительностью у высоко восприимчивых хозяев (верблюды, лошади, собаки и т.д.), чем у хозяев со слабой или низкой чувствительностью (КРС, буйволы, свиньи и т.д.). Использование пригодных ДНК препаратов и самых чувствительных праймеров (TBR) позволяет обнаруживать трипаномы в таких ничтожных количествах, как 1-5 трипаносом/мл (Panyim et al., 1993; Penchenier et al., 1996), с помощью ПЦР или всего 10 трипаносом на 1 мл у буйволов с помощью ПЦР в реальном времени (Konnai et al., 2009).

Реакция ПЦР обладает чувствительностью и специфичностью, необходимой для обнаружения трипаносомной инфекции (Masiga et al., 1992; Wuylts et al., 1994; Wuylts et al. 1995), но она может давать ложноотрицательные результаты. Экспериментальные исследования на овцах показали, что ПЦР может давать отрицательные результаты в течение длительного периода во время периода отсутствия паразитов в крови (Bengaly et al., 2001), в то время как у буйволов диагностическая чувствительность ПЦР была только 78%, что совпадает с результатами при заражении мышей (Holland et al., 2001). Несмотря на это, ПЦР – это самый чувствительный метод выявления инфекции.

1.5. Обнаружение антигена

Обнаружение циркулирующего антигена в крови или сыворотке – это также один из способов выявления активной инфекции. Несколько попыток разработать такие тесты не позволили достичь удовлетворительного уровня, чтобы этот метод можно было рекомендовать для стандартной диагностики (Desquesnes, 1996; Monzon et al., 1996, Morzaria et al., 1996).

2. Серологические тесты

Исторически, для обнаружения неспецифических гуморальных антител, присутствующих в случае заражения суррой, использовались различные методы. Это биохимические тесты, включающие осадочную пробу, пробу на гелеобразование с формалином, реакцию преципитации дихлорида ртути и тимоловую пробу, которые считаются устаревшими, хотя проба на гелеобразование с формалином все еще используется в полевых условиях, так как она проста в исполнении. Эти тесты основаны на повышении уровня глобулинов в сыворотке в результате инфекции, но такое повышение не специфично для заражения *T. evansi*. Дихлорид ртути также не следует использовать из-за его токсичности. Проба на гелеобразование с формалином является тестом выбора для верблюдов, но его валидировали и для других видов животных. Он проводится путем добавления двух капель концентрированного раствора формалина (40% формальдегида [в/об]) к 1 мл сыворотки. Реакция считается положительной, если сыворотка сворачивается немедленно и становится белой. При отрицательной реакции сыворотка остается в неизменном виде или коагуляция может занять до 30 минут.

Таким же образом, использовались различные методы для обнаружения специфических гуморальных антител к антигенам трипаносом; например, прямая или непрямая реакция агглютинации, реакция связывания комплемента (РСК), РНИФ (Desquesnes, 1997a; Uilenberg, 1998) и реакция лизиса трипаносом. РНИФ все используется для небольших наблюдений. Благодаря своей высокой специфичности реакция лизиса трипаносом используется для подтверждения отдельных положительных случаев. Другие тесты больше не применяются, так как недавно их заменили более легко стандартизируемые методы ИФА (Davison et al., 1999; Franke et al., 1994; RAE et al., 1989; Reid и Soreman, 2002; Reid и Soreman, 2003; Tuntasuvan et al., 1996) и реакция агглютинации на диагностических карточках (Bajjana Songa и Hamers, 1988; Njiru et al., 2004). Попытки разработать новые методики, такие как реакция латекс-агглютинации, пока не принесли успеха (Gutierrez et al., 2004b; Holland et al., 2005; Morzaria et al., 1996).

Оценка ИФА и реакции агглютинации на карточках проводилась на верблюдах, лошадях, КРС, буйволах и свиньях (Desquesnes et al., 2009; Dially et al., 1994; Holland et al., 2005; Payne et al., Reid и Soreman, 2003; Verloo et al., 2000). Реакции лучше проводить на плазме или сыворотке, однако отбор проб можно упростить путем использования фильтровальной бумаги для нанесения пятен крови для использования позднее в ИФА, в то время как для реакции агглютинации на карточках цельную кровь можно заменить на

сыворотку (Holland et al., 2002; Hopkins et al., 1998). Очень важно, чтобы серологические тесты валидировали и стандартизировали, если они не подходят для правильного выявления инфицированных животных; поэтому необходима перекрестная оценка в нескольких лабораториях. Возможно, для каждого вида животного потребуется разработка стандартных критериев для интерпретации тестов хотя бы на региональном уровне (Desquesnes, 1997c). Также необходимо принять во внимание различные виды и штаммы *Trypanosoma* (например, RoTat против не RoTat), циркулирующие на данной территории.

2.1. Реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ)

Хотя данный метод не адаптирован для крупномасштабных наблюдений, он может быть полезным при скрининге небольшого количества проб в лабораториях, которые проводят тест для других целей и/или которые не делают ИФА. Стоимость реактивов – умеренная, около 0,5 евро/тест, но выполнение метода требует времени.

2.1.1. Процедура тестирования

Антиген состоит из высушенных мазков крови, содержащих от пяти до десяти *T. evansi* на поле при 500-кратном увеличении, полученных от мышей или крыс с высоким уровнем паразитемии (3-4 дня после заражения). Мазки сушат при комнатной температуре в течение 1 часа и фиксируют в ацетоне (\pm этанол) в течение 5 минут. В сухом виде мазки можно хранить при температуре -20°C в течение нескольких месяцев. Наилучшие результаты получают с использованием очищенных трипаносом, отделенных от лейкоцитарной пленки крысы на диэтиламиноэтил-целлюлозной колонке (Lanham & Godfrey, 1970) с использованием смеси 80% холодного ацетона и 0,25% формалина в нормальном физиологическом растворе.

При тестировании предметные стекла сначала делят на несколько кружков по 5 мм в диаметре с помощью жидкости для снятия лака с использованием закрепляющих сред (можно использовать покрытые тефлоном предметные стекла с несколькими точками), затем промывают в ФБР, pH 7,2, при комнатной температуре в течение 10 минут.

После промывки добавляют положительную и отрицательную контрольную сыворотку и исследуемые полевые сыворотки (разведенные 1/50 в ФБР) и оставляют для реакции при температуре 37°C в течение 30 минут во влажной камере. Предметные стекла промывают три раза в ФБР в течение 5 минут каждый. Кроличий или козий IgG против КРС (для исследования сывороток КРС), конъюгированный с флуоресцеина изотиоцианатом или другой флуоресцеин-конъюгированной антисывороткой, специфичной для исследуемых видов животных, добавляют в подходящем разведении и оставляют при 37°C в течение 30 минут во влажной камере. Предметные стекла повторно промывают в ФБР, закрепляют 50% глицерином в ФБР с иммунофлуоресцентными закрепляющими средами и изучают методом флуоресцентной микроскопии. Раствор глицерина следует хранить при 4°C и заменять каждые 2 недели.

Флуоресцеиновый конъюгат нужно хранить при -20°C небольшими аликвотами, чтобы избежать повторного замораживания и оттаивания. Пробирки нужно образом защищать от света, например, заворачивая в

алюминиевую фольгу. Конъюгат разводят в ФБР, рН 7,2 или в ФБР, содержащем голубой Эванс 1/1000 (в/об) в качестве контрастного красителя для различения между положительной (зеленая) и отрицательной (красная) флуоресценцией. В общем, моноспецифичные анти-IgG (гамма-цепь) конъюгаты дают самые специфичные результаты.

Сероконверсия к *T. evansi* в РНИФ может занять до 60-90 дней (Jacquet et al., 1993). По сравнению с реакцией агглютинации на диагностических карточках РНИФ более чувствительный метод, вероятно, поскольку он может выявлять животных с отсутствием паразитов в крови, однако специфичность этого теста ниже (Dia et al., 1997b). В пограничных случаях интерпретация носит субъективный характер, а воспроизводимость можно иногда поставить под сомнение (Ferenc et al., 1990). По этим причинам ИФА является более подходящим методом.

2.2. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА)

Принцип этого метода состоит в том, что специфичные антитела к трипаносомам можно обнаружить с помощью анти-иммуноглобулинов, меченных ферментом, с использованием твердофазного носителя – полистеролового планшета, сенсibilизированного растворимым антигеном. Ферментом может служить пероксидаза, щелочная фосфатаза или другой подходящий фермент. Конъюгат фермента связывается с комплексом антиген/антитело, а затем реагирует с подходящим субстратом до получения характерного изменения цвета либо самого субстрата, либо добавленного индикатора (хромогена).

Антиген для сенсibilизации планшетов получают из крови крыс с высоким уровнем паразитемии. Трипаносомы концентрируют в лейкоцитарной пленке путем центрифугирования, отделяют на диэтиламиноэтилцеллюлозной колонке и промывают три раза путем центрифугирования в холодном ФБР с глюкозой, рН 8 (ФБР с 1% глюкозы). Финальный осадок суспендируют в холодном ФБР с глюкозой до концентрации 5%, вместе со смесью ингибиторов протеаз³ подвергают 5-кратному замораживанию-размораживанию и обрабатывают ультразвуком три раза по 2 минуты на льду для обеспечения полного распада организмов. Препарат центрифугируют при 4°C и 14 000 g в течение 10 минут. Супернатант собирают и определяют концентрацию белка в УФ лучах при длине волны 260 и 280 нм (Warburg и Christian, 1942). Полученный таким образом растворимый антиген можно хранить в аликвотах при -80°C в течение нескольких месяцев. Его также можно лиофилизировать и хранить при -20°C. Сенсibilизацию ИФА планшетов обычно проводят в концентрации 5 мкг/мл белка в сенсibilизирующем буфере.

2.2.1. Процедура теста

- i) Растворимый антиген разводят в концентрации 5 мкг/мл в свежеприготовленном 0,01 М карбонатном/бикарбонатном буфере, рН 9,6. Добавляют 100 мкл в каждую лунку 96-луночного микропланшета и инкубируют в течение ночи при 4°C или в течение 1 часа при 37°C. Для данного этапа лучше использовать иммунопланшеты, которые обеспечивают

³ Полный раствор для ингибитора протеазы; Roche Molecular Biochemicals

сохранение специфической активности эпитопов во время связывания с поверхностью планшета,⁴ чем другие планшеты, которые могут делать эпитопы нечеткими и ослабленными из-за характеристик связывания.

- ii) Антиген удаляют и добавляют 150 мкл блокирующего буфера (ББ: 0,01 М ФБР, содержащего 0,1 твин 20 и 5% сухого обезжиренного молока в течение 1 часа и при 37°C. Качество обезжиренного молока очень важно;⁵ оптимальная концентрация обезжиренного молока может варьировать от 0,5 до 7% в зависимости от происхождения молока. Альбумин бычьей сыворотки также можно использовать в качестве блокирующего агента.
- iii) Добавляют разведения исследуемой сыворотки в ББ (100 мкл) в двух и в трех повторностях. Включают контрольные отрицательные и положительные сыворотки. Разведения нужно определять эмпирически, но обычно они составляют 1/100-1/200. Планшеты инкубируют при 37°C в течение 30 минут. Изымают содержимое и промывают пять раз промывочным буфером (ФБР – 0,1% Твин 20).
- iv) Добавляют особый видоспецифичный антиглобулин, конъюгированный с пероксидазой (100 мкл), надлежащим образом разведенный в ББ (обычно между 1/5 000 и 1/20 000). Если видоспецифичных конъюгатов нет, можно использовать конъюгаты протеина А и протеина G. Планшеты инкубируют при 37°C в течение 30 минут, изымают содержимое и промывают три раза промывочным буфером.
- v) Для конъюгатов с пероксидазой можно использовать несколько растворов субстрат/хромоген, которые состоят из перикиси водорода с хромогеном, например с тетраметилбензидином (ТМВ), 2,2'-азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислотой) (ABTS) и орто-фенилендиамином (OPD). Подходящий раствор субстрат/хромоген для конъюгатов с пероксидазой – это 30% перекись водорода (0,167 мл и 35 мг) в цитратном буфере (100 мл), рН 6,0. Цитратный буфер готовят следующим образом: Раствор А (36,85 мл): (0,1 М лимонной кислоты [21,01 г/л]); Раствор В (65,15 мл): (0,2 М Na₂HPO₄ [35,59 г/литр]); и дистиллированная вода (100 мл). Растворяют 10 мг ТМВ в 1 мл диметилсульфоксида и добавляют до 99 мл цитратного буфера. Несколько таких комбинаций имеются в продаже в готовых для использования составах, которые остаются стабильными при 4°C в течение периода до 1 года. Добавляют субстрат хромоген (100 мкл) на планшеты и инкубируют при комнатной температуре в течение 20-30 минут.
- vi) Считывают планшеты или останавливают реакцию путем добавления 50 мкл 1М серной кислоты. Считывают оптическую плотность каждой лунки при 450 нм для ТМВ

⁴ Например, Polysorp Nunc® immunoplates

⁵ Например, № 190-12865, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Япония

хромогена. Для других хромогенов может потребоваться другая длина волны. Все тесты должны включать три известных сильно положительных и средне положительных контрольных сыворотки, три слабоотрицательных и среднеотрицательных контрольных сыворотки и буферный контроль. Результаты выражают в относительном проценте положительных результатов на основании оптической плотности контрольных проб (Desquesnes, 1997c; Desquesnes et al., 2009).

Существует широкий ряд других процедур тестирования, например, с использованием очищенного нативного антигена (Verloo et al., 1998) или, недавно, с использованием рекомбинантных антигенов (Tran et al., 2009). Для близкородственных видов животных можно использовать перекрестно реагирующие реактивы (например, иммуноглобулин против КРС для буйволов), также обычно рекомендуется использование моноспецифичных анти-IgG конъюгатов. Однако если специфичных конъюгатов нет, можно использовать неспецифичные белки, обладающие способностью прикрепляться к Fc фрагменту иммуноглобулинов, такие как белок А (для обнаружения IgG) и белок G (для обнаружения IgM). Конъюгат с белком А валидировали для использования для верблюдов (Desquesnes et al., 2009).

Существует несколько методов, которые можно использовать для определения точки раздела с целью дифференциации между положительными и отрицательными результатами. Самый простой метод – определить точку раздела путем визуального анализа результатов теста из известных положительных и известных отрицательных популяций (Desquesnes, 1997c). Такие результаты, вероятно, покажут определенное перекрытие. Оператор может выбрать наиболее подходящую точку для модификации ложноположительных и ложноотрицательных результатов в зависимости от требуемого применения анализа. Другим вариантом может стать определение точки раздела по среднему значению + 2 стандартных отклонения (СО) или + 3 СО из большой выборки отрицательных животных. И наконец, в отсутствие отрицательных/положительных образцов точку раздела можно определять на основании анализа данных от животных в эндемической ситуации (Greiner et al., 1994). Если бимодальное распределение разделяет инфицированных от неинфицированных животных, тогда можно выбрать подходящее значение. С помощью ИФА, вероятно, можно правильно выявить неинфицированных животных (в то время как реакция агглютинации на диагностических карточках эффективна для выявления инфицированных животных). Новый метод ИФА ELISA/RoTat 1.2, основанный на переменных поверхностных гликопротеинах из клона *T. evansi* RoTat 1.1 – доминирующего антигена в *T. evansi* (Verloo et al., 2001) – успешно использовался в полевых условиях во Вьетнаме (Holland et al., 2002; Verloo et al., 2000); протоколы можно получить в Референтной лаборатории МЭБ в ИТМ (Антверпен) для использования для лошадиных, верблюжьих и азиатских буйволов. Недавно в ИТМ разработан другой тест, основанный на гликопротеине инвариантной поверхности (Tran et al., 2009), который передан на межлабораторные испытания.

Переменные поверхностные гликопротеины могут быть слишком специфичными для использования в качестве антигена в универсальном тесте (см. ниже RoTat против не RoTat паразитов), в то время как ИФА с

использованием растворимых антигенов не является штамм-специфичным и это делает его универсальным тестом. Растворимые антигены из цельного лизата *T. evansi* способны обнаруживать иммуноглобулины, направленные против штаммов *T. evansi*, присутствующих у различных видов хозяев и на разных географических территориях (Laha и Sasmal, 2008); они могут также обнаруживать инфекции в гетерологичных системах благодаря сильным перекрестным реакциям с *T. vivax*, *T. congolense* и даже *T. cruzi*. Растворимый антиген *Trypanosoma evansi* нужно рассматривать в качестве универсального реактива для обнаружения *T. evansi*, но здесь необходимо учитывать видо-специфичность в многовидовых областях. Стоимость реактивов низкая, около 0,1 евро/тест, а метод достаточно быстрый, что позволяет опытному оператору тестировать 500-1000 проб в сутки.

2.3. Реакции агглютинации на карточках

Хорошо известно, что определенные доминирующие типы варибельных антигенов экспрессируются совместно в различных штаммах трипаносом, присутствующих в слюне, из различных областей. Этот результат использовали в качестве основания для теста для диагностики *T. evansi* – реакции агглютинации на диагностических карточках (САТТ/*T. Evansi*). В данном тесте используются фиксированные и окрашенные трипаносомы с определенным типом варибельного антигена, который известен как RoTat 1.2. В реакции агглютинации участвуют как варибельные, так и инвариантные поверхностные антигены. Реакцию агглютинации на диагностических карточках можно получить в виде набора в Референтной лаборатории МЭБ ИТМ. Набор состоит из лиофилизированных окрашенных паразитов («антиген»), ФБР, рН 7,4, карточек с пластмассовым покрытием, шпателей, положительных и отрицательных сывороток и ротационного шейкера. Лиофилизированный антиген можно хранить при температуре 2-8°C в течение периода до 1 года. Восстановленный антиген можно хранить при температуре 2-8°C в течение 1 недели, но лучше использовать в течение 8 часов при хранении при 37°C.

Для скрининга исследуемые сыворотки разводят 1/4 или 1/8 в ФБР на кружках, нанесенных на пластиковые карточки. На кружки, нанесенные на пластиковые карточки, добавляют 45 мкл приготовленной суспензии антигена (которую нужно предварительно встряхнуть до получения однородной суспензии паразитов). Наносят 25 мкл каждой исследуемой сыворотки. Смешивают и размазывают реактивы с помощью шпателя и ставят карточку на ротационный шейкер, предоставленный в наборе, на 5 минут (или на классическую ротационную мешалку на скорости 70 об. в мин.). Сравнивают рисунок агглютинации с иллюстрациями различных реакций, представленными в наборе. Голубые гранулированные отложения указывают на положительную реакцию, видимую невооруженным взглядом. Стоимость антигена умеренная, около 0,5 евро/тест, один оператор может провести около 200 тестов в день.

Поскольку САТТ главным образом обнаруживает IgM (агглютинирующие пентавалентные иммуноглобулины с коротким периодом полураспада), она подходит для обнаружения ранних или поздних инфекций недавно циркулирующими паразитами в крови и может обнаруживать активные инфекции с высокоположительным прогностическим значением. Реакция агглютинации, скорее всего, классифицирует истинно инфицированных

животных, ее можно использовать для выбора отдельных животных для последующего их лечения трипаноцидными препаратами.

Альтернативный формат теста (LATEX/*T. evansi*) с использованием латексных шариков, покрытых нативным варибельным поверхностным гликопротеином RoTat 1.2 VSG в настоящее время проходит оценку.

2.4. Реакция лизиса трипаносом

Реакция лизиса трипаносом обнаруживает специфические трипанолитические антитела, направленные против определенного штамма паразитов, способные индуцировать лизис трипаносом в присутствии комплемента. Он проводится с использованием поверхностного антигена *T. evansi* типа RoTat 1.2 и может, следовательно, быть положительной только у хозяев, у которых вырабатываются трипанолитические иммуноглобулины, направленные против варибельного антигена RoTat 1.2 VAT (Van Meirvenne et al., 1995). Сыворотки тестируют в разведении 1/4. Живых трипаносом инкубируют в течение 60 минут с исследуемой сывороткой в присутствии сыворотки морской свинки как источника комплемента. Если вариант-специфичные антитела присутствуют в сыворотке, происходит лизис трипаносом RoTat 1.2. Образец считается положительным на наличие антител к RoTat 1.2, если произошел лизис 50% или более трипаносом. Для данного теста необходимо выращивание трипаносом в грызунах, поэтому он достаточно дорогой. В настоящее время реакция чаще всего используется для подтверждения проб, которые были протестированы с подозрением на положительный результат другими методами. Эту реакцию можно провести в ИТМ, Антверпен, по требованию. Стоимость теста достаточно высока (250 евро/тест).

3. Применение тестов

Применение описанных выше методов, так же, как и большинства биологических тестов, ограничено с точки зрения их чувствительности и специфичности. Более того, способы проведения тестов и их параметры значительно отличаются в зависимости от вида хозяина или территории, где обитает хозяин. На сегодняшний день не существует общего тестирования (паразитологического, серологического или даже молекулярного), способного отличить *T. Evansi* от других видов или подвидов *Trypanozoon*. Окончательная диагностика сурры будет зависеть от эпизоотологических данных, результатах лабораторных исследований и наблюдений. По этим причинам рекомендуется проводить несколько комбинаций тестов, адаптированных к различным обстоятельствам, которые относятся к определенным видам хозяев. Далее представлены рекомендации, которые могут быть полезными в постановке правильного диагноза.

3.1. Рекомендуемые методы

- i. *Микроскопическое исследование*: Наблюдение под микроскопом ($\times 400-1000$ в масляной иммерсии) окрашенной окраской азур-эозином пробы крови, отобранной у хозяина или в тесте путем заражения мышей, позволяет идентифицировать подвид *Trypanozoon* на основании морфологии и морфометрии паразитов. Когда доступны свежие пробы, то для повышения чувствительности необходимо использовать НСТ или BSM.
- ii. *ПЦР-TBR*: ДНК нужно готовить из крови с применением коммерческого набора или методом с использованием фенол хлороформа. Для этого нужно использовать лейкоцитную пленку, полученную посредством 8000 g центрифугирования 0,5 мл крови. ПЦР выполняют описанным выше способом с использованием праймеров TBR (Masiga et.,al 1992). Результат в

отношении *Trypanozon* считается положительным, если на агарозном геле видны 177 пар оснований продукта.

- iii. ИФА *T. evansi*: Сыворотку или плазму тестируют с использованием ИФА *T. evansi* (растворяемые антигены из целого лизата *T. evansi*), как описано выше. Проба считается положительной, когда ее RPP > точки разделения, установленной для видов хозяев (соответствующие конъюгаты определяют для каждого вида; смотри ниже (d)).
- iv. САТТ/Т. *evansi*: Сыворотку или плазму разводят 1:4 и тестируют в соответствии с инструкциями производителя. Положительными пробами считают пробы с результатами = или > один +(сомнительные пробы считаются отрицательными).

3.2. Непарнокопытные

Непарнокопытное считается отрицательным на сурру, если оно имеет отрицательные результаты в ИФА- *T. Evansi* (цельная молекула анти-лошадиного IgG), САТТ/Т. *Evansi*, ПЦР-*TBR* и исследовании с использованием микроскопа.

Считается, что животное инфицировано *Trypanozon spp.*, если оно демонстрирует положительные результаты в ПЦР *TBR* и/или при микроскопическом исследовании обнаружены паразиты *Trypanozon*.

Животное считается серопозитивным к сурре, если оно имеет положительные результаты в ИФА *T. evansi* и/или САТТ/Т. *Evansi*; в этом случае необходимо проводить исследование животного на дурину в РСК. Если результаты исследования на дурину в РСК положительные, то оно считается серопозитивным к дурине. Если результаты исследования на дурину в РСК отрицательные, то оно считается серопозитивным только к сурре.

3.3. Верблюдовые

Животное считается отрицательным на сурру, если оно имеет отрицательные результаты в ИФА- *T. Evansi* (конъюгат белка А), САТТ/Т. *Evansi*, ПЦР-*TBR* и исследовании с использованием микроскопа).

Считается, что животное инфицировано *Trypanozon spp.*, если оно демонстрирует положительные результаты в ПЦР *TBR* и/или при микроскопическом исследовании.

Животное считается серопозитивным к сурре, если оно демонстрирует положительные результаты в ИФА- *T. Evansi* и/или САТТ/Т. *Evansi*.

3.4. Другие виды-хозяев

Животное считается отрицательным на сурру, если оно имеет отрицательные результаты в ИФА-Т. *Evansi* (конъюгат см. ниже), САТТ/Т. *Evansi*, ПЦР-*TBR* и исследовании с использованием микроскопа).

Считается, что животное инфицировано *Trypanozon spp.*, если оно демонстрирует положительные результаты в ПЦР *TBR* и/или при микроскопическом исследовании.

Животное считается серопозитивным к суре, если оно демонстрирует положительные результаты в ИФА- *T. Evansi* и/или САТТ/Т. *Evansi*.

Конъюгаты, используемые для каждого вида-хозяина: Крупный рогатый скот и буйволы: Цельная молекула антибычьего IgG; свиньи и слоны: конъюгат белка G; Верблюды: конъюгат белка А; Крысы: цельная молекула антикрысиного IgG. Необходимо определить конъюгаты для видов-хозяев.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

Для профилактики этой болезни не существует вакцин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ARTAMA W.T., AGEY M.W. & DONELSON J.E. (1992). DNA comparisons of *Trypanosoma evansi* (Indonesia) and *trypanosoma brucei* spp. *Parasitology*, **104**, 67–74.

BASAGOUDANAVAR S.H., RAO J.R., OMANAWAR S., TIWARI A.K., SINGH R.K., KARTARIA R.S. & BUTCHAIH G. (2001). Identification of *Trypanosoma evansi* by DNA hybridisation using a non-radioactive probe generated by arbitrary primer PCR. *Acta Vet. Hung.*, **49**, 191–195.

BAJYANA SONGA E. & HAMERS R. (1988). A card agglutination test (CATT) for veterinary use based on an early VAT RoTat 1–2 of *Trypanosoma evansi*. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.*, **68**, 233–240.

BENGALY Z., KASBARI M., DESQUESNES M. & SIDIBE I (2001). Validation of a polymerase chain reaction assay for monitoring the therapeutic efficacy of diminazene aceturate in trypanosome-infected sheep. *Vet. Parasitol.*, **96**, 101–113.

BRUN R., HECKER H. & LUN Z.R. (1998). *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Vet. Parasitol.*, **79**, 95–107.

CLAES F., AGBO E.C., RADWANSKA M., TE PAS M.F.W., BALTZ T., DE WAAL D.T., GODDEERIS B.M., CLASSEN E. & BUSCHER P. (2003). How does *Trypanosoma equiperdum* fit into the *Trypanozoon* group. A cluster analysis by RAPD and multiplex-endonuclease genotyping approach. *Parasitology*, **26**, 425–431

CLAES F., BUSCHER P., TOURATIER L. & GODDEERIS B.M. (2005). *Trypanosoma equiperdum*: master of disguise or historical mistake. *Trends Parasitol.*, **21** (7), 316–321.

CLAES F., RADWANSKA M., URAKAWA T., MAJIWA P.A., GODDEERIS B. & BUSCHER P. (2004) Variable surface glycoprotein RoTat 1.2 PCR as a specific diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma evansi* infections. *Kinetoplastid Biol. Dis.*, **3**, 3.

DARGANTES A.P., REID S.A. & COPEMAN D.B. (2005a). Experimental *Trypanosoma evansi* infection in the goat. I Clinical signs and pathology. *J. Comp. Pathol.*, **133**, 261–266.

DARGANTES A.P., REID S.A. & COPEMAN D.B. (2005b). Experimental *Trypanosoma evansi* infection in the goat. II Pathology. *J. Comp. Pathol.*, **133**, 267–276.

DAVISON H.C., THRUSFIELD M.V., MUHARSINI S., HUSEIN A., PARTOUTOMO S., MASAKE R. & LUCKINS A.G. (1999). Evaluation of antigen- and antibody-detection tests for *Trypanosoma evansi* infections of buffaloes in Indonesia. *Epidemiol. Infect.*, **123**, 149–155.

DESQUESNES M. (1996). Evaluation of three antigen detection tests (monoclonal trapping ELISA) for African trypanosomes, with an isolate of *T. vivax* from French Guyana. *Ann. NY Acad. Sci.*, **791**, 172–184.

- DESQUESNES M. (1997a). Les trypanosomoses du bétail en Amérique Latine, étude spéciale dans le Plateau des Guyanes. PhD Thesis, Lille II University, 26 septembre 1997, Lille, France, 409 p.
- DESQUESNES M. (1997b). Evaluation of a simple PCR technique for the diagnosis of *Trypanosoma vivax* in the serum of cattle in comparison to parasitological techniques and antigen-enzyme linked immunosorbent assay (Ag-ELISA). *Acta Trop.*, **65**, 139–148.
- DESQUESNES M. (1997c). Standardisation internationale et régionale des épreuves immuno-enzymatiques: méthode, intérêts et limites. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **16**, 809–823.
- DESQUESNES M. (2004). Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America. 2004, CIRAD-EMVT publication, OIE, Paris, France, ISBN 92-9044-634-X. 174 p.
- DESQUESNES M., BOSSARD G., THEVENON S., PATREL D., RAVEL S., PAVLOVIC D., HERDER S., PATOUT O., LEPETITCOLIN E., HOLLZMULLER P., BERTHIER D., JACQUIET P. & CUNY G. (2009). Development and application of an antibody- ELISA to follow up a *Trypanosoma evansi* outbreak in a dromedary camel herd in France. *Vet. Parasitol.*, **162** (3–4), 214–220.
- DESQUESNES M. & DAVILA A.M. (2002). Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Vet. Parasitol.*, **109** (3–4), 213–231.
- DESQUESNES M., MCLAUGHLIN G., ZOUNGRANA A. & DÁVILA A.M.R. (2001). Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *Int. J. Parasitol.*, **31**, 610–614.
- DESQUESNES M., MICHEL J.F., DE LA ROCQUE S., SOLANO P., MILLOGO L., BENGALY Z. & SIDIBE I. (1999). Enquête parasitologique et sérologique (ELISA-indirectes) sur les trypanosomoses des bovins dans la zone de Sidéradougou, Burkina Faso. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **52**, 3–4.
- DESQUESNES M. & TRESSE L. (1996). Evaluation de la sensibilité du test de WOO pour la détection de *Trypanosoma vivax*. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 1996. **49**, 315–321.
- DIA M.L., DIOP, C., AMINETOU M., JACQUIET P. & THIAM A. (1997). Some factors affecting the prevalence of *T. evansi* in camels in Mauritania. *Vet. Parasitol.*, **72**, 111–120.
- DIA M.L., VAN MEIRVENNE N., MAGNUS E., LUCKINS A.G., DIOP C., THIAM A., JACQUIET P. & HAMERS R. (1997). Evaluation de 4 tests de diagnostic: Frottis sanguins, CATT, IFI et ELISA-Ag dans l'étude de l'épidémiologie de la trypanosomose cameline à *Trypanosoma evansi* en Mauritanie. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **50** (1), 29–36.
- DIALLO O., BAJYANA SONGA E., MAGNUS E., KOUYATE B., DIALLO B., VAN MEIRVENNE N. & HAMERS R. (1994). Evaluation of a direct serologic card agglutination test for the diagnosis of camel trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi*. *Rev. Sci. Tech.*, **13**(3), 793–800.

- FERENC S.A., STOPINSKI V. & COURTENEY C.H. (1990). The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* and its use in a seroepidemiological survey in the eastern Caribbean basin. *Int. J. Parasitol.*, **20**, 51–56.
- FRANKE C.R., GREINER M. & MEHLITZ D. (1994). Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Pocone (Mato Grosso, Brazil). *Acta Trop.*, **58**, 159–169.
- GILL B.S. (1977). Trypanosomes and trypanosomiasis of Indian livestock. Indian Council of Agricultural Research, Edit. ICAR New Delhi, 1977, A booklet, 137 p.
- GREINER M., FRANKE C.R., BOHNING D. & SCHLATTMANN P. (1994). Construction of an intrinsic cut off value for the sero-epidemiological study of *Trypanosoma evansi* infections in a canine population in Brazil: a new approach toward an unbiased estimation of prevalence. *Acta Trop.*, **56**, 97–109.
- GUTIERREZ C., CORBERA J.A., DORESTE F. & BUSCHER P. (2004a). Use of the miniature anion exchange centrifugation technique to isolate *Trypanosoma evansi* from goats. *Ann. NY Acad. Sci.*, **1026**, 149–151.
- GUTIERREZ C., CORBERA J.A., JUSTE M.C., DORESTE F. & MORALES I. (2005). An outbreak of abortions and high neonatal mortality associated with *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels in the Canary Islands. *Vet. Parasit.*, **130**, 163–168.
- GUTIERREZ C., CORBERA J.A., MORALES M. & BUSCHER P. (2004b). Performance of serological tests for *Trypanosoma evansi* in experimentally inoculated goats. *Ann. NY Acad. Sci.*, **1026**, 152–153.
- HOLLAND W.G., CLAES F., MY L.N., THANH N.G., TAM P.T., VERLOO D., BUSCHER P., GODDEERIS B. & VERCRUYSSSE J. (2001). A comparative evaluation of parasitological tests and a PCR for *Trypanosoma evansi* diagnosis in experimentally infected water buffaloes. *Vet. Parasit.*, **97**, 23–33.
- HOLLAND W.G., THANH N.G., DO T.T., SANGMANEEDET S., GODDEERIS B. & VERCRUYSSSE J. (2005). Evaluation of diagnostic tests for *Trypanosoma evansi* in experimentally infected pigs and subsequent use in field surveys in North Vietnam and Thailand. *Trop. Anim. Health Prod.*, **37**(6), 457–467.
- HOLLAND W.G., THANH N.G., MY L.N., MAGNUS E., VERLOO D., BUSCHER P., GODDEERIS B. & VERCRUYSSSE J. (2002). Evaluation of whole fresh blood and dried blood on filter paper discs in serological tests for *Trypanosoma evansi* in experimentally infected water buffaloes. *Acta Trop.*, **81**, 159–165.
- HOPKINS J.S., CHITAMBO H., MACHILA N., LUCKINS A.G., RAE P.F., VAN DE BOSSCHE P. & EISLER M. (1998). Adaptation and validation of antibody-ELISA using dried blood spots on filter paper for epidemiological surveys of tsetse-transmitted trypanosomiasis in cattle. *Prev. Vet. Med.*, **37**, 91–99.
- JACQUIET P., CHEILH D., THIAM A. & DIA M.L. (1993). La trypanosomose à *Trypanosoma evansi* (Steel 1985), Balbiani 1988, chez les ruminants de Mauritanie. Résultats d'inoculations expérimentales et d'enquêtes sur le terrain. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **46**, 574–578.

- JENSEN R.E., SIMPSON L. & ENGLUND P.T. (2008). What happens when *Trypanosoma brucei* leaves Africa. *Trends Parasitol.*, **24**, 428–431.
- KONNAI S., MEKATA M., MINGALA C., ABES N., GUTIERREZ C., HERRERA J., DARGANTES A., WITOLA W., CRUZ L., INOUE N., ONUMA M. & OHASHI K. (2009). Development and application of a quantitative real-time PCR for the diagnosis of Surra in water buffaloes. *Infect. Genet. Evol.*, **4**, 449–452.
- LAHA R. & SASMAL N.K. (2008). Characterization of immunogenic proteins of *Trypanosoma evansi* isolated from three different Indian hosts using hyperimmune sera and immune sera. *Res. Vet. Sci.*, **85** (3), 534–539.
- LAI D.H., HASHIMI H., LUN Z.R., AYALA F.J. & LUKES J. (2008). Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **105** (6), 1999–2004.
- LANHAM S.M. & GODFREY D.G. (1970). Isolation of salivarian Trypanosomes from man and other mammals using DEAE – Cellulose. *Exp. Parasitol.*, **28**, 521–534.
- LOHR K.F., PHOLPARK S., SIRIWAN P., LEESIRIKUL N., SRIKITJAKARN & STAAK C. (1986). *Trypanosoma evansi* infection in buffaloes in North-East Thailand. II. Abortions. *Trop. Anim. Health Prod.*, **18**, 103–108.
- LUMDSEN W., KIMBER C., DUKES P., HALLER L., STANGHELLINI A. & DUVALLET G. (1981). Field diagnosis of sleeping sickness in Ivory Coast 1. Comparison of the miniature anion-exchange centrifugation technique with other protozoological methods. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **75**, 242–250.
- MACIEL B.M., SANTOS A.C., DIAS J.C., VIDAL R.O., DIAS R.J., GROSS E., CASCARDO J.C. & REZENDE R.P. (2009). Simple DNA extraction protocol for a 16S rDNA study of bacterial diversity in tropical landfarm soil used for bioremediation of oil waste. *Genet. Mol. Res.*, **8** (1), 375–388.
- MAJIWA P.A.O., THATTHI R., MOLOO S.K., NYEKO J.P.H., OTIENO L.H. & MALOO S. (1994). Detection of trypanosome infections in the saliva of tsetse flies and buffy coat samples from antigenaemic but aparasitaemic cattle. *Parasitology*, **108**, 1–10.
- MASIGA D.K., SMYTH A.J., HAYES P., BROMIDGE T.J. & GIBSON W.C. (1992). Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Int. J. Parasitol.*, **22**, 909–918.
- MONZON C.M. (2006). Characterisation of a monoclonal antibody against *Trypanosoma evansi* and its application for detecting circulating antibodies. *Rev. Sci. Tech.*, **25** (3), 1067–1074.
- MONZON C.M., MANCEBO O.A. & ROUX J.P. (1990). Comparison between 6 parasitological methods for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in the subtropical area of Argentina. *Vet. Parasitol.*, **36**, 141–146.
- MORZARIA S., MASAKE R., ROWLAND J. & MUSOKE T. (1996). Antigen ELISAs for trypanosomes; evaluation of the performance. Proceedings of a Workshop held at ILRI, Nairobi, Kenya, 9–11 December 1996, 129 p.

- MOSER D.R., COOK G.A., OCHS D.E., BAILEY C.P., MCKANE M.R. & DONELSON J.E. (1989). Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology*, **99**, 57–66.
- NGAIRA J.M., OLEMBO N.K., NJAGI E.N. & NGERANWA J.J. (2005). The detection of non-RoTat 1.2 *Trypanosoma evansi*. *Exp. Parasitol.*, **110** (1), 30–38.
- NJIRU Z.K., CONSTANTINE C.C., NDUNG’U J.M., ROBERTSON I., OKAYE S., THOMPSON R.C. & REID S.M. (2004). Detection of *Trypanosoma evansi* in camels using PCR and CATT/*T. evansi* tests in Kenya. *Vet. Parasitol.*, **124**, 187–199.
- OMANWAR S., RAO J.R., BASAGOUDANAVAR S.H., SINGH R.K. & BUTCHAIA G. (1999). A simple and highly sensitive method to detect *Trypanosoma evansi* by DNA amplification from crude blood samples collected on filter papers. *J. Vet. Parasitol.*, **13** (1), 27–29.
- ONAH D.N., HOPKINS J.A. & LUCKINS A.G. (1998). Increase in CD5⁺ B cells and depression of immune responses in sheep infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **63**, 209–222.
- PANYIM S., VISESHAKUL N., LUXANANIL P., WUYTS N. & CHOKESAJJAWATEE N. (1993). A PCR method for highly sensitive detection of *Trypanosoma evansi* in blood samples. Proceedings of EEC contractants workshops, Resistance or tolerance of animals to diseases and veterinary epidemiology and diagnostic methods, Rethymno, Greece, 2–6 November 1992. CIRAD-EMVT, Maisons Alfort, France (Monographie), 138–143.
- PAYNE R.C., SUKANTO I.P., DJAUHARI D., PARTOUTOMO S., WILSON A.J., JONES T.W., BOID R. & LUCKINS A.G. (1991). *Trypanosoma evansi* infection in cattle, buffaloes and horses in Indonesia. *Vet. Parasitol.*, **38** (2–3), 109–119.
- PENCHENIER L., DUMAS V., GREBAUT P., REIFENBERG J.-M. & CUNY G. (1996). Improvement of blood and fly gut processing for PCR diagnosis of trypanosomosis. *Parasite*, **4**, 387–389.
- RAE P.F., THRUSFIELD M.V., HIGGINS A., AITKEN C.G.G., JONES T.W. & LUCKINS A.G. (1989). Evaluation of enzyme immunoassays in the diagnosis of camel (*Camelus dromedarius*) trypanosomiasis: a preliminary investigation. *Epidemiol. Infect.*, **102**, 297–307.
- REID S.A. & COPEMAN D.B. (2002). Evaluation of an antibody–ELISA using five crude antigen preparations for the diagnosis of *Trypanosoma evansi* infection in cattle. *Vet. Parasitol.*, **104**, 79–84.
- REID S.A. & COPEMAN D.B. (2003). The development and validation of an antibody–ELISA to detect *Trypanosoma evansi* infection in cattle in Australia and Papua New Guinea. *Prev. Vet. Med.*, **61**, 195–208.
- REID S.A., HUSEIN A. & COPEMAN D.B. (2001). Evaluation and improvement of parasitological tests for *Trypanosoma evansi* infection. *Vet. Parasitol.*, **102**, 291–297.
- SACHS R. (1984). Improvements in the miniature anion exchange centrifugation technique for detecting trypanosomes in domestic pigs. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **78**, 561.

- SOLANO P., MICHEL J.F., LEFRANÇOIS T., DE LA ROCQUE S., SIDIBE I., ZOUNGRANA A. & CUISANCE D. (1999). Polymerase chain reaction as a diagnosis tool for detecting trypanosomes in naturally infected cattle in Burkina Faso. *Vet. Parasitol.*, **86**, 95–103.
- TAYLOR T.K., BOYLE D.B. & BINGHAM J. (2008). Development of a TaqMan PCR assay for the detection of *Trypanosoma evansi*, the agent of surra. *Vet. Parasitol.*, **153** (3–4), 255–264.
- THEKISOE O.M., INOUE N., KUBOKI N., TUNTASUVAN D., BUNNOY W., BORISUTSUWAN S., IGARASHI I. & SUGIMOTO C. (2005). Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP), PCR and parasitological tests for detection of *Trypanosoma evansi* in experimentally infected pigs. *Vet. Parasitol.*, **130** (3–4), 327–330.
- TRAN T., CLAES F., VERLOO D., DE GREEVE H. & BUSCHER P. (2009). Towards a new reference test for surra in camels. *Clin. Vaccine Immunol.*, **16** (7), 999–1002.
- TUNTASUVAN D., CHOMPOOCHAN T., VONGPAKORN M. & MOHKAEW K. (1996). Detection of *Trypanosoma evansi* antibodies in pigs using an enzyme linked immunosorbent assay. *J. Thai Vet. Med. Assoc.*, **47**, 45–53.
- UILENBERG G. (1998). A field guide for the diagnosis treatment and prevention of African animal trypanosomosis. FAO, Rome, Italy, 158 p.
- VAN MEIRVENNE N., MAGNUS E. & BUSCHER P. (1995). Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosoma brucei gambiense*. *Acta Trop.*, **60** (3), 189–199.
- VENTURA R.M., TAKEDA G.F., SILVA R.A., NUNES V.L., BUCK G.A. & TEIXEIRA M.M. (2002). Genetic relatedness among *Trypanosoma evansi* stocks by random amplification of polymorphic DNA and evaluation of a synapomorphic DNA fragment for species-specific diagnosis. *Int. J. Parasitol.*, **32**, 53–63.
- VERLOO D., HOLLAND W., MY L.N., THANH N.G., TAM P.T., GODDEERIS B., VERCRUYSSSE J. & BUSCHER P. (2000). Comparison of serological tests for *Trypanosoma evansi* natural infections in water buffaloes from north Vietnam. *Vet. Parasitol.*, **92**, 87–96.
- VERLOO D., MAGNUS E. & BUSCHER P. (2001). General expression of RoTat 1.2 variable antigen type in *Trypanosoma evansi* isolates from different origin. *Vet. Parasitol.*, **97**, 183–189.
- VERLOO D., TIBAYRENC R., MAGNUS E., BÜSCHER P. & VAN MEIRVENNE N. (1998). Performance of serological tests for *Trypanosoma evansi* infections in camels from Niger. *J. Protozool. Res.*, **8**, 190–193.
- VIRESHAKUL N. & PANYIM S. (1990). Specific DNA probe for the sensitive detection of *Trypanosoma evansi*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, **21**, 21–27.
- WARBURG O. & CHRISTIAN W. (1942). Isolation and crystallization of enolase. *Biochem. Z.*, **310**, 384–421.
- WUYTS N., CHODESAJJAWATEE N. & PANYIM S. (1994). A simplified and highly sensitive detection of *Trypanosoma evansi* by DNA amplification. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, **25**, 266–271.

WUYTS N., CHOKESAJJAWATEE N., SARATAPHAN N. & PANYIM S. (1995). PCR amplification of crude blood on microscope slides in the diagnosis of *Trypanosoma evansi* in dairy cattle. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, **75**, 229–237.

ZABLOTSKIJ V.T., GEORGIU C., DE WAAL T., CLAUSEN P.H., CLAES F. & TOURATIER L. (2003). The current challenges of dourine: difficulties in differentiating *Trypanosoma equiperdum* within the subgenus Trypanozoon. *Rev. SciTech.*, **22**(3), 1087–1096.

NB: Референтные лаборатории МЭБ по инфекции *trypanosoma evansi* (сурра)

(Новый список МЭБ можно увидеть в Таблице в Части 3 данного Руководства по наземным животным или на веб-сайте МЭБ:

<http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения дальнейшей информации о диагностических тестах, реагентах против сурры свяжитесь с Референтной лабораторией МЭБ.