

ГЛАВА 3.4.16.

**ТРИХОМОНОЗ**

---

**РЕЗЮМЕ**

*Венерический трихомоноз КРС возникает по причине Tritrichomonas foetus, жгутикового протозойного паразита. Болезнь распространена во всем мире и одно время имела серьезную экономическую значимость, поскольку приводила к абортam и инфертильности, в особенности среди молочных коров. Широкое использование искусственного осеменения во многих странах мира способствует снижению превалентности. Тем не менее, трихомоноз по-прежнему имеет большое значение в стадах, где не проводят искусственное осеменение.*

*Передача болезни осуществляется в основном в ходе спаривания, однако возможна также передача механическим путем через инструменты во время искусственного осеменения или в ходе гинекологического осмотра. Организм способен выживать в цельной или разбавленной сперме при температуре 5°C. Быки являются основным резервуаром болезни, поскольку имеют тенденцию к долгосрочному носительству, в то время как у большинства коров инфекция исчезает спонтанно. По этим причинам для диагностики и контроля болезни в стадах образцы лучше отбирать от быков.*

**Идентификация возбудителя:** Tritrichomonas foetus – жгутиковый грушевидный протозойный паразит, длина которого составляет примерно 8-18 мкм, а ширина – 4-9 мкм. У паразита имеется три передних и один задний жгутик, а также ундулирующая мембрана. Организм передвигается толчкообразными, перекатывающимися движениями, и его можно увидеть в исследуемых культурах препуциальных образцов, полученных от инфицированных быков, в вагинальных смывах или цервико-вагинальной слизи инфицированных коров, или иногда от абортированных плодов. Tritrichomonas foetus можно культивировать *in-vitro* и рассмотреть во влажном препарате или на окрашенном слайде. Стандартный метод диагностики для быков включает соответствующий сбор, исследование и культивирование смегмы с препуция и пениса. Смегму можно отбирать разными способами, включая лаваж препуция или соскоб из полости препуция и головки полового члена на уровне свода с помощью сухой пипетки для осеменения. Существует ряд питательных сред *in-vitro*, однако коммерческий тест-набор, представляющий собой систему культивирования<sup>2</sup>, позволяет осуществить выращивание трихомонад и провести прямое микроскопическое исследование.

**Альтернативные исследования:** Трихомоноз КРС можно также обнаружить с помощью амплификации методом полимеразной цепной реакции. В прошлом для исследования стад проводили реакцию агглютинации с использованием слизи, отобранной из шейки, и антигена из культивированных организмов. Также для исследования стад

---

<sup>2</sup> InPouch™ TF тест, BioMed Diagnostics, Уайт Сити, Орегон, Соединенные Штаты Америки (США).

проводили интрадермальный тест с помощью преципитации организма трихлоруксусной кислотой.

**Требования к вакцинам:** В продаже имеются убитые цельноклеточные вакцины, которые частично доказали свою эффективность. Они представлены либо в виде моновалентных вакцин, либо в виде поливалентных вакцин, содержащих *Campylobacter* и *Leptospira*.

## А. ВВЕДЕНИЕ

Венерический трихомоноз КРС возникает по причине жгутикового протозойного паразита *Tritrichomonas foetus*. Обычно хозяевами *T. foetus* является КРС (*Bos taurus*, *B. indicus*). Непатогенные виды трихомонад возникают в кишечнике КРС; *T. suis* свиней не различим морфологически, серологически и генетически (в современных молекулярных анализах) от *T. foetus* (Felleisen, 1997; Soulsby, 1982). Для определения таксономического статуса изолятов, полученных от КРС и свиней, требуется проведение дальнейшей генетической характеристики.

*Tritrichomonas foetus* – полиформ длиной 8-18μм, шириной 4-9 μм, с тремя жгутиками спереди и одним сзади, а также с ундулирующей мембраной. Живые организмы передвигаются толчкообразными, перекатывающимися движениями, и их можно увидеть с помощью оптического микроскопа. Фазово-контрастная, темнопольная микроскопия используется для детального исследования, необходимого для проведения идентификации. Опубликованы детальные морфологические описания, включая исследования под электронным микроскопом (Warton & Honigberg, 1979). Важно дифференцировать *T. foetus* от других контаминирующих жгутиковых простейших, которые могут присутствовать в образцах, отобранных из половых путей КРС (BonDurant *et al.*, 1999; Campero *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 2003b; Taylor *et al.*, 1994). При проведении фазово-контрастной микроскопии важной характеристикой является количество наблюдаемых жгутиков, поскольку это позволяет дифференцировать *T. foetus* от некоторых других жгутиковых КРС, которые кажутся похожими. Описана методика окрашивания, которая позволяет более четко увидеть морфологию и упрощает процесс идентификации (Lun & Gajadhar *et al.*, 1999).

*Tritrichomonas foetus* размножается путем продольного деления на две части; не известно, происходит ли размножение генеративно. Экологически резистентные стадии паразита не наблюдались. Тем не менее, *T. foetus* можно культивировать *in vitro* с помощью коммерческого набора (смотрите сноску 1) или самостоятельно приготовленной среды такой, как среда Даймонда (Dimond, 1983). Организм также можно обнаружить молекулярными методами такими, как полимеразная цепная реакция (ПЦР) (Campero *et al.*, 2003; Felleisen *et al.*, 1998).

Согласно исследованиям, проведенным ранее, на основании реакции агглютинации выделяется три серотипа (Skirrow & BonDurrant, 1988); как сообщают, штамм 'belfast' преобладал в Европе, Африке и США (Gregory *et al.*, 1990); штамм 'brisbane' – в Австралии (Elder, 1964); а штамм 'manley' был зарегистрирован лишь в нескольких

вспышках (Skirrow & BonDurrant, 1988). Для обозначения 'штамма' и 'серотипа' необходимо провести дальнейшую работу по сравнению ростовых характеристик, а также генетических и антигенных вариаций и патогенеза изолятов *T. foetus*, полученных из разных местностей.

Передача инфекции возникает во время спаривания, искусственного осеменения или в ходе гинекологического осмотра коров. Место инфицирования у быков, в основном, - препуциальная полость (BonDurant 1997; Personson *et al.*, 1974), при этом клинические проявления либо слабые, либо вовсе отсутствуют. Что касается быков в возрасте 3-4 лет, внезапное выздоровление происходит редко, что приводит к тому, что они являются резервуаром инфекции в стаде. У быков моложе 3-4 лет инфекция может носить преходящий характер.

*Tritrichomonas foetus* присутствует в малых количествах в препуциальной полости быков, концентрируясь на своде и вокруг головки полового члена (Hammond & Barlett, 1943). У хронически инфицированных быков отсутствуют генерализованные поражения. У инфицированных коров первым поражением является вагинит, которому у стельных животных может сопутствовать инвазия шейки матки и матки. В результате могут возникать различные осложнения, включая плацентит, который ведет к раннему аборту (1-16 недель), выделения из матки и пиометру. В некоторых случаях, несмотря на инфекцию, беременность не прерывается абортом, и рождается нормальный выношенный теленок. На уровне стада, у коров после инфицирования цикл течки может стать нерегулярным, могут появиться маточные выделения, пиометра или возникнуть ранний аборт (BonDuart, 1997; Fitzgerald, 1986; Skirrow & BonDurant, 1988). Коровы обычно избавляются от инфекции и приобретают иммунитет, как минимум на случный сезон (BonDurant, 1997; Fitzgerald, 1986; Soulsby, 1982).

## **В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ**

### **1. Идентификация возбудителя**

#### **1.1. Идентификация возбудителя путем непосредственного исследования или культуральным методом (тест, предписанный для международной торговли)**

Предположительный диагноз трихомоноз, как причина неспособности к оплодотворению в стаде, основывается на клинической истории, признаках раннего аборта, проведении повторных случек, а также нерегулярном цикле течки. Подтверждение инфекции зависит от проявления организмов в плацентарной жидкости, содержимом желудка абортированных плодов, маточных смывах, выделениях пиометры, вагинальной слизи или препуциальной смегмы. В инфицированных стадах наиболее надежным материалом для диагностики являются препуциальные или вагинальные смывы или соскобы (Европейский Союз, 1988; Kittel *et al.*, 1998; Mukhufhi *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 1999; Schonmann *et al.*, 1994).

В различных ситуациях количество организмов варьирует. Их обнаруживают в больших количествах в абортированных плодах, в матке через несколько дней после аборта и у недавно инфицированных коров (в вагинальной слизи на 12-20 день после инфицирования). У инфицированных быков организмы *T. foetus* присутствуют в слизи препуция или пениса, при этом, очевидно, не затрагивая подслизистые ткани. Перед отбором препуциальных образцов обычно рекомендуется подождать хотя бы 1 неделю после последней случки.

### 1.1.1. Отбор образцов

Описан ряд методов отбора препуциальных образцов от быков и вагинальных образцов от коров. Важно не допускать контаминацию фекалиями, поскольку это может занести в образец простейшие, которые можно спутать с *T. foetus*, из кишечника, (Taylor *et al.*, 1994). Чтобы минимизировать риск контаминации образцов необходимо удалить посторонние материалы и загрязненную шерсть из области препуциального отверстия или вульвы; тем не менее, следует избегать очистки данных зон, в частности, дезинфектантами, поскольку это может снизить диагностическую чувствительность. Образцы отбирают от быков путем соскабливания слизи с препуция и полового члена с помощью пипетки для искусственного осеменения (Parker *et al.*, 1999; Schonmann *et al.*, 1994), щеточки (Ostrowski *et al.*, 1974; Parker *et al.* 1999), путем лаважа препуциального мешка (Schonmann *et al.*, 1994) или путем взятия смыва с искусственной вагины после сбора спермы (Gregory *et al.*, 1990). Последний метод не рекомендуется использовать, поскольку его чувствительность может быть ниже (Gregory *et al.*, 1990). Образцы от коров представляют собой смывы из вагины или соскобы с шейки матки, отобранные с помощью пипетки для искусственного оплодотворения или щеточки (Kittle *et al.*, 1998; Mancebo *et al.*, 1995).

В случае, когда образцы невозможно доставить в лабораторию в течение 24 часов необходимо использовать транспортировочную среду с антибиотиками (например, тиогликолевый бульон с антибиотиками [Bryan *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1990] или систему культивирования). Во время транспортировки необходимо обеспечить защиту организмов от воздействия солнечного света, а также резких перепадов температур (температура должна быть выше 5°C и ниже 38°C) (Bryan *et al.*, 1999).

### 1.1.2. Культура

Если организмов слишком мало, чтобы их можно было непосредственно обнаружить и точно идентифицировать – необходимо приготовить культуры. Как правило, в большинстве случаев существует необходимость в приготовлении культуры *T. foetus*, поскольку количество организмов не достаточно высоко для

положительной диагностики путем непосредственного исследования. Можно использовать несколько сред. Предпочтение отдают среде Даймонда или коммерческим системам культивирования (Bryan *et al.*, 1999; Eaglesome & Garcia, 1992; Parker *et al.*, 2003a; Ribeiro, 1990). Другие среды, которые тоже могут быть использованы, включают среду Клаузена и среду Оксоида (Eaglesome & Garcia, 1992). Инокуляцию образцов в культурную среду необходимо произвести как можно быстрее после из сбора. Что касается образцов, представляющих собой преуциальные мазки, их необходимо обработать путем центрифугирования. Затем осадок инокулируют в культуральную среду. Некоторые протоколы рекомендуют проведение визуального контроля материала или осадка перед инокуляцией, однако это не повышает диагностическую чувствительность. Также важно убедиться в том, что срок годности используемой среды не истек, поскольку многие среды являются нестабильными. Большое значение играет качество воды, поэтому в среду можно добавить фунгицид, чтобы предотвратить рост дрожжей.

Первоначальное обнаружение организмов можно осуществить с помощью оптического микроскопа на слайде с влажным препаратом, приготовленном непосредственно из образца или культуры, или через пластиковую стенку пакета из набора InPouch™ (смотрите сноску 1), используя прилагаемый специальный пластиковый зажим. Подвижные организмы можно увидеть под обычным составным микроскопом при 100-кратном увеличении и больше. Для исследования пробирок с культуральной средой можно использовать инвертированный микроскоп. Культуральные среды необходимо просматривать под микроскопом с интервалами с 1 по 7 день после инокуляции (Bryan *et al.*, 1999; Lun *et al.*, 2000). Организмы можно идентифицировать на основании характерных морфологических параметров. Грушевидные организмы имеют три жгутика спереди и один сзади, а также ундулирующую мембрану, которая практически доходит до заднего края клетки. Также у них имеется аксостиль, который выходит за пределы задней части клетки. Фазово-контрастная микроскопия имеет особую ценность при выявлении данных черт, хотя можно также провести процедуру окрашивания (Lun & Gajadhar, 1999). Оба метода работают особенно хорошо при относительно большом количестве организмов. Особенно это касается окрашивания.

#### **1.1.2.1. Культуральный метод**

##### **i) Модифицированная среда Даймонда**

Лабораторную посуду, используемую для культивирования, необходимо промыть дистиллированной водой (избегая

использования моющих средств). Модифицированная среда Даймонда состоит из: 2 г пептон триптиказы, 1 г экстракта дрожжей, 0,5 г мальтозы, 0,1 г L-цистеин гидрохлорида и 0,02 г L-аскорбиновой кислоты с добавлением 90 мл дистиллированной воды, содержащей по 0,08 г  $K_2HPO_4$  и  $KH_2PO_4$ . Среду доводят до pH 7,2-7,4 с помощью гидроксида натрия или соляной кислоты. После добавления 0,05 г агара среду автоклавируют в течение 10 минут при температуре 121°C, дают остыть до 49°C и затем асептическим методом добавляют 10 мл инактивированной бычьей сыворотки (инактивированной путем нагревания до 56°C в течение 30 минут), 100000 единиц кристаллического пенициллина С и 0,1 г стрептомицина сульфата. Среду асептическим методом делят на аликвоты по 10 мл, помещают в стерильные пробирки (16 × 125 мм) с завинчивающейся крышкой и хранят в холодильнике при температуре 4°C до использования. Культивирование среды занимает до 7 дней, при этом образцы ежедневно проверяют (BonDurant, 1997; Lun *et al.*, 2000). Введение агара в среду удерживает контаминирующие организмы в верхней части культурной среды, помогая, таким образом, поддерживать условия, благоприятные для микроаэрофилов, внизу, где трихомонады присутствуют в наибольших количествах.

ii) Коммерческая система культивирования

Когда наряду с чувствительностью стоит вопрос удобства, можно использовать систему культивирования (смотрите сноску 1) (BonDurant, 1997; Borhardt *et al.*, 1992; Parker *et al.*, 2003a; Schonmann *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1990). Набор состоит из прозрачного гибкого пластикового пакета с двумя камерами. В верхней камере содержится среда, в которую вводят образец. Полевые образцы для непосредственного введения в мешок с культурой, как правило, собирают путем соскоба из полости препуция (BonDurant, 1997; Schonmann *et al.*, 1994). Образцы, представляющие собой смывы из препуциальной полости, требуют центрифугирования перед введением осадка в верхнюю камеру. После смешивания среду перемещают в нижнюю камеру, а мешок затем герметично закрывают и инкубируют при температуре 37°C. Исследование на трихомонады под микроскопом можно провести непосредственно через пластиковый мешок (Borhardt *et al.*, 1992). Результаты диагностики образцов от быков с использованием либо среды Даймонда, либо системы культивирования показали, что оба метода дают сопоставимые результаты, однако у системы есть некоторые преимущества

(относительно удобства и результатов тестирования) (Brochardt *et al.*, 1992; Bryan *et al.*, 1999; Kittel *et al.*, 1998; Parker *et al.*, 2003a, Schonmann *et al.*, 1994).

#### **1.1.2.2. Общая чувствительность и специфичность культуры и теста на идентификацию**

Любая оценка диагностической чувствительности и специфичности культуры и теста на идентификацию будет зависеть от эффективности отбора образцов, проведения манипуляций с ними и обработки, а также от состава и качества культуральной среды. Что касается быков, чувствительность системы InPouch™ оценили в 92% (95% доверительный интервал, 84-96%) (Parker *et al.*, 1999; 2003a). Оценки среды Даймонда и других сред варьируют, возможно, по причине различий в составе и способах приготовления, однако диапазон составляет от 78% до 99% (Parker *et al.*, 2003a; Skirrow & BonDurrant, 1988). До недавнего времени полагалось, что специфичность культурального метода составляет 100%, но, скорее всего, это преувеличение.

Не каждый образец, отобранный от конкретного быка (известно инфицированного), обязательно даст положительный результат при использовании культурального метода. Даже при оптимальных условиях отбора проб, транспортировки, культивирования и идентификации необходимо получить как минимум один отрицательный образец, прежде чем с уверенностью говорить, что животное не инфицировано. Чтобы оценить вероятность того, что животное не инфицировано, необходимо рассчитать прогностическое значение отрицательного результата. Для этого используют оценку чувствительности диагностического теста и вероятность наличия инфекции у животного до проведения испытания (Parker *et al.*, 1999). Инфекция у самок обычно исчезает в пределах 90-95 дней, поэтому бывает сложно выделить организмы у животных на поздних стадиях инфекции. Что касается экспериментально инфицированных коров, с помощью системы культивирования InPouch™ была достигнута чувствительность в 88% в течение 10 недель после инфицирования (Kittel *et al.*, 1998).

Диагностику аборта, вызванного *T. foetus*, достаточно просто провести, если использовать плод, поскольку в жидкости из плаценты или в жидкости сычуга плода присутствует большое количество организмов. Кроме того, для демонстрации организмов *T. foetus* в абортированных плодах можно использовать метод иммуногистохимии и ДНК-методы.

## 1.2. Полимеразная цепная реакция

Для идентификации *T. foetus* разработаны принципы молекулярной биологии, лежащие в основе метода ПЦР (Campero *et al.*, 2003; Cobo *et al.*, 2007; Felleisen *et al.*, 1997; 1998; Parker *et al.*, 2001). Диагностическое исследование с использованием ПЦР дает ряд преимуществ, включая повышенную аналитическую чувствительность, более быстрое получение результатов и тот факт, что организмы в отобранном образце, необязательно должны быть живыми. Описана ПЦР в реальном времени (McMillen & Lew, 2006) с низким порогом обнаружения. Однако количество протестированных образцов недостаточно для того, чтобы адекватно оценить ее эффективность. Диагностическая ПЦР включает как выделение, так и специфическую амплификацию ДНК с использованием методов ПЦР и специфических праймеров. Чувствительность и специфичность исследования зависят от выбора метода экстрагирования, условий проведения ПЦР и праймеров. Исследование методом ПЦР позволяет обнаруживать очень малые количества паразитов в лабораторных культурах организмов как в присутствии препуциального материала, так и при его отсутствии (Felleisen *et al.*, 1998; Parker *et al.*, 2001). Тем не менее, при наличии препуциального материала требуется большее количество паразитов для получения положительного результата ПЦР; наиболее вероятно это происходит по причине ингибирования компонентами препуциальной смегмы. Описаны некоторые методики выделения ДНК (Felleisen *et al.*, 1998; Huby-Chilton *et al.*, 2009; Parker *et al.*, 2001), и обычно чувствительность диагностического теста зависит от эффективности метода выделения и выполнения процедур по недопущению контаминирующих ингибиторов. Диагностическая специфичность ПЦР зависит отчасти от специфичности праймеров. Ряд праймеров, основанных на 5,8s рРНК последовательности показал хорошую диагностическую специфичность в отношении образцов, полученных от отрицательных животных (TER 3 и TER4; Felleisen *et al.*, 1998). Данные праймеры являются наиболее часто упоминаемыми в литературе. Тем не менее, они продуцируют продукты амплификации нескольких близкородственных жгутиковых (*Tritrichomonas suis*, *T. mobilensis* и трихомонада кошек), которые не отличаются от продуктов амплификации *T. foetus* (Felleisen *et al.*, 1998; Gookin *et al.*, 2002). Данные виды также невозможно дифференцировать с помощью микроскопического метода, и вполне возможно, что данные организмы синонимичны *T. foetus*. Данные праймеры можно использовать для дифференциации между *T. foetus* и не-*T. foetus* трихомонадами, которые иногда обнаруживают в препуциальных образцах (Bon Durant *et al.*, 1999; Campero *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 2003b).

Диагностическую чувствительность и специфичность данных тестов еще предстоит определить, используя адекватное количество образцов от положительных и отрицательных животных, хотя исследования, проведенные до настоящего времени, указывают на хорошую



специфичность (Campero *et al.*, 2003; Rhyan *et al.*, 1995). Диагностическую чувствительность ПЦР тестов оценили, как схожую с диагностической чувствительностью системы культивирования InPouch™ (Campero *et al.*, 2003), однако данная оценка была проведена с использованием небольшого количества животных. Методы ПЦР являются хорошей альтернативой микроскопии благодаря более быстрому получению результатов, а также способности обнаруживать мертвые организмы. Необходимо продолжить валидацию методов ПЦР путем проведения исследований с большим количеством известно положительных и отрицательных образцов. ДНК-методы могут быть использованы в качестве дополнительных или первичных испытаний (BonDurant *et al.*, 1999; Campero *et al.*, 2003; Felleisen *et al.*, 1998; Mukhufhi *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 2001) и играют ключевую роль в дифференциации простейших трихомонад, выделенных из образцов от КРС, отобранных из половых путей.

Для продолжения ранее начатой работы было выбрано несколько различных методов, в которых использовали один набор праймеров (TFR3 и TFR4; [Felleisen *et al.*, 1998]) для специфической диагностики *T. foetus*. Чтобы дифференцировать организмы, считавшиеся фекальными контаминантами репродуктивной системы КРС и *T. foetus* использовали сразу два ряда праймеров, одни праймеры - для амплификации ДНК группы трихомонад (TFR1 и TFR2; [Felleisen, 1997]), другие - специфичные для *T. foetus* (TFR3 и TFR4; [Felleisen *et al.*, 1998]) (Campero *et al.*, 2003). В качестве альтернативы для амплификации ДНК использовали праймер-аналоги (TFR1 и TFR2; [Felleisen, 1997]) и затем с помощью анализа ПДРФ провели дифференциацию различных видов простейших (Hayes *et al.*, 2003). В третьем исследовании был разработан другой набор праймеров для амплификации из простейшей трихомонады ампликонов разного размера, что позволило распознать различные виды (Grahm *et al.*, 2005). Недавно с помощью одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP) удалось показать эффективность в различении *T. foetus* от других трихомонад (Huby-Chilton *et al.*, 2009). ПЦР с использованием объединенных аликвот осажденных образцов доказала повышенную диагностическую эффективность (Kennedy *et al.*, 2009). Также было доказано, что ПЦР можно проводить для обнаружения ДНК *T. foetus* в тканях эндометрия и абортированного плода, зафиксированных в формалине (BonDurant *et al.*, 2003).

### 1.3. Иммунологические тесты

Для диагностики трихомоноза КРС в прошлом использовали несколько иммунологических тестов, а недавно было разработано еще несколько (Kerr & Robertson, 1941; Pierce, 1949; Rhyan *et al.*, 1999; Soto & Parm, 1989). Тем не менее, использование данных методов ограничено, и они не рекомендуются для обнаружения *T. foetus* у отдельных животных. В 1940-х гг. были разработаны интрадермальные диагностические тесты и реакция агглютинации со слизью, однако проблемы с их чувствительностью и

специфичностью ограничивают их применимость. Также были разработаны другие иммунологические тесты, основанные на твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА) с захватом антигена (BonDurant, 1997; Gault *et al.*, 1995). Было установлено, что с помощью методов иммуногистохимии с использованием моноклональных антител можно выявить организмы *T. foetus* в тканях, зафиксированных в формалине (Rhyan *et al.*, 1995).

### 1.3.1. Иммуногистохимический анализ тканей

У абортированного плода отсутствуют какие-либо макроскопические или микроскопические поражения, а идентификация организма необходима для диагностики. Имеются сведения об иммуногистохимическом анализе с использованием моноклональных антител (MAb) для обнаружения *T. foetus* в планценте, зафиксированной в формалине и залитой в парафин, и легких абортированного плода (Rhyan *et al.*, 1995). Иммуногистохимическое окрашивание проводят с помощью коммерческой системы стрептавидин/биотин<sup>2</sup> и моноклональных антител (34.7C4.4) к *T. foetus*. В ходе процедуры депарафинированные фрагменты по 4 мкм инкубируют с моноклональным антителом после блокировки неиммунной козьей сывороткой. Фрагменты три раза ополаскивают в буфере и инкубируют с биотинилированным козьим антимышным и антикроличьим иммуноглобулином в течение 30 минут при температуре 37°C. После трех дополнительных ополаскиваний в буфере наносят меченный пероксидазой стрептавидин на 30 минут при температуре 37°C, а ферментную активность разбавляют с 3% АЕС (3-амино-9-этилкарбазол) в N,N диметилформамиде. Фрагменты докрашивают с помощью гематоксилина Gill II в течение 3 минут, ополаскивают и окрашивают в синий цвет в буфере в течение 1 минуты. Данный метод используется для диагностики абортов, вызванных *T. foetus*.

## С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

Было показано, что цельноклеточные вакцины обеспечивают защиту КРС, и они доступны в продаже (Corbeil, 1994) либо как часть моновалентной вакцины, либо как часть поливалентной вакцины, которая также содержит *Campylobacter* и *Leptospira* spp. (BonDurant, 1997). Данные продукты показали свою эффективность в отношении коров, но не в отношении быков (BonDurant, 1993). В качестве примера, цельноклеточную вакцину можно произвести путем выращивания *T. foetus* (культура VMC-84) в модифицированной среде Даймонда (Corbeil, 1994) и заморозки культуры при температуре -20°C на 60 минут. После оттаивания суспензию, содержащую  $5 \times 10^7$  организмов/мл, в фосфатно-буферном солевом растворе добавляют к СL-вакцине.

---

<sup>2</sup> DAKO Corporation, Карпинтерия, Калифорния, США

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- BONDURANT R.H. (1997). Pathogenesis, diagnosis and management of trichomoniasis in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 13, 345–361.
- BONDURANT R.H., CAMPERO C.M. ANDERSON M.L. & HOOSEAR K.A. (2003). Detection of *Tritrichomonas foetus* by polymerase chain reaction in culture isolates, cervicovaginal mucus, and formalin-fixed tissues from infected heifers and fetuses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 15, 579–584.
- BONDURANT R.H., CORBEIL R.R. & CORBEIL L.B. (1993). Immunisation of virgin cows with surface antigen TF1.17 of *Tritrichomonas foetus*. *Infect. Immun.*, 61, 1385–1394.
- BONDURANT R.H., GAJADHAR A., CAMPERO C.M., ET AL. (1999). Preliminary characterization of a *Tritrichomonas foetus*-like protozoan isolated from preputial smegma of virgin bulls. *Bov. Pract.*, 33, 124–127.
- BORCHARDT K.A., NORMAN B.B., THOMAS M.W. & HARMON W.M. (1992). Evaluation of a new culture method for diagnosing *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Med.*, 87, 104–112.
- BRYAN L.A., CAMBELL J.R. & GAJADHAR A.A. (1999). Effects of temperature on the survival of *Tritrichomonas foetus* in transport, Diamond's and InPouch™ TF media. *Vet. Rec.*, 144, 227–232.
- CAMPERO C.M., RODRIGUEZ DUBRA C., BOLONDI A., CACCIATO C., COBO E., PEREZ S., ODEON A., CIPOLLA A. & BONDURANT R.H. (2003). Two-step (culture and PCR) diagnostic approach for differentiation of non-T.foetus trichomonads from genitalia of virgin bulls in Argentina. *Vet. Parasitol.*, 112, 167–175.
- COBO E.R., FAVETTO P.H., LANE V.M., FRIEND A., VAN HOOSER K., MITCHELL J. & BONDURANT R.H. (2007). Sensitivity and specificity of culture and PCR of smegma samples of bulls experimentally infected with *Tritrichomonas foetus*. *Theriogen.*, 68, 853–860.
- CORBEIL L.B. (1994). Vaccination strategies against *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol. Today*, 10, 103–106.
- DIAMOND L.S. (1983). Lumen dwelling protozoa: entamoeba, trichomonads and giardia. In: *In Vitro Cultivation of Protozoan Parasites*, Jensen J.B., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 65–109.
- EAGLESOME M.D. & GARCIA M.M. (1992). Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part 1. *Brucella*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Bull*, 62, 743–775.
- ELDER J.K. (1964). Examination of twelve strains of *Trichomonas foetus* (Reidmuller) isolated in Queensland and the description of a new serotype, *T. foetus* var. brisbane. *Queensl. J. Agric. Sci.*, 21, 193–203.
- EUROPEAN UNION (1988). Council Directive of 14 June 1988 laying down the animal health requirements applicable to intra-community trade in and imports of deep-frozen semen of

domestic animals of the bovine species (88/407/EEC): Official Journal of the European Communities L 194, 10–23 (Directive as last amended by Directive 2008/73/EC: Official Journal of the European Union L 219, 40–54).

FELLEISEN R. (1997). Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitol.*, 115, 111–119.

FELLEISEN R.J., SCHIMID-LAMBELET N. & GOTTSTEIN B. (1997). Comparative evaluation of methods for the diagnosis of bovine *Tritrichomonas foetus* infection. *J. Protozool. Res.*, 7, 90–101.

FELLEISEN R.S.J., LAMBELET N., BACHMANN P., NICOLET J., MULLER N. & GOTTSTEIN B. (1998). Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 513–519.

FITZGERALD P.R. (1986). Bovine trichomoniasis in parasites: epidemiology and control. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.*, 2, 277–282.

GAULT R.A., KVASNICKA W.G. HANKS D., HANKS M. & HALL M.R. (1995). Specific antibodies in serum and vaginal mucus of heifers inoculated with a vaccine containing *Tritrichomonas foetus*. *Am. J. Vet. Res.*, 56, 454–459.

GOOKIN J.L., BIRKENHEUER A.J., BREITSCHWERDT E.B. & LEVY M.G. (2002). Single-tube nested PCR for detection of *Tritrichomonas foetus* in feline feces. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 4126–4130.

GRAHN R.A., BONDURANT R.H., HOOSEAR K.A., WALKER R.L. & LYON L.A. (2005). An improved molecular assay for *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Parasitol.*, 127, 33–41.

GREGORY M.W., ELLIS B. & REDWOOD D.W. (1990). Comparison of sampling methods for the detection of *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Rec.*, 127, 16.

HAMMOND D.M. & BARTLETT D.E. (1943). The distribution of *Trichomonas foetus* in the preputial cavity of infected bulls. *Am. J. Vet. Res.* 4,143–149.

HAYES D.C., ANDERSON R.R. & WALKER R.L. (2003). Identification of trichomonadid protozoa from the bovine preputial cavity by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism typing. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 15, 390–394.

HUBY-CHILTON F., SCANDRETT B.W., CHILTON N.B. & GAJADHAR A.A. (2009). Detection and identification of *Tetratrichomonas* in preputial wash from a bull by PCR and SSCP. *Vet Parasitol.*, 166, 199–204.

KENNEDY J.A., PEARL D., TOMKY T. & CARMAN J. (2009). Pooled polymerase chain reaction to detect *Tritrichomonas foetus* in beef bulls. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20, 97–99.

KERR W.R. & ROBERTSON M. (1941). An investigation into the infection of cows with *Trichomonas foetus* by means of the agglutination reaction. *Vet. J.*, 97, 351–363.

- KITTEL D.R., CAMPERO C., VAN HOOSEAR K.A., RHYAN J.C. & BONDURANT R.H. (1998). Comparison of diagnostic methods for detection of active infection with *Tritrichomonas foetus* in beef heifers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 213, 519–522.
- LUN Z.-R. & GAJADHAR A.A. (1999). A simple and rapid method for staining *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 11, 471–474.
- LUN Z.-R., PARKER S. & GAJADHAR A.A. (2000). Comparison of growth rates in *Trichomonas foetus* isolates from various geographic regions using three different culture media. *Vet. Parasitol.*, 89, 199–208.
- MANCEBO O.A., RUSSO S.M., CARABAJAL L.L. & MONZON C.M. (1995). Persistence of *Tritrichomonas foetus* in naturally infected cows and heifers in Argentina. *Vet. Parasitol.*, 59, 7–11.
- MCMILLEN L. & LEW A.E. (2006). Improved detection of *Tritrichomonas foetus* in bovine diagnostic specimens using a novel probe-based real time PCR assay. *Vet. Parasitol.*, 141, 204–215.
- MUKHUFHI N., IRONS P.C., MICHEL A. & PETA F. (2003). Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls: effects of sample collection method, storage and transport medium on the test. *Theriogen.*, 60, 1269–1278.
- OSTROWSKI J.E.B., BAIGUN R., FRENE A.J., RODRIGUEZ DUBRAC C. & RUTTER R. (1974). Obtencion de muestras prepuciales para el diagnostico de *Trichomonas foetus* por raspado de mucosa (Comunicacion previa). *Rev. Med. Vet.*, 55, 525–528.
- PARKER S., CAMPBELL J.R., RIBBLE C. & GAJADHAR A.A. (1999). Comparison of two sampling tools for diagnosis of *Tritrichomonas foetus* in bulls and clinical interpretation of culture results. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 215, 231–235.
- PARKER S., CAMPBELL J. & GAJADHAR A. (2003a). Comparison of the diagnostic sensitivity of a commercially available culture kit and a diagnostic culture test using Diamond's media for diagnosing *Tritrichomonas foetus* in bulls. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 15, 460–465.
- PARKER S., CAMPBELL J., MCINTOSH K., & GAJADHAR A. (2003b). Diagnosis of trichomoniasis in 'virgin' bulls by culture and polymerase chain reaction. *Can. Vet. J.*, 44, 732–734.
- PARKER S., LUN Z.-R. & GAJADHAR A. (2001). Application of a PCR assay to enhance the detection and identification of *Tritrichomonas foetus* in cultured preputial samples. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 13, 508–513.
- PARSONSON I.M., CLARK B.L. & DUFTY J.H. (1974). The pathogenesis of *Tritrichomonas foetus* infection of the bull. *Aust. Vet. J.*, 50, 421–423.
- PIERCE A.C. (1949). The mucus agglutination test for the diagnosis of bovine trichomoniasis. *Vet. Rec.*, 61, 347–349.

- RHYAN J.C., WILSON K.L., BENGESS D.E., STAOKHOUSE L.L. & QUINN W.J. (1995). The immunohistochemical detection of *Tritrichomonas foetus* in formalin-fixed paraffin-embedded sections of bovine placenta and fetal lung. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7, 98–101.
- RHYAN J.C., WILSON K.L., WAGNER B., ANDERSON M.L., BONDURANT R.H., BURGESS D.E., MUTWIRI G.K. & CORBEIL L.B. (1999). Demonstration of *Tritrichomonas foetus* in the external genitalia and of specific antibodies in preputial secretions of naturally infected bulls. *Vet. Pathol.*, 36, 406–411.
- RIBEIRO L.M.M. (1990). An efficient medium for the isolation of *Tritrichomonas foetus*. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 57, 209–210.
- SCHONMANN M.J., BONDURANT R.H., GARDNER L.A., VAN HOOSEAR K., BALTZER W. & KACHULIS C. (1994). Comparison of sampling and culture methods for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls. *Vet. Rec.*, 134, 620–622.
- SKIRROW S.Z. & BONDURANT R.H. (1988). Bovine trichomoniasis. *Vet. Bull.*, 58, 591–603. SOTO P. & PARMA A.E. (1989). The immune response in cattle infected with *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Parasitol.*, 33, 343–348.
- SOULSBY E.J.L. (1982). *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*, Seventh Edition. Balliere Tindall, London, UK, 556–561.
- TAYLOR M.A., MARSHALL R.N. & STACK M. (1994). Morphological differentiation of *Tritrichomonas foetus* from other protozoa of the bovine reproductive tract. *Br. Vet. J.*, 150, 73–80.
- THOMAS M.W., MARMON W.M. & WHITE C. (1990). An improved method for the detection of *Tritrichomonas foetus* infection by culture in bulls. *Agri-Practice*, 11, 13–17.
- WARTON A. & HONIGBERG B.M. (1979). Structure of trichomonads as revealed by scanning electron microscopy. *J. Protozoot.*, 26, 56–62.

\*

\* \*