

ГЛАВА 3.4.17

ТРИПАНОСОМОЗ

(переносимый мухой цеце)

РЕЗЮМЕ

Определение болезни: трансплантоспецифический трипаносомоз представляет собой комплекс заболеваний, вызванных несколькими видами простейших паразитов рода *Trypanosoma*, которые в основном передаются циклически родом *Glossina* (мухи цеце), но также передаются механически несколькими кусающими мухами (табаниды, стомоны, и т.д.). Болезнь может поражать различные виды млекопитающих, но, с экономической точки зрения, трипаносомоз, передаваемый цеце, является особенно важным в отношении КРС. Он главным образом вызывается *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* и, в меньшей степени, *T. brucei brucei*.

Описание болезни: Трипаносомоз, передаваемый цеце, представляет собой классически острое или хроническое заболевание, которое вызывает перемежающуюся лихорадку и сопровождается анемией, отеком, слезотечением, увеличением лимфатических узлов, абортацией, сниженной репродуктивной способностью, потерей аппетита и снижением массы тела, что приводит к ранней смерти при острой форме болезни или к расстройствам со стороны пищеварительной и/или нервной системы, приводя к истощению и, в конечном итоге, гибели при хронических формах болезни.

Идентификация возбудителя: Можно использовать несколько методов обнаружения паразитов, включая микроскопическое исследование влажных или сухих окрашенных толстых капель или тонких мазков крови. Диагностическая чувствительность значительно повышается за счет концентрации паразитов до обследования и при использовании фазово-контрастного или темнопольного микроскопа. Методы концентрирования паразита центрифугированием имеют дополнительное преимущество в том, что гематокрит и, следовательно, степень анемии можно определить на уровне отдельного животного и/или стада. Высокоспецифичным и более чувствительным тестом, используемым во все большем числе лабораторий, является полимеразная цепная реакция, которая может идентифицировать паразитов на уровне рода, вида или подвида, в зависимости от конкретного случая.

Серологические тесты: Для обнаружения антител к трипаносомам у КРС обычно используются два теста: реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) и иммуноферментный анализ (ИФА) для выявления антител. Они обладают высокой чувствительностью и специфичностью к роду, но могут быть использованы только для предположительной диагностики трипаносомоза. ИФА для обнаружения антител, в частности, поддается автоматизации и будет обеспечивать высокую степень стандартизации, когда будут разработаны и валидированы рекомбинантные антигены. Однако в настоящее время они с удовлетворительной чувствительностью и специфичностью проводятся с нативными растворимыми антигенами трипаносом, выращенных на грызунах.

Требования к вакцинам: В настоящее время вакцины не используются.

А. ВВЕДЕНИЕ

Трипаносомы являются жгутиковыми простейшими, которые обитают в плазме крови, лимфе и различных тканях их хозяев. Род *Trypanosoma* относится к простейшим, отряд *Kinetoplastida*, семейство *Trypanosomatidae*. Трипаносомы, передаваемые цеце, относятся к группе саливарий, подроду *Nannomonas* в случае *T. congolense*, подроду *Duttonella* в случае *T. vivax* и подроду *Trypanozoon* в случае *T. brucei ssp.*

Трипаносомоз, передаваемый цеце, представляет собой комплекс заболеваний, вызванный несколькими из этих видов, в основном передаваемый циклически родом *Glossina* (мухи цеце), но также механически гнусом. Цеце инфестировано 10 миллионов квадратных километров и поражено 37 стран, в основном в Африке, где данное заболевание известно как «нагана». Заболевание затрагивает различные виды млекопитающих, но, с экономической точки зрения, трипаносомоз, передаваемый цеце, имеет особое значение для КРС (в южной части Африки данное заболевание называется африканский типаносомоз). Оно в основном вызывается *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* и, в меньшей степени, *T. brucei brucei*. *Trypanosoma uniforme* и *T. simiae* - это другие, менее распространенные передаваемые цеце виды. *Trypanosoma vivax* также механически передается гнусом, среди которого, как предполагается, наиболее важными видами являются слепни и жигалки, примером чего является ее присутствие в Южной и Центральной Америке, а также в некоторых регионах Африки, свободных или очищенных от мухи цеце (Эфиопия, Чад и т. д.). Трипаносомоз, передаваемый цеце, может поражать верблюдов и является естественным барьером, препятствующим распространению этого вида млекопитающих в южной части региона Сахель в Западной Африке. Лошади также очень восприимчивы. Наблюдаются очень редкие случаи заболевания человека, вызванные видами животных, переносчиков трипаносомы. Тем не менее, трипаносомоз, переносимый цеце, также поражает людей, вызывая сонную болезнь при заражении *T. brucei gambiense* или *T. brucei rhodesiense*. Ряд диких и домашних животных может выступать в качестве носителей этих паразитов, поражающих человека; особую осторожность необходимо проявлять людям, работающим с биологическими материалами, которые могут содержать инфекционных паразитов, поражающих человека, например, с биологическими материалами от сельскохозяйственных или диких животных, .

Клинические признаки трипаносомоза, передаваемого цеце, могут включать перемежающуюся лихорадку, отек, абортирование, снижение репродуктивной функции и истощение. У пораженных животных обычно развивается анемия, а за ней следует потеря массы тела, снижение производительности и часто смерть. Признаки, определяемые при вскрытии, могут включать истощение, увеличенные лимфатические узлы, увеличенную печень и селезенку, чрезмерное количество жидкости в полостях тела и петехиальные кровоизлияния. У животных, смерть которых наступила во время хронической фазы заболевания, лимфоидные органы, как правило, не увеличены, а часто выявляемым признаком является тяжелый миокардит. Клинические и посмертные признаки трипаносомоза, передаваемого цеце, не являются патномическими. Поэтому диагноз должен основываться на прямых методах, которые подтверждают наличие трипаносом либо путем микроскопической визуализации, либо путем косвенных серологических методов, либо путем полимеразной цепной реакции (ПЦР). Клинически трипаносомоз может быть принят за бабезиоз, анаплазмоз, тейлериоз, гемонхоз и даже эрлихиоз, бешенство или отравление растением. Дифференциальной диагностике способствуют клинические наблюдения,

эволюция, эпизоотологическая обстановка, но в основном она базируется на лабораторной диагностике.

В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Существуют различные методы диагностики (Toure, 1976), и исследователи осуществляют попытки усовершенствовать существующие тесты и разработать новые. Текущие диагностические тесты различаются по их чувствительности и специфичности, простоте применения, стоимости (Paris *et al.*, 1982). Выбор конкретного теста будет основываться на экономических принципах и наличии экспертных знаний, но особенно на диагностических требованиях. Например, для подтверждения инфекции у отдельного животного и для обнаружения инфекции на уровне стада применяются различные степени чувствительности и специфичности. Аналогичным образом, диагностический тест(ы) для установления паразитологической превалентности трипаносомоза отличается от тех, которые необходимы для установления наличия или отсутствия заболевания на территории. Точный диагноз может быть поставлен путем объединения соответствующих диагностических тестов. Надежная интерпретация результатов диагностических тестов будет зависеть от валидности теста, а также от правильного выбора/ отбора образца, размера образца и способа проведения диагностических тестов (см. Таблицу 1).

Таблица 1. Методы исследований для диагностики трипаносомоза, переносимого цеце, и их назначение

Цель/ Метод	Тип территории					
	Неинфицированная зона			Энзоотическая зона		Обе зона
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельных животных до перемещения	Содействие стратегии искоренения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции - эпиднадзор	Специфические характеристики или интерес
Идентификация возбудителя¹						
Тонкие окрашенные мазки крови	+++	-	-	++	+	Морфология паразита
Выявление ДНК/ПЦР	+++	+++	+++	+++	+++	Чувствительная и специфическая молекулярная идентификация
Обнаружение активной инфекции						
Влажный мазок крови	++	-	-	++	+	Оперативное последующее (экспериментальное) заражение
Окрашенная толстая капля крови	-	-	-	+	+	Дешевый метод

¹ Рекомендовано использовать комбинацию методов для идентификации возбудителя на одном и том же образце клинического материала

Цель/ Метод	Тип территории					
	Неинфицированная область			Энзоотическая область		Обе области
	Подтверждение и идентификация случая подозрения	Свобода популяции от инфекции	Эффективность политики искоренения	Подтверждение клинических случаев	Распространенность инфекции - эпиднадзор	Специфические характеристики или интерес
Метод определения гематокрита центрифугированием (HCT, Woo)	+++	+++	+++	+++	+++	Активная инфекция и показатель гематокрита
Исследование лейкоцитарной пленки (Muntau)	+++	-	+	+++	++	Активная инфекция и значение гематокрита
Анионообменные колонки	+++	-	+++	-	-	Малый индивидуальный тест или крупномасштабное производство паразита
Размножение паразита						
Введение грызунам	+++	+	+++	-	-	Чувствительное выделение или получение паразита
Культивирование <i>in-vitro</i>	-	-	-	-	-	Получение паразита
Серологическая диагностика						
РНИФ	+++	++	-	-	++	Маломасштабные исследования
ИФА	+++	+++	+++	-	+++	Исследования популяции

Обозначения: +++ = рекомендуемый метод; ++ = подходящий метод; + = может использоваться в некоторых случаях, однако стоимость, надежность или иные факторы значительно ограничивают его применение; - = не подходит для данной цели.

Хотя не все тесты, обозначенные как +++ или ++, прошли официальную валидацию, их стандартный характер и тот факт, что они широко используются без сомнительных результатов, делают их приемлемыми.

Agent id. = идентификация агента; ПЦР = полимеразная цепная реакция; РНИФ = Реакция непрямой иммунофлюоресценции; ИФА = иммуноферментный анализ.

1. Идентификация возбудителя

Методы обнаружения паразитов являются высокоспецифичными, но их чувствительность относительно низкая (т. е. высока доля зафиксированных ложноотрицательных результатов). Чувствительность особенно низкая, когда результаты учитываются на уровне отдельного животного, а не на уровне стада. Чувствительность в значительной степени варьируется с течением инфекции: (i) на ранней стадии чувствительность высокая, поскольку паразиты активно размножаются в крови в отсутствие иммунологического контроля; (ii) во время хронической фазы чувствительность низкая, поскольку из-за иммунного ответа хозяина паразиты немногочисленны и редко встречаются в крови; (iii)

наконец, чувствительность почти равна нулю у здоровых носителей, у которых паразиты не заметны. На уровне популяции эти вариации означают, что методы обнаружения паразитов являются высокочувствительными во время эпизоотических вспышек (когда большинство животных находятся на ранних стадиях инфекции) и имеют низкую или очень низкую чувствительность в зонах энзоотической активности (большинство животных находятся на стадии хронической инфекции), особенно во время субклинических фаз инфекции (здоровые носители). В связи с такой низкой чувствительностью, наблюдаемая паразитологическая превалентность трипаносомоза незначительно или существенно ниже, нежели фактическая паразитологическая превалентность. Низкая диагностическая чувствительность также затрудняет определение трипаносомоза, когда он присутствует при низкой паразитологической превалентности, и невозможно установить отсутствие заболевания с высокой степенью достоверности. Более того, в районах, где широко используются трипаноцидные препараты, паразиты не могут быть обнаружены.

Существует несколько методов обнаружения паразитов, каждый из которых имеет различную чувствительность. Выбор будет зависеть от доступных лабораторных мощностей и целей диагностики.

1.1. Прямые методы исследования

Простейшим методом является изучение влажных, тонких мазков крови или толстой капли крови, обычно полученных из ушной вены, яремной вены или хвоста. Из числа методов прямого исследования окрашенные тонкие мазки крови обычно считаются более специфичными, но менее чувствительными, чем другие два вида образцов. Фактическая специфичность и чувствительность этих методов напрямую зависят от объема крови.

1.1.1. Влажные мазки крови

Их готовят, помещая каплю крови (около 2 мкл) на чистое предметное стекло микроскопа и накрывая покровным стеклом (22×22 мм). Кровь исследуют под микроскопом при общем 400× увеличении с апертурой конденсора, фазовым контрастом или интерференционным контрастом. Рассматривают около 50-100 полей. Трипаносомы можно распознать благодаря их перемещению среди эритроцитов (RBC).

Метод прост, недорог и дает немедленные результаты. В зависимости от размера и движений трипаносомы можно сделать предположение о видах трипаносомы. Окончательное подтверждение вида производится путем изучения окрашенного препарата. Диагностическая чувствительность метода обычно низкая, но зависит от опыта исследователя и уровня паразитемии. Чувствительность может быть значительно улучшена путем проведения лизиса эритроцитов перед исследованием с использованием гемолитического средства, такого как додецилсульфат натрия (ДСН).

1.1.2. Толстые капли крови

Толстые капли крови готовят, помещая каплю крови (5-10 мкл) на чистое предметное стекло микроскопа и распределяя ее на площади приблизительно 2 см в диаметре уголком другого предметного стекла. Толщина полученного мазка должна быть такой, чтобы в сухом виде через нее можно было прочесть цифры на циферблате наручных часов. Мазок

тщательно высушивают, быстро размахивая в воздухе, без фиксации удаляют гемоглобин посредством погружения на несколько секунд в дистиллированную воду и высушивают перед окрашиванием. Сухой мазок следует сохранять сухим и защищенным от пыли, воздействия тепла, мух и других насекомых. Его окрашивают в течение 30 минут разбавленным в забуференном фосфатом физиологическом растворе, рН 7,2, 4% красителем Гимза. Время окрашивания и разбавления пятен может варьироваться в зависимости от пятна и метода. Поэтому важно начать с указаний изготовителя и изменять время окрашивания и концентрацию пятен для получения оптимального результата. Затем окрашенный мазок промывают буферной водой и исследуют при общем увеличении $\times 500$ - $\times 1000$.

Метод прост и относительно недорог, но результаты получают с задержкой в силу процесса окрашивания; однако для быстрого окрашивания имеются коммерческие наборы. Трипаносомы легко распознаются по их общей морфологии, но могут быть повреждены во время процесса окрашивания. Это может затруднить идентификацию вида.

1.1.3. Тонкие мазки крови

Тонкие мазки крови готовят, помещая небольшую каплю крови (около 5 мкл), например, из капиллярной трубки для микрогематокрита, на чистое предметное стекло микроскопа примерно в 20 мм от одного конца (оставляя место для нанесения толстой капли) и распределяя ее краем другого предметного стекла. Это предметное стекло помещают под углом около 30° к первому предметному стеклу и отодвигают так, чтобы оно соприкасалось с каплей крови. Крови позволяют растекаться вдоль края распределяющего предметного стекла, которое затем продвигают на другой конец предметного стекла довольно быстрым, но плавным движением. При использовании правильного количества крови предметное стекло должно быть покрыто пленкой крови без излишка у края предметного стекла, а мазок должен иметь форму пули. В идеале тонкие мазки должны быть подготовлены таким образом, чтобы эритроциты располагались достаточно близко друг к другу, но не заходили один на другой. Предметное стекло быстро высушивают, размахивая в воздухе, и защищают от пыли, мух и других насекомых. Предметное стекло фиксируют в течение 3 минут в метаноле и окрашивают, как в случае толстых капель крови. После окрашивания предметное стекло осторожно промывают под водопроводной водой и высушивают. Вариацией данного метода является фиксация в метаноле в течение 2 минут, нанесение красителя Май-Грюнвальда на 2 минуты, затем добавление равного объема буферной воды, рН 7,2, после чего предметное стекло оставляют еще на 8 минут и высушивают. Приблизительно 50-100 полей окрашенного тонкого мазка исследуют под линзой иммерсионного объектива с увеличением $\times 50$ или $\times 100$, прежде чем образец будет признан отрицательным. Даже после обнаружения трипаносомы исследуют еще около 20 полей, чтобы определить присутствие более одного вида. Заостренный край мазка следует тщательно изучить, поскольку из-за своих капиллярных свойств трипаносомы могут быть сконцентрированы в этом месте (особенно это относится к крупным

видам, таким как *T. brucei* и *T. vivax*).

Описанная выше методика также может быть использована для биопсийных образцов лимфы, полученных в результате пункции лимфатических узлов.

Как правило, тонкий мазок и толстую каплю приготавливают из одного и того же образца. Толстые капли содержат больше крови, чем тонкие мазки, и, следовательно, имеют более высокую диагностическую чувствительность. Тонкие мазки, с другой стороны, позволяют идентифицировать виды трипаносомы. Виды трипаносомы могут быть идентифицированы по следующим морфологическим характеристикам:

- i) *Trypanosoma vivax*: длина 20-27 мкм, ундулирующая мембрана средняя или неочевидная, свободный конец жгутика на переднем конце, задний конец закругленный, кинетопласт большой и терминальный.
- ii) *Trypanosoma brucei* является полиморфным видом трипаносомы. Можно различать две совершенно разные формы, т. е. длинную тонкую форму и короткую широкую форму. Часто наблюдаются промежуточные формы, обладающие характеристиками как тонких, так и широких форм. В окрашенных образцах цитоплазма часто содержит базофильные зерна.
 - a) *Trypanosoma brucei* (длинная тонкая форма): 17-30 мкм в длину и около 2,8 мкм в ширину, ундулирующая мембрана видна, свободный конец жгутика, на переднем конце, задний конец заострен, кинетопласт малый и субтерминальный.
 - b) *Trypanosoma brucei* (короткая широкая форма): 17-22 мкм в длину и около 3,5 мкм в ширину, ундулирующая мембрана видна, свободный конец жгутика отсутствует, задний конец заострен, кинетопласт небольшой и субтерминальный.
- iii) *Trypanosoma congolense*: 8-25 мкм (мелкие виды), ундулирующая мембрана не видна, свободный конец жгутика отсутствует, задний конец закруглен, кинетопласт среднего размера и терминальный, часто расположен в поперечном направлении. Хотя *T. congolense* считается мономорфным, иногда наблюдается некоторая степень морфологической вариации. До сих пор был описан ряд морфотипов; от тонкого до широкого: гиперлептоморф (*rodhaini*-подобный, очень длинный тонкий, со свободным концом жгутика), лептоморф (подобный *simiae*, тонкий, со свободным концом жгутика), изоморф (подобный *congolense*, короткий, без свободного конца жгутика), пахиморф (подобный *montgomeryi*, короткий и толстый, $0,25 < W_{Lr} < 0,34$, без свободного конца жгутика) и гиперпахиморф (подобный *hyper-montgomeryi*, короткий и очень толстый, $0,35 < W_{Lr} < 0,7$, без свободного конца жгутика) (Desquesnes *et al.*, 2012). Кроме того, также описаны сфероморфные и розеточные формы. В пределах *T. congolense* существуют различные типы или подгруппы (саванна, лес, Килифи или побережье Кении), которые имеют различную патогенность (Bengaly *et al.*, 2002); также имеют место существенные вариации патогенности

внутри подгруппы саванны. Эти типы можно различить только с помощью ПЦР.

- iv) *Trypanosoma theileri*: (крупные виды), обычно 60-70 мкм, но длина отдельных организмов может варьироваться от 19 до 120 мкм, ундулирующая мембрана видна, имеется длинный свободный конец жгутика, задний конец заостренный и жесткий, кинетопласт большой и расположен вблизи ядра и по краям. *Trypanosoma theileri* обычно непатогенна, но ее присутствие может запутать диагностику паразита. В Западной Европе *T. theileri* - единственный вид трипаносомы, встречающийся у КРС.

1.2. Методы концентрации паразитов

Вероятность обнаружения трипаносом в образце, отобранном от инфицированного животного, зависит в значительной степени от количества исследуемой крови и уровня паразитемии. Количество крови, исследованной методами прямого исследования, невелико, а концентрация паразитов в крови инфицированного животного часто очень невысока. Оба этих фактора приводят к низкой чувствительности методов прямого исследования. Чувствительность может быть улучшена за счет увеличения объема исследуемой крови и концентрации трипаносом.

1.2.1. Определение микрогематокрита методом центрифугирования (метод Woo)

Определение микрогематокрита методом центрифугирования или метод Woo (1970) широко используется для диагностики трипаносомоза животных. Он основан на разделении различных компонентов образца крови в зависимости от их удельного веса. Метод выглядит следующим образом:

- i) Свежую, обычно венозную кровь, (около 70 мкл) собирают в гепаринизированные капиллярные трубки (75 × 1,5 мм).
- ii) Один конец капиллярной трубки закупоривают кристасилом или нагреванием, избегая обугливания.
- iii) Запечатанные капиллярные трубки помещают в центрифугу для микрогематокрита запечатанным концом вверх. Для обеспечения хорошего баланса трубки загружаются симметрично.
- iv) Завинчивают крышку и закрывают центрифугу.
- v) Капиллярные трубки центрифугируют при 9000 g в течение 5 минут. Изготавливают держатель для трубки, закрепив на предметном стекле на расстоянии 1,5 мм друг от друга два кусочка стекла размером 25 × 10 × 1,2 мм таким образом, чтобы получилась канавка.
- vi) Трубку помещают в канавку, сверху накрывают покровным стеклом, и поверхность заливают водой. В качестве альтернативы, исследование может быть выполнено без заполнения водой, но в этом случае световой конденсор должен быть помещен таким образом, чтобы клетки были лучепреломляющими.

- vii) Поверхность плазмы или белых кровяных клеток (лейкоцитарная пленка) исследуют при медленном вращении трубки. Движение трипаносомы можно сначала определять с помощью линзы объектива с $\times 10$ увеличением при с уменьшенной апертуре конденсора; трипаносомы можно увидеть более четко с использованием объектива с $\times 40$ увеличением, предпочтительно на большом рабочем расстоянии, чтобы обеспечить достаточную глубину фокусировки через капиллярную трубку.

Определение микрогематокрита методом центрифугирования более чувствительно, чем методы прямого исследования (Kratzer & Ondiek, 1989). В случае инфекций *T. vivax* чувствительность методов Woo приближается к 100%, когда паразитемия составляет >700 трипаносом/ мл крови. Чувствительность уменьшается до 50%, когда паразитемия колеблется от 60 до 300 трипаносом / мл крови. Трипаносомы очень трудно обнаружить, когда паразитемия ниже 60 трипаносом/ мл крови (Desquesnes, 2004). Идентификация видов трипаносом сложна. Поскольку удельный вес *T. congolense* аналогичен удельному весу эритроцитов, паразиты часто встречаются под лейкоцитарной пленкой в слое эритроцитов. Чтобы улучшить отделение эритроцитов от паразитов и повысить чувствительность к *T. congolense*, удельный вес эритроцитов может быть увеличен добавлением глицерина.

Модификацией метода Woo является количественный анализ лейкоцитарной пленки (QBC) (Bailey & Smith, 1992). Анализ использовали инфекции *T. b. gambiense*; обычно этот анализ слишком затратен для рутинного широкомасштабного использования в исследованиях животных на трипаносомоз животных.

1.2.2. Методы темнопольного или фазово-контрастного микроскопического исследования лейкоцитарной пленки (метод Мюррея)

Методика исследования лейкоцитарного слоя или метод Мюррея (Murray *et al.*, 1977) представляет собой усовершенствованный метод обнаружения трипаносом и широко используется. Он выполняется следующим образом

(i) после выполнения вышеуказанных пунктов 1-5 капиллярную трубку разрезают с стеклореза с алмазным наконечником на 0,5 мм ниже лейкоцитарного слоя, оставляя верхний слой эритроцитов. Лейкоцитарный слой и верхний слой эритроцитов переносят на чистое предметное стекло микроскопа (следует убедиться, что лейкоцитарный пленка не прилипла к капиллярной трубке, она должна быть видна на предметном стекле до того, как его накроют покровным стеклом [22×22 мм]). Приблизительно 200 полей препарата исследуют на наличие подвижных трипаносом с помощью темнопольного или фазо-контрастного микроскопа с объективом с $\times 40$ увеличением. Виды трипаносом можно идентифицировать с учетом следующих критериев:

- i) *Trypanosoma vivax*: Крупный, чрезвычайно активный, очень быстро перемещается по всему полю, иногда останавливаясь.
- ii) *Trypanosoma brucei*: Различные размеры, быстрое движение в

ограниченном пространстве; ундулирующая мембрана захватывает свет в «карманы», движущиеся вдоль тела.

- iii) *Trypanosoma congolense*: Маленький, вялый, прилипает к эритроцитам передним концом.
- iv) *Trypanosoma theileri*: по размеру более чем в два раза превышает патогенных трипаносом, имеет тенденцию вращаться; задний конец отчетливо виден, очень длинный, острый и жесткий.

Как и в случае определения микрогематокрита методом центрифугирования, метод исследования лейкоцитарной пленки более чувствителен, чем методы прямого исследования. Чувствительность метода исследования лейкоцитарной пленки может быть повышена с использованием техники двойного центрифугирования лейкоцитарной пленки (Kratzer & Ondiek, 1989). Общее количество крови 1500-2000 мкл центрифугируют, после чего лейкоцитарный слой всасывается в капиллярную трубку для микрогематокрита, и снова центрифугируют. Исследуют лейкоцитарную пленку. Однако сбор лейкоцитарной пленки после первого центрифугирования является деликатной процедурой, и результаты могут варьироваться в зависимости от опыта специалиста.

По сравнению с определением микрогематокрита методом центрифугирования, метод исследования лейкоцитарной пленки имеет дополнительное преимущество в том, что препараты можно фиксировать и окрашивать для более точной идентификации видов и для хранения в архиве.

Определение микрогематокрита методом центрифугирования и метод исследования лейкоцитарной пленки дают прямые результаты и могут быть использованы для скрининга большого количества животных. Они требуют специализированного оборудования и электроснабжения, что делает тесты более дорогими по сравнению с анализом влажного мазка крови. Однако это компенсируется повышенной чувствительностью. Оба метода концентрации паразитов основаны на обнаружении подвижных, живых трипаносом. Поскольку после взятия образца крови трипаносомы могут довольно быстро утратить свою энергичность и погибнуть, образцы, отобранные в капиллярные трубки, следует незамедлительно охладить и избегать из перегрева в центрифуге для микрогематокрита или на этапе исследования под микроскопом. Образцы следует исследовать сразу после отбора, предпочтительно в течение нескольких часов.

Определение микрогематокрита методом центрифугирования и метод исследования лейкоцитарной пленки особенно полезны тем, что можно одновременно определить гематокритное число (ГЧ). Чтобы после центрифугирования определить ГЧ, микрогематокритную капиллярную трубку (содержащую кровь из ушной или яремной вены) помещают в считывающее устройство для гематокрита. Длина колонки осажденных эритроцитов выражается в процентах от общего объема крови. Измерение ГЧ полезно для определения степени анемии. Анемия может быть вызвана факторами, отличными от трипаносомоза, передаваемого цеце. Однако она

остаётся одним из важнейших показателей трипаносомоза у КРС. Поскольку трипаносомоз является проблемой стада, на ГЧ-профиль стада влияет количество инфицированных трипаносомой животных, и он может использоваться для обозначения различий инфицирования болезнью. На средний показатель ГЧ также влияет возраст и уровень генетической восприимчивости КРС.

1.2.3. Ионный обмен

Метод портативной ионообменной хроматографии (m-AECT) широко используется для диагностики сонной болезни человека, вызываемой *T. b. gambiense* (Lumsden *et al.*, 1979). Кровь пропускают через колонку диэтиламиноэтил (ДЭАЭ)-целлюлозой, уравновешенную раствором фосфатно-буферного солевого раствора (ФБР) с ионной силой, подходящей для крови исследуемых видов животных. Поскольку эритроциты имеют более высокий отрицательный заряд, чем трипаносомы, они удерживаются в колонке, а трипаносомы выходят с элюатом, который собирают, центрифугируют, затем трипаносомы концентрируют и исследуют под микроскопом.

Можно исследовать большие объемы крови от каждого животного, и поэтому метод имеет высокую чувствительность. Однако этот метод является трудоемким и не подходит для изучения большого количества животных, поскольку он очень дорогостоящ и времязатратен.

1.2.4. Культивирование *in vitro*

Описана процедура культивирования *T. brucei*, но ее полезность в течение многих лет была нерегулярной. Кроме того, этот метод требует сложного оборудования, дает результаты со значительной задержкой и однозначно не подходит для крупномасштабного использования. Было доказано, что набор для выделения трипаносомы является многообещающим для выделения и амплификации всех видов *T. brucei* у людей, домашних и диких животных (Truc *et al.*, 1992). Полезность теста для выделения *T. congolense* и *T. vivax* до настоящего времени неизвестна. Поскольку он основан на культивировании проциклических форм трипаносом, дифференциация видов невозможна; однако недавно описан метод для полного жизненного цикла *T. congolense in vitro* (Coustou *et al.*, 2010). Следует отметить, что культивирование является высокоэффективным и чувствительным методом для обнаружения передаваемых слепнями *T. theileri*, определение превалентности которых с использованием этого метода зачастую приближается к 100%. В случае смешанных инфекций *T. theileri* легко перерастает *T. b. brucei* (Verloo *et al.*, 2000).

1.3. Введение животным

Введение грызунам дорогостояще, диагностика небыстрая, и использования данного метода, по возможности, следует избегать, поскольку он вызывает серьезные проблемы в области благополучия животных. Однако инокуляции крови грызунам, обычно мышам или крысам, является более чувствительным методом, чем определение гематокрита методом центрифугирования, а иногда и ПЦР, поэтому она особенно пригодна для выявления субпатентной паразитемии,

что может быть особенно значимо для в эндемичных регионах.

Лабораторным животным вводят внутривенно 0,1-0,5 мл (в зависимости от размера грызуна) свежесобранной крови. Искусственная иммуносупрессия животных-реципиентов путем облучения или введения лекарственных препаратов (циклофосфамид 200 мг / кг) значительно увеличит шансы на выделение паразита. Каплю крови отбирают из кончика хвоста грызуна три раза в неделю. Кровь исследуют с использованием метода влажного мазка. В случае инфекции, она обычно проявляется через 3-10 дней, однако грызунов следует исследовать в течение не менее 1 месяца.

В случае предполагаемого заражения трипаносомой вероятность успеха этого метода зависит от вида трипаномы: он очень чувствителен к обнаружению инфекций *Trypanozoon*, обладает средней чувствительностью к штаммам *T. congolense* и, как правило, является слабо чувствительным, но в редких случаях все же эффективен для *T. vivax*. Поэтому современное использование введения грызунам должно быть ограничено (i) массовым получением антигена паразитов для серологической диагностики и (ii) попытками демонстрации и выделения паразитов в случае положительного инфицирования трипаносомой животных, живущих или перемещающихся в направлении эндемичных регионов.

1.4. Тест для обнаружения трипаносомального антигена

Описаны иммуноферментные анализы (ИФА) для выявления антигенов при трипаносомозе (Nantulya & Lindquist, 1989). Полевые испытания тестов показали противоречивые результаты (Международное агентство по атомной энергии [МАГАТЭ], 1993 год). Дополнительные работы проводились в контролируемых условиях, позволило сделать вывод о том, что чувствительность и специфичность этих тестов не подходят для диагностики трипаносомоза (Desquesnes, 1996; 2004; Eisler *et al.*, 1998).

1.5. Тесты с амплификацией ДНК

В качестве инструмента для диагностики инфекций африканскими трипаносомами у людей и животных, а также у мух цеце разработан метод ПЦР. Специфичные повторяющиеся последовательности ядерных ДНК могут быть амплифицированы для *T. vivax* и трех типов *T. congolense* (Desquesnes & Davila, 2002; Masiga *et al.*, 1992). Имеется общий набор праймеров для обнаружения трех подвидов *T. brucei*. Набор праймеров для разных подвидов, видов и типов трипаномы следующий: подвид трипанозона - TBR1 и TBR2; *T. congolense* (тип саванны) - TCN1 и TCN2; *T. congolense* (тип леса) - TCF1 и TCF2; *T. congolense* (тип побережья Кении) - TCK1 и TCK2; и *T. vivax* - TVW1 и TVW2. Из-за множественности этих таксон-специфических праймеров у мух цеце или КРС, полная идентификация видов трипаномы требует проведения пяти ПЦР для каждого образца, что значительно увеличивает стоимость диагностики. Недавно были разработаны ПЦР с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) и амплификацией ITS1 рибосомной ДНК, которые позволяют идентифицировать все виды трипаномы как при единичных, так и при смешанных инфекциях с использованием одного единственного теста (Delespauх *et al.*, 2003; Desquesnes & Davila, 2002; Desquesnes *et al.*, 2001; Geysen

et al., 2003); однако в настоящее время эти тесты не подходят для рутинной диагностики. Для диагностики трипаномы также проводится петлевая изотермическая амплификация (Kuboki *et al.*, 2003).

Стандартные моновалентные ПЦР-амплификации проводят в реакционной смеси, содержащей Tris/ HCl, MgCl₂, KCl, каждый из четырех дезоксирибонуклеозид-трифосфатов, праймеры, ДНК-матрицы и Taq ДНК-полимеразы. Образцы инкубируют в течение нескольких циклов при различных температурах. Продукты ПЦР подвергают электрофорезу через агарозу. Гели окрашивают бромидом этидия и визуализируют под ультрафиолетовым светом для определения присутствия продуктов с определенным весом. Процедура чрезвычайно чувствительна, но в результате контаминации образцов другими ДНК могут быть получены ложноположительные результаты. Для исследования требуется специализированное оборудование и высококвалифицированный персонал, поэтому оно не подходит для многих лабораторий оно не подходит. Ложноотрицательные результаты могут быть получены, когда паразитемия очень низкая (<1 трипаносома / мл крови), что часто встречается при хронических инфекциях; они могут также возникать, когда специфичность праймеров слишком высока, поэтому не все изоляты определенного вида трипаномы могут быть определены. Сбор образцов был упрощен путем адаптации теста для использования крови или лейкоцитарной пленки, нанесенных на фильтровальную бумагу (Geysen *et al.*, 2003; Katakura *et al.*, 1997). Одновременно можно обрабатывать большое количество образцов, что делает тест потенциально пригодным для крупномасштабных исследований. Однако на данный момент стоимость ПЦР препятствует реакции на стандартной основе.

2. Серологические тесты

Было разработано несколько методов обнаружения антител с разной чувствительностью и специфичностью для выявления антител к трипаносомам с целью диагностики трипаномоза животных. Возможными способами являются реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) (Katende *et al.*, 1987) и ИФА для обнаружения антител к трипаносомам (Hopkins *et al.*, 1998; Luckins, 1977). Идентификация основных антигенов трипаносом и их продуцирование в виде рекомбинантных молекул или синтетических пептидов могут привести к разработке новых тестов, основанных на использовании определенных молекул. Таким образом, в будущем можно будет улучшить специфичность серологических тестов, позволяющих обнаруживать видоспецифичные антитела, и достичь высокого уровня стандартизации, который в настоящее время не достигнут при использовании общих экстрактов паразитов.

2.1. Реакция непрямой иммунофлуоресценции

Методика получения антигенов трипаносом (Katende *et al.*, 1987) включает фиксацию живых трипаносом с использованием смеси 80% холодного ацетона и 0,25% формалина в нормальном физиологическом растворе.

2.1.1. Процедура исследования

- i) Готовят тонкие мазки из крови, зараженной паразитами или суспензии трипаномы. Высушивают на воздухе и фиксируют в ацетоне в течение

5 минут.

- ii) Лаком для ногтей на стеклянном предметном стекле отмечают круги диаметром 5 мм.
- iii) Тестовую сыворотку в разведении 1/40 пипеткой помещают в каждый круг, полностью покрывая площадь каждого круга.
- iv) Препарат антигена/ тестовой сыворотки инкубируют во влажной камере при температуре 37°C в течение 30 минут.
- v) Препарат три раза промывают в ФБР по 5 минут при 4 °C, слегка помешивая. Предметные стекла высушивают на воздухе.
- vi) Наносят конъюгат: IgG кролика или козы (для тестов с использованием бычьей сыворотки), конъюгированные с изотиоцианатом флуоресцеина.
- vii) Инкубируют и промывают, как указано выше. Промывают в дистиллированной воде. Предметные стекла высушивают на воздухе.
- viii) Предметные стекла помещают в ФБР или забуференный глицерин и исследуют на наличие флуоресценции.

2.2. Иммуноферментный анализ для выявления антител

Первоначальный ИФА на выявление антител (Luckins, 1977) был недавно усовершенствован для использования в крупномасштабных исследованиях трипаносомоза КРС (Desquesnes, 1997; Hopkins *et al.*, 1998). Были получены рекомендации, позволяющие производить антиген и проводить стандартизацию теста на местах (Desquesnes, 1997, 2004; Greiner *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 1993).

Стандартный антиген для использования в тестах на выявления антител к трипаносомам получают из трипаносом, обитающих в крови. Трипаносомы выделяют из паразитов цельной крови инфицированных крыс с помощью ионообменной хроматографии с DEAE (Lanham & Godfrey 1970). Антигены готовят в виде растворимой фракции с лизисом (с добавлением антифермента) с использованием семи циклов замораживания-оттаивания и центрифугирования при 10000 *g* в течение 10 минут. Можно также использовать антигены, размноженных *in vitro* проциклических форм трипаносомы (Greiner *et al.*, 1997). Растворимые антигены следует добавлять в смесь ингибиторов протеаз и хранить при -80°C или -20°C в течение длительного и короткого времени соответственно, но они также могут быть лиофилизированы для хранения при комнатной температуре. Были разработаны ИФА с использованием предварительно сенсибилизированных *T. congolense* или *T. vivax* микротитрационных планшетов, преимущество которых является использование стандартизированного денатурированного антигена, который может храниться в течение длительного времени при комнатной температуре (Rebeski *et al.*, 2000).

Как РНИФ, так и ИФА, направленные на обнаружение антител, были адаптированы для анализа образцов крови, отобранных на фильтровальную бумагу. Кровь, содержащуюся в одной гепаринизированной капиллярной трубке для определения микрогематокрита посредством центрифугирования, помещают на фильтровальную бумагу (Whatman® № 4). Образцы высушивают на воздухе под прямыми солнечными лучами и помещают в полиэтиленовый

пакет с индикаторным силикагелем. Пакет герметично запаковывают и хранят в максимально прохладных условиях до охлаждения или замораживания образцов.

Каждый ИФА-микропланшет используют для исследования сильноположительных, слабоположительных и отрицательных исходных сывороток, которые должны соответствовать заранее установленным значениям для обеспечения качества. Абсорбция каждого исследуемого в ИФА образца выражается в процентах (процентная положительность: PP) от сильного положительного эталонного стандарта (Wright *et al.*, 1993) или положительных и отрицательных референтных стандартов (Desquesnes, 1997); следовательно, результаты поддаются количественной оценке. Точка разделения определяется с использованием известных положительных и отрицательных полевых или экспериментальных образцов (Desquesnes, 1997; 2004).

Оба теста для обнаружения антител обладают высокой чувствительностью и родо-специфичностью. Их видоспецифичность, как правило, низкая, но может быть улучшена за счет использования стандартизованного набора трех видоспецифических тестов (Desquesnes, 2004). Они обнаруживают иммунные реакции на текущие и прошлые инфекции и поэтому могут обеспечить только предполагаемый диагноз активной инфекции. Однако продолжительность действия антител после медицинского лечения или самолечения составляет в среднем 3–4 месяца при заражении молодого и взрослого КРС (Desquesnes, 2004); хотя у некоторых животных период до исчезновения всех антител может достигать 13 месяцев (Van den Bossche *et al.*, 2000), следовательно, правильный пробоотбор и умение применять трипаноцид позволят получить более точную информацию.

Иммунодиагностика требует дорогого, сложного оборудования и опыта, которые имеются не всегда. Она должна проводиться в специализированных лабораториях, и имеет место существенная задержка между фактическим пробоотбором и получением результатов. Тем не менее, ИФА для определения антител опирается на высокую степень автоматизации и стандартизации. Сбор и хранение образцов облегчается благодаря использованию фильтровальной бумаги. Все эти факторы делают ИФА для определения антител очень полезным для крупномасштабных исследований, направленных на определение распространения трипаносомоза, передаваемого мухой цеце.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

В настоящее время вакцины не используются.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

BENGALY Z., SIDIBE I., GANABA R., DESQUESNES M., BOLY H. & SAWADOGO L. (2002). Comparative pathogenicity of three genetically distinct types of *Trypanosoma congolense* in cattle: clinical observations and haematological changes. *Vet. Parasitol.*, **108**, 1–19.

COUSTOU V., GUEGAN F., PLAZOLLES N. & BALTZ T. (2010). Complete in vitro life cycle of *Trypanosoma congolense*: development of genetic tools. *PLoS Negl Trop. Dis.*, **4**, e618.

DELESPAUX V., AYRAL F., GEYSEN D. & GEERTS S. (2003). PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification: applicability for the diagnosis of mixed infections with different trypanosome species in cattle. *Vet. Parasitol.*, **117**, 185–193.

DESQUESNES M. (1997). 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. OIE and CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement). World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France, 192 pp. ISBN 92-9044-634-X.

DESQUESNES M. & DAVILA A.M.R. (2002). Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes; a review and perspectives. *Vet. Parasitol.*, **109**, 213–231.

DESQUESNES M., MCLAUGHLIN G., ZOUNGRANA A. & DAVILA 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., RAVEL S., DESCHAMPS J.-Y., POLACK B. & ROUX F., (2012). Atypical hyperpachymorph

Trypanosoma (Nannomonas) *congolense* forest-type in a dog returning from Senegal. *Parasite*, **19**, 239–247.

EISLER M.C., LESSARD P., MASAKE R.A., MOLOO S.K. & PEREGRINE A.S. (1998). Sensitivity and specificity of antigen- capture ELISAs for diagnosis of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* infections in cattle. *Vet. Parasitol.*, **79** (3), 187–201.

GEYSEN D., DELESPAUX V. & GEERTS S. (2003). PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. *Vet. Parasitol.*, **110**, 171–180.

GREINER M., KUMAR S. & KYESWA C. (1997). Evaluation and comparison of antibody ELISAs for serodiagnosis of bovine trypanosomosis. *Vet Parasitol.*, **73**, 197–205.

HOPKINS J.S., CHITAMBO H., MACHILA N., LUCKINS A.G., RAE P.F., VAN DEN BOSSCHE P. & EISLER M.C. (1998).

Adaptation and validation of the antibody trapping ELISA using dried blood spots on filter paper, for epidemiological surveys of tsetse transmitted trypanosomosis in cattle. *Prev. Vet. Med.*, **37**, 91–99.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA) (1993). Improving the Diagnosis and Control of Trypanosomiasis and Other Vector-borne Diseases of African Livestock Using Immunoassay Methods. IAEA-TECDOC 707, IAEA, Vienna, Austria.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA) (2007). Developing Methodologies for the Use of PCR in the Diagnosis and Monitoring of Trypanosomosis. IAEA-TECDOC-1559. IAEA, Vienna, Austria.

KATAKURA K., LUBINGA C., CHITAMBO H. & TRADA Y. (1997). Detection of *Trypanosoma congolense* and *T. brucei* subspecies in cattle in Zambia by polymerase chain reaction from blood collected on a filter paper. *Parasitol. Res.*, **83**, 241–245.

KATENDE J.M., MUSOKE A.J., NANTULYA V.M. & GODDEERIS B.M. (1987). A new

method for fixation and preservation of trypanosomal antigens for use in the indirect immunofluorescence antibody test for diagnosis of bovine trypanosomiasis. *Trop. Med. Parasitol.*, **38**, 41–44.

KUBOKI N., INOUE N., SAKURAI T., DI CELLO F., GRAB D.J., SUZUKI H., SUGIMOTO C. & IGARASHI I. (2003). Loop-

mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *J. Clin. Microbiol.*, **41** (12), 5517–5524.

LANHAM S.M. & GODFREY D.G. (1970). Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-Cellulose. *Exp. Parasitol.*, **28**, 521–534.

LUCKINS A.G. (1977). Detection of antibodies in trypanosome infected cattle by means of a microplate enzyme– linked immunosorbent assay. *Trop. Anim. Health Prod.*, **9**, 53–62.

LUMSDEN W.H.R., KIMBER C.D., EVANS D.A. & DOIG S.J. (1979). *Trypanosoma brucei*: miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias: adaptation for field use. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **73**, 312–317.

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.

MURRAY M., MURRAY P.K. & MCINTYRE W.I.M. (1977). An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **71**, 325–326.

NANTULYA M.V. & LINDQUIST K.J. (1989). Antigen-detection enzyme immunoassays for the diagnosis of

Trypanosoma vivax, *T. congolense* and *T. brucei* infections in cattle. *Trop. Med. Parasitol.*, **40**, 267–272.

PARIS J., MURRAY M. & MCODEMBA F. (1982). A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomiasis in cattle. *Acta Trop.*, **39**, 307–316.

REBESKI D.E., WINGER E.M., OKORO H., KOWALIK S., BURGER H.J., WALTERS D.E., ROBINSON M.M., DWINGER R.H. &

CROWTHER J.R. (2000). Detection of *Trypanosoma congolense* antibodies with indirect ELISAs using antigen- pre-coated microtitre plates. *Vet. Parasitol.*, **89**, 187–198.

TOURE S.M. (1976). Diagnostic des trypanosomiasés animales. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **30**, 1–10.

TRUC P., AERTS D., MCNAMARA J.J., CLAES Y., ALLINGHAM R., LE RAY D. & GODFREY D.G. (1992). Direct isolation *in*

vitro of *Trypanosoma brucei* from man and other animals, and its potential value for the diagnosis of Gambian trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **86**, 627–629.

VAN DEN BOSSCHE P., CHIGOMA D. & SHUMBA W. (2000). The decline of anti-trypanosomal antibody levels in cattle after treatment with trypanocidal drugs and in the absence of tsetse challenge *Acta Trop.*, **77**, 263–270.

VERLOO D., BRANDT J., VAN MEIRVENNE N. & BUSCHER P. (2000). Comparative *in*

vitro isolation of *Trypanosoma theileri* from cattle in Belgium. *Vet. Parasitol.*, **89**, 129–132.

WOO P.T.K. (1970). The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Trop.*,

27, 384–

386.

WRIGHT P.F., NILSSON E., VAN ROOIJ E.M.A., LELENTA M. & JEGGO M.H. (1993). Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **12**, 435–450.

*

* *

NB: Существует Референтная лаборатория МЭБ по трипаносомозу (см. Таблицу в Части 4 настоящего Руководства по наземным животным или см. веб-сайт МЭБ для получения последнего списка:

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

<http://www.oie.int/>)

Пожалуйста, свяжитесь с Референтной лабораторией МЭБ для получения дополнительной информации о диагностических тестах, реагентах и вакцинах против трипаносомоза (передаваемого цеце)