

#### ГЛАВА 3.9.4.

### КРИПТОСПОРИДИОЗ

#### РЕЗЮМЕ

**Описание заболевания:** Криптоспоридиоз – патологическое состояние, вызванное инфекцией простейших, принадлежащих к семейству *Cryptosporidium*. После заражения жизненный цикл криптоспоридии, включающий половую и бесполовую фазы, развивается в одном организме-хозяине с образованием спорулированных ооцист. Существует не менее 32 «подтвержденных» видов семейства *Cryptosporidium*, некоторые из которых вызывают заболевания человека, сельскохозяйственных животных, домашней птицы, пернатой дичи и животных-компаньонов. *Cryptosporidium parvum* инфицирует, в основном, желудочно-кишечный тракт и вызывает понос у молодых, не отлученных от матерей сельскохозяйственных животных. Уровень летальности при данной инфекции низкий, но периодически возможны тяжелые вспышки. После отъема и у взрослых животных признаки заболевания в норме отсутствуют, но возможна экскреция ооцист, загрязняющих окружающую среду и способствующих прогрессивной передаче возбудителя. *Cryptosporidium parvum* является одной из основных причин зоонозного криптоспоридиоза у человека. *Cryptosporidium andersoni* инфицируют пищеварительные железы сычуга у подросших телят и взрослого крупного рогатого скота и также двугорбых верблюдов. У некоторых инфицированных коров снижается удой молока и привес, но диарея не возникает. *Cryptosporidium baileyi* поражает, главным образом, верхние дыхательные пути, фабрициеву сумку и клоаку, почки и глаза курообразных птиц, и вызывает вспышки и летальной пернатой дичи и домашней птицы. *Cryptosporidium meleagridis* поражает, главным образом, подвздошную кишку индюшат и пернатой дичи и вызывает энтерит, диарею и гибель этих птиц, и *C. galli* инфицирует поверхностной, протоковый и железистый эпителий железистого желудка взрослых кур и некоторых диких птиц.

**Идентификация возбудителя болезни:** Для диагностики необходима лабораторная идентификация возбудителя. Часто применяется микроскопическое исследование ооцист с окрашиванием по Цилю-Нильсену, нанесение аурамин-фенольных или иммунофлуоресцентных красителей на фекальные мазки. Также широко применяются иммуноферментные анализы, но специфичность этого метода может быть низкой. Расширяется доступность молекулярных диагностических наборов. Инфицирующий вид невозможно идентифицировать по морфологии ооцисты или анализом антител, но для определения видов могут быть использованы анализ ДНК в направлении экспрессии генов, амплифицированной с помощью полимеразной цепной реакции. Большинство случаев криптоспоридиоза у молодых сельскохозяйственных млекопитающих, вероятно, вызваны *C. parvum*, который также является наиболее важным зоонозным видом. Стандартизированная схема субтипирования отсутствует, но при исследованиях во время вспышек заболевания может оказаться информативным секвенирование гена *gpb0*. В настоящее время разрабатываются схемы мультилокусного субтипирования, однако необходима их стандартизация. Во влажной среде ооцисты могут сохранять жизнеспособность в течение многих месяцев и передаваться через пищеварительный тракт с пищей и водой. Однако применение генотипирования к немногочисленным ооцистам, присутствующим в пище, воде и природных образцах, представляет собой сложную задачу.

**Требования к вакцинам:** Серийно выпускаемые вакцины против криптоспоридиоза отсутствуют.

## А. ВВЕДЕНИЕ

Криптоспоридиоз – патологическое состояние, вызванное инфекцией простейших организмов, принадлежащих к роду *Cryptosporidium*. Чаще всего наблюдается инфекция желудочно-кишечного тракта, основным симптом этой инфекции – диарея. У некоторых животных-хозяев, особенно птиц, развивается респираторная инфекция. Могут быть инфицированы также и другие органы тела, которые чаще поражаются также у птиц и лиц со сниженным иммунитетом.

### 1. Возбудитель болезни

Возбудителем криптоспоридиоза являются простейшие, принадлежащие к роду *Cryptosporidium*, которых традиционно относили к типу Apicomplexa, классу Sporozoasida, подклассу Coccidiasina, порядку Eucoccidiorida и семейству *Cryptosporidiidae*. В результате пересмотра классификации эукариот род *Cryptosporidium* помещен в следующие иерархические группы, перечисленные в нисходящем порядке: Diaphoretickes; надгруппа Sar (Stramenopiles, Alveolata и Radiolaria); Alveolata; и, в конечном счете, Conoidasida, при этом род *Cryptosporidium* является отдельной группой, отделенной от *Coccidia* и *Gregarinasina* (Adl et al., 2012). По состоянию на период подготовки данной публикации (июль 2015 г.), формально описаны биологические и генетические характеристики 26 видов рода *Cryptosporidium* (Таблица 1).

Для диагностики криптоспоридиоза необходима лабораторная детекция рода, но лишь молекулярные методы позволяют дифференцировать виды и подтипы рода *Cryptosporidium*, потому что ооцисты многих видов неотличимы по размеру (Таблица 1), и существует небольшое количество видоспецифичных антигенов. В прошлом многие «виды» были описаны исходя из ложной посылки, основанной на специфичности организма-хозяина (Fayer, 2010). Опубликованы сообщения о том, что *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. baileyi* и *C. meleagridis* вызывают заболевания отдельных животных и вспышки заболевания среди сельскохозяйственных животных, домашней птицы и даже пернатой дичи. Считается, что для человека основными патогенами являются *C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis* и *C. cuniculus*, вызывающие отдельные случаи и вспышки заболевания (Таблица 1). Большинство случаев криптоспоридиоза у молодых сельскохозяйственных млекопитающих, вероятно, вызваны *C. parvum*, с которым также связана наибольшая опасность зоонозных заболеваний человека. Дополнительно на основании результатов секвенирования ДНК у животных идентифицированы более 40 «генотипов» *Cryptosporidium*, однако биологические данные в достаточном количестве для учреждения статуса вида отсутствуют (Fayer, 2010). У человека описаны генотип I *Cryptosporidium* лошади, скунса и бурундука, и генотипы *C. hominis* обезьяны.

Предложено выделить *C. molnari* и *Cryptosporidium*-подобные виды и также генотипы паразитов, инфицирующих рыбу, в новый род, обозначенный *Piscicryptosporidium*; но необходимо дополнительно охарактеризовать его с биологической и генетической точки зрения, для того чтобы определить, является ли в действительности *Piscicryptosporidium* полноценным родом.

**Таблица 1. Некоторые различия видов, принадлежащих к роду *Cryptosporidium***

Вид рода <i>Cryptosporidium</i>	Средние размеры ооцисты (мкм) <sup>a</sup>	Основной хозяин (хозяева)	Обычное место инфекции	Инфекции, описанные у человека
<i>C. andersoni</i>	7,4 x 5,5	Крупный рогатый скот	Желудок	Да, но лишь редко
<i>C. baileyi</i>	6,2 x 4,6	Домашняя птица	Верхние	Нет

дыхательные пути				
<i>C. bovis</i> (ранее бычий генотип В)	4,9 x 4,6	Крупный рогатый скот	Тонкий кишечник	Да, но лишь редко
<i>C. canis</i> (ранее собачий генотип)	5,0 x 4,7	Собака	Тонкий кишечник	Да, время от времени
<i>C. cichlidis</i> (ранее рыбий генотип 1 или <i>C. Molnari</i> – подобный генотип)	4,6 x 4,4	Тилапия	Желудок	Нет
<i>C. cuniculus</i> (ранее кроличий генотип)	5,6 x 5,4	Кролик, человек	Тонкий кишечник	Да, время от времени. Одна вспышка вследствие передачи возбудителя через воду
<i>C. ducismarci</i>		Черепаша	Кишечник	Нет
<i>C. erinacei</i>	4,9 x 4,4	Еж	Тонкий кишечник	Да, но лишь редко
<i>C. fayeri</i> (ранее генотип сумчатых I)	4,9 x 4,3	Сумчатые животные	Кишечник	Да, но лишь редко
<i>C. felis</i>	4,6 x 4,0	Кошка	Тонкий кишечник	Да, время от времени
<i>C. fragile</i>	6,2 x 5,5	Малайская жаб	Желудок	Нет
<i>C. galli</i>	8,3 x 6,3	Цыпленок	Железистый желудок	Нет
<i>C. hominis</i> (ранее описанный как генотип паразита человека <i>C. parvum</i> 1 и H)	4,9 x 5,2	Человек	Тонкий кишечник	Да, часто. Часто описываются вспышки инфекции
<i>C. huwi</i>	4,6 x 4,4	Гуши	Желудок	Нет
<i>C. macropodum</i> (ранее генотип сумчатых II)	5,4 x 4,9	Восточный серый кенгуру	Кишечник	Нет
<i>C. meleagridis</i>	5,2 x 4,6	Птицы, млекопитающие	Кишечник	Да, частота зависит от условий. Одна вспышка среди сельскохозяйственных работников и одна вспышка среди школьников.
<i>C. molnari</i>	4,7 x 4,5	Морской лещ	Кишечник	Нет
<i>C. muris</i>	7,0 x 5,0	Грызуны	Желудок	Да, но лишь редко
<i>C. parvum</i> (также ранее в некоторых случаях называли бычьим генотипом II и генотипом В)	5,0 x 4,5	Человек, неотлученные от матки сельскохозяйственные млекопитающие	Тонкий кишечник	Да, часто. Часто описываются вспышки инфекции
<i>C. proliferans</i>	7,7 x 5,3	Грызуны	Желудок	Нет
<i>C. ruanae</i> (ранее «подобный оленьему генотипу»)	3,7 x 3,2	Крупный рогатый скот		Нет
<i>C. reichenbachklinkei</i> (ранее рыбий генотип 2)	3,4 x 3,4	Гурами	Желудок	Нет
<i>C. rubeyi</i>	4,7 x 4,3	Суслики		Нет
<i>C. scrofarum</i> (ранее свиной генотип II)	5,2 x 4,8	Свинья	Тонкий кишечник	Да, но лишь редко
<i>C. serpentis</i>	6,2 x 5,3	Рептилии	Желудок	Нет
<i>C. suis</i> (ранее свиной генотип I)	4,6 x 4,2	Свинья	Тонкий кишечник	Да, но лишь редко
<i>C. tyzzeri</i> (ранее мышинный генотип I)	4,6 x 4,2	Мыши	Тонкий кишечник	Да, но лишь редко

<i>C. ubiquitum</i> (ранее олений генотип)	5,0 x 4,7	Разнообразные млекопитающие	Тонкий кишечник	Да, время от времени
<i>C. viatorum</i>	5,4 x 4,7	Человек		Да, время от времени
<i>C. varanii</i> (синоним <i>C. saurophilum</i> )	4,8 x 4,7	Рептилия	Кишечник	Нет
<i>C. wrairi</i>	5,4 x 4,6	Морская свинка	Тонкий кишечник	Нет
<i>C. xiaoi</i> (ранее <i>C. bovis</i> -подобный генотип или <i>C. bovis</i> овечий или <i>C. agni</i> )	3,9 x 3,4	Овца, коза		Нет

<sup>a</sup> Данные из оригинальных публикаций, в которых описаны виды

## 2. Описание заболевания у животных

Имеется описание клинических и субклинических инфекции у животных (Santin, 2013).

*Cryptosporidium parvum* является важной причиной поноса у молодых, неотлученных от маток сельскохозяйственных животных, включая телят, ягнят, козлят, жеребят и детенышей альпаки. Помимо вопросов здоровья и благополучия, нежелательные последствия включают также снижение продуктивности. Здоровые и взрослые животные тоже могут распространять с экскрементами ооцисты, часто в больших количествах, представляя собой потенциальный резервуар инфекции и загрязнения окружающей среды.

Вызванные *Cryptosporidium parvum* инфекции крупного рогатого скота признаны эндемичными во всем мире. Распространенность и тяжесть заболевания достигают максимального уровня на второй неделе жизни. Эндогенные стадии паразита инфицируют энтероциты дистального отдела тонкого кишечника, слепую кишку и ободочную кишку. Основные патологические изменения включают атрофию ворсинок, укорочение микроворсинок и слущивание энтероцитов. Заболевшие животные обычно выздоравливают через 2 недели после появления признаков болезни. Клинические признаки могут варьировать от легкой до бессимптомной инфекции у взрослых животных до тяжелого поноса у молодых животных; инфекция может вызывать обезвоживание, снижение активности, анорексию, лихорадку и общее ухудшение состояния различной степени тяжести. Летальность обычно низкая, кроме случаев смешанной инфекции совместно с другими кишечными патогенами, например *Escherichia coli* или ротавирусом, хотя в некоторых случаях сообщается о тяжелых вспышках криптоспоридиоза.

У мелких жвачных животных (овец и коз) инфекция *Cryptosporidium parvum* обычно вызывает диарею у новорожденных животных, которая в некоторых случаях сопровождается высокой заболеваемостью и летальностью, особенно при сопутствующих инфекциях или неудовлетворительном питании и условиях содержания животных. У овец наблюдалось повышенное выделение ооцист в околородовом периоде.

Хотя *C. parvum* патогенен для поросят и вызывает у них утрату аппетита, угнетенное состояние, рвоту или диарею, наиболее часто описываемыми видами являются *C. suis* и *C. scrofarum*. Однако инфицирование в естественных условиях не приводит к болезни, и клинические признаки криптоспоридиоза у свиней могут быть связаны с инфицированием другими видами или генотипами *Cryptosporidium*, либо одновременным заражением другими энтеропатогенами.

Другие виды рода *Cryptosporidium* тоже вызывают инфекцию у сельскохозяйственных и домашних животных.

В целом, *Cryptosporidium bovis* и *C. ryanae* обнаруживаются у телят после отъема чаще, чем *C. parvum*, но инфекция этими адаптированными к хозяину (КРС) видами не сопровождается болезненными явлениями, и гистологические или патологические сообщения о таких инфекциях отсутствуют. *Cryptosporidium andersoni* колонизирует пищеварительные железы сычуга подросших телят и взрослого крупного рогатого скота. У инфицированного крупного рогатого скота не возникает диарея, но экскреция ооцист может продолжаться в течение нескольких месяцев. У некоторых инфицированных быков снижается привес по сравнению с неинфицированными контрольными животными, и в одном исследовании обнаружено, что у инфицированных молочных коров могут снижаться удои.

*Cryptosporidium ubiquitum* и *C. xiaoi* инфицируют ягнят и козлят. *Cryptosporidium ubiquitum* обнаруживается преимущественно у ягнят-отъемышей; в одной из публикаций сообщается об обнаружении *C. parvum* у животных во время вспышки диареи, и в одном исследовании у ягнят-носителей *C. ubiquitum* были показаны повышенные оценки консистенции фекалий. Инфекция *Cryptosporidium xiaoi* сопровождалась вспышками диареи у новорожденных козлят.

*Cryptosporidium canis* является наиболее часто наблюдаемым видом у собак, и, хотя эта инфекция обычно бывает бессимптомной, ее связывают с тяжелой диареей, мальабсорбцией и потерей массы тела, особенно у молодых животных.

У кошек чаще всего наблюдают инфекцию *Cryptosporidium felis*, часто не сопровождающуюся клиническими признаками, хотя инфекция в некоторых случаях связана со стойкой диареей. Кошки с другими кишечными паразитами или с вирусной инфекцией кошачьего лейкоза наиболее подвержены развитию криптоспоридиоза, и криптоспоридиоз следует включить в дифференциальную диагностику хронической диареи у кошек.

*Cryptosporidium* – первичный патоген у цыплят, индеек и куропаток, вызывающий заболевания дыхательных путей и/или кишечника, приводящие к заболеваемости и летальности. Имеется обзор трех видов рода *Cryptosporidium* – *C. baileyi*, *C. meleagridis* и *C. Galli*, вызывающих инфекции у домашней птицы (Current, 1997; Ryan, 2010).

*Cryptosporidium baileyi* чаще всего инфицирует верхние дыхательные пути, хотя обнаружен и в других органах, включая почки и мочевыводящие пути, фабрициеву сумку и клоаку, тогда как инфекция трахеи и конъюнктивы наблюдаются реже. Инфекция кишечника, как правило, не приводит к макроскопическим поражениям или явным признакам болезни, но респираторный криптоспоридиоз цыплят и пернатой дичи может приводить к тяжелой заболеваемости и иногда к гибели птицы. Первоначально тяжелая болезнь сопровождается чиханием и кашлем с последующим вытягиванием головы для облегчения дыхания. У молодых бройлеров стирание ресничек и гиперплазия эпителиальных клеток, утолщение слизистой оболочки и выделение слизистоклеточного экссудата в дыхательные пути являются основными патологическими изменениями, ассоциированными с заболеванием. Тяжелые признаки респираторного заболевания могут продолжаться до 4 недель после инфицирования. У индеек криптоспоридиоз, вызванный *Cryptosporidium baileyi* протекает аналогично. Полученные у цыплят изоляты *C. baileyi* вызывают инфекцию у других птиц. У выращенных на коммерческой ферме куропаток описан вызванный *C. baileyi* респираторный и кишечный криптоспоридиоз, сопровождавшийся патологическими изменениями, описанными у цыплят. Пероральное заражение цыплят 100 ооцистами *C. baileyi* может приводить к кишечному криптоспоридиозу (Current, 1997).

*Cryptosporidium meleagridis* инфицирует индеек, других птенцов домашней птицы и человека. Основными патологическими изменениями являются атрофия ворсинок кишечника и укорочение микроворсинок.

*Cryptosporidium galli* вызывает заболевание у взрослых кур и некоторых видов диких и экзотических птиц. В отличие от стадий жизненного цикла *C. meleagridis* или *C. baileyi*, вызванная *C. galli* инфекция ограничена эпителиальными клетками железистого желудка. Клинические признаки включают рыхлое оперение, спрятанную под крыло голову, отсутствие реакции на внешние раздражители и отсутствие прибавки в весе. При гистопатологическом исследовании птицы окрашиванием срезов гематоксилином и эозином отмечается некроз и гиперплазия железистых эпителиальных клеток железистого желудка и смешанные воспалительные инфильтраты в собственной пластинке железистого желудка при наличии многочисленных ооцист на поверхности железистых эпителиальных клеток.

Вспышки заболевания у пернатой дичи (фазана, серой куропатки и тетерева) указывает на необходимость включения криптоспориоза в число респираторных и кишечных заболеваний, на которые в плановом порядке проверяют этих птиц. Заболевание вызывают и *C. meleagridis*, и *C. baileyi*.

Значение инфекции *Cryptosporidium* для аквакультуры и рыбоводства в точности не известно, хотя сообщается о заболеваемости и летальности на рыбоводных заводах с высокой распространенностью инфекции (Garbor *et al.*, 2011).

### **3. Опасность для здоровья людей**

У человека криптоспориоз обычно представляет собой острое, самоизлечивающееся заболевание желудочно-кишечного тракта, которое характеризуется водянистой диареей, спастическими болями в животе, рвотой, небольшим повышением температуры тела и потерей аппетита (Chalmers & Davies, 2010). Симптомы могут сохраняться до 1 месяца, в течение которого приблизительно в трети случаев происходит рецидив заболевания. Описаны отдаленные последствия, связанные с инфекцией *Cryptosporidium*, однако требуется их дополнительное исследование. У пациентов с тяжелым иммунодефицитом криптоспориоз может иметь хроническое, тяжелое и трудноизлечимое течение со значимой смертностью. У детей с неудовлетворительным питанием инфекция вызывает существенную заболеваемость и смертность (Kotloff *et al.*, 2013). В дополнение к зоонозным видам *Cryptosporidium* (Таблица 1), важной причиной заболеваний желудочно-кишечного тракта у людей является *C. hominis*. Хотя сообщения о вызванных *C. hominis* инфекциях у крупного рогатого скота и овец немногочисленны, нет никаких данных об удержании инфекции или о передаче ее между стадами или поголовьями, и также о клинических признаках заболевания у животных.

### **4. Передача инфекции**

Передача происходит фекально-оральным способом, при этом может быть задействован носитель, например, загрязненная пища или питьевая вода. *Cryptosporidium parvum* обладает высокой инфекционностью для молодых сельскохозяйственных животных и людей; подросшие сельскохозяйственные животные могут оставаться инфицированными и выделять с экскрементами ооцисты, передающиеся другим восприимчивым хозяевам. Передача *C. hominis* признана антропономической. Инвазионная способность изолятов варьирует, и на чувствительность к ним влияют факторы хозяина (Borad & Ward 2010; Flores & Okhuysen, 2009; Yang *et al.*, 2010). Модели дозозависимости указывают на высокую вероятность заражения человека и молодых, неотлученных от матерей

сельскохозяйственных животных одиночными ооцистами *C. parvum*, и также на взаимосвязь между присутствующими в организме антителами и защитой от инфекции.

Ооцисты способны сохранять жизнеспособность в течение длительного времени (>6 месяцев) в прохладной, влажной среде и также на предметах, с которыми они контактировали, например, воротах фермы, в помещениях и на посуде. Ооцисты передаются при прямом контакте с фекалиями инфицированной особи или при контакте с загрязненными предметами, либо через желудочно-кишечный тракт при употреблении загрязненной пищи или воды. Агротехнические приемы, вероятно, способствующие распространению криптоспоридиоза, включают отел и окот в помещениях и групповое кормление и содержание новорожденных животных, при котором молодые чувствительные животные находятся в тесном контакте с инфицированными животными. Возможна передача возбудителя от клинически здоровых самок к подсосным новорожденным, однако о носительстве почти ничего неизвестно. Показано, что вывоз фекалий, стойлового навоза или других загрязненных отходов на свалки мусора и распространение навозной жижи с последующими периодами обильных осадков или таяния снега могут привести к загрязнению ооцистами водостоков и источников снабжения питьевой водой.

Дикие млекопитающие могут выступать в роли хозяев *Cryptosporidium* (Fayer, 2010; Xiao *et al.*, 2004), но об их роли в передаче инфекции или удержании инфекции сельскохозяйственными животными в сельскохозяйственных угодьях почти ничего не известно (Sturdee *et al.*, 1999). Животные, инфицированные в природных условиях адаптированными к хозяину видами *Cryptosporidium*, могут служить векторами, передающими *C. parvum* другим видам животных.

## 5. Дифференциальная диагностика

Дифференциальная диагностика паразитов рода *Cryptosporidium* включает других энтеропатогенов, которые могут вызывать диарею. Могут присутствовать многочисленные патогены, включающие других паразитов, ротавирусов, коронавируса, патогенные штаммы *E. coli* и *Salmonella*. Подтверждением криптоспоридиоза у сельскохозяйственных животных служит обнаружение значимого количества ооцист в диарейных фекалиях при отсутствии других патогенов, и хотя широко распространено предположение, согласно которому при сопутствующей инфекции течение криптоспоридиоза может быть более тяжелым (Lorenz *et al.*, 2011), экспериментальное подтверждение этого предположения отсутствует. Возможны другие причины желудочно-кишечного расстройства, например, воспалительное заболевание кишечника у человека.

## В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

**Таблица 2.** Методы исследований, применяемые для диагностики криптоспоридиоза, и их назначение

Метод	Цель					
	Отсутстви е инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельных животных перед перемещением	Вклад в политику искоренения	Подтвержде ние клинических случаев	Надзор за распростра нием инфекции	Иммунный статус отдельных животных или популяций после вакцинации
<b>Идентификация возбудителя <sup>1</sup></b>						
<b>Световая микроскопия</b>	нп	нп	нп	+++	++	нп
<b>РФА</b>	нп	нп	нп	+++	++	нп
<b>Детекция</b>	нп	нп	нп	+	+	нп

антигена методом ИХ						
Детекция антигена методом твердофазного ИФА	нп	нп	нп	+++	+++	нп
ПЦР	нп	нп	нп	+++	+++	нп
<b>Выявление иммунной реакции<sup>1</sup></b>						
Детекция антител методом твердофазного ИФА	нп	нп	нп	нп	++	нп

Пояснение: +++ = рекомендованный метод; ++ = приемлемый метод; + = может быть использован в некоторых ситуациях, но применение существенно ограничено стоимостью, достоверностью или другими факторами;

– = не подходит для данной цели; нп = не применимо. Хотя не все тесты, относящиеся к категории +++ или ++ формально валидированы, они признаны приемлемыми по причине применения их в установившейся практике и широкого использования без неоднозначных результатов.

РФА = реакция флуоресцирующих антител; ИХ = иммунохроматография; ПЦР = полимеразная цепная реакция; твердофазный ИФА = твердофазный иммуноферментный анализ.

## 1. Вводная информация о доступных методах диагностики

Наиболее распространенным способом подтверждения инфекции является обнаружение ооцист *Cryptosporidium* при микроскопическом изучении кала (Casemore, 1991). Возможно обнаружение возбудителя в кишечном соке, образцах ткани или биоптатах; либо антигенов в кале или кишечном соке; либо нуклеиновой кислоты методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в кале, кишечном соке, образцах ткани или биоптатах. Для гистологической диагностики полученного при биопсии материала или посмертного подтверждения диагноза может применяться окрашивание гематоксилином и эозином.

Идентификацию видов обычно выполняет референтная лаборатория, в которой используется эталонный метод секвенирования гена малой субъединицы рРНК. В эпидемиологических исследованиях инфекций, вызванных *C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis* и *C. ubiquitum*, применяются методы субтипирования. Обычно генетической мишенью является ген *grbO*. Стандартизированная мультилокусная схема субтипирования отсутствует, и, хотя описаны секвенирование или анализ размера фрагментов мини- или микросателлитных маркеров (Xiao, 2010), требуется гармонизировать выбор маркеров, анализ и алгоритмы установления взаимосвязи (Widmer & Caccio, 2015).

Воспроизводимые методы выращивания криптоспоридий в культуре для амплификации их количества перед идентификацией отсутствуют.

Серологические методы не приемлемы для диагностики, но могут быть использованы в сероэпидемиологических обследованиях воздействия.

<sup>1</sup> Для анализа клинического образца рекомендуется использовать сочетание методов идентификации возбудителя.



## **2. Идентификация паразитов рода *Cryptosporidium***

### **2.1. Безопасность и качество**

Лабораторные исследования *Cryptosporidium* связаны с риском, и все лабораторные процедуры, при которых возможно образование инфекционных аэрозолей, должны проводиться в боксе биологической безопасности. В образцах могут содержаться другие патогенные микроорганизмы, в связи с чем необходимо соблюдать надлежащие правила работы с ними. Для защиты здоровья сотрудников лаборатории все манипуляции в лаборатории должны проводиться при определенном уровне биобезопасности и изоляции, в соответствии с результатами анализа биориска (см. главу 1.1.4 *Биобезопасность и биосохранность: Стандарты управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и помещениях для содержания животных*).

### **2.2. Получение и представление образцов**

Образцы для первичной диагностики следует получить во время острой инфекции. Если ведется поиск только представителей рода *Cryptosporidium*, то допустимо непродолжительное хранение образцов кала при 4°C, поскольку эти условия позволяют сохранить морфологию ооцистов и структуру антигенов. Возможно более длительное хранение при –20°C. В качестве альтернативы для оптимизации условий хранения при температуре окружающей среды может быть добавлен равный объем 5% K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Однако, если предполагается дифференциальная диагностика от других паразитов и в особенности трофозоитов, исследование кала следует провести без промедления. Для того чтобы снизить риск ухудшения морфологии паразита на других стадиях развития, и также не допустить избыточного роста других микроорганизмов, в особенности дрожжей, в образцы могут быть добавлены консерванты, включая 10% (отношение объемов) водный формалин, раствор мертиолята-йода-формальдегида (MIF), натрия ацетата – уксуснокислого формалина (SAF) и поливиниловый спирт (PVA). Описанные ниже тесты следует рассматривать с учетом совместимости консервантов, например, формалин и SAF, в целом, совместимы с наборами для твердофазного иммуноферментного анализа (твердофазного ИФА) и наборами для иммунохроматографии (ИХ), однако необходимо следовать инструкциям производителя. Консерванты могут взаимодействовать с анализами на основе ПЦР; фекальные образцы можно хранить в 90% этиловом спирте для проведения ПЦР в будущем. Фекальные образцы, хранящиеся с консервантом, может потребоваться сконцентрировать перед микроскопией с использованием признанного метода, однако в случае использования наборов для твердофазного ИФА и ИХ концентрирование не применяется, поскольку может привести к потере растворимых антигенов. Некоторые фекалии могут потребовать дополнительной обработки, например, очень жидкие фекалии могут быть сконцентрированы, в случае жирных фекалий может потребоваться обезжиривание, слизистые образцы может потребоваться обработать КОН или дитиотреитолом, фекалии, содержащие волокна, бывает необходимо просеять, чтобы удалить волокна.

Процедуры упаковки и транспортировки следует осуществлять в соответствии с Правилами перевозки опасных грузов Международной ассоциации воздушного транспорта (ИАТА, 2003). Эти правила кратко описаны в главе 1.1.2 *Получение, представление и хранение диагностических образцов* и главе 1.1.3 *Транспортировка образцов животного происхождения*.

### **2.3. Микроскопия – подготовка и окрашивание образца**

#### **2.3.1. Приготовление фекальных мазков (или мазков биологических жидкостей)**

Большинство не содержащих консерванты образцов можно перед окрашиванием наносить непосредственно на предметные стекла. Каждый раз при выполнении этой процедуры следует включить в серию образцов стекло с положительным контрольным образцом.

### **2.3.1.1. Методика**

- i) Необходимо работать в защитной спецодежде и одноразовых перчатках. На предметном стекле алмазным маркером<sup>2</sup> указывают справочный номер образца и используются отдельные предметные стекла для каждого образца. В случае сформированных фекалий в центр предметного стекла помещают 1 каплю физиологического раствора (приблизительно 50 мкл).
- ii) В случае жидких фекалий (или другой соответствующей биологической жидкости) одну каплю жидкости (приблизительно 20 мкл) наносят непосредственно на предметное стекло. В случае сформированных фекалий кончиком чистой аппликаторной палочки отбирают образец массой приблизительно 2 мг<sup>3</sup> и готовят эмульсию в физиологическом растворе, тщательно перемешивая образец.
- iii) В случае густого образца с участками, имеющими разную плотность, следует приготовить среду для загущения образца и убедиться в надлежащей прозрачности мазка<sup>4</sup>.
- iv) Мазок сушат на воздухе при комнатной температуре.
- v) Мазок<sup>5</sup> фиксируют в метаноле в течение 3 минут.
- vi) Мазок окрашивают модифицированным методом Циля-Нильсена или аурамин-фенольным красителем, как описано ниже.

### **2.3.2. Концентрирование ооцист методом флотации из образцов с консервантом или жидких образцов**

#### **2.3.2.1. Приготовление флотационного раствора**

Для выделения ооцист из фекального дебриса могут быть использованы раствора сахарозы, сульфата цинка или хлорида натрия.

##### **2.3.2.1.1. Приготовление раствора сахарозы или сульфата цинка**

Готовят либо раствор сахарозы (с удельной плотностью 1,18) в стеклянном химическом стакане, добавляя 250 г сахарозы к 300 мл деионизированной воды, либо раствор сульфата цинка (с удельной плотностью 1,18), в стеклянном химическом стакане, добавляя 100 г сульфата цинка к 300 мл деионизированной воды. Раствор осторожно нагревают (<60°C) на плитке с мешалкой при непрерывном перемешивании, чтобы добиться полного растворения сахарозы или сульфата цинка. Полученный раствор помещают в лед или в холодильную камеру и охлаждают до 4°C. Охлажденный раствор выливают в мерный цилиндр вместимостью 500 мл и корректируют удельную плотность до 1,18, добавляя холодную деионизированную воду (4°C). Раствор заливают в стеклянную бутылку с навинчивающейся крышкой, подписывают, проставляют дату и инициалы и хранят при 4°C до использования.

---

<sup>2</sup> Альтернативно можно карандашом сделать отметку на протравленной (матовой) части предметного стекла с матовой поверхностью.

<sup>3</sup> В случае сформированных фекалий образец должен включать порции с поверхности и из глубины фекалий.

<sup>4</sup> Для данной методики рекомендуется использовать мазки средней густоты. Если образец слишком жидкий или слишком густой, то можно пропустить ооцисты. Через препарат приемлемой густоты можно увидеть стрелки наручных часов или прочитать текст, напечатанный на этой странице.

<sup>5</sup> Высушенные на воздухе и фиксированные в метаноле образцы можно хранить при комнатной температуре в течение >6 месяцев после окрашивания.

#### 2.3.2.1.2. Приготовление насыщенного раствора соли

Для приготовления насыщенного раствора соли (с удельной плотностью 1,2) к 200 мл деионизированной воды добавляют приблизительно 200 г хлорида натрия. Раствор осторожно нагревают (<60°C) на плитке с мешалкой при непрерывном перемешивании. Далее через каждые 10 минут добавляют небольшие порции (приблизительно 10 г) хлорида натрия до насыщения раствора. Насыщенный солевой раствор заливают в чистую стеклянную бутылку и помещают ее в лед или холодильную камеру для охлаждения до 4°C. Охлажденный раствор выливают в мерный цилиндр вместимостью 500 мл и корректируют удельную плотность до 1,18, добавляя холодную деионизированную воду (4°C). Насыщенный раствор соли заливают в стеклянную бутылку с навинчивающейся крышкой, подписывают, проставляют дату и инициалы и хранят при 4°C до использования.

Альтернативно может быть использован холодный метод; для насыщения 4 литров деионизированной воды требуется приблизительно 1,5 кг хлорида натрия; с этой целью в воду добавляют небольшими порциями хлорид натрия, не останавливая магнитную мешалку и не прерывая энергичного перемешивания раствора. Хлорид натрия продолжают добавлять до тех пор, пока удельная плотность не достигнет 1,2. Насыщенный раствор соли разливают по бутылкам с навинчивающейся крышкой, подписывают, проставляют дату и инициалы и хранят при 4°C до использования.

Перед использованием необходимо посредством противодвижения убедиться в том, что раствор перемешан и затем подождать в течение 5 минут, пока не будет достигнуто равновесие.

#### 2.3.2.2. Извлечение ооцист *Cryptosporidium* посредством флотации при центрифугировании

##### 2.3.2.2.1. Методика

i) Необходимо работать в защитной спецодежде и одноразовых перчатках. В 10 мл флотационного раствора, помещенного в центрифужную пробирку вместимостью 15 мл, вносят аппликаторной палочкой приблизительно 1–2 г фекалий<sup>6</sup> или пипеткой 1–2 мл жидких фекалий и тщательно перемешивают.

ii) Центрифужную пробирку помещают в настольную центрифугу со свободно подвешенными в роторе стаканами, при необходимости добавляют центрифужную пробирку для уравнивания и центрифугуют при 1100 g в течение 5 минут<sup>7</sup>.

iii) Из мениска отбирают верхние 2 мл жидкости (содержащей ооцисты), трехкратно промывают деионизированной водой и в заключение ресуспендируют в минимальном объеме деионизированной воды.

iv) Ресуспендированное содержимое переносят одноразовой пипеткой на предметное стекло и сушат на воздухе.

#### 2.3.3. Концентрирования ооцист методом седиментации из образцов с консервантом или жидких образцов

Все этапы, на которых возможно образование аэрозоля, следует выполнять в ламинарном боксе, обеспечивающем защиту оператора.

---

<sup>6</sup> В случае сформированных фекалий образец должен включать порции с поверхности и из глубины фекалий.

<sup>7</sup> Не рекомендуется центрифугировать образцы при скорости более 1100 g дольше 5 минут, поскольку это может привести к деформации или разрыву и спаданию некоторых паразитов.

### 2.3.3.1. Методика

- i) Необходимо работать в защитной спецодежде и одноразовых перчатках. Образец фекалий<sup>8</sup> массой от 500 мг до 1 г отбирают аппликаторной палочкой<sup>9</sup> и помещают в чистую центрифужную пробирку вместимостью 12–15 мл, содержащую 7 мл 10% формалина. В случае жидких фекалий в центрифужную пробирку вносят приблизительно 750 мкл образца.
- ii) Тщательно измельчают образец и эмульгируют его аппликаторной палочкой.
- iii) Полученную суспензию фильтруют через сито<sup>10</sup> в химический стеклянный стакан, затем фильтрат заливают обратной в ту же центрифужную пробирку.
- iv) В формализированный раствор вносят 3 мл этилацетата<sup>11</sup>, запечатывают горлышко пробирки резиновой пробкой и тщательно встряхивают смесь в течение 30 минут. Во время этой процедуры пробирку несколько раз переворачивают и затем осторожно стравливают давление, медленно вытаскивая пробку.
- v) Пробирку центрифугируют при 1100 g в течение 2 минут<sup>12</sup>.
- vi) Жировую пробку расшатывают деревянной палочкой, вставляя палочку между пробкой и внутренней стенкой пробирки. Пробку и жидкость, которая находится поверх пробки и ниже пробки выбрасывают, переворачивая пробирку и позволяя лишь одно или двум каплям упасть обратно в пробирку. Эту жидкость, содержащую этилацетат и формалин, следует выбросить, поместив в подписанный герметизируемый контейнер для жидких отходов.
- vii) Осадок ресуспендируют при перемешивании<sup>13</sup>. Ресуспендированное содержимое переносят одноразовой пипеткой на предметное стекло и сушат на воздухе.

Выпускаются коммерческие устройства для концентрирования яиц гельминтов, личинок и цист простейших формалино-эфирным методом.

### 2.3.4. Методы окрашивания

#### 2.3.4.1. Модифицированный метод окрашивания по Цилю-Нильсену (mZN)

- i) Концентрированный карбол-фуксин  
20 г основного фуксина растворяют в 200 мл абсолютного метанола и перемешивают на магнитной мешалке до растворения. Добавляют 125 мл жидкого фенола (реактив общего назначения [РОН; 80% (отношение объемов) в дистиллированной воде]), тщательно перемешивают и разбавляют до метки 1675 миллилитрами деионизированной воды.

---

<sup>8</sup> Соответствует размеру горошины.

<sup>9</sup> В случае сформированных фекалий образец должен включать порции с поверхности и из глубины фекалий.

<sup>10</sup> Размер поры 425 мкм при диаметре 38 мм эквивалентен Британскому стандарту 36 меш (BS 410-86) или американскому стандарту 40 меш (ASTM E11-81). Кромка сита должна точно прилегать к краю химического стакана. Между образцами необходимо тщательно промывать сито и химический стакан под струей воды.

<sup>11</sup> Хотя этилацетат менее легковоспламеняемое вещество, по сравнению с использованным ранее диэтиловым эфиром, он тем не менее является горючим веществом, поэтому процедуру следует проводить в хорошо проветриваемом помещении, в котором не допустимо присутствие открытого пламени. Не следует допускать длительного вдыхания этилацетата или попадания его на кожу.

<sup>12</sup> Не рекомендуется центрифугировать образцы при скорости более 1100 g дольше 5 минут, поскольку это может привести к деформации или разрыву и спаданию некоторых паразитов.

<sup>13</sup> Слишком большое количество осадка указывает на следующее: центрифугирование при скорости, превышающей рекомендованную, недостаточное встряхивание (на этапе iv), либо использование избыточного фекального образца.

Тщательно перемешивают. Перед использованием фильтруют через фильтровальную бумагу Whatman №1 для удаления дебриса и хранят в бутылки для исходных реактивов. Бутылку подписывают и проставляют дату и инициалы. Исходный реактив хранят в темном шкафу при комнатной температуре. Возможно также приобретение готового коммерческого препарата. Концентрация основного фуксина может варьировать при приемлемом диапазоне от 1 до 3%.

ii) 1% кислый метанол

К 1980 мл абсолютного метанола осторожно добавляют 20 мл концентрированной соляной кислоты и перемешивают. Приготовленный раствор переносят в бутылку для исходных реактивов. Бутылку подписывают и проставляют дату и инициалы. Возможно также приобретение готового коммерческого препарата.

iii) 0,4% малахитовый зеленый

К 480 мл деионизированной воды добавляют 2 г малахитового зеленого и перемешивают на магнитной мешалке. Фильтруют через фильтровальную бумагу Whatman №1 в бутылку для исходных реактивов, подписывают, проставляют дату и инициалы. Возможно также приобретение готового коммерческого препарата.

#### 2.3.4.1.1. Методика

Каждый раз при выполнении этой процедуры следует включить в серию образцов стекло с положительным контрольным образцом.

i) Необходимо работать в защитной спецодежде и одноразовых перчатках. Высушенный на воздухе мазок<sup>14</sup> фиксируют в метаноле в течение 3 минут.

ii) Предметное стекло погружают в холодный концентрированный карбол-фуксин или промывают стекло холодным концентрированным карбол-фуксином.

iii) Тщательно ополаскивают предметное стекло водопроводной водой.

iv) В течение 10-15 секунд обесцвечивают в 1% кислом метаноле<sup>15</sup>.

v) Ополаскивают предметное стекло водопроводной водой.

vi) Выполняют контрастное окрашивание 0,4% малахитовым зеленым в течение 30 секунд.

vii) Ополаскивают предметное стекло водопроводной водой.

viii) Высушивают предметное стекло на воздухе.

ix) Изучают предметное стекло на предмет присутствия ооцист посредством системного сканирования предметного стекла под светопольным микроскопом при 40-кратном увеличении. При подтверждении присутствия ооцист используют масляно-иммерсионный объектив<sup>16</sup>.

x) Используя калиброванную оптическую сетку окуляра, измеряют размер и определяют форму окрашенных в красный цвет телец.

Ооцисты микроорганизмов рода *Cryptosporidium* окрашиваются в красный цвет на светло-зеленом фоне. Степень и доля окрашивания ооцисты индивидуальны. Кроме того, внутренние структуры в различной степени поглощают краситель. Некоторые ооцисты могут выглядеть аморфными, тогда как другие содержат характерные серповидные формы спорозоитов. Ооцисты *Cryptosporidium parvum* похожи на диски диаметром 4–6 мкм. Дрожжи и фекальный дебрис окрашиваются в тускло-красный цвет. Некоторые

---

<sup>14</sup> Для данной методики рекомендуется использовать мазки средней густоты.

<sup>15</sup> Не следует допускать чрезмерного обесцвечивания.

<sup>16</sup> Мазок можно изучать с/без покровного стекла.

бактериальные споры могут также окрашиваться в красный цвет, но они слишком мелкие, поэтому их невозможно спутать с ооцистами.

#### 2.3.4.2. Аурамин-фенол

i) Аурамин-фенол (АФ)

В 100 мл деионизированной воды растворяют 3 г фенола и медленно добавляют 0,3 г аурамина О. Фильтруют через фильтровальную бумагу Whatman №1 в бутылку для исходных реактивов. Исходный реактив подписывают, проставляют дату и инициалы. Хранят при комнатной температуре в защищенной от света стеклянной бутылке с герметичной пробкой. Возможно также приобретение готового коммерческого препарата, например, реактива Лемперта.

ii) 3% кислый метанол

К 1940 мл абсолютного метанола осторожно добавляют 60 мл концентрированной соляной кислоты и перемешивают. Приготовленный раствор переносят в бутылку для исходных реактивов. Бутылку подписывают и проставляют дату и инициалы. Возможно также приобретение готового коммерческого препарата.

iii) 0,1% перманганат калия

К 499,5 мл деионизированной воды добавляют 0,5 г перманганата калия и перемешивают на магнитной мешалке. Фильтруют через фильтровальную бумагу Whatman №1, подписывают, проставляют дату и инициалы. Возможно также приобретение готового коммерческого препарата.

##### 2.3.4.2.1. Методика

Каждый раз при выполнении этой процедуры следует включить в серию образцов стекло с положительным контрольным образцом.

i) Необходимо работать в защитной спецодежде и одноразовых перчатках. Высушенные на воздухе образцы или концентрированные образцы<sup>17 17</sup> фиксируют в абсолютном метаноле в течение 3 минут.

ii) Предметные стекла на 10 минут погружают в краситель АФ.

iii) Предметные стекла ополаскивают водопроводной водой для удаления избытка красителя.

iv) Обесцвечивают 3% кислым спиртом в течение 5 минут.

v) Выполняют контрастное окрашивание 0,1% перманганатом калия в течение 30 секунд.

vi) Предметное стекло сушат на воздухе при комнатной температуре<sup>1818</sup>.

vii) Изучают на предмет присутствия ооцист под эпифлуоресцентным микроскопом, оборудованным флуоресцеин-изотиоцианатными (FITC) или УФ-фильтрами, системно сканируя предметное стекло под 20-кратным увеличением. Для подтверждения присутствия ооцист используют объектив с 40-кратным увеличением.

viii) Используя калиброванную оптическую сетку окуляра, измеряют размер и определяют форму флуоресцентных телец (см. ниже)<sup>19. 19</sup>.

---

<sup>17</sup> Для данной методики рекомендуется использовать мазки средней густоты.

<sup>18</sup> Не промокайте стекла досуха, потому что в состав фильтровальной бумаги могут входить флуоресцентные волокна.

Ооцисты микроорганизмов рода *Cryptosporidium* имеют кольцевидную или яйцевидную форму и обладают характерной яркой флуоресценцией яблочно-зеленого цвета на темном фоне. Ооцисты *Cryptosporidium parvum* имеют форму кольца или пончика 4–6 мкм в диаметре. При наличии УФ-фильтра данный препарат следует рассматривать этот препарат в УФ-свете (длина волны возбуждения 355 нм, длина волны излучения 450 нм), поскольку спорозоиты лучше видны при использовании УФ, а не FITC-фильтров. При использовании УФ-фильтра ооцисты имеют светло-зеленый цвет, а спорозоиты желто-зеленый цвет.

#### 2.3.4.3. Представление результатов микроскопического исследования

Заключение по негативным образцам должно быть следующим: «Ооцисты *Cryptosporidium* НЕ наблюдаются».

Заключение по позитивным образцам должно быть следующим: «Наблюдаются ооцисты *Cryptosporidium*».

Можно использовать систему оценки позитивных образцов, основанную на количестве ооцист, наблюдаемых при использовании объектива с 40-кратным увеличением. Однако микроскопическое исследование нельзя считать количественным определением, потому что в ходе инфекции количество ооцистов существенно варьирует.

+	=	менее 1 ооцисты в поле зрения
++	=	от 1 до 10 ооцист в поле зрения
+++	=	11 или более ооцист в поле зрения

#### 2.3.5. Иммунологические методы

Хорошо зарекомендовали себя три подхода к иммунологической детекции антигенов ооцист рода *Cryptosporidium*: иммунофлуоресцентная микроскопия (ИФМ), твердофазный ИФА и ИХ; могут быть приобретены разнообразные коммерческие наборы, основанные на перечисленных подходах. Наборы для ИФМ более специфичны и более чувствительны в отношении ооцист *Cryptosporidium* в фекальных мазках по сравнению с традиционными красителями (Chalmers & Katzer, 2013). Согласно сообщениям, порог обнаружения ооцист при использовании твердофазного ИФА и ИХ составляет от  $3 \times 10^5$  до  $10^6$  ооцист в 1 мл (Anusz *et al.*, 1990; Robert *et al.*, 1990; Smith, 2008), т.е. эти методы не превосходят по чувствительности традиционные микроскопические методы и менее чувствительные, чем ИФМ. Однако твердофазный ИФА, выполняемый в формате микропланшета для титрования обладает преимуществом оптимизированного анализа большого количества образцов, тогда как ИХ может применяться вне лаборатории менее квалифицированным персоналом. Положительную реакцию следует подтвердить другим методом.

##### 2.3.5.1. Прямая иммунофлуоресцентная микроскопия (пИФМ)

Для пИФМ используют моноклональные антитела к *Cryptosporidium*, конъюгированные с флуоресцеин изотиоцианатом (FITC), которые распознают поверхностные эпитопы ооцист. Этот метод не позволяет различить разные виды *Cryptosporidium*. Вследствие эпифлуоресценции при использовании системы фильтров FITC меченые ооцисты обладают яркой яблочно-зеленой флуоресценцией. Материалы в составе коммерческих

---

<sup>19</sup> Для измерения предполагаемых ооцист медленно повышают напряжение (интенсивность света) светлопольного источника света для того, чтобы одновременно наблюдать флуоресцентное и светлопольное изображения. После этого можно измерить размер объекта, используя калиброванную оптическую сетку окуляра.

наборов варьируют, но могут включать положительный и отрицательный контроль ооцист *C. parvum*, меченое FITC моноклональное антитело к *Cryptosporidium* (в рабочем разведении, не оправдывающее экономию средств на разведение) и среда для заливки на основе глицерина, содержащая ингибитор обесцвечивания светом.

Каждый раз при выполнении этой процедуры следует включить в серию образцов стекла с положительным и отрицательным контрольными образцами (которые обычно входят в набор). Ооцисты *Cryptosporidium parvum* можно приобрести у коммерческих поставщиков, в диагностических ветеринарных лабораториях или исследовательских организациях.

После окрашивания и заливки стекол, выполняемых в соответствии с инструкциями производителя, препарат ооцист сканируют под эпифлуоресцентным микроскопом, оснащенным FITC-фильтрами (максимальная длина волны возбуждения 490 нм, средняя длина волны излучения 530 нм) при использовании объектива с 20-кратным увеличением и подтверждают при использовании объектива с 40-кратным увеличением. Для измерения ооцист используют объектив со 100-кратным увеличением.<sup>18</sup> При необходимости предметные стекла до изучения можно хранить при комнатной температуре, в темноте.

Ооцисты *Cryptosporidium* представляют собой округлые или несколько яйцевидные объекты, обладающие яркой флуоресценцией яблочно-зеленого цвета при использовании набора фильтров FITC. Размеры ооцист (измеренная длина × ширина) показаны в Таблице 1. Часто наблюдается повышенная интенсивность флуоресценции вокруг полной окружности ооцисты при отсутствии видимых разрывов в окрашивании стенки ооцисты. Если в диагностический набор включен краситель синий Эванса, уменьшающий интенсивность неспецифичной флуоресценции, то фоновая флуоресценция будет красной. Если в качестве контрастного красителя включен DAPI, то ядро будет флуоресцировать синим цветом. Неспецифичная флуоресценция имеет желтый цвет. Следует всегда сравнивать результаты с положительным контрольным образцом, чтобы убедиться в соответствии размера, формы и цвета предполагаемой ооцисты параметрам положительного контроля.

Результаты представляют таким же образом, как при использовании традиционных микроскопических методов (см. выше). Может быть указана численность, соответствующая идентифицированной ранее.

#### **2.3.5.2. Детекция антигенов *Cryptosporidium* методом твердофазного иммуоферментного анализа (твердофазного ИФА)**

При применении твердофазного ИФА ведется поиск растворимых антигенов *Cryptosporidium* в фекалиях (копроантигена). В зависимости от используемого коммерческого набора для захвата и детекции копроантигенов *Cryptosporidium* применяются разные смеси моноклональных и поликлональных антител.

В состав коммерческих наборов для детекции антигена с помощью сэндвич-метода твердофазного ИФА входят ряды лунок, покрытых антителами к *Cryptosporidium*, для захвата копроантигенов *Cryptosporidium*, антитела к *Cryptosporidium* для развития реакции, конъюгированных с ферментом (которым часто является пероксидаза хрена), субстрат, система хромоген/субстрат и стоп-реактив (подавляющий дальнейший ферментативный катализ при добавлении в реакцию смесь). Эти наборы были разработаны для обнаружения антигенов *C. parvum* в образцах фекалий, но позволяют также обнаруживать общие эпитопы, когда инфекция вызвана другими видами рода *Cryptosporidium*. В коммерческие наборы включены положительные и отрицательные образцы. Обычно в состав коммерческих наборов входят все необходимые реактивы для проведения анализа и инструкции производителя, которые следует соблюдать. Разбавление реактивов в составе



набора с целью повышения потенциального количества анализов является мнимой экономией. В набор обычно включено полное описание методики и формула для расчета порогового значения и присвоения образцам позитивного или негативного статуса. Как правило, между анализами реактивы набора следует хранить при температуре 4°C. Перед использованием все реактивы должны согреться до комнатной температуры. Аналитик обязан определять наличие потенциальных противопоказаний к применению коммерческого набора и фиксаторов для фекалий/образцов. Из-за различия методов, описанных применительно к разным коммерческим наборам, в данную главу не включено описание методов твердофазного ИФА или ИХ, применяемых для детекции копроантигена.

Заключение по негативным реакциям должно быть следующим: «Антиген *Cryptosporidium* НЕ обнаружен».

Заключение по позитивным реакциям должно быть следующим: «Обнаружен антиген *Cryptosporidium*».

Рекомендуется подтверждать позитивные реакции методом, имеющим равные или более высокие чувствительность и специфичность, например, пИФМ или ПЦР.

### **2.3.5.3. Детекция антигенов *Cryptosporidium* методом иммунохроматографии**

В отличие от механизма молекулярной диффузии, определяющей скорость связывания антигена антителом при твердофазном ИФА, во время которого продолжительность каждой реакции составляет приблизительно 1 час, при горизонтальном иммунохроматографическом анализе скорость связывания антигена с захватывающим антителом, иммобилизованным на твердой фазе, повышается благодаря капиллярному всасыванию. Этот эффект приводит к быстрому просачиванию всех жидкостей через мембрану, заключенную в иммунохроматографической кассете и к сокращению требуемого для анализа времени от часов до минут или секунд. Присутствующие в исследуемом образце растворимые антигены *Cryptosporidium* просачиваются через мембрану, контактируют с иммобилизованными антителами к антигенам *Cryptosporidium* и связываются с этими антителами, благодаря чему резко ускоряется взаимодействие между антигеном и антителом. Положительные реакции являются качественными и наблюдаются в виде окрашенной полосы, имеющей специфичное расположение на мембране, которые обычно идентифицируют линией на кассете. Формат анализа, предлагаемого разными коммерческими наборами может варьировать. Аналитик обязан во всех случаях определять потенциальные противопоказания к использованию имеющегося коммерческого набора и фиксаторов.

ИХ – удобный и быстрый метод обнаружения *Cryptosporidium* в образцах фекалий, несмотря на описанные ложноположительные реакции, из-за которых положительные реакции следует подтверждать другим методом. Чувствительность иммунохроматографии ниже чувствительности твердофазного ИФА, и пИФМ и ПЦР.

Заключение по негативным реакциям должно быть следующим: «Антиген *Cryptosporidium* НЕ обнаружен».

Заключение по позитивным реакциям должно быть следующим: «Обнаружен антиген *Cryptosporidium*». Рекомендуется подтверждать позитивные реакции методом, имеющим равные или более высокие чувствительность и специфичность, например, пИФМ или ПЦР, и включать полученные результаты в отчет.

### 2.3.6. Методы распознавания нуклеиновых кислот

ПЦР обладает повышенной диагностической чувствительностью по сравнению с микроскопией и иммунологическими анализами применительно к обнаружению *Cryptosporidium* в фекалиях (de Waele *et al.*, 2011). Мишенью является находящаяся в ооцистах ДНК спорозойта. Указанная в сообщениях чувствительность опубликованных методов ПЦР варьирует от 1 до  $10^6$  ооцист в зависимости от количества копий гена-мишени, степени разрушения ооциста, экстракции ДНК, реактивов для амплификации и детекции, методик и платформ.

В фекальных образцах могут содержаться многочисленные ингибиторы ПЦР. Важными ингибиторами являются билирубин, соли желчных кислот и сложные полисахариды. Степень ингибирования можно снизить кипячением фекальных образцов в 10% растворе поливинилпирролидона (ПВП) перед экстракцией, но эта мера может не потребоваться, если использовать нейтрализацию во время экстракции ДНК (например, на спин-колонках) или при проведении ПЦР (включая бычий сывороточный альбумин или соответствующий мастер-микс). Перед экстракцией ДНК фекалии или частично очищенные ооцисты, хранящиеся в равном объеме 5%  $K_2Cr_2O_7$  и предназначенные для ПЦР, следует отмыть в деионизированной воде, чтобы удалить остаточный консервант. Применительно к находящимся в суспензии ооцистам, серия из трех отмывок, после каждой из которых выполняют центрифугирование (при 1100 g в течение 10 минут), удаление надосадочной жидкости и ресуспендирование осадка деионизированной воде, позволяют минимизировать ингибирование ПЦР.

Стандартный метод разрушения ооцист и экстракции ДНК спорозойта *Cryptosporidium* отсутствует. Экстракция ДНК *Cryptosporidium* может быть выполнена либо после частичной очистки ооцистов при использовании одного из описанных выше методов флотации/седиментации, или непосредственно из находящихся в фекалиях ооцистов. Если применяемым в лаборатории рутинным методом является концентрирование седиментацией в формолэтилацетате, то концентрат ооцист, пригодный для лизиса и амплификации методом ПЦР, может быть получен при промывании осадка посредством центрифугирования в деионизированной воде. Для разрушения ооцист можно использовать следующие подходы: обработку гранулами, циклы замораживания-оттаивания, нагревание или обработку химическими/ферментативными препаратами (Elwin *et al.*, 2012). Варианты последующей экстракции ДНК основаны на использовании коммерческих спин-колонок, микропористого стекла и смолы «Килекс».

Следует уделить особое внимание выбору праймера для ПЦР, поскольку некоторые из них являются родоспецифичными, тогда как другие праймеры видоспецифичны. Для детекции и идентификации *Cryptosporidium parvum* и других отдельных видов применяются валидированные методы ПЦР в реальном времени с использованием гидролизуемого зонда (De Waele *et al.*, 2011).

Расширяется доступность коммерческих наборов для обычной или мультиплексной ПЦР для детекции обширных панелей желудочно-кишечных патогенов (в том числе, для применения в ветеринарии), в которых использованы роботизированные платформы для экстракции ДНК, организации анализа и детекции ампликона. Панели патогенов должны идеально соответствовать присутствующим в исследуемой популяции. Включенными локусами при проведении таких анализов являются гены малой субъединицы рРНК и белка стенки ооцисты *Cryptosporidium* (COWP).

### 2.3.7 Обнаружение ооцист в питьевой воде и продуктах питания

Существуют стандартные методы обнаружения ооцист *Cryptosporidium* в питьевой воде (например, методы, разработанные Международной организацией по стандартизации

[2006], Агентством по окружающей среде [2010], Агентством охраны окружающей среды [2012]), которые основаны на высокообъемном фильтровании, элюции, концентрировании, иммуномагнитной сепарации и ИФМ. В настоящее время Международная организация по стандартизации разрабатывает стандартный метод обнаружения *Cryptosporidium* в зеленолистных овощах и ягодах.

### **2.3.8. Типирование и субтипирование с целью отслеживания заболевания и патогенного источника**

При исследовании передачи возбудителя, идентификации источников инфекции и отдельных факторов риска специалисты или референтные лаборатории обычно используют молекулярные методы, позволяющие различать виды и более узкие группы в пределах вида.

Общепризнанным эталонным подходом к идентификации видов является метод секвенирования ДНК, основанный на использовании гена малой субъединицы рРНК *Cryptosporidium* и праймеров Xiao/Jiang (Xiao & Ryan, 2008), поскольку, например, методика полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) позволяет идентифицировать не все виды или генотипы *Cryptosporidium*; однако большинство видов, представляющих коммерческое значение для сельскохозяйственных животных, можно идентифицировать методом ПЦР-ПДРФ, используя праймеры VspI и SspI (Xiao & Ryan, 2008). При работе с образцами КРС для различения *C. andersoni* и *C. muris* может быть включен праймер *Ddel*, и для различения *C. parvum*, *C. bovis* и *C. ryanae* может быть включен праймер *MboII* (Feng *et al.*, 2007). При работе с образцами воды или образцами объектов окружающей среды, в которых могут присутствовать любые виды или генотипы, необходимо секвенировать ампликон. Последние исследования подтверждают целесообразность использования маркеров мини- или микросателлитной ДНК при изучении структуры популяции *Cryptosporidium*, однако требуется гармонизировать весь метод полностью от выбора маркеров до алгоритмов анализа (Widmer & Caccio, 2015).

### **3. Серологические реакции**

Большинство анализов антител к *Cryptosporidium* основаны на использовании твердофазного ИФА с разнообразными водными экстрактами нативных антигенов (например, Hill *et al.*, 1990) или рекомбинантных белков (например, Priest *et al.*, 2006), полученных из ооцист *C. parvum*. Эти методы иногда находят применение при эпидемиологическом надзоре, однако полученные результаты следует интерпретировать с осторожностью, поскольку методы не были полностью валидированы.

## **С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ**

Серийно выпускаемые или прошедшие строгую проверку вакцины против криптоспоридиоза отсутствуют.

## **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

\* \* \*

ADL S.M., SIMPSON A.G., LANE C.E., LUKEŠ J., BASS D., BOWSER S.S., BROWN M.W., BURKI F., DUNTHORN M., HAMPL V., HEISS A., HOPPENRATH M., LARA E., LE GALL L., LYNN D.H., MCMANUS H., MITCHELL E.A., MOZLEY-STANRIDGE S.E., PARFREY L.W., PAWLOWSKI J., RUECKERT S., SHADWICK R.S., SCHOCH C.L., SMIRNOV A. & SPIEGEL F.W. (2012). The revised classification of Eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **59**, 429–493.

- ANUSZ K.Z., MASON P.H., RIGGS M.W. & PERRYMAN L.E. (1990). Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in bovine feces by monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 2770–2774.
- BORAD A. & WARD H. (2010). Human immune responses in cryptosporidiosis. *Future Microbiol.*, **5**, 507–519.
- CASEMORE D.P. (1991). Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. ACP Broadsheet 128: June 1991. *J. Clin. Pathol.*, **44**, 445–451.
- CHALMERS R.M. & DAVIES A.P. (2010). Mini review: clinical cryptosporidiosis. *Exp. Parasitol.*, **124**, 138–146
- CHALMERS R.M. & KATZER F. (2013). Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends Parasitol.*, **29** (5), 237–251.
- CURRENT W.L. (1997). Cryptosporidiosis. In: Diseases of Poultry, Tenth Edition, Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L. R. & Saif Y.M. eds. Mosby-Woolfe, Mosby International, London, UK, 883–890.
- DE WAELE V., BERZANO M., BERKVENNS D., SPEYBROECK N., LOWERY C., MULCAHY G.M. & MURPHY T.M. (2011). Age-stratified Bayesian analysis to estimate sensitivity and specificity of four diagnostic tests for detection of *Cryptosporidium* oocysts in neonatal calves. *J. Clin. Microbiol.*, **49**, 76–84.
- ELWIN K., ROBINSON G., HADFIELD S.J., FAIRCLOUGH H.V., ITURRIZA-GÓMARA M. & CHALMERS R.M. (2012). A comparison of two approaches to extracting *Cryptosporidium* DNA from human stools as measured by a real-time PCR assay. *J. Microbiol. Methods* **89**, 38–40.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA) (OF THE UNITED STATES OF AMERICA) (2012) Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. EPA, Office of Water, USA.
- FAYER R. (2010). Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.*, **124**, 90–97.
- FENG Y., ORTEGA Y., HE G., DAS P., ZHANG X., FAYER R., GATEI W., CAMA V. & XIAO L. (2007). Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Vet. Parasitol.*, **144**, 1–9.
- FLORES J. & OKHUYSEN P.C. (2009). Host factors – genetics of susceptibility to infection with enteric pathogens. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **22**, 471–476.
- GABOR L.J., SRIVASTAVA M., TITMARSH J., DENNIS M., GABOR M. & LANDOS M. (2011). Cryptosporidiosis in intensively reared barramundi (*Lates calcarier*). *J. Vet. Daign. Invest.*, **23**, 383–386.
- HILL B.D., BLEWETT D.A., DAWSON A.M. & WRIGHT S.E. (1990). Analysis of the kinetics, isotype and specificity of serum and coproantibody in lambs infected with *Cryptosporidium parvum*. *Res. Vet. Sci.*, **48**, 76–81.

INTERNATIONAL AIR TRANSPORT ASSOCIATION (2003). Dangerous Goods Regulations, 44th Edition. International Air Transport Association, 800 Place Victoria, P.O. Box 113, Montreal, Quebec H4Z 1M1, Canada, 815 pp.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) (2006). ISO 15553:2006 Water quality – Isolation and identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. ISO, Geneva, Switzerland.

KOTLOFF K.L., NATARO J.P., BLACKWELDER W.C., NASRIN D., FARAG T.H., PANCHALINGAM S., WU Y., SOW S.O., SUR D., BREIMAN R.F., FARUQUE A.S., ZAIDI A.K., SAHA D., ALONSO P.L., TAMBOURA B., SANOGO D, ONWUCHEKWA U., MANNA B., RAMAMURTHY T., KANUNGO S., OCHIENG J.B., OMORE R., OUNDO J.O., HOSSAIN A., DAS S.K., AHMED S., QURESHI S., QUADRI F., ADEGBOLA R.A., ANTONIO M., HOSSAIN M.J., AKINSOLA A., MANDOMANDO I., NHAMPOSSA T., ACÁCIO S., BISWAS K., O'REILLY C.E., MINTZ E.D., BERKELEY L.Y., MUHSEN K., SOMMERFELT H., ROBINS-BROWNE R.M. & LEVINE M.M. (2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*, **382**, 209–222.

LORENZ I., FAGAN J. & MORE S.J. (2011). Calf health from birth to weaning. II. Management of diarrhoea in pre-weaned calves. *Ir. Vet. J.*, **64**, 9.

PRIEST J.W., BERN C., XIAO L., ROBERTS J.M., KWON J.P., LESCANO A.G., CHECKLEY W., CABRERA L., MOSS D.M., ARROWOOD M.J., STERLING C.R., GILMAN R.H. & LAMMIE P.J. (2006). Longitudinal analysis of *Cryptosporidium* species-specific immunoglobulin G antibody responses in Peruvian children. *Clin. Vaccine Immunol.*, **13**, 123–131.

RYAN U. (2010). *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. *Exp Parasitol.*, **124**, 113–120.

SANTÍN M. (2013). Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. *N.Z. Vet. J.* **61**, 1–10.

SMITH H.V. (2008). Diagnostics. *In: Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, Second Edition, Fayer R. & Xiao L. eds. CRC Press and IWA Publishing, Boca Raton, Florida, USA, 173–208.

STURDEE A.P., CHALMERS R.M. & BULL S.A. (1999). Detection of *Cryptosporidium* oocysts in wild mammals of mainland Britain *Vet. Parasitol.*, **80**, 273–280.

THE ENVIRONMENT AGENCY (2010). The Microbiology of Drinking Water (2010) – Part 14: Methods for the isolation, identification and enumeration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. The Environment Agency, Bristol, UK.

WIDMER G. & CACCIO S.M. (2015). A comparison of sequence and length polymorphism for genotyping cryptosporidium isolates. *Parasitology*, Apr 20, 1–6. [Epub ahead of print]

XIAO L. (2010). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Exp. Parasitol.* **124**, 80–89.

XIAO L., FAYER R., RYAN U. & UPTON S.J. (2004). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.*, **17**, 72–97.

XIAO L. & RYAN U.M. (2008). Molecular epidemiology. *In: Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, Second Edition, Fayer R. & Xiao L. eds. CRC Press and IWA Publishing, Boca Raton, Florida, USA, 387–410.

YANG, Y-L. BUCK G.A. & WIDMER G. (2010). Cell sorting-assisted microarray profiling of host cell response to *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* **78**, 1040–1048.