

ТОКСОПЛАЗМОЗ

РЕЗЮМЕ

Описание заболевания: Токсоплазмоз – это зоонозная инфекция животных, возбудителем которой является простейший паразит *Toxoplasma gondii*. Инфекция может поражать всех теплокровных животных и, хотя она не вызывает развития клинических заболеваний у большинства видов животных, в некоторых случаях эта инфекция может стать причиной развития острого опасного для жизни заболевания, а у других видов, в частности, овец и коз, может проявлять себя как болезнь беременности, во время которой возбудитель размножается в плаценте и эмбрионе. У последних животных это может привести к выкидышу или рождению ослабленных ягнят/козлят, а также может сопровождаться развитием синдрома мумифицированного плода. Характерным для подобных случаев является то, что состояние плацентарных межкотиледонных оболочек может соответствовать норме, в то время как на котиледонах могут быть обнаружены белые очаги некротических поражений диаметром приблизительно 1–3 мм. Под микроскопом эти очаги выглядят как области коагуляционного некроза, которые практически не имеют признаков воспаления. Воспаление, в случае его наличия, является безгнойным. Трофозоиты токсоплазмы могут быть обнаружены в редких случаях, связанных с образованием указанных очагов, обычно на периферии области поражения. При исследовании мозга может быть выявлен фокальный микроглиоз. Часто очаги поражения имеют небольшую некротическую точку в центре, которая может минерализоваться. Также, по причине аноксии, возникающей в связи с патологией плаценты, в белом веществе мозга часто присутствует фокальная лейкомаляция. Фокальный микроглиоз является более специфическим нарушением, поскольку лейкомаляция отражает наличие поражения плаценты, но может возникать и при развитии других паталогических состояний, при которых поражается также плацента, включая, хотя и редко, хламидиоз овец. Наличие инфекции у свиней может приводить к гибели плода у беременных свиноматок, однако чаще болезнь протекает в легкой и бессимптомной форме. Инфекция в острых формах поражает обезьян Нового Света, сумчатых и представителей некоторых других видов.

Идентификация возбудителя болезни: *Toxoplasma gondii* – это облигатный внутриклеточный паразит, проходящий фазу полового размножения в организме кошачьих и двухэтапную фазу бесполого размножения в организме всех теплокровных животных. В большинстве своем он имеет три молекулярных линии (I, II и III). В острой фазе заражения трофозоиты токсоплазмы размножаются в клетках, что приводит к разрушению тканей различной степени тяжести и, в случае смерти хозяина, трофозоиты могут быть обнаружены в асцитической жидкости или в мазках-отпечатках легких. При возникновении иммунного ответа трофозоиты трансформируются в брадизоитов, которые медленно размножаются в клетках, провоцируя образование тканевых цист. В случае выкидыша у овец, коз и свиней *T. gondii* зачастую сложно обнаружить в тканевых срезах, однако вероятность их обнаружения в срезах головного мозга и плаценты гораздо выше. Идентичность паразита может быть подтверждена методом иммуногистохимического исследования, в то время как полимеразная цепная реакция может использоваться для идентификации ДНК паразита в тканях. Выделение *T. gondii* из образцов является дорогостоящей и длительной процедурой, однако, в случае необходимости, оно наиболее эффективно осуществляется путем инокуляции мышам гомогената ткани, полученной из мозга плода или плаценты.

Половая фаза размножения паразита протекает исключительно в эпителиальных клетках кишечника кошачьих и может являться причиной экскреции большого числа ооцист вместе с экскрементами. Ооцисты могут сохранять жизнеспособность в окружающей среде на протяжении многих месяцев.

Серологические реакции:

Реакция с красителем является традиционным методом серологического исследования, во многих отношениях выступающим в качестве «золотого стандарта», по крайней мере, для людей. В реакции с красителем используются живые вирулентные трофозоиты токсоплазмы, комплементоподобный «вспомогательный фактор» и тест-сыворотка. Когда специфическое антитело воздействует на трофозоиты, последние не окрашиваются равномерно метиленовым синим со щелочью. Было установлено, что данный тест является ненадежным для некоторых видов. Кроме того, по причине использования живой токсоплазмы, данное испытание представляет потенциальный риск заражения людей, а также является дорогостоящим методом. Реакция с красителем применяется только в нескольких лабораториях во всем мире. Непрямая реакция флюоресцирующих антител (НРФА) является более безопасным методом, дающим титры, сопоставимые с титрами реакции с красителем, и может использоваться для дифференциации антител к иммуноглобулину М и антител к иммуноглобулину G. Прямая реакция агглютинации и реакция латекс-агглютинации являются относительно быстрыми методами исследования, не требующими использования сложного лабораторного оборудования. Твердофазный иммуноферментный анализ требует использования более сложного лабораторного оборудования, но позволяет обрабатывать большое число образцов и не нуждается в интерпретации людьми для установления результата.

Требования к вакцинам: Вакцина, состоящая из живых трофозоитов *T. gondii* доступна на рынке некоторых европейских стран и Новой Зеландии и применяется для иммунизации овец. Вакцина поставляется в форме концентрированной суспензии трофозоитов вместе с одобренным для использования дилуентом и системой доставки. Любые манипуляции с вакциной должны выполняться строго в соответствии с инструкциями производителей, поскольку вакцина имеет очень короткий срок годности.

А. ВВЕДЕНИЕ

Toxoplasma gondii – это зоонозный облигатный внутриклеточный простейший паразит, который может поражать всех теплокровных животных, включая птиц. Хотя инфекция не вызывает развития клинических заболеваний у большинства видов животных, в некоторых случаях эта инфекция может стать причиной развития острого опасного для жизни заболевания, а у других видов, в частности, овец и коз, а также у свиней, может проявлять себя как болезнь беременности, во время которой возбудитель размножается в плаценте и эмбрионе. Случаи острого потенциально смертельного заражения отмечались у обезьян Нового Света (Cunningham *et al.*, 1992), сумчатых (Canfield *et al.*, 1990) и некоторых других животных (см. ниже). Сообщения о развитии клинической и субклинической (бессимптомной) инфекции у домашних и диких животных во всех странах мира были собраны в двух книгах (Dubey, 2010; Dubey & Beattie, 1988). В случаях острого заболевания клинические симптомы могут включать в себя лимфаденопатию, гепатомегалию, интерстициальную пневмонию и признаки расстройства или поражения нервной системы. Во время патологоанатомического исследования может быть установлено, что лимфатические узлы, селезенка и печень увеличены в размере, при этом, на печени могут иметься бледные очаги поражения. У овец, коз и свиней первичная инфекция, наличие которой установлено во время беременности, может стать причиной вероятного бесплодия, а также мертворождения и выкидышей, в зависимости от стадии

беременности, на которой произошло заражение. В типичных случаях выкидышей у овцы или самки оленя, зараженной на средних сроках беременности, на несколько дней раньше установленного срока окончания беременности рождается мертвый ягненок/оленок. Абортрованный плод часто рождается вместе со вторым ослабленным или «мумифицированным» плодом (Vuxton, 2000). Состояние овцы/самки оленя с клинической точки зрения остается нормальным. В подобных случаях котиледоны плаценты обычно покрыты очаговыми поражениями белого цвета диаметром около 2–3 мм, в то время как внешний вид межкотиледонных оболочек остается нормальным. Заражение на ранних сроках беременности, когда плод имеет лишь зачаточную иммунную систему, приводит к гибели плода и резорбции. Это может привести к бесплодию матери, которое, в свою очередь, может имитировать проблему бесплодия в стаде. Матери, зараженные на поздних сроках беременности, обычно воспроизводят на свет инфицированное, но клинически нормальное потомство. После заражения во время беременности или в срок, выходящий за пределы срока беременности, паразит, как правило, не вызывает выкидышей во время любых последующих беременностей. Хотя последние исследования ставят данный вывод под вопрос (Duncanson *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2005), большинство ученых сегодня склоняется к тому, что рецидив хронической инфекции во время беременности, ведущей к повторным выкидышам, в норме не является распространенным явлением (Dubey, 2010; Rodger *et al.*, 2006). У зараженных свиней инфекция может стать причиной гибели плода беременных свиноматок, однако в современных условиях интенсивного животноводства, когда риск заражения помещений для содержания животных и их корма ооцистами *T. gondii* минимален или полностью исключен, общее число случаев заражения является крайне низким, и инфекция провоцирует лишь развитие легких проявлений или протекает бессимптомно (Lind & Vuxton, 2000). Тем не менее, во время нахождения свиней за пределами помещений и при попадании их в среду других систем интенсивного хозяйствования, вероятность их заражения ооцистами значительно возрастает, и, таким образом, случаи развития инфекции могут быть гораздо более частыми (Dubey, 2010; Kijlstra *et al.*, 2004).

Toxoplasma gondii – это облигатный внутриклеточный паразит, проходящий двухэтапную фазу бесполого размножения в организме теплокровных животных и фазу полового размножения в организме кошачьих. Паразит имеет, главным образом, три генетические линии (I, II и III). При этом линии II и III связаны с болезнью животных, в то время как тип I является преобладающей формой паразита, обнаруживаемого у зараженных людей (Howe & Sibley, 1995; Khan *et al.*, 2006). Фаза бесполого размножения включает в себя две стадии: стадию быстрого размножения трофозоитов и стадию медленного размножения брадизоитов. В случае развития острой инфекции трофозоиты активно проникают в клетки-хозяева, где они размножаются, приводя к разрушению клеток и высвобождению организмов локально и в кровяное русло. Поскольку у хозяина вырабатывается иммунитет, паразит сохраняет свой общий размер и свою форму, но трансформируется в брадизоита и продолжает размножаться медленнее в тканевых цистах, в результате чего инфекция переходит в хроническую стадию. Эти микроскопические тканевые цисты наиболее часто образуются в головном мозге и в скелетных мышцах, представляя собой неактивную стадию развития паразита в организме хозяина. Жизнеспособные тканевые цисты в мышцах являются значимым источником заражения человека. У животных с острой инфекцией трофозоиты могут быть обнаружены в асцитической жидкости или в мазках-отпечатках легких, а также в тканевых срезах печени и других пораженных органов.

Фаза полового размножения паразита протекает в энтероэпителиальных клетках окончательного хозяина, относящегося к семейству кошачьих, результатом чего становится производство ооцист *токсоплазмы*. Вслед за развитием первичной инфекции у кошки ооцисты могут выделяться в окружающую среду вместе с экскрементами в течение нескольких дней. Ооцисты спорулируют в окружающей среде на протяжении

последующих 1–5 дней (в зависимости от степени проветриваемости, уровня влажности воздуха и температуры окружающей среды), становясь в этот период заразными. Они являются очень устойчивыми к воздействию факторов окружающей среды и могут оставаться заразными в течение одного года и более. Спорулирующие ооцисты имеют диаметр 11×13 мкм, и каждая из них содержит четыре спорозоида в каждой из двух спороцист (Dubey & Beattie, 1988). Когда восприимчивое животное проглатывает спорулирующие ооцисты, спорозоиды высвобождаются, проникая в оболочку кишечника, где трансформируются в трофозоиды и способствуют развитию инфекции.

У овец, коз, свиней, лошадей и людей тканевые цисты могут сохраняться на протяжении всей жизни (Dubey & Beattie, 1988). *Токсоплазма* обычно не вызывает клинического заболевания у крупного рогатого скота, представителей семейства верблюдовых и оленей, однако, как отмечается, может стать причиной развития смертельной болезни у обезьян Нового Света, сумчатых и некоторых других животных, включая зайцевых (*Lepus europaeus*; *L. timidus*) (Gustafsson & Uggla, 1994), манулов (Brown *et al.*, 2005), песцов (Sørensen *et al.*, 2005), некоторых птиц и морских млекопитающих (Dubey, 2010). Предполагается, что эти и другие аналогичным образом пораженные животные подвергались минимальному воздействию *T. gondii* в своей естественной среде обитания на протяжении многих поколений, что сделало их чрезвычайно уязвимыми к воздействию на организм этого паразита.

Выкидыши у овец и коз, вызываемые деятельностью *T. gondii*, следует отличать от выкидышей, вызываемых возбудителями других инфекционных болезней, включая *Chlamydomphila abortus* (см. главу 2.7.6. *Энзоотические выкидыши у овец*), *Coxiella burnetii* (см. главу 2.1.16. *Австралийская лихорадка Q*), *Brucella melitensis* (см. главу 2.1.4. *Бруцеллез* [*Brucella abortus*, *B. melitensis* и *B. suis*]), *Campylobacter fetus fetus* (см. главу 2.4.4. *Генитальный кампилобактериоз коров*), *Salmonella* (см. главу 2.9.8. *Сальмонеллез*), вирус пограничной болезни овец (см. главу 2.7.1. *Пограничная болезнь овец*) и вирусы, вызывающие инфекционную катаральную лихорадку овец, болезнь Весселсброн и болезнь Акабане. У свиней вирус *Brucella suis* (см. главу 2.1.4) также может вызывать гибель плода, мумификацию плода и выкидыш.

1. Опасность для здоровья людей

Toxoplasma gondii легко поражает людей. В то время как заражение людей паразитом можно считать относительно распространенным явлением (приблизительно 30% от популяции, в зависимости от возраста и среды), клиническая форма болезни развивается относительно редко. В группу риска развития клинической болезни входят беременные женщины, поскольку паразит может представлять серьезную опасность для неродившегося ребенка, если мать становится инфицированной в первый раз во время беременности, лица с подавленным иммунитетом, такие как пациенты, которым проведена трансплантация, ВИЧ-инфицированные лица, больные с определенными видами рака и больные, проходящие определенные курсы терапии рака. Эти лица подвергаются риску развития острой смертельно опасной инфекции, если не принимаются необходимые меры по лечению болезни. Более восприимчивыми к паразиту являются также лица очень молодого и очень пожилого возраста. В отдельных случаях у лиц без явно выраженного иммунодефицита может развиваться болезнь, характеризующаяся общим недомоганием, лихорадкой и лимфаденопатией. Наиболее вероятными источниками заражения людей являются употребляемое в пищу сырое или подвергнувшееся недостаточной термической обработке мясо, содержащее тканевые цисты живых *T. gondii*, употребляемые в пищу сырые или подвергнувшиеся недостаточной термической обработке овощи, зараженные ооцистами, а также сады и детские песочницы, которые могут быть заражены ооцистами в результате контакта с кошачьими экскрементами. Признанным фактом в настоящее время

является также то, что токсоплазмоз представляет собой зооноз, который может передаваться через воду (Dubey, 2010). Такой способ передачи возможен в тех случаях, когда проводимая очистка и обработка воды является неэффективной или несущественной при наличии достаточно крупной местной популяции кошачьих, заражающей ооцистами поверхностные воды (Bowie *et al.*, 1997; Dubey, 2004). В связи с этим, в настоящее время существует мнение, что заражение паразитом морских млекопитающих происходит посредством воды, попадающей в море из зараженной почвы, а также из неочищенных стоков городской канализации.

Все лабораторные манипуляции с живыми организмами должны выполняться с применением соответствующих мер предосторожности, определенных на основании анализа рисков, описанного в главе 1.1.4. *Биобезопасность и биосохранность: Стандарты управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и помещениях для содержания животных.*

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 1. Методы исследований, применяемые для диагностики токсоплазмоза и их назначение

| Метод | Цель | | | | | |
|---|---------------------------------|---|------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|---|
| | Отсутствие инфекции в популяции | Отсутствие инфекции у отдельных животных перед перемещением | Вклад в политику искоренения | Подтверждение клинических случаев | Надзор за распространением инфекции | Иммунный статус у отдельных животных или популяций после вакцинации |
| Идентификация возбудителя | | | | | | |
| ПЦР | нп | нп | нп | ++ | - | нп |
| Гистопатологическое исследование | нп | нп | нп | + | - | нп |
| Выявление иммунной реакции | | | | | | |
| НРФА | нп | нп | нп | ++ | ++ | нп |
| Твердофазный ИФА | нп | нп | нп | ++ | ++ | нп |
| ПРА/МРА | 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

ПЦР = полимеразная цепная реакция; НРФА = непрямая реакция флюоресцирующих антител;

твердофазный ИФА = твердофазный иммуноферментный анализ; ПРА = прямая реакция агглютинации; МРА = модифицированная реакция агглютинации

1. Идентификация возбудителя болезни

1.1. Гистопатологическое исследование

У животных, умерших от острого токсоплазмоза, в ряде тканей, включая ткани печени, сердца и легких, могут быть обнаружены признаки очагового мононуклеарного воспаления, сопровождающегося или не сопровождающегося фокальным некрозом. Последний может носить отечный характер. Лимфатические узлы могут быть увеличены. При этом они могут иметь признаки фокального некроза с гемorragиями или без них, или не иметь таковых. Обычно трофозоиты *токсоплазмы* обнаруживаются в связи с обнаружением признаков некроза и воспаления.

В случаях выкидышей и мертворождения у овец и коз пораженные котиледоны плаценты обычно имеют обширные очаги коагуляционного некроза, который со временем может минерализоваться. Любое сопутствующее воспаление можно охарактеризовать как легкое и безгнойное. На хорошо сохранных образцах котиледонов плаценты можно обнаружить признаки умеренной отечности мезенхимы эмбриональных ворсин с диффузным распространением и повышенным содержанием паренхиматозных клеток, связанным с наличием крупных мононуклеаров. Иногда можно обнаружить небольшое число внутриклеточных и внеклеточных токсоплазм, находящихся, как правило, на периферии области некроза или в ворсинах, что наблюдается на ранних стадиях развития инфекции. Трофозоиты *токсоплазмы* имеют овоидную форму при длине 2–6 мкм и содержат умеренно базофильные ядра, расположенные по центру или в районе заднего полюса.

В головном мозге плода могут развиваться первичные и вторичные поражения. Скопления микроглиальных клеток, обычно имеющих некротический и, в некоторых случаях, минерализованный центр, и часто связанных с наличием легкой формы лимфатического менингита, являются проявлением иммунного ответа плода, последовавшего за непосредственным повреждением, вызванным локальным размножением паразита. Тканевые цисты *токсоплазмы* обнаруживаются редко, как правило, на периферии этих очагов поражения. Фокальная лейкомаляция также является частой патологией. Считается, что ее развитие связано с аноксией плода на поздних сроках беременности, вызванной распространенными очаговыми поражениями в плаценте, препятствующими переносу достаточного количества кислорода от матери плоду. Очаги лейкомаляции в большинстве случаев возникают в ядрах белого вещества головного мозга, но иногда и в белом веществе мозжечка. Сама по себе фокальная лейкомаляция дает основание предполагать наличие плацентарной патологии или острой плацентарной недостаточности, однако наличие одновременно двух типов нейрпатологических изменений свидетельствует о заражении *токсоплазмой*. Идентичность структур, похожих на *T. gondii*, в тканевых срезах, полученных в случаях развития описываемой формы патологии, а также в случаях развития острого токсоплазмоза, может быть подтверждена путем иммуногистохимического исследования, позволяющего маркировать интактные *T. gondii* или остатки антигенов. Данный метод является, как удобным, так и чувствительным, и используется при исследовании фиксированных тканей (включая архивные образцы тканей), которые также могут показать степень распада в тех случаях, когда выполнение процедуры выделения является нецелесообразным или невозможным. Непрямой иммунопероксидазный АВС-метод и пероксидазно-антипероксидазный метод (ПАМ) (Uggla *et al.*, 1987) являются в равной степени эффективными. Имеется подробное описание процедуры исследования данными методами (Dubey, 2010).

1.2. Методы распознавания нуклеиновой кислоты

С целью обнаружения нуклеиновых кислот *T. gondii* было разработано несколько методов анализа, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР) (таблица 1). Основными областями-мишенями исследования являются повторяющаяся последовательность В1, элемент 529-bp копии 300, ген P30 (SAG1) и рибосомная РНК (рРНК) 18S (Burg *et al.*, 1989; Dubey, 2010; Ellis, 1998; Savva *et al.*, 1990). Чувствительность ПЦР зависит от

номера копии последовательности-мишени (P30: 1 копия; B1: 35 копий; pРНК: 110 единиц повтора). В продаже имеются изготавливаемые по заказу синтетические олигонуклеотиды ДНК (пример: www.sigma-genosys.co.uk). Недавно, с целью анализа материала хрусталика глаза пациентов с врожденной инфекционной катарактой, использовался метод амплификации повторяющейся последовательности B1 (Mahalakshima *et al.*, 2007). В результате, было установлено, что данный метод является более чувствительным, чем использовавшийся традиционный метод (твердофазный иммуноферментный анализ [твердофазный ИФА]). Несмотря на это, хотя ПЦР и является очень чувствительным методом, в тех случаях, когда он является единственным доступным методом исследования, необходимо позаботиться о возможности использования также других методов, поскольку во многих ситуациях более надежная диагностика возможна при использовании ПЦР в сочетании с данными других методов диагностики.

Недавно был разработан метод ПЦР в масштабе реального времени, который позволяет одновременно осуществлять количественный анализ и амплификацию ДНК. Данный метод, очень похожий на существующие методы ПЦР, может осуществляться с использованием 96-луночных микротитрационных планшетов. После каждого этапа амплификации флуорогенные красители интеркалируются в спираль двухцепочной ДНК, и результаты, отражаемые на участке амплификации, позволяют провести количественный анализ ДНК паразита в образце. Метод ПЦР в масштабе реального времени использовался с целью амплификации и количественного анализа ДНК гена B1 паразита *T. gondii* (Costa *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000). Данный количественный анализ ДНК паразита может использоваться для определения количества паразитов в тканях и жидкостях, таких как околоплодные воды пациентов с подозрением на наличие врожденной инфицированности паразитом *T. gondii*. (Nagy *et al.*, 2007). ПЦР в масштабе реального времени представляет собой высокочувствительный и специфический метод, хотя он является дорогостоящим, требует наличия специальных систем обнаружения и, таким образом, может считаться рентабельным только в случае его применения в лабораториях, в которых проводится анализ большого числа образцов.

Следующим методом является метод гнездовой ПЦР с амплификацией повторяющейся последовательности B1 ДНК (Wastling *et al.*, 1993). ДНК паразита может быть экстрагирована и очищена от различных тканей, включая ткани плаценты, центральной нервной системы, сердца и скелетных мышц.

Загрязняющие эритроциты, присутствующие в тканях, удаляются путем промывания образцов в 10 ммоль лизирующего буфера Трис/ NH_4Cl (рН 7,6), после чего образцы центрифугируются с центробежным ускорением 2000 *g* в течение 15 минут. После этого ДНК экстрагируется из образовавшегося в результате осадка и повторно взвешивается в 10 ммоль буфера Трис, (рН 8,3), 50 ммоль KCl , 1,5 ммоль MgCl_2 , содержащего протеиназу К в объеме 100 мкг/мл, и 0,5% полисорбата Твин 20.

Образцы инкубируются при температуре 55С в течение как минимум 1 часа, после чего протеиназа К инактивируется путем кипячения. ПЦР осуществляется в 50-мкл объемах. Амплификация гена B1 осуществляется посредством модификации процедуры, описанной в ссылке 1. Реакционная смесь содержит 10 ммоль Трис (рН 8,3), 2,5 ммоль MgCl_2 , 40 ммоль KCl , 0,01% желатина, 0,1 ммоль смеси дезоксинуклеотидов (dNTPs), 0,2 ммоль каждого праймера (олигонуклеотидные праймеры; Bowie *et al.*, 1997), два смысловых праймера P1 и P2 и два антисмысловых праймера P3 и P4), а также 2,5 единицы ДНК-полимеразы Taq.

Первичная амплификация выполняется с использованием праймеров 1 и 4, позволяющих получить продукт 193 бп, и имеет 25 циклов: при температуре 93°C – продолжительностью 1 минута, при температуре 50°C – продолжительностью 1,5 минуты и при температуре 72°C – продолжительностью 3 минуты. После этого амплифицированный продукт разводится в пропорции 1/20 в дистиллированной воде с целью снижения амплификации неспецифических продуктов.

Вторичная амплификация с использованием гнездовых праймеров 2 и 3 при идентичных условиях реакции имеет свыше 15 циклов, необходимых для получения продукта 94 бп. Визуальное исследование конечного продукта осуществляется на 1% агарозных гелях. Блоттинг по Саузерну с использованием меченого зонда может применяться для подтверждения идентичности продуктов ПЦР В1 и для отделения их от неспецифических продуктов.

1.3. Обнаружение ооцист в питьевой воде

Ооцисты паразита *Toxoplasma gondii* обнаруживались в питьевой воде с помощью метода обнаружения ооцист криптоспоридии (*Cryptosporidium*) (Issac-Renton *et al.*, 1998). Данный метод основан на сборе образцов воды большого объема и пропускании их через сменный (картриджный) фильтр. Идентификация ооцист токсоплазмы осуществлялась посредством заражения прививкой грызунов. Тем не менее, в отличие от криптоспоридии (*Cryptosporidium*), количество ооцист *T. gondii* в воде является очень низким.

С точки зрения опасности для здоровья людей необходимо отличать ооцисты паразита *T. gondii* от ооцист родственной токсоплазме кокцидии, *Hammondia hammondi*, которая также присутствует в кошачьих экскрементах. *Hammondia hammondi* не является патогенным организмом. Биологические анализы, в настоящее время являющиеся единственным однозначным методом обнаружения жизнеспособных ооцист упомянутых паразитов, являются дорогостоящими, и только в нескольких лабораториях мира имеется необходимое оборудование для их выполнения. Хотя обнаружение ДНК считается высоко специфическим методом исследования, отмечалась перекрестная реактивность (специфичность) между *T. gondii* и *H. hammondi*. Недавно были опубликованы праймеры, специфические для *H. hammondi* (Walzer *et al.*, 2014).

Выделение ДНК из ооцист *T. gondii* может порождать дополнительные проблемы, связанные с наличием ингибиторов в экскрементах и со сложностью высвобождения ДНК из ооцист. Ниже приводится подробное описание метода подготовки ооцист и экстракции ДНК.

1.3.1. Реактивы

- i) ФСБ: 300 ммоль NaCl, 2,7 ммоль KCl, 10 ммоль Na₂HPO₄, 1,7 ммоль NaH₂PO₄.
- ii) Гипохлорит натрия, водный раствор, ≥ 4% активного хлора.
- iii) Лизирующий буфер ООС (рН 9,5): 600 ммоль ЭДТК (этилендиаминтетрауксусной кислоты), 1,3% (объемное содержание) N-лауроилсаркозина, 2 мг/мл протеиназы К.
- iv) Буфер ООС-ЦТАБ: 2% (объемное содержание) цетилтриметиламмония бромид, 1,4 моль NaCl, 0,2% (объемное содержание) меркаптоэтанола, 20 ммоль ЭДТК, 100 ммоль трис(гидроксиметил)метиламина.

v) фенол/хлороформ/ изоамиловый спирт (25/24/1).

vi) 4 моль NaCl.

vii) 96% (объемное содержание) этанола I, 70% (объемное содержание) этанола.

1.3.2. Описание процедуры производства

i) Промойте ооцисты четыре раза путем центрифугирования (с центробежным ускорением 1100 g в течение 7 минут без использования тормоза) в 15 мл ФСБ в 15-мл пробирке для центрифугирования.

ii) Осуществляйте инкубацию осадка ооцист и оставшихся загрязняющих элементов (до 0,5 мл) в 2 мл 5,75% гипохлорита натрия (30 минут при температуре 37°C).

iii) Добавьте до 15 мл воды (H₂O) двойной дистилляции.

iv) Центрифугируйте надосадочную жидкость в 15-мл пробирке (с центробежным ускорением 1100 g в течение 7 минут без использования тормоза) и смешайте осадок с ФСБ. Трижды промойте осадок ФСБ (с центробежным ускорением 1100 g в течение 7 минут без использования тормоза).

v) По завершении последнего центрифугирования снова взвесьте осадок в 1 мл ФСБ, перелейте полученную суспензию в 1,5-мл реакционную пробирку и осадите путем центрифугирования (с центробежным ускорением 1100 g в течение 7 минут без использования тормоза).

vi) Осторожно удалите максимально возможное количество надосадочной жидкости и выполните три цикла заморозки-разморозки (10 минут при температуре -20°C, а затем 2 минуты при комнатной температуре) осадка.

vii) Снова взвесьте (суспендируйте) осадок в 100 мкл лизирующего буфера ООС (45 минут при температуре 65°C).

viii) Добавьте 400 мкл буфера ООС-ЦТАБ (60 минут при температуре 60°C).

ix) Смешайте с 500 мкл фенола/хлороформа/изоамилового спирта (25/24/1) путем 50-кратного переворачивания пробирки. Центрифугируйте в течение 7 минут с центробежным ускорением 13000 g.

x) Перелейте надосадочную жидкость в чистую пробирку и снова смешайте с 500 мкл фенола/хлороформа/изоамилового спирта (25/24/1) путем 50-кратного переворачивания пробирки. Центрифугируйте в течение 7 минут с центробежным ускорением 13000 g.

xi) Перелейте надосадочную жидкость в чистую пробирку и добавьте 0,04 объема 4 моль NaCl и 2–3 объема 96% (объемное содержание) этанола, охлажденного до температуры -20°C, чтобы осадить ДНК (выдерживайте как минимум 20–30 минут при температуре -20°C).

xii) Центрифугируйте в течение 15 минут с центробежным ускорением 13000 g. Процедите надосадочную жидкость.

xiii) Промойте осадок с помощью 70% (объемное содержание) этанола и центрифугируйте в течение 15 минут с центробежным ускорением 13000 *g*.

xiv) Удалите раствор этанола и выполните воздушную сушку осадка.

xv) Снова растворяйте ДНК в воде двойной дистилляции в течение как минимум 12 часов при температуре 4°C.

xvi) Используйте 2,5–10 мкл аликвот для ПЦР (см. раздел 1.2 выше).

2. Серологические реакции

Существует несколько серологических реакций для обнаружения антител к *T. gondii* (таблица 1). В случае использования одного типа реакций экспериментатор оценивает результат по цвету трофозоитов, изучаемых под микроскопом. К этому типу реакций относятся реакция с красителем (РК) и непрямая реакция флюоресцирующих антител (НРФА). Другой вид реакций основан на принципе агглютинации трофозоитов *токсоплазмы*, эритроцитов или частиц латекса. К данному виду относятся прямая реакция агглютинации (ПРА) и модифицированная реакция агглютинации (МРА), а также непрямая реакция гемагглютинации (НРГ) и реакция латекс-агглютинации (РЛА), соответственно. При использовании твердофазного ИФА степень изменения цвета позволяет определить количество специфических антител в растворе. Ниже описываются методы РК, НРФА, ПРА и твердофазного ИФА, а также приводится более подробное описание метода НРФА.

РК (Sabin & Feldman, 1948) является так называемым «золотым стандартом» серологических реакций на обнаружение антител к *токсоплазме* у человека. Живые трофозоиты *токсоплазмы* инкубируются с комплементоподобным вспомогательным фактором и тест-сывороткой при температуре 37°C в течение 1 часа перед добавлением метиленового синего. Специфические антитела влияют на проницаемость клеточных мембран паразита, способствуя вытеканию цитоплазмы, в результате чего трофозоиты не соединяются с красителем и, таким образом, выглядят бесцветными. Трофозоиты, не подвергшиеся воздействию специфического антитела (например, образца негативной сыворотки), соединяются с красителем и приобретают синюю окраску. РК является как специфическим, так и чувствительным методом для обнаружения антител у людей, но может быть ненадежным для других видов. Кроме того, данный метод потенциально опасен по причине использования живых паразитов. Он является дорогостоящим и требует наличия высокого уровня профессиональной компетентности. Следует отметить, что в соответствии с принципами гуманного обращения с животными, трофозоиты должны выращиваться в культуре клеток тканей, а не в брюшной полости мышей всегда, когда это возможно.

НРФА (Munday & Corbould, 1971) является простым и широко используемым методом. Цельные инактивированные трофозоиты *токсоплазмы* инкубируются вместе с разведенной тест-сывороткой с добавлением соответствующей антивидовой флюоресцирующей сыворотки, после чего результат исследуется с помощью флюоресцентного микроскопа. В продаже имеются помеченные флюоресцирующие антитела для различных видов животных. Данный метод является относительно недорогим, и комплекты для его применения имеются в продаже. Несмотря на это, метод требует наличия флюоресцентного микроскопа, а результаты оцениваются «на глаз», в связи с чем возможны различные интерпретации результатов. Также может возникнуть сложность с наличием некоторых вид-специфических конъюгатов, и существует риск

возможной перекрестной реактивности (перекрестной специфичности) с ревматоидным фактором и антинуклеарными антителами.

ПРА (Desmonts & Remington, 1980) является, как чувствительным, так и специфическим методом. Обработанные формалином трофозоиты *токсоплазмы* помещаются в лунки подковообразных микротитрационных планшетов, после чего в них добавляются разведенные тест-сыворотки. Положительные (позитивные) образцы вызовут реакцию агглютинации, которая может варьироваться по степени, в то время как отрицательные (негативные) образцы будут способствовать образованию «пуговицы» из осажденных трофозоитов на дне лунок. Данный метод является простым, хотя для его применения необходимо относительно большое количество антигенов. Комплекты для выполнения данного теста имеются в продаже. Во избежание ложноположительных реакций, связанных с наличием неспецифического иммуноглобулина М, важным условием является обработка сывороток меркаптоэтанолом. После модификации данная процедура была названа модифицированной реакцией агглютинации (МРА) (Dubey & Desmonts, 1987). МРА широко используется для обнаружения паразита *T. gondii* в сыворотках всех видов животных. Подробное описание этой процедуры приведено ниже. МРА может давать ложноотрицательные результаты на ранних стадиях заражения или в случае проведения исследования на сыворотках собаки. Еще одним доступным тестом, комплекты которого имеются в продаже, является реакция латекс-агглютинации (РЛА), однако данный метод исследования является относительно нечувствительным в сравнении с МРА или ИРФА.

В оригинальном твердофазном ИФА (Voller *et al.*, 1976) используется препарат из растворимого антигена, изготовленного из трофозоитов *токсоплазмы* штамма RH (в соответствии с приведенным ниже описанием) и послойно помещенного в лунки микротитрационного планшета. Далее добавляются тест-сыворотки (например, в соответствии с оригинальным методом, овечья сыворотка), после чего добавляется меченый ферментом антивидовой конъюгат, такой как конъюгат из антител к иммуноглобулину G овец, меченый пероксидазой хрена. Любые включенные в состав конъюгаты вызывают изменение цвета субстрата, что напрямую связано с количеством связанных антител, и результат такого изменения может быть прочтен с помощью спектрофотометра при коэффициенте поглощения, характерном для используемого субстрата. Данный анализ является простым, позволяет легко исследовать большое число образцов, и легко выполняется при выборе антивидового конъюгата. В продаже имеются необходимые антивидовые конъюгаты, субстраты и полные комплекты для проведения данного анализа. Тем не менее, данный метод исследования требует наличия спектрофотометра. Твердофазный ИФА хорошо подходит для лабораторий, которым необходимо проводить анализ большого числа образцов.

Недавно был разработан метод кинетического твердофазного ИФА (КТИФА) (Werre *et al.*, 2002). Система КТИФА позволяет измерять скорость реакции между связанным ферментом и раствором субстрата, ведущей к образованию цвета. Три оптические плотности (ОП) читаются с 45-секундными интервалами (с помощью программы управления данными КТИФА), а результаты выражаются в угловых коэффициентах. Корреляция между твердофазным ИФА и КТИФА является очень высокой, и, таким образом, два этих метода исследования представляют собой очень надежные инструменты диагностики, различающиеся только по степени удобства их применения.

С целью подтверждения специфичности традиционного твердофазного ИФА, были разработаны методы анализа с использованием рекомбинирующих антигенов (Johnson & Шана, 1991) и аффинно очищенных *токсоплазма*-специфических антигенов (Lekutis *et al.*, 2001), предназначенные для проведения исследования на материале овец (Sager *et al.*,

2003; Tenter *et al.*, 1992). Несмотря на это, данные методы анализа еще не используются регулярно.

С клинической точки зрения существует необходимость в различении недавних (острых) инфекций и длительных (хронических) инфекций. При обнаружении *токсоплазма*-специфических антигенов к иммуноглобулину G и иммуноглобулину M вместе с антигеном к иммуноглобулину A с помощью традиционного твердофазного ИФА существует вероятность игнорирования степени различий между острым и хроническим токсоплазмозом. Разработан метод анализа, позволяющий определять авидность антител IgG (иммуноглобулина G) к антигену P30 паразита *T. gondii* у овец. Результаты исследования свидетельствуют о повышении авидности в течение периода, равного 10 неделям после заражения (Sager *et al.*, 2003). Данный метод анализа является надежным инструментом диагностики, позволяющим отличать относительно длительные инфекции от недавних инфекций.

2.1. Приготовление антисыворотки и антигенов

В продаже доступны антисыворотки к *T. gondii* и конъюгированные антисыворотки для ИРФА и твердофазного ИФА, позволяющие проводить исследования на материале большого числа видов животных. Международных стандартов, касающихся сывороток животных, не существует.

Ниже приведены описания стандартных процедур приготовления антигена трофозоитов для его использования в исследованиях методами ИРФА и твердофазного ИФА. Трофозоиты могут выращиваться в культурах клеток тканей и сохраняться в форме цельных паразитов для проведения исследования методом ИРФА или подготавливаться в форме растворимого антигена для проведения твердофазного ИФА.

2.2. Приготовление аликвот из замороженных трофозоитов *T. gondii*

2.2.1. Методика

- i) В соответствии с приведенным описанием, культивируйте трофозоиты в культуре клеток тканей.
- ii) Центрифугируйте препарат с центробежным ускорением 500 g в течение 5 минут, после чего повторно взвесьте (суспендируйте) его в среде Дульбекко, модифицированной по способу Исков (СДМИ) приблизительно три раза.
- iii) Добавьте следующие растворы для получения соответствующих концентраций: 10% диметилсульфоксида, 20% нормальной лошадиной сыворотки (свободное антитело к *T. gondii*) и 70% ресуспендированных трофозоитов для получения окончательной концентрации, равной 1×10^8 трофозоитов/мл.
- iv) Дайте препарату отстояться на столе в течение 1 часа.
- v) Разделите препарат на 1-мл аликвоты с помощью пробирок с завинчивающимися крышками, подходящих для хранения жидкого азота.
- vi) Поместите пробирки в маленький контейнер, оберните его плотным изолирующим материалом и поместите в морозильную камеру, поддерживающую температуру -70°C , чтобы обеспечить постепенную заморозку трофозоитов.

vii) На следующий день переместите образцы в жидкий азот, обеспечивая надежную изоляцию в процессе их перемещения (переноса).

viii) В будущем такая консервированная (замороженная) культура может использоваться для инокуляции в организм мышей или для выращивания культуры клеток ткани паразита. В случае извлечения культуры из среды хранения быстро разморозьте культуру в теплой воде.

2.3. Выращивание трофозоитов токсоплазмы в культуре клеток ткани

2.3.1. Методика

i) *Toxoplasma gondii* может выращиваться, и ее рост может контролироваться в культуре клеток тканей путем пассажа паразита в культуру клеток почки африканской зеленой мартышки (клетки Vero) два раза в неделю.

ii) Клетки и паразиты выращиваются в СДМИ с добавлением 50 МЕ/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 2% сыворотки эмбриона телянка.

iii) Забор трофозоитов из лабораторных сосудов с культурой клеток ткани осуществляется путем соскребания монослоя клеток с помощью специального стерильного скребка для сбора клеток.

iv) Используя 25 см² лабораторные сосуды с вентиляционным отверстием для культур клеток тканей, в каждый из которых посеяны 1 × 10⁵ клеток Vero, добавьте трофозоиты в количестве двух трофозоитов на монослой клеток и осуществляйте их инкубацию при температуре 37°C в увлажнительной камере с содержанием 5% CO₂. Через 3–4 дня соберите образцы.

2.4. Выращивание цельных трофозоитов для их использования в исследовании методом ИРФА

2.4.1. Методика

i) Приготовьте суспензию концентрацией 4 × 10⁷/мл из трофозоитов *T. gondii* штамма RH в ФСБ.

ii) Добавьте формальдегид (40%), чтобы обеспечить окончательную концентрацию, равную 0,2% (объемное содержание).

iii) Осуществляйте инкубацию препарата при температуре 4°C в течение ночи, после чего разделите его на аликвоты, разлив в соответствующие герметичные пробирки с крышками/пробками, и храните в замороженном состоянии до момента использования.

2.5. Приготовление растворимых антигенов для твердофазного ИФА

2.5.1. Методика

i) Приготовьте суспензию из трофозоитов *T. gondii* штамма RH в ФСБ.

ii) Центрифугируйте суспензию с центробежным ускорением 2000 g в течение 15 минут; сохраните осадок и ресуспендируйте его в дистиллированной воде объемом, в девять раз превышающем объем осадка.

iii) Разрушите трофозоиты путем трехкратной заморозки и разморозки.

iv) После этого воздействуйте на препарат антигена ультразвуком с амплитудой колебаний 20 микрон в течение 20 секунд при температуре 4°C.

v) Удалите все продукты распада клеток путем центрифугирования с центробежным ускорением 10000 g в течение 30 минут при температуре 4°C.

vi) Сохраните надосадочную жидкость и храните при температуре -20°C до момента использования. (Уровень содержания протеина, в соответствии с результатом оценки, может составлять от 2 до 4 мкг/мл).

2.6. Исследование методом НРФА

Ниже приводится описание процедуры исследования методом НРФА для антител класса IgG (иммуноглобулин G) к *токсоплазме* в овечьей сыворотке. Данная процедура требует незначительных модификаций при исследовании материала различных видов животных или при измерении количества антител класса IgM (иммуноглобулин M).

2.6.1. Методика

i) Очистите необходимое число предметных стекол на 15-луночном планшете для исследования культур клеток тканей (поточные лаборатории) и дайте им высохнуть.

ii) Внесите цельные слои препарата из трофозоитов объемом 5 мкл в каждую лунку и дайте им высохнуть.

iii) Зафиксируйте препараты путем выдержки в метаноле в течение 10 минут.

iv) Дважды промывайте препараты по 10 минут в 0,3 моль ФСБ, pH 7,4.

v) Добавьте 5 мкл полученной овечьей тест-сыворотки (разведенной в ФСБ) в каждую лунку. (Приготовьте серию разведений тест-сывороток, например 1/16, 1/32, и т. д. до 1/1024). Удостоверьтесь в том, что положительная и отрицательная контрольные сыворотки, а также образец, содержащий только ФСБ, включены в каждый тест. Осуществляйте инкубацию образцов в течение 30 минут при комнатной температуре.

vi) Дважды промывайте препараты по 10 минут в ФСБ.

vii) Добавьте 5 мкл соответствующего разведения антител сыворотки кролика к иммуноглобулину G овец, конъюгированного в флуоресцинизиотиоцианат, разведенного в 0,2% ФСБ с фильтрованным синим красителем Эвана, в каждую лунку и осуществляйте инкубацию в течение 30 минут при комнатной температуре.

viii) Трижды промывайте препараты по 10 минут в ФСБ.

ix) Нанесите на предметные стекла под покровными стеклами забуференный глицерин (одна часть глицерина на девять частей ФСБ).

х) Исследуйте образцы с помощью флюоресцентного микроскопа, оснащенного $\times 20$ и $\times 40$ линзами объектива.

При использовании отрицательной тест-сыворотки цельные паразиты будут иметь красное свечение, причиной которого является автофлюоресценция синего красителя Эвана. Также на полюсе паразитов может быть виден зеленый флюоресцентный колпак (неспецифическая полярная флюоресценция). При использовании положительной тест-сыворотки паразиты будут иметь красное флюоресцентное свечение, и как минимум 80% паразитов, находящихся в определенной лунке, будет окружено неразрывным зеленым ободом флюоресцентного свечения. Для взрослых овец / коз положительный титр может быть определен как $\geq 1/64$, а отрицательный титр – как $\leq 1/32$. Для сыворотки ягнят / козлят и сыворотки эмбриона / плода соответствующие титры могут быть определены как $\geq 1/32$ и $\leq 1/16$.

Ниже приведен пример значений для образцов на предметных стеклах планшета:

Образец 1

| | | | | | | | | |
|--------|---|--------|---|------------|---|--------|---|-------|
| 1/16 | → | 1/32 | → | 1/64 | → | 1/128 | → | 1/256 |
| □ | | □ | | □ | | □ | | □ |
| 1/512 | → | 1/1024 | | Только ФСБ | | 1/1024 | ← | 1/512 |
| □ | | □ | | □ | | □ | | □ |
| ↑ | | | | | | | | ↓ |
| 1/1256 | ← | 1/128 | ← | 1/64 | ← | 1/32 | ← | 1/16 |
| □ | | □ | | □ | | □ | | □ |

Образец 2

2.7. Описание процедуры исследования методом модифицированной реакции агглютинации

2.7.1. Буфер для разведения сыворотки

i) Разведите 42,5 г NaCl, 1,54 г NaH_2PO_4 (молекулярная масса = 120) и 5,4 г Na_2HPO_4 (молекулярная масса = 142) в 900 мл деионизированной воды.

ii) Доведите значение pH до 7,2. С помощью деионизированной воды доведите объем до 1 литра.

iii) Храните раствор в холодильнике. Данный раствор представляет собой $5\times$ базовый раствор.

iv) Разведите имеющийся базовый раствор в пропорции 1/5, чтобы получить 0,01 моль ФСБ (1 часть базового раствора на 4 части деионизированной воды). Непосредственно перед использованием ФСБ необходимо осуществить его фильтрацию, пропустив ФСБ через мембрану пропускной способностью 0,22 мкмоль.

2.7.2. Буфер для разведения антигена

i) Растворите 7,01 г хлорида натрия, 3,09 г борной кислоты и 2,0 г азиды натрия в 900 мл деионизированной воды.

ii) Добавьте 24 мл 1 N NaOH и доведите значение pH до 8,95.

iii) Доведите объем раствора до 1 литра. В результате получится базовый раствор, который можно хранить при комнатной температуре.

iv) Для получения рабочего буфера для разведения антигена растворите 0,4 г альбумина бычьей сыворотки (АБС) в 100 мл боратного буфера. Храните полученный буфер при температуре 4°C.

2.7.3. Разведения сыворотки

i) Разведите образцы сыворотки буфером для разведения сыворотки (см. раздел В.2.7.1 выше) в маленьких пробирках для тестов (1,2 мл в пробирках с полосками 8 или 12) с помощью многоканальной пипетки, начиная с титра 1/25.

ii) Микротитрационные планшеты могут использоваться также для изготовления растворов (разведений) сыворотки.

2.7.4. Приготовление смеси антигена

i) На каждой планшете (стекле) смешайте 2,5 мл буфера для разведения антигена (см. раздел В.2.7.2 выше), 35 мкл 2-меркаптоэтанола, 50 мкл раствора синего красителя Эвана (2 мг/мл воды) и 0,15 мл антигена (цельные паразиты, зафиксированные в формалине).

2.7.5. Описание процедуры агглютинации

Процедура агглютинации выполняется на 96-луночных микротитрационных планшетах со скобообразным дном.

i) С помощью пипетки внесите 25 мкл смеси антигена в каждую лунку сразу после смешивания.

ii) С помощью пипетки внесите 25 мкл растворов (разведений) сыворотки в каждую лунку и аккуратно смешайте раствор с антигеном путем повторного переливания с помощью пипетки.

iii) На каждой планшете должна присутствовать положительная контрольная сыворотка. Титр контрольной сыворотки должен составлять 1/200, а для двукратных разведений (растворов) должен использоваться титр от 1/25 до 1/3200.

iv) Закройте планшеты (стекла) клейкой лентой и осуществляйте инкубацию при температуре 37°C на протяжении ночи.

v) Прочтите результаты с помощью увеличительного зеркала. Наличие синей «пуговицы» на дне лунки свидетельствует об отрицательном (негативном) результате. Чистое дно свидетельствует о положительном (позитивном) результате.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

Единственной доступной вакциной, имеющейся в продаже, является живая вакцина для овец, в настоящее время имеющая лицензию на использование в Великобритании,

Ирландии, Франции, Португалии, Испании и Новой Зеландии. Эта вакцина состоит из выращенных в культуре клеток тканей трофозоитов S48 паразита *T. gondii*, аттенуированных посредством более 3000 пассажей в организм мышей. Вакцина стимулирует выработку иммунитета от паразита как минимум на 18 месяцев после ее однократного подкожного введения, однако, по причине невозможности формирования ею тканевых цист, у овец не развивается персистентная вакцинная инфекция. Вакцина имеет короткий срок годности и представляет потенциальную опасность для лиц с подавленным иммунитетом и беременных женщин из числа персонала (Vuxton, 1993). Вакцина должна храниться и использоваться в строгом соответствии с инструкциями производителя. Так, вакцину никогда нельзя замораживать и необходимо постоянно хранить в прохладной среде (при температуре около 4°C), не допуская попадания на нее прямых солнечных лучей. Предоставляемый вместе с вакциной дилуэнт необходимо добавить в концентрированную суспензию из трофозоитов непосредственно перед использованием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

BOWIE W.R., KING A.S. WERKER D.H., ISAAC-RENTON J.L., BELL A., ENG S.B.V & MARION S.A. (1997). Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet*, **350**, 173–177.

BROWN M., LAPPIN M.R., BROWN J.L., MUNKHTSOG B. & SWANSON W.F. (2005). Exploring the ecological basis for extreme susceptibility of Pallas' cats (*Otocolobus manul*) to fatal toxoplasmosis. *J. Wildlife Dis.*, **41**, 691–700.

BURG J.L., GROVER C.M., POULETTY P. & BOOTHROYD J.C. (1989). Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 1787–1792.

BUXTON D. (1993). Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. *Parasitol. Today*, **9**, 335–337.

BUXTON D. (2000). Toxoplasmosis and neosporosis. *In: Diseases of Sheep*, Martin W.B. & Aitken I.D., eds. Blackwell Science, Oxford, UK, 86–94.

CANFIELD P.J., HARTLEY W.J. & DUBEY J.P. (1990). Lesions of toxoplasmosis in Australian marsupials. *J. Comp. Pathol.*, **103**, 159–167.

COSTA J.M., PAUTAS C., ERNAULT P., FOULET F., CORDONNIER C. & BRETAGNE S. (2000). Real-time PCR for diagnosis and follow-up of *Toxoplasma* reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 2929–2932.

CUNNINGHAM A.A., BUXTON D. & THOMSON K.M. (1992). An epidemic of toxoplasmosis in a captive colony of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *J. Comp. Pathol.*, **107**, 207–219.

DESMONTS G. & REMINGTON J.S. (1980). Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J. Clin. Microbiol.*, **11**, 562–568.

- DUBEY J.P. (2010). *Toxoplasmosis of Animals and Humans*, Second Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- DUBEY J.P. & BEATTIE C.P. (1988). *Toxoplasmosis of Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- DUBEY J.P. & DESMONTS G. (1987). Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Vet. J.*, **19**, 337–339.
- DUNCANSON P., TERRY R.S., SMITH J.E. & HIDE G. (2001). High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *Int. J. Parasitol.*, **31**, 1699–1703.
- ELLIS J.T. (1998). Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, **28**, 1053–1060.
- GUSTAFSSON K. & UGGLA A. (1994). Serologic survey for *Toxoplasma gondii* infection in the brown hare (*Lepus europaeus*) in Sweden. *J. Wildlife Dis.*, **30**, 402–407.
- HOWE D.K. & SIBLEY D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Inf. Dist.*, **172**, 1561–1566.
- ISAAC-RENTON J., BOWIE W.R., KING A., IRWIN G.S., ONG C.S., FUNG C.P., SHOKEIR M.O. & DUBEY J.P. (1998). Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. *Applied Environ. Microbiol.*, **64**, 2278–2280.
- JOHNSON A.M. & ILLANA S. (1991). Cloning of *Toxoplasma gondii* gene fragments encoding diagnostic antigens. *Gene*, **99**, 127–132.
- KHAN A., BÖHME U., KELLY K.A., ADLEM E., BROOKS K., SIMMONDS M., MUNGALL K., QUAIL M.A., ARROWSMITH C., CHILLINGWORTH T., CHURCHER C., HARRIS D., COLLINS M., FOSKER N., FRASER A., HANCE Z., JAGELS K., MOULE S., MURPHY L., O'NEIL S., RAJANDREAM M.A., SAUNDERS D., SEEGER K., WHITEHEAD S., MAYR T., XUAN X., WATANABE J., SUZUKI Y., WAKAGURI H., SUGANO S., SUGIMOTO C., PAULSEN I., MACKAY A.J., ROOS D.S., HALL N., BERRIMAN M., BARRELL B., SIBLEY L.D. & AJIOKA J.W. (2006). Common inheritance of chromosome Ia associated with clonal expansion of *Toxoplasma gondii*. *Genome Res.*, **16**, 1119–1125.
- KIJLSTRA A., EISSEN O.A., CORNELISSEN J., MUNNIKSMA K., EIJCK I. & KORTBEEK T. (2004). *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. *Invest. Ophthal. Vis. Sci.*, **45**, 3165–3169.
- LEKUTIS C., FERGUSON D.J., GRIGG M.E., CAMPS M. & BOOTHROYD J.C. (2001). Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int. J. Parasitol.*, **112**, 1–10.
- LIN M.H., CHEN T.C., KUO T., TSENG C.C. & TSENG C.P. (2000). Real-Time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 4121–4125.
- LIND P. & BUXTON D. (2000). Veterinary aspects of *Toxoplasma* infection. In: *Congenital Toxoplasmosis; Scientific Background, Clinical Management and Control*, Ambrose-Thomas P. & Petersen E., eds. Springer, Paris, France, 261–269.

- MAHALAKSHIMA B., THERESE K.L., SHYAMALA G., DEVIPRIYA U & MADHAVAN H.N. (2007). *Toxoplasma gondii* detection by nested polymerase chain reaction in lens aspirate and peripheral blood leukocyte in congenital cataract patients: The first report from a tertiary eye hospital in India. *Curr. Eye Res.*, **32**, 653–657.
- MUNDAY B.L. & CORBOULD A. (1971). The application of the *Toxoplasma* indirect fluorescent-antibody test to sheep sera. *Aust. J. Med. Technol.*, **2**, 3–6.
- NAGY B., LÁZÁR L., NAGY G., BÁN Z. & PAPP Z. (2007). Detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid using quantitative real-time PCR method. *Orv. Hetil.*, **148**, 935–938.
- RODGER S.M., MALEY S.W., WRIGHT S.E., MACKELLAR A., WESLEY F., SALES J. & BUXTON D. (2006). Ovine toxoplasmosis; the role of endogenous transmission. *Vet. Rec.*, **159**, 768–772.
- SABIN A.B. & FELDMAN H.A. (1948). Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). *Science*, **108**, 660–663.
- SAGER H., GLOOR M., TENTER A., MALEY S., HÄSSIG M. & GOTTSTEIN B. (2003). Immunodiagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in sheep by the use of a P30 IgG avidity ELISA. *Parasitol. Res.*, **91**, 171–174.
- SAVVA D., MORRIS J.C., JOHNSON J.D. & HOLLIMAN R.E. (1990). Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. *J. Med. Microbiol.*, **32**, 25–31.
- SØRENSEN K.K., MØRK T., SIGURSDÓTTIR Ó.G., ÅSBAKK K., ÅKERSTEDT J., BERGSJØ B. & FUGLEI E. (2005). Acute toxoplasmosis in three wild arctic foxes (*Alopex alopex*) from Svalbard; one with co-infections of *Salmonella enteritidis* PT1 and *Yersinia pseudotuberculosis* serotype 2b. *Res. Vet. Sci.*, **78**, 161–167.
- TENTER A.M., VIETMEYER C. & JOHNSON A.M. (1992). Development of ELISAs based on recombinant antigens for the detection of *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in sheep and cats. *Vet. Parasitol.*, **43**, 189–201.
- UGGLA A., SJOLAND L. & DUBEY J.P. (1987). Immunohistochemical demonstration of toxoplasmosis in fetuses and fetal membranes of sheep. *Am. J. Vet. Res.*, **48**, 348–351.
- VOLLER A., BIDWELL D.E., BARTLETT A., FLECK D.G., PERKINS M. & OLADEHIN B. (1976). A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody. *J. Clin. Pathol.*, **29**, 150–153.
- WALZER K.A., WIER G.M., DAM R.A., SRINIVASAN A.R., BORGES A.L., ENGLISH E.D., HERRMANN D.C., SCHARES G., DUBEY J.P. & BOYLE, J.P. (2014). *Hammondia hammondi* harbors functional orthologs of the host-modulating effectors GRA15 and ROP16 but is distinguished from *Toxoplasma gondii* by a unique transcriptional profile. *Eukaryot. Cell*, **13**, 1507–1518.
- WASTLING J.M., NICOLL S. & BUXTON D. (1993). Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep. *J. Med. Microbiol.*, **38**, 360–365.

WERRE S.R., JACOBSON R.H., BOWMAN D.D., DUBEY J.P. & MOHAMMED H.O. (2002). Evaluation of kinetics and single-read enzyme-linked immunoassays for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **14**, 225–230.

WILLIAMS R.H., MORLEY E.K., HUGHES J.M., DUNCANSON P., TERRY R.S., SMITH J.E. & HIDE G. (2005). High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts. *Parasitol.*, **130**, 301–307.

* * *

NB: Первая версия принята в 2004 году.
Последние версии с изменениями приняты в 2017 году.