

ГЛАВА 3.5.3

СЛУЧНАЯ БОЛЕЗНЬ

РЕЗЮМЕ

Случная болезнь – контагиозное заболевание с хроническим или острым течением племенных животных, принадлежащих к семейству лошадиных, которое передается при прямом контакте от животного к животному во время коитуса. Возбудителем случайной болезни является трипаномосома *Trypanosoma (Trypanozoon) equiperdum* (Doflein, 1901).

Случная болезнь – единственный трипаносомоз, который передается без участия беспозвоночных животных. *Trypanosoma equiperdum* отличается от остальных трипаносом тем, что является, в основном, тканевым паразитом и редко обнаруживается в крови. Другие природные резервуары паразита, кроме инфицированных животных семейства лошадиных, неизвестны. Паразит находится в выделениях из половых органов инфицированных самок и самцов. Инкубационный период, тяжесть и продолжительность заболевания существенно варьируют; заболевание часто приводит к летальному исходу, однако сообщается и о случаях спонтанного выздоровления, и о существовании латентных носителей. Течение инфекции может быть субклиническим. Ослы и мулы более устойчивы, чем лошади, и могут оставаться неявными носителями. Инфицированное животное не обязательно передает инфекцию при каждой копуляции. Хотя адаптация к другим организмам-хозяевам не всегда возможна, лабораторных грызунов, включая кроликов, крыс и мышей, можно инфицировать в экспериментальных условиях и использовать их для поддержания штаммов паразита неограниченно долго. Для наилучшего хранения штаммы *Trypanosoma equiperdum* помещают в жидкий азот.

Клинические признаки характеризуются периодическими обострениями и рецидивами, завершающимися смертью животного, в некоторых случаях, после паралича или выздоровлением. Могут наблюдаться умеренная лихорадка, локальный отек гениталий и молочных желез, кожные высыпания, расстройства координации, паралич лицевого нерва и губ, поражения глаз, анемия и истощение. Отечные бляшки на коже диаметром 5-8 см и толщиной 1 см по-прежнему считаются патогномоничным признаком, хотя такие бляшки иногда обнаруживаются также у представителей семейства лошадиных, инфицированных *T. evansi*.

Идентификация возбудителя: Окончательный диагноз определяется распознаванием клинических признаков и идентификацией паразита. Поскольку такое редко возможно, диагноз обычно основывается на клинических признаках и серологических доказательствах, полученных при проведении реакций связывания комплемента (РСК).

Серологические исследования: У инфицированных животных сывороточные антитела присутствуют даже при отсутствии клинических признаков. Для подтверждения инфекции в клинических случаях и у латентных носителей применяется РСК. У неинфицированных животных, особенно ослов, результат РСК часто оказывается неопределенным. Для подтверждения инфекции или окончательного решения в случае неопределенного результата РСК можно использовать непрямую реакцию флуоресцирующих антител. Также применяется твердофазный иммуноферментный анализ.

Молекулярные исследования: В настоящее время проводятся исследования генетических маркеров, позволяющих различить *T. equiperdum* и *T. evansi*, принадлежащих к подроду *Trypanozoon*.

Требования к вакцинам: Вакцины от вызванного этим паразитом заболевания отсутствуют. Единственный эффективный способ борьбы заключается в забое инфицированных животных. Во время ассистированного спаривания принципиально важна надлежащая гигиена, поскольку инфекция может передаваться при контакте с контаминированными предметами.

А. ВВЕДЕНИЕ

Случная болезнь – контагиозное заболевание с хроническим или острым течением животных семейства лошадиных, которое передается при прямом контакте от животного к животному во время коитуса. Возбудителем заболевания является *Trypanosoma equiperdum* (Doflein, 1901). Случная болезнь известна также под другими названиями: mal de coit, syphilis du cheval, el dourin, morbo coitale maligno, Beschalseuche, slapsiekte, sluchnaya boleyzni – названия на других языках), и дурина (Barner, 1963; Hoare, 1972). До настоящего времени случаи заболевания человека не описаны.

Хотя заболевание известно с древнейших времен, его природа была установлена только в 1896 г., когда Rouget обнаружил трипаносомы у инфицированной алжирской лошади. Случная болезнь – единственный трипаносомоз, который передается без участия беспозвоночных животных. *Trypanosoma equiperdum* отличается от остальных трипаносом тем, что является, в основном, тканевым паразитом и редко обнаруживается в крови. Другие природные резервуары паразита, кроме инфицированных животных семейства лошадиных, неизвестны.

Инфекция передается во время копуляции, чаще от жеребца к кобыле, но возможна также передача инфекции от кобылы к жеребцу, вследствие присутствия паразита в семенной жидкости и слизистом экссудате полового члена и препуция полового члена самца и вагинальной слизи инфицированной самки. Вначале паразиты находятся снаружи на поверхности слизистой оболочки или между эпителиальными клетками недавно инфицированного животного. После того как происходит инвазия в ткани, на половых путях появляются бляшки. Затем паразиты могут проникать в кровь, с которой они переносятся в другие органы тела. В типичных случаях такая метастатическая инвазия приводит к образованию характерных кожных бляшек.

Инкубационный период, тяжесть и продолжительность заболевания существенно варьируют; В Южной Африке заболевание обычно имеет хроническое течение, как правило, легкое и может продолжаться от 6 месяцев до 2 лет (Henning, 1955). На других территориях, например, в Северной Африке и Южной Америке, заболевание обычно имеет более острое течение, часто продолжается 1-2 месяца или, в исключительных случаях 1 неделю. Хотя случная болезнь часто приводит к летальному исходу, средняя летальность составляет 50% (особенно для жеребцов), возможно и спонтанное выздоровление. Известны случаи субклинической инфекции. По сравнению с лошадьми, ослы и мулы более устойчивы к случной болезни. У ослов заболевание часто остается незамеченным, при этом в сперме и вагинальных выделениях присутствуют инфекционные трипаносомы. Описана вспышка случной болезни в Италии, которая произошла в 2011 г., через 16 лет после предыдущего официального зарегистрированного случая заболевания в этой стране (Pascucci *et al.*, 2013; Scacchia *et al.*, 2011).

Поскольку трипаносомы не непрерывно присутствуют в половых путях в течение заболевания, передача заболевания не обязательно происходит во время каждой копуляции с участием инфицированного животного. Возможна передача инфекции от

кобылы к жеребенку через слизистую оболочку, например, конъюнктиву. Трипаномы обнаружены в молочной железе кобылы вне периода лактации (Parkin, 1948) и в образцах кожи при иммуногистохимическом исследовании (Pascucci *et al.*, 2013; Scacchia *et al.*, 2011). Животных, не принадлежащих к семейству лошадиных, например, кроликов, крыс и мышей, с трудом удается инфицировать к экспериментальных условиях. Поэтому выделение новых штаммов является довольно сложной задачей. Описана адаптация возбудителя к крысам после выделения его у кроликов и инокуляции в семенники (Heisch *et al.*, 1970; Schneider & Buffard, 1900; Soldini, 1939). Адаптированные к грызунам штаммы можно поддерживать неограниченно долго; кровь инфицированных грызунов удовлетворительно переносит криоконсервацию. При проведении серологических реакций часто используют антигены, полученные у инфицированных лабораторных грызунов.

Для случной болезни характерны стадии обострения, толерантности или рецидива, продолжительность которых может варьировать, и которые могут возникать однократно или несколько раз до смерти или выздоровления животного. Клинические признаки этого заболевания, которые отмечают чаще всего: пирексия, распухание или местный отек гениталий и молочных желез, отежные кожные высыпания, узловатость суставов, нарушение координации, паралич лицевого нерва и губ, поражения глаз, анемия и истощение. Патогномичным признаком является отежная бляшка, представляющая собой приподнятое над кожей поражение толщиной 1 см и до 5-8 см в диаметре. Обычно бляшки появляются на ребрах, хотя могут возникать на любом месте тела и обычно сохраняются от 3 до 7 дней. Эта особенность не является постоянной.

Как правило, отек исчезает и вновь появляется с неопределенной периодичностью. Во время каждого перерыва можно видеть возрастающую степень утолщения и уплотнения ткани. На слизистой оболочке влагалища могут присутствовать приподнятые и утолщенные полупрозрачные бляшки. Из влагалища могут выступать наружу складки отежной слизистой оболочки. Часто обнаруживается отек молочных желез и прилегающих тканей. Возможны депигментация области половых органов, промежности и вымени. У жеребцов первым клиническим признаком является варьирующее опухание головки полового члена и препуция. Отек распространяется назад на мошонку, паховые лимфатические узлы и промежность и вперед на нижнюю часть живота. У жеребцов крупных пород отек может распространяться на все основание живота.

Наблюдается периодическая пирексия; признаки со стороны нервной системы включают расстройство координации, главным образом, задних конечностей, губ, ноздрей, ушей и горла. Паралич лицевого нерва обычно бывает односторонним. В фатальных случаях заболевание обычно развивается медленно и прогрессивно, с возрастающей анемией и истощением, хотя аппетит животного остается хорошим почти на протяжении всего заболевания.

При посмертном патологоанатомическом исследовании под кожей обнаруживается студенистый экссудат. У жеребцов утолщены и инфильтрированы мошонка, препуций пениса и оболочка семенников. В некоторых случаях семенники погружены в вязкую массу склерозированной ткани и могут быть нераспознаваемыми. У кобыл могут быть вульва, слизистая оболочка влагалища, матка, мочевого пузыря и молочные железы могут быть утолщены и пропитаны студенистым содержимым. Лимфатические узлы, в особенности, в брюшной полости гипертрофированные, размягченные и в некоторые случаях геморрагические. У животных с параличией спинной мозг часто мягкий, тестовидный и обесцвеченный, в особенности в поясничном и крестцовом отделах.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

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

Метод	Цель			
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельных животных перед перемещением	Подтверждение клинических случаев	Надзор за распространением инфекции
Идентификация возбудителя¹				
Микроскопия	-	+	+++	-
ПЦР	-	+	++	+
Детекция иммунного ответа				
РСК	+	+++	+++	+++
НРФА	++	+	+	++
Твердофазный ИФА	++	+	+	++

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.

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.

ПЦР = полимеразная цепная реакция; РСК = реакция связывания комплемента

НРФА = непрямая реакция флуоресцирующих антител; твердофазный ИФА = твердофазный иммуноферментный анализ.

1. Идентификация возбудителя

1.1. Обзор паразитологических методов

Окончательный диагноз определяется распознаванием клинических признаков и демонстрацией паразита. Это редко бывает возможным по следующим причинам: (а) хотя при развившемся заболевании клинические признаки и макроскопические поражения могут быть патогномичными, их не всегда можно идентифицировать с полной определенностью, особенно на ранних стадиях или в латентных случаях; их можно спутать с другими состояниями, например, коитальной сыпью (более того, в некоторых странах [например, в Южной Африке], к возникновению аналогичных клинических признаков приводят инфекции, вызванные *T. evansi*); (б) трипаносомы присутствуют в низкой плотности, и их исключительно сложно найти, особенно на отечных участках; и (с) в крови трипаносомы появляются лишь на короткое время и в небольших количествах, что существенно затрудняет их обнаружение. Чтобы проиллюстрировать сложность выделения *T. equiperdum*, отметим, что после 1979 г. ни в одной из стран мира не был выделен штамм паразита, широко признанный *T. equiperdum*, и большинство штаммов, имеющих в настоящее время в национальных ветеринарных диагностических лабораториях, родственны *T. evansi* (Claes *et al.*, 2003; Lun *et al.*, 1992).

Недавно выделены новые предполагаемые штаммы *T. equiperdum* strains в Эфиопии (Додола), Италии (ICT 2011) и Венесуэле (TeAp-N/D1), хотя эти изоляты требуется охарактеризовать более подробно (Hagos *et al.*, 2010; Perrone *et al.* 2009; Pascucci *et al.*, 2013). На практике диагноз основан на клинических данных, подкрепляемых способом

¹ Для анализа клинического образца рекомендуется использовать сочетание методов идентификации возбудителя.

передачи, результатами серологических и гистопатологических исследований. Недавно были изучены и предложены другие подходы (Claes *et al.*, 2003).

У инфицированных животных трипаномы присутствуют лишь в небольших количествах, в лимфе и отечной жидкости в наружных половых органах, в вагинальной слизи (Parkin, 1948) и экссудате бляшек и также в экссудате молочных желез (Pascucci *et al.*, 2013; Scacchia *et al.*, 2011). Обычно трипаномы не обнаруживаются в крови, но могут быть найдены в вагинальной или уретральной слизи, полученной из промывных вод или соскобов с препуция или из влагалища через 4-5 дней после заражения. Позднее паразитов можно найти в жидком содержимом отеков и бляшек, особенно вскоре после высыпания. Следует помыть, побрить и высушить кожу, покрывающую бляшку, и затем отобрать шприцом жидкое содержимое бляшки. Следует избегать попадания в кровеносные сосуды. Далее проводят микроскопическое исследование свежего аспирата на наличие подвижных трипаносом. Они присутствуют лишь в течение нескольких дней, поэтому поражения следует изучать через определенные промежутки времени. Поскольку паразиты редко обнаруживаются в толстых мазках крови, рекомендуется использовать приемы концентрирования крови, например, центрифугирование в капиллярной трубке и анионообменное центрифугирование на миницентрифуге (BQscher *et al.*, 2009; Lanham & Godfrey, 1970; Woo 1970).

Поскольку случайная болезнь – единственный трипаномоз, встречающийся у лошадей на территориях, свободных от сонной болезни и сурры, для положительного диагноза достаточно обнаружения трипаносом в толстых мазках крови. В странах, где встречается сонная болезнь и сурра, микроскопическими методами (при оценке морфологии и подвижности) сложно отличить *T. equiperdum* от других представителей подрода *Trypanozoon* (*T. evansi*, *T. brucei*). В частности, морфологические критерии не позволяют различить *T. equiperdum* и *T. evansi*. Оба паразита являются мономорфными, удлинёнными трипомастиготами со свободным жгутиком, хотя признано также существование плеоморфных коротких форм. Длина типичных штаммов паразита составляет от 15,6 до 31,3 мкм.

1.2. Детекция трипаносомной ДНК и дифференциальная диагностика

Кинетопластная ДНК в митохондриях – наиболее примечательная характеристика порядка (класса) Kinetoplastida. В полевых условиях лишённые кинетопласта штаммы *T. evansi* (отсутствие кинетопласта видно при окрашивании препарата по Гимзе) обнаруживались у инфицированных животных, но такая ситуация не наблюдалась при инфекции, вызванной *T. equiperdum*. Более значимым для различения являлось присутствие максиколец у *T. equiperdum* и их отсутствие у *T. evansi*, что обеспечивает возможность различия двух паразитов (Li *et al.*, 2007). Кроме того, как исследует из других публикаций, молекулярным маркером, позволяющим отличить *T. equiperdum* от *T. evansi*, является отсутствие варибельного поверхностного гликопротеина VSG RoTat 1.2 (Claes *et al.*, 2003; 2004), однако VSG RoTat 1.2 у некоторых штаммов *T. evansi* VSG RoTat 1.2 отсутствует (Ngaira *et al.*, 2005). Несмотря на отсутствие метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), специфичного в отношении *T. equiperdum*, для обнаружения ДНК *T. equiperdum* можно использовать метод ПЦР, специфичный в отношении подрода *Trypanozoon* (см. главу 2.1.21 *Инфекции, вызванные Trypanosoma evansi [включая сурру]*). Недавно метод ПЦР в реальном времени, высокочувствительный в отношении подрода *Trypanozoon*, применили для анализа образцов тканей и жидкостей лошади с естественным заражением случайной болезнью, и в которых этот метод позволил обнаружить небольшое количество паразитов (Pascucci *et al.*, 2013; Scacchia *et al.*, 2011).

ПЦР и другие родственные методы амплификации ДНК применялись для исследования экссудатов и образцов ткани после начальной фазы инфекции, с учетом невозможности детекции возбудителя с помощью этих методов в образцах крови (Calistri *et al.*, 2013).

2. Серологические исследования

У инфицированных животных сывороточные антитела присутствуют даже при отсутствии клинических признаков. Для подтверждения клинических данных и обнаружения латентных инфекций используют реакцию связывания комплемента (РСК) (Министерство сельского хозяйства, рыбоводства и продовольствия Соединенного Королевства [MAFF], 1986). У неинфицированных животных, в особенности ослов и мулов, результаты РСК часто оказываются противоречивыми или неспецифичными из-за антикомплементарных эффектов сывороток этих животных (т.е. наличия в них активности, направленной против компонентов комплемента). В случае антикомплементарных сывороток следует воспользоваться преимуществами непрямой реакции флуоресцирующих антител (НРФА). Признанный на международном уровне протокол отсутствует. Возможны перекрестные реакции, объясняющиеся присутствием в некоторых странах других трипаносом, например, *T. cruzi* и *T. evansi*. Также применяется твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). Вид *Trypanosoma equiperdum* является близкородственным другим трипаносомам восточного полушария, включая *T. brucei* и *T. evansi*. У всех представителей этого рода присутствуют консервативные элементы цитоскелета, вызывающие выраженный и перекрестно реактивный ответ. Все имеющиеся в настоящее время диагностические антигены и антисыворотки, которые можно приобрести для серодиагностических испытаний содержат эти консервативные элементы или антитела к ним, поэтому ни одна из описанных выше серологических методик не является специфичной в отношении случной болезни. Поэтому диагностика случной болезни, в результате которой будет установлен определенный подтвержденный случай болезни, должна включать сбор анамнеза, клинических и патологических данных и также серологические исследования (Calistri *et al.*, 2013). Для значимого улучшения серодиагностики случной болезни потребуется разработать больше субъединичных антигенов, специфичны для *T. equiperdum*, и антител к ним.

2.1. Реакция связывания комплемента

Можно использовать стандартные или адаптированные к микропланшетам методики (Herr *et al.*, 1985). В качестве источника комплемента используют сыворотку морской свинки (имеющуюся на рынке). Другими необходимыми реактивами являются отмытые в вероналовом буферном растворе эритроциты овцы и гемолитическая сыворотка кролика (т.е. сыворотка кролика против эритроцитов овцы) (коммерческая) и также негативная и позитивная контрольные сыворотки.

2.1.1. Получение антигена

Поскольку надежные серологические или молекулярные маркеры для различения *T. equiperdum* от *T. evansi* отсутствуют, следует обратить особое внимание на штамм *T. equiperdum*, используемый для получения антигена. В соответствии с последними достижениями на пути различения двух близкородственных видов (Claes *et al.*, 2003, 2004), складывается впечатление, что истинный *T. equiperdum* можно отличить от *T. evansi* типа А по отсутствию гена VSG RoTat 1.2 gene. Принимая это во внимание, штаммы *T. equiperdum* OVI и BoTat 1.1 могут быть подходящими штаммами в качестве источников антигенов.

i) Беспатогенную крысу инокулируют криоконсервированным основным образцом *T. equiperdum*. Половозрелым крысам вводили внутривентриально по 0,5-1,0 мл замороженной и быстро размороженной консервированной культуры возбудителя. При

максимальном уровне паразитемии собирают кровь в контейнер с антикоагулянтом, например, гепарином, для того чтобы использовать этот образец в качестве исходной культуры для инокуляции дополнительных крыс.

ii) Двадцать крупных крыс инокулируют внутрибрюшинно 0,5-1,0 мл исходной культуры. У всех крыс одновременно должна развиваться тяжелая инфекция. При необходимости дозу корректируют и инокулируют дополнительных крыс, чтобы достичь максимальной паразитемии в желаемое время через 72-96 часов. Обычно крысы умирают в течение 3-5 дней; перед этим у них получают кровь из хвоста для тонкого влажного мазка крови и изучают его под микроскопом. Когда паразитемия достигает максимального уровня крысу умерщвляют, и собирают кровь для выделения трипаносом по одному из двух описанных ниже протоколов: дифференциального центрифугирования или анионообменной хроматографии.

iii) Для дифференциального центрифугирования кровь инфицированных крыс собирают в раствор Олсвера или физиологический раствор с добавлением цитрата-декстрозы (ACD). Хотя обычно паразитемия наблюдается синхронно, в ином случае кровь можно собирать в раствор Олсвера или физиологический раствор с ACD и хранить при 4°C до тех пор, пока не будет получена кровь всех крыс. Кровь фильтруют через марлю и центрифугируют в течение 4 минут при 800 g. Большая часть эритроцитов осаждается, а трипаносомы остаются в суспензии.

iv) Надосадочную жидкость переносят в новую пробирку; верхний слой эритроцитов смешивают с трипаносомами во второй пробирке, и следующий слой переносят в третью пробирку. В пробирки 2 и 3 добавляют раствор Олсвера или ACD-физиологический раствор, чтобы не допустить коагуляции крови. Содержимое каждой пробирки перемешивают и пробирки центрифугируют в течение 5 минут при 1500 g.

v) Надосадочную жидкость отбрасывают, и содержащий трипаносомы белый слой переносят из всех пробирок в чистую пробирку. Следующий розовый слой переносят во вторую пробирку, и нижний слой переносят в третью пробирку.

vi) Добавляют физиологический раствор, перемешивают, и пробирки вновь центрифугируют в течение 5 минут при 1500 g для отделения трипаносом. Этап отмывания повторяют до тех пор, пока не будут собраны все трипаносомы, представляющие собой чистую белую массу. При использовании 10 крыс получают 3-5 г антигена. Концентрированных трипаносом разбавляют двумя объемами вероналового буферного раствора с добавлением 5% поливинилпирролидона в качестве криоконсерванта. Перед использованием антигена в РСК антиген следует диспергировать при использовании охлаждаемого во льду ручного или автоматического гомогенизатора с притертым стеклом с образованием высокодисперсной суспензии (Watson, 1920). Этот антиген может быть разделен на аликвоты, заморожен и лиофилизирован.

vii) Для анионообменной хроматографии кровь с добавленным гепарином наносят на гель из ДЭАЭ (диэтиламиноэтил)-целлюлозы, уравновешенный фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), содержащим глюкозу, pH 8,0 (Lanham & Godfrey, 1970). Клетки крови задерживаются на геле, а элюировавшие трипаносомы центрифугируют в течение 15 минут при 1000-1500 g. Один объем осажденных трипаносом ресуспендируют охлажденным во льду 0,01 М фосфатным буферным раствором с pH 8,0, что приводит к вызванному гипотоническим шоком лизису в течение 15 минут. Затем суспензию центрифугируют в течение 1 часа при 42 000 g, и собирают надосадочную жидкость и фильтруют ее через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Осветленная надосадочная

жидкость содержит водорастворимую фракцию трипаносом. Содержание белка можно определить методом УФ-спектрофотометрии или аналогичным методом, и этот препарат антигена, разделенный на небольшие объемы, можно хранить при -80°C .

Для стандартизации антигена выполняют титрование стандартной антисывороткой с низким титром в разведении 1/5.

2.1.2. Сыворотки

Перед использованием в эксперименте положительные и отрицательные сыворотки следует инактивировать в течение 30 минут при 58°C . Сыворотки мула и осла обычно инактивируют в течение 30 минут при 62°C . Протоколом связывания комплемента USDA предусмотрена инактивация сыворотки в течение 35 минут (Министерство сельского хозяйства США [USDA], 2006). Разведения сыворотки, позитивные при скрининговом исследовании, титруют против двух единиц антигена. Проводят скрининг исследуемых сывороток в разведении 1/5. Сыворотку, которая в этом разведении обеспечивает связывание более чем 50% комплемента, обычно считают положительной.

2.1.3. Антикомплементарная сыворотка

Если при контроле антикомплементарной активности обнаружены лишь следы такой активности, ее можно проигнорировать. Для всех других антикомплементарных сывороток следует выполнить титрование активности. Готовят серийные разведения в двух повторностях, и образцы тестируют повторно, используя антиген *T. equiperdum* в первом ряду и только вероналовый буферный раствор во втором ряду. Полученные для второго ряда результаты показывают титр антикомплементарной реакции. При условии продемонстрированной для первого ряда конечной точки, то есть не менее трех разведений после второго разведения, эффект антикомплементарности можно проигнорировать, и признать образец положительным. Если получены более близкие результаты, следует запросить свежий образец сыворотки. Разведение сыворотки в соотношении 1/2 и термоинактивация в течение 30 минут при $60-63^{\circ}\text{C}$ могут привести к уменьшению или исключению эффекта антикомплементарности.

2.1.4. Буферные растворы и реактивы

Для разведения реактивов и отмывания эритроцитов овцы используют 0,15 М вероналовый буфер, приготовленный на физиологическом растворе, pH 7,4. Антиген предварительно тестируют методом шахматной доски, с последующим использованием 2 единиц антигена при проведении анализа. Комплемент (C) морской свинки проверяют на наличие гемолитической активности и затем разбавляют, чтобы получить 2 единицы для анализа. Эритроциты овцы, находящиеся в растворе Олсвера или ACD-физиологическом растворе трехкратно промывают. 3% раствор используют для гемолитической системы. Протокол USDA предусматривает использование 2% раствора для микротитрования с подтверждением результата анализом 3% раствора эритроцитов в пробирке (USDA, 2006). Титрованную сыворотку кролика против эритроцитов овцы – гемолитическую сыворотку кролика – используют в двойной концентрации гемолитического титра (2 единицы). Перед анализом все исследуемые сыворотки, включая положительную и отрицательную контрольные сыворотки, инактивируют в разведении 1/5.

2.1.5. Первичные разведения

i) Исследуемые сыворотки, положительные и отрицательные контрольные сыворотки разбавляют вероналовым буферным раствором в соотношении 1:5.

ii) Для того чтобы инактивировать комплемент и разрушить антикомлементарные факторы, растворы инкубируют в водяной бане в течение 30 минут при 58°C. Сыворотки осла и мула следует инактивировать в течение 30 минут при температуре 63°C.

2.1.6. Методика скринингового исследования

i) В каждую из трех лунок вносят по 25 мкл исследуемой сыворотки.

ii) В каждую из трех лунок вносят по 25 мкл инактивированной контрольной сыворотки.

iii) Только в первую лунку вносят 25 мкл антигена *T. equiperdum* для каждой сыворотки, разбавленного до содержания 2 единиц.

iv) Только в первые две лунки вносят по 25 мкл комплемента для каждой сыворотки, разбавленного до содержания 2 единиц.

v) Во вторую лунку добавляют 25 мкл вероналового буферного раствора, pH 7,4, для каждой сыворотки (лунка с антикомлементарной активностью).

vi) В третью лунку добавляют 50 мкл вероналового буферного раствора, pH 7,4, для каждой сыворотки (лунка с лизирующей активностью).

vii) Готовят контроль комплемента.

viii) Планшет встряхивают на микрошейкере для достаточного перемешивания реактивов.

ix) Планшет инкубируют в течение 1 часа на водяной бане, в термостате или влажной камере при 37°C.

x) Готовят гемолитическую систему. После первых 50 минут инкубации эритроциты овцы сенсibiliзуют, смешивая равные объемы кроличьей гемолитической сыворотки, разбавленной до содержания 2 единиц в 50 мкл, и 3% суспензии отмытых эритроцитов; раствор тщательно перемешивают и инкубируют в течение 10 минут при 37°C.

xi) После инкубации в каждую лунку добавляют по 50 мкл гемолитической системы.

xii) Планшет встряхивают на микрошейкере для достаточного перемешивания реактивов.

xiii) Планшет инкубируют в течение 30 минут при 37°C. Для облегчения регистрации результатов планшеты можно отцентрифугировать после инкубации.

xiv) *Регистрация результатов:* Под планшет помещают источник света и рассматривают его сверху. Связывание комплемента в каждой лунке оценивают по приблизительному проценту нелизированных клеток. Степень связывания выражают как 0, 1+, 2+, 3+, 4+ (0%, 25%, 50%, 75% или 100% нелизированных клеток). Реакции интерпретируют следующим образом: 4+, 3+, 2+ = положительная, 1+ = сомнительная, следы = отрицательная, полный гемолиз = отрицательная.

xv) *Титрование до конечной точки:* Выполняют серийные двукратные разведения всех сывороток, для которых получены положительные результаты при разведении 1/5, и

проводят анализ в соответствии с описанной выше методикой титрования до конечной точки.

2.2. Непрямая реакция флуоресцирующих антител

Можно также использовать НРФА (MAFF, 1986) в качестве подтверждающего метода анализа или для окончательного решения в случае неопределенного результата. Анализ проводится следующим образом:

2.2.1. Антиген

(Способ получения антигена для РСК описан в разделе В.2.1). Кровь животного, у которого продолжает увеличиваться численность трипаносом (в поле микроскопа 10x40 должно присутствовать более 10 паразитов), собирают в гепаринизированные вакутейнеры или в раствор цитрата-декстрозы.

i) Кровь центрифугируют в течение 10 минут при 800 *g*.

ii) К эритроцитарной массе добавляют 1-2 раствора PBS, смесь перемешивают и готовят мазки, равномерно покрывая ими всю поверхность предметного стекла.

iii) Мазки высушивают на воздухе, затем по 4 стекла складывают стопкой и заворачивают в бумагу таким образом, чтобы каждое стекло было изолировано. Стопки стекол заворачивают в алюминиевую фольгу, запечатывают в герметичный контейнер с вложенным силикагелем и хранят при температуре от -20°C или -80°C.

iv) При хранении при -20°C предметные препараты на предметных стеклах должны сохранять активность в течение 1 года; при хранении при -80°C препараты пригодны для использования в течение более длительного времени.

2.2.2. Раствор цитрата-декстрозы

Используют в количестве 15 мл на 100 мл крови.

2.2.3. Конъюгат

Флуоресцентно меченые антилошадиные иммуноглобулины овцы.

2.2.4. Методика

i) Предметные стекла с антигеном выдерживают в эксикаторе до достижения комнатной температуры. Альтернативный метод заключается в использовании стекол сразу после извлечения их из морозильной камеры и фиксации в ацетоне в течение 15 минут.

ii) Стекла подписывают.

iii) Наносят отдельные точки исследуемой сыворотки, разбавленной раствором PBS, и стекла инкубируют во влажной камере в течение 30 минут при температуре окружающей среды.

iv) Стекла троекратно промывают раствором PBS, pH 7.2, при 5-минутной продолжительности каждой промывки, и сушат на воздухе.

v) Добавляют флуоресцентно меченый конъюгат в правильном разведении. Следует выполнить титрование индивидуальных партий антигена и конъюгата относительно друг друга, используя контрольную сыворотку для оптимизации разведения конъюгата. Стекла инкубируют во влажной камере в течение 30 минут при температуре окружающей среды.

vi) Стекла тоекратно промывают раствором PBS, при 5-минутной продолжительности каждой промывки, и сушат на воздухе. Альтернативный способ уменьшения фоновой флуоресценции заключается в контр-окрашивании красителем Эванса синим (0,01% в дистиллированной воде) в течение 1 минуты, промыванием в растворе PBS с последующим высушиванием на воздухе.

vii) Стекла заключают в смесь глицерин/PBS (50/50), иммерсионное масло (коммерческое, нефлуоресцирующее) или в заливочную среду для окраски флуоресцирующим красителем (коммерческим препаратом).

viii) После этого стекла изучают при УФ-свете. Работают в отраженном свете при использовании подходящего набора фильтров. Препараты на предметных стеклах могут храниться в течение 4-5 дней при температуре 4°C. Обычно положительной считают сыворотку, которая в разведениях 1/80 и демонстрирует выраженную флуоресценцию паразитов. Для оценки интенсивности флуоресценции наблюдателю необходимо иметь достаточный опыт.

В каждую партию анализов следует включать стандартные положительные и отрицательные контрольные сыворотки, и при оценке результатов, полученных с исследуемой сывороткой, следует учитывать характерную флуоресценции, наблюдаемую при использовании этих контрольных сывороток.

2.3. Твердофазный иммуоферментный анализ (ИФА)

Разработан метод твердофазного ИФА и выполнено его сравнение с серологическими исследованиями, применяемыми для диагностики случной болезни (Bundesinstitut fQr Gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinarmedizin, 1995; Wassall *et al.*, 1991).

Карбонатный буферный раствор, pH 9,6, для нанесения антигена на титрационные микропланшеты: Na₂CO₃ (1,59 г); NaHCO₃ (2,93 г); и дистиллированная вода (1 литр). Альтернативно для приготовления раствора антигена можно использовать фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) (KH₂PO (0,2 г); Na₂HPO₄ x 12 H₂O (2,94 г); NaCl (8.0 г); KCl (0,2 г в 1 литре дистиллированной воды)).

2.3.1. Блокирующий буферный раствор

Карбонатный буфер + 3% фетальной телячьей сыворотки (FCS), или PBS + 1% (отношение массы к объему) казеина.

2.3.2. Отмывочный раствор PBS, pH 7.4, с Твином 20 (PBST)

PBS + 0.05% (отношение объемов) Твин 20.

2.3.3. Буферный раствор для разведения образца и конъюгата

PBST + 6% FCS, или PBS + 1% (отношение массы к объему) казеина.

2.3.4. Цитрат-фосфатный буферный раствор

Моногидрат лимонной кислоты (4,2 г в 200 мл дистиллированной воды); Na₂HPO₄ x 12 H₂O (в 200 мл дистиллированной воды). Смешивают равные объемы этих компонентов.

2.3.5. Система субстрат-индикатор

ABTS (2,2'-азино-бис-[3-этилбензотиазолин-6-сульфоная кислота) (коммерческий препарат).

2.3.6. Конъюгат

Антилошадиный IgG (H+L) кролика - пероксидаза или антилошадиный IgY - пероксидаза.

2.3.7. Антиген

Способ получения антигена для РСК описан в разделе В.2.1В.2.1.

2.3.8. Методика

i) В лунки, расположенные в колонках 2, 4, 6 и т.д. вносят по 100 мкл антигена (2 мкг/мл), в лунки в колонках 1, 3, 5 и т.д. вносят такое же количество карбонатного буферного раствора или PBS. Планшет инкубируют в течение 40 минут при 37°C (или в течение ночи при 4°C) во влажной камере, после чего в каждую лунку вносят по 300 мкл блокирующего буферного раствора. Планшет инкубируют в течение 1 часа при температуре окружающей среды, трехкратно промывают раствором PBST, выдерживая с промывочным раствором по 3 минуты в каждом цикле.

ii) В лунки с антигеном и без антигена вносят параллельно по 150 мкл исследуемого образца и контрольной лошадиной сыворотки, разбавленной в отношении 1/100 буферным раствором для образца/конъюгата. Планшет инкубируют в течение 1 часа, затем трехкратно промывают раствором PBST.

iii) Во все лунки вносят по 150 мкл конъюгата, надлежащим образом разбавленного буферным раствором для образца/конъюгата. Планшет инкубируют в течение 1 часа с последующим промыванием, как описано выше.

iv) Во все лунки вносят по 150 мкл системы субстрат-индикатор и инкубируют в течение 1 часа.

v) Планшет встряхивают в течение 10 секунд и регистрируют результаты на фотометре при длине волны 415 нм.

vi) *Расчет результатов*: чистая экстинкция = оптическая плотность (с антигеном) минус оптическая плотность (без антигена). Реакцию, для которой чистая экстинкция превышает 0,3, считают положительным результатом.

В каждую серию испытаний следует включить стандартные положительные и отрицательные контрольные сыворотки.

Также описано применение конкурентного твердофазного ИФА для детекции антител к *T. equiperdum* (Katz *et al.*, 2000).

2.4. Другие серологические реакции

Применялись другие серологические методы, включая радиоиммуноанализ, противоточный иммуноэлектрофорез и иммунодиффузия в агаровом геле (ИДАГ) (Caporale *et al.*, 1981; Hagebock *et al.*, 1993). ИДАГ применяется для подтверждения положительных результатов и тестирования антикомплементарных сывороток. Используется 7-луночная схема и 0,8% раствор агарозы в Трис-буфере; антиген, использованный в РСК, вносят в центральную лунку, положительные контрольные сыворотки и неизвестные сыворотки вносят поочередно в периферические лунки. Описано применение этого метода в сочетании с иммуноблоттингом для одновременной диагностики пироплазмоза лошадей, сапа и случной болезни (Katz *et al.*, 1999). Разработана карточная агглютинационная проба, превосходящая по своим характеристикам РСК (Claes *et al.*, 2005).

3. Подтвержденный случай случной болезни

В случае позитивного результата серологической реакции и после клинического обследования: серологические исследования повторяют дважды с интервалом 15-20 дней и проводят точное эпидемиологическое исследование.

Подтвержденный случай случной болезни определяют следующим образом: животное с положительным результатом РСК, или НРФА, или ПЦР и (i) с типичными клиническими признаками случной болезни, или (ii) продемонстрировавшее повышение серологического титра в двух последовательных испытаниях методом РСК, или (iii) эпидемиологически связанное с подтвержденным случаем случной болезни (Calistri *et al.*, 2013).

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

Вакцины против этого заболевания отсутствуют.

ЛИТЕРАТУРА

BARNER R.D. (1963). Protozoal diseases. *In: Equine Medicine and Surgery*, Bone J.F. *et al.*, eds. American Veterinary Publications, Santa Barbara, California, USA, 205–210.

BUNDESINSTITUT FÜR GESUNDHEITLICHEN VERBRAUCHERSCHUTZ UND VETERINÄRMEDIZIN (Federal Institute for Consumer Health Protection and Veterinary Medicine) (1995). Working Protocols: ELISA on Dourine. BgVV. P.O. Box 33 00 13, D-14191 Berlin, Germany.

BÜSCHER P., NGOYI D.M., KABORÉ J., LEJON V., ROBAYS J., JAMONNEAU V., BEBRONNE N., VAN DER VEKEN W. & BIÉLER S. (2009) Improved models of mini anion exchange centrifugation technique (mAECT) and modified single centrifugation (MSC) for sleeping sickness diagnosis and staging. *PLoS Negl. Trop. Dis*, **3**, e471.

CALISTRI P., NARCISI V., ATZENI M., DE MASSIS F., TITTARELLI M., MERCANTE M.T., RUGGIERI E. & SCACCHIA M. (2013) Dourine re-emergence in Italy. *J. Equine Vet. Sci.*, **33**, 83–89.

CAPORALE V.P., BIANCIFIORI F., DI MATTEO A., NANNINI D. & URBANI G. (1981). Comparison of various tests for the serological diagnosis of *Trypanosoma equiperdum* infection in the horse. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*, **4**, 243–246.

CLAES F., AGBO E.C., RADWANSKA M., TE PAS M.F., BALTZ T., DE WAAL D.T., GODDEERIS B.M., CLAASSEN E. & BUSCHER P. (2003). How does *T. equiperdum* fit into the *Trypanozoon* genus? A cluster analysis and multiplex genotyping approach. *Parasitol*, **126**, 425–431.

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

HAGEBOCK J.M., CHIEVES L., FRERICHS W.M. & MILLER C.D. (1993). Evaluation of agar gel immunodiffusion and indirect fluorescent antibody assays as supplemental tests for dourine in equids. *Am. J. Vet. Res*, **54**, 1201–1208.

HAGOS A., DEGEFA G., YACOB H., FIKRU R., ALEMU T., FESEHA G., CLAES F. & GODDEERIS B.M. (2010) Seroepidemiological survey of *Trypanozoon* infection in horses in the suspected dourine-infected Bale highlands of the Oromia region, Ethiopia. *Rev. Sci. Tech*, **29**, 649–654.

HEISCH R.B., KILLICK-KENDRICK R., GUY M.W. & DORRELL J. (1970). The development of trypanosomes, *Leishmania* and ascetic tumor cells in the testicles of laboratory animals. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*, **64**, 679–682.

HENNING M.W. (1955). *Animal Diseases in South Africa*, Third Edition. Central News Agency, South Africa.

HERR S., HUCHZERMAYER H.F.K.A., TE BRUGGE L.A., WILLIAMSON C.C., ROOS J.A. & SCHIELE G.J. (1985). The use of a single complement fixation technique in bovine brucellosis, Johne's disease, dourine, equine piroplasmiasis and Q fever serology. *Onderstepoort J. Vet. Res*, **52**, 279–282.

HOARE C.A. (1972). *The Trypanosomes of Mammals*. A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford & Edinburgh, UK.

KATZ J.B., CHIEVES L.P., HENNAGER S.G., NICHOLSON J.M., FISHER T.A. & BYERS P.E. (1999). Serodiagnosis of equine piroplasmiasis, dourine and glanders using an arrayed immunoblotting method. *J. Vet. Diagn. Invest*, **11**, 292–294.

KATZ J.B., DEWALD R. & NICHOLSON J. (2000). Procedurally similar competitive immunoassay systems for the serodiagnosis of *Babesia equi*, *Babesia caballi*, *Trypanosoma equiperdum* and *Burkholderia mallei* infection in horses. *J. Vet. Diagn. Invest*, **12**, 46–50.

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

LI F.J., GASSER R.B., LAI D-H., CLAES F., ZHU X-Q. & LUN Z-R. (2007) PCR approach for the detection of *Trypanosoma brucei* and *T. equiperdum* and their differentiation from *T. evansi* based on maxicircle kinetoplast DNA. *Mol. Cell. Probes*, **21**, 1–7.

LUN Z-R., BRUN R. & GIBSON W. (1992) Kinetoplast DNA and molecular karyotypes of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum* from China. *Mol. Biochem. Parasitol*, **50**, 189–196.

MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD (1986). *A Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques*, Third Edition. Her Majesty's Stationery Office, London, UK.

PARKIN B.S. (1948) The demonstration and transmission of the South African strain of *Trypanosoma equiperdum* of horses. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind*, **23**, 41–57.

PASCUCCI I., DI PROVVIDO, A., CAMMÀ C., DI FRANCESCO G., CALISTRI P., TITTARELLI M., FERRI N., SCACCHIA M. & CAPORALE V. (2013). Diagnosis of dourine outbreaks in Italy. *Vet. Parasitol.*, **193**, 30–38.

PERRONE T.M., GONZATTI M.I., VILLAMIZAR G., ESCALANTE A. & ASO P.M. (2009). Molecular profiles of Venezuelan isolates of *Trypanosoma sp.* by random amplified polymorphic DNA method. *Vet. Parasitol*, **161**, 194–200.

ROUGET J. (1896). Contribution à l'étude du trypanosome des mammifères. *Annales Inst. Pasteur*, **10**, 716–728.

SCACCHIA M., CAMMÀ C., DI FRANCESCO G., DI PROVVIDO A., GIUNTA R., LUCIANI M., MARINO A.M.F., PASCUCCI I. & CAPORALE V. (2011) A clinical case of dourine in an outbreak in Italy. *Vet. Ital*, **47**, 473–475.

SCHNEIDER G. & BUFFARD M. (1900) Le trypanosome de la dourine. *Arch. Parasitol*, **3**, 124–133.

SOLDINI M. (1939) Procédé rapide et pratique pour le diagnostic expérimental de la Dourine. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **32**, 334–341.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (2006). Complement Fixation Test for Detection of Antibodies to *Trypanosoma equiperdum* – Microtitration Test. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, USA.

WASSALL D.A., GREGORY R.J.F. & PHIPPS L.P. (1991). Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of dourine. *Vet. Parasitol*, **39**, 233–239.

WATSON A.E. (1920). Dourine in Canada 1904–1920. History, Research and Suppression. Dominion of Canada Department of Agriculture, Health of Animals Branch, Ottawa, Canada.

WOO P.T.K. (1970) The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Trop*, **27**, 384–386.

*
* *

ВНИМАНИЕ: Существуют Справочные лаборатории МЭБ по диагностике случной болезни (см. таблицу, приведенную в части 4 настоящего *Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных* или посетите веб-сайт МЭБ для получения актуального списка лабораторий: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения более подробной информации, касающейся тестов и реагентов для диагностики случной болезни, просим Вас обращаться в Справочные лаборатории МЭБ.