

ГЛАВА 3.5.8.

ПИРОПЛАЗМОЗ ЛОШАДЕЙ

РЕЗЮМЕ

Пироплазмоз лошадей – это передаваемое клещами протозойное заболевание, поражающее лошадей, мулов, ослов и зебр. Его возбудителями являются кровепаразиты под названиями *Theileria equi* и *Babesia caballi*. *Theileria equi* была ранее известна как *Babesia equi*. Инфицированные животные очень длительно могут оставаться носителями этих паразитов и служить источником инфекции для клещей, которые действуют как переносчики.

Попадание животных-носителей инфекции в такие области, где распространены клещи-переносчики, может привести к эпизоотическому распространению болезни.

Идентификация возбудителя: Инфицированные лошади могут быть выявлены в острой фазе болезни посредством обнаружения паразитов в мазках крови или органных тканей. Лучшие результаты дают методы окраски типа Романовского, например, Гимза. У животных-носителей низкий уровень паразитемии делает обнаружение паразитов чрезвычайно трудным, особенно в случае инфекции *B. caballi*, хотя иногда их присутствие можно продемонстрировать по методике толстой капли крови.

Диагностическим признаком инфекции *B. caballi* являются спаренные мерозоиты, соединенные задними концами. Паразиты в эритроцитах имеют размер 2×5 мкм. Мерозоиты *T. equi* имеют длину менее 2-3 мкм и грушевидную, округлую или яйцевидную форму. Характерной особенностью *T. equi* является специфическая расстановка четырех грушевидных мерозоитов, которые формируют тетраду, известную под названием «мальтийский крест».

Были разработаны и продолжают свое развитие молекулярные методики для обнаружения *T. equi* и *B. caballi*, которые основаны на видоспецифической полимеразной цепной реакции (ПЦР), нацеленной на ген рибосомной РНК 18S, а также гены BC48 (*B. caballi*) и Европейское валютное ЕМА-1 (*T. equi*). Было показано, что эти тесты обладают высокой специфичностью и чувствительностью, благодаря чему они обещают играть все большую роль в диагностике инфекций. Важно, что специфичность ПЦР можно определить без оценки молекулярной массы ампликонов. Также доступны гибридизация со специфическими зондами, анализ рестрикционной эндонуклеазы и секвенирование ампликонов.

Серологические тесты: Инфекцию у животных-носителей лучше всего можно продемонстрировать посредством анализа их сывороток на присутствие специфических антител.

В настоящее время основными тестами, используемыми для отбора лошадей на импорт, являются непрямая реакция флюоресцирующих антител (НРФА [IFAT]) и конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ (К-ИФА). Реакция связывания комплемента (РСК), которая много лет была основным тестом, заменена в этой роли НРФА и К-ИФА. Эти тесты оказались более эффективными при обнаружении давно инфицированных животных и животных, леченых противопаразитарными препаратами; такие животные могут давать отрицательную РСК, по-прежнему оставаясь инфицированными. Было показано, что НРФА и К-ИФА высокоспецифичны для каждого из двух биологических видов, являющихся возбудителями пироплазмоза. Одна проблема, связанная с НРФА, заключается в потребности разведения сывороток для того, чтобы уменьшить неспецифическое связывание и последующий фоновый шум, что

может помешать идентификации внутриэритроцитарных паразитов. Разведения сывороток для повышения специфичности приводят к снижению чувствительности ИФА. Непрямые ИФА с использованием в диагностических анализах рекомбинантных белков мерозоитов *T. equi* и *B. caballi* оказались очень перспективными в точном выявлении инфекции пироплазмоза лошадей.

Потребность в вакцинах: Доступных вакцин не существует.

А. ВВЕДЕНИЕ

Пироплазмоз лошадей – это передаваемое клещами протозойное заболевание, поражающее лошадей, мулов, ослов и зебр. Недавно эта инфекция была описана у верблюдов (Sloboda *et al.*, 2011). Возбудителями пироплазмоза лошадей являются *Theileria equi* и *Babesia caballi*. Приблизительно четырнадцать видов иксодовых из родов, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* и *Hyalomma* были идентифицированы как трансстадийные переносчики *B. caballi* и *T. equi*, причем восемь из этих видов также могут передавать инфекцию *B. caballi* трансвариально (De Waal, 1992). Инфицированные животные очень долго могут оставаться носителями этих кровепаразитов и служить источником инфекции для клещей-переносчиков.

Паразиты встречаются в южной Европе, в Азии, в странах СНГ, в Африке, на Кубе, в Южной и Центральной Америке, а также в некоторых штатах на юге США. *Theileria equi* также была описана в публикации из Австралии (но, по-видимому, никогда не имела особого значения в этом регионе), и теперь полагают, что этот кровепаразит имеет более широкое общее распространение, чем *B. caballi*.

В ходе жизненного цикла *Babesia*, спорозоиты сначала проникают в эритроциты, где они преобразуются в трофозоиты. В этой ситуации трофозоиты растут и делятся на два округлых, овальных или грушевидных мерозоита. Зрелые мерозоиты способны к инфицированию новых эритроцитов, а затем процесс деления повторяется.

У *Babesia caballi* мерозоиты в эритроцитах имеют грушевидную форму, длину 2-5 мкм и диаметр 1,3-3,0 мкм (Levine, 1985). Спаренные мерозоиты, соединенные задними концами, считаются диагностическим признаком инфекции *B. caballi*.

У *Theileria equi*, мерозоиты этого организма относительно малы, имея длину менее 2-3 мкм (Levine, 1985), а также грушевидную, округлую или яйцевидную форму. Характерной особенностью *T. equi* является выстраивание четырех грушевидных мерозоитов, имеющих длину порядка 2 мкм, в тетраду, известную под названием «мальтийский крест» (Holbrook *et al.*, 1968).

При инфекции *T. equi* было показано, что спорозоиты, попавшие в организм лошадей через укус клеща, проникают в лимфоциты (Schein *et al.*, 1981). Спорозоиты проходят развитие в цитоплазме этих лимфоцитов и в конечном итоге формируют *Theileria*-подобные шизонты. Мерозоиты, вышедшие из этих шизонтов, проникают в эритроциты. Также была описана вертикальная передача *T. equi* от кобылы жеребенку (Allsopp *et al.*, 2007). При экспериментальной инфекции *T. equi* были обнаружены не только в крови, но и в других тканях, например, в печени, селезенке, легких и костном мозге (Alhassan *et al.*, 2007).

Таксономическое положение *T. equi* было противоречиво, и лишь относительно недавно этот вид был повторно описан как *Theileria* (Mehlhorn & Schein, 1998). Дальнейшее

подтверждение близкого родства с видами *Theileria* также можно получить из гомологии, найденной между поверхностными белками *T. equi* 30 и 34 кДа и примерно такими же по размеру белками различных видов *Theileria*. (Knowles *et al.*, 1997). Однако положение *T. equi* на филогенетическом древе, основанное на маленьких субъединицах генах рибосомной РНК, изменчиво и, главным образом, выглядит как сестринская филогенетическая ветвь тейлерид (Criado-Fornelio *et al.*, 2003), заставляя некоторых исследователей предположить, что *T. equi* является предком тейлерид (Criado-Fornelio *et al.*, 2003) или целой иной филогенетической группы (Allsopp *et al.*, 1994). Завершение анализа генома *T. equi* поддержало его филогенетическое положение как сестринского таксона по отношению к видам *Theileria*. (Karrmeier *et al.*, 2012). Разнородность последовательностей существует как у *B. caballi*, так и у *T. equi*, что потенциально может повлиять на интерпретацию тестов молекулярной диагностики.

Клинические признаки пироплазмоза лошадей часто носят неопределенный характер, из-за чего эту болезнь легко перепутать с другими патологическими состояниями. Пироплазмоз может протекать в молниеносной, острой и хронической формах. Острые случаи наиболее часты и характеризуются высокой температурой, обычно превышающей 40°C, снижением аппетита и недомоганием, повышенной частотой дыхания и пульса, гиперемией слизистых оболочек и фекальными шариками, которые меньше и суше по сравнению с нормальными испражнениями.

Клинические признаки подострых случаев сходны с вышеописанными. Кроме того, пораженные животные теряют в весе и время от времени лихорадят. Цвет слизистых оболочек варьируются от бледно-розового до розового, или бледно-желтого до ярко-желтого. На слизистых оболочках также могут быть видны петехии и/или экхимозы. Нормальная кишечная перистальтика может быть немного заторможена, и у животных могут наблюдаться симптомы умеренной колики. Иногда развивается легкая отечная припухлость периферических отделов конечностей.

Хронические случаи обычно представляют неопределенную клиническую картину, в частности, умеренное снижение аппетита, ухудшение рабочей выносливости и потерю веса. При ректальном исследовании обычно обнаруживают увеличение селезенки. Описана редкая молниеносная форма, когда лошадей находят уже мертвыми или умирающими.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДИКИ

Таблица 1. Методы исследований, применяемые для диагностики пироплазмоза лошадей и их целевой назначение

Метод	Целевое назначение					
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельных животных	Вклад в политику искоренения	Подтверждение клинических случаев	Надзор за распространением инфекции	Иммунный статус отдельных животных или популяций после вакцинации
Идентификация возбудителя¹						
Микроскопичес	-	+	-	++	+	нп

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

кое исследование						
ПЦР	+++	+++	+++	+++	+++	нп
Обнаружение иммунного ответа						
НРФА	++	++	++	+++	++	нп
К-ИФА	+++	+++	+++	+++	+++	нп
РСК	+	+	+	+	+	нп

Пояснение: +++ = рекомендованный метод; ++ = приемлемый метод; + = может быть использован в некоторых ситуациях, но применение существенно ограничено стоимостью, достоверностью или другими факторами;
– = не подходит для данной цели; нп = не применимо.

Хотя не все тесты, относящиеся к категории +++ или ++ формально валидированы, они признаны приемлемыми по причине применения их в установившейся практике и широкого использования без неоднозначных результатов.

ПЦР = полимеразная цепная реакция; НРФА = непрямая реакция флюоресцирующих антител; К-ИФА = конкурентный твердофазный иммуоферментный анализ; РСК = реакция связывания комплемента.

1. Идентификация возбудителя

Инфицированные лошади могут быть выявлены в острой фазе болезни посредством обнаружения паразитов в окрашенной крови, в оптимальном варианте собранной из поверхностных кожных капилляров, или из мазков органных тканей. Лучшие результаты обычно дают методы окраски типа Романовского, например, метод Гимза. Однако даже в острых клинических случаях инфекции *B. caballi* уровень паразитемии очень низок и ее трудно обнаружить. Для того чтобы диагностировать очень низкую паразитемию, опытные исследователи иногда используют метод толстой капли крови. Толстые пленки получают, поместив небольшую каплю крови (приблизительно 50 мкл) на чисто предметное стекло, которое затем высушивают на воздухе, фиксируют теплом при 80°C в течение 5 минут и окрашивают в 5% рабочем растворе Гимза в течение 20-30 минут.

Иногда желательна точная идентификация биологического вида паразитов, поскольку довольно часто встречаются смешанные инфекции *T. equi* и *B. caballi*.

Идентификация пироплазмоза лошадей у животных-носителей в мазке крови не только очень сложна, но и не слишком точна, поэтому предпочтительны серологические методы (см. ниже). Однако серологические тесты могут давать как ложноотрицательные, так и ложноположительные результаты (Tenter & Freidhoff, 1986). В таких случаях было предложено использовать в качестве дополнительных диагностических процедур введение цельной крови интактной лошади или кормление клеща на подозрительном животном. Однако эти методики обременительны, дороги и занимают много времени. Кроме того, важно отметить, что необходимость получения диагностической информации сопряжена с проблемой защиты животных, поэтому всегда надо взвешивать риск и выгоды.

Альтернативным дополнением к вышеописанным методам идентификации носителей паразитов может быть успешное получение *in-vitro* культур *T. equi* и *B. caballi*. Паразиты *Babesia caballi* были успешно культивированы из крови двух лошадей давших отрицательный результат в реакции связывания комплемента (РСК) (Holman *et al.*, 1993). Точно так же *T. equi* можно было культивировать от лошадей, которые не демонстрировали явной паразитемии в начальный момент постановки культур (Zweygarth *et al.*, 1997).

Были описаны молекулярные методики выявления *T. equi* и *B. caballi*. Эти методики основаны на видоспецифической полимеразной цепной реакции (ПЦР), нацеленной, главным образом, на ген 18S рибосомной РНК (Criado-Fornelio *et al.*, 2003). Дальнейшие усовершенствования методики включают гнездовую ПЦР (Rampersad *et al.*, 2003), петлевую изотермическую амплификацию (ПИА/LAMP) (Alhassan *et al.*, 2007) с увеличенной чувствительностью, описанной в литературе, высокочувствительную блот-гибридизацию с обратной линией (БГОЛ/RLB) и мультиплексную ПЦР для одновременного обнаружения и идентификации биологических видов *Theileria u Babesia* у лошадей (Alhassan *et al.*, 2005). Расшифровка генома *T. equi* дает нам дополнительные возможности для улучшения и расширения спектра диагностических методик, позволяющих обнаружить этого паразита (Karrmeier *et al.*, 2012).

2. Серологические тесты

Чрезвычайно трудно диагностировать микроорганизмы у животных-носителей посредством микроскопического исследования мазков крови. Кроме того, это никоим образом не практикуется в больших масштабах. Поэтому серологическое тестирование животных рекомендуется как предпочтительный метод диагностики, особенно в тех случаях, когда лошади предназначены для импорта в страны, где это заболевание не встречается, но присутствует промежуточный переносчик инфекции.

Образцы сывороток необходимо собирать и посылать в диагностические лаборатории в соответствии с техническими требованиями этих лабораторий. Лошадей, предназначенных для экспорта, которые были подвергнуты серологическим анализам и оказались свободными от инфекции, необходимо содержать в местах, изолированных от клещей, чтобы предотвратить случайное инфицирование.

Для диагностики пироплазмоза использовались многие серологические методики, включая РСК, непрямую реакцию флюоресцирующих антител (НРФА) и твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). В дополнение к этому недавно также был описан довольно простой и быстрый иммунохроматографический тест на *T. equi*, который может оказаться очень полезным подспорьем при массовом скрининге образцов сыворотки (Huang *et al.*, 2004).

2.1. Непрямая реакция флюоресцирующих антител

Методика НРФА была успешно применена в дифференциальной диагностике инфекций *T. equi* и *B. caballi* (Madden & Holbrook, 1968). Распознать строго положительную реакцию довольно просто, но любое дифференцирование между слабоположительными и отрицательными реакциями требует значительного опыта в интерпретации результатов анализа. Подробное описание протокола НРФА представлено в публикации Madden & Holbrook, 1968. Одна проблема, связанная с НРФА, заключается в потребности разведения сывороток для того, чтобы уменьшить неспецифическое связывание и последующий фоновый шум, что может помешать идентификации внутриэритроцитарных паразитов. Разведения сывороток для повышения специфичности приводят к снижению чувствительности НРФА. Пример протокола НРФА будет приведен ниже.

2.1.1. Получение антигена

Кровь для получения антигена берут у лошадей с нарастающей паразитемией, в идеальном варианте на уровне 2-5%. Животные-носители, которые ранее вырабатывали антитела, не подходят для выработки антигена. В альтернативном варианте паразиты, культивированные *in vitro*, могут быть использованы для получения препаратов антигенов на предметных стеклах во избежание контаминации инфицированных эритроцитов антителами и для постоянной доставки инфицированных эритроцитов, что особенно

важно в отношении *B. cabalii*. Кровь (около 15 мл) собирают в 235 мл забуференного фосфатом физиологического раствора (ЗФФР/PBS), pH 7,2. Эритроциты троекратно отмывают в холодном ЗФФР (1000 г) в течение 10 минут при 4°C. После каждого отмывания удаляют надосадочную жидкость и слой лейкоцитов. По окончании последнего отмывания уплотненные эритроциты восстанавливают до начального объема при помощи 4% фракции V бычьего сывороточного альбумина ЗФФР, то есть, исходный объем уплотненных клеток = 30% так, чтобы одна треть состояла из эритроцитов. Если исходный объем эритроцитов равен 15 мл, то 5 мл уплотненных эритроцитов + 10 мл 4% бычьего альбумина в ЗФФР составляют антиген. После тщательного перемешивания антиген помещают в подготовленные ячейки на предметном стекле (по типу планшета) при помощи шаблона или шприца. В альтернативном варианте клетки можно гладко распластать на предметных стеклах для микроскопии, покрывая все стекло ровной, умеренно толстой пленкой. Этим стеклам позволяют высохнуть, заворачивают их в мягкую бумагу и запечатывают в пластиковых пакетах или обертывают алюминиевой фольгой и хранят при -20°C до 1 года.

2.1.2. Процедура тестирования

i) Каждый образец сыворотки тестируют на антиген *B. caballi* и *T. equi*.

ii) Перед использованием стекла с замороженным антигеном извлекают из хранилища с температурой -20°C и инкубируют при 37°C в течение 10 минут.

iii) Затем с мазков антигена удаляют защитную крышку и фиксируют их холодным сухим ацетоном (-20°C) в течение 1 минуты. Стекла с антигеном коммерческого изготовления доступны в предварительно зафиксированном состоянии.

iv) Если мазки были подготовлены на всей поверхности стекла, на мазках антигена формируют квадраты (числом 14-21, т.е. 2-3 ряда по 7 квадратов в каждом), разделяя их лаком для ногтей или быстро высыхающей заливочной средой (например, Cystoseal).

v) Тестируемые, положительные и отрицательные контрольные сыворотки разбавляют от 1/80 до 1/1280 в ЗФФР. Отрицательные и положительные контрольные сыворотки включают в каждый анализ.

vi) Сыворотки в соответствующих разведениях (10 мкл каждого) вносят в разные лунки или квадраты на мазках антигена, инкубируют при 37°C в течение 30 минут, несколько раз отмывают в ЗФФР и один раз в воде.

vii) Антилошадиный иммуноглобулин, полученный на кроликах и конъюгированный с флуоресцинизиотиоцианатом (этот конъюгат поступает в продажу) разбавляют в ЗФФР и наносят на мазок, который затем инкубируют и отмывают как ранее.

viii) После заключительного отмывания две капли раствора, содержащего равные части глицерина и ЗФФР, наносят на каждый мазок и накрывают покровным стеклом.

ix) Затем мазок исследуют под микроскопом на выявление флуоресцирующих паразитов. Положительными обычно считают сыворотки в разведении 1/80 или более, демонстрирующие сильную флуоресценцию, уделяя при этом должное внимание характеру флуоресценции положительных и отрицательных контрольных образцов.

2.2. Конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ

Было описано множество рекомбинантных антигенов для применения в ИФА. Рекомбинантные белки *T. equi* (ЕМА-1; ЕМА-2) и *B. caballi* (RAP-1; Bc48) были получены из *Escherichia coli* (Huang *et al.*, 2003; Karpmeier *et al.*, 1999; Knowles *et al.*, 1992) или из клеток насекомых, инфицированных бакуловирусом (Xuan *et al.*, 2001). Рекомбинантные антигены, выработанные в *E. coli* или при помощи бакуловируса, имеют очевидное преимущество, связанное с тем, что отпадает потребность в инфицировании лошадей для получения антигена и устранении перекрестных реакций, которые наблюдались в прошлом с неочищенными антигенами ИФА. Они также обеспечивают постоянный источник антигена для международного распределения и стандартизации.

Непрямые ИФА с использованием ЕМА-2 и Bc48 показали высокую чувствительность и специфичность в обнаружении антител у инфицированных лошадей (Huang *et al.*, 2003; Ikadaï *et al.*, 1999). Начальные результаты этих тестов сулят хорошие перспективы, и их дальнейшая апробация идет полным ходом.

Конкурентный ИФА с торможением (К-ИФА), в котором используются белок ЕМА-1 и специфическое моноклональное антитело, определяющее этот белковый эпитоп на поверхности мерозоида, применяли в К-ИФА для *T. equi* (Knowles *et al.*, 1992). Для этого К-ИФА не важна проблема чистоты антигена, поскольку его специфичность зависит только от специфичности моноклонального антитела к белковому эпитопу *T. equi*. Была продемонстрирована 94%-ная корреляция между К-ИФА и РСК в обнаружении антител к *T. equi*. Сыворотки, которые давали расходящиеся результаты, оценили на их способность к иммунопреципитации меченых 35S-метионином и транслированных *in-vitro* продуктов мРНК мерозоитов *T. equi*. Образцы, которые были положительными по К-ИФА и отрицательными по РСК, четко преципитировали белки *T. equi*. Однако результаты иммунопреципитации с образцами сыворотки, которые были отрицательными по К-ИФА и положительными по РСК, оказались неубедительными (Knowles *et al.*, 1991). Данная методика К-ИФА для *T. equi* также прошла апробацию в Марокко и Израиле, показав совпадение с НРФА 91% и 95,7%, соответственно (Rhalem *et al.*, 2001; Shkar *et al.*, 1998). Была разработана сходная методика К-ИФА с использованием рекомбинантного белка 1 *B. caballi*, ассоциированного с роптриями (RAP-1), и моноклонального антитела, реагирующего с пептидным эпитопом 60 кДа антигена *B. caballi* (Karpmeier *et al.*, 1999). Результаты анализа 302 образцов сыворотки по этой методике К-ИФА и в РСК показали совпадение на уровне 73%. Из 72 образцов, которые были отрицательными по РСК и положительными по К-ИФА, 48 образцов (67%) оказались положительными по НРФА, тогда как положительный ответ по НРФА дали четыре из пяти образцов, положительных по РСК и отрицательных по К-ИФА (Karpmeier *et al.*, 1999).

Был описан и использован для дополнительных аттестационных исследований протокол тестирования для пироплазмоза лошадей по методике К-ИФА (Министерство сельского хозяйства США [USDA], 2005). Наблюдаемая специфичность К-ИФА для *T. equi* и *B. caballi* была определена в диапазоне от 99,2% до 99,5% на материале сывороток от 1000 лошадей предположительно свободных от пироплазмоза. Одна тысяча лошадей иностранного происхождения с неизвестным инфекционным статусом были протестированы по методикам К-ИФА и РСК с выявленной большей чувствительностью К-ИФА по результатам анализа. По результатам исследования было выявлено на 1,1% (*T. equi*) и на 1,3% (*B. caballi*) больше серопозитивных животных по методике К-ИФА, чем по РСК; дополнительные положительные результаты были подтверждены методикой НРФА. В сходном исследовании 645 лошадей иностранного происхождения, проверенных для импорта и предимпортного отбора, где были использованы термообработанные сыворотки (58°C в течение 30 минут), было выявлено на 3,6% (*T. equi*) и 2,1% (*B. caballi*) больше серопозитивных животных по методике К-ИФА, чем по РСК. Результаты обоих

тестов К-ИФА были высоко воспроизводимыми от лунки к лунке, от пластинки к пластинке и день ото дня при общей дисперсии $\pm 1,2\%$ и $\pm 1,6\%$ для *T. equi* и *B. caballi*, соответственно.

Протокол К-ИФА будет представлен ниже.

Подробное описание получения антигена и протокола тестирования было представлено Национальными лабораториями ветеринарной службы (NVSL) министерства сельского хозяйства США (USDA) (2005). В настоящее время в продажу поступает коммерческий набор, основанный на тех же антигенах и моноклональных антителах.

2.2.1. Растворы

i) Посадочный буфер для антигена

Посадочный буфер для антигена в необходимом объеме готовят, исходя из следующего количества ингредиентов в расчете на литр: 2,93 г бикарбоната натрия; 1,59 г карбоната натрия; достаточное количество сверхчистой воды для растворения и доведение объема до 1 литра сверхчистой водой. Проводят подгонку pH до 9,6.

ii) Отмывочный раствор К-ИФА (высокосолевого растворитель)

Отмывочный раствор для К-ИФА в необходимом объеме готовят, исходя из следующего количества ингредиентов в расчете на литр: 29,5 г хлорида натрия; 0,22 г одноосновного фосфата натрия; 1,19 г двухосновного фосфата натрия; 2,0 мл полисорбата твин 20; достаточное количество сверхчистой воды для растворения и доведение объема до 1 литра сверхчистой водой. Раствор хорошо перемешивают. Проводят подгонку pH до 7,4. Раствор стерилизуют в автоклаве при 121°C.

2.2.2. Получение антигена

Замороженную культуру трансформированной *E. coli* высевают в разведении 1/10000 в любой стандартный неселективный бульон для роста бактерий (например, бульон Луриа), содержащий добавленный карбенициллин (100 мкг/мл) и изопропилтиогалактозид (ИПТГ/IPTG, 1 мМ). Культуры инкубируют в установке орбитального шейкера на скорости 200 об/мин при 37°C в течение ночи. Клетки, выращенные в течение ночи, собирают центрифугированием (5000 g в течение 10 минут), отмывают в 50 мМ трис/HCl и 5 мМ буфере этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТУ), pH 8,0, и снова собирают таким же образом. (Антиген доступен по запросу из NVSL, P.O. Box 844, Ames, Iowa 50010, USA.)

Клетки ресуспендируют до 10% первоначального объема в буфере трис/ЭДТУ с добавлением 1 мг/мл лизоцима и инкубируют на льду в течение 20 минут. Затем добавляют детергент нонидет Р-40 (NP-40) до конечной концентрации 1% (объем/объем), перемешивают вихревым способом, и инкубируют смесь на льду в течение 10 минут. После этого материал гомогенизируют на льду ультразвуком (четыре раза по 30 секунд на уровне мощности 100 ватт), выдерживая 2-минутный интервал между сонификациями, чтобы материал оставался холодным. Ультразвуковой гомогенат центрифугируют с ускорением 10000 g в течение 20 минут. Полученную надосадочную жидкость разливают аликвотами по 0,5 мл в пробирки для микроцентрифуги, и этот материал можно хранить при -70°C несколько лет. Присутствие гетерологичных бактериальных антигенов хозяина не мешает связыванию специфичных антител против лошадиного пироплазмоза или парных моноклональных антител с их соответствующими экспрессирующимися рекомбинантным эпитопами антигенов, что подтверждается дальнейшими процедурами. Надосадочные жидкости, содержащие антиген, подвергают контрольной проверке на качество, титруя их с вместе с парными моноклональными антителами и с эталонной

моноспецифической лошадиной антисывороткой для верификации как адекватного уровня экспрессии, так и полной специфичности по отношению к гомологичным видам возбудителей пироплазмоза. Контрольные образцы нормальной (отрицательной) сыворотки не должны мешать связыванию моноклональных антител или положительных эталонных лошадиных сывороток с препаратом экспрессирующегося антигена.

2.2.3. Процедура тестирования

i) Микротитрационные планшеты готовят, покрывая лунки 50 мкл антигена или *T. equi*, или *B. caballi*, растворенного в посадочном буфере антигена. Используемое разведение определяют методиками стандартного серологического титрования. Планшеты плотно закрывают упаковочной лентой, сохраняют в течение ночи при 4°C, и замораживают при -70°C. При этой температуре планшеты можно хранить до 6 месяцев.

ii) Первичное моноклональное антитело против *T. equi* или против *B. caballi*, а также вторичный конъюгат антитело-пероксидаза непосредственно перед использованием в К-ИФА разводят в соответствии с указаниями производителя в буфере-разбавителе антител (поставляется вместе с набором реактивов для теста).

iii) Планшеты оттаивают при комнатной температуре, посадочный раствор сливают, и планшеты дважды промывают отмывочным раствором К-ИФА.

iv) Перед добавлением 50 мкл сывороток в лунки контрольные и испытуемые образцы сыворотки разводят в соотношении 1/2 буфером для разбавления сывороток. Каждый неизвестный образец сыворотки тестируют в одиночных или парных лунках. Положительные контрольные сыворотки и холостые пробы тестируют в двух экземплярах, а отрицательные контрольные сыворотки - в трех экземплярах в разных частях планшета. Планшеты инкубируют закрытыми, при комнатной температуре (21-25°C), в течение 30 минут, во влажной камере, а затем трижды промывают отмывочным раствором К-ИФА.

v) Затем во все лунки вводят по 50 мкл (на каждую лунку) разбавленного первичного моноклонального антитела против *T. equi* или против *B. caballi*. (Моноклональные антитела производят в биореакторе для клеточных культур, и их можно получить по запросу из NVSL, PO. Box 844, Ames, Iowa 50010, USA.) Планшеты инкубируют закрытыми в течение 30 минут, при комнатной температуре (21-25°C), во влажной камере, а затем трижды промывают отмывочным раствором К-ИФА.

vi) В каждую лунку добавляют разведенный вторичный конъюгат пероксидазы с противомышиным IgG (50 мкл на лунку). Планшеты инкубируют закрытыми в течение 30 минут, при комнатной температуре (21-25°C), во влажной камере, а затем трижды промывают отмывочным раствором К-ИФА.

vii) Во все лунки добавляют хромогенный ферментный субстрат (50 мкл на лунку), и планшеты инкубируют в течение 15 минут при комнатной температуре (21-25°C) для развития цвета.

viii) Развитие цвета приостанавливают, добавляя 50 мкл стоп-реагента во все лунки, и немедленно считывают планшеты на сканирующем спектрофотометре.

ix) Считывание планшетов проводят на длине волны 620, 630 или 650 нм (ОП). Среднюю ОП рассчитывают для парных лунок по всем контрольным сывороткам и холостым пробам. Для состоятельного критерия средний показатель по отрицательным

контрольным образцам должен отражать ОП > 0,300 и < 2,000. Средние положительные контрольные сыворотки должны давать ослабление >40%.

х) Средний процентный показатель ослабления [%I] рассчитывают по формуле: $\%I = 100 - [(ОП\ образца \times 100) \div (средняя\ ОП\ отрицательного\ контроля)]$.

xi) Если испытуемые образцы производят ослабление >40%, они считаются положительными. Если испытуемый образец производит ослабление <40%, он считается отрицательным.

2.3. Реакция связывания комплемента

Методику РСК в прошлом использовали в некоторых странах, и она до сих пор широко используется в некоторых регионах для качественного отбора лошадей в целях импорта. В литературе было представлено подробное описание выработки антигена и протокола тестирования (например, USDA, 1997). РСК дает точный результат только для выявления острых инфекций на ранней стадии, показывая при этом хорошую чувствительность и специфичность, но эта методика неспособна выявить всех инфицированных животных, особенно получавших медикаментозное лечение, или тех, которые дают антикомплементарные реакции, а также из-за неспособности IgG(T) (главного изотипа иммуноглобулина лошадей) связывать комплемент морской свинки. Антиген для РСК получают посредством экспериментальной инфекции лошадей, что связано с проблемой благополучия животных. Поэтому вполне вероятно, что в будущем использование методики РСК будет прекращено; НРФА и К-ИФА заменили ее в качестве диагностических тестов, поскольку они в большей степени подходят для индивидуальной сертификации животных перед их транспортировкой, включая международную торговлю.

Пример протокола РСК будет приведен ниже.

2.3.1. Растворы

i) Раствор Олсвера

Для приготовления 1 литра раствора Олсвера 20,5 г глюкозы; 8,0 г цитрата натрия; 4,2 г хлорида натрия растворяют в достаточном количестве дистиллированной воды. Проводят подгонку рН до 6,1, используя лимонную кислоту, и доводят объем до 1 литра дистиллированной водой. Раствор стерилизуют фильтрованием.

ii) Маточный вероналовый буфер (5×)

В 1 литре дистиллированной воды растворяют следующие компоненты: 85,0 г хлорида натрия; 3,75 г 5,5-диэтилбарбитурата натрия; 1,68 г хлорида магния ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$); 0,28 г хлорида кальция. 5,75 г 5,5-диэтилбарбитурата натрия растворяют в 0,5 литре горячей (почти кипящей) дистиллированной воды. Этот кислый раствор охлаждают и добавляют к солевому раствору. Объем раствора доводят до 2 литров дистиллированной водой и хранят при 4°C. Для приготовления рабочего раствора одну часть маточного раствора добавляют к четырем частям дистиллированной воды. Конечный уровень рН должен быть от 7,4 до 7,6.

2.3.2. Получение антигена

Кровь берут от лошадей с высокой паразитемией (например, 3-7% для *B. caballi* и 60-85% для *T. equi*) и смешивают ее с равным объемом раствора Олсвера в качестве антикоагулянта. Надосадочную жидкость плазмы/Олсвера и лейкоцитарную пленку удаляют, осаждая эритроциты на дно флакона. Эритроциты несколько раз отмывают холодным вероналовым буфером, а затем разрушают. Антиген восстанавливают из лизата центрифугированием с ускорением 30900 g в течение 30 минут.

Восстановленный антиген несколько раз отмывают в холодном вероналовом буфере центрифугированием с ускорением 20000 *g* в течение 15 минут. В качестве стабилизатора добавляют поливинилпирролидон 40000 (1-5% в отношении веса к объему), перемешивают материал в магнитной мешалке 30 минут, процеживают его через два слоя стерильной марли, распределяют на порции объемом 2 мл и высушивают сублимацией. Антиген можно хранить при температуре ниже -50°C в течение нескольких лет.

2.3.3. Процедура тестирования

i) Специфичность и мощность каждой партии необходимо сравнивать со стандартными антисыворотками известной специфичности и мощности. Также определяют оптимальные разведения антигена предварительным титрованием в двух направлениях (методом «шахматной доски»).

ii) Испытуемые сыворотки инактивируют в течение 30 минут при 58°C (сыворотки ослов и мулов инактивируют при 62,5°C в течение 35 минут), и анализируют в разведениях от 1/5 до 1/5120. Во всех разведениях используют вероналовый буфер.

iii) Комплемент готовят и титруют спектрофотометрически, чтобы определить 50%-ную гемолитическую дозу (С'Н₅₀) (Stiller *et al.*, 1980), после чего С'Н₅₀ используется в тесте в пять раз. Гемолитическая система состоит из равных частей 2%-ной суспензии овечьих эритроцитов и вероналового буфера пятью минимальными гемолитическими дозами (МГД) гемолизина (комплементсвязывающее антитело) (USDA, 1997). Некоторые лаборатории дважды используют 100%-ную гемолитическую дозу, что обеспечивает эквивалентную чувствительность.

iv) Тест был адаптирован к микротитрационным планшетам (Herr *et al.*, 1985). Общий объем материала в тесте равен 0,125 мл и состоит из равных частей (0,025 мл) антигена, комплемента (пять раз С'Н₅₀) и разбавленной сыворотки. Инкубацию проводят в течение 1 часа при 37°C.

v) Добавляют двойную порцию (0,05 мл) гемолитической системы, и планшеты инкубируют еще 45 минут при 37°C, встряхивая их после 20 минут инкубации.

vi) Планшеты центрифугируют 1 минуту с ускорением 200 *g* перед их считыванием над зеркалом.

vii) В анализе с титром, представляющим самое большое разведение сыворотки, которое дает 50%-ный лизис, такой уровень лизиса регистрируют как положительный. Титр 1/5 рассматривают как положительный. В каждый тест необходимо включать полный комплект контрольных образцов (положительные и отрицательные сыворотки), а также контрольный антиген, приготовленный из эритроцитов здоровой (не инфицированной) лошади.

Антикомплементарные образцы исследуют по методике НРФА. Ослиные сыворотки часто оказываются антикомплементарными.

С. ПОТРЕБНОСТЬ В ВАКЦИНАХ

В настоящее время вакцин не существует.

ЛИТЕРАТУРА

- Alhassan A., Govind Y, Tam, N., Thekisoe O., Yokoyama N., Inoue N. & Igarashi I. (2007). Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and *in vitro* culture methods for the diagnosis of equine piroplasmosis. *Parasitol. Res.*, 100, 1165-1168.
- Alhassan A., Pumidonming W., Okamura M., Hirata H., Battsetseg B., Fujisaki K., Yokoyama N. & Igarashi I. (2005). Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. *Vet. Parasitol.*, 129, 43-49.
- Allsopp M.T., Lewis B.D. & Penzhorn B.L. (2007). [Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals.](#) *Vet Parasitol.*, 148, 130-136.
- Criado-Fornelio A., Martinez-Marcos A., Buling-Sarana A., & Barba-Carretero J.C. (2003). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe: Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Vet. Parasitol.*, 114, 173-194.
- De Waal D.T. (1992). [Equine piroplasmosis: a review.](#) *Br. Vet. J.*, 148, 6-14.
- Herr S., Huchzermeyer 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 test technique in bovine brucellosis, Johne's disease, dourine, equine piroplasmosis and Q fever serology. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 52, 279-282.
- Holbrook A.A., Johnson A.J. & Madden B.S. (1968). Equine piroplasmosis: Intraerythrocytic development of *Babesia caballi* (Nuttall) and *Babesia equi* (Laveran). *Am. J. Vet. Res.*, 29, 297-303.
- Holman P.J., Frerichs W.M., Chieves L. & Wagner G.G. (1993). Culture confirmation of the carrier status of *Babesia caballi*-infected horses. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 698-701.
- Huang X, Xuan X, Xu L, Zhang S, Yokoyama N, Suzuki N, & Igarashi I. (2004). Development of an immunochromatographic test with recombinant EMA-2 for the rapid detection of antibodies against *Babesia equi* in horses. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 359-361.
- Huang X., Xuan X., Yokoyama N., Xu L., Suzuki H., Sugimoto C., Nagasawa H., Fujisaki K. & Igarashi I. (2003). High-level expression and purification of a truncated merozoite antigen-2 of *Babesia equi* in *Escherichia coli* and its potential for immunodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 1147-1151.
- Ikadai H., Xuan X., Igarashi I., Tanaka S., Kanemaru T., Nagasawa H., Fujisaki K., Suzuki N. & Mikami T (1999). Cloning and expression of a 48-kilodalton *Babesia caballi* merozoite rhoptry protein and potential use of the recombinant antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 3475-3480.
- Kappmeyer L.S., Perryman L.E., Hines S.A., Baszler T.V., Katz J.B., Hennager S.G. & Knowles D.P (1999). Detection of equine antibodies to *Babesia caballi* recombinant *B. caballi* rhoptry-associated protein 1 in a competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 2285-2290.

Kappmeyer L.S., Thiagarajan M., Herndon D.R., Ramsay J.D., Caler E., Djikeng A., Gillespie J.J., Lau A.O., Roalson E.H., Silva J.C., Silva M.G., Suarez C.E., Ueti M.W., Nene V.M., Mealey R.H., Knowles D.P. & Brayton K.A. (2012). Comparative genomic analysis and phylogenetic position of *Theileria equi*. *BMC Genomics*, 13, 603.

Knowles D.P., Kappmeyer, L.S. & Perryman L.E. (1997). Genetic and biochemical analysis of erythrocyte-stage surface antigens belonging to a family of highly conserved proteins of *Babesia equi* and *Theileria* species. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 90, 69-79.

Knowles D.P., Kappmeyer, L.S., Stiller D., Hennager S.G. & Perryman L.E. (1992). Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with *Babesia equi*. *J. Clin. Microbiol.*, 30, 3122-3126.

Knowles D.P., Perryman L.E. & Kappmeyer L.S. (1991). Detection of equine antibody to *Babesia equi* merozoite proteins by a monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 2056-2058.

Levine N.D. (1985). *Veterinary protozoology*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
Madden P.A. & Holbrook A.A. (1968). Equine piroplasmiasis: Indirect fluorescent antibody test for *Babesia caballi*. *Am. J. Vet. Res.*, 29, 117-123.

Melhorn H. & Schein E. (1998). Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi*. *Parasitol Res.*, 84, 467-475.

Rampersad J., Cesar E., Campbell M.D., Samlal M. & Ammons D. (2003). A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. *Vet. Parasitol.*, 114, 81-87.

Rhalem A., Sahibi H., Lasri S., Johnson W.C., Kappmeyer L.S., Hamidouch A., Knowles D.P. & Goff W.L. (2001). Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosing *Babesia equi* infections of Moroccan origin and its use in determining the seroprevalence of *B. equi* in Morocco. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 13, 249-251.

Schein E., Rehbein G., Voigt W.P. & Zwegarth E. (1981). *Babesia equi* (Leveran, 1901). Development in horses and in lymphocyte culture. *Tropenmed Parasitol.*, 32, 223-227.

Shkap V., Cohen I., Leibovitz B., Savitsky, Pipano E., Avni G., Shofer S., Giger U., Kappmeyer L. & Knowles D. (1998). Seroprevalence of *Babesia equi* among horses in Israel using competitive inhibition ELISA and IFA assays. *Vet. Parasitol.*, 76, 251-259.

Sloboda M., Jirku M., Lukesová D., Qablan M., Batsukh Z., Fiala I., Horin P, Modry D. & Lukes J. (2011). [A survey for piroplasmids in horses and Bactrian camels in North-Eastern Mongolia](#). *Vet. Parasitol.*, 179, 246-249.

Stiller D., Frerichs W.M., Leach G. & Kuttler K.L. (1980). Transmission of equine babesiosis and bovine anaplasmosis by *Dermacentor albipictus* (Packard) (Acari: Ixodidae). *J. N.Y. Ent. Soc.*, 88, 75-76.

Tenter A.M. & Freidhoff K.T. (1986). Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *B. caballi* infections. *Vet. Parasitol.*, 20, 49-61.

United States Department of Agriculture (USDA) (1997). Complement fixation test for the detection of antibodies to *Babesia caballi* and *Babesia equi* - microtitration test. USDA, Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services, National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, USA.

United States Department of Agriculture (USDA) (2005). Competitive ELISA for Serodiagnosis of Equine Piroplasmiasis (*Babesia equi* and *Babesia caballi*), USDA, Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services, National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, USA.

Xuan X., Larsen A., Idadai H., Tnanka T., Igarashi I., Nagasawa H., Fujisaki K., Toyoda Y, Suzuki N. & Mikami T (2001). Expression of *Babesia equi* merozoite antigen 1 in insect cells by recombinant baculovirus and evaluation of its diagnostic potential in an enzyme-linked immunosorbant assay. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 705-709.

Zweygarth E., Just M.C. & De Waal D.T (1997). *In vitro* cultivation of *Babesia equi*: detection of carrier animals and isolation of parasites. *Onderstepoort J. Vet Res.*, 64, 51-56.

*
* *

ВНИМАНИЕ: Существуют Справочные лаборатории МЭБ по диагностике пироплазмоза лошадей (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 пироплазмоза лошадей, просим Вас обращаться в Справочные лаборатории МЭБ.