

УДК 619:579

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ
ПИРОПЛАЗМИДОЗОВ ЛОШАДЕЙ
THE MOLECULAR DETECTION OF EQUINE PIROPLASMOSIS**

**Т.В. Калашникова, М.М. Кузнецова
T.V. Kalashnikova, M.M. Kuznetsova**

**Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства
Russian Research Institute of Horse Breeding**

Equine piroplasmosis (babesiosis), caused by Babesia caballi and Babesia equi, is an important protozoan disease worldwide from both veterinary and economic viewpoints. Babesia caballi and Babesia equi have overlapping geographical distributions. In such areas, a horse may be infected by both species. The protozoan parasites Babesia equi and Babesia caballi replicates within erythrocytes. During the acute phase of infection, B. equi and B. caballi can reach high levels of parasitemia, resulting in a hemolytic crisis. Horses that recover from the acute phase of the disease remain chronically infected. The significance of the disease is sufficient that carriers of the infection are prohibited from international movement, a requirement that has substantial economic impact. This restriction is based on the presumption that chronically infected horses serve as reservoirs for vector ticks to acquire and subsequently transmit B. equi or B. caballi.

Пироплазмоз – трансмиссивная природно-очаговая инвазия, возбудителями которой являются простейшие из отряда *Piroplasmata*: *Babesia caballi* и *Theileria equi*, паразитирующие в клетках крови. Очаги пироплазмоза привязаны к ареалу его переносчиков – клещей родов *Dermacentor* и *Haemaphysalis*. Пироплазмоз наносит существенный ущерб коневодству, не только в виде непосредственной гибели животных и вынужденного убоя, но и снижения на длительный срок продуктивности и работоспособности, а также затрат на проведение ветеринарно-санитарных и лечебно-профилактических мероприятий. Диагностика на наличие в крови лошадей возбудителей пироплазмоза является обязательной при ввозе лошадей на территорию Российской Федерации и ряда сопредельных стран. Существующие в настоящее время тест-системы для диагностики пироплазмоза основаны на трудоемких и, зачастую, низкочувствительных и малоэффективных серологических и бактериологических методах. Применение тест-систем, основанных на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяет с очень высокой степенью специфичности обнаруживать ДНК возбудителей непосредственно в клиническом материале, без предварительного получения чистой культуры. Одним из важнейших достоинств этого метода является возможность быстрого получения результата (в течение нескольких часов) и невысокая стоимость массовых анализов.

Материалом для исследований послужили образцы крови 597 голов лошадей (*Equus caballus*), доставленных в лабораторию из различных регионов РФ, в том числе и неблагополучных по пироплазмозу (Алтайский, Краснодарский, Пермский, Ставропольский края, Республики Башкирия и Хакасия, Воронежская, Новосибирская, Ростовская и Смоленская области).

Кровь брали из яремной вены с соблюдением мер асептики и антисептики. В качестве антикоагулянта использовали Трилон Б. Кровь доставлялась в лабораторию в течение 1-2 суток после взятия.

Мазки крови окрашивали по Паппенгейму [1] и исследовали при помощи светового микроскопа OptiTech с использованием системы фотодокументирования Webbers MyScope 300M.

На основании анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S-рибосомальной РНК, представленных в «GeneBank» *Babesia equi* и *Babesia caballi*, были выбраны несколько вариантов праймеров. ДНК выделяли с использованием набора «Diatom DNA Prep 200» («Изоген», г. Москва) по инструкции производителя и амплифицировали с использованием выбранных праймеров. Температура отжига составляла 58 °С. Продукты амплификации анализировали в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия в гель. Видовую принадлежность возбудителя дифференцировали по массе конечных продуктов амплификации – 203 п.н. для *Babesia caballi* и 264 п.н. для *Babesia equi*. Интерпретацию результатов проводили визуально на трансиллюминаторе под УФ-излучением.

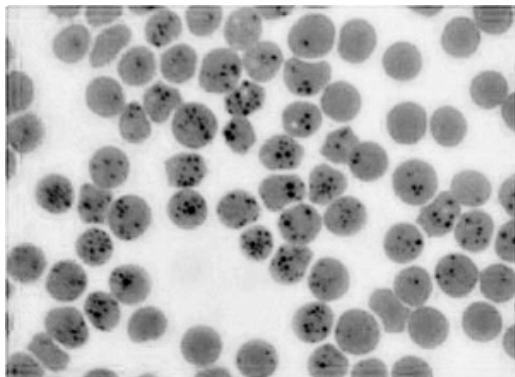


Рисунок 1 – Включения в эритроцитах (увеличение 10x40)

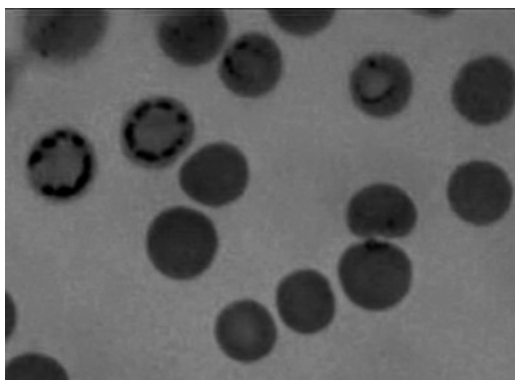


Рисунок 2 – Кольцевые структуры в эритроцитах (увеличение 10x100)

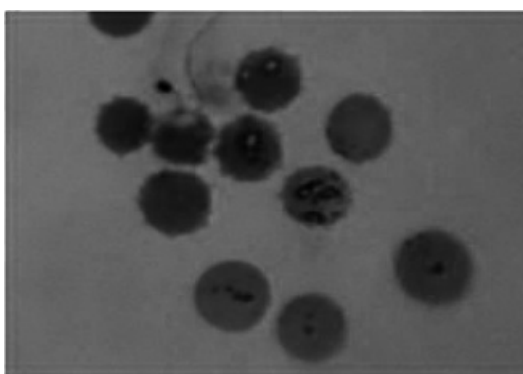


Рисунок 3 – Парные грушевидные элементы в эритроцитах (увеличение 10x100)

При исследовании мазков крови обнаружилась следующая картина: Эритроциты 393 исследованных животных окрашивались в розовый цвет и не содержали посторонних включений.

Выявлено 17 образцов с наличием *B. caballi* и 6 - с *B. equi*. При этом в 3 образцах была выявлена смешанная инвазия. 19 образцов из 23 дали положительный результат ПЦР, что составило 82,6%.

В 176 образцах были обнаружены темные включения в эритроцитах (от 1 до 10 штук на эритроцит) (рисунок 1), при этом в ряде случаев отмечались гипохромные эритроциты (14 голов), а в эритроцитах нескольких животных (4 головы) были обнаружены кольцевые структуры (рисунок 2).

Недифференцируемые включения могли являться как признаками хронического течения пироплазмоза, так и остатками ядерного вещества эритроцитов (тельца Хауэлла-Жолли) или нестабильными формами гемоглобина (тельца Гейнца). Методом ПЦР была протестирована 41 случайно отобранная проба, при этом положительный результат дали 17 проб (41,52%). Полученные данные свидетельствуют о том, что применение ПЦР-диагностики позволяет выявить животных-носителей бабезиоза.

Методом ПЦР была протестирована 41 случайно отобранная проба, при этом положительный результат дали 17 проб (41,52%). Полученные данные свидетельствуют о том, что применение ПЦР-диагностики позволяет выявить животных-носителей бабезиоза.

Методом ПЦР была протестирована 41 случайно отобранная проба, при этом положительный результат дали 17 проб (41,52%). Полученные данные свидетельствуют о том, что применение ПЦР-диагностики позволяет выявить животных-носителей бабезиоза.

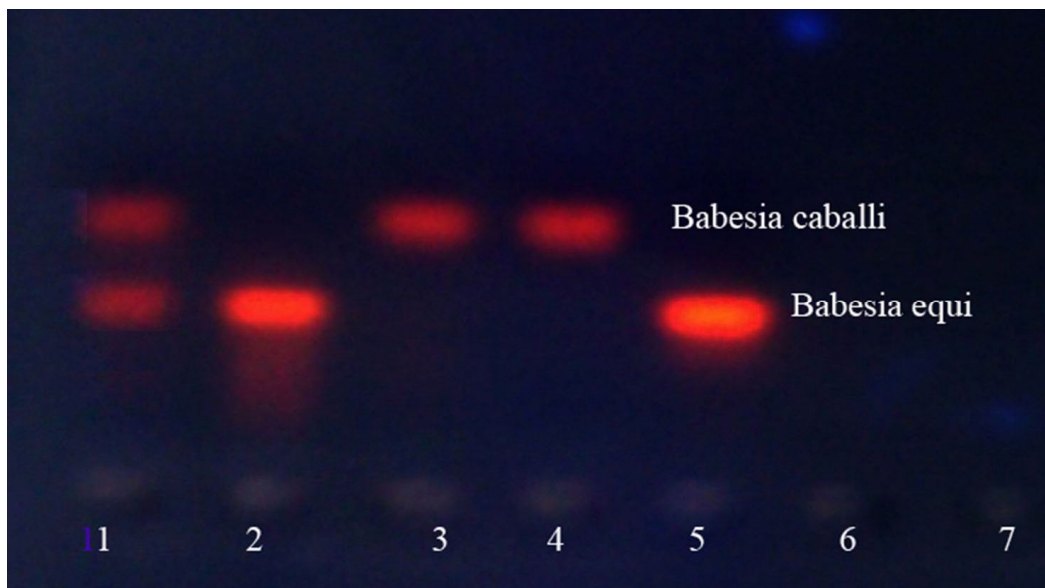


Рисунок 4 - Фореграмма продуктов амплификации на наличие ДНК *Babesia equi* и *Babesia caballi*

Примечание: Трек 1 – смешанная инвазия *Babesia equi* и *Babesia caballi*; трек 2 – положительная реакция на *Babesia equi*; трек 3 – положительная реакция на *Babesia caballi*; трек 4 – положительный контроль *Babesia caballi*; трек 5 – положительный контроль *Babesia equi*.

В период с 2009 по 2010 гг. нами наблюдались шесть жеребых кобыл, в эритроцитах которых были обнаружены *B. caballi*, и носительство пироплазмоза было подтверждено методом РСК. В начале 2010 г. две кобылы абортировали, а в мазках крови двух из четырех новорожденных жеребят были обнаружены единичные паразиты *B.caballi*, что может свидетельствовать о трансплацентарной передаче *B.caballi* от кобылы жеребенку.

Полученные результаты свидетельствуют, что ПЦР-диагностика может использоваться для выявления животных-носителей или случаев скрытого заболевания бабезиозом (особенно при отсутствии клинических симптомов), что особенно актуально для лошадей аборигенных пород.

Литература

1. Базарнова М.А., Морозова В.Т. Клиническая ветеринарная лабораторная диагностика. М., 1988.