Проект

Изображение государственного Герба Республики Казахстан

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

# Животные

# ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ТОКСОПЛАЗМОЗА

# Основные положения

**СТ РК**

*Настоящий проект стандарта*

*не подлежит применению до его утверждения*

**Комитет технического регулирования и метрологии**

**Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан**

**(Госстандарт)**

**Астана**

**Предисловие**

1. **РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН** РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии» Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан
2. **УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ** Приказом Председателя Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан от «\_\_» \_\_\_\_\_\_\_\_\_ 20\_\_ года № \_\_\_\_.

**3** В настоящем стандарте реализованы нормы Закона Республики Казахстан   
«О ветеринарии» от 10 июля 2002 года № 339.

**4 СРОК ПЕРВОЙ ПРОВЕРКИ 20\_\_ г.**

**ПЕРИОДИЧНОСТЬ ПРОВЕРКИ 5 лет**

**5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ**

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном каталоге «Документы по стандартизации», а текст изменений – в ежемесячных информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном каталоге «Национальные стандарты».*

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

**Введение**

Toxoplasma gondii – это зоонозный облигатный внутриклеточный простейший паразит, который может поражать всех тепл¬окровных животных, включая птиц. Хотя инфекция не вызывает развития клинических заболеваний у большинства видов животных, в некоторых случаях эта инфекция может стать причиной развития острого опасного для жизни заболевания, а у других видов, в частности, овец и коз, а также у свиней, может проявлять себя как болезнь беременности, во время которой возбудитель размножается в плаценте и эмбрионе. Случаи острого потенциально смертельного заражения отмечались у обезьян Нового Света (Cunningham et al., 1992), сумчатых (Canfield et al., 1990) и некоторых других животных (смотреть ниже). Сообщения о развитии клинической и субклинической (бессимптомной) инфекции у домашних и диких животных во всех странах мира были собраны в двух книгах (Dubey, 2010; Dubey & Beattie, 1988). В случаях острого заболевания, клинические симптомы могут включать в себя лимфаденопатию, гепатомегалию, интерстициальную пневмонию и признаки расстройства или поражения нервной системы. Во время патологоанатомического исследования может быть установлено, что лимфатические узлы, селезенка и печень увеличены в размере, при этом, на печени могут иметься бледные очаги поражения. У овец, коз и свиней первичная инфекция, наличие которой установлено во время беременности, может стать причиной вероятного бесплодия, а также мертворождения и выкидышей, в зависимости от стадии беременности, на которой произошло заражение. В типичных случаях выкидышей у овцы или самки оленя, зараженной на средних сроках беременности, на несколько дней раньше установленного срока окончания беременности рождается мертвый ягненок/олененок. Абортированный плод часто рождается вместе со вторым ослабленным или «мумифицированным» плодом (Buxton, 2000). Состояние овцы/самки оленя с клинической точки зрения остается нормальным. В подобных случаях, котиледоны плаценты обычно покрыты очаговыми поражениями белого цвета диаметром около 2–3 мм, в то время как внешний вид межкотиледонных оболочек остается нормальным. Заражение на ранних сроках беременности, когда плод имеет лишь зачаточную иммунную систему, приводит к гибели плода и резорбции. В этом случае, мать может выглядеть бесплодной, что, в свою очередь, может имитировать проблему бесплодия стада или отары. Матери, зараженные на поздних сроках беременности, обычно воспроизводят на свет инфицированное, но клинически нормальное потомство. После заражения, во время беременности или в срок, выходящий за пределы срока беременности, паразит, как правило, не вызывает выкидышей во время любых последующих беременностей. Хотя последние исследования ставят данный вывод под вопрос (Duncanson et al., 2001; Williams et al., 2005), большинство ученых сегодня склоняется к тому, что рецидив хронической инфекции во время беременности, ведущей к повторным выкидышам, в норме не является распространенным явлением (Dubey, 2010; Rodger et al., 2006). У зараженных свиней, инфекция может стать причиной гибели плода беременных свиноматок, однако в современных условиях интенсивного животноводства, когда риск заражения помещений для содержания животных и их корма ооцистами T. gondii минимален или полностью исключен, общее число случаев заражение является крайне низким, и инфекция провоцирует лишь развитие легких проявлений или протекает бессимптомно (Lind & Buxton, 2000). Тем не менее, во время нахождения свиней за пределами помещений и при попадании их в среду других систем интенсивного хозяйствования, вероятность их заражения ооцистами значительно возрастает, и, таким образом, случаи развития инфекции могут быть гораздо более частыми (Dubey, 2010; Kijlstra et al., 2004).

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

Фаза полового размножения паразита, протекает в энтероэпителиальных клетках окончательного хозяина, относящегося к семейству кошачьих, результатом чего становится производство ооцист токсоплазмы. Вслед за развитием первичной инфекции у кошки, ооцисты могут выделяться в окружающую среду вместе с экскрементами в течение нескольких дней. Ооцисты спорулируют в окружающей среде на протяжении последующих 1–5 дней (в зависимости от степени проветриваемости, уровня влажности воздуха и температуры окружающей среды), становясь в этот период заразными. Они являются очень устойчивыми к воздействию факторов окружающей среды и могут оставаться заразными в течение одного года и более. Спорулирующие ооцисты имеют диаметр 11 × 13 мкм, и каждая из них содержит четыре спорозоита в каждой из двух спороцист (Dubey & Beattie, 1988). Когда восприимчивое животное проглатывает спорулирующие ооцисты, спорозоиты высвобождаются, проникая в оболочку кишечника, где трансформируются в трофозоиты и способствуют развитию инфекции.

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

Аборты у овец и коз, вызванные T. gondii, следует отличать от абортов, вызванных другими инфекционными агентами, включая инфекции Chlamydophila abortus (см. [39], Энзоотический аборт овец), Coxiella burnetii (см. [39], Q-лихорадка), Brucella melitensis (см. [39], Бруцеллез [Brucella abortus, B. melitensis и B. suis]), кампилобактериоз плода (см. [39], Кампилобактериоз половых органов крупного рогатого скота), Salmonella spp. (см. [39], Сальмонеллез), пограничная болезнь (см. [39], Пограничная болезнь) и вирусы, вызывающие блютанг, болезнь Вессельсброна и болезнь Акабане. У свиней вирус Brucella suis (см. [39]) также может вызывать гибель плода, мумификацию плода и выкидыш.

Toxoplasma gondii легко заражает людей, и хотя инфекция относительно распространена (примерно у 30% населения в зависимости от возраста и окружающей среды), клиническое заболевание встречается относительно редко. В группу риска развития клинической болезни входят беременные женщины, поскольку паразит может представлять серьезную опасность для неродившегося ребенка, если мать становится инфицированной в первый раз во время беременности, лица с подавленным иммунитетом, такие как пациенты, которым проведена трансплантация, ВИЧ-инфицированные лица, больные с определенными видами рака и больные, проходящие определенные курсы терапии рака. Эти лица подвергаются риску развития острой смертельно опасной инфекции, если не принимаются необходимые меры по лечению болезни. Более восприимчивыми к паразиту являются также лица очень молодого и очень пожилого возраста. В отдельных случаях, у лиц без явно выраженного иммунодефицита может развиваться болезнь, характеризующаяся общим недомоганием, лихорадкой и лимфаденопатией. Наиболее вероятными источниками заражения людей являются употребляемое в пищу сырое или подвергшееся недостаточной термической обработке мясо, содержащее тканевые цисты живых T. gondii, употребляемые в пищу сырые или подвергшиеся недостаточной термической обработке овощи, зараженные ооцистами, а также сады и детские песочницы, которые могут быть заражены ооцистами в результате контакта с кошачьими экскрементами. В настоящее время токсоплазмоз также признан зоонозом, передающимся через воду (Dubey, 2010). Такой способ передачи возможен в тех случаях, когда проводимая очистка и обработка воды является неэффективной или несущественной при наличии достаточно крупной местной популяции кошачьих, заражающей ооцистами поверхностные воды (Bowie et al., 1997; Dubey, 2004). В связи с этим, в настоящее время существует мнение, что заражение паразитом морских млекопитающих происходит посредством воды, попадающей в море из зараженной почвы, а также из неочищенных стоков городской канализации.

Все лабораторные манипуляции с живыми организмами должны выполняться с применением соответствующих мер предосторожности, определенных на основании анализа рисков, описанного в [39].

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Животные**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ТОКСОПЛАЗМОЗА**

**Основные положения**

**Дата введения**

# Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методы лабораторной диагностики токсоплазмоза.

**2 Методы диагностики**

**Таблица 1 - Методы испытаний, доступные для диагностики токсоплазмоза и их цель**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Метод** | **Цель** | | | | | |
| Отсутствие инфекции в популяции | Отсутствие инфекции у отдельного животного до перемещения | Содействие политике искоренения | Подтверждение клинических случаев | Превалентность инфекции – надзор | Иммунный статус у отдельных животных или в популяциях после вакцинации |
| **Обнаружение возбудителя1** | | | | | | |
| **ПЦР** | - | - | - | ++ | - | - |
| **Гистопатоло-гическое исследование** | - | - | - | + | - | - |
| **Обнаружение иммунной реакции** | | | | | | |
| **НРФА** | - | - | - | ++ | ++ | - |
| **ИФА** | - | - | - | ++ | ++ | - |
| **ПРА/МРА** | - | - | - | ++ | ++ | - |
| +++ = рекомендуется для этой цели;  ++ = рекомендуется, но имеет ограничения;  + = подходит в очень ограниченных случаях;  – = не подходит для этой цели.  ПЦР = полимеразная цепная реакция;  ИФА = иммуноферментный анализ;  НРФА= непрямая реакция флюоресцирующих антител;  ПРА = прямая реакция агглютинации;  МРА = модифицированная реакция агглютинации. | | | | | | |

* 1. **Обнаружение возбудителя**

2.1.1 Гистопатологическое исследование

У животных, умерших от острого токсоплазмоза, в ряде тканей, включая печень, сердце и легкие, может наблюдаться очаговое мононуклеарное воспаление с очаговым некрозом или без него. Последний может носить отечный характер.

**Проект, редакция 1**

Возможно, лимфатические узлы увеличились, и может наблюдаться очаговый некроз с кровоизлиянием или без него. Обычно трофозоиты токсоплазмы обнаруживаются в связи с обнаружением признаков некроза и воспаления.

В случаях выкидышей и мертворождения у овец и коз, пораженные котиледоны плаценты обычно имеют обширные очаги коагуляционного некроза, который со временем может минерализоваться. Любое сопутствующее воспаление можно охарактеризовать как легкое и безгнойное. Хорошо сохранившиеся образцы плацентарных котиледонов могут показать умеренный отек мезенхимы ворсин плода с диффузной гиперклеточностью из-за присутствия крупных мононуклеарных клеток. Иногда можно увидеть небольшое количество внутриклеточных и внеклеточных токсоплазм, обычно на периферии некротического участка или в ворсинках, находящихся на ранних стадиях инфекции. Трофозоиты токсоплазмы имеют овоидную форму, при длине 2–6 мкм и содержат умеренно базофильные ядра, расположенные по центру или в районе заднего полюса.

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

2.1.2 Методы распознавания нуклеиновой кислоты

С целью обнаружения нуклеиновых кислот T. gondii было разработано несколько методов анализа, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР) (см. таблицу 1). Основными областями-мишенями исследования являются повторяющаяся последовательность B1, элемент 529-bp копии 300, ген P30 (SAG1) и рибосомная РНК (рРНК) 18S (Burg et al., 1989; Dubey, 2010; Ellis, 1998; Savva et al., 1990). Чувствительность ПЦР зависит от номера копии последовательности-мишени (P30: 1 копия; B1: 35 копий; рРНК: 110 единиц повтора). В продаже имеются изготавливаемые по заказу синтетические олигонуклеотиды ДНК (пример: www.sigma-genosys.co.uk). Недавно, с целью анализа материала хрусталика глаза пациентов с врожденной инфекционной катарактой, использовался метод амплификации повторяющейся последовательности B1 (Mahalakshima et al., 2007) и был признан более чувствительным, чем используемый традиционный метод (иммуноферментный анализ [ИФА]). ПЦР чрезвычайно чувствителен, следует быть осторожным, если это единственный доступный тест, так как во многих ситуациях более надежный диагноз будет получен, если использовать его в сочетании с другими диагностическими данными.

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

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

Загрязняющие эритроциты, присутствующие в тканях, удаляются путем промывания образцов в 10 ммоль лизирующего буфера Трис/NH4Cl (pH 7,6), после чего образцы центрифугируются с центробежным ускорением 2000 g в течение 15 минут. После этого ДНК экстрагируется из образовавшегося в результате осадка и повторно взвешивается в   
10 ммоль буфера Трис, (pH 8,3), 50 ммоль KCl, 1,5 ммоль MgCl2, содержащего протеиназу K в объеме 100 мкг/мл, и 0,5 % полисорбата Твин 20.

Образцы инкубируются при температуре 55 °C в течение как минимум 1 часа, после чего протеиназа K инактивируется путем кипячения. ПЦР осуществляется в 50-мкл объемах. Амплификация гена B1 осуществляется посредством модификации процедуры, описанной в ссылке 1. Реакционная смесь содержит 10 ммоль Трис (pH 8,3), 2,5 ммоль MgCl2, 40 ммоль KCl, 0,01 % желатина, 0,1 ммоль смеси дезоксинуклеотидов (dNTPs),   
0,2 ммоль каждого праймера (олигонуклеотидные праймеры; Bowie et al., 1997), два смысловых праймера P1 и P2 и два антисмысловых праймера P3 и P4), а также 2,5 единицы ДНК полимеразы Taq.

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

Вторичная амплификация с использованием гнездовых праймеров 2 и 3 при идентичных условиях реакции имеет свыше 15 циклов, необходимых для получения продукта 94 bp. Визуальное исследование конечного продукта осуществляется на 1 % агарозных гелях. Блоттинг по Саузерну с использованием меченого зонда может применяться для подтверждения идентичности продуктов ПЦР B1 и для отделения их от неспецифических продуктов.

2.1.3 Обнаружение ооцист в питьевой воде

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

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

Выделение ДНК из ооцист T. gondii может порождать дополнительные проблемы, связанные с наличием ингибиторов в экскрементах и со сложностью высвобождения ДНК из ооцист. Ниже подробно описан способ получения ооцист и извлечения ДНК.

2.1.3.1 Реактивы

i) PBS: 300 мм NaCl, 2,7 мм KCl, 10 ммоль Na2HPO4, 1,7 ммоль NaH2PO4.

ii) Гипохлорит натрия, водный раствор, ≥ 4 % активного хлора.

iii) Лизирующий буфер OOC (pH 9,5): 600 ммоль ЭДТК (этилендиаминтетрауксусной кислоты), 1,3 % (объемное содержание) N-лауроилсаркозина, 2 мг/мл протеиназы K.

iv) Буфер OOC-ЦТАБ: 2% (объемное содержание) цетилтриметиламмония бромида, 1,4 моль NaCl, 0,2 % (объемное содержание) меркаптоэтанола, 20 ммоль ЭДТК, 100 ммоль трис(гидроксиметил)метиламина.

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

vi) 4 М NaCl.

vii) 96 % (объемное содержание) этанола I.

2.1.3.2 Процедура

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

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

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

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

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

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

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

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

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

x) Перелейте надосадочную жидкость в чистую пробирку и снова смешайте с 500 мкл фенола/хлороформа/изоамилового спирта (25/24/1) путем 50-кратного переворачивания пробирки. Центрифугируйте в течение 7 минут с центробежным ускорением 13 000 g.

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

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

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

xiv) Удалите раствор этанола и выполните воздушную сушку осадка.

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

xvi) Используйте 2,5–10 мкл аликвот для ПЦР (см. 2.1.2).

**2.2 Серологические испытания**

Существует несколько серологических реакций для обнаружения антител к T. gondii (см. таблица 1). В одном типе теста наблюдатель оценивает данный цвет тахизоитов под микроскопом, например, с помощью теста с красителем (DT) и непрямой реакции флюоресцирующих антител (НРФА). Другой вид реакций основан на принципе агглютинации трофозоитов токсоплазмы, эритроцитов или частиц латекса, к данному виду относятся прямая реакция агглютинации (ПРА) и модифицированная реакция агглютинации (МРА), а также непрямая реакция гемагглютинации (НРГ) и реакция латекс-агглютинации (РЛА), соответственно. При использовании твердофазного ИФА, степень изменения цвета позволяет определить количество специфических антител в растворе. Ниже описываются методы РК, НРФА, ПРА и твердофазного ИФА, а также приводится более подробное описание метода НРФА.

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

НРФА (Munday & Corbould, 1971) является простым и широко используемым методом. Цельные инактивированные трофозоиты токсоплазмы инкубируются вместе с разведенной тест-сывороткой с добавлением соответствующей антивидовой флюоресцирующей сыворотки, после чего результат исследуется с помощью флюоресцентного микроскопа. Флуоресцентно-меченые антитела коммерчески доступны для различных видов животных, метод относительно недорог, а наборы коммерчески доступны. Метод требует наличия флюоресцентного микроскопа, а результаты оцениваются «на глаз», в связи с чем возможны различные интерпретации результатов. Также может возникнуть сложность с наличием некоторых вид-специфических конъюгатов, и существует риск возможной перекрестной реактивности (перекрестной специфичности) с ревматоидным фактором и антинуклеарными антителами.

ПРА (Desmonts & Remington, 1980) является, как чувствительным, так и специфическим методом. Обработанные формалином трофозоиты токсоплазмы помещаются в лунки подковообразных микротитрационных планшетов, после чего в них добавляются разведенные тест-сыворотки. Позитивные образцы вызовут реакцию агглютинации, которая может варьироваться по степени, в то время как отрицательные (негативные) образцы будут способствовать образованию «пуговицы» из осажденных трофозоитов на дне лунок. Данный метод является простым, хотя для его применения необходимо относительно большое количество антигенов. Комплекты для выполнения данного теста имеются в продаже. Во избежание ложноположительных реакций, связанных с наличием неспецифического иммуноглобулина M, важным условием является обработка сывороток меркаптоэтанолом. Процедура была модифицирована Dubey & Desmonts (1987), которые назвали ее модифицированным тестом на агглютинацию (МРА). MРА широко используется для выявления T. gondii в сыворотках всех видов животных, и процедура подробно описана ниже. МРА может давать ложноотрицательные результаты на ранних стадиях инфекции или при проведении на собачьей сыворотке. Еще одним доступным тестом, комплекты которого имеются в продаже, является реакция латекс-агглютинации (РЛА), однако данный метод исследования является относительно нечувствительным в сравнении с МРА или НРФА.

В оригинальном твердофазном ИФА (Voller et al., 1976) используется препарат из растворимого антигена, изготовленного из трофозоитов токсоплазмы штамма RH (в соответствии с приведенным ниже описанием) и послойно помещенного в лунки микротитрационного планшета. Добавляют тестовые сыворотки (например, овечьего происхождения), а затем меченный антивидовым ферментом конъюгат, такой как меченый пероксидазой хрена анти-овечий IgG. Любые включенные в состав конъюгаты вызывают изменение цвета субстрата, что напрямую связано с количеством связанных антител, и результат такого изменения может быть прочтен с помощью спектрофотометра при коэффициенте поглощения, характерном для используемого субстрата. Данный анализ является простым, позволяет легко исследовать большое число образцов, и легко выполняется при выборе антивидового конъюгата. Коммерчески доступны определенные антивидовые конъюгаты, субстраты и целые наборы. Однако для проведения анализа требуется спектрофотометр. Твердофазный ИФА хорошо подходит для лабораторий, которым необходимо проводить анализ большого числа образцов.

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

С целью подтверждения специфичности традиционного твердофазного ИФА, были разработаны методы анализа с использованием рекомбинирующих антигенов (Johnson & Illana, 1991) и аффинно очищенных токсоплазма-специфических антигенов (Lekutis et al., 2001), предназначенные для проведения исследования на материале овец (Sager et al., 2003; Tenter et al., 1992).

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

2.2.1 Приготовление антисыворотки и антигенов

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

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

2.2.2 Приготовление аликвот из замороженных трофозоитов T. gondii

2.2.2.1 Процедура испытания

i) В соответствии с приведенным описанием, культивируйте трофозоиты в культуре клеток тканей.

ii) Центрифугируйте препарат с центробежным ускорением 500 g в течение   
5 минут, после чего повторно суспендируйте его в среде Дульбекко, модифицированной по способу Исков (СДМИ) приблизительно три раза.

iii) Добавьте следующие растворы для получения соответствующих концентраций: 10 % диметилсульфоксида, 20 % нормальной лошадиной сыворотки (свободное антитело к T. gondii) и 70 % ресуспендированных трофозоитов для получения окончательной концентрации, равной 1 × 108 трофозоитов/мл.

iv) Дайте препарату отстояться на столе в течение 1 часа.

v) Разделите препарат на 1-мл аликвоты с помощью пробирок с завинчивающимися крышками, подходящих для хранения жидкого азота.

vi) Поместите пробирки в маленький контейнер, оберните его плотным изолирующим материалом и поместите в морозильную камеру, поддерживающую температуру минус 70 °C, чтобы обеспечить постепенную заморозку трофозоитов.

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

viii) Затем этот стабилизат можно использовать для инокуляции мышей или выращивания паразита в тканевой культуре. В случае извлечения культуры из среды хранения быстро разморозьте культуру в теплой воде.

2.2.3 Выращивание трофозоитов токсоплазмы в культуре клеток ткани

2.2.3.1 Процедура испытания

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

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

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

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

2.2.4 Выращивание цельных трофозоитов для их использования в исследовании методом НРФА

2.2.4.1 Процедура испытания

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

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

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

2.2.5 Приготовление растворимых антигенов для твердофазного ИФА

2.2.5.1 Процедура испытания

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

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

iii) Разрушьте трофозоиты путем трехкратной заморозки и разморозки.

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

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

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

2.2.6 Исследование методом НРФА

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

2.2.6.1 Процедура испытания

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

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

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

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

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

vi) Дважды промывайте препараты по 10 минут в ФСБ.

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

viii) Трижды промывайте препараты по 10 минут в ФСБ.

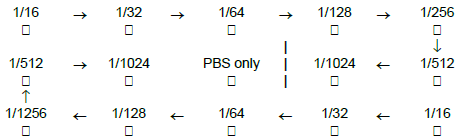
ix) Нанесите на предметные стекла под покровными стеклами забуференный глицерин (одна часть глицерина на девять частей ФСБ).

x) Исследуйте образцы с помощью флюоресцентного микроскопа,   
оснащенного ×20 и ×40 линзами объектива.

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

Ниже приведен пример значений для образцов на предметных стеклах планшета:

Образец 1



Образец 2

2.2.7 Описание процедуры исследования методом модифицированной реакции агглютинации

2.2.7.1 Буфер для разведения сыворотки

i) Разведите 42,5 г NaCl, 1,54 г NaH2PO4 (молекулярная масса = 120) и 5,4 г Na2HPO4 (молекулярная масса = 142) в 900 мл деионизированной воды.

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

iii) Храните раствор в холодильнике. Данный раствор представляет собой   
5× базовый раствор.

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

2.2.7.2 Буфер для разбавления антигена

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

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

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

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

2.2.7.3 Разведения сыворотки

i) Разведите образцы сыворотки буфером для разведения сыворотки (см. 2.2.7.1) в маленьких пробирках для тестов (1,2 мл в пробирках с полосками 8 или 12) с помощью многоканальной пипетки, начиная с титра 1/25.

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

2.2.7.4 Приготовление смеси антигена

i) На каждом планшете, смешайте 2,5 мл буфера для разведения антигена (см. 2.2.7.2), 35 мкл 2-меркаптоэтанола, 50 мкл раствора синего красителя Эвана (2 мг/мл воды) и   
0,15 мл антигена (цельные паразиты, зафиксированные в формалине).

2.7.5. Описание процедуры агглютинации

Агглютинация проводится в U-образных 96-луночных микротитровальных планшетах.

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

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

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

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

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

**3 Требования к вакцинам**

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

**Библиография**

[1] БОУИ У.Р., КИНГ А.С., ВЕРКЕР Д.Х., АЙЗЕК-РЕНТОН ДЖ.Л., БЕЛЛ А., ЭНГ С.Б.В. и МАРИОН С.А. (1997). Вспышка токсоплазмоза, связанная с муниципальной питьевой водой. Ланцет, 350, 173-177.

[2] БРАУН М., ЛАППИН М.Р., БРАУН ДЖ.Л., МУНХЦОГ Б. и СВЕНСОН В.Ф. (2005). Изучение экологических основ чрезвычайной восприимчивости манулов (Otocolobus manul) к смертельному токсоплазмозу. Журнал о болезнях диких животных, 41, 691-700.

[3] БУРГ ДЖ.Л., ГРОВЕР К.М., ПУЛЕТТИ П. и БУТРОЙД ДЖ.С. (1989). Прямое и чувствительное обнаружение патогенного простейшего, Toxoplasma gondii, с помощью полимеразной цепной реакции. Журнал клинической патологии, 27, 1787-1792.

[4] БАКСТОН Д. (1993). Токсоплазмоз: Первая коммерческая вакцина. Паразитология сегодня, 9, 335-337.

[5] БАКСТОН Д. (2000). Токсоплазмоз и неоспороз. В: Болезни овец, МАРТИН У.Б. и ЭЙТКЕН И.Д., РЕД. БЛЭКВЕЛЛ САЙЕНС, Оксфорд, Великобритания, 86-94.

[6] КЭНФИЛД П.ДЖ., ХАРТЛИ У.ДЖ. и ДУБЕЙ ДЖ.П. (1990). Поражения токсоплазмозом австралийских сумчатых. Журнал сравнительной патологии, 103, 159-167.

[7] КОСТА Х.М., ПАУТАС С., ЭРНО П., ФУЛЕ Ф., КОРДОНЬЕ С. и БРЕТАНЬ С. (2000). ПЦР в реальном времени для диагностики и наблюдения за реактивацией Toxoplasma после трансплантации аллогенных стволовых клеток с использованием гибридизационных зондов с флуоресцентным резонансным переносом энергии. Журнал клинической патологии, 38, 2929-2932.

[8] КАННИНГЕМ А.А., БАКСТОН Д. и ТОМСОН К.М. (1992). Эпидемия токсоплазмоза в колонии беличьих обезьян в неволе (Saimiri sciureus). Журнал сравнительной патологии, 107, 207-219.

[9] ДЕСМОНТС Г. и РЕМИНГТОН ДЖ.С. (1980). Тест прямой агглютинации для диагностики инфекции Toxoplasma: Метод повышения чувствительности и специфичности. Журнал клинической патологии, 11, 562-568.

[10] ДУБЕЙ ДЖ.П. (2004). Токсоплазмоз - зооноз, передающийся через воду. Ветеринарная паразитология, 126, 57-72.

[11] ДУБЕЙ ДЖ.П. (2010). Токсоплазмоз животных и человека, второе издание. CRC PRESS, БОКА-РАТОН, ФЛОРИДА, США.

[12] ДУБЕЙ ДЖ.П. И БИТТИ К.П. (1988). Токсоплазмоз животных и человека. CRC PRESS, БОКА-РАТОН, ФЛОРИДА, США. ДУБЕЙ ДЖ.П. и ДЕСМОНТС Г. (1987). Серологические реакции у лошадей, которых кормили ооцистами Toxoplasma gondii. Ветеринарный журнал о лошадях, 19, 337-339.

[13] ДУНКАНСОН П., ТЕРРИ Р.С., СМИТ ДЖ.Э. и ХАЙД Г. (2001). Высокий уровень врожденной передачи Toxoplasma gondii в промышленном стаде овец. Международный журнал по паразитологии., 31, 1699-1703.

[14] ЭЛЛИС ДЖ.Т. (1998). Методы полимеразной цепной реакции для выявления Neospora caninum и Toxoplasma gondii. Международный журнал по паразитологии, 28, 1053-1060.

[15] ГУСТАФССОН К. и УГГЛА А. (1994). Серологическое исследование инфекции Toxoplasma gondii У ЗАЙЦА-РУСАКА (Lepus europaeus) в Швеции. Журнал о болезнях диких животных, 30, 402-407.

[16] ХОУ Д.К. И СИБЛИ Д. (1995). Toxoplasma gondii включает в себя три клональные линии: Корреляция генотипа паразита с заболеванием человека. журнал Inf. Dist., 172, 1561 -1566.

[17] АЙЗЕК-РЕНТОН ДЖ., БОУИ У.Р., КИНГ А., ИРВИН Г.С., ОНГ К.С., ФУНГ К.П., ШОКИР М.О. и ДУБЕЙ ДЖ.П. (1998). Обнаружение ооцист Toxoplasma gondii в питьевой воде. Прикладная и экологическая микробиология, 64, 2278-2280.

[18] ДЖОНСОН А. М. и ИЛЛАНА С. (1991). Клонирование фрагментов гена Toxoplasma gondii, кодирующих диагностические антигены. Ген, 99, 127-132.

[19] ХАН А., БЁМЕ У., КЕЛЛИ К.А., АДЛЕМ Э., БРУКС К., СИММОНДС М., МАНГАЛЛ К., КВЕЙЛ М.А., ЭРРОУСМИТ К., ЧИЛЛИНГВОРТ Т., ЧЕРЧЕР К., ХАРРИС Д., КОЛЛИНЗ М., ФОСКЕР Н., ФРЕЙЗЕР А., ХЭНС З., ДЖАГЕЛС К., МУЛ С., МЕРФИ Л., О’НЕЙЛ С., РАДЖАНДРИМ М.А., СОНДЕРС Д., СИГЕР К., УАЙТХЕД С., МАЙР Т., СЮАН Х., ВАТАНАБЭ ДЖ., СУЗУКИ Ю., ВАКАГУРИ Х., СУГАНО С., СУГИМОТО К., ПОЛСЕН И., МАККИ А.ДЖ., РООС Д.С., ХОЛЛ Н., БЕРРИМАН М., БАРРЕЛЛ Б., СИБЛИ Л.Д. и АДЖИОКА ДЖ.В. (2006). Общее наследование хромосомы LA связано с клональной экспансией Toxoplasma gondii. Исследование генома., 16, 1119-1125.

[20] КИЙЛСТРА А., ЭЙССЕН О.А., КОРНЕЛИССЕН ДЖ., МУННИКСМА К., ЭЙК И. и КОРТБЕК Т. (2004). Инфекция Toxoplasma gondii в системах свиноводства, благоприятных для животных. Исследовательская офтальмология и наука о зрении, 45, 3165-3169.

[21] ЛЕКУТИС С., ФЕРГЮСОН Д.ДЖ., ГРИГГ М.Э., КЭМПС М. и БУТРОЙД ДЖ.С. (2001). Поверхностные антигены Toxoplasma gondii: Вариации на тему. Международный журнал по паразитологии, 112, 1 -10.

[22] ЛИН М.Х., ЧЕН Т.С., КУО Т., ЦЕНГ С.С. и ЦЕНГ С.П. (2000). ПЦР в реальном времени для количественного определения Toxoplasma gondii. Журнал клинической патологии, 38, 4121-4125.

[23] ЛИНД П. и БАКСТОН Д. (2000). Ветеринарные аспекты токсоплазменной инфекции. В: Врожденный токсоплазмоз; Научные основы, клиническое ведение и контроль, АМБРУАЗ-ТОМАС П. и ПЕТЕРСЕН Э., РЕД. СПРИНГЕР, Париж, Франция, 261 -269.

[24] МАХАЛАКШИМА Б., ТЕРЕЗА К.Л., ШЬЯМАЛА Г., ДЕВИПРИЯ У. и МАДХАВАН Х.Н. (2007). Обнаружение Toxoplasma gondii методом вложенной полимеразной цепной реакции в аспирате хрусталика и лейкоцитах периферической крови у пациентов с врожденной катарактой: Первый отчет из глазной больницы высшего звена в Индии. Современные исследования глаз, 32, 653-657.

[25] МАНДЕЙ Б.Л. и КОРБОУЛД А. (1971). Применение непрямого теста на флуоресцентные антитела к токсоплазме к сывороткам овец. Австралийский журнал медицинской микробиологии, 2, 3-6.

[26] НАГИ Б., ЛАЗАР Л., НАГИ Г., БАН З. и ПАПП З. (2007). Обнаружение Toxoplasma gondii в околоплодных водах с использованием количественного метода ПЦР в реальном времени. Орвоси Хетилап, 148, 935-938.

[27] РОДЖЕР С.М., МЭЙЛИ С. У., РАЙТ С. Э., МАККЕЛЛАР А., УЭСЛИ Ф., СЕЙЛЗ ДЖ. и БАКСТОН Д. (2006). Токсоплазмоз овец; Роль эндогенной передачи. Ветеринарная паразитология, 159, 768-772.

[28] САБИН А.Б. и ФЕЛЬДМАН Х.А. (1948). Красители, как микрохимические индикаторы нового явления иммунитета, поражающего простейших паразитов (Toxoplasma). Наука, 108, 660-663.

[29] САГЕР Х., ГЛУР М., ТЕНТЕР А., МЭЙЛИ С., ХАССИГ М. и ГОТТШТЕЙН Б. (2003). Иммунодиагностика первичной инфекции Toxoplasma gondii у овец с использованием ИФА на авидность P30 IGG. Паразитология сегодня, 91, 171-174.

[30] САВВА Д., МОРРИС ДЖ.С., ДЖОНСОН ДЖ.Д. И ХОЛЛИМАН Р.Э. (1990). Полимеразная цепная реакция для выявления Toxoplasma gondii. Журнал медицинской микробиологии, 32, 25-31.

[31] Соренсен К.К., Морк Т., Сигурдсдоттир О.Г., Осбакк К., Окерстедт Й., Бергшо Б. и Фуглей Э. (2005). Острый токсоплазмоз у трех диких песцов (Alopex alopex) со Шпицбергена; у одной из них сочетанная инфекция Salmonella enteritidis PT1 и Yersinia pseudotuberculosis серотипа 2b. Исследования ветеринарной паразитологии, 78, 161-167.

[32] ТЕНТЕР А. М., ВЬЕТМЕЙЕР С. И ДЖОНСОН А. М. (1992). Разработка ИФА на основе рекомбинантных антигенов для выявления антител, специфичных к Toxoplasma GONDII, у овец и кошек. Ветеринарная паразитология, 43, 189-201.

[33] УГГЛА А., ШОЛАНД Л. и ДУБЕЙ ДЖ.П. (1987). Иммуногистохимическая демонстрация токсоплазмоза у плодов и плодных оболочек овец. Американский журнал ветеринарных диагностических, 48, 348-351.

[34] ВОЛЛЕР А., БИДВЕЛЛ Д.Э., БАРТЛЕТТ А., ФЛЕК Д.Г., ПЕРКИНС М. и ОЛАДЕХИН Б. (1976). Иммуноферментный анализ на микропланшетах на антитела к токсоплазме. Журнал клинической патологии., 29, 150-153.

[35] УОЛЦЕР К.А., ВИР Г.М., ДАМ Р.А., ШРИНИВАСАН А.Р., БОРХЕС А.Л., ИНГЛИШ Э.Д., ХЕРРМАНН Д.С., ШАРЕС Г., ДУБЕЙ ДЖ.П. и БОЙЛ ДЖ.П. (2014). Hammondia hammondi содержит функциональные ортологи эффекторов, модулирующих хозяина, GRA15 И ROP16, но отличается от Toxoplasma gondii уникальным профилем транскрипции. Эукариотические клетки, 13, 1507-1518.

[36] ВАСТЛИНГ ДЖ.М., НИКОЛЛ С. И БАКСТОН Д. (1993). Сравнение двух методов амплификации генов для выявления Toxoplasma gondii у экспериментально инфицированных овец. Журнал медицинской микробиологии., 38, 360-365.

[37] ВЕРРЕ С.Р., ДЖЕЙКОБСОН Р.Х., БОУМЕН Д.Д., ДУБЕЙ ДЖ.П. и МОХАММЕД Х.О. (2002). Оценка кинетики и однократный иммуноферментный анализ для выявления антител к Toxoplasma gondii у овец. Журнал ветеринарных диагностических исследований., 14, 225-230.

[38] УИЛЬЯМС Р.Х., МОРЛИ Э.К., ХЬЮЗ ДЖ.М., ДАНКАНСОН П., ТЕРРИ Р.С., СМИТ ДЖ.Э. и ХАЙД Г. (2005). Высокие уровни врожденной передачи Toxoplasma gondii в продольных и поперечных исследованиях на овцеводческих фермах свидетельствуют о вертикальной передаче инфекции у овец-хозяев. Паразитол., 130, 301-307.

[39] Рекомендации Всемирной организации здравоохранения животных Международного эпизоотического бюро (МЭБ) «Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных».

**МКС 11.220**

**Ключевые слова:** животные, лабораторная диагностика, японский энцефалит, методы испытаний

**МКС 11.220**

**Ключевые слова:** животные, лабораторная диагностика, японский энцефалит, методы испытаний

РАЗРАБОТЧИК:

РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии» Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Заместитель**  **генерального директора** |  | **Е. Амирханова** |
| **Руководитель**  **Департамента разработки НТД** |  | **А. Сопбеков** |
| **Специалист**  **Департамента разработки НТД** |  | **Ж. Туяков** |