

На правах рукописи

**ВОРОБЬЕВА
МАРИНА НИКОЛАЕВНА**

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ РЕТРОСПЕКТИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ТОКСОПЛАЗМОЗА КОШЕК И СОБАК**

16 00 03 – ветеринарная микробиология вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология,
03 00 19 – паразитология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата ветеринарных наук



A handwritten signature in black ink is positioned below the barcode and the text 'кандидата ветеринарных наук'. The signature appears to be 'М. Воробьева'.

Казань – 2007

Работа выполнена на кафедре патологии мелких животных и оперативной хирургии и кафедре эпизоотологии ФГОУ ВПО “Казанская академия ветеринарной медицины им Н Э Баумана”, в отделе культивирования и идентификации вирусов Республиканского центра профилактики и борьбы со СПИД и инфекционными заболеваниями Минздрава РТ

Научный руководитель доктор ветеринарных наук, профессор,

Равилов Рустам Хаметович

Научный консультант кандидат биологических наук

Герасимов Валерий Валентинович

Официальные оппоненты доктор ветеринарных наук, профессор

Алимов Азат Миргасимович

доктор ветеринарных наук, профессор

Хазиев Гадельгарай Закирович

Ведущее учреждение ФГОУ ВПО “Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия”

Защита состоится **30 мая 2007** года в **14** часов на заседании диссертационного совета Д-220 034 01

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО “Казанская академия ветеринарной медицины им Н Э Баумана”

Автореферат разослан 26 апреля 2007 года

Ученый секретарь диссертационного совета,

профессор



М С Ежкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Актуальность проблемы токсоплазмоза обусловлена практически повсеместным распространением возбудителя в природе, высокой частотой инфицированности и способностью токсоплазм длительно персистировать в пораженных клетках, а также опасностью заражения людей от животных

Болезнь регистрируется во всех странах мира. Зараженность токсоплазмами кошек и собак, сельскохозяйственных животных и человека в той или иной степени выявлена в большинстве стран Европы, Америки, Африки и Азии. Установлено, что примерно у 25-30% населения земного шара выявляются антитела к токсоплазмам (есть регионы, где до 50-90% людей имеют такие антитела). Кошке среди других представителей семейства кошачьих принадлежит основная роль в распространении этой инвазии. Кошки распространены во всех странах мира, имеют тесный контакт с человеком, сельскохозяйственными и домашними животными (Галузо И.Г., 1963).

Значительный полиморфизм клинических проявлений при токсоплазмозе, разнообразный характер течения болезни и преобладание латентных форм инвазии над клинически выраженными практически исключают возможность постановки диагноза только на основании клинической картины, в связи с этим возрастает роль лабораторных исследований, включающих паразитологические и иммунологические методы (Мороз Б.В., 1984).

Паразитологические исследования включают световую микроскопию и выделение паразита. Метод прямой микроскопии, хотя несложен и доступен, не всегда результативен, а выделение токсоплазм не пользуется широкой популярностью из-за большой трудоемкости и необходимости соблюдения режимных условий при работе с живым возбудителем. В подавляющем большинстве случаев при диагностике токсоплазмоза ориентируются на данные серологических исследований.

Наиболее популярными методами ретроспективной диагностики заболевания у людей являются реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) и

иммуноферментный анализ (ИФА) РНИФ и ИФА успешно сочетают в себе чувствительность, специфичность и простоту выполнения теста. В ветеринарной практике для этих целей до настоящего времени применяют реакцию связывания комплемента (РСК), которая по своим характеристикам значительно уступает двум первым методам.

Применение иммуноферментного метода ветеринарными специалистами во многом сдерживается отсутствием в достаточном количестве необходимых компонентов (тест-систем и оборудования), но, учитывая его диагностическую важность, можно уверенно утверждать, что в перспективе ИФА станет достоянием ветеринарных лабораторий при диагностике инфекционных и инвазионных болезней.

В доступной литературе встречаются сообщения об использовании ИФА для диагностики токсоплазмозов у животных (Remington J S , 1994, Lappin M R , 1996, Lin D S , 1997, Park Y K , 1999, Sohn W M , 1999). Несмотря на это, вопросы серологической диагностики токсоплазмоза у кошек и собак до настоящего времени остаются открытыми.

Цель и задачи исследований. Цель исследований – усовершенствовать средства диагностики токсоплазмоза у мелких домашних животных (кошек и собак).

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

- провести комплекс исследований по выяснению этиологической роли токсоплазм при различной патологии у мелких домашних животных,
- разработать токсоплазменный антиген для иммунологических реакций и изучить его свойства,
- сконструировать тест-систему для ретроспективной диагностики токсоплазмоза у кошек и собак иммуноферментным методом,
- доказать преимущества разработанной тест-системы для индикации специфических антител по сравнению с общепринятыми,
- изучить сероконверсию токсоплазменных антител у иммунизированных кошек.

Научная новизна. Впервые сконструирована и апробирована в лабораторных и производственных условиях иммуноферментная тест-система для индикации в сыворотках крови кошек и собак противотоксоплазменных антител

Разработана новая технология получения токсоплазменного антигена для иммунологических реакций

С использованием разработанного набора диагностикумов проведен серологический скрининг спонтанно зараженных токсоплазмами мелких домашних животных

Практическая ценность. Разработана тест-система ИФА для ретроспективной диагностики токсоплазмоза у кошек и собак

Результаты проведенных исследований вошли в следующие разработанные и внедренные в практику нормативно-технические документы

- во “Временную инструкцию по изготовлению и контролю иммуноферментной тест-системы для выявления токсоплазменных антител у кошек и собак”, утвержденную ректором ФГОУ ВПО КГАВМ 3 декабря 2004 г ,
- в “Технические условия на опытную партию иммуноферментных тест-систем для выявления токсоплазменных антител у кошек и собак”, утвержденные ректором ФГОУ ВПО КГАВМ 3 декабря 2004 г ,
- во “Временное наставление по применению иммуноферментной тест-системы для выявления токсоплазменных антител у кошек и собак”, утвержденное начальником ГУВ Кабмина РТ 3 декабря 2004 г ,

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены на

- Ежегодных итоговых заседаний проблемных советов ФГОУ ВПО “Казанская академия ветеринарной медицины им Н Э Баумана” (2002-05 гг)
- Научно-практических конференциях по проблемам ветеринарии и зоотехнии (Казань, 2002, 2004-06 гг)
- Научно-практической конференции “Актуальные вопросы ветеринарной медицины домашних животных” (Екатеринбург, 2003 г)
- XI, XIII и XIV Международных ветеринарных конгрессах (Москва, 2003, 2005 и 2006 гг)

- Конференции молодых ученых и специалистов (Казань, 2004 г)
- V Всероссийской научно-практической конференции “Ветеринарная медицина современные проблемы и перспективы развития” (Саратов, 2005 г)
- Международном симпозиуме “Научные основы обеспечения защиты животных от экотоксикантов, радионуклидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний” (Казань, 2005 г)

Публикация результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ Разработаны нормативно-технические документы на набор биопрепаратов наставление по применению, инструкция по изготовлению и контролю, технические условия

Основные положения диссертации, выдвигаемые для защиты:

- значительная встречаемость подозрительных по заболеванию токсоплазмозом кошек и собак в практике городских ветеринарных клиник,
- эффективность иммуноферментного анализа по сравнению с общепринятыми методами ретроспективной диагностики токсоплазмоза,
- возможность использования ПЦР для идентификации токсоплазм,
- высокая позитивность поголовья кошек и собак в отношении токсоплазменной инвазии при серологическом скрининге

Объем и структура диссертации Диссертация изложена на 125 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований (5 глав), обсуждение результатов исследования, выводы, практические предложения и указатель литературы (всего 271 источник, в том числе 198 иностранных и 6 ссылок на сайты Internet) Диссертация иллюстрирована 8 таблицами и 8 рисунками Прилагаются разработанные нормативно-технические и другие документы, подтверждающие результаты исследований, их научно-практическую ценность

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Материалы и методы

Работа выполнена в 2001-2006 годы на кафедре патологии мелких животных и оперативной хирургии и кафедре эпизоотологии ФГОУ ВПО “Казанская академия ветеринарной медицины им Н Э Баумана”, в отделе культивирования и идентификации вирусов Республиканского центра профилактики и борьбы со СПИД и инфекционными заболеваниями Минздрава РТ, в государственных и коммерческих ветеринарных клиниках г Казани

В опытах были использованы взрослые кошки (32), взрослые собаки (20), сыворотки крови кошек (993), сыворотки крови собак (356), клинический материал (кал), полученный от кошек (128)

В качестве исходного материала при изготовлении токсоплазменного антигена и получении иммунных токсоплазменных сывороток использовали инактивированные лиофилизированные культуры производственных штаммов токсоплазм рода *T gondii*

При эпизоотологическом обследовании была использована ветеринарная учетная документация районных ветеринарных клиник, частных ветеринарных клиник и кабинетов, частнопрактикующих ветеринарных врачей

Индикацию и идентификацию возбудителя в пробах патологического и клинического материала осуществляли при помощи световой микроскопии и в полимеразной цепной реакции ПЦР проводили с использованием специфичных для *Toxoplasma gondii* олигонуклеотидных праймеров, сконструированных Burg J L. с соавт (1989)

В качестве серологических тестов использовали РСК и ИФА РСК выполняли с использованием стандартного набора диагностикумов, ИФА – по непрямому методу Учет результатов ИФА проводили с помощью спектрофотометра при длине световой волны 450 нм

При получении антигена суспензию токсоплазм обрабатывали ультразвуком и детергентами в 5 различных сочетаниях обработка УЗДН, обработка

УЗДН и 1%-ным тритоном-X100, обработка УЗДН и 1%-ным дезоксихолатом натрия, обработка УЗДН и 0,1%-ным додецилсульфатом натрия, обработка УЗДН и 1%-ным твином-80 Очистку полученных полуфабрикатов проводили путем ультрацентрифугирования при 100000g в течение 6,5 часов в градиенте плотности сахарозы 5-55% (w/v) с шагом 5%

Электрофоретическое разделение биомолекул проводили электрофорезом в линейном (10-20%) градиенте плотности пластины ПААГ по методу, описанному Laemmli Сканирование электрофореграмм проводили на сканере Sharp (Япония) Анализ результатов сканирования проводили с использованием специализированной компьютерной программы Image Master 1D Gel Analysis v 3 0

Статистическую достоверность полученных данных определяли по методу Стьюдента Статистическую обработку результатов серологических исследований проводили по методике описанной Сайдуллиным Т С

На отдельных этапах работа проводилась совместно с к б н Хаертыновым К С и к б н Вафиным Р Р

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Клинико-эпизоотологические аспекты токсоплазмоза кошек и собак

По данным эпизоотологического обследования доля домашних плотоядных с клиническими признаками, характерными для токсоплазменной инвазии (рвота, диарея, желтуха, увеличение лимфатических узлов, панкреатит, поражения органов зрения, поражение центральной нервной системы, аборт, бесплодие, мертворождение, рождение слабого нежизнеспособного молодняка, острая пневмония, сепсис и др), этиология которых остается невыясненной, составляет от 17 до 25% от общего числа кошек и собак, владельцы которых обращаются к ветеринарным специалистам

В период с 2001 по 2006 гг. клиническому осмотру подвергнуто более 1000 голов домашних плотоядных (около 90% из них составили кошки) подозрительных в заболевании токсоплазмозом, у 142 из них (у 128 кошек и 14 собак) были взяты анализы для лабораторных исследований У 296 животных

(265 кошек и 31 собаки) анализы были взяты по просьбе владельцев, при этом животные клинически были здоровы. Были проведены лабораторные исследования 438 сывороток крови кошек и собак в РСК (таблица 1)

1 Результаты исследования сывороток крови кошек и собак на токсоплазмоз

Группы животных	Число проб	Реагировало в РСК			
		сомнительно		положительно	
		кол-во	%	кол-во	%
Подозрительные по заболеванию					
Кошки	128	8	6,3	3	2,3
Собаки	14	-	0	-	0
ВСЕГО от подозрительных по заболеванию	142	8	5,6	3	2,1
По просьбе владельцев					
Кошки	265	13	4,9	5	1,9
Собаки	31	1	3,2	-	0
ВСЕГО по просьбе владельцев	296	14	4,7	5	1,7
ИТОГО	438	22	5,0	8	1,8

Из 142 проб (128 от кошек и 14 от собак), полученных от подозрительных по заболеванию животных, в РСК с токсоплазменным антигеном реагировали 11 (только кошки), что составило 7,7%. При исследовании животных по просьбе владельцев из 296 проб (265 от кошек и 31 от собак), в РСК реагировали 19 (6,4%), в том числе 18 (6,8%) проб, полученных от кошек, и 1 (3,2%) – от собак. Всего из 438 испытанных в РСК сывороток домашних плотоядных с токсоплазменным антигеном реагировало 30 (6,8%) проб. При этом было протестировано 394 сыворотки крови кошек и 45 – собак, из них в РСК реагировало соответственно 29 (7,3%) и 1 (2,2%) пробы. От 128 подозрительных по заболеванию токсоплазмозом кошек мы брали клинический материал (кал) и исследовали копрологическими методами. При этом в 4 пробах (3,1%) были выявлены микроскопические объекты, которые по своему строению были сходны с токсоплазмами (две из четырех кошек не реагировали в РСК).

Достоверно идентифицировать указанные объекты при помощи световой микроскопии не представлялось возможным. Для идентификации возбудителя была использована полимеразная цепная реакция. В результате проведенных ис-

следований 128 проб кала положительный результат ПЦР был получен в 3 случаях (2,3% от общего числа подозрительных по заболеванию токсоплазмозом кошек). В кале всех этих кошек при микроскопии были обнаружены ооцисты, сыворотка одной из них не реагировала в РСК с токсоплазменным антигеном.

При исследовании в ПЦР фекалий остальных 124 подозрительных по заболеванию кошек (в т.ч. и 9 серопозитивных в РСК), в кале которых не были обнаружены ооцисты, получены отрицательные результаты молекулярно-генетических исследований. У одной кошки, в кале которой также были обнаружены микроскопические объекты похожие на токсоплазмы, был получен отрицательный результат в ПЦР, антитела в РСК у нее также не были выявлены.

Таким образом, нами было установлено, что токсоплазмоз играет определенную этиологическую роль в патологии мелких домашних животных в г. Казани и, учитывая тесный контакт хозяев со своими питомцами и опасность токсоплазмоза для человека, усилия исследователей должны быть направлены на разработку эффективных средств диагностики токсоплазмоза у кошек и собак.

2.2. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления токсоплазменных антител

Чувствительность и специфичность иммуноферментной тест-системы определяется качеством антигена. При сравнении 5 вариантов полученных лизаты антигенов токсоплазм наиболее специфичным оказался антиген, полученный из фракции собранной в 35%-ной сахарозе ступенчатого градиента, после центрифугирования суспензии токсоплазм, которая подвергалась обработке ультразвуком и 1%-ным дезоксихолатом натрия. Коэффициент его специфичности при концентрации 6 мкг/мл при исследовании сывороток кошек составил 10,6, собак – 11,8. Антиген не реагировал с гетерологичными сыворотками, содержащими антитела против эхинококка, токсокар, лямблий, хламидий, микоплазм и вирусов чумы плотоядных.

При диск-электрофорезе полученного токсоплазменного антигена в линейном градиенте ПААГ был получен его полипептидный профиль, который

представлен 6 мажорными фракциями с молекулярной массой 79,50, 60,12, 50,09, 34,40, 32,20 и 30,22 кД

При определении оптимальной концентрации белка в антигене в модельных опытах были испытаны концентрации антигена от 1 до 12 мкг/мл. Наименьшая концентрация белка в антигене, при которой удается достичь наивысшей специфичности тест-системы, составила 6 мкг/мл.

Контрольные токсоплазменные сыворотки получали на клинически здоровых серонегативных беспородных собаках и кошках путем гипериммунизации. В качестве антигена при этом была использована инактивированная культура токсоплазм. Нарастание титра антител в сыворотке крови доноров контролировали еженедельно в РСК. Контрольные отрицательные сыворотки получали от серонегативных интактных кошек и собак. Обработку препаратов проводили аналогично схеме получения положительных сывороток.

Титр конъюгата был определен путем "шахматного" титрования специфического антигена и положительных токсоплазменных сывороток. В результате нами установлено, что для исследования сывороток кошек к 1 мл раствора ФСР-Т необходимо добавлять 15 мкл, а для исследования сывороток собак – 6 мкл базового раствора конъюгата.

При подборе регламента постановки реакции в опытах мы испытывали 20-, 30-, 40-, 50-, 60-, 70-, 80- и 90-минутные периоды инкубации планшетов в термостате. В модельных опытах сначала подбирали регламент экспозиции сывороток (при одинаковой экспозиции конъюгата), а затем наоборот. Оптимальным временем экспозиции сывороток оказалась инкубация планшета в термостате в течение 60 минут, конъюгата – 40 минут.

В результате исследований нами разработан набор для диагностики токсоплазмоза кошек и собак в ИФА путем выявления антител, включающий иммуносорбент – планшет для иммунологических реакций, сорбированный специфическим токсоплазменным антигеном, положительные контрольные образцы – сыворотки крови кошек и собак, содержащие токсоплазменные антитела, отрицатель-

ные контрольные образцы – сыворотки крови кошек и собак, не содержащие токсоплазменные антитела, конъюгат – белок А, меченный пероксидазой хрена, фосфатно-солевой раствор с твином, цитратный буферный раствор с перекисью водорода, хромоген – тетраметилбензидин, стоп-реагент – 4N раствор серной кислоты. Высокий коэффициент специфичности тест-системы (6,5-7,5) позволяет регистрировать результаты анализа не только инструментально, но и визуально.

Материалы по разработке ИФА в качестве диагностического теста для выявления токсоплазменных антител у кошек и собак и нормативно-техническая документация рассмотрены и одобрены на научно-техническом совете ФГОУ ВПО КГАВМ (протокол № 3 от 3 декабря 2004 г.). Временная инструкция и технические условия утверждены ФГОУ ВПО КГАВМ, наставление по применению тест-системы – ГУВ Кабмина РТ 3 декабря 2004 г.

2.3. Сравнительное изучение эффективности РСК и ИФА для ретроспективной диагностики токсоплазмоза у домашних плотоядных

Учитывая успешное использование сконструированной тест-системы для лабораторной диагностики токсоплазмоза кошек и собак, нами были предприняты попытки обнаружения токсоплазменных антител в сыворотках животных в ИФА и сравнения полученных результатов с данными испытания тех же проб в РСК. Всего было исследовано 438 проб, в том числе 393 от кошек и 45 от собак (таблица 2).

Данные таблицы свидетельствуют, что из 142 проб (128 от кошек и 14 от собак), полученных от подозрительных по заболеванию животных, в ИФА с токсоплазменным антигеном реагировали 51 (39,8%) кошка и 2 собаки (14,3%). При исследовании животных по просьбе владельцев из 296 проб (265 от кошек и 31 от собак), в ИФА реагировали 89 (30,1%), в том числе 86 (32,5%) проб, полученных от кошек, и 3 (9,7%) – от собак. Всего из 438 испытанных в ИФА сывороток домашних плотоядных реагировало с токсоплазменным антигеном 142 (32,4%) проб. Из протестированных 394 сывороток крови кошек и 45 – собак, в ИФА реагировали соответственно 137 (34,9%) и 3 (6,7%) пробы. Следует отметить, что все реагирующие в РСК сыворотки также реагировали и в ИФА.

**2 Результаты исследования на токсоплазмоз сывороток крови
подозрительных по заболеванию кошек и собак**

Группы животных	Число проб	Реагировало в ИФА		Реагировало в РСК			
				сомнительно		положительно	
		кол-во	%	кол-во	%	кол-во	%
Подозрительные по заболеванию							
Кошки	128	51	39,8	8	6,3	3	2,3
Собаки	14	2	14,3	-	0	-	0
ВСЕГО от подозрительных по заболеванию	142	53	37,3	8	5,6	3	2,1
По просьбе владельцев							
Кошки	265	86	32,5	13	4,9	5	1,9
Собаки	31	3	9,7	1	3,2	-	0
ВСЕГО по просьбе владельцев	296	89	30,1	14	4,7	5	1,7
ИТОГО	438	142	32,4	22	5,0	8	1,8

Полученные данные показывают большую чувствительность ИФА по сравнению с РСК при выявлении антител у подозрительных по заболеванию токсоплазмозом мелких домашних животных. Кроме того, следует отметить, что проведение РСК – весьма трудоемкий по сравнению с ИФА процесс, для которого требуется, как минимум, 4-5 часов, а для постановки последней – около 2 часов.

Все 137 реагирующие в ИФА сыворотки крови кошек были подвергнуты повторному испытанию иммуноферментным методом через 3-4 недели после первого исследования. При этом у 133 кошек уровень специфических антител за этот период не изменился или несколько (на 5-10%) снизился.

У трех животных при исследовании парных сывороток крови был установлен значительный (в 1,5-2 раза) рост показателя оптической плотности цветной реакции иммуноферментного анализа. Таковыми оказались кошки, в кале которых были обнаружены похожие на токсоплазмы микроорганизмы и в ПЦР был получен положительный результат молекулярно-генетических исследований.

Кошка, у которой в кале также были обнаружены микроскопические объекты, похожие на токсоплазмы, и затем в ПЦР был получен отрицательный результат, антитела в ИФА ни при первом, ни при повторном (через 3 недели) исследованиях, не были выявлены.

У одной кошки при исследовании парных сывороток крови было установлено увеличение в 1,4 раза показателя оптической плотности цветной реакции иммуноферментного анализа. Однако в фекалиях этой кошки при копрологических исследованиях микроскопические объекты похожие на токсоплазмы не были обнаружены и в ПЦР был получен отрицательный результат молекулярно-генетических исследований. Данный факт говорит о том, что эта кошка уже перестала выделять ооцисты с фекалиями, однако титры антител у нее еще растут.

2.4. Серологический скрининг домашних плотоядных животных в отношении токсоплазменной инвазии

При определении степени серонегативности поголовья домашних плотоядных в г. Казани было проведено исследование в ИФА всех кошек и собак, владельцы которых обращались за врачебной помощью в Лечебно-консультативный центр ФГОУ ВПО КГАВМ. Иными словами был проведен серологический скрининг поголовья мелких домашних животных в отношении токсоплазменной инвазии. Всего было исследовано 600 проб клинического материала, в том числе 311 сывороток крови собак и 289 – кошек (таблица 3).

3. Результаты исследования на токсоплазмоз сывороток крови подозрительных по заболеванию кошек и собак

Возрастные группы	Число проб	Реагировало в ИФА	
		кол-во	%
Щенята	115	4	3,5
Суки	106	27	25,5
Кобели	90	11	12,2
ВСЕГО СОБАК	311	42	13,5
Котята	80	9	11,3
Кошки	118	32	27,1
Коты	91	12	13,2
ВСЕГО КОШЕК	289	53	18,3
ИТОГО	600	95	15,8

Из 600 исследованных сывороток, полученных от домашних плотоядных, владельцы которых обращались за ветеринарной помощью в ветеринарные клиники, в ИФА с токсоплазменным антигеном реагировало 95 проб, что со-

ставляет 15,8%. По видам животных процент серопозитивности в ИФА поголовья кошек и собак составил соответственно 13,5 и 18,3.

Таким образом, нашими исследованиями показана возможность использования иммуноферментной тест-системы для серологического скрининга поголовья домашних плотоядных в отношении токсоплазмоза, а также высокая степень серопозитивности домашних кошек и собак в отношении указанной инвазии

2.5. Изучение сероконверсии при иммунизации кошек токсоплазменным антигеном

Синтез антител при первичном заражении токсоплазмами при нормально функционирующей иммунной системе осуществляется по общим законам иммуногенеза. При этом чрезвычайно важное значение имеет динамика антител во времени. Концентрация антител, относящихся к иммуноглобулинам класса IgG, при токсоплазмозе достигает максимума ко 2-3-му месяцу инвазии, затем снижается, но остается повышенной в течение всей жизни инвазированного (Васильев В В, 1998). Нами было проведено изучение сероконверсии специфических антител в организме кошек при их иммунизации инактивированными токсоплазмами.

Ввиду чрезвычайной опасности заболевания для человека и необходимости соблюдения особого режима при работе с живыми токсоплазмами мы не имели возможности использовать для иммунизации не инактивированного паразита. Культуры производственных штаммов токсоплазм поступали к нам уже инактивированными, в лиофилизированном состоянии.

При изучении сероконверсии токсоплазменных антител в сыворотках крови 12 кошек иммунизированных инактивированным паразитом было установлено, что у разных животных отмечалась разнообразная реакция на введение инактивированных токсоплазм. Через 2 недели после иммунизации только у 9 кошек ОП иммуноферментной реакции превышала ОП контрольной отрицательной сыворотки на 0,2 и более оптических единиц. Через 4 недели такая реакция была уже у всех кошек.

Максимальных значений уровень специфических антител достиг у 2 кошек уже через 4, у 8 – через 6 и у 2 – через 8 недель после введения инактивированного антигена токсоплазм. Динамика средних значений уровня токсоплазменных антител в сыворотках крови иммунизированных кошек представлена на рисунке 1.

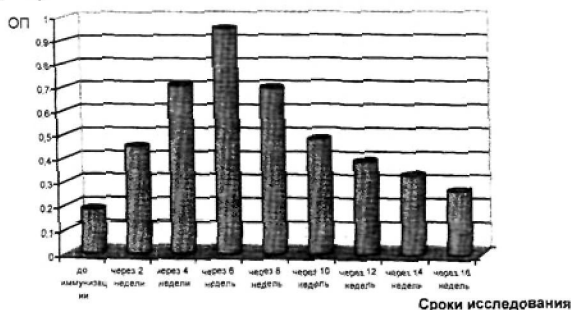


Рис. 1. Динамика специфических антител в сыворотке крови кошек при иммунизации их токсоплазменным антигеном.

Несмотря на то, что в наших опытах мы использовали инактивированный антиген, полученные данные позволяют проводить иммунобиологическую оценку реактивности организма кошек при иммунизации токсоплазменными антигенами. Эти данные могут быть использованы в разработке средств диагностики и профилактики токсоплазмоза.

2.6. Алгоритм исследования кошек на токсоплазмоз

Диагностика токсоплазмоза должна базироваться на комплексе различных методов исследования. В этом плане обычно отдается предпочтение легко доступным, безопасным, высоко чувствительным, специфичным и недорогим диагностическим тестам. Нами разработаны схемы диагностики токсоплазмоза у кошек и собак, в которых ключевым этапом является исследование сывороток крови иммуноферментным методом.

Основываясь на данных, представленных в предыдущих главах, мы предложили алгоритм серологического исследования кошек на токсоплазмоз с использованием разработанной нами тест-системы:

- сыворотки, давшие положительный результат в ИФА в разведении 1 100 при первом исследовании, оставляют для хранения в морозильной камере холодильника (однократное замораживание)
- серопозитивных животных подвергают повторному исследованию через 2-3 недели,
- в период между взятиями парных проб сыворотки крови в обязательном порядке проводятся копрологические исследования подозрительной по заболеванию кошки

Увеличение титров токсоплазменных антител при параллельных исследованиях парных сывороток крови, а также наличия в кале объектов, похожих по строению на ооцисты токсоплазм, является основанием считать животное больными. Для более точной постановки диагноза необходимо проводить идентификацию токсоплазм в пробах кала при помощи ПЦР.

Однократное замораживание положительных в ИФА проб сывороток оказывает незначительное снижение титров специфических антител (менее 1%) и не влияет на результаты параллельных исследований парных сывороток крови.

На схеме диагностики токсоплазмоза у подозрительных по заболеванию или подозрительных по заражению собак ключевым этапом также является исследование сывороток крови иммуноферментным методом. Для подтверждения или опровержения диагноза проводят паразитологические исследования, где в качестве материала для исследования используют мертворожденный (абортированный) плод или его паренхиматозные органы (головной мозг, глаза, кусочки плаценты и др.), органы павших или вынуждено убитых животных (сердце, легкие, печень, селезенку, почки, лимфатические узлы и головной мозг).

Последовательное выполнение алгоритмов исследования дает ветеринарному специалисту возможность правильно интерпретировать результаты предварительных серологических исследований и решить вопрос об опасности инфицированного животного для его владельца.

ВЫВОДЫ

1 Клинико-эпизоотологическими исследованиями установлена степень распространения токсоплазменной инвазии у мелких домашних животных

- симптомы характерные для токсоплазмоза встречаются у 17-25% от общего числа кошек и собак, владельцы которых обращаются к ветеринарным специалистам,
- в реакции связывания комплемента с токсоплазменным антигеном в диагностических титрах реагируют 7,7% сывороток крови, полученных от подозрительных по заболеванию токсоплазмозом домашних плотоядных,
- при исследовании кошек и собак, не имеющих клинических признаков, характерных для токсоплазмоза, специфические антитела в РСК обнаружены у 6,6% животных,
- при копрологических исследованиях микроскопические объекты, которые по своему строению были сходны с токсоплазмами, были выявлены в фекалиях у 3,1% подозрительных по заболеванию кошек,
- положительный результат ПЦР при исследовании фекалий подозрительных по заболеванию кошек был получен в 2,3% случаев

2 Полипептидный профиль разработанного токсоплазменного антигена для иммунологических реакций представлен 6 мажорными фракциями с молекулярной массой 79,50, 60,12, 50,09, 34,40, 32,20 и 30,22 кД

3 Сконструированная иммуноферментная тест-система для выявления токсоплазменных антител у спонтанно инвазированных кошек и собак эффективна при постановке диагноза на токсоплазмоз у спонтанно больных животных в сочетании с другими лабораторными методами исследования. При сравнительном исследовании сывороток крови, полученных от подозрительных по заболеванию токсоплазмозом домашних плотоядных, в РСК и ИФА с токсоплазменным антигеном в диагностических титрах реагируют соответственно 7,7% и 37,3%, что свидетельствует о высокой специфичности последней

4 Серологическим скринингом поголовья кошек и собак в г. Казани выявлено 15,8% домашних плотоядных, в сыворотках крови которых циркулируют специфические токсоплазменные антитела

5 При введении инаktivированных токсоплазм кошкам уровень специфических антител достигает максимальных значений через 6 недель после иммунизации

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

На основании проведенных исследований внесены следующие практические предложения

1 С целью предупреждения заболевания у кошек и собак токсоплазмозом ветеринарные специалисты обязаны регистрировать все случаи поражения органов зрения и центральной нервной системы, увеличения лимфатических узлов, гепатитов, панкреатитов, аборт и мертворождений у самок, гибели приплода в первые дни жизни и другой патологии, характерной для токсоплазмоза, и принимать все меры для установления их этиологии

2 При диагностике заболевания у мелких домашних животных (кошек и собак) необходимо использовать сочетание серологических тестов, копрологических исследований и молекулярно-генетических методов индикации токсоплазм согласно разработанным нами схемам

3 Иммуноферментная тест-система для выявления токсоплазменных антител у кошек и собак предложена для промышленного изготовления (Временное наставление по применению иммуноферментной тест-системы для выявления токсоплазменных антител у кошек и собак, утверждено ГУВ Кабмина РТ 3 декабря 2004 г) и может быть использована в ветеринарной практике для постановки диагноза на токсоплазмоз у спонтанно больных кошек и собак в сочетании с другими лабораторными методами исследования, серологическом скрининге поголовья мелких домашних животных в отношении токсоплазмоза

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

- 1 Воробьева, МН Совершенствование диагностики токсоплазмоза кошек / РХ Равилов, ВВ Герасимов, МН Воробьева // Матер Всероссийской науч-произв конф по актуал пробл ветерин и зоотехн – Казань КГАВМ, 2002 – Ч 2 – С 149-152
- 2 Воробьева, МН Иммуноферментная диагностика токсоплазмоза кошек / РХ Равилов, ВВ Герасимов, МН Воробьева // Сб статей “Актуал вопр вет мед мелких дом жив” – Екатеринбург, 2003 – С 30-32
- 3 Воробьева, МН ELISA-тест для диагностики токсоплазмоза мелких домашних животных / РХ Равилов, ВВ Герасимов, МН Воробьева // Матер XI Московского междунар ветерин конгресса – М, 2003 – С 12-13
- 4 Воробьева, МН Серологическая диагностика токсоплазмоза кошек / МН Воробьева // Матер конф мол уч и спец КГАВМ – Казань, 2004 – С 16
- 5 Воробьева, МН Серологическая диагностика токсоплазмоза собак и кошек / РХ Равилов, МН Воробьева, ВВ Герасимов // Сб стат Вет мед дом жив – Казань, 2004 – С 38-40
- 6 Воробьева, МН Алгоритм исследования кошек на токсоплазмоз / РХ Равилов, МН Воробьева, ВВ Герасимов // Сб стат Вет мед дом жив – Казань, 2004 – С 40-44

7. Воробьева, МН Ретроспективная диагностика токсоплазмоза кошек и собак / Р Х Равилов, МН Воробьева, В В Герасимов // Матер XIII Междунар моск конгр по болезням мелк домаш жив – М., 2005 – С 9-10
- 8 Воробьева, МН Динамика специфических антител в сыворотке крови кошек при иммунизации токсоплазменным антигеном / Р Х Равилов, М.Н Воробьева, В В Герасимов // Сб стат Вет мед дом жив – Казань, 2005 – С 40-43
- 9 Воробьева, МН Иммуноферментный метод диагностики токсоплазмоза кошек / Р Х Равилов, В В Герасимов, М Н Воробьева // Матер межд симп Науч осн обесп защ жив от экотокс , радионук и возб опасн инф забол – Казань, 2005 – Ч II– С 105-111
- 10 Воробьева, МН Сравнительная оценка ретроспективных методов диагностики токсоплазмоза у кошек и собак / МН Воробьева // Матер V Всерос науч -практ конф “Вет медицина Совр пробл и пресп разв” – Саратов, 2005 – С 48-49
- 11 Воробьева, МН Серологический скрининг кошек в отношении токсоплазмоза / Р Х Равилов, В В Герасимов, М Н Воробьева // Матер XIV Междунар моск конгр по болезням мелк домаш жив – М , 2006 – С 22-23
- 12 Воробьева, МН Серопозитивность кошек в отношении токсоплазменной инвазии / Р Х Равилов, МН Воробьева, В В Герасимов // Ученые записки КГАВМ – Казань, 2006 – Т 182 – С 272-277

*Отпечатано в ООО «Печатный двор»
г. Казань, ул. Журналистов, 1/16, оф. 207
Тел. 272-74-59, 541-76-41, 541-76-51
Лицензия ПД №7-0215 от 01.11.2001 г.
Выдана Поволжским межрегиональным
территориальным управлением МПТР РФ
Подписано в печать 25.04.2007 г. Усл. п. л. 1,25
Заказ № К-6378 Тираж 100 экз. Формат 60х84 1/16
Бумага офсетная Печать - ризография*