

**ИНСТИТУТ СИСТЕМАТИКИ
И ЭКОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИСиЭЖ СО РАН)**

ООО «Биоград»

630091, г. Новосибирск, ул.Фрунзе - 11
Для телеграмм: г. Новосибирск, 91, Зоология
тел./факс: (383)2170973
E-mail: office@eco.nsc.ru

Исследование выполнялось в г. Новосибирске на базе ветеринарной клиники «АС Вет» в 2014-2015 гг.

Предмет исследования: особенности эпизоотологии возбудителя токсоплазмоза.

Объект исследования: домашние кошки разных возрастов, полов и пород.

С учетом литературных данных по вопросам диагностики для изучения эпизоотических особенностей токсоплазмозной инвазии решено было выбрать наиболее информативный и чувствительный метод – исследование сыворотки крови с помощью ИФА.

Лабораторными методами исследованы пробы сыворотки крови от 73 кошек. Пробы крови получали от клинически здоровых животных с согласия владельцев. От каждой кошки без использования анестезии брали из вены по 2-3 мл крови в сухие чистые пробирки, которые затем подписывали порядковым номером. Сыворотку отделяли путем отстаивания при комнатной температуре до полной ретракции сгустка. До проведения серологического исследования закрытые пробирки хранили в морозильной камере холодильника.

Антитела к возбудителю токсоплазмоза выявляли с использованием комбинированной тест-системы ImmunoComb Feline Toxoplasma & Chlamydomphila Antibody Test Kit. Данный тест является модифицированным иммуноферментным анализом и позволяет одновременно проводить исследование 12 проб сыворотки крови на наличие антител IgG к возбудителям токсоплазмоза и хламидиоза. В ходе исследования наличие антител к возбудителю хламидиоза при дальнейшей обработке данных не учитывалось.

Основными компонентами тест-системы являются пластиковый гребень с 12 зубцами и проявочная ванна с 6 рядами по 12 ячеек, имеющими обозначения А, В, С, D, E, F.

Для исследования из пробирки отбирают капилляром 5 мкл сыворотки, после чего вскрывают защитную пленку ячейки ряда А, вносят образец и перемешивают. Таким же образом в ячейки ряда А вносят все исследуемые пробы. Пластиковый гребень вставляют зубцами во вскрытые ячейки печатной стороной к себе (при необходимости тестирования менее 12 образцов гребень отламывают или отрезают по нужной метке). В начале каждого ряда гребень осторожно несколько раз перемещают вверх-вниз для лучшего перемешивания. Капли жидкости на концах зубцов при переносе из ряда в ряд аккуратно промокают фильтровальной бумагой. Выдержка в ячейках ряда А составляет 10 минут. После этого вскрывают необходимое число ячеек ряда В, в котором вымываются несвязавшиеся антитела, и погружают гребень на 2 минуты. В ячейках ряда С, где антитела помечаются, гребень оставляют на 10 минут. В каждый из рядов D и E гребень для промывки помещают на 2 минуты. Затем гребень вставляют в ряд F, где проявляется цвет, на 10 минут. После этого переносят гребень обратно в ряд E ещё на 2 минуты для фиксации окраски, затем вынимают его и сушат в течение 1-10 минут. Таким образом, на проведение реакции без учета результатов требуется от 39 до 48 минут.

После проведения теста на каждом из зубцов гребня должны быть видны окрашенные точки. Верхняя – точка положительного контроля, которая окрашена в пурпурно-серый цвет. Средняя точка показывает результат на антитела к возбудителю хламидиоза в образце. Нижняя точка показывает результат на антитела к возбудителю токсоплазмоза в образце. Быстрое чтение результатов можно произвести визуальным сравнением средней и нижней точки с контролем – если они такого же цвета или темнее, результат положительный.

Интерпретация результатов с выявлением титра антител производится с помощью цветовой шкалы CombScale, предоставляющейся в составе набора. Шкала пронумерована от S0 до S6. Цвет точек на гребне соответствует значениям S, которые, в свою очередь, обозначают титр антител. S0 обозначает отсутствие цвета и явно отрицательный результат. S1 и S2 обозначают неопределенный результат и интерпретируются как значения менее 1:16 и 1:16 соответственно. Все цвета, начиная с S3 и далее, трактуются как положительный результат. S3 соответствует значению титра антител 1:32, S4 – 1:64, S5 – 1:128, S6 – 1:256.

Оценку результатов производили с помощью стандартной паразитологической формулы расчета экстенсивности инвазии (ЭИ), или показателя частоты встречаемости:

$$P = \frac{Np \times 100\%}{n},$$

где Np – число инвазированных животных;

n – общее число обследованных животных.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия достоверности разностей двух оценок экстенсивности инвазии (Федоров, 1986).

$$t \text{ dif} = \frac{P1 - P2}{\sqrt{m1^2 + m2^2}},$$

где $P1$ и $P2$ – сравниваемые показатели экстенсивности инвазии, %;

$m1$ и $m2$ – их ошибки.

Ошибку для относительного показателя экстенсивности инвазии рассчитывали по формуле:

$$mp = \sqrt{\frac{P \times (100 - P)}{n}}.$$

Достоверными различия считали при t -критерии не менее 2, то есть вероятности безошибочного прогноза не менее 95%.

Для графического оформления материала и статистической обработки использовали программное обеспечение Microsoft Office Excel 2007.

Результаты исследования

Инвазированность домашних кошек токсоплазмозом в г. Новосибирске

Всего было исследовано 73 пробы сыворотки крови от животных разных возрастов, полов и пород. Первичные данные о кошках, записанные со слов владельцев, вместе с показателем титра антител для каждого из животных представлены в приложении 1.

Из всех обследованных проб сыворотки крови антитела к возбудителю токсоплазмоза были выявлены в 48 случаях. Следовательно, показатель экстенсивности инвазии составляет 65,8%.

В процессе серологического скрининга нами были исследованы пробы от животных разных пород. В таблице 1 представлены сведения о полученных результатах при разделении животных на группы по породному критерию.

Таблица 1

Инвазированность кошек токсоплазмозом в различных породных группах

Порода кошек	Количество обследованных животных	Количество животных с положительным результатом	Показатель положительных результатов, %	
			в породной группе	среди всех серопозитивных животных
Абиссинская	2	1	50	2,1
Бенгальская	7	5	71,4	10,4
Бобтейл	4	2	50	4,2
Британская короткошерстная	16	13	81,3	27,1
Донской сфинкс	2	2	100	4,2
Канадский сфинкс	9	3	33,3	6,2
Мейн-кун	2	1	50	2,1
Метис (б/п)	29	21	72,4	43,7
Шотландская вислоухая	2	0	0	0

Всего было исследовано 29 проб от беспородных животных, 21 из которых оказалась положительной, и 44 пробы от породистых животных, 27 из которых дали положительную реакцию. При анализе результатов по породным данным выявлено, что в группе беспородных животных экстенсивность инвазии выше, чем в группе породистых ($72,4 \pm 8,3\%$ и $61,4 \pm 7,3\%$ соответственно). При статистической обработке данных получили t-критерий достоверности, равный 1, что не позволяет считать данные различия достоверными.

Половозрастная динамика токсоплазмоза у домашних кошек в г. Новосибирске

В ходе проведения исследования образцы сыворотки крови были взяты от животных в возрасте от 2 месяцев до 16 лет. Было принято решение разделить животных на 3 группы: младшая – до 1 года; средняя – от 1 до 7 лет; старшая – более 7 лет. Данные по полученным результатам у животных разных возрастов представлены в таблице 2.

Таблица 2

Распространение токсоплазмоза среди кошек в зависимости от возраста

Возрастная группа	Количество обследованных животных	Количество серопозитивных животных	Процент положительных результатов, %
Младшая	22	10	45,5
Средняя	46	34	73,9
Старшая	5	4	80

Анализ результатов показал, что количество положительных реакций в старшей и средней возрастной группе заметно выше, чем в младшей.

При сравнении экстенсивности инвазии в группе животных младше 1 года и группе животных старше 1 года (без деления на среднюю и старшую возрастные группы) мы получили результаты $45,5 \pm 10,6\%$ и $74,5 \pm 6,1\%$ соответственно. t-критерий достоверности составил 2,4, что позволяет говорить о статистической достоверности данных результатов.

В ходе обработки полученных результатов животные также были разделены по половому критерию. В таблице 3 представлены данные по распределению положительных результатов среди самцов и самок.

Таблица 3

Инвазированность кошек токсоплазмозом в зависимости от пола

Половая группа	Количество обследованных животных	Количество серопозитивных животных	Процент положительных результатов, %
Самцы	26	16	61,5
Самки	47	32	68

При статистической обработке полученных результатов выяснилось, что антитела к возбудителю токсоплазмоза имеются у $61,5 \pm 9,5\%$ самцов и $68 \pm 6,8\%$ самок. t-критерий достоверности имеет значение 0,6, что указывает на статистическую недостоверность выявленных различий.

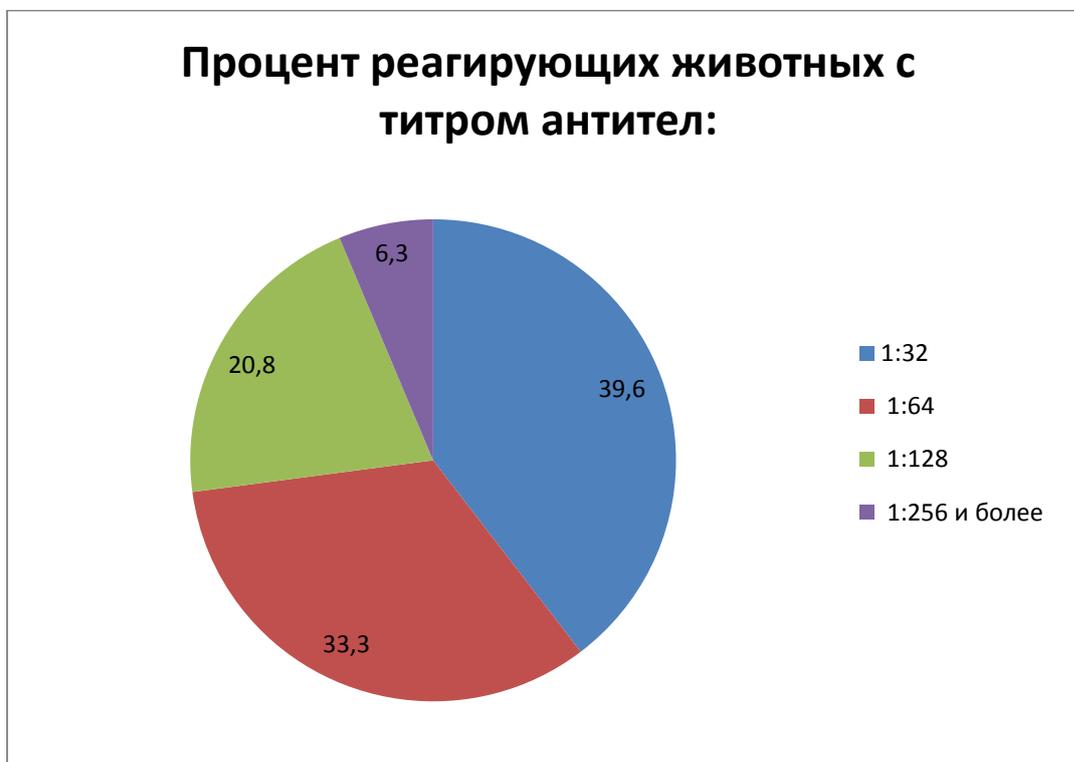
Особенности распределения титров антител среди положительно реагирующих домашних кошек

При осмотре ни у одного из животных не были выявлены клинические признаки токсоплазменной инвазии или других заболеваний, все кошки имели хороший аппетит, находились в активном состоянии, температура тела укладывалась в пределы нормы. Жалоб со стороны владельцев также не было. Исходя из этого, можем предположить, что животных с острой формой токсоплазмоза среди обследованных не было. Следовательно, все животные, у которых были обнаружены антитела, переболели ранее, а серонегативные животные еще не сталкивались с возбудителем инвазии.

При учете результатов было выявлено различие в титрах антител у исследуемых животных.

Как можно видеть из рисунка 2, наибольшее количество обследованных серопозитивных животных имеет титр антител 1:32 или 1:64. Немногим меньшее количество животных имеет титр антител 1:128. Самый низкий процент реагирующих животных имеет титр антител 1:256 и выше.

Рис. 2. Распределение титров антител среди серопозитивных животных



Обсуждение полученных результатов

При выявлении степени инвазированности домашних кошек г. Новосибирска получили экстенсивность инвазии 65,8%.

Данный процент укладывается в пределы интервала, указанного авторами в литературе в разных географических регионах (от 12,7% до 80%). Средний показатель в изученных литературных данных составляет 46,1%, следовательно, в этом исследовании мы получили результат выше среднего по некоторым городам России. Наиболее близкие результаты получены при исследованиях разными авторами в г. Воронеже и Воронежской области.

Можно сделать вывод, что, несмотря на то, что все обследованные нами животные проживают в городских условиях, экстенсивность токсоплазмозной инвазии остается высокой, как и в природе, и трофические связи между хозяином и возбудителем остаются неразрывными.

Полученных данных по отдельным породам кошек недостаточно, чтобы можно было сделать какие-либо выводы о предрасположенности их к заражению, так как в некоторых породных группах слишком малое количество животных, чтобы результаты сравнения считались достоверными.

Имеется статистически недостоверная тенденция к увеличению количества зараженных кошек в группе беспородных животных в сравнении с породистыми.

Многие авторы из рассмотренных в обзоре литературе указывают на то, что количество позитивных результатов увеличивается в группе животных, имеющих доступ на улицу. При проведении исследования мы не выясняли, имеется ли у животного возможность беспрепятственно находиться на улице и охотиться. Можно предположить, что владельцы беспородных кошек чаще предоставляют им доступ на улицу, чем породистых, поэтому наблюдается разность в процентных показателях экстенсивности инвазии в этих группах. Но, так как количество животных в одной и в другой группе сильно отличается, статистически данная зависимость не достоверна. Для подтверждения или опровержения такой тенденции необходимо провести исследование в равных или близких к этому группам животных.

При анализе результатов исследования выявлена статистически достоверная прямая возрастная зависимость среди положительных животных. В группе животных младше 1 года и группе животных старше 1 года получены показатели экстенсивности инвазии $45,5 \pm 10,6\%$ и $74,5 \pm 6,1\%$ соответственно. В изученных литературных данных анализ результатов исследования по возрастному критерию наиболее распространен. Таковую же зависимость подтверждает ряд авторов, в том числе Новикова Т.В. (2005, 2006), Волгина И.С. (2010), Гапонов С.П. и Меняйлова И.С. (2011), Березина Е.С. (2012).

Следовательно, мы можем подтвердить тот факт, что с возрастом вероятность встречи кошки с возбудителем увеличивается, и шанс животного остаться серонегативным снижается.

Из полученных первичных результатов можно сделать вывод, что наблюдается небольшая половая предрасположенность к заражению и самки заражаются чаще самцов. Однако при статистической обработке данные различия оказались недостоверными ($61,5 \pm 9,5\%$ самцов и $68 \pm 6,8\%$ самок).

В литературе часто указывается на преобладание положительных результатов в группе самок, например, по данным Новиковой Т.В. (2005, 2006), Воробьевой М.Н. (2007), Меняйловой И.С. (2012), Березиной Е.С. (2012). Только в работе Гапонова С.П. и Меняйловой И.С. (2011) указано, что количество реагирующих самцов и самок различалось незначительно. Принято считать, что самки кошачьих в большей степени участвуют в охоте, чем самцы, поэтому такое распределение, вероятно, актуально только для животных с доступом на улицу и возможностью ловить птиц и мышевидных грызунов, которые являются промежуточными хозяевами токсоплазмы. Кроме этого, не во всех источниках литературы указаны сведения о статистической обработке данных, а сравнение только лишь полученных процентов не позволяет сделать вывод о достоверной зависимости. Так же, как и в случае с породными группами, для подтверждения или опровержения данной зависимости необходимо провести исследование в относительно равных группах животных.

В ходе проведения исследования у обследованных животных были выявлены различия в титрах антител. Сам по себе титр антител IgG не является показателем, позволяющим достоверно определять время заражения животного, так как начинает расти, как правило, только через пару недель после заражения и достигает пика через несколько месяцев. Но он позволяет определить факт встречи животного с возбудителем, так как сохраняется в течение многих лет, фактически в течение всей жизни кошки. Таким образом, на основании данного теста мы можем установить, что животное, от которого была получена положительная проба сыворотки крови, переболело токсоплазмозом и больше не опасно для человека в качестве потенциального источника инвазии.

В большинстве случаев мы определяли значения титра антител 1:32 или 1:64. Некоторая часть животных имеет титр антител 1:128. В каждом индивидуальном случае это говорит о том, что животное подверглось инвазии достаточно давно, чтобы титр антител снизился до этих значений. Кроме этого, могут быть случаи, когда животное обследуют непосредственно через пару недель после инвазирования, и титр антител еще не успел достигнуть пика. Но вероятность такого варианта ниже, так как временной интервал, в

течение которого антитела IgG растут, составляет всего несколько недель. Вместе с тем, двойственность такого результата делает необходимым применения метода парных сывороток во всех случаях.

Титр антител 1:256 был выявлен у малого числа животных. Такой показатель может говорить о недавнем заражении животного в течение нескольких прошедших месяцев, и являться диагностическим критерием, при наличии клинической картины, когда необходимо принимать решение о специфической терапии, а окончательный диагноз устанавливать уже позднее.

Можно сделать вывод, что большая часть обследованных нами положительных животных перенесла заражение токсоплазмозом сравнительно давно, и только некоторые – в течение нескольких предшествующих месяцев. У всех обследованных серопозитивных кошек токсоплазмоз протекает в скрытой, хронической форме (носительство) и не представляет угрозы ни для состояния животного, ни для человека. Для диагностики острой формы токсоплазмоза однократный анализ сыворотки крови с выявлением антител класса IgG малоинформативен.

Таким образом, при обследовании животного с подозрением на острую форму токсоплазмоза следует использовать тесты, основанные на выявлении антител классов IgM или IgA, как наиболее быстро появляющихся в крови после заражения. Однако такие тесты не доступны ни в лабораториях, ни для использования в клиниках. В случае, когда возможно исследование сыворотки крови только на антитела класса IgG, реакцию проводят методом парных сывороток, то есть исследуют кровь от одного и того же животного с интервалом в 2-3 недели, и по изменению титра антител судят о динамике заболевания. Дополнительными методами диагностики могут служить копрологические методы, цитологические исследования и ПЦР.

Оценивая результаты серологического обследования домашних кошек на наличие антител класса IgG, можно прийти к выводу, что серонегативные животные представляют собой наибольшую потенциальную опасность в качестве источника заражения для людей и других животных, так как могут заразиться в любое время и начать выделять ооцисты с фекалиями.

Поскольку наибольшую опасность токсоплазмоз представляет для матери и плода во время беременности, необходимо разрабатывать профилактические меры с учетом этих особенностей. В медицине обязательным является обследование беременных женщин. В ветеринарии одной из мер предосторожности может стать обследование домашней кошки, живущей рядом с беременной или готовящейся забеременеть серонегативной женщиной. При отсутствии антител у такой кошки необходимо в полной мере соблюдать меры профилактики, описанные в литературе, направленные на предотвращение заражения как женщины, так и кошки, в некоторых случаях

– снизить количество контактов животного и человека. Данная мера предосторожности может быть направлена и на других домашних животных в период их беременности, живущих рядом с кошками. Кроме этого, рекомендуется обследовать беременных кошек, от которых планируется получить здоровое потомство. При отсутствии антител в сыворотке крови беременной кошки рекомендуется производить контроль каждые 2-3 недели, кроме того, снизить вероятность заражения животного.

Выводы

1. Серологическое исследование показало высокую серопозитивность популяции кошек г. Новосибирска в отношении токсоплазменной инвазии. При исследовании проб сыворотки крови с помощью модифицированного метода ИФА антитела к *Toxoplasma gondii* были выявлены в 65,8% случаев. Это доказывает высокую распространенность токсоплазмоза среди кошачьих не только в природе, но и в урбанизированной среде.

2. При проведении серологического скрининга была выявлена статистически достоверная прямая возрастная зависимость токсоплазмозной инвазии ($45,5 \pm 10,6\%$ среди кошек до 1 года и $74,5 \pm 6,1\%$ среди кошек после 1 года). При расчете экстенсивности инвазии в группах, разделенных по половому и породному признаку, выявлены статистически недостоверные тенденции к увеличению показателей в группах самок и беспородных животных. ЭИ составила $68 \pm 6,8\%$ среди самок и $61,5 \pm 9,5\%$ среди самцов; $72,4 \pm 8,3\%$ среди беспородных и $61,4 \pm 7,3\%$ среди породистых кошек.

3. Наиболее информативным методом диагностики с точки зрения переболевания животного является метод ИФА, основанный на выявлении в сыворотке крови животного антител к возбудителю. При использовании готовой диагностической тест-системы можно провести сразу 12 исследований за 40-50 минут, не обладая специальными навыками, кроме того провести диагностику одновременно на токсоплазмоз и хламидиоз.

Практические предложения и рекомендации

1. При диагностических исследованиях кошек на токсоплазмоз использовать в практической ветеринарии готовые тест-системы – ImmunoComb Feline *Toxoplasma* & *Chlamydophila* Antibody Test Kit или другие подобного типа.

2. При дифференциации острой формы токсоплазмоза от других состояний, сопровождающихся схожими симптомами, проводить два исследования сыворотки крови с интервалом в 2-3 недели.

Научный сотрудник, к.б.н.,

С.В. Коняев



Директор

д.б.н., проф.,
Институт систематики и экологии животных
СО РАН, г. Новосибирск

