

О.О. Федулina ¹, О.В. Сунцова ¹, В.А. Рар ², И.В. Мельцов ³, И.В. Козлова ¹, О.В. Лисак ¹,
В.В. Чекушкина ⁴

ВЫЯВЛЕНИЕ *THEILERIA EQUI* В КРОВИ ЛОШАДЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

¹ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека (Иркутск)

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск)

³ Иркутская государственная сельскохозяйственная академия (Иркутск)

⁴ ЗАО «Иркут» (Иркутск)

Работа посвящена выявлению в крови лошадей ДНК представителей отряда Piroplasmida. Проведено исследование 166 проб крови лошадей из пяти районов Иркутской области. Отмечена высокая инфицированность лошадей пироплазмидами (69 %). У шести положительных образцов определены нуклеотидные последовательности. Сравнение определенных нуклеотидных последовательностей гена 18S рРНК с ранее опубликованными показало, что все обнаруженные образцы ДНК пироплазм относятся к *Theileria equi*. Приведены данные о случае падежа лошадей от пироплазмоза, зафиксированного в Иркутской области в 2008 г.

Ключевые слова: тейлерии, тейлериоз, лошадиный пироплазмоз, иксодовые клещи

IDENTIFICATION OF *THEILERIA EQUI* IN HORSE BLOOD IN THE IRKUTSK REGION

О.О. Fedulina ¹, О.В. Suntsova ¹, V.A. Rar ², I.V. Meltsov ³, I.V. Kozlova ¹, O.V. Lisak ¹,
V.V. Chekushkina ⁴

¹ Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

³ Irkutsk State Agricultural Academy, Irkutsk

⁴ ZAO Irkut, Irkutsk

This paper describes the detection of Piroplasmida DNA in the blood of horses. 166 blood samples of horses from five districts of the Irkutsk region were studied. The high piroplasms infection rate in horses (69 %) was found. For six positive samples nucleotide sequences were determined. The comparison of determined 18S rRNA gene sequences with previously published sequences showed that all revealed piroplasms DNA samples are *Theileria equi*. The data are presented on the lethal cases of equine piroplasmosis in the Irkutsk region in 2008.

Key words: *Theileria*, theileriosis, equine piroplasmosis, ixodid ticks

Иксодовые клещи могут быть переносчиками не только возбудителей вирусных и бактериальных инфекций, но и простейших гемопаразитов из отряда Piroplasmida, тип Споровики (Apicomplexa). В состав отряда Piroplasmida входят представители двух семейств – Babesiidae и Theileriidae, состоящие из родов *Babesia*, *Theileria* и *Cytauxzoon*. Бабезии являются паразитами как беспозвоночных, так и позвоночных хозяев. Этиологическим агентом бабезиоза человека в США чаще всего является *Babesia microti*, а в Европе – *B. divergens*/*B. venatorum*.

Тейлериоз – заболевание животных, которое вызывается гемопаразитами рода *Theileria*. Тейлериоз являются облигатными внутриклеточными паразитами, принадлежат к семейству Theileriidae.

Theileria annulata и *T. parva* являются этиологическими агентами тейлериоза крупного рогатого скота, *T. equi* – вызывает заболевания у лошадей, мулов, ослов и зебр.

В настоящее время *T. equi* считается угрозой для конной индустрии во всем мире [4, 5, 14]. *T. equi* встречается в Южной Европе, Азии, странах СНГ, Африке, Кубе, Южной и Центральной Америке, США, Австралии [3, 13]. Наличие антител к данному возбудителю обнаружено у лошадей в Саудовской Аравии, Иордании, Мексике, Бразилии, Нидерландах,

Венесуэле, Египте и в Республике Корея [9]. С помощью ПЦР *T. equi* выявлена в Израиле [12], Северо-Восточной Монголии [11] и в Польше [2]. Однако на территории России этот возбудитель остается недостаточно изученным.

Как и все пироплазмиды, *T. equi* является паразитом как беспозвоночных, так и позвоночных хозяев. Ее жизненный цикл достаточно сложен, он включает чередование бесполого размножения (шизогонии), полового процесса и спорогонии. Половое развитие *T. equi* протекает в слюнных железах нимф и имаго клещей и завершается формированием спорозоитов. Со слюной клещей на 1–5-й день их питания в лимфу и кровь животных инокулируются спорозоиты размером от 1 до 2–3 мкм. В организме животного паразиты внедряются в лимфоидные клетки, растут в них и размножаются путем шизогонии. Сначала в результате последовательного деления ядер образуются макрошизонты, а затем при множественном почковании – микрошизонты. Сформированные в микрошизонтах мерозоиты внедряются в эритроциты животных и превращаются в трофозоиты, которые растут и размножаются путем простого деления, образуя грушеподобные тетрады («Мальтийский крест») [3]. В эритроцитарной фазе *T. equi* заглатывается личинками и нимфами клещей с кровью больных

или переболевших животных – тейлерионосителей, и цикл развития в клещах повторяется. Трансовариальная передача у *T. equi* отсутствует [3].

Основными переносчиками *T. equi* являются клещи семейства Ixodidae (*Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma*) [3]. Передача возбудителя также возможна через механические векторы, например, через загрязненные инфицированной кровью иглы [3].

Инкубационный период при пироплазмозе лошадей, ассоциированном с *T. equi* составляет от 12 до 19 дней. Клинические симптомы тейлериоза неспецифичны и его можно спутать с другими заболеваниями, протекающими с лихорадкой, анемией и желтухой.

Заболевание может протекать в острой, подострой и хронической формах [3]. Острая форма характеризуется лихорадкой до 40 °С, потерей аппетита, недомоганием, учащенным дыханием и пульсом, отеком слизистых оболочек, появлением темно-красной мочи, желтухой и анемией. Подострая форма подобна острой форме, но сопровождается потерей веса пораженных животных и перемежающейся лихорадкой. Цвет слизистых оболочек варьирует от бледно-розового до розового, или от бледно-желтого до ярко-желтого, на них могут появляться петехии. При хронической инфекции, как правило, присутствуют неспецифические клинические признаки, такие как снижение аппетита, массы тела. Отмечается бледность или иктеричность слизистых оболочек, кровь становится водянистой. При вскрытии трупа: печень раздутая оранжево-коричневой или бледной окраски; селезенка увеличена, рыхлая, темная с кровоизлияниями; почки бледнее или темнее чем обычно, с точечными кровоизлияниями; на ткани сердца могут быть субэпикардальные и субэндокардиальные кровоизлияния.

Смертность лошадей при данной инфекции варьирует от 10 до 50 % [3]. Однако в эндемичных областях большинство лошадей, перенесших тейлериоз, выживают.

В Иркутской области в 2008 г. в Усть-Удинском районе были зафиксированы случаи падежа лошадей. Для установления этиологии эпизоотии в район выехали специалисты противоэпизоотического отдела Службы ветеринарии. При осмотре трупа 2-годовалого мерина видимые слизистые оболочки были желтого цвета, при вскрытии – вся подкожная клетчатка, селезенка, почки, сердце с кровоизлияниями, печень глинистого цвета. В результате осмотра ветеринарными врачами в табуне были выявлены еще две кобылы с признаками инфекции. При осмотре заболевших животных: слизистые оболочки желтого цвета, дыхание затруднено, температура тела 40 °С, из половых органов выделение кровавистой мочи. Из крови и капилляров уха были приготовлены мазки, которые затем окрашены по Романовскому-Гимзе. При просмотре мазков под иммерсионным увеличением микроскопа выявлены пироплазмиды грушевидной формы. Для лечения и профилактики пироплазмоза всем лошадям табуна однократно был введен препарат «Верибен». От повторного введения препарата владелец табуна

отказался. Через 40 дней падеж в табуне повторился. Через неделю заболело еще две кобылы. При исследовании мазков крови от данных животных выявлено наличие пироплазмид.

В связи с отсутствием на вооружении ветеринарной службы Иркутской области методов видовой идентификации пироплазмид, более детальная этиологическая расшифровка эпизоотии не проводилась.

Приведенный случай является свидетельством в пользу актуальности проведения на территории Иркутской области исследований, направленных на выявление инфицированности лошадей представителями отряда Piroplasmida.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На наличие ДНК тейлерий было исследовано 166 образцов крови лошадей из шести районов Иркутской области.

Кровь животных по 1 мл отбирали в стандартные пробирки (erpendorf 1,5 мл) с добавлением 100 мкл 0,5М ЭДТА.

Суммарные нуклеиновые кислоты экстрагировали из образцов с помощью набора «Рибо-преп» («Амплипрайм», Москва). ДНК тейлерий выявляли методом двухраундовой ПЦР в присутствии родоспецифичных праймеров из области гена 18S рРНК, как описано в [8]. У шести положительных образцов были определены нуклеотидные последовательности гена 18S рРНК длиной 300 н.о. Сравнение нуклеотидных последовательностей с ранее опубликованными проведено с использованием программы BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), анализ полученных последовательностей выполнен методом ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustal/index.html>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами проведено исследование 166 проб крови лошадей из Эхирит-Булагатского, Осинского, Баяндаевского, Боханского, Усть-Удинского и Иркутского районов Иркутской области.

Боханский, Осинский, Баяндаевский и Эхирит-Булагатский районы входят в состав Усть-Ордынского Бурятского округа (УОБО), расположенного на юге Иркутской области. По физико-географическому районированию территория УОБО относится к Иркутско-Черемховской провинции и области островной лесостепи Средне-Сибирской страны, характеризуется умеренно теплым и недостаточно влажным климатом.

На территории Эхирит-Булагатского района встречаются клещи *I. persulcatus*, *D. silvarum*, *D. nuttalli* и *H. concinna*. Фауна характеризуется своеобразным набором биоценологических группировок, свойственных таежному, подтаежному, лесостепному и степному ландшафтам.

Для Осинского, Боханского и Баяндаевского районов наиболее характерными типами населения иксодовых клещей являются – лесостепной и степной. Для обоих типов характерно доминирующее положение клеща *D. nuttalli* и приуроченность к территории, максимально освоенным сельским хозяйством.

Численность клещей, как правило, низкая. Но на участках, используемых под выпас скота и заселенных длиннохвостым сусликом, а также вокруг населенных пунктов обилие клещей резко возрастает.

Агроклиматические условия Усть-Ордынского Бурятского округа благоприятны для сельскохозяйственного производства, в том числе для развития коневодства.

Нами было обследовано 20 проб крови лошадей из Эхирит-Булагатского района. ДНК представителей отряда *Piroplasmida* была выявлена в одной пробе (5 %).

На территории Боханского, Осинского и Баяндаевского районов инфицированность лошадей пироплазмами была очень высокой и составила 45 %, 90 % и 95 % соответственно.

Наибольший интерес для исследования представлял Усть-Удинский район, где ранее были зафиксированы случаи падежа лошадей от пироплазмоза. Район расположен в Среднем Приангарье, на правом берегу Ангары и Братского водохранилища, в верхнем течении Илима.

Доминирующим видом на данной территории являются клещи *I. persulcatus*, а их прокормителями – представители таежных фаунистических группировок. В лесостепных участках района к ним присоединяется *D. silvarum* и степные виды животных.

Было исследовано 60 проб крови лошадей из Усть-Удинского района. В 51 (85 %) из них обнаружена ДНК представителей отряда *Piroplasmida*.

В данную работу также были включены 26 проб крови лошадей, содержащихся на одном из ипподромов Иркутского района. Инфицированность лошадей представителями отряда *Piroplasmida* здесь была высокой – 61,5 %. У шести положительных образцов были определены нуклеотидные последовательности гена 18S рРНК длиной 300 н.о. Результаты секвенирования показали, что все исследованные образцы были одинаковыми и полностью идентичными последовательностям *T. equi*, обнаруженным ранее в крови лошадей из Швейцарии [№ доступа GenBank - KM 046921], Венгрии [KM 046921] и др.

На территории Иркутской области отмечается высокая инфицированность лошадей пироплазмами (69 %) в сравнении с другими странами. Так, например, в Иордании зараженность жеребцов и кобыл *T. equi* и *B. caballi* составила 37 и 23,5 %, соответственно [7]. Инфицированность мулов была более высокой – в среднем 75 % [7]. В Египте *T. equi* выявлена у 41,61 % исследованных лошадей [9]. Для получения более объективных данных об инфицированности лошадей пироплазмами на территории Иркутской области необходимо проведение мониторинга на постоянной основе с использованием более репрезентативной выборки. Остается нерешенным вопрос о переносчиках *T. equi* на территории Иркутской области. Проведенные нами ранее рекогносцировочные исследования позволили выявить в иксовых клещах несколько видов представителей отряда *Piroplasmida* – *Babesia microti* US-type, *B. venatorum*, а также пироплазм, филогенетически схожих

с *B. crassa* и *B. motasi* [1]. ДНК *T. equi* в клещах на настоящий момент не выявлена.

Отсутствие симптомов инфекции у большинства обследованных лошадей, по всей видимости, свидетельствует о наличии у них низкого уровня паразитемии. Однако инфицированные *T. equi* носители могут служить резервуарами инфекции, способствующими дальнейшему распространению этого паразита на территории Иркутской области.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ проекта №14-04-32375 мол_а.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Федулина О.О., Рар В.А., Сунцова О.В., Козлова И.В. Результаты рекогносцировочных исследований по обнаружению очагов babesиоза на территории Иркутской области // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН, 2013. – № 2–2 (90). – С. 130–133.
2. Fedulina O.O., Rar V.A., Suntsova O.V., Kozlova I.V. Results of reconnaissance studies on detection of babesiosis foci the Irkusk region // Bull. VSNC SO RAMN. – 2013. – N 2–2 (90). – P. 130–133. (in Russian)
3. Adaszek L., Gorna M., Krzysiak M., Garbal M., Winiarczyk S. Identification of the piroplasms isolated from horses with clinical piroplasmosis in Poland // Wiad. Parazytol. – 2011. – Vol. 57 (1). – P. 21–26.
4. Equine piroplasmosis. – <http://www.cfsph.iastate.edu>.
5. Hall C.M., Busch J.D., Scoles G.A., Palma-Cagle K.A., Ueti M.W., Kappmeyer L.S., Wagner D.M. Genetic characterization of *Theileria equi* infecting horses in North America: evidence for a limited source of U.S. introduction // Parasites & Vectors. – 2013. – Vol. 6. – P. 35.
6. Knowles D.P. Jr., Kappmeyer L.S., Stiller D., Hengnager S.G., Perryman L.E. Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with *Babesia equi* // J. Clin. Microbiol. – 1992. – N 30. – P. 3122–3126.
7. Lazarev V.V. Piroplasmoses of ruminant animals // Veterinary of the Kuban. – 2008. – N 2. – P. 29–31.
8. Qablan M.A., Obornik M., Petrzelkova K.J., Sloboda M., Shudiefat M.F., Horin P., Lukes J., Modry D. Infections by *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Jordanian equids: epidemiology and genetic diversity // Parasitology, Cambridge University Press. – 2013. – P. 1–8.
9. Rar V.A., Epikhina T.I., Livanova N.N., Panov V.V. Genetic diversity of *Babesia* in *Ixodes persulcatus* and small mammals from North Ural and West Siberia, Russia // Parasitology. – 2011. – Vol. 138. – P. 175–182.
10. Salib F.A., Youssef R.R., Said S.F. Epidemiology, diagnosis and therapy of *Theileria equi* infection in Giza, Egypt // Vet. World. – 2013. – Vol. 6 (2). – P. 76–82.
11. Seo M.G., Yun S.H., Choi S.K., Cho G.J., Park Y.S., Kwon O.D., Cho K.H., Kim T.H., Jeong K.S., Park S.J., Kwon Y.S., Kwak D. Seroprevalence of equine piroplasms in the Republic of Korea // Vet. Parasitol. – 2012. – Vol. 179 (1–3). – P. 224–226.
12. Sloboda M., Jirku M., Lukesova D., Qablan M., Bat-sukh Z., Fiala I., Horin P., Modry D., Lukes J. A survey for piroplasmids in horses and Bactrian camels in North-East-

ern Mongolia // Vet. Parasitol. – 2011. – Vol. 179 (1–3). – P. 246–249.

12. Steinman A., Zimmerman T., Klement E., Lensky I.M., Berlin D., Gottlieb Y., Baneth G. Demographic and environmental risk factors for infection by *Theileria equi* in 590 horses in Israel // Vet. Parasitol. – 2012. – Vol. 187 (304). – P. 558–562.

13. Stiller D., Goff W.L., Johnson L.W., Knowles D.P. *Dermacentor variabilis* and *Boophilus microplus* (Acari:

Ixodidae): experimental vectors of babesia equi to equids // J. Med. Entomol. – 2002. – Vol. 39 (4). – P. 667–670.

14. Ueti M.W., Palmer G.H., Kappmeyer L.S., Statfield M., Scoles G.A., Knowles D.P. Ability of the vector tick *Boophilus microplus* to acquire and transmit *Babesia equi* following feeding on chronically infected horses with low-level parasitemia // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43 (8). – P. 3755–3759.

Сведения об авторах

Федулина Ольга Олеговна – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел./факс: 8 (3952) 33-39-51; e-mail: bookslina@mail.ru)

Сунцова Ольга Владимировна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека

Рар Вера Александровна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории микробиологии института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАМН

Мельцов Иван Владимирович – кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры «Инновационные технологии в земледелии, животноводстве и ветеринарной медицине» института дополнительного профессионального образования Иркутской государственной сельскохозяйственной академии, начальник отдела организации противоэпизоотических мероприятий, лечебной и лабораторной работы – государственный ветеринарный инспектор Службы ветеринарии Иркутской области (e-mail: ivanmeltsov@mail.ru)

Козлова Ирина Валерьевна – доктор медицинских наук, руководитель лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека

Лисак Оксана Васильевна – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека

Чекушкина Вера Валерьевна – специалист в общем отделе ЗАО «Иркут»

Information about the authors

Fedulina Olga Olegovna – Junior Research Officer of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Genetic Diagnostics of Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems (664003, Irkutsk, Timiryazeva str., 16; tel./fax: (3952) 33-39-51; e-mail: bookslina@mail.ru)

Suntsova Olga Vladimirovna – Candidate of Biological Sciences, Research Officer, Laboratory of Molecular Epidemiology and Genetic diagnostics of Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems

Rar Vera Alexandrovna – Candidate of Biological Sciences, Research Officer of the Laboratory of Microbiology of Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine

Meltsov Ivan Vladimirovich – Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor of the department of Innovative Technologies in Agriculture, Animal Husbandry and Veterinary Medicine of Institute of Continuing Professional Education of Irkutsk State Agricultural Academy, Head of the Department of Organization of Anti-epizootic Measures, Medical and Laboratory Work, State Veterinary Inspector of the Veterinary Service of the Irkutsk region (e-mail: ivanmeltsov@mail.ru)

Kozlova Irina Valerievna – Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Genetic diagnostics of Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems

Lisak Oksana Vasilievna – Junior Research Officer of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Genetic diagnostics of Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems

Chekushkina Vera Valerievna – Specialist in the general department of ZAO Irkut