

УДК 619:616.993.192

DOI: 10.31016/1998-8435-2021-15-1-71-78

Оригинальная статья

Разработка новых антигенов для серологической диагностики трипаносомозов животных и применение их для эпизоотологического мониторинга

Георгиу Христофис

ФГБНУ ФНЦ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К. И. Скрябина и Я. П. Коваленко РАН, Россия, 109428, Москва, Рязанский проспект, 24, кор. 1, e-mail: Chgeorgiou@rambler.ru

Поступила в редакцию: 10.09.2020; принята в печать: 12.01.2021

Аннотация

Цель исследований – разработка способа получения эритроцитарных ДНК-содержащих и не содержащих антигенов *Trypanosoma equiperdum* и *T. evansi*, которые в дальнейшем могут быть использованы в серологических реакциях для дифференциации этих видов трипаносом.

Материалы и методы. Исследования выполняли в лаборатории протозоологии и Вышневолоцком филиале ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, а также в животноводческих хозяйствах Российской Федерации и других стран с использованием клинических, микроскопических, гематологических, паразитологических, молекулярно-биологических и серологических методов.

Результаты и обсуждение. Проведенные впервые исследования показали, что можно использовать эритроцитарные ДНК-содержащие антигены *T. equiperdum* и *T. evansi*, полученные после 3-кратного введения мышам и кроликам смеси из трипаносомного антигена с добавлением 1,0 мл адьюванта (гидрогись алюминия) и обескровливания животных после 25–30 сут. Полученный осадок использовали как антиген для серологических исследований. Опыты показали, что кровь для приготовления позитивной сыворотки можно брать, когда антитела в РДСК находятся в титрах 1:20, в РНГА и ИФА – не ниже 1:400, отрицательной – когда сыворотка крови лошадей отрицательно реагирует в РДСК, РНГА и ИФА с антигенами *T. equiperdum* и *T. evansi*. Приготовленные нами тест-системы РДСК, РНГА и ИФА с антигенами, содержащими и не содержащими ДНК *T. equiperdum* и *T. evansi*, привели к созданию универсальной тест-системы (РНГА) для дифференциации *T. equiperdum* от *T. evansi*.

Ключевые слова: протозойные болезни, трипаносомоз, *Trypanosoma evansi*, *T. equiperdum*, антиген, экзоантиген

Прозрачность финансовой деятельности: автор не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах

Конфликт интересов отсутствует

Для цитирования: Георгиу Х. Разработка новых антигенов для серологической диагностики трипаносомозов животных и применение их для эпизоотологического мониторинга // Российский паразитологический журнал. 2021. Т. 15. № 1. С. 71–78.

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2021-15-1-71-78>

© Георгиу Х., 2021



Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License.
The content is available under Creative Commons Attribution 4.0 License.

Original article

Development of new antigens for serologic diagnosis of animal trypanosomosis and their use for epizootic monitoring

Ch. Georgiou

Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV RAS",
24 Ryazansky prospect, Bldg. 1, Moscow, 109428, Russia, e-mail: Chgeorgiou@rambler.ru

Received on: 10.09.2020; accepted for printing on: 12.01.2021

Abstract

The purpose of the research is developing a method for obtaining erythrocyte antigens containing and not containing *Trypanosoma equiperdum* and *T. evansi* DNA, which can later be used in serological reactions to differentiate these types of Trypanosoma.

Materials and methods. The studies were conducted in the Protozoology Laboratory and the Vyshnevolotsk Branch of the Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV RAS", as well as livestock farms of the Russian Federation and other countries using clinical, microscopic, hematological, parasitological, biomolecular and serological methods.

Results and discussion. Studies carried out for the first time have shown that it is possible to use erythrocyte antigens containing the *T. equiperdum* and *T. evansi* DNA obtained after 3-fold administration to mice and rabbits of a mixture of trypanosomal antigen with addition of 1.0 ml of an adjuvant (aluminum hydroxide), and bleeding of animals at 25 to 30 days. The formed precipitate was used as an antigen for serological tests. Experiments have shown that blood for preparation of positive serum can be taken when antibodies are in titers of 1:20 in the Prolonged Complement Fixation Test, and at least 1:400 in the Indirect Hemagglutination Test and ELISA, and for negative serum when horse blood serum reacts negatively with antigens of *T. equiperdum* and *T. evansi* in the Prolonged Complement Fixation Test, Indirect Hemagglutination Test and ELISA. The test systems of the Prolonged Complement Fixation Test, Indirect Hemagglutination Test and ELISA prepared by us with antigens containing and not containing *T. equiperdum* and *T. evansi* DNA resulted in creating a universal test system (Indirect Hemagglutination Test) for differentiating *T. equiperdum* from *T. evansi*.

Keywords: protozoal diseases, trypanosomosis, *Trypanosoma evansi*, *T. equiperdum*, antigen, exoantigen

Financial Disclosure: The author has no financial or property interest in any material or method mentioned

There is no conflict of interests

For citation: Georgiou Ch. Development of new antigens for serologic diagnosis of animal trypanosomiasis and their use for epizootic monitoring. *Rossiyskiy parazitologicheskii zhurnal = Russian Journal of Parasitology*. 2021; 15 (1): 71–78. (In Russ.).

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2021-15-1-71-78>

© Georgiou Ch., 2021

Введение

Трипаномы – одноклеточные простейшие жгутиковые паразиты класса кинетопластид. На территории России встречаются возбудители случной болезни однокопытных (*T. equiperdum*) и суры лошадей и верблюдов (*T. evansi*).

По данным МЭБ случную болезнь, вызываемую *T. equiperdum*, регистрируют в Южной Африке, на юге Западной Европы, в Южной

Америке, КНР, Среднем Востоке, Средней Азии (Киргизии, Узбекистане) и в России (Сибири). У лошадей случная болезнь протекает наиболее тяжело с высоким уровнем смертности (30–50%) [6, 13, 15, 17].

T. evansi широко распространена в Азии, Северной Африке, Центральной и Южной Америке. К ней восприимчивы большинство видов домашних и многие виды диких животных. У непривитых лошадей и верблюдов

вызываемая этой трипаносомой болезнь сура (су-ауру), как правило, заканчивается летально [6, 14, 16, 18].

По международным правилам, ввоз лошадей из неблагополучных по случайной болезни стран разрешен только при условии исключения у них данного трипаносомоза. С этой целью в основном применяют серологические тесты (чаще реакцию связывания комплемента и дополнительно иммуноферментный анализ), микроскопию и биопробу на лабораторных животных.

При проведении диагностических исследований особую сложность представляет видовая дифференциация *T. equiperdum* и *T. evansi*, поскольку они неразличимы морфологически, имеют перекрестно реагирующие антигены и многочисленные сходные участки генома [1, 2, 4, 5, 7, 10, 12].

В некоторых лабораториях в качестве дополнительного подтверждающего теста используют ПЦР с праймерами к гену RoTat1.2 VSG, гену субъединицы 5 NADH дегитрогеназы (*nad5*) и другим участкам кинетопласта [4]. Однако, эти праймеры позволяют установить лишь принадлежность к подроду *Trypanozoon*, по меньшей мере, трех видов: *T. equiperdum*, *T. brucei* и *T. evansi* [1, 3, 4, 5, 8, 9, 11]. До сих пор

никому не удалось создать универсальную тест-систему для дифференциации этих видов трипаносом методом ПЦР.

В настоящее время методы молекулярной диагностики пока не нашли широкого применения для диагностики трипаносомозов животных. Ими пользуются преимущественно в исследовательских целях.

Для оценки филогенетического сходства использовали выборку из 10–13 последовательностей миникольца кинетопласта представителей разных видов трипаносом: *T. evansi*, *T. equiperdum* и *T. brucei* [данные из GenBank]. На дендрограммах (рис. 1, 2) можно, с одной стороны, установить родство между пробами 13, 55, G, с другой – охватить как можно более длинный фрагмент, чтобы получить более достоверные результаты. Все исследуемые пробы 13, 55, G оказались на одной эволюционной ветви с представителями *T. evansi*.

Две ветви, представляющие разные группы *T. evansi*, и ветвь *T. equiperdum*, довольно близки между собой эволюционно-дивергенция между ними не превышает 0,02–0,03, и равноудалены от *T. brucei* на гораздо большее расстояние, составляющее 0,26–0,27.

Оба антигена при исследовании сывороток крови лошадей показывают одинаковый

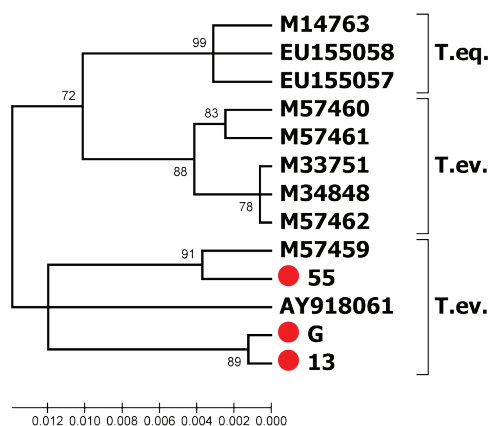


Рис. 1. Дендрограмма фрагмента в 410 н. п. из области миникольца кинетопласта, построенная методом ближайшего соседа с повторной выборкой $n = 1000$ в бутстрепном анализе в программе Mega 4. Статистическая достоверность соответствующих узлов дерева приведена в процентах. Шкала делений отражает эволюционное расстояние – число замен нуклеотидов на сайт. Эволюционное расстояние рассчитано методом максимального правдоподобия. Кругами помечены пробы, исследованные в настоящей работе

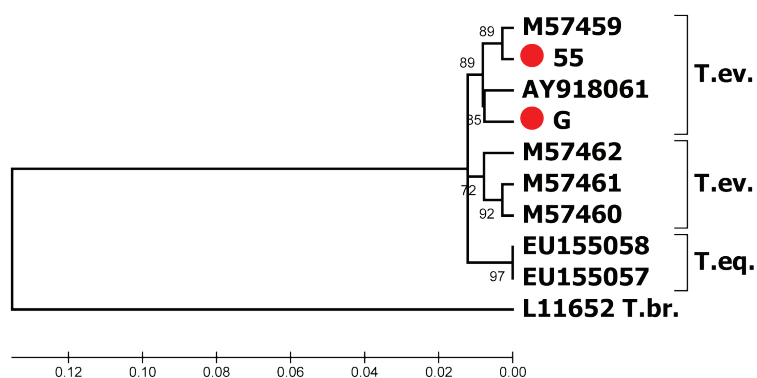


Рис. 2. Дендрограмма фрагмента в 724 н. п. (см. описание к рис. 1)

результат и пока не удается дифференцировать с их помощью положительные сыворотки *T. equiperdum* от таковых *T. evansi*. Поэтому нами приготовлена серия антигенов, с помощью которых можно дифференцировать трипаномы. Кроме применяемых в мировой практике антигенов, мы использовали и эритроцитарные ДНК-содержащие антигены *T. equiperdum* и *T. evansi*, полученные после трёхкратного введения мышам и кроликам АГ трипаносомного + 1,0 мл АГА (адьювант: гидроксид алюминия) и обескровливания после 25–30 сут.

С помощью этих антигенов изготовлены наборы компонентов для диагностики трипаносомозов лошадей в РДСК, РНГА и ИФА с ДНК-содержащими и не содержащими антигенами; положительные сыворотки, полученные от мышей, кроликов и лошадей, зараженных референтными штаммами и отрицательные – от отрицательно реагирующих лошадей.

Цель исследований – разработка способа получения эритроцитарных ДНК-содержащих и не содержащих антигенов *T. equiperdum* и *T. evansi*, которые в дальнейшем могут быть использованы в серологических реакциях для создания универсальной тест-системы для дифференциации этих видов трипаносом.

Материалы и методы

Научные исследования выполняли в лаборатории протозоологии и Вышневолоцком филиале ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, а также в животноводческих хозяйствах Российской Федерации и других стран с использованием клинических, микроскопических, гематологических, паразитологических, молекулярно-биологических и серологических методов в соответствии с Методическими рекомендациями для серологической диагностики случной болезни лошадей с применением экзоантигенов *T. equiperdum* в ИФА (2006, 2011), Методическими рекомендациями по диагностике трипаносомозов лошадей (*T. equiperdum* и *T. evansi*) в РНГА (2009), Временным наставлением по применению набора компонентов для диагностики анаплазмоза рогатого скота в РДСК (1997), Способом получения трипаносомного антигена для серологической диагностики у животных (патент на изобретение RUS 2327169 20.07.2006), и современного оборудования: микроскопы Olympus, BX53 и

CARL ZEISS, низкотемпературный холодильник HAIER, INDESIT, универсальный водный термостат BWT-U BIOSAN, весы GX200, термостат MIR 262 и центрифуга MPW-380 – с вентиляцией, ИФА-ридер, термостатируемый шейкер.

Получены содержащие и не содержащие ДНК антигены *T. equiperdum* и *T. evansi* и эритроцитарные с ДНК-содержащими антигенами и положительные и отрицательные сыворотки обоих видов трипаносом.

Сублимационное высушивание приготовленных серий позитивных сывороток проводили без защитной среды.

Реакцию длительного связывания компонента (РДСК) ставили согласно «Временному наставлению по применению набора компонентов для диагностики анаплазмоза рогатого скота в РДСК»; реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА), иммуноферментный анализ (ИФА) – согласно «Методическим рекомендациям по диагностике трипаносомозов лошадей (*T. equiperdum* и *T. evansi*)».

Результаты и обсуждение

Установлено, что объектом исследования были лиофильно высушенные трипаносомные с ДНК содержащими и белковыми компонентами и высокими титрами антигенами *T. equiperdum* и *T. evansi* (табл. 1).

Установлено, что присутствие и отсутствие ДНК в исследуемых пробах антигенов не влияет на белковые компоненты и на титры антигенов. Во всех исследуемых пробах титры антигенов были высокие: от 1:32 до 1:64. В дальнейшем, эти антигены могут быть использованы в серологических реакциях, таких как РДСК, РНГА и ИФА с целью создать универсальную тест-систему для дифференциации *T. equiperdum* и *T. evansi*.

Кроме выше описанных антигенов, нами использованы и эритроцитарные с ДНК-содержащими антигенами *T. equiperdum* (13 и 14, табл. 1) и *T. evansi* (55, табл. 1), полученные после трёхкратного введения мышам и кроликам АГ трипаносомного + 1,0 мл АГА (адьювант: гидроксид алюминия) и обескровливания после 25–30 сут.

Способ заключается в том, что полученную кровь от зараженных мышей или кроликов с последующей 2–3-кратной отмывкой их с помощью центрифугирования, разрушения путем

Таблица 1

Характеристика препаратов трипаносом и результаты их исследования в ПЦР

Материал		Результаты ПЦР с праймерами	
Проба	Описание	T1 и Tr2 (температура отжига 48 °С)	T1 и Tr2 (температура отжига 50 °С)
13	<i>T. equiperdum</i> (штамм Альфорт), изначально получен из Германии. Перевивается на собаках. Кровь после центрифугирования (надосадочная жидкость), лиофильно высушенная	Присутствие ДНК. Присутствие белковых компонентов. Титр антигена в РДСК – 1:32–1:64	Отсутствие ДНК. Присутствие белковых компонентов. Титр антигена в РДСК – 1:32–1:64
14	<i>T. equiperdum</i> (штамм Альфорт), изначально получен из Германии. Перевивается на собаках. Кровь после центрифугирования (осадок), лиофильно высушенная	Присутствие ДНК. Присутствие белковых компонентов. Титр антигена в РДСК – 1:32	Отсутствие ДНК. Присутствие белковых компонентов. Титр антигена в РДСК – 1:32
55	<i>T. evansi</i> , изначально выделена от верблюдов, перевивается на мышах. Кровь после центрифугирования (осадок), лиофильно высушенная	Присутствие ДНК. Присутствие белковых компонентов. Титр антигена в РДСК – 1:16–1:32	Отсутствие ДНК. Присутствие белковых компонентов. Титр антигена в РДСК – 1:16–1:32

2–3-кратного замораживания и оттаивания, концентрировали и титровали в РДСК с положительными и отрицательными сыворотками.

После трёхкратного введения мышам и кроликам трипаносомный антиген использовали для серологической диагностики в РДСК случной болезни и суры (су-ауру). Надосадочную жидкость, которая образуется после первого центрифугирования лизированных эритроцитов, обрабатывали 20–25%-ным раствором полиэтиленгликоля, взятого в равном объеме, после чего полученную смесь оставляли при комнатной температуре на 12–15 мин., повторно центрифугировали при 6000 об/мин 15–20 мин, затем надосадочную жидкость удаляли, а полученный осадок использовали как трипаносомный антиген в серологических реакциях.

Плазму крови трёхкратно иммунизированных животных, которая образуется после первого центрифугирования и удаления осадка, обрабатывали 20–25% раствором полиэтиленгликоля, взятого в равном объеме.

Полученную смесь оставляли при комнатной температуре на 12–15 мин., повторно центрифугировали при 6000 об/мин 15–20 мин., затем надосадочную жидкость удаляли, а полученный осадок использовали как трипаносомный экзоантиген в серологических реакциях.

В дальнейшем, содержащие и не содержащие ДНК антигены *T. equiperdum* и *T. evansi* использовали для приготовления тест-системы РДСК, РНГА и ИФА (наборы компонентов) для диагностики трипаносомозов. Эти тест-системы использовали для мониторинга эпизоотической ситуации по случной болезни на территории РФ, для титрования изготовленных позитивных и негативных сывороток крови лошадей, кроликов, верблюдов, козлов и зебр.

Для изготовления позитивных трипаносомных сывороток необходимо было брать кровь от зараженных кроликов и мышей и от иммунизированных кроликов и мышей в тот момент, когда специфические антитела в РДСК находятся в титрах 1:20 и выше, в РНГА и ИФА – не ниже 1:400 (табл. 2). Для приготовления негативной

Таблица 2

Титры нативных сывороток (позитивных и негативных) крови зараженных кроликов и мышей после трёхкратного введения антигена в РДСК, РНГА и ИФА

№ серии	Вид животного	Рабочий титр в		
		РДСК	РНГА	ИФА
1	Зараженные мыши	1 : 40	1 : 800	1 : 800
2	Зараженные кролики	1 : 40	1 : 800	1 : 1600
3	Иммунизированные мыши	1 : 20	1 : 400	1 : 800
4	Иммунизированные кролики	1 : 40	1 : 800	1 : 800
5	Контрольные кролики	-	-	-
6	Контрольные мыши	-	-	-

сыворотки можно использовать только кровь от здоровых животных.

Позитивные серии сывороток были активными и не антикомплементарными. Негативные сыворотки были отрицательными и не антикомплементарными в РДСК, РНГА и ИФА.

При исследовании положительно реагирующих на случайную болезнь, сыворотки с *T. evansi* антигеном давали отрицательный результат (табл. 3) и, наоборот, давали положительный результат при исследовании их на антиген *T. equiperdum*.

Таблица 3

Определение специфичности *T. evansi* антигена в РДСК

Происхождение сывороток	Показатель при разведении сывороток		
	1 : 5	1 : 10	без антигена
Фабричная сыворотка (Омская) № 1 от лошади, зараженной <i>T. equiperdum</i>	Отр.	Отр.	Отр.
Положительная сыворотка от кроликов, зараженных <i>T. evansi</i>	Пол.	Пол.	Пол.
Положительная сыворотка от мышей, зараженных <i>T. evansi</i>	Пол.	Пол.	Отр.
Положительная сыворотка от кроликов, иммунизированных <i>T. equiperdum</i>	Отр.	Отр.	Отр.
Положительная сыворотка от мышей, зараженных <i>T. equiperdum</i>	Отр.	Отр.	Отр.
Здоровые кролики	Отр.	Отр.	Отр.
Здоровые мыши	Отр.	Отр.	Отр.

Таблица 4

Определение специфичности *T. equiperdum* антигена в РДСК

Происхождение сывороток	Показатель при разведении сывороток		
	1 : 5	1 : 10	без антигена
Фабричная сыворотка (Омская) № 1 от лошади, зараженной <i>T. equiperdum</i>	Пол.	Пол.	Отр.
Положительная сыворотка от кроликов, зараженных <i>T. evansi</i>	Отр.	Отр.	Отр.
Положительная сыворотка от мышей, зараженных <i>T. evansi</i>	Отр.	Отр.	Отр.
Положительная сыворотка от кроликов, иммунизированных <i>T. equiperdum</i>	Пол.	Пол.	Отр.
Положительная сыворотка от мышей, зараженных <i>T. equiperdum</i>	Пол.	Пол.	Отр.
Здоровые кролики	Отр.	Отр.	Отр.
Здоровые мыши	Отр.	Отр.	Отр.

В дальнейшем антигены, позитивные и негативные сыворотки крови лошадей с целью длительного хранения высушивали. После высушивания сыворотки разводили в 1 мл физиологического раствора и вновь титровали в сравнении с негативными с высушенными антигенами. Высушенные антигены, положительные и отрицательными сыворотки крови сохраняли свою активность и не были антикомплементарными.

Заключение

Впервые показано, что кроме соматических и экзоантигенов можно использовать и эритроцитарные с ДНК содержащими антигенами *T. equiperdum* и *T. evansi*, полученными после трёхкратного введения мышам и кроли-

кам АГ трипаносомного + 1,0 мл АГА и обескровливания после 25–30 сут.

Впервые был отработан способ получения положительных и отрицательных сывороток крови от зараженных *T. equiperdum* и *T. evansi* мышей и кроликов, и от иммунизированных мышей и кроликов. Опыты показали, что кровь для приготовления позитивной сыворотки можно брать, когда антитела в РДСК находятся в титрах 1:20, в РНГА и ИФА не ниже 1:400, негативной - когда сыворотка крови лошадей отрицательно реагирует в РДСК, РНГА и ИФА с антигенами *T. equiperdum* и *T. evansi*.

Приготовленные нами тест системы РДСК, РНГА и ИФА с содержащими и не содержащими ДНК антигенами *T. equiperdum* и *T. evansi*, привели к созданию универсальной

тест-системы (РНГА) для дифференциации этих видов трипаносом. Исследования имеют большое экономическое значение. С их помощью можно различать *T. equiperdum* от *T. evansi* и положительно реагирующих на суру животных лечить, продавать и использовать как здоровых лошадей.

Литература

1. Василевич Ф. И., Георгиу Х., Белименко В. В., Гулюкин М. И. Практическое руководство по борьбе с кровепаразитарными болезнями домашних животных. М.: ЗооВетКнига, 2015. 86 с.
2. Георгиу Х. ИФА для диагностики трипаномоза (дурина) лошадей // Ветеринарная патология. 2003. № 1. С. 99-101.
3. Георгиу Х. Получение высокоактивных и высокоспецифичных трипаносомных сывороток // Ветеринария и кормление. 2014. № 1. С. 26-28.
4. Георгиу Х., Белименко В. В., Самойловская Н. А. Паразитарные болезни животных из Списка МЭБ. Монография. М.: Инфра-М, 2016. 88 с.
5. Гулюкин М. И., Заблоцкий В. Т., Белименко В. В., Христиановский П. И., Саруханян А. Р. Кровепаразитарные болезни домашних животных. М.: ЗооВетКнига, 2013. 86 с.
6. Гулюкин М. И., Георгиу Х., Заблотский В. Т., Ломакина Н. Ф., Юров К. П., Туратъе Л. Генетические анализы для дифференциальной диагностики трипаносомозов лошадей: дурин и сурра // Ветеринария и кормление. 2015. № 2. С. 16-19.
7. Ломакина Н. Ф., Георгиу Х., Заблоцкий В. Т., Гулюкин М. И., Туратъе Л. Изучение генома возбудителей трипаносомозов лошадей (*T. equiperdum* и *T. evansi*) // Ветеринария. 2013. № 3. С. 29-33.
8. Ломакина Н. Ф., Георгиу Х., Гулюкин М. И. Трудности дифференциации трипаносом *T. evansi* и *T. equiperdum* // «Молекулярная диагностика»: Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. М., 2014. Т. II. С. 491-492.
9. Юров К. П., Алексеенкова С. В., Гулюкин М. И., Георгиу Х., Амирбеков М. А., Аноятбеков М. А., Махмадшоев А. Н., Шодмонов И. Ш., Давятова М. Д., Туратъе Л. Дифференциальная диагностика трипаносомозов у лошадей и филогенетический анализ возбудителя сурры (*T. evansi*) в Республике Таджикистан // Материалы докладов VI Международного ветеринарного конгресса. М., 2016. С. 320-322.
10. Claes F, Buscher P, Touratier L, Goddeeris B. M. *Trypanosoma equiperdum*: master of disguise or historical mistake? Trends Parasitol. 2005; 21 (7): 316-321.
11. Claes F, Radwanska M., Urakawa T. et al. Variable surface glycoprotein RoTat 1.2 PCR as a specific diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma evansi* infections. Kinetoplastid Biol. Dis. 2004; 3; 3.
12. Clausen P. H., Chuluun S., Sodnomdarjaa R. et al. A field study to estimate the prevalence of *Trypanosoma equiperdum* in Mongolian horses. Vet. Parasitol. 2003; 115. 9-18.
13. Lai D. H., Hashimi H., Lun Z. R. et al. Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008; 105 (6): 1999-2004.
14. Li Fj, Gasser R. B., Lai D. H., Claes F. et al. HCR approach for the detection of *Trypanosoma brucei* and *Tr. equiperdum* and their differentiation from *T. evansi* based on maxicircle kinetoplast DNA. Mol. Cell. Propes. 2007; 21 (1): 1-7.
15. Young R., Taylor J. E., Kurioka A., Becker M. et al. Isolation and analysis of the genetic diversity of repertoires of VSG expression site containing telomeres from *Trypanosoma brucei gambiense*, *T. brucei* and *T. equiperdum*. BMC Genomics. 2008; 9. 385.
16. Zablotskij V. T., Georgiu C., De Waal T. et al. The current challenges of dourine: difficulties in differentiating *Trypanosoma equiperdum* within the subgenus Trypanozoon. Rev. Sci. Tech. 2003; 22 (3): 1087-1096.
17. OIE Terrestrial Manual 2012. Chapter 2.1.17. P.213. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.17_TRYPANO_SURRA.pdf.
18. OIE Terrestrial Manual. 2008. Chapter 2.5.3. P. 845 - 851. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.03_DOURINE.pdf.

References

1. Vasilevich F. I., Georgiou Ch., Belimenko V. V., Gulyukin M. I. Practical guidelines to control hemoprotozoan diseases of domestic animals. М.: ZooVetKniга, 2015; 86. (In Russ.)
2. Georgiou Ch. The ELISA for the diagnosis of equine trypanosomosis (dourine). *Veterinarnaya patologiya = Veterinary pathology*. 2003; 1: 99-101. (In Russ.)
3. Georgiou Ch. Obtaining highly active and highly specific sera from *Trypanosoma*-infected animals.

- Veterinariya i kormleniye = Veterinary Medicine and feeding*. 2014; 1: 26-28. (In Russ.)
4. Georgiou Ch., Belimenko V. V., Samoilovskaya N. A. Parasitic diseases of animals from the OIE List. Monograph. M.: Infra-M, 2016; 88. (In Russ.)
 5. Gulyukin M. I., Zablotsky V. T., Belimenko V. V., Khristianovsky P. I., Sarukhanyan A. R. Hemoprotozoan diseases of domestic animals. M.: ZooVetKniga, 2013; 86. (In Russ.)
 6. Gulyukin M. I., Georgiou Ch., Zablotsky V. T., Lomakina N. F., Yurov K. P., Touratier L. Genetic analyzes for differential diagnosis of equine trypanosomiasis: dourine and surra. *Veterinariya i kormleniye = Veterinary Medicine and feeding*. 2015; 2: 16-19. (In Russ.)
 7. Lomakina N. F., Georgiou Ch., Zablotsky V. T., Gulyukin M. I., Touratier L. Studying the genome of the causative agents of equine trypanosomiasis (*T. equiperdum* and *T. evansi*). *Veterinariya = Veterinary Medicine*. 2013; 3: 29-33. (In Russ.)
 8. Lomakina N. F., Georgiou Ch., Gulyukin M. I. Difficulties in differentiating trypanosomes *T. evansi* and *T. equiperdum*. «*Molekulyarnaya diagnostika*»: *Sbornik trudov VIII Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem "Molecular diagnostics": Proceedings of the VIII All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation*. M., 2014; II. 491-492. (In Russ.)
 9. Yurov K. P., Alekseenkova S. V., Gulyukin M. I., Georgiou Ch., Amirbekov M. A., Anoyatbekov M. A., Makhmadshoev A. N., Shodmonov I. Sh., Davyatova M. D., Touratier L. Differential diagnosis of trypanosomiasis in horses and phylogenetic analysis of the causative agent of surra (*T. evansi*) in the Republic of Tajikistan. *Materialy dokladov VI Mezhdunarodnogo veterinarnogo kongressa = Proceedings of the VI International Veterinary Congress*. M., 2016; 320-322. (In Russ.)
 10. Claes F., Buscher P., Touratier L., Goddeeris B. M. *Trypanosoma equiperdum*: master of disguise or historical mistake? *Trends Parasitol.* 2005; 21 (7): 316-321.
 11. Claes F., Radwanska M., Urakawa T. et al. Variable surface glycoprotein RoTat 1.2 PCR as a specific diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma evansi* infections. *Kinetoplastid Biol. Dis.* 2004; 3: 3.
 12. Clausen P. H., Chuluun S., Sodnomdarjaa R. et al. A field study to estimate the prevalence of *Trypanosoma equiperdum* in Mongolian horses. *Vet. Parasitol.* 2003; 115: 9-18.
 13. Lai D. H., Hashimi H., Lun Z. R. et al. Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105 (6): 1999-2004.
 14. Li Fj, Gasser R. B., Lai D. H., Claes F. et al. HCR approach for the detection of *Trypanosoma brucei* and *Tr. equiperdum* and their differentiation from *T. evansi* based on maxicircle kinetoplast DNA. *Mol. Cell. Probes.* 2007; 21 (1): 1-7.
 15. Young R., Taylor J. E., Kurioka A., Becker M. et al. Isolation and analysis of the genetic diversity of repertoires of VSG expression site containing telomeres from *Trypanosoma brucei gambiense*, *T. brucei* and *T. equiperdum*. *BMC Genomics.* 2008; 9: 385.
 16. Zablotskij V. T., Georgiu C., De Waal T. et al. The current challenges of dourine: difficulties in differentiating *Trypanosoma equiperdum* within the subgenus *Trypanozoon*. *Rev. Sci. Tech.* 2003; 22 (3): 1087-1096.
 17. OIE Terrestrial Manual 2012. Chapter 2.1.17. P.213. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.17_TRYPANO_SURRA.pdf.
 18. OIE Terrestrial Manual. 2008. Chapter 2.5.3. P. 845-851. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.03_DOURLINE.pdf