

РОЗРОБКА МЕТОДУ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ПРИ ХЛАМІДІОЗІ ТВАРИН

І. С. Данілова, к.вет.н., зав. лабораторії з питань біобезпеки, управління якістю та метрології, ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків
В. І. Рисований, к.вет.н., доцент, Сумський національний аграрний університет

У даній роботі проаналізовані та наведені дані щодо розробки набору як одного з експрес-методу лабораторної діагностики, а саме реакції непрямой гемаглютинації. Представлені результати власних досліджень по вивченню компонентів набору щодо їх активності та специфічності. Встановлено, що під час вивчення специфічності й активності компонентів «Набору еритроцитарного антигену та сироваток для діагностики хламідіозу сільськогосподарських тварин та хутрових звірів», розробленого в ННЦ «ІЕКВМ» з польовими сироватками від різних видів тварин $M \pm m$ складало $3,2 \pm 0,47$; $3,27 \pm 0,42$ та $3,13 \pm 0,40$ при трьох послідовних дослідженнях відповідно.

Ключові слова: лабораторна діагностика, сільськогосподарські тварини, хламідіоз.

Постановка проблеми у загальному вирішенні. Хламідіоз – хронічне захворювання, яке викликає аборти, мертвонародження або народження нежиттєздатного приплоду і протікає у вигляді бронхопневмоній, уретритів, поліартритів, енцефалітів, тощо. Хвороба завдає господарствам великі економічні збитки за рахунок бракування плідників, отримання неякісних продуктів забою, відставання у рості і розвитку молодняку. В стаціонарно неблагополучних господарствах хламідіоз частіше за все протікає хронічно та активізується на тлі неблагополучних впливів зовнішнього середовища на організм тварин, що тягне за собою клінічне виявлення даної інфекції [1, 3, 4].

Діагностика хламідіозів повинна базуватись на результатах лабораторних досліджень із урахуванням епізоотичної ситуації, клінічних ознак та результатів патологоанатомічних даних розтину трупів [3].

Проблема вивчення хламідіозу охоплює коло питань, які починаються з виділення й ідентифікації штамів, виявлення джерел інфекції та закінчується організацією заходів боротьби й оздоровлення господарств від інфекційних хвороб [2, 3].

На деяких етапах лабораторних досліджень значна роль належить серологічним методам до яких належить реакція непрямой гемаглютинації (РНГА).

Результати лабораторної діагностики на хламідіоз залежать від наступних факторів:

- правильного зберігання і доставки матеріалу до лабораторії;
- правильної попередньої підготовки відібраного матеріалу і своєчасності проведення дослідження;
- вибору методу лабораторного дослідження;
- матеріально-технічного забезпечення лабораторного дослідження;
- рівня кваліфікації персоналу, який проводить дослідження;
- правильного методу відбору зразків матеріалу для дослідження із осередків

хламідійного ураження.

Зв'язок з важливим науковим і практичним значенням. Дослідження проводились за тематикою «Розробити систему епізоотичного моніторингу та удосконалити методи діагностики і профілактики бактеріальних хвороб дрібних жуйних», номер державної реєстрації 0111U000815.

Метою нашої роботи було розробити набір для діагностики хламідіозу сільськогосподарських тварин та хутрових звірів, визначити його активність і специфічність.

Матеріали і методи досліджень. РНГА ставили на плексигласовій панелі, для цього використовували 1,5 %-ве робоче розведення еритроцитарного антигену на гліцеринізованому фізіологічному розчині з рН-7,2. Готовили послідовні розведення гіперімунної сироватки крові в об'ємі 0,2 см³. Потім у всі розведення сироватки крові додавали по 0,2 см³ еритроцитарного антигену. Панель струшували та залишали за температури 20 °С. Результати враховували через 30–40 хв. Титр еритроцитарного антигену в РНГА з гіперімунною сироваткою повинен бути не нижче 1:32 (активність антигену в титрі 5 log₂). Позитивна реакція характеризувалась появою осаду еритроцитів у вигляді «парасольки» на дні лунки з рівними або зубчатими краями.

Для контролю еритроцитарного антигену на відсутність спонтанної аглютинації використовували гліцеринізований 0,5 %-й фізіологічний розчин з рН 7,2. З цієї метою в п'ять лунок плексигласової панелі вносили по 0,2 см³ гліцеринізованого 0,5 %-го фізіологічного розчину рН 7,2, потім додавали по 0,2 см³ 1,5 %-го еритроцитарного антигену. Залишали за температури 20 °С на 30–40 хв. Реакція повинна бути негативною, тобто еритроцити сідають на дно лунки у вигляді чіткої крапки.

Результати власних досліджень. Для лабораторної діагностики хламідійних інфекцій застосовуються п'ять груп методів:

1. серологічні (виявлення специфічних хламідійних антитіл у сироватці крові тварин) у

РЗК, РТЗК, РНЗК, РГА, РНГА або ІФА;

2. імунологічні (виявлення антигену збудника хламідіозу у патологічному матеріалі) у ІФА та РІФ;

3. морфологічні – виявлення хламідій у патологічному матеріалі методом світлової, люмінесцентної або електронної мікроскопії;

4. молекулярно-генетичні (виявлення ДНК збудника хламідіозу у клінічному або патологічному матеріалах) методом ПЛР, ЛЛР рестрикційного аналізу, ДНК-гібридизації;

5. культуральні (ізоляція хламідій на курячих ембріонах, культурах клітин, лабораторних тваринах) із наступною ідентифікацією методами світлової мікроскопії, в ІФА, РІФ чи ПЛР.

Ураховуючи, що хламідії не гемаглютинують еритроцити, була поставлена задача розробити еритроцитарний хламідійний антиген для реакції непрямой гемаглютинації.

З літературних даних, еритроцитарним антигенам, які використовуються в РНГА, притаманна висока специфічність, так як механізм реакції базується на взаємодії тільки гомологічного антитіла з антигеном, який адсорбований на еритроцитах. Відмічено якість РНГА, яка визначає її очевидну перевагу перед реакцією дифузної преципітації та реакцією зв'язування комплекменту (РЗК).

В основу виготовлення антигену була покладена методика Boyden S. V. (1951), який запропонував РНГА для кількісного визначення антитіл до білкових антигенів різного походження. Ця методика була нами видозмінена, удосконалена та захищена деклараційним патентом України на корисну модель № 18386 «Спосіб одержання еритроцитарного діагностикуму для реакції непрямой гемаглютинації (РНГА) при хламідіозі тварин».

Під час розробки засобів і методу діагностики хламідіозу були виконані дослідження по відпрацюванню технології виготовлення еритроцитарного антигену та порядок його використання в реакції непрямой гемаглютинації (РНГА).

Технологія виготовлення антигену включає

такі етапи:

1. отримання хламідієвміщуючого матеріалу та його контроль на відсутність бактеріальної і грибової контамінації;

2. виготовлення консервованих еритроцитів барана;

3. режим сенсibiliзації еритроцитів хламідіями штамом РМ-11 для отримання стабілізованого антигену;

4. контроль антигену на активність і стерильність.

Оптимальною для отримання хламідієвміщуючої рідини було зараження перещеплюваної культури клітин ЛЕК хламідіями з використанням ДЕАЕ-декстраном, через 72 год. заражену культуру клітин заморожували, а перед роботою розморожували. Для виготовлення антигену застосовували 10 % завись формалінізованих еритроцитів барана.

Для сенсibiliзації формалінізованих еритроцитів барана використовували інактивованій хламідієвміщуючий матеріал. У результаті проведених досліджень, в якості «посередника» при сенсibiliзації еритроцитів хламідією, був визначений танін в розведенні 1:20 000 при експозиції контакту 30 хв. при температурі 37° С.

При визначенні оптимальних умов сенсibiliзації формалінізованих і танізованих еритроцитів встановлено, що адсорбція хламідій залежить, у значному ступені, від температурного режиму й експозиції контакту еритроцитів з хламідією. Оптимальними умовами сенсibiliзації формалінізованих і танізованих еритроцитів барана в наших дослідках виявилися наступні: експозиція 30 хв. за температури 37° С, рН буферного розчину 6,4.

Під час вивчення специфічності й активності компонентів «Набору еритроцитарного антигену та сироваток для діагностики хламідіозу сільськогосподарських тварин та хутрових звірів», розробленого в ННЦ «ІЕКВМ» з польовими сироватками від різних видів тварин були отримані наступні результати, які подані в таблиці 1.

Таблиця 1

Результати дослідження в РНГА дослідних і контрольних сироваток крові на хламідіоз (n=21)

№ п/п	Сироватки крові	Титр антитіл в РНГА на хламідіоз, $\log_2$		
		1-е дослідження	2-е дослідження	3-е дослідження
1	Корови з інв. № 1173	3	3	3
2	Корови з інв. № 0716	2	1	2
3	Корови з інв. № 0607	0	0	0
4	Корови з інв. № 0708	2	1	1
5	Корови з інв. № 8561	0	0	0
6	Корови з інв. № 1264	6	6	5
7	Вівцематки з інв. № 12609	3	3	2
8	Вівцематки з інв. № 03885	3	4	4
9	Вівцематки з інв. № 18315	4	3	3
10	Барана з інв. № 9160	4	4	4
11	Барана з інв. № 0480	3	3	4
12	Свиноматки з інв. № 331	1	2	2
13	Свиноматки з інв. № 285	3	4	3
14	Свиноматки з інв. № 5316	1	2	1
15	Кнура з інв. № 82	2	3	3
16	Кнура з інв. № 17	4	3	3
17	Норки № 1	негативно	негативно	негативно
18	Норки № 2	негативно	негативно	негативно
19	Норки № 3	негативно	негативно	негативно
20	Специфічна хламідійна з набору	7	7	7
21	Негативна з набору	0	0	0
M±m		3,2±0,47	3,27±0,42	3,13±0,40
σ		1,66	1,62	1,55
CV		51,75	49,72	49,54

Аналізуючи дані таблиці 1 слід відмітити, що при трьохразовому дослідженні сироваток крові від великої рогатої худоби, овець, свиней і норок у РНГА на хламідіоз «Набором еритроцитарного антигену та сироваток для діагностики хламідіозу сільськогосподарських тварин та хутрових звірів», розробленим в ННЦ «ІЕКВМ» титри антитіл співпадали.

В перспективі дослідження з даного напрямку дозволять проводити експрес-діагностику хламідіозу та враховувати результати реакції вже через 40 хвилин після її постановки.

Висновок. Розроблений «Набір еритроцитарного антигену та сироваток для діагностики хламідіозу сільськогосподарських тварин та хутрових звірів» є активним, специфічним та може бути застосований для експрес-діагностики за допомогою РНГА з метою контролю благополуччя господарств щодо хламідіозу тварин.

Список використаної літератури:

1. Brinkman F. S. [et al.] Evidence that plant-like genes in Chlamydia species reflect an ancestral relationship between Chlamydiaceae, cyanobacteria and the chloroplast [Text]. *Genome Res.* 2002. Vol. 12, № 8. P. 1159-1167.
2. Bavoil P. M., Hsia R.-C., Ojcius D. M. Closing in on Chlamydia and its bag of tricks [Text]. *Microbiol.* 2000. Vol. 146. P. 2723-2731.
3. Вержиховський О. М. [та ін.]. Настанова із лабораторної діагностики хламідійних інфекцій сільськогосподарських тварин [Текст]. Київ, 2006. 44 с.
4. Караваев Ю. Д. [и др.] Диагностика, профилактика и меры борьбы с хламидиозами животных [Текст]. *Ветеринария с.-х. животных.* 2005. № 5. С. 19-21.

References:

1. Brinkman F. S. [et al.] (2002), "Evidence that plant-like genes in Chlamydia species reflect an ancestral relationship between Chlamydiaceae, Cyanobacteria and the chloroplast" [Text], *Genome Res.*, Vol. 12, No. 8, pp. 1159-1167.
2. Bavoil P. M., Hsia R. C. and Ojcius D. M. (2000), "Closing in on Chlamydia and its bag of tricks" [Text], *Microbiol.*, Vol. 146, pp. 2723-2731.
3. Vergikhovsky O. M. [and others.] (2006), An instruction from the laboratory diagnosis of chlamydial infections of farm animals [Nastanova iz laboratornoyi diagnostiki hlamidynih infektsiy sllskogospodarskih tvarin], Kyiv, 44 p. (in Ukraine)
4. Karavaev Yu. D. [and others] (2005), "Diagnostics, prophylaxis and measures of struggle against chlamydiosis of animals" [Text], *Veterinarian with x animals*, No. 5, pp. 19-21. (in Russian)

Данилова И. С., Рисованый В. И. Разработка метода лабораторной диагностики при хламидиозе животных.

Хламидиоз – хроническое заболевание, которое вызывает аборт, мертворождения или рождение нежизнеспособного приплода и протекает в виде бронхопневмоний, уретритов, полиартритов, энцефалитов, другое.

Диагностика хламидиозов должна базироваться на результатах лабораторных исследований с учетом эпизоотической ситуации, клинических признаков и результатов патологоанатомического вскрытия.

Проблема изучения хламидиоза охватывает круг вопросов, которые начинаются с выделения и идентификации штаммов, выявления источников инфекции и заканчивается организацией мероприятий по борьбе и оздоровления хозяйств от инфекционных болезней.

Результаты лабораторной диагностики на хламидиоз зависят от некоторых факторов: правильного хранения и доставки материала до лаборатории; правильной предварительной подготовки отобранного материала и своевременного проведения исследования; выбора метода лабораторного исследования; материально-технического обеспечения лабораторного исследования; уровня квалификации персонала, который проводит исследования; правильного метода отбора образцов материала для исследования с очагов хламидийного поражения.

В данной работе проанализированы и приведены данные по разработке набора как одного из экспресс-метода лабораторной диагностики, такого как реакции непрямой гемагглютинации. Представлены результаты собственных исследований по изучению компонентов набора на их активность и специфичность. Установлено, что во время изучения специфичности и активности компонентов «Набора эритроцитарного антигена и сывороток для диагностики хламидиоза сельскохозяйственных животных и пушных зверей», разработанного в ННЦ «ИЭКВМ» с полевыми сыворотками от разных видов животных $M \pm m$ составляло $3,2 \pm 0,47$; $3,27 \pm 0,42$ и $3,13 \pm 0,40$ при трех последовательных исследованиях соответственно.

Ключевые слова: лабораторная диагностика, сельскохозяйственные животные, хламидиоз.

Danilova I. S., Risovaniy V. I. Development of a method for laboratory diagnosis in the case of chlamydia.

Chlamydiosis – a chronic disease which causes abortions, a birth of dead fruits or a birth of an impractical issue and proceeds in the form of bronchopneumonia, urethritis, polyarthritis, encephalitis, another.

Diagnosis of Chlamydioses shall be based on results of laboratory researches taking into account an epizootic situation, clinical signs and results of autopsy.

The problem of study Chlamydiosis envelops a circle of questions which detections of sources of an infection begin with separation and identification of strains, and comes to an end with organization of events on fight and improvements of farms from infectious diseases. At some stages of laboratory studies, a significant role belongs to serological methods, which include the response of indirect hemagglutination.

Taking into account that Chlamydia does not hemagglutinate red blood cells, the task was to develop an erythrocytic Chlamydia antigen for indirect hemagglutination reaction.

Results of laboratory diagnostics on Chlamydiosis depend on some factors: the correct storage and delivery of material to laboratory; the correct preliminary preparation of the selected material and timely carrying out research; choice of a method of laboratory research; material support of laboratory research; skill level of staff which conducts researches; the correct method of sampling of material for research from the centers of Chlamydia defeat.

Are analyzed and provided in this operation this on development of a set as one of an express method of laboratory diagnostics, such as responses of an indirect hemagglutination. Results of own researches on study of components of a set on their activity and specificity are provided. It is set that during study of specificity and activity of components "Erythrocytic antigen and serums kit for Chlamydiosis diagnostics in farm and fur producing animals", developed in NSC 'IECVM' with field serums from different types of animals $M \pm m$ made $3,2 \pm 0,47$; $3,27 \pm 0,42$ and $3,13 \pm 0,40$ in case of three sequential researches respectively.

Keywords: laboratory diagnostics, farm animals, Chlamydiosis.