

пешт: Изд-во АН Венгрии, 1975. – 334 с.

2. Дорожкова И.Р. Возбудитель туберкулеза: история открытия и изучения / И.Р. Дорожкова // Туберкулез и болезни легких: науч.-практ. журн. – 2012. – № 3. – С. 3-15.

3. Кочемасовой З.Н. L-формы микобактерий туберкулеза / Под ред. З.Н. Кочемасовой. – М.: Медицина, 1980. – 176 с.

4. Ткаченко О.А. Біологічний цикл розвитку *Mycobacterium bovis* / Ткаченко О.А. // Ветеринарна медицина України. – 2014. – № 10. – С. 15-20.

Ткаченко А. А., Алексеева Н. В., Захарский В. В. Зернистые некислотоустойчивые формы в биологическом цикле диссоциации *M. bovis*.

*В статье представлены результаты экспериментальных исследований участия зернистых некислотоустойчивых форм в биологическом цикле развития диссоциированных *M. bovis*. Установлено изменение биологических свойств диссоциированных *M. bovis* 117 и 118 вариантов в динамике многочисленных пассажей на ячной питательной среде, повышение частоты образования зернистых некислотоустойчивых форм и их адаптация к среде. Доказано что именно с зернистых некислотоустойчивых форм генерируются палочкообразные варианты микобактерий.*

Ключевые слова: диссоциированные *M. bovis*, биологический цикл развития, зернистые некислотоустойчивые формы, ультрамелкие фильтрующиеся формы, элементарные тельца.

Tkachenko A. A., Alekseeva N. V., Zazharskiy V. V. Granular not acid-resistant forms in biological cycles dissociative of *M. bovis*.

*The article presents the results of experimental studies on the participation granular not acid-resistant forms the biological cycle of dissociative *M. bovis*. The changes of biological properties dissociative *M. bovis* 117 and 118 options for the numerous passages through egg breeding ground, increase the frequency of formation not acid-resistant granular forms and their adaptation to the environment. It is proved that from granular forms generated not acid-resistant rod-generated versions of mycobacterium.*

Keywords: dissociative *M. bovis*, biological development cycle, granular not acid-resistant form, ultra small forms, elementary bodies.

Рецензент: д.вет.н., професор Кассіч В. Ю.

Дата надходження до редакції: 24.11.2015 р.

УДК 639.09:579.882(477)

ІДЕНТИФІКАЦІЯ НОВОГО ВИДУ ХЛАМІДІЙ В УКРАЇНІ?

Ю. Р. Романишина, аспірант, Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ)

В. Г. Скрипник, д.вет.н.

А. В. Скрипник, к.вет.н.

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (м. Київ)

*Описано перший випадок ідентифікації *Chlamydia gallinasea* у домашньої птиці на території України. За допомогою полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі та методу ДНК-чипів було виділено ДНК збудника із клоакальних зіскрібків 7 індиків. Встановлено той факт, що геном *C. gallinasea*, ідентифікованої від української птиці має певні відмінності у порівнянні з геномами штамів, що були виділені в інших країнах.*

Ключові слова: хламідіоз, *Chlamydia gallinasea*, індики, ПЛР у реальному часі, ДНК-чипи.

Постановка проблеми у загальному вигляді. Перший описаний випадок пташиного хламідіозу датується другою половиною 19-го століття (Ritter, 1879), коли 7 людей у Швейцарії захворіли пневмонією, або, як назвав захворювання сам Ritter, пневмотифом, після контакту із папугами роду *Amazona*, що були завезені з Аргентини. Між тим, сам збудник захворювання, *Chlamydia* (*C.*) *psittaci*, був визнаний причиною пситакозу (від лат. «psittacus» – «папуга») лише у 1930 році, після поширення пандемії пташиного хламідіозу у США та країнах Європи. Протягом

1929-1930 років захворіло близько 850 людей та близько 20 % з них загинуло внаслідок хвороби [1]. Пізніше було доведено, що птахи, які не належать до родини папугових, також можуть бути резервуаром інфекції й джерелом зараження людини, тому захворювання часто називають орнітозом (з грецьк. «ornis» - «птаха») [2]. Не зважаючи на значний інтерес до вивчення захворювання, *C. psittaci* вважали вірусом аж до 1960 року [3, 4, 5], коли у вчених з'явилась можливість використовувати у своїх дослідженнях методи електронної мікроскопії [6].

Аналіз основних досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання проблеми. Наступний стрибок у вивченні проблеми пситакозу пов'язаний з широким застосуванням у 90-их роках минулого століття молекулярно-генетичних методів дослідження. Так, стало зрозумілим, що *C. psittaci* є гетерогенним видом, спорідненість серед ізолятів *C. psittaci*, виділених від різних видів тварин варіювались від 93% до 30% [7, 8]. У зв'язку з цим на даний момент виділяють 15 генотипів *C. psittaci* [9].

Хоча прийнято вважати, що причиною орнітозу є *C. psittaci*, дослідження останніх років свідчать, що серед птахів циркулюють й інші види хламідій – *C. abortus*, *C. pecorum* та *C. trachomatis*, а також зафіксовано нетиповані штами збудника [10, 11]. Окрім цього, завдяки молекулярно-генетичним методам вдалось ідентифікувати нові види збудників хламідіозу, що превалюють серед птахів.

Так, у 2009-2010 роках від здичавілих африканських священних ібісів (*Threskiornis aethiopicus*), що втекли із зоологічного парку Бретані (захід Франції) було виділено внутрішнь-оклітинного паразита, що за результатами молекулярно-генетичних досліджень належав до родини *Chlamydiaceae*. При порівнянні ділянок його геному із генами інших представників родини, виявилось, що виділений мікроорганізм близький до *C. psittaci*. Проте, оскільки він має ряд унікальних генів, багато з яких згруповані у кластерах навколо хромосом, запропоновано виділити його у окремий вид *Chlamydia ibidis* [12].

Ще у 1996-1997 році, в Італії, від голубів було виділено кілька атипичних штамів хламідій, які не вдалось віднести до жодного відомого раніше виду через значні відмінності у генотипі. У 2010 році в Німеччині із селезінки папуги роду *Polytelis*, що загинув із ознаками катарального ентериту, вдалось виділити генетично схожий мікроорганізм, а у наступні два роки із зішкрібку з клоаки та селезінки двох молодих голубів, що мали ознаки ураження респіраторного тракту та діарею, знову виділили два схожі штами [13]. Таким чином, після багаторічних досліджень геномів цих штамів, на міжнародній конференції «2nd European Meeting on Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications (EMAC-2)», що проходила у 2013 році в м. Єна, Німеччина, було повідомлено про відкриття нового виду хламідій *Chlamydia (C.) avium*. На даний момент вважається, що сприйнятливими тваринами для *C. avium* є папуги та голуби. У тому ж році даний вид збудника було ідентифіковано у клінічних зразках, відібраних від синантропних голубів на території України [14].

На цій же конференції було запропоновано виокремити ще один вид хламідій – *Chlamydia (C.) gallinacea*, дослідження якого почалося ще у 2008 році, коли його вдалось виділити від курчат,

що не мали видимих клінічних ознак захворювання. Свою видову назву «*gallinacea*» мікроорганізм отримав через те, що був ідентифікований лише у представників ряду куроподібних (*Galliformes*). Вважається, що *C. gallinacea* може уражати курей, цесарок, індиків та, можливо, іншу домашню птицю [15, 16]. На сьогоднішній день інформації щодо патогенності даного виду хламідій занадто мало, щоб можна було робити якісь висновки щодо здатності мікроорганізму викликати захворювання серед тварин. Існує припущення, що *C. gallinacea* являється коменсалом в організмі домашньої птиці, але ситуація щодо інших птахів може відрізнятись [15]. Окрім того Lagoucau et al., був описаний випадок захворювання з ознаками атипичної пневмонії серед 3 працівників забійного цеху, які доглядали за птицею, що виявилася позитивною на *C. gallinacea* [17]. Проте, наведений приклад не дає можливість робити висновки щодо патогенності *C. gallinacea* для людей, оскільки не можна виключати можливість попереднього інфікування працівників *C. psittaci*.

Мета роботи. Провести індикацію та ідентифікацію хламідій у зразках, відібраних від індиків.

Матеріали і методи досліджень. З метою дослідження на хламідіоз у 2012 році було відібрано зразки біоматеріалу (зішкрібки з клоаки) від 9 індиків (*Meleagris gallinacea*), що знаходились у спільному вольєрі та демонстрували ознаки відставання у рості. Зразки відбирались у пробірки типу «Eppendorf» із 500 мкл ізотонічного розчину NaCl за допомогою стерильних аплікаторів із ватною намоткою. До моменту дослідження матеріал зберігався за температури - 80° С.

Індикацію та ідентифікацію мікроорганізму проводили у Референс-лабораторії МЕБ з хламідіозу, Федеральний дослідний інститут ім. Фрідріха Лефлера (FLI, Єна, Німеччина).

Для виділення ДНК використовували комерційний набір High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics.

Відібраний матеріал досліджували на наявність мікроорганізмів родини *Chlamydiaceae* у полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) у реальному часі використовуючи TaqMan Universal MasterMix (Applied Biosystems, Weiterstadt) та праймери і зонд, специфічні ділянки гену 23S рибосомальної РНК.

З метою проведення видової диференціації хламідій, ДНК яких вдалось виявити, усі позитивні зразки дослідили в ПЛР у реальному часі із видоспецифічними праймерами на наявність ДНК *C. psittaci* (праймери та зонд підібрані до ділянки *ompA* гену) [18], *C. avium* (*epoA* гену) [19] та *C. gallinacea* (16S гену) [20]. У якості позитивних контролів використовували ДНК штамів DC15 (*C. psittaci*), DC96 (*C. avium*) та DC63 (*C. gallinacea*), які було задепоновано у попередні

роки в Федеральному дослідному інституті ім. Фрідріха Лефлера (Німеччина).

Окрім того, усі позитивні зразки досліджували за допомогою ДНК-чипів (Alere Technologies, Jena, Germany). Для напрацювання ділянок ДНК проводили ПЛР із біотинізованими праймерами, підібраними до 23S рибосомальної РНК [21, 22]. Результат фіксували та обробляли використовуючи Array Mate Reader (Alere Technologies) і програму IconoClust (Clondiag).

Результати власних досліджень. За ре-

зультатами дослідження в ПЛР у реальному часі проб біоматеріалу від індиків, виявилось, що 7 із 9 птахів являються носіями бактерії родини Chlamydiaceae. Подальша видова диференціація не дала жодних результатів. У зв'язку з тим, що вибір праймерів для дослідження видової приналежності «пташиних» хламідій обмежений їх досить незначною кількістю, для подальших досліджень використовували ДНК-чипи. Усі Chlamydiaceae – позитивні птахи виявились носіями *C. gallinacea* (рис. 1).

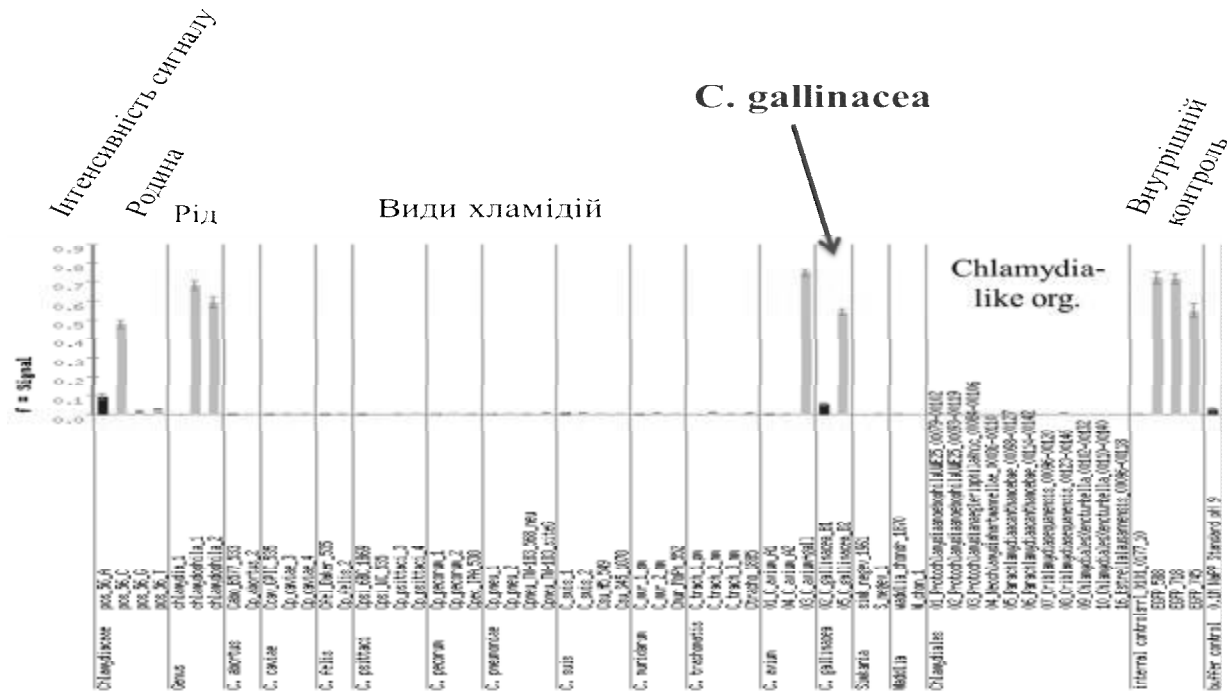


Рис. 1. Результати видової диференціації хламідій, виявлених у індиків за допомогою ДНК-чипів.

Не зважаючи на те, що для видової диференціації використовувались методи, які застосовуються у Референс-лабораторії МЕБ з хламідіозу птахів, не всі вони дали однакові результати. Найкращим для поставленої мети виявився метод ДНК-чипів, тоді як ПЛР у реальному часі не дала змоги провести видову диференціацію. Зважаючи на те, що останній метод добре зарекомендував себе при дослідженні зразків ДНК інших штамів *C. gallinacea*, які задепоновані в Інституті ім. Фрідріха Лефлера, можна припустити, що виявлена нами бактерія родини Chlamydiaceae належить до виду *C. gallinacea*. Проте

вона мала певні відмінності у геномі, а підібраними праймерами виявились неспецифічними до обраної ділянки 16S гену. У будь-якому випадку, питання генетичного різноманіття в межах даного виду потребує детальнішого вивчення.

Таки чином, аналізуючи літературні дані та результати наших досліджень, можна зробити висновок, що розглядати *C. psittaci* як єдину можливу причину пташиного хламідіозу більше не можна (табл. 1), оскільки птахи можуть являтися носіями й інших видів хламідій, у тому числі і тих, які раніше на території України не були ідентифіковані.

Таблиця 1

Види хламідій, що були ідентифіковані лише у птахів

| Вид хламідій | Відомі сприйнятливі тварини | Клінічні ознаки | Чи було зафіксовано на території України |
|-------------------------------|------------------------------|---|--|
| <i>C. avium</i> sp. nov. | Голубові, папугові | Респіраторні захворювання; ентерити | Так |
| <i>C. gallinacea</i> sp. nov. | Курячі | Патогенність не досліджена; можливо - симптоми відсутні або відставання у рості | Так |
| <i>C. ibidis</i> sp. nov. | Ідентифіковано лише у ібісів | Не встановлено | Ні |

Оскільки аналіз умов утримання, стан кормової бази, вивчення циркуляції інших інфекційних агентів серед досліджених нами тварин не

проводились, ми не можемо пов'язувати значне відставання у рості птахів із хламідієносійством, а отже і робити висновки щодо патогенності *C. gal-*

linasea для індиків та свійської птиці.

Висновки. 1. Уперше на території України зафіксовано виділення ДНК та ідентифікацію бактерії родини Chlamydiaceae – *C. gallinacea*.

2. Встановлено, що виявлений мікроорганізм має ряд відмінностей у геномі в порівнянні із геномами інших відомих штамів *C. gallinacea*. Такі відмінності можуть перешкоджати виявленню мікроорганізму, а отже діагностиці хламідіозу в цілому.

3. Підтверджено гіпотезу, що *C. gallinacea* може не викликати клінічних ознак хламідіозу птахів.

Перспективи подальших досліджень полягають у більш глибокому вивченні молекулярно-генетичних особливостей мікроорганізму *C. gallinacea*, виявленню наслідків, що спричинені такими генетичними відмінностями представників виду, у тому числі і встановленні його патогенності та значення для здоров'я тварин.

Список використаної літератури:

1. Elkeles G. Die Psittakose unter besonderer Berücksichtigung der Pandemie. Ergebnisse der Hygiene, Bakteriologie, Immunitätsforschung und exp. / G. Elkeles, E. Barros // Therapie. – 1931. – Vol. 12. – P. 529-639.
2. Pinkerton H. Comparative Study of Meningopneumonitis Virus, Psittacosis of Pigeon Origin, And Psittacosis of Parrot Origin / H. Pinkerton, V. Moragues // The Journal of Experimental Medicine. – 1942. – Vol. 75 (6). – P. 575-580.
3. Eaton M.D. A. Virus from cases of atypical pneumonia: relation to the viruses of meningopneumonitis and psittacosis / M.D. Eaton, M.D. Beck, H.E. Pearson // The Journal of Experimental Medicine. – 1941. – Vol. 73 (5). – P. 641-654.
4. Lazarus A.S. The Virus of Psittacosis: III. Serological Investigations / A.S. Lazarus, K.F. Meyer // Journal of Bacteriology. – 1939. – Vol. 38 (2). – P. 171-198.
5. Woolridge R.L. Trachoma virus isolation studies on Taiwan / R.L. Woolridge, S.P. Wang, J.T. Grayston // Bulletin of the World Health Organization. – 1962. – Vol. 26 (6). – P. 783-787.
6. Weisburg W.G. Eubacterial origin of chlamydiae / W.G. Weisburg, T.P. Hatch, C.R. Woese // Journal of Bacteriology. – 1986. – Vol. 167 (2). – P. 570-574.
7. Kaltenboeck B. Detection and strain differentiation of Chlamydia psittaci mediated by a two-step polymerase chain reaction / B. Kaltenboeck, K.G. Kousoulas, J. Storz // Journal of Clinical Microbiology. – 1991. – Vol. 29 (9). – P. 1969-1975.
8. Kaltenboeck B. Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein (ompA) genes of the four chlamydial species / B. Kaltenboeck, K.G. Kousoulas, J. Storz // Journal of Bacteriology. – 1993. – Vol. 175 (2). – P. 487-502.
9. OIE Terrestrial manual. Chapter 2.3.1. Avian Chlamydiosis. – Paris: OIE, 2012. – P. 1-13.
10. More than classical Chlamydia psittaci in urban pigeons / K. Sachse, S. Kuehlewind, A. Ruetzger, E. Schubert, G. Rohde // Veterinary Microbiology. – 2012. – Vol. 157 (3-4). – P. 476-480.
11. Видова ідентифікація збудників хламідіозу синантропної та домашньої птиці за допомогою гніздової ПЛР та ПЛР у реальному часі / Скрипник А.В., Ксьонз І.М., Скрипник В.Г., Дерябін О.М., Захсе К. // Ветеринарна медицина; Міжвід. тематич. наук. зб. – 2011. – № 95. – С. 132-134.
12. Isolation of a New Chlamydia species from the Feral Sacred Ibis (Threskiornis aethiopicus): Chlamydia ibidis / F. Vorimore, R. Hsia, H. Huot-Creasy, S. Bastian, L. Deruyter, A. Passet, K. Laroucau // Systematic and Applied Microbiology. – 2014. – Vol. 37 (2). – P. 79-88.
13. Evidence for the existence of two new members of the family Chlamydiaceae and proposal of Chlamydia avium sp. nov. and Chlamydia gallinacea sp. nov. / K. Sachse, K. Laroucau, K. Riege, S. Wehner, M. Dilcher, H. Creasy, M. Weidmann, G. Myers, F. Vorimore, N. Vicari, S. Magnino, E. Liebler-Tenorio, A. Ruetzger, P. Bavoil, F. Hufert, R. Rosselló-Móra, M. Marz // Systematic and Applied Microbiology. – 2014. – Vol. 37. – P. 79-88.
14. Романишина Ю.П. Виявлення Chlamydia avium у синантропних голубів України / Ю.П. Романишина, В.Г. Скрипник, А.В. Скрипник // Ветеринарна медицина; Міжвід. тематич. наук. зб. – 2014. – № 99. – С. 65-68.
15. Sachse K. Two more species of Chlamydia - does it make a difference? / K. Sachse, K. Laroucau // Pathogens and Disease. – 2015. – Vol. 73 (1). – P. 1-3.
16. Chlamydien im Rinderbestand – ein Wolf im Schafspelz? / P. Reinhold, B. Kaltenboeck, C. Ostermann, K. Sachse // Tierärztliche Umschau. – 2013. – Vol. 68. – P. 515-527.
17. Isolation of a new chlamydial agent from infected domestic poultry coincided with cases of atypical pneumonia among slaughterhouse workers in France / K. Laroucau, F. Vorimore, R. Aaziz, et al. // Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases. – 2009. – Vol. 9. – P. 1240-1247.
18. New real-time PCR tests for species-specific detection of Chlamydia psittaci and Chlamydia abortus from tissue samples / A. Pantchev, R. Sting, R. Bauerfeind, J. Tyczka, K. Sachse // The Veterinary Journal. – 2009. – Vol. 181 (2) – P. 145-150.

19. A Real-Time PCR Assay for the Detection of Atypical Strains of Chlamydiaceae from Pigeons / A. Zocevic, F. Vorimore, N. Vicari, J. Gasparini, L. Jacquin, K. Sachse, S. Magnino, K. Laroucau // PLOS One. – 2013. – Vol. 8 (3). – P. 1-5.

20. Molecular characterization of atypical Chlamydia and evidence of their dissemination in different European and Asian chicken flocks by specific real-time PCR / A. Zocevic, F. Vorimore, C. Marhold, D. Horvatek, D. Wang, B. Slavec, Z. Prentza, G. Stavianis, E. Prukner-Radovic, A. Dovc, V. Siarkou, K. Laroucau. // Environmental Microbiology. – 2012. – Vol. 14 (8). – P. 2212-2222.

21. Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies / R. Ehrlich, P. Slickers, S. Goellner, H. Hotzel, K. Sachse // Molecular and Cellular Probes. – 2006. Vol. 20(1). – P. 60-63.

22. DNA microarray-based detection and identification of Chlamydia and Chlamydophila spp. / K. Sachse, H. Hotzel, P. Slickers, T. Ellinger, R. Ehrlich // Molecular and Cellular Probes. – 2005. – Vol. 19. – P. 41-50.

Романишина Ю. Р., Скрипник В. Г., Скрипник А. В. Идентификация нового вида хламидий на Украине?

Описан первый случай идентификации *Chlamydia gallinacea* у домашней птицы на территории Украины. С помощью ПЦР в реальном времени и метода ДНК-чипов была выделена ДНК возбудителя с клоакальных соскобов 7 индюков. Установлен тот факт, что геном *C. gallinacea*, идентифицированный от птицы в Украине имеет некоторые отличия от штаммов, которые были выделены в других странах.

Ключевые слова: хламидиоз, *Chlamydia gallinacea*, индюки, ПЦР в реальном времени, ДНК-чипы.

Romanyshyna Yu, Skrypnyk V., Skrypnyk A. Identification of a novel Chlamydia species in Ukraine?

The first case of identification of *Chlamydia gallinacea* in poultry in Ukraine was described. The pathogen was detected from 7 cloacal scrapings of turkeys by using Real-time polymerase chain reaction and DNA microarray technology. It was established the fact that the genome of *C. gallinacea* identified in Ukrainian poultry has certain differences compared with the genomes of strains that were isolated in other countries.

Keywords: chlamydiosis, *Chlamydia gallinacea*, turkeys, Real-time PCR, DNA microarrays.

Рецензент: д.вет.н., професор Стегній Б.Т.
Дата надходження до редакції: 02.12.2015 р.

УДК 636.09:616–092.4:579.86

ВИЯВЛЕННЯ КОАГУЛАЗНОЇ АКТИВНОСТІ В ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE

Н. Г. Пінчук, к.вет.н., Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

К. Ю. Колеснікова, к.вет.н., Херсонське державне підприємство – біологічна фабрика

Встановлено, що 33 культури збудника бешихи свиней (94,3 %) з 35 досліджуваних, володіли коагулазною активністю. Результати досліджень свідчать про відсутність залежності між активністю коагулази, серотиповою належністю і ступенем вірулентності ізолятів, виділених з різних регіонів України, та штамів мікроорганізмів, які були отримані із Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів.

Ключові слова: збудник бешихи свиней, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, коагулазна активність, ізоляти, плазма крові, штами.

Постановка проблеми у загальному вигляді. Бешиха свиней (*Erysipelas suum*) – одне з найбільш поширених і небезпечних захворювань, переважно свиней у віці від 3 до 12 місяців, яке характеризується при гострому і підгострому перебігах септицемією, запальною еритемою шкіряного покриву, гастроентеритом і гіперплазією селезінки, а при хронічному – дерматитом, бородавчастим або виразковим ендокардитом і серозно-фібринозними артритамі.

Окрім свиней, хворіють велика та дрібна рогата худоба, коні, північні олені, багато диких ссавців, домашні та дикі птахи. Серед домашніх та диких тварин, птахів і, особливо, гризунів широко розповсюджено мікробносієство. Збудника бешихи часто виявляють в організмі морських та річкових риб, дельфінів, комах і членистоногих. Хворіє бешихою і людина.

Джерелом інфекції можуть бути і клінічно здорові свині. На основі цього, носійство бактерій