

Таблиця 3 – Узагальнені результати випробування отриманого препарату проти AnaplgKp для виявлення АнГІ в РНІФ при дослідженні модельних, клінічних та зразків іншого біологічного матеріалу

Вивчені показники	Рівень узагальнених показників дослідження модельних, клінічних та зразків іншого біологічного матеріалу для виявлення АнГІ в РНІФ при використанні отриманого препарату проти AnaplgKp, ($m \pm d$)
Межа чутливості	у модельній системі: АнГІ + ФСБ (рН=7,0) ($2,6 \pm 1,0$) $\times 10^4$ корпускул антигену/мл; у модельній системі: АнГІ + кров людини ($8,5 \pm 3,3$) $\times 10^5$ корпускул антигену/мл
Специфічність	(93 \pm 5) %
Відтворюваність	(93 \pm 5) %

Висновки. Таким чином, за результатами проведених досліджень розроблено спосіб діагностики анаплазмозу шляхом виявлення антигену збудника в РНІФ, для відтворення якої запропоновано використовувати в якості Ант1 поліклональні протианаплазмозні імуноглобуліни кролячі, отримані при імунізації тварин повним корпускулярним антигеном штаму *A. marginale* ВИЗВ1.

Список літератури

1. Васильева, И. С. Новые болезни, передаваемые иксодовыми клещами (Ixodidae). Эрлихиозы и анаплазмозы человека [Электронный ресурс] / И. С. Васильева // <http://lib.2005.rat-info.ru/files/>. 2. Ильинских, Е. Н. Изучение субпопуляционной и функциональной гетерогенности мононуклеарных клеток периферической крови у больных иксодовым клещевым боррелиозом и гранулоцитарным эрлихиозом человека [Текст] / Е. Н. Ильинских, Н. Н. Ильинских // Медицина в Кузбассе; Матер. Межрегион. науч.-практич. конфер. с междунар. участием. – Кемерово: – ИД «Медицина и просвещение» – 2008. – № 5 (спецвып.). – 190 с. – С. 77-78. – ISSN 1819-0901. 3. Dumler, J. S. Anaplasma and Ehrlichia infection [Text] / J. S. Dumler // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2005. – Vol. 1063. – P. 361-373. 4. Comer, J. A. Serologic testing for human granulocytic ehrlichiosis at a National Referral Center [Text] / J. A. Comer, W. L. Nicholson, J. G. Olson, J. E. Childs // J. Clin. Microbiol. – 1999. – Vol. 37, № 3. – P. 558-564. 5. Walls, J. E. Inter- and intralaboratory comparison of Ehrlichia equi and human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agents strains for serodiagnosis of HGE by the immunofluorescent-antibody test [Text] / J. E. Walls, M. Aguero-Rosenfeld, J. S. Bakken [et al] // J. Clin. Microbiol. – 1999. – Vol. 37, № 9. – P. 2968-2973.

LABORATORY-CLINICAL TEST OF THE EXPERIMENTAL RIF-TEST-SYSTEM FOR DETECTION OF ANAPLASMOSIS ANTIGEN

Kilipko L.V.

Kharkiv Regional Sanitary Epidemiological Station MPH of Ukraine

Timchenko O.M.

SE „Institute of Microbiology and Immunology named after I.I. Mechnikov, AMS of Ukraine”, Kharkiv

Experimental sample of domestic RIF-test-system is developed for serum diagnostics of anaplasmosis infections by detection in samples of a clinical material (blood, punctate lymph nodes, spleen, marrow, sectional material and other) of antigens of agent (cells and microcolonies bacteria of genera Anaplasma).

УДК 636.09:579.62:579.88:001.891:577.213:636.8:636.7(477-25)

РОЗРОБКА ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ *TOXOPLASMA GONDII* МЕТОДОМ ПЛР І МОНІТОРИНГ РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ЗБУДНИКА ТОКСОПЛАЗМОЗУ СЕРЕД ДОМАШНІХ КІШОК І СОБАК У М. КИЄВІ

Кудрявченко О.П.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м.Київ, Україна

Важливими завданнями ветеринарної науки і практики є вирішення проблем діагностики й профілактики хвороб тварин, захист їх від зараження особливо небезпечними збудниками захворювань різної етіології. Паразитарні хвороби тварин останнім часом мають тенденцію до поширення, тому розроблення нових методів діагностики та вдосконалення лікувально – профілактичних заходів – одне з найактуальніших завдань паразитологів на сучасному етапі.

Одна з актуальних паразитарних проблем в Україні – токсоплазмоз, який зумовлює необхідність проведення робіт з удосконалення існуючих та розроблення нових, більш досконалих методів його діагностики та профілактики [1, 10]. В останні роки прогрес в діагностиці пов'язують із розвитком молекулярно-генетичних технологій на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [6, 7]. Перевагами цього методу є швидкість (для отримання відповіді достатньо декількох годин), висока чутливість, специфічність та універсальність [4].

Дослідження в цьому напрямку, на наш погляд, стануть основою для розробки та впровадження у ветеринарну практику нових ефективних методів діагностики і контролю паразитарних хвороб.

Токсоплазмоз – паразитарне захворювання, що характеризується переважно латентним або хронічним протіканням, ураженням нервової системи, органів ретикулоендотеліальної системи, м'язів, міокарду і очей.

Збудник токсоплазмозу – *Toxoplasma gondii* належить до типу найпростіших *Protozoa*. Значну роль у розповсюдженні збудника відіграють коти, собаки і хутрові звірі. Але найбільш інтенсивно в навколишнє середовище токсоплазми виділяють коти, в організмі яких проходить статевий цикл розвитку збудника, який виділяється з фекаліями у вигляді ооцист, які мають високу стійкість до зовнішнього впливу. Також збудник може виділятися з навколоплідною рідиною, плацентою та піхвовими виділеннями, абортіваними і мертворождуваними плодами [8].

Розвиток нових методів лабораторної діагностики (зокрема, ПЛР) дозволяє оцінити поширеність інфекції *T. gondii* серед домашніх вихованців (кішок і собак), що представляють потенційну небезпеку для зараження людини [4].

У людей зараження відбувається аліментарно при попаданні в кишечник цист та споживанні сирого м'ясного фаршу або недостатньо термічно обробленого м'яса, особливо свиней, кролів, овець. Інший шлях зараження здійснюється при попаданні

в кишечник ооцист, у виділених котах екскрементах (при забрудненні рук ґрунтом, піском), при контакті з котах. Після гострої інфекції *T. gondii* продовжує існувати в організмі у формі тканинних цист, частіше всього в м'язах і мозку. У людини *T. gondii* представляють безпрецедентну небезпеку для вагітних жінок, оскільки в 40% випадків це означає вертикальну передачу збудника плоду з подальшими важкими ураженнями в більшості випадків. У тварин при імунodefіцитному стані організму (вірусних інфекціях, стресах, пов'язаних з в'язкою, і т. п.) відбувається розрив цист, що приводить до реактивації захворювання, включаючого енцефаліт або диссемінований токсоплазмоз. ІgG-антитіла до *T. gondii* з'являються через невеликий проміжок часу після інфікування, досягаючи найвищих значень протягом 6 місяців і виявляються потім впродовж всього життя [10].

У тварин клінічні ознаки токсоплазмозу різноманітні і малоспецифічні.

У кішок через 6-9 днів після зараження (інкубаційний період) спостерігаються пригноблення, підвищення температури тіла, зниження апетиту, понос, блювота, нервові явища, кон'юнктивіт і риніт. Хронічний перебіг хвороби характеризується менш вираженими клінічними ознаками, які зникають через 2-3 тижні. Надалі інвазія протікає безсимптомно.

У собак токсоплазмоз перебігає гостро, підгостро і хронічно. Інкубаційний період при гострому перебігу становить 2-3 дні. Спостерігаються підвищення температури тіла, кон'юнктивіти, частіше пульс і дихання, з'являються кашель, гнійно-слизисті виділення з носових порожнин. Хворі тварини пригноблені, відмовляються від корму і води. Виникає понос, блювота, фекалії нерідко з домішками крові. На шкірі голови і лап нерідко розвиваються дерматити і екзема. Зустрічаються аборти, випадки народжень потворних плодів. Іноді клінічні ознаки токсоплазмоза можуть нагадувати симптоми нервової форми чуми. При підгострому перебігу захворювання інкубаційний період продовжується від 5 до 10 днів. При цьому буває прогресуюче схуднення тварин, явища гастроентериту, нервові розлади і відсутність апетиту. Хронічний перебіг токсоплазмоза характеризується короткочасною лихоманкою. Симптоми хвороби ті ж, що і при під гострому перебігу, але менш виражені. Нерідко хвороба у собак протікає безсимптомно [1, 8].

Мета роботи. Метою даної роботи було створення тест-системи на основі полімеразної ланцюгової реакції для виявлення збудника токсоплазмозу *Toxoplasma gondii* в екскрементах, кон'юнктиві дифінітивних господарів з родини котячих, а також патологічному матеріалі (лімфатичних вузлах, паренхіматозних органах, головному мозку) та в плаценті у абортіваних тварин та проведення моніторингу носійства збудника токсоплазмозу *Toxoplasma gondii* у домашніх тварин (кішок і собак) в м. Києві і вивчення особливостей клінічного простору захворювання.

Матеріал і методи. В основі методу ПЛР лежить виділення в досліджуваній пробі ДНК збудника і подальша ампліфікація специфічної ділянки ДНК *T. gondii* за рахунок багатократного повторення циклів денатурації ДНК, відпалу специфічних олигонуклеотидів (праймерів) і синтезу комплементарних ланцюгів ДНК за допомогою ферменту *Taq*-полімерази [2].

Пошук нуклеотидних послідовностей проводили за базами даних GenBank, EMBL (Європейська молекулярно-біологічна бібліотека), DDBJ (Японська база даних нуклеотидних послідовностей) і Entrez (Національний центр біотехнологічної інформації, США).

Вибір ділянки *Toxoplasma gondii* для подальшого синтезу олигонуклеотидних праймерів базується на аналізі її варіабельності і пошуку консервативних послідовностей, найбільш вдалим для розробки праймерів виявились нуклеотидні послідовності гену поверхневого антигену P30 *Toxoplasma gondii*. Вибрана для ампліфікації ділянка геному повинна бути достатньо консервативною і не мати гомології з іншими збудниками хвороб. Для з'ясування цього нами було проведено вирівнювання нуклеотидних послідовностей за допомогою комп'ютерної програми "Vector NTI" і порівняння їх гомологічності для подальшого аналізу на варіабельність і пошуку консервативних ділянок, необхідних для підбору праймерів. Перевірка за допомогою програми BLAST-on line не виявила критичної гомології з нуклеотидними послідовностями інших груп бактерій, вірусів або еукаріот. Синтез праймерів на наше замовлення виконали НВФ "Літех" (м. Москва, Росія).

ПЛР проводили на чотириканальному ампліфікаторі «Терцик» виробництва НВФ "ДНК-Технологія" (м. Москва, Росія), по Saiki R.. Реакційна суміш об'ємом 25 мкл вміщувала: 67 ммоль трис-НСІ (рН 8,8), 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 2,0 ммоль MgCl₂, 0,01 % твін-20, по 100 мкмоль dATP, dGTP, dTTP, dCTP, 50 ммоль кожного зі специфічних праймерів, 2 од. *Taq*-полімерази, 5 мкл зразків виділеної ДНК. Для попередження випаровування у кожній зразок поверх реакційної суміші нашарували по 30 мкл мінеральної олії.

Для моніторингу носійства збудника токсоплазмозу відбирались фекалії, змиви з кон'юнктиви і кров домашніх котів і собак м. Києва.

Зразки були досліджені з використанням тест-системи «Тохо-test» для виявлення збудника токсоплазмозу *Toxoplasma gondii* методом полімеразно ланцюгової реакції (ПЛР) розробки Державного науково – контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ТУ У 24.4 – 19024865 – 004 : 2005) та тест – системи «Токс» виробництва фірми «АмпліСенс» (Москва, Центральний науково-дослідний інститут епідеміології МОЗ РФ).

Результати і обговорення. Розроблені праймери Тох 1 (forward) та Тох 2 (reverse) створювались у відповідності до всіх вимог, теоретично мають високу специфічність для зв'язування із ділянками матричної ДНК, не мають критичної гомології з іншими бактеріями, вірусами.

Для комісійного випробування тест-системи на специфічність та чутливість було використано ДНК збудника токсоплазмоза *Toxoplasma gondii*, взятую з контрольного зразка набору для діагностики *Toxoplasma gondii* методом РЗГА, та польовий штам, який був позитивний за результатами перевірки іншими тест-системами.

Чутливість тест-системи визначали на різних розведеннях ДНК контрольного зразка *Toxoplasma gondii*: 10⁹ г ДНК; 10⁸ г ДНК; 10¹⁰ г ДНК; 10¹¹ г ДНК; 10¹² г ДНК

Чутливість даної тест-систем для детекції *Toxoplasma gondii* становить 10¹¹ г ДНК.

Для перевірки таксономічної специфічності тест-системи були використані штами бактерій, що не відносяться до роду *Toxoplasma* але гено- та фенотипово до них споріднені: *Yersinia enterocolitica*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus alvei*, *B. cereus*, *Klebsiella*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocitogenes*. У жодному з цих випадків ампліфікація не зареєстрована. Ці результати свідчать на користь високої специфічності методу.

Досліджені зразки, отримані від 228 домашніх кішок і 42 собак м. Києва, господарі яких звернулися у ветеринарні клініки міста як з метою профілактичної діагностики, так і з різними патологіями. Дані скринінгу токсоплазманосійства наведені в таблиці.

Позитивну реакцію на наявність ДНК *T. gondii* виявили у 52 кішок (22,8 %) і 6 собак (14,3 %).

Визначили, що поширеність збудника токсоплазмозу *T. gondii* в дослідженій групі тварин становить 22,8% і 14,3% серед кішок і собак відповідно. При цьому частота інфікованості не залежить від статі тварини – зараженими опинилися в рівних кількостях коти і кішки (по 26 тварин, 24,5% і 21,3% від загальної кількості котів і кішок відповідно), а також кобелі і суки (по 3 тварини, 15,8% і 13,0% від загальної кількості кобелів і сук відповідно).

Дослідження проводили паралельно на двох тест – системах: «Тохо-Test» розробки Державного науково – контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів і «Токс» виробництва фірми «АмпліСенс» (Москва, Центральний науково-дослідний інститут епідеміології МОЗ РФ). Обидві тест-системи під час даного дослідження показали однакові результати.

Серед тварин, у яких був виявлений збудник токсоплазмозу *T. gondii*, клінічна картина виявлялася в середньому лише у 40 %. У кішок (в основному самців віком до 1 року) спостерігалось здуття кишечника, поноси, блювота, зміна формули крові (еозінофілія, лейкоцитоз, лімфоцитоз). У дорослих особин найчастіше за все клінічна картина була відсутня (токсоплазмоз в латентній формі, носійство). Серед собак спостерігалось два випадки простатиту, при цьому один пес двічі був нездатним до в'язки. У трьох собак спостерігали хронічний лімфоденіт, запалення підщелепових і шийних лімфовузлів із стійкою субфебрильною температурою. В решті випадків симптоми були відсутні, або спостерігалися легкі форми кон'юнктивіту.

Таблиця – 1

	Позитивний результат (наявність ДНК <i>T. gondii</i> в досліджених біоптатах)		Негативний результат (відсутність ДНК <i>T. gondii</i> в досліджених біоптатах)	
	Кількість	%	Кількість	%
Коти	26	24,5	80	75,5
Кішки	26	21,3	96	78,7
Всього	52	22,8	176	77,2
Кобелі	3	15,8	16	84,2
Суки	3	13,0	20	87,0
Всього	6	14,3	36	85,7

В чотирьох випадках господарі заражених собак мали високі титри IgG на *T. gondii* і звернулися у ветеринарну клініку з метою обстежити тварин. В цих випадках клінічної картини захворювання в собак не виявлялося, тобто мало місце носійство інфекції.

Висновки.

1. У результаті виконаної роботи розроблено тест-систему, відпрацьовано умови проведення ПЛР і методику пробопідготовки, що дозволяє в короткий час визначити збудника токсоплазмоза *Toxoplasma gondii*.
2. Проведені дослідження дозволили встановити високий ступінь зараження кішок та собак у м. Києві збудником токсоплазмозу.
3. Частіше серед інвазованих тварин відсутні клінічні прояви захворювання, що робили їх ще більш небезпечними.

Список літератури

1. Проблема токсоплазмоза / Под ред. Д.Н. Засухина: АМН СССР. – М.: Медицина, 1980. – 312 с.
2. Saiki, R., Gillensten, U., Erlich, H. Genome analyses / Ed. K.E. Davies. – New York, 1990. – P. 176-190.
3. Griffin, A.M., Griffin, H.G. PCR Technology. Current Innovations. – Boca Raton, 1994, P. 327-339.
4. Гинсбург, А.Л., Романова, Ю.М. ПЦР в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний // Клиническая лабораторная диагностика. – 1998. – № 2. – С. 35-39.
5. Jauregui, L. H., Higgins, J., Zarlenga, D., Dubey, J. P., and Lunney, J. K. Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Toxoplasma gondii* in Pig and Mouse Tissues – J. Clin Microbiol. 2001 June; 39(6): 2065–2071.
6. Desmont, G, Remington, J S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. J Clin Microbiol 1980;11:562-568.
7. Homan, W L, Vercammen, M, De Braekeleer, J, Verschuere, H. Identification of a 200–300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Int J Parasitol 2000;30:69-75.
8. Галузо, И.Г. Токсоплазмоз животных. Алма-Ата. 1965, 191с.
9. Галузо, И.Г., Коновалова С.И. Диагностика токсоплазмоза животных. – Алма-Ата, 1971. – С.144.
10. Тодоренко, А. Звідки він приходить токсоплазмоз. Будьмо здорові. Київ. 2003. №6, 44с.

DEVELOPMENT OF A TEST SYSTEM FOR PCR DETECTION OF TOXOPLASMA GONDII AND MONITORING THE SPREAD OF TOXOPLASMOSIS PARASITE IN DOMESTIC CATS AND DOGS IN KIEV

Kudryavchenko A.P.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kiev, Ukraine

A test system for PCR detection of *Toxoplasma gondii* and monitored the distribution of carriers of the causative agent of toxoplasmosis *T. gondii* by polymerase chain reaction (PCR) in domestic animals (cats and dogs) in Kiev.

УДК 619:576.895.1:631.311.86

ВИПРОБУВАННЯ ДЕЗІНФЕКТАНТІВ ДЛЯ ЗНЕЗАРАЖЕННЯ ІНВАЗІЙНИХ ЕЛЕМЕНТІВ ГЕЛЬМІНТІВ У ДОВКІЛЛІ

Луценко Л.І., Веселий В.А., Сумакова Н.В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

У свійських тварин реєструється велика кількість різних гельмінтозів. Багато з них, близько 67 видів гельмінтів, являються зоонозами і представляють значну небезпеку для людей. Найбільш небезпечними в епідеміологічному плані є трихінельоз, цистицеркози, аскаридатози, ехінококоз, анкілостоматидози та інші, які передаються від тварин людям [1].

Забруднення навколишнього середовища має важливий вплив на існування і виживання паразитів. Найбільш небезпечними в епідеміологічному плані являються аскариди собак і кішок (*Toxosara*), анкілостоматиди. Гельмінти, що паразитують в імагінальній стадії у м'ясоїдних, можуть продукувати більше 200 тисяч яєць за добу, звідси кількість виділених яєць у навколишнє середовище сягає мільйонів. Так, за даними ВООЗ, з 1 г фекалій у навколишнє середовище виділяється 10-15 тисяч яєць. Тому контамінація навколишнього середовища яйцями токсикар створює значний резервуар інвазії для ураження людини [2, 3].

У системі ветеринарно-санітарних заходів, спрямованих на профілактику або ліквідацію гельмінтозних захворювань, дезінвазія займає одне з важливих місць. Основне її призначення – знезараження приміщень і навколишнього середовища від яєць