

Розділ 8. Патологія тварин, клінічна біохімія, якість і безпека тваринницької продукції

2. У птахогосподарствах при утриманні птиці на підлозі, ураженість її нематодами складала від 10 % до 63 %, еймеріями – 6,6-40 %, ектопаразитами – 6,6-17,7 %.

3. Ураженість курей індивідуальних господарств при вільному її утриманні становила 12-100 % нематодами, 3-15,2 % еймеріями і від 19,2 % до 100 % ектопаразитами.

4. Кури в досліджуваних господарствах були інвазовані наступними видами гельмінтів: *Ascaridia galli*, *Heteracis gallinarum*, *Capillaria obsignata*, *Trichostrongylus tenuis*, *Strongyloides avium*.

Список літератури

1. Богач, М.В. Інвазійні хвороби свійської птиці [Текст]: навч. посібник / М.В. Богач, А.В. Березовський, І.Л. Тараненко. – Київ: Ветінформ, 2007. – 224 с.
2. Пономаренко, В.Я., Протозойні хвороби тварин. Монографія, Харків, «Гриф», 2010.
3. Моніторинг гельмінтозів та еймеріозів свійської птиці в господарствах степової зони України та лікувально-профілактичні заходи [Текст] / Л.С. Королєнко, І.І. Коваленко, Т.В. Маршалкіна, Г.В. Заїкіна // Ветеринарна медицина України. – 2010. – № 7. – С. 14-16.
4. Єщенко, Л.В. Епізоотологія паразитарних захворювань с/г птиці регіону Дніпропетровщини [Текст] / Л.В. Єщенко, Т.В. Маршалкіна // Вет. медицина: міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2003. – Вип. 81. – С. 130-133.
5. Гельминтологические исследования животных и окружающей среды [Текст]: справочник / Г. А. Котельников. – М.: Колос, 1983. – 208 с.
6. Скрябин, К.И. Метод полных гельминтологических вскрытий позвоночных, включая человека. Изд. 1-го Моск. Гос. Университета [Текст]. М., 1928.
7. Черткова, А.Н., Петров А.М. Гельминты домашних куриных птиц и вызываемые ими заболевания [Текст]. Т.1. – М., 1959. – 363 с.

MONITORING OF CHICKEN PARASITIC DISEASES IN FARMS OF FOREST-STEPPE ZONE OF UKRAINE

Vesely V.A., Lutsenko L.I., Poleschuk N.G.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

Results of investigations at definition of extensiveness of parasitic diseases in chickens at different technologies of maintenance in farms of forest-steppe zone of Ukraine are presented in the article.

УДК 579.882+57.082.542

УДОСКОНАЛЕННЯ ПІДХОДІВ ДО ВИДІЛЕННЯ ЗБУДНИКІВ ХЛАМІДІОЗІВ

Волков Т. О., Джорасєва С. К., Солоніна Н. Л., Кучма І. Ю., Пилюгін С. В.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечнікова АМН України», м. Харків

Волянська Н. П., Мойсєєнко Т. М., Танасов С. В., Мартіросян І. О.

ДУ «Інститут дерматології та венерології АМН України», м. Харків

Хламідійна інфекція за поширеністю та спектром патології посідає провідне місце серед захворювань, що передаються статевим шляхом, та являє собою серйозну проблему охорони здоров'я, яка є спільною для всіх розвинених країн світу. Так, щорічно у світі реєструється біля 89 млн. нових випадків захворювання. Розповсюдженість хламідійної інфекції в Україні складає 87,4 на 100 тис. населення, що свідчить про серйозність та масштабність захворюваності. Ця інфекція може мати хронічний та латентний перебіг з різними клінічними проявами з боку сечостатевого тракту, може спричиняти розвиток висхідних та екстрагенітальних ускладнень, що нерідко призводить до порушень репродуктивної функції та безпліддя. Встановлена роль хламідій у патогенезі захворювань дихальної системи з виникненням бронхітів, ларингітів, синуситів, пневмоній. Показаний зв'язок між наявністю антитіл до *S. pneumoniae* та розвитком тяжких ушкоджень з боку серцево-судинної системи, у тому числі таких важких, як інфаркт міокарду та запальних захворювань опорно-рухового апарату [1,2]. На фоні високої частоти виявлення хламідій, непатогномонічності хламідійної інфекції, схильності до персистентного існування в організмі, особливу значущість набувають діагностичні методи, спрямовані на встановлення етіологічного фактору захворювання, тісно пов'язані з виділенням патогенного агенту та подальшим вивченням його біологічних властивостей. Важко переоцінити значення виділення чистих культур цього мікроорганізму. Фундаментальні зміни, які відбулися у таксономії хламідій, у значній мірі обумовлені ізоляцією та глибоким вивченням біологічних особливостей нових агентів, виділених від різних хазяїв, на основі яких розроблені нові принципи видової ідентифікації [3].

Дослідження, які спрямовані на одержання нових штамів хламідій, відіграють важливу роль у роботі науково-дослідних лабораторій. Методологічні основи вивчення біології хламідій базуються на здібності цих мікроорганізмів до облігатного внутрішньоклітинного паразитування. Відомо два основних методи виділення чистих культур хламідій – ізоляція збудника на перещеплюваних лініях клітин та у жовткових мішках курячих ембріонів, що розвиваються. Для первинного виділення лабораторних штамів споріднених хламідійних мікроорганізмів використовують різноманітні лінії перещеплюваних клітинних культур, а для серійного культивування ізолятів доцільно застосовувати модель «*in ovo*» з використанням 6-7-добових курячих ембріонів, що розвиваються [4, 5].

Метою дослідження стало визначення можливостей застосування різних методичних підходів щодо оптимізації виділення збудника з сечостатевого тракту та екстрагенітальних вогнищ.

Матеріали та методи дослідження. Клінічним матеріалом для дослідження слугували: зскрібки з різних ділянок сечостатевого та дихального тракту, синовіальна рідина, змиви та аспірат бронхів, кардіоваскулярні та судинні зразки, навколплідні води, плацента. Внаслідок вираженої токсичної дії синовіальної рідини, аспірату бронхів, навколплідних вод на клітинні моделі, їх розводили поживним середовищем у 10-50 разів. Дослідження проводились на перещеплюваних клітинних лініях L929, Her-2, McCoу та 6-7-добових курячих ембріонах, що розвиваються з використанням методів світової та люмінесцентної мікроскопії.

Результати та їх обговорення. Стан клітинної культури, яка застосовується для первинного виділення збудника хламідіозів, має вирішальне значення. Оскільки для хламідій характерна наявність тропізму до клітинних ліній, в яких вони паразитують, то вибір клітинної лінії визначається його цитопатичною дією та тропізмом збудника. Збудники виду *S. trachomatis* проявляють тропізм до епітеліальних клітин сечостатевого, опорно-рухового трактів, тому виділення цього виду збудника доцільно проводити на фібробластоподібних клітинах ліній McCoу та L 929. Збудники виду *S. pneumoniae* розмножуються в альвеолярних макрофагах, моноцитах, епітелії дихальних шляхів та в ендотеліальних клітинах судин, тому вилучення цього збудника краще проводити на епітеліоїдній клітинній лінії Her-2 [6, 7]. Повноцінна популяція клітин може бути отримана тільки від покоління, яке

складається з життєздатних клітин, які не мають ознак дегенерації. У нормальній культурі клітини вирізняються чіткими межами та володіють морфологічними ознаками, типовими для даної тканини. Наявність великої кількості велетенських округлених клітинних елементів, порушення морфологічних характеристик, поява клітин з вакуолями робить дану генерацію непридатною для використання з метою первинного виділення збудника хламідіозу.

Важливе значення для успішного виділення мікроорганізму має використання належного транспортного середовища. В своїх дослідженнях для транспортування інфекційного матеріалу, ми використовували середовище 199 з 5-10 % вмістом ЕТС та 5 % 40ММ розчину глюкози та антибіотики у концентрації: гентаміцин – 30 мкг/мл, ванкоміцин – 150 мкг/мл та амфотеріцин В – 2,5 мкг/мл, замість традиційного поживного середовища на основі сахарозо-фосфатного буфера [4].

Однією із задач, поставлених у нашому дослідженні, було отримання клітинного моношару з найменшою кількістю пошкоджених клітин. Для виконання цієї задачі ми у своїх дослідженнях замість класичного методу обробки клітин сумішшю розчинів версену та трипсину [5], використовували розчин альбуциду (30 мг/мл).

У результаті були отримані дані, які доводять, що застосування розчину альбуциду є доцільним. Це підтверджено збільшенням мітотичного індексу клітин, що свідчить про більш інтенсивні процеси проліферації. Внаслідок цього клітини усіх ліній раніше формували суцільний моношар у порівнянні з клітинами, обробленими за класичною методикою. Крім того знизилась кількість клітин, у яких спостерігалась вакуолізованість цитоплазми, вирости клітинної мембрани та деформовані ядра [8]. Така культура виявилася найбільш оптимальною для діагностичного виділення збудника.

Більшість дослідників для діагностичного виділення хламідій застосовують різні способи, які стимулюють розмноження мікроорганізму у клітинах та підвищення їх адсорбції на моношар. З цією метою широко застосовують як самостійно, так і в різних комбінаціях додаткові методичні засоби: центрифугування інфекційного матеріалу на моношар клітин, ультрафіолетове опромінювання клітин, обробка клітин ДЕАЕ, поліетиленгліколем, циклогексимідом, які володіють цитостатичною дією та стимулюють розмноження хламідій. При застосуванні загальноприйнятих методів обробки клітин ліній L929, McCoу, Her-2: циклогексимідом – інгібітором білкового синтезу еукаріотних клітин у концентрації – 0,9-1,0 мг/мл [9], ми незмінно спостерігали інтенсивну вакуолізацію цитоплазми клітин, що не могло не впливати на репродукцію лабораторних ізолятів та результати діагностичного виділення хламідій із клінічних зразків. Тому нами в процесі досліджень необхідно було провести роботу в цьому напрямку. Для отримання результатів ми обрали метод обробки моношару клітин L-цистеїном – амінокислотою, яка входить до складу цистеїнівміщуючих білків структурної організації мембран різних форм хламідій.

Інфікування моношару клітин біологічним матеріалом здійснювали за стандартною методикою [5] із внесенням розчину L-цистеїну у концентрації 2,5-3,0 мкг/мл до поживного середовища з метою покращення проникнення збудника у клітини [10]. Облік результатів проводили після 48-72-годинної інкубації температури 35-37 °С. Виявлення морфологічних структур хламідій здійснювали за допомогою забарвлення препаратів за Май-Грюнвальда-Гімзою та методу прямої імуофлюоресценції. Застосування L-цистеїну у концентрації 2,5-3,0 мкг/мл не спричиняло вакуолізацію клітин, токсично не впливало на моношар, а сприяло збільшенню інфікування клітинної культури при діагностичному виділенні хламідій з клінічних зразків у 3-4 рази та у наступних пасажах у 5-6 разів.

Однак, первинне виділення хламідій у культурі клітин з подальшим накопиченням біомаси збудника в наступних пасажах, упродовж тривалого часу залишалось прерогативою високопатогенних штамів і не було доступно для більшості інших штамів, які мають менш виражену патогенність, оскільки великий вплив на процес культивування здійснюють умови навколишнього середовища: чинники, які виробляють клітини-хазяї, антибіотики, коливання рівня необхідних поживних речовин, у тому числі амінокислот, температура культивування. У таких випадках доцільно проводити пасивування на 6-7-добових курячих ембріонах, що розвиваються, оскільки тропізм мікроорганізму до клітин судин призводить до накопичення великої кількості антигену у судинних стінках оболонки жовткових мішків. У 6-7 добових курячих ембріонів, що розвиваються, жовтковий мішок має найбільший об'єм, що полегшує інокуляцію дослідного матеріалу та забезпечує велику клітинну поверхню для розмноження мікроорганізму. При чіткому виконанні усіх вимог методики суттєвою перевагою є також висока бактеріологічна чистота одержаних суспензій, оскільки замкнута поверхня яйця слугує надійним захистом від різної сторонньої мікрофлори. Курячі ембріони зручні та доступні для роботи, дозволяють одержувати порівняно велику кількість антигену у зараженому жовтковому мішку, у них проявляються чіткі симптоми інфекції.

Співробітниками лабораторії хламідіозів проведені дослідження щодо можливості сумісного послідовного використання перещеплених клітинних ліній та курячих ембріонів, що розвиваються, з метою збільшення біомаси збудника та підтримання його життєздатності у подальших пасажах як на культурах клітин, так і на курячих ембріонах.

У деяких випадках первинне діагностичне виділення хламідій на перещеплених клітинних лініях давало негативну відповідь, але при перенесенні даного матеріалу на жовткові мішки курячих ембріонів, що розвиваються ми отримували позитивний результат. Застосування курячих ембріонів обумовлює відмінні передумови їх використання для підняття вірулентності отриманих ізолятів. При цьому проходить різке зростання кількості елементарних та ретикулярних тілець хламідій. Ізолят набуває достатньої вірулентності, і що найголовніше, він набагато краще зберігає свою життєздатність при довгостроковій криоконсервації і здатний відновлюватись у мінімальні терміни при необхідності розконсервування.

Таким чином, використання запропонованого нами транспортного середовища, розчину альбуциду (30 мг/мл), цистеїну (2,5 мкг/мл) та методу сумісного послідовного використання перещеплених клітинних ліній та курячих ембріонів, що розвиваються, дозволить розширити спектр виділення збудників хламідіозу із сечостатевої та екстрагенітальної осередків від хворих.

Список літератури

1. Мавров, И. И. Актуальные медико-социальные проблемы хламидийной инфекции // Дерматология и венерология. – 2001. – №1 (11). – С. 37-41.
2. Сельнікова, О. П., Поліщук, О. І., Колтукова, Н. В. Музей патогенних для людини мікроорганізмів: Принципи формування та перспективи розвитку // Методи одержання чистих культур мікроорганізмів та їх довгострокового зберігання в колекціях. Роботи співробітників Музею патогенних для людини мікроорганізмів. – К. – 2000. – Випуск 1. – С. 4-17.
3. Everett, K. D., Bush, R. M., Andersen, A. A. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1999. – №49.
4. Кутова, В. В., Гончаренко, В. В., Джорасва, С. К., Щоголева, О. В., Усік, І. В. Збудники хламідіозів: особливості методологічних заходів при ізоляції та ідентифікації штамів мікроорганізму // Методи одержання чистих культур

Розділ 8. Патологія тварин, клінічна біохімія, якість і безпека тваринницької продукції

мікроорганізмів та їх довгострокового зберігання в колекціях. Роботи співробітників Музею патогенних для людини мікроорганізмів. Вип.3., – 2004. – С. 80-84. 5. Урогенитальные хламидиозы/ Шаткин А.А., Мавров И.И. – Киев: Здоров'я, – 1983. – 200 с. 6. Roblin, P. M., Dumornay, W., Hammerschlag, M. Use of Hep-2 cells for improved isolation and passage of Chlamydia pneumoniae.// Clin. Microbiol. – 1992. – № 30. – P. 1968-1971. 7. Herbrink, P., Zuyderwijn-Zwinkels, M., Wagenwoort, J. Comparison of different culture media for isolation of Chlamydia trachomatis by cell culture on HeLa cells //Eur.J.Clin. Microbiol Infect Dis. – 1991. – № 10. – P. 655-659. 8. «Спосіб пасивування клітинної культури L 929». Пат. 25661 Україна G01N33/00 Мавров І. І., Джораєва С. К., Кутова В. В., Гончаренко В. В., Щоголева О.В. № и200705527; заявл. 21.05.2007 р.; опубл. 10.08.2007 р. Бюл.№ 12. 9. Black, C. M. Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections // Clin, microbiol. Rev. – 1997. – Vol. 10. –№1. – P. 160-184. 10. Кутовая, В. В., Щоголева, О. В., Пустовойтова, Л. М., Гончаренко, В. В. Некоторые особенности использования L-цистеина для стимуляции размножения хламидий в культуре клеток // Дерматология та венерология. – 2001. – №1 (11). – С. 33-35.

THE IMPROVEMENT OF METHODOLOGICAL TECHNIQUES FOR ISOLATION OF CHLAMYDIOSIS AGENTS

Volkov T.O, Dzhorayeva S.K., Solonina N.L., Kuchma I.Yu., Pilyugin S.V., Volyans'ka N.P., Moysenchenko T.M., Tanasov S.V., Martirosyan I.O.

SE «Institute of microbiology and immunology AMS of Ukraine named after I.I. Mechnikov», Kharkiv

SE «Institute of dermatology and venerology AMS of Ukraine», Kharkiv

The methodological techniques for the primary diagnostic isolation of the agent and its biomass accumulation in cell culture L929, Hep-2, McCoy and developing chicken embryo is described in the article.

УДК 619:616.36-002-07:636.2

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СПОСОБОВ ДИАГНОСТИКИ ГЕПАТОЗОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Голубь А.А.

УО Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины, г. Витебск

Патологические процессы, связанные с поражением печени, довольно широко распространены среди сельскохозяйственных животных. По данным литературных источников [3, 6, 11] и собственных исследований [4] патология печени диагностируется у 20-90 % исследованных животных. Массовое клиническое проявление гепатоза и гепатита у крупного рогатого скота наблюдается лишь на фоне погрешностей кормления. Но по данным лабораторных исследований ряда учёных следует отметить, что более чем у 50 % животных имелись симптомы снижения функциональной способности органа [1]. Данная проблема усугубляется также гипомикроэлементозами, так как Республика Беларусь находится в биогеохимической зоне, где отмечается недостаток ряда микроэлементов (цинка, кобальта, меди и др.) [5].

Актуальность. Диагностика дистрофических и воспалительных поражений печени представляет значительные затруднения [9]. Существующие на практике методы исследования печени не всегда дают объективную информацию о характере заболевания и стадии патологического процесса. Поэтому необходимо проведение комплексных исследований для установления диагноза. Возможности клинического метода исследований ограничены, т.к. можно получить ориентировочную информацию о топографии и состоянии органа, но и не у всех животных [2]. Биохимические исследования последних лет позволили выявить избирательные изменения ферментной активности, которая при поражении тех или иных органов и тканей (в т.ч. и печени) резко возрастает, являясь показателем степени и глубины повреждения. Вместе с этим, клинико-биохимические показатели, характеризующие состояние печени у крупного рогатого скота изучены мало [10, 12]. Известно, что при поражении печени нарушается целый ряд биохимических процессов, в том числе изменяется обмен микроэлементов, и в частности цинка, который обладает гепатопротекторными свойствами [7, 8].

Целью настоящей работы являлась разработка нового способа диагностики гепатозов крупного рогатого скота.

Материалы и методы. Исследования проводились в условиях скотоводческих хозяйств Республики Беларусь. В опытах использовано 984 бычка, в возрасте 7-8 месяцев, живой массой 250 кг. Клиническое исследование проводили по общепринятой схеме. Лабораторные исследования проводились в НИИПВМиБ УО ВГАВМ. Из биохимических показателей определяли общий белок, альбумины, триглицериды, холестерол, глюкозу, общий билирубин, аланинаминотрансферазу (АЛТ), аспартатаминотрансферазу (АСТ), гаммаглутамилтрансферазу (ГГТ), сорбитолдегидрогеназу (СДГ), глутамилдегидрогеназу (ГлДГ) и цинк. Депарафинированные срезы печени окрашивали гематоксилином, эозином и суданом III. Полученный цифровой материал обработан статистическими методами с применением дисперсионного анализа по методу ANOVA/MANOVA и критерия достоверности Манна-Уитни (U).

Для определения новых критериев поражения печёночной ткани нами был проведён комплекс исследований, включающий изучение зависимости определённых показателей от концентрации цинка в крови, а также математическая подборка нового критерия, характеризующего поражение печени.

На первом этапе исследований, используя дисперсионный анализ по методу ANOVA/MANOVA, проводили изучение зависимости различных биохимических показателей крови всех исследуемых животных под влиянием изменения концентрации в крови цинка.

Обозначив ряд показателей, имеющих зависимость от концентрации цинка, для дальнейших расчётов нового критерия диагностики мы оценивали достоверность различий между двумя выборками по уровню какого-либо признака, используя критерий достоверности Манна-Уитни (U). Для этого, учитывая клинический и биохимический статус, опытные животные были разделены на две группы: животные, имеющие неспецифические признаки гепатозов (группа 1) и условно здоровые животные (группа 2).

На следующем этапе был проведён математический подбор нового коэффициента с применением ранее выявленных определённых биохимических показателей, достоверно различных между двумя группами. Затем используя критерий достоверности Манна-Уитни был выбран наиболее достоверный коэффициент характеризующий степень поражения печёночной ткани. Подтверждение полученных результатов были получены посредством проведения морфологических исследований печени подопытных животных.

Результаты исследований. Используя дисперсионный анализ по методу ANOVA/MANOVA определили ряд показателей, имеющих достоверную зависимость от изменения концентрации цинка в крови. Наиболее достоверными были зависимости АЛТ, АСТ и ГГТ. При увеличении концентрации цинка уровень активности АЛТ вначале несколько возрастает, а затем достоверно снижается ($F=4,43$; $p\leq 0,007$). При анализе зависимости активности АСТ и ГГТ от концентрации в крови цинка отмечается достоверное снижение активности ферментов при увеличении концентрации цинка. Причём наиболее резкий спад активности ферментов наблюдался при достижении концентрации цинка в крови до 3,28 мг/л.

Для дальнейших расчётов нового критерия диагностики, мы используя критерий Манна-Уитни (U) оценивали достоверность