

І.М.Ксьонз

В.М.Юхно

**Діагностика та заходи
профілактики і боротьби з
хламідіозами
сільськогосподарських
тварин**

УДК 619:616-07:619:616.986:614.91
ББК 48:45
К 86

Рекомендовано Міністерством освіти і науки України як навчальний посібник для
студентів вищих навчальних закладів
(Лист № 1,4/18-Г-28-72 від 24.12.08.)

Рецензенти: доктор ветеринарних наук, завідувач лабораторії вірусології і діагностики Інституту ветеринарної медицини УААН Синицин В.А.; доктор біологічних наук, професор, академік УААН, завідувач лабораторії фізіології Інституту свинарства ім. О.В.Квасницького Коваленко В.Ф.; кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри технології переробки продукції тваринництва Полтавської державної аграрної академії Лисенко М.В.

Ксьонз І.М., Юхно В.М.

Діагностика та заходи профілактики і боротьби з хламідіозами
сільськогосподарських тварин / Посібник. –

У посібнику узагальнені та систематизовані дані про збудників хламідійних інфекцій, клініко-епізоотичні особливості прояву інфекції у сільськогосподарських тварин, методи лабораторної діагностики, лікування та заходи боротьби і профілактики із даним зооантропонозом.

Представлені рекомендації щодо діагностики, лікування, боротьби і профілактики з хламідіозами сільськогосподарських тварин.

Посібник розрахований на практичних фахівців ветеринарної медицини, співробітників лабораторій ветеринарної медицини, тваринників, а також викладачів і студентів аграрних закладів освіти III-IV рівнів акредитації зі спеціальності «Ветеринарна медицина».

УДК 619:616-07:619:616.986:614.91

ББК 48:45

ISBN

І. М. Ксьонз

В. М. Юхно

ЗМІСТ

Вступ.....	
Хламідіози тварин	
Історична довідка	
Епізоотологічні дані.....	
Патогенез.....	
Клінічні ознаки	
Патологоанатомічні зміни	
Лабораторна діагностика.....	
<i>Відбір і доставка матеріалів для лабораторних досліджень</i>	
<i>Ретроспективна діагностика</i>	
<i>Імунологічні методи діагностики</i>	
<i>Морфологічні методи виявлення збудника хламідіозу.....</i>	
<i>Молекулярно-генетичні методи.....</i>	
<i>Виділення збудника із патологічного матеріалу.....</i>	
Диференціальна діагностика.....	
Лікування	
Заходи щодо профілактики і ліквідації захворювання.....	
Використана література.....	

ВСТУП

Хламідійні інфекції є досить розповсюдженими в інфекційній патології сільськогосподарських тварин. Вони завдають суттєвих економічних збитків господарствам, перш за все через недоотримання та загибель молодняку, а також через втрату репродуктивної здатності маточного поголів'я. Останнє зводить нанівець багаторічну напружену селекційну роботу, що має особливо тяжкі наслідки для племінних господарств. Ймовірна також і загроза здоров'ю людей, які контактують із хворими на хламідіоз тваринами.

Умови аграрного сектору економіки нашої держави на сучасному етапі є досить непростими і галузь тваринництва переживає не найкращі часи. До проблем годівлі та утримання тварин додаються суттєві проблеми щодо експлуатації та відтворення існуючого поголів'я. Саме із відтворенням стада, особливо в громадському секторі, виникають найбільші проблеми, за умови що один бугаєць осіменяє корів та телиць усього села. Внаслідок зараження урогенітальною інфекцією такого плідника від однієї самиці інфікується практично все маточне поголів'я. Не своєчасне ж виявлення інфікованих плідників племінних станцій сприяє широкому розповсюдженню захворювань, що передаються статевим шляхом, і хламідіозу зокрема, серед тварин господарств цілого регіону. Тому, єдиним способом уберегти поголів'я від зазначених інфекцій, або від подальшого поширення вже існуючих, є жорсткий періодичний контроль за станом благополуччя самців-плідників, використовуючи найсучасніші методи лабораторної діагностики.

Розповсюдженню хламідійних інфекцій серед тварин сприяє недостатня обізнаність і несерйозне ставлення до даної проблеми фахівців ветеринарної медицини та тваринництва. На нашу думку, хламідіоз є досить серйозним захворюванням і це мають знати працівники ветеринарної медицини та враховувати у своїй роботі. Тому популяризація знань щодо різних аспектів захворювань на хламідіоз сільськогосподарських тварин, на наш погляд, є надзвичайно актуальним.

ХЛАМІДІОЗИ ТВАРИН

Хламідіози – це інфекційні захворювання, які викликаються патогенними облигатними внутрішньоклітинними грам-негативними бактеріями порядку *Chlamydiales* родини *Chlamydiaceae*, до складу якої входить два роди: *Chlamydia* і *Chlamydophila*. Рід *Chlamydia* включає такі види: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia suis* і *Chlamydia muridarum*. До роду *Chlamydophila* входить 6 видів: *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila pecorum*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila felis* і *Chlamydophila caviae*.

Даний антропозооноз реєструється на всіх континентах земної кулі, має гострий і хронічний перебіг та латентну форму, причому, інфіковані особини залишаються довгий час хламідієносіями. До того ж, з кожним роком хламідіоз має тенденцію до інтенсивного поширення, набуваючи загрозливих масштабів, викликаючи занепокоєння науковців та практичних лікарів як гуманної, так і ветеринарної медицини.

Збудники хламідіозу під мікроскопом мають вигляд дрібних грам-негативних коків з характерною для прокаріотів структурою, які містять ДНК і РНК. Хламідіям та хламідофілам притаманний унікальний цикл внутрішньоклітинного розвитку, що включає дві стадії життєвого циклу існування мікроорганізму: елементарне тільце (ЕТ) – високоінфекційна форма збудника розміром 200-400 нм (рис. 1) і ретикулярне (ініціальне) тільце (РТ) – неінфекційна форма розміром 500-1500 нм. Також виявлені перехідні тільця – проміжні форми існування хламідій.

Механізми розвитку бактерій родини *Chlamydiaceae* включаються після ендоцинозу в цитоплазму епітеліальної клітини, утворюючи ендоцитозні вакуолі, котрі вміщують включення з колоніями часточок на різному ступені їх зрілості. Через 14-18 годин після ураження клітин включення починають диференціюватися на дрібніші структури і повний цикл їх розвитку завершується через 48-72 години.

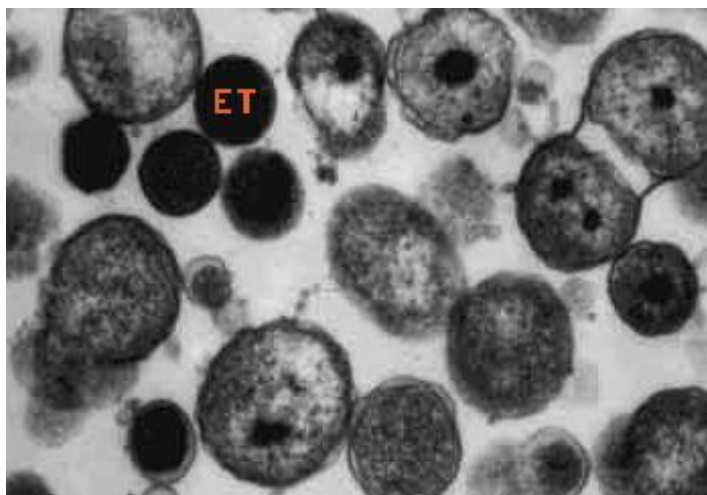


Рис. 1. Елементарні тільця хламідій під електронним мікроскопом.

Цикл розвитку хламідій та хламідофіл включає три основних етапи, а саме: контакт елементарного тільця із чутливою епітеліальною клітиною, його проникнення у цитоплазму цієї клітини шляхом ендоцитозу та перетворення ретикулярних тілець в елементарні тільця нового покоління.

Елементарні тільця хламідій концентруються у вакуолях цитоплазми клітин господаря. У них же вони трансформуються у великі ретикулярні форми до 600-1500 нм в діаметрі. Ретикулярні тільця розмножуються шляхом бінарного поділу, перетворюючись у дрібні тільця за рахунок ущільнення. Таким чином, в одному цитоплазматичному включенні можуть знаходитись хламідії різних стадій розвитку та розмірів, від дрібних до величезних утворень-мікроколоній, котрі після лізису клітини-господаря розпадаються на сотні елементарних тілець. Крім того, існує варіант трансформації хламідій чи хламідофіл у клітині макроорганізму в L-форми. Це зустрічається після неадекватної терапії (особливо етіотропної терапії, проведеної без урахування антибіотикорезистентності хламідій і хламідофіл) (рис. 2).

Хламідіози у дорослих тварин характеризуються, перш за все, ураженням репродуктивних органів. У самиць вони зумовлюють аборти і народження мертвого та нежиттєздатного приплоду, у самців – орхіти, баланопостити та проктити. У молодняку захворювання часто

супроводжується кон'юнктивітами, поліартритами, пневмоентеритами. Також може мати місце нервова форма, яка проявляється енцефаломієлітами.

У зв'язку з тим, що у сільськогосподарських тварин хламідіоз проявляється в різних клінічних формах, це захворювання має багато назв, які свого часу були віднесені до окремих нозологічних одиниць: хламідійний аборт великої рогатої худоби, хламідійний енцефаломієліт великої рогатої худоби, хламідійний ентерит великої рогатої худоби та овець, хламідійна бронхопневмонія телят, хламідійний поліартрит телят і ягнят, хламідійний кон'юнктивіт жуйних, хламідійна бронхопневмонія поросят, хламідійний аборт кобил, хламідійна бронхопневмонія лоша́т, хламідійний поліартрит лоша́т тощо.

Діагноз на хламідіози ставиться комплексно із врахуванням епізоотологічних даних, характерної клінічної картини та патологоанатомічних змін із обов'язковим проведенням лабораторної діагностики.

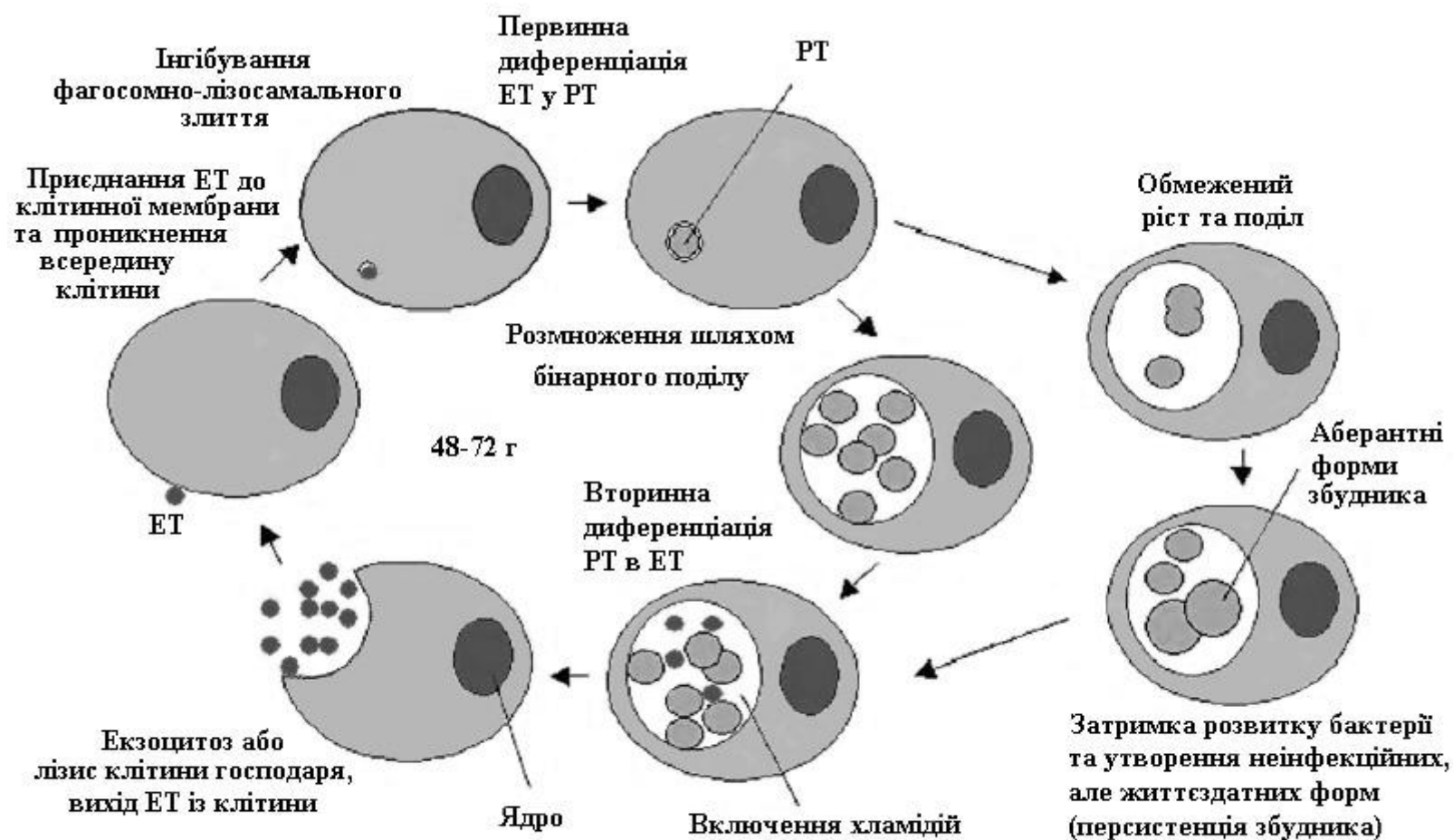


Рис. 2. Цикл розвитку збудника хламідіозу.

ІСТОРИЧНА ДОВІДКА

Понад три десятки видів збудників різноманітних форм інфекційних захворювань людини та тварин, що споріднені за морфологією, циклом розвитку та наявністю групового антигену, були об'єднані в єдину родину, котра отримала назву «хламідія» (*Chlamydia*). Ця назва є видозміною первинного номенклатурного терміну *chlamydozoon*, який було впроваджено в науковий обіг ще в 1907 році Гольбершtedером та Провачеком. У той час ці автори вважали, що включення при трахомі утворюються в результаті проникнення в клітину вірусних елементарних тілець, котрі потім обволікаються клітинною речовиною, наче мантиєю. На цій підставі внутрішньоклітинні утворення отримали назву «*Chlamydozoa*» від злиття слів *Chlamyis* – мантия та *Zoon* – тварина. У 1945 році Jones, Rake і Stearnes запропонували для позначення родини і роду цієї групи збудників термін «*Chlamydia*».

Історія ж вивчення хламідійних інфекцій бере свій початок з кінця XIX століття, коли було встановлено взаємозв'язок із пневмонією людини, що мала своєрідний перебіг, та хворобами папуг, завезених із тропіків.

Хламідії у ВРХ вперше були виділені американськими дослідниками York і Baker у 1951 році з фекалій клінічно здорових телят. Хламідійна ж етіологія абортів корів була з'ясована у 1956 році німецькими вченими Schoon і Kauker. Пізніше хламідії були виділені із абортіваних плодів у Франції, США, Італії, Канаді, Іспанії, Бельгії, США, колишніх НДР, Югославії, СРСР та інших країнах.

Хламідіоз свиней в Україні виявив і описав Бортнічук В.А. із співробітниками у 70-х роках XX століття. Також значний вклад у вивчення хламідіозів сільськогосподарських тварин в Україні внесли Ковальов В.Л., Бабкін А.Ф., Яцишин А.Й, Павленко М.С.

Саме в середині 70-х років минулого століття, коли накопичився достатній дослідницький матеріал для синтезу та аналізу справ із

захворюванням як в гуманній, так і ветеринарній медицині, на хламідійну інфекцію по-справжньому звернули увагу. Тоді ж з'явилися перші аналітичні огляди в науковій літературі, в тому числі і в галузі ветеринарної медицини.

Восьмидесяті роки минулого століття вважаються «Ерою молекулярної біології хламідійної клітини». У той період була здійснена біохімічна, антигенна і генетична характеристика хламідій, розроблена методика виявлення хламідійних антигенів в матеріалі від хворих особин за допомогою імуноферментного аналізу, а також технологія приготування видоспецифічних моноклональних антитіл для імунофлюоресцентної ідентифікації хламідій.

В останні часи розвиток молекулярної біології дозволив виявити нові мікроорганізми з характерним для хламідій циклом розвитку і разом з визначенням геному вже відомих збудників це призвело до необхідності чергового перегляду їх номенклатури. Окрім виявлення нових представників родини *Chlamydiaceae*, визначено ще три родини порядку *Chlamydiales*: *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae* і *Waddiaceae*, представники яких є непатогенними для ссавців і птахів.

ЕПІЗООТОЛОГІЧНІ ДАНІ

До хламідіозу сприйнятливі усі статеві та вікові групи більшості видів ссавців (включаючи людину) та більш ніж 130 видів птахів. Окрім того, бактерії родини *Chlamidiaceae* виявляються у риб, амфібій, членистоногих, молюсків і навіть у рослин.

Основним джерелом збудника інфекції є інфіковані тварини, особливо матки та плідники, які передають збудника потомству. Виділення хламідій та хламідофіл з організму інфікованих тварин відбувається з аборт-плодами, плацентою та плодовими водами під час абортів або родів маток, а також із молоком, сечею, фекаліями, носовим слизом та іншими екскретами. У інфікованих плідників збудник виділяється зі спермою, що призводить до зараження маток як при природному, так і при штучному осіменінні. Зараження тварин хламідіями та хламідофілами відбувається при прямому контакті тварин, аерогенним, аліментарним та, насамперед, статевим шляхами. Крім цього, має місце і внутрішньоутробне зараження, яке обумовлене тим, що хламідії та хламідофіли долають плацентарний бар'єр, проникають у матку, викликаючи зараження, захворювання чи загибель плоду. Факторами передачі збудника можуть стати виділення хворих тварин, підстилка, предмети догляду, молоко хворих корів. Існує можливість і трансмісивного шляху передачі збудника інфекції, в якому досить важливу роль відіграють кліщі *Ixodes ricinus* та *Dermacentor marginatus*, у яких були виділені хламідії. Також збудника можуть передавати мухи і пухощі. Крім того, зараження тварин хламідіями може відбуватись при контакті з інфікованими гризунами та синантропною птицею.

Особливу епізоотичну небезпеку у розповсюдженні хламідіозу являє заражений хламідіями племінний молодняк та самці-плідники при комплектуванні станцій (центрів) штучного осіменіння, оскільки збудник активно розноситься по багатьох господарствах.

Заражені тварини, у яких відсутні клінічні прояви хламідіозу (латентний перебіг захворювання), часто бувають причиною виникнення спалахів захворювання, особливо при їх завезенні у благополучні стада.

Хвороба може мати спорадичний перебіг, а в більшості випадків – у вигляді ензоотій. Слід відмітити, що найчастіше захворювання виникає при масових родах маток, при недотриманні ветеринарно-санітарних вимог, незадовільних умовах утримання та годівлі тварин тощо. Зокрема, до виникнення захворювання молодняку спонукають незбалансованість раціонів вагітних маток, скупчене утримання молодняку, відсутність необхідного мікроклімату приміщень тощо, тобто факторів, які впливають на зниження резистентності організму. В таких умовах відбувається адаптація збудника до організму сприйнятливого поголів'я і підвищення його вірулентності.

Відсоток захворюваності тварин на хламідіоз складає 2-60 %, летальність від 30 до 70 %. Існує пряма залежність захворюваності і летальності від віку тварин: чим менший вік тварини, тим вищим є відсоток захворюваності та летальності.

У разі первинного спалаху хламідіозу серед тварин інфекційний і епізоотичний процеси перебігають гостро (масові аборти, народження мертвого та нежиттєздатного приплоду, затримка посліду). У подальшому хвороба набуває хронічного та латентного перебігу з періодами загострення та затухання епізоотичного процесу та клінічного прояву.

Тварини, які перехворіли на хламідіоз або інфіковані хламідіями, але клінічно здорові, залишаються тривалий час (12 місяців і більше) хламідієносіями. У зв'язку з цим захворювання має стаціонарний характер. У неблагополучному господарстві утворюється замкнутий ланцюг: збудник – сприйнятливий організм.

Захворювання може перебігати у вигляді моноінфекції, а також в асоціації з вірусами і патогенними бактеріями. Такі змішані інфекції, у більшості випадків, виникають в умовах високої концентрації поголів'я і впливу провокуючих стрес-факторів. Особливо гострого перебігу хламідіоз

набуває при ускладненні сальмонельозом, пастерельозом, лептоспірозом, інфекційними ринотрахеїтом, парагрипом-3, вірусною діареєю, адено-, корона- та пікорнавірусними інфекціями у ВРХ, парво- та ротавірусною інфекціями, колібактеріозом, анаеробною дизентерією, мікоплазмозом – у свиней, пастерельозом, мікоплазмозом, бруцеляовісною інфекцією – у овець та кіз, ринопневмонією та вірусним артеріїтом – у коней.

Хоча хламідіоз не має вираженої сезонності, взимку захворювання виникає частіше, оскільки в зимово-стійловий період відбувається більш тісний контакт між тваринами.

Перехворіла на хламідіоз доросла худоба набуває імунітету на період від 4 до 6 місяців, новонароджені ж телята отримують колостральний або ж зберігають спадковий імунітет до 2-3-місячного віку. Титр специфічних молозивних антитіл у новонароджених телят та антитіл до хламідій у корів, у більшості випадків, співпадає, поступово знижуючись у молодняку до 70-денного віку на рівень, котрий вже не забезпечує резистентності організму до збудника. У таких випадках в телят проявляються перші ознаки хламідіозу, а в сироватках крові виявляють комплементзв'язуючі антитіла до групового антигену.

У молозиві корів відразу після отелення антитіла зустрічаються найбільш часто, але у найвищому титрі лише через 48 годин. У сироватці крові новонароджених телят до першого випоювання молозива антитіла до хламідій зазвичай не виявляють. Вони з'являються у них лише після отримання молозива і у найвищому титрі саме через 2 доби після народження, що синхронізується із найвищими титрами антитіл у сироватках крові корів.

Імунна реакція організму овець на хламідійну інфекцію мало вивчена. Однак, зважаючи на те, що захворювання найхарактерніше для ягниць-первородок, є підстави вважати, що у вівцематок старшого віку організм більш резистентний до інфекції і це, можливо, пов'язане з набуттям певного імунітету після перехворівання в період першого окоту.

Також недостатньо вивченим є імунітет і при хламідіозі свиней. У них, як і у овець, аборти та народження мертвих і нежиттєздатних поросят частіше мають місце серед перевіряємих, ніж у основних свиноматок. Виявлення ж комплементзв'язуючих та аглютинуючих антитіл до хламідій в сироватках крові перехворілих свиней вказує на присутність певних факторів імунітету.

ПАТОГЕНЕЗ

Хламідії та хламідофіли здатні добре адаптуватись і інтенсивно розмножуватись в епітеліальних клітинах слизових оболонок органів респіраторної та статеві систем, шлунково-кишкового тракту, звивистих каналців нирок, гепатоцитах печінки та клітинах ретикуло-ендотеліальної системи. При цьому збудник здатний спричиняти дистрофічні та некротичні зміни в паренхіматозних органах, особливо плода, викликати аборти або народження мертвого чи нежиттєздатного приплоду.

У дорослих самиць латентна форма інфекції розвивається, як правило, із настанням вагітності. За рахунок високого тропізму до клітин епітелію статевих органів, на певній стадії вагітності, хламідії заносяться до них з током крові. Вкорінившись і розмножившись в епітеліальних клітинах хоріону, збудник викликає їх дистрофію і некроз. Крім того, розмножуючись в паренхіматозних органах плода, хламідії зумовлюють набряк підшкірної клітковини, і внаслідок токсичної дії викликають його загибель. Розвиток плацентиту або загибель плода призводить до абортів.

Особлива роль у розвитку механізмів хламідійної інфекції належить кишковій фазі перебування збудника в організмі. Проникність слизової оболонки кишечника лежить в основі як цитоцидного інфікування епітеліальних та ендотеліальних клітин, так і змін міжклітинних зв'язків, внаслідок чого порушуються функції базальних мембран клітин. Зараження ендотелію судин центральних каналців є кінцевою фазою прориву бар'єра слизової оболонки кишечника.

Із місця первинної локалізації збудник проникає у кров (хламідемія) і розноситься у паренхіматозні органи, лімфовузли, суглоби, окремі залози внутрішньої секреції, наприклад тимус, і навіть мозок.

КЛІНІЧНІ ОЗНАКИ

Інкубаційний період хвороби коливається від 4 до 25 діб, а інколи і до року. Хламідії та хламідофіли вражають майже усі органи і тканини макроорганізму. Захворювання може мати гострий, підгострий, а частіше за все хронічний та латентний перебіг, а також різні за проявом форми: генітальну, респіраторну, нервову та змішану, яка поєднує ті чи інші ознаки вищеназваних форм. Будь-яка із цих форм може супроводжуватись кон'юнктивітами, поліартритами, а у молодняку ще і розладами функцій органів шлунково-кишкового тракту.

У разі первинного спалаху хвороби інфекційний та епізоотичний процеси перебігають гостро, надалі хвороба набуває хронічного та латентного перебігу із періодичним загостренням епізоотичного процесу та клінічних проявів.

У неблагополучних господарствах латентну форму хламідіозу виявляють при лабораторних дослідженнях у 10-80 % тварин різних статевих вікових груп (коливання відсотку позитивно реагуючих тварин залежить не лише від ступеню інфікованості стада, а й від чутливості того чи іншого методу діагностики).

У ж у й н и х т в а р и н (велика рогата худоба, вівці, кози) хламідіоз найчастіше зустрічається в генітальній, респіраторній, нервовій та кишкової формах перебігу, які часто ускладнюються артритами та кон'юнктивітами.

Г е н і т а л ь н а форма хвороби характеризується абортами у корів на 7-9 місяцях тільності, але інколи аборти можуть бути і на 4 місяці. Хвороба починається раптово, і, за винятком підвищення температури тіла до 40,5°C, клінічні прояви відсутні. Інколи відмічають прогресивне виснаження тварини. У корів захворювання супроводжується зниженням молочної продуктивності та розвитком маститів. У більшості тварин, які абортували, відмічається затримка посліду, розвиваються ендометрити, вагініти, що часто

призводить до яловості. Крім абортів, також відмічають народження слабких телят, які гинуть в перші дні життя.

У бугаїв-плідників, заражених хламідофілами від корів, захворювання характеризується хронічним запаленням сім'яників та їх придатків, що у ряді випадків закінчується атрофією статевих залоз. При цьому якість сперми погіршується: знижується кількість і рухливість спермій, первинні та вторинні аномалії некроспермія, олігоспермія і навіть аспермія (заплідненість складає 50-70 %). У корів, що запліднювались такою спермою нерідко виявляють наявність кіст в яєчниках, які призводять до безплідності. При цьому вибраковується до 10-15 % корів.

Клінічні ознаки хламідійного абортів овець спостерігаються переважно під час окоту в зимово-весняний період. За декілька діб до абортів або передчасного окоту у тварин підвищується температура тіла до 40,5°C і навіть вище та починаються слизові або слизово-гнійні виділення зі статевих органів. Народжені від заражених вівцематок ягнята гинуть у перші доби життя з ознаками розладів діяльності шлунково-кишкового тракту та (або) бронхопневмонії.

При респіраторній формі хвороби, яка найчастіше зустрічається у молодняку, хвороба починається з підвищення температури тіла до 40-40,5°C. У хворих відмічається недовготривала діарея, яка минає без терапевтичного втручання. У подальшому з'являються серозні або серозно-слизисті витіки із носової порожнини, слезотеча, сухий кашель, прискорене дихання, в окремих випадках відмічається яскраво виражена пневмонія. При ускладненні бактеріальними інфекціями захворювання часто набуває затяжного характеру і закінчується летально. При гострій стадії хвороби відмічається лейкопенія з нейтрофілією.

При неускладнених випадках захворювання через 7-10 діб температура тіла нормалізується, серозно-слизисті витіки із носової порожнини припиняються. Пізніше у певної частини інфікованих телят (при несприятливих умовах утримання і годівлі кількість таких телят може сягати

половини) хвороба може ускладнитись вторинною полімікробною аутоінфекцією. При цьому у хворих телят посилюються ознаки бронхопневмонії і відмічається погіршення загального стану, прискорене поверхнєве дихання, ремітуюча лихоманка з підвищенням температури тіла до 41°C і вище, частий кашель, вологі хрипи в легенях і значні слизово-гнійні витіки із носової порожнини, а в картині крові – нейтрофільний лейкоцитоз. Хворі телята відстають в рості і розвитку, і при неправильному лікуванні летальність досягає 30 і більше відсотків.

Симптоми респіраторного захворювання хламідійної етіології у телят непостійні. Клінічні прояви хвороби коливаються від латентної форми до тяжкої пневмонії з гострим, підгострим і хронічним перебігом. Певно, окрім інших факторів, ступінь прояву інфекції залежить від віку тварини, вірулентності збудника і супутньої мікрофлори вірусної та бактеріальної природи. Так, розладами шлунково-кишкового тракту частіше страждають телята у віці від 2 до 16 діб, а ураженням респіраторного тракту – від 10-20 діб до 5-6 місяців. Ускладненням може бути виражений гепатит, нефрит, міокардит. Тварини, що одужали, довгий час залишаються хламідієносіями.

Н е р в о в а форма перебігу хламідіозу характеризується раптовим підвищенням температури тіла до 40,5-42°C. Після чого поступово зникає апетит, настає виснаження і фізична слабкість, відмічається слюзотеча і кашель. Після цієї стадії може наставати видужування тварин. Але у більшості випадків розвиваються симптоми нервового захворювання. Рухи тварин стають некоординованими через слабкість кінцівок в путових суглобах, які мимовільно згинаються. Суглоби кінцівок іноді бувають набрякові, м'які та болючі. У деяких тварин чітко проявляється кульгавість, невпевнена хода, вони часто спотикаються і ходять по колу, падають і здійснюють плавальні рухи. Можуть спостерігатися виділення із носа та діарея. У хворої худоби відмічається підвищена чутливість. Іноді тварини упираються головою в тверді предмети. Фізична слабкість супроводжується

прострацією і глибоким пригніченням. В окремих випадках перед смертю відмічаються судорожні скорочення шийних і потиличних м'язів. Окрім того відмічаються нервовість, статична і динамічна атаксія, дрижання голови, регулярні судоми верхніх повік, вух і губ. Протягом 7-12 діб хворі або гинуть, або поступово видужують.

Хламідійний ентерит жуйних найчастіше відмічається у молодняку до 6-місячного віку. Клінічна картина при такій формі захворювання характеризується пригніченням, підвищенням температури тіла до 41°C, відсутністю апетиту, прискоренням пульсу і дихання та кон'юнктивітом. У подальшому лихоманка носить рецидивний характер. Через 7-8 діб тварини мляво реагують на оточення, знаходяться в сонливому стані, опутивши голову вниз, відмічається сльозотеча. Найбільш характерною ознакою захворювання є розлад шлунково-кишкового тракту. Затяжні проноси супроводжуються тенезмами, у рідких калових масах знаходиться велика кількість слизу з домішками крові. В подальшому телята стоять виснажені, очі западають глибоко в орбіти, а у окремих з'являються серозно-слизові виділення із носової порожнини та кашель. Часом цей симптомокомплекс дещо пом'якшується, а потім знову посилюється. Через 15-20 діб телята видужують або гинуть.

При локалізації збудника інфекції в суглобах у телят та ягнят діагностується хламідійний поліартрит. При цьому, як правило, у хворих телят відмічається болючість суглобів, лихоманка, кон'юнктивіти, слабкість, короткочасна діарея. Більшість телят гине через 2-10 діб після появи перших ознак захворювання. У хворих ягнят відмічають загальну слабкість, депресію і скутість рухів. Лихоманка відмічається при гострому перебігові хвороби та в період її загострення. У цей час опухлі суглоби ягнят болючі, при випасі тварини відстають від стада і худнуть.

При ураженні кон'юнктиви із хворого ока з'являються виділення, повіки опухають, розвивається сильна світлобоязнь. На поверхні набряку слизової спостерігається дрібна зернистість. Запальний процес може

розповсюджуватись і на рогівку, викликаючи кератит, а іноді і укриття її виразками. Кон'юнктивіт частіше буває одностороннім. Через 8-10 діб, у більшості випадків, тварини видужують.

У **свиней** інкубаційний період при цьому захворюванні, як вже було сказано вище, триває від двох тижнів до року і довше. Його тривалість залежить від рівня резистентності організму, вірулентності збудника та терміну поросності у свиноматок. Захворювання проходить гостро, хронічно та латентно у різноманітних формах – генітальній, респіраторній, кишковій, нервовій та змішаній.

В одному і тому ж господарстві хвороба може мати як гострий, так і латентний перебіг, який встановлюється лише лабораторними дослідженнями.

При первинному виникненні інфекції в господарстві, серед разових свинок, у 80-100 % спостерігаються масові аборти, що виникають наприкінці поросності. Основні свиноматки народжують 2-3 мертвих, решту живих, але нежиттєздатних поросят, які, частіше за все, гинуть протягом перших годин чи діб після народження. У стаціонарно неблагополучних господарствах аборти і мертвонародження спостерігаються переважно у разових, рідше – у основних свиноматок, проте і в цих випадках унаслідок внутріутробного зараження поросята можуть захворіти в перші доби життя. Передвісників абортів або патологічних опоросів у свиноматок зазвичай не буває. Зрідка в окремих із них може спостерігатися зниження апетиту аж до його зникнення, залежування, занепокоєння. Після опоросу свиноматки лежать, неохоче поїдають корм, температура тіла у більшості з них нормальна або дещо підвищена. У деяких свиноматок виникають метрити, а також розвивається агалактія (як наслідок порушення загальної фізіологічної рівноваги або на ґрунті маститу). Можливі і ранні аборти, які відбуваються на другому місяці поросності. Такі випадки часто проходять непоміченими, і тварини вважаються холостими. В окремих стадах аборти у свиноматок спорадичні. Іноді відбувається муміфікація плодів, але таке явище не має масового

характеру. Відомі випадки гострого перебігу хламідіозу у свиноматок. При цьому спостерігається сильний кашель, утруднене з присвистом дихання, порушується функція кишечника (закріпи), і, в окремих випадках, на 3-5 добу після абортів тварина гине.

Новонароджені поросята від хворих або інфікованих свиноматок мляві, зі слабким сисним рефлексом, їх шкіра гіперемійована, з синюшним відтінком, слизові оболонки бліді, сухі. Маса тіла таких тварин сягає 500-700 г, крім цього у таких поросят відмічається підвищена збудливість, ремітуюча лихоманка, температура періодично підвищується до 40,5°C. Зазвичай такі поросята гинуть у перші години або на 5-7 добу після народження. При захворюванні поросят віком понад 2 місяці спостерігаються пневмонії, кон'юнктивіти, короткочасні проноси, виснаження. У більшості тварин виявляють обмежені некротичні ураження шкіри в ділянках вух, тулуба, хвоста, у 5-10 % поросят зустрічаються поліартрити.

Поросята-сисуні захворюють на хламідіоз через декілька діб після народження. Як правило, хвороба починається легким катаральним ринітом і кон'юнктивітом. Із розвитком хвороби гіперемія кон'юнктиви стає більш вираженою, серозне запалення замінюється гнійним, внаслідок чого повіки у поросят склеюються і вони не можуть розкрити очі. Катарально-гнійний кон'юнктивіт зустрічається у 3-5 % хворих поросят. На початку захворювання пульс і дихання прискорюються, знижується апетит, з'являються «тифозний» стан і «торакальна надчутливість». Температура тіла коливається від 39,0-40,0°C до 41,0-42,0°C, іноді залишається в межах норми. Дихання важке, виражені ознаки ціанозу. Шкіра і слизові оболонки бліді, пізніше шкіра набуває жовто-коричневого кольору, на ній утворюються темно-коричневі кірки. Одночасно з'являються короткочасні проноси, які призводять до виснаження тварин. Залежно від умов утримання і наданої лікувальної допомоги летальність тварин за 2-3 тижні коливається у межах 20-60 %.

У відлучених поросят температура тіла незначно підвищується або залишається у межах норми. Апетит частіше збережений. Домінують ознаки ураження органів дихання, спостерігаються короткочасні проноси, гіперемія кон'юнктиви і слъзотеча, знижується маса тіла. У деяких кнурців відмічаються ознаки запалення препуція. На вухах, на тулубі і біля кореня хвоста можуть бути некротичні ураження, розповсюдження яких носить ензоотичний характер і може охоплювати від 40 до 80 % хворих поросят. При цьому спонтанно з'являється округла ціанотична зона величиною від 1 до 2 см, на місці якої тканина відмирає, охоплюючи значні ділянки.

У сисунів і поросят після відлучення, в деяких випадках, спостерігаються ознаки враження центральної нервової системи і суглобів. Тварини впадають в депресивний стан, у них відмічається тремтіння шкіри, хвилеподібне скорочення м'язів, виникають парези задніх, рідше передніх кінцівок. Іноді спостерігається збудження, що характеризується верещанням, раптовим падінням і плаваючими рухами. Через деякий час тварини підіймаються і здаються здоровими. У свиней старших вікових груп нервова форма хвороби характеризується періодичними порушеннями координації рухів.

Приблизно у 5 % поросят зустрічаються поліартрити, що характеризуються збільшенням і набряклістю декількох суглобів, скутою ходою і кульгавістю. У порожнині ураженого суглоба накопичується значна кількість непрозорої темно-червоної рідини тягучої консистенції.

Поява на фермі слабких і відстаючих у розвитку поросят в умовах цілком нормального утримання та годівлі і при відсутності бактеріальної інфекції є підставою для проведення лабораторних досліджень з метою виключення хламідіозу.

У дорослих кнурів, у більшості випадків, захворювання має латентний або хронічний характер, без явно виражених клінічних ознак. Іноді спостерігаються орхіти, баланопостити, артрити, зниження статевої активності та схуднення. На відміну від основних кнурів, у молодих (віком

близько 8 місяців), які вперше потрапили в осередок інфекції, захворювання може мати гострий перебіг, при якому відмічається ураження органів дихання, шлунково-кишкового тракту та статеві системи. При цьому у них спостерігається пригнічення та різке зниження апетиту, температура тіла коливається від 40,5 до 41,0 °С, дихання стає прискореним, переважно черевного типу. Крім цього, у хворих тварин може з'являтися глибокий, сухий кашель, який з розвитком стає помірно вологим, не частим. У деяких тварин з'являються короткочасні проноси, що змінюються запорами, блювання, депресія. Іноді захворювання може закінчуватись летально. Частіше, гострі ознаки хвороби через 8-10 діб зникають і тварини поволі видужують, проте у деяких з них залишаються орхіти, баланопостити та прискорене сечовиділення. При хронічному перебігу клінічні ознаки хвороби зазвичай стерті. Плідники худнуть, у них помірно набрякає зона препуцію, при паруванні з уретри виділяється кров'яна рідина, статеві активність поступово знижується. Іноді у кнурів спостерігається кульгавість, що розвивається унаслідок враження суглобів.

У **к о н е й** хламідіоз перебігає у генітальній, респіраторній формах та у вигляді запалення суглобів. Г е н і т а л ь н а форма проявляється у вигляді абортів у кобил. Аборти, як правило, виникають у другій половині вагітності, раптово, без будь-яких попередніх клінічних ознак. Протікають аборти легко, переважно непомітно, зазвичай в нічний час або рано-вранці. Іноді навіть важко, за клінічним станом, визначити, яка з кобил абортувала. Хоча у деяких кобил аборти супроводжуються загальним пригніченням та відмовою від корму. Ускладнень після абортів, як правило, не буває; фізіологічний стан матки відновлюється швидко і вже через 45-60 діб може відбутися запліднення. Супутнім фактором, що призводить до абортів, є зниження резистентності організму внаслідок неповноцінної годівлі та незадовільних умов утримання.

У жеребців хламідіоз проявляється орхітами, баланопоститами, епідидимітами, хоча такі клінічні прояви зустрічаються досить рідко. У більшості ж випадків відмічають порушення сперміогенезу.

У лошат хламідіоз протікає в респіраторній та артритній формах. Респіраторна форма характеризується бронхопневмонією, яка починається із підвищенням температури тіла до 40°C. У подальшому відмічається гіперемія видимих слизових оболонок, напружене дихання. Через 4-6 діб після виявлення лихоманки з'являються кашель і хрипи в легенях. Хвороба часто набуває хронічної форми і триває, як правило, 6-8 тижнів.

Поліартрит частіше за все буває у лошат до 1-2 місячного віку. Спочатку хвороба проявляється болючістю суглобів при пальпації, хоча видимі зміни можуть бути відсутніми. Через декілька діб суглоби (зазвичай усіх чотирьох кінцівок) розпухають, стають гарячими, підвищується тактильна чутливість. Температура тіла, як правило, на початку захворювання залишається в нормі, а на 7-10 добу підвищується і може досягати 41°C. У новонароджених лошат поліартрит часто розвивається разом із бронхопневмонією.

ПАТОЛОГОАНАТОМІЧНІ ЗМІНИ

Патологоанатомічні зміни при хламідіозах тварин залежать від форми перебігу захворювання. У ВРХ при *хламідійному аборті* інтенсивність патологоанатомічних змін в аборт-плодах і плацентах корів, перш за все, залежить від терміну вагітності. Після аборту розвиваються катаральний ендометрит, цервіт і вагініт з множинними крововиливами на слизовій. Запальний процес в статевих шляхах часто ускладнюється у зв'язку з активізацією вторинної бактеріальної інфекції. При цьому в матці скупчується гнійно-катаральний, фібринозний або іхорозний ексудат. Мікроскопічно в товщі слизової оболонки матки і вагіни виявляють лімфогістоцитарну і плазмоцитарну інфільтрацію. Хронічний хламідійний ендометрит часто супроводжується метаплазією епітелію, фіброзом сполучнотканної основи слизової і атрофією маткових залоз.

Плодові оболонки набрякові, місцями міжкотеледонний хоріон студенисто інфільтрований нерідко з некротичними враженнями. В котеледонах безліч дрібних некротичних вогнищ сірувато-жовтого кольору. Також відмічають відторгнення ворсинок хоріону. При мікроскопії виявляють зміни, характерні для плацентита: некроз трофобластичного епітелію, лейкоцитарна інфільтрація і васкуліти в хоріоні, скупчення фібринозно-гнійного ексудату між поверхнею хоріону і маткою, вогнищевий некроз епітелію матки, особливо виражений між карункулами.

У трупах загиблих корів, окрім змін в статевих органах, можуть спостерігатись постпневматичні залишкові явища – дрібні рубці в легенях і синехії між долями. В колишніх пневмонічних фокусах мікроскопічно виявляють папіломатозні вирости епітелію бронхів, клітинна інфільтрація і фіброз сполучнотканної основи їх слизової оболонки, а також порушення архітектоніки альвеол. Відмічають також ознаки хронічного ентериту (зморщення і потовщення слизової, значна клітинна інфільтрація власної

пластинки), нерідко ендокардити, клітинні інфільтрати в міокарді і гломерулонефрити.

Плоди, які були абортвані до 6 місяців тільності, не мають яскраво виражених уражень. Відмічають лише збільшення кількості прозорої, червонуватої рідини в плевральній і черевній порожнинах та набряк підшкірної клітковини. Плоди, абортвані на 7-9 місяці тільності, мають більш помітні патологічні зміни: анемічність слизових оболонок, виражений набряк шкіри та підшкірної клітковини, особливо в області голови; скупчення янтарно-жовтого (інколи з домішками крові) ексудату в порожнинах; досить часто мають місце крововиливи на слизових оболонках кон'юнктиви, ротової порожнини і язика, глотки, трахеї, стравоходу, в слинних залозах, тимусі, лімфатичних вузлах і на перикарді. У плодів відмічають асцит, який викликає значне збільшення об'єму черевної порожнини. Ексудат при цьому жовтуватого кольору, іноді із домішками крові. Лімфовузли плода, у більшості випадків, збільшені, набрякові і геморагічно інфільтровані. Найбільш характерні зміни знаходять в печінці. Вона збільшена в розмірах, зерниста, рихла, від світло-жовтого до червоно-оранжевого кольору, нерідко плямиста. Мікроскопічно в печінці спостерігаються дистрофічні, некротичні зміни паренхіми, лімфогістоцитарні інфільтрати стромі. Нирки з явищами вираженої білкової дистрофії. При мікроскопічному дослідженні гістопрепаратів із паренхіми нирок, типовим є накопичення в клітинах нирок гранул бурого пігменту. Епітелій звивистих каналців знаходиться в стані вакуольної дистрофії і некрозу. У багатьох випадках мають місце ураження сичуга і тонкого відділу кишечника. Епітелій їх слизової оболонки в стані слизової дистрофії, місцями десквамований, власна пластинка розрихлена, інфільтрована клітинними елементами. В криптах поряд зі злущеними епітеліоцитами знаходять нейтрофіли. Приблизно в 60-70 % випадків зустрічаються зміни в головному мозку: продуктивні перваскуліти, вогнищевий менінгоенцефаліт.

У окремих випадках виражені зернистий розпад і лізис м'язових волокон, дряблість і клітинна інфільтрація сполучної тканини міокарда.

У бугаїв-плідників відмічають ознаки орхіту, епідидиміту та баланопоститу. При цьому сім'яники збільшені в розмірах, мають більш щільну консистенцію, внаслідок потовщення і ущільнення спеціальної піхвової оболонки і строми. Гістологічно в сім'яниках виявляють ділянки окремих каналців, в яких сперматогенні клітини і спермії знаходяться в міжканальцевих просторах, розширення і повнокрів'я міжканальцевих артерій. В багатьох каналцях відмічають розрідження фолікулярних клітин і сперматогоній. Протоки придатків мають різну величину, можуть мати місце дистрофічні зміни, відмирання і десквамацію епітелію в просвіт протоку. Волокниста сполучна тканина придатка потовщена, в стані різко вираженого набряку. В сім'явивідних каналцях придатка також відмічають дистрофічні зміни, відмирання і злушення епітеліальних клітин, місцями десквамацію кубічного епітелію з повним оголенням волокнисто-м'язового шару. Аналогічні зміни реєструють в придаткових статевих залозах.

При *хламідійній бронхопневмонії телят* у них, після загибелі, знаходять запалення верхівкової, серцевої та додаткової часток легень. Гістологічно виявляють бронхіт, бронхіоліт, перибронхіт і альвеоліти. При ускладненні бактеріальною інфекцією відмічають численні гнійні ураження. На ранній стадії хвороби відмічається картина серозного риніту, слизова оболонка носа при цьому помірно інфільтрована лимфо-гістоцитарними клітинами і лейкоцитами. В легенях знаходять дрібні осередки затвердіння, які частіше локалізуються у верхівках і серцевих частках, а також в тупих кряях діафрагмальних часток. Зміни у легенях можуть бути від бронхіту до інтерстиціальної пневмонії. Ексудативні явища в альвеолах виражені слабо. У телят, що утримуються у незадовільних зоогігієнічних умовах, запальний процес прогресує і охоплює усі частки легень. Крім цього у них значно пошкоджується миготливий епітелій, звужується просвіт бронхів клітинно-інфільтрованою набряковою оболонкою або закупорюється клітинно-

білковим детритом. Унаслідок цього зустрічаються обтураційні ателектази, застійний набряк у спалих легеневиx часточках. Після перехворювання телят ускладненою бронхопневмонією резорбтивно-відновлювальні процеси в пошкодженій легеневій тканині закінчуються значно пізніше клінічного видужання. Характер залишкових явищ у легенях залежить від терміну і давнини застосування лікувальних препаратів. У телят, що лікувалися антибіотиками, при гістологічних дослідженнях знаходять осередки потовщення і склеротичні зміни альвеолярних перетинок, хоча макроскопічні зміни у легенях не спостерігаються. Резорбтивно-відновлювальні процеси в легенях проходять краще у телят, для лікування яких застосовувались антибіотики тетрациклінового ряду. У тварин, лікування яких проводиться несвоєчасно і нерегулярно, в легенях залишаються застарілі осередки бронхопневмонії, інкапсульовані некрози і гнійники, а також перибронхіальні і параваскулярні склерози, бронхоектази, осередки карніферації і сполучнотканинні зрощення поміж легеневою і костальною плеврою.

Крім цього відмічають також осередки некрозів у печінці та проліферацію купферових клітин, гіперплазію ретикулярних клітин та гістоцитів у селезінці, а також катар тонкого відділу кишечника з інфільтрацією слизового шару лімфоїдними клітинами, дистрофічні зміни міокарду і нирок.

При *хламідійному енцефаломієліті ВРХ* патологоанатомічні зміни бувають досить широкими. Найбільш вираженими є запалення перитоніальної, плевральної та перикардіальної порожнин. На початку хвороби в указаних порожнинах знаходять серозний ексудат, а у більш пізні терміни (через 5-10 діб) серозні поверхні покриваються плівкою із фібринозного ексудату і можуть утворювати спайку із прилеглими органами. Селезінка і лімфовузли, як правило, збільшені. Часто реєструються пневмонії в окремих частках легень. Кровоносні судини мозкових оболонок і центральної нервової системи перенаповнені кров'ю. Вважається, що

ураження різних органів пов'язано з порушенням функції судин, причому ступінь ураження мозку є критичним моментом, який визначає загибель або видужання тварини.

Гістологічно на серозних оболонках в порожнинах тіла і багатьох внутрішніх органах виявляють запальні процеси. На серозних оболонках в перитоніальній, плевральній і перикардальній порожнинах відмічаються відкладення серозно-фібринозного ексудату з незначною кількістю лейкоцитів, розподілених поміж ниток фібрину. В печінці, нирках і селезінці іноді знаходять некротичні осередки. В сполучній тканині печінки, особливо навколо печінкових тріад, лімфоцити і одноядерні макрофаги скупчуються в осередки. В центральній нервовій системі в усіх ділянках головного і спинного мозку та у мозкових оболонках виявляють запальні зміни із явищами клітинної периваскулярної інфільтрації лімфоцитами.

При *хламідійному ентериті ВРХ та овець* можуть мати місце дрібні крововиливи в кишечнику, особливо у клубовій кишці, і в фундальній та пілоричній частині сичуга. Слизова оболонка сичуга набрякова, гіперемована. Часто реєструють фібринозний перитоніт на серозних оболонках харчотравного тракту та інших серозних поверхнях черевної порожнини. Також характерним для цього захворювання є злушення епітелію кишечника, кишкові ворсинки набувають булавоподібної форми, при гістологічних дослідженнях виявляють закупорку ліберкюнових залоз та їх інфільтрацію нейтрофільними лейкоцитами і одноядерними клітинами. Брижові лімфатичні вузли збільшені в об'ємі, набрякові, в синусах – крововиливи. Печінка з явищами тяжких дистрофічних змін, нерівномірно забарвлена, місцями із сірувато-жовтими плямами. Краплинні крововиливи виявляють також у тимусі, під капсулою селезінки, на епікарді і слизовій оболонці сечового міхура. У багатьох телят відмічаються ознаки зневоднення.

У телят, які загинули у більш дорослому віці, виявлені потовщення і складчатість слизової сичуга і тонкої кишки, катаральна, фібринозна або

гнійна бронхопневмонія, катарально-гнійний риніт, трахеїт; часто злипливий перикардит, плеврит, перитоніт, інтерстиціальний нефрит і міокардит. В суглобах виявляють ознаки серозного, серозно-фібринозного і іноді гнійного запалення. Нерідко вражаються і навколосуглобові сухожильні піхви і бурси (тендовагініти і бурсити). В мазках синовії хламідії виявляються в цитоплазмі синовіальних клітин і моноцитів.

Електронною мікроскопією було встановлено, що розмноження хламідій відбувається в кишкових епітеліоцитах, келихоподібних ентероцитах, ентерохромафіноцитах і макрофагах власної пластинки слизової оболонки. Характер і тяжкість ультраструктурних змін інфікованих клітин залежить від стадії розвитку в них збудника. Первинні зміни в клітинах виявляються лише в місцях локалізації хламідій. В проміжній стадії хламідійної інфекції відбувається дислокація клітинних органел, вакуолізація цитоплазми, зменшення числа рибосом і полісом. На пізній стадії інфекції, коли в клітинах з'являються елементарні тільця хламідій, настають тяжкі дистрофічні зміни клітин, які характеризуються зміною форми і розміру мікроворсинок, розбуханням мітохондрій, розширенням ендоплазматичного ретикулума, втратою рибосом і розрідженням цитоплазми. Після розриву і лізису плазмолемі хламідії потрапляють у вміст.

При *хламідійному поліартриті телят і ягнят* незважаючи на однотипність патологоанатомічних змін при розтині тварин, ступінь ураження залежить від характеру перебігу хвороби. В *гострих* випадках встановлюють гіперемію і набряковість мускулатури в ділянці суглобів з осередками крововиливів, розм'якшення і набряк сухожиль, ерозії на суглобових поверхнях хряща. Сухожильні піхви містять темно-жовтий ексудат.

При *хронічному перебігові* виражено потовщення колінних, зап'ястних та інших суглобів. Зміни в тканинах характеризуються як проліферативний фібринозний артрит і периостит. У суглобах – надлишок синовіальної рідини, іноді водянистої. На суглобових поверхнях відмічають світло-жовті

плями різних розмірів і форми, а у ряді випадків – слабовиражені ерозії в хрящі. Іноді відмічаються потовщення і гіперемія навколосуглобових зв'язок. Тканини просякнуті фібринозним ексудатом. У найбільш уражених суглобах виявляють бляшки фібрину, які щільно прилягають до синовіальних оболонок. До змін, що зустрічаються не так регулярно, слід віднести набряк, крововиливи, гіперемію мозкових оболонок, нирок, печінки, серця і легень. Окрім того, у телят відмічена гіперплазія селезінки і лімфовузлів. Слизова оболонка у різних відділах кишкового тракту катарально запалена і гіперемована.

Гістологічні зміни при хламідійному поліартриті ягнят виявляють в сухожиллях, сухожильних піхвах, суглобових капсулах, навколосуглобових тканинах і мускулатурі. Суглобові капсули і сухожильні піхви мають виражені фібринозні потовщення запального характеру з великою кількістю плазматичних клітин, моноцитів, лімфоцитів, макрофагів і нейтрофілів. Субсиновіальна сполучна тканина набрякова і містить значну кількість осередків моноклональних клітин. У сухожильних піхвах відмічають осередки проліферації фібробластоподібних клітин.

Зразки синовії, забарвлені за Романовським-Гімзою, містять синовіальні клітини, моноцити, лімфоцити, поліморфноядерні лейкоцити, ядерний детрит і фібрин. На ранній стадії розвитку хвороби синовіальні клітини і клітини білої крові містять хламідійні включення. У місцях, що прилягають до сухожиль, виявляють скупчення запальних клітинних елементів поміж м'язовими волокнами, гіперемію і крововиливи. Уражені сухожилля і сухожильні піхви містять набрякову рідину інфільтровану клітинами білої крові. Ці зміни указують на тендовагініт. В паренхіматозних органах, як правило, реєструють запально-реактивні процеси. Мозкові оболонки, серце, печінка, нирки і лімфатичні вузли гіперемовані, набрякові та інфільтровані клітинними елементами. В гістопрепаратах легень спостерігається васкулярна перибронхіальна інфільтрація.

Патологоанатомічні зміни у свиней також залежать від форми перебігу та локалізації хламідій в організмі. При генітальній формі встановлено, що у абортіваних свиноматок зміни локалізуються у матці. Спостерігаються гіперемія і набряк ендометрію, невеликі, діаметром 1-1,5 см, ділянки некрозу. У 50 % хворих свиноматок на слизовій оболонці рогів матки спостерігаються кістозно-розширені залози величиною з горошину і кістозне переродження яєчників. При мікроскопічному дослідженні в слизовій оболонці статевих шляхів знаходять рясну лімфоїдно-гістіоцитарну, плазмоклітинну і нейтрофільну інфільтрацію.

У абортіваних плодів і поросят, що загинули в перші 24 години після опоросу, відмічається набряк підшкірної сполучної тканини в області голови, грудей, лопатки; у підшкірній сполучній тканині в області грудей – драглистий інфільтрат; у тім'яній частині голови і кінцівках – дифузні крововиливи. Макроскопічно печінка кровонаповнена, можливі крововиливи і гематоми з виходом крові у черевну порожнину. Мікроскопічно виявляються ділянки зернистої дистрофії гепатоцитів, різке кровонаповнення судин, периваскулярні лімфоїдно-клітинні інфільтрати. Архітектоніка печінкових балок порушена, виявляються вогнища некрозу і некробіозу. Селезінка без видимих змін, в окремих випадках капсула її напружена, рідше спостерігаються інфаркти. Мікроскопічно – малюнок тканини стертий, повнокров'я з ділянками некрозу, некробіозу або жирової дистрофії.

При розтині поросят, що загинули в перші години життя, в більшості випадків спостерігаються зміни в легенях. На початковій стадії хвороби знаходять потовщення міжальвеолярної лімфоїдно-гістіоцитарної тканини в результаті інфільтрації, скупчення вказаних клітин навколо кровоносних судин, бронхів і бронхіол і невеликі вогнища пневмонії. У зв'язку з активізацією вторинної бактерійної інфекції зміни в легенях нерідко прогресують, що характеризуються катарально-гнійною бронхопневмонією, абсцесами і некротичними вогнищами. Ці зміни важко піддаються зворотному розвитку. У багатьох тварин, що перенесли хламідіоз, протягом

тривалого часу зберігаються постпневмонічні явища – синехії між частками, рубцюваті стягнення та інші склеротичні зміни, а також клітинно-інфільтративні процеси у сполучній основі органу. Нирки кровонаповнені, під капсулою крапкові крововиливи. Мікроскопічно – множинні крововиливи.

У кнурів відмічають характерні зміни в статевих органах: у окремих тварин змінюються колір і консистенція тестікулів, пахові лімфатичні вузли збільшені в 1,5-2 рази; сім'япроводи геморагічно запалені; у випадках повного або часткового парафімозу виражений некроз тіла статевого члена. Мікроскопічно в тестисах відмічається виражене кровонаповнення з ектазією судин. У центральних відділах каналців клітин і їх ядра різної величини з помірним вмістом хроматину, багато клітин в стані мітозу. У центрі окремих каналців некротичні маси. Передміхурова залоза складається з часточок різноманітної форми і величини, багато з яких кістозно розширені, заповнені еозин-забарвленим вмістом, в якому розташовані зрушені клітини залозистого епітелію. У залозистих ходах багато слизу. Спостерігається повнокров'я з ектазією судин. Строма розпушена за рахунок набряку. Статевий член сильно кровонаповнений, виражена ектазія судин. Тканини печеристого тіла розширені, заповнені фібрином й еритроцитами. Навколо уретри велика кількість сегментоядерних лейкоцитів. Епітелій уретри некротизований по всій її довжині.

При ентеритній формі у поросят знаходять набряк підшкірної клітковини в ділянці підщелепового простору, промежини, грудних і тазових кінцівок, інколи крововиливи. В порожнинах тіла нерідко відмічають скупчення ексудату солом'яного кольору; в легенях – набряк та повнокров'я судин; в шлунку та тонкому кишечнику – серозно-слизове катаральне запалення, а слизова товстого кишечника в стадії драглистого набряку. Печінка і нирки повнокровні, під капсулою нирок крапкові крововиливи.

У к о н е й патологоанатомічні зміни також різняться в залежності від форми перебігу хламідіозу.

При абортах у кобил зрідка відмічають катаральний ендометрит та цервіт. При цьому мікроскопічно в слизовій матки виявляють гістоцитарну і плазмоцитарну інфільтрацію та метаплазію епітелію.

В аборт-плодах спостерігається анемічність слизових оболонок, скупчення ексудату янтарного кольору (інколи з домішками крові) в грудній та черевній порожнинах, краплинні крововиливи на слизових кон'юнктиви, ротової порожнини, глотки, трахеї і на перикарді, збільшення селезінки та печінки.

У жеребців можуть мати місце зміни в сім'яниках, уретрі та припуцті. Макроскопічні зміни відмічаються досить рідко. Гістологічно реєструють руйнування окремих каналців сім'яників, розширення, кровонаповнення та структурні зміни стінок їх кровоносних судин.

У трупах лошаг загинулих від хламідіозу, що перебігав у респіраторній формі, відмічають запалення верхівки або серцево-діафрагмальних часток легень. При артритній формі мають місце потовщення колінних і зап'ястних суглобів, надлишок синовію водянистої консистенції.

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА

Для лабораторної діагностики хламідіозів тварин застосовують різні методи відповідно до «Настанови із лабораторної діагностики хламідійних інфекцій сільськогосподарських тварин», затвердженої Державним департаментом ветеринарної медицини Міністерства АПК України 20 грудня 2006 року.

Лабораторні дослідження на хламідійні інфекції тварин включають:

- виявлення специфічних антитіл у сироватці крові хворих і перехворілих тварин чи встановлення приросту антитіл при дослідженні парних сироваток з інтервалом 2-4 тижні в реакції зв'язування комплементу (РЗК), реакції тривалого зв'язування комплементу (РТЗК), реакції непрямого зв'язування комплементу (РНЗК), реакції гемаглютинації (РГА) і непрямой гемаглютинації (РНГА) або імуноферментним аналізом (ІФА);
- виявлення антигену хламідій в патологічному матеріалі за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА), реакції імунофлуоресценції (РІФ);
- виявлення хламідій та хламідофіл у патологічному матеріалі методом світлової мікроскопії;
- виділення ДНК збудника хламідіозу у клінічному та патологічному матеріалах методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР);
- ізоляція хламідій на курячих ембріонах, лабораторних тваринах, культурах клітин із наступною ідентифікацією методами світлової мікроскопії, в реакції імунофлуоресценції, ІФА, ПЛР.

Робота зі збудником хламідіозу тварин допускається у лабораторіях, які мають умови для роботи із збудниками 2-4 групи патогенності; дослідження проводять у окремому боксі або окремій кімнаті з настільним боксом.

Робота зі збудником хламідіозу також може проводитись у ПЛР-лабораторії із попередньо інактивованим матеріалом, прогрітим при 70-80°C протягом 10 хв, або залитим 0,5 % розчином фенолу; чи гуанідінізотіоціонатом у концентрації 5,3 М/дм³ або 5 % робочим розчином реагенту «Chelex-100».

Відбір і доставка матеріалів для лабораторних досліджень

У лабораторію для дослідження на хламідійну інфекцію від загиблих або забитих з діагностичною метою тварин направляють шматочки легень, паренхіматозних органів, лімфатичні вузли, передню частину спинного і головний мозок, яєчники самок та сім'яники самців. При ознаках артрити від тварин відбирають синовій. Від тварин, що абортували, – ділянки плаценти із геморагічними інфільтратами, вагінально-маточний секрет. Дрібні аборт-плоди направляють цілими, а від великих відбирають головний мозок та шматочки паренхіматозних органів. Від плідників відбирають зразки еякуляту або замороженої сперми.

Для ретроспективної діагностики та імунологічних методів відбирають сироватки крові у кількості 2-3 см³, а для діагностики молекулярно-генетичними методами епітеліальні зіскрібки зі слизових оболонок кон'юнктиви, вагін самиць та препуцію або прямої кишки самців.

Патологічний матеріал відбирають не пізніше 2 годин після загибелі чи забою тварини у стерильні флакони, металеві або поліетиленові контейнери, поліетиленові пакети, які герметично закриваються.

Упакований матеріал поміщають у термос із льодом і не пізніше, ніж через 24 години доставляють у лабораторію, дотримуючись заходів, що виключають поширення збудника.

Відібраний патологічний матеріал можна поміщати у флакони з транспортним середовищем, яке забезпечує життєздатність хламідій та

хламідофіл впродовж 30 діб при кімнатній температурі і 34 доби при + 4 °С. Рекомендований склад живильного середовища для збудників хламідіозу є таким: сахароза – 71,6 г/дм³; α-глутамінова кислота – 0,724 г/дм³; фетальна сироватка великої рогатої худоби – 10 %/об.; ванкоміцин і стрептоміцин – по 10 мкг/см³; гентаміцин і ністатин по 50 мкг/см³. Також можна використовувати середовище 199, до якого додають 3 % фетальної сироватки великої рогатої худоби або сахарозо-фосфатний буферний розчин із вмістом 5-10 % тієї ж сироватки, у яке входять стрептоміцин – 100-200 мкг/см³, канаміцин – 100 мкг/см³ і ністатин – 25 мкг/см³. Інша комбінація антибіотиків може бути такою: гентаміцин – 20 мкг/ см³, ністатин – 25 мкг/см³, ванкоміцин – 100 мкг/см³. РН указаних середовищ доводять до 7,0-7,1.

Для відбору епітеліальних зіскрібків слід застосовувати спеціальні одноразові стерильні урогенітальні мультizonди «Medscand Medical», «Акцелон», «DNC Med» тощо.

У самиць зіскрібки відбираються шляхом введення мультizonду (у корів, телиць, свиноматок, свинок та овець на глибину 8-11 см) у вагіну з наступним виведенням його назовні енергійними спіральними рухами (рис. 3).

У самців зіскрібки відбираються з головки статевого члена так, щоб захопити мультizonдом безпосередньо отвір сечостатевого каналу, або зі слизових оболонок препуцію, прямої кишки.

Після взяття зіскрібка мультizonд поміщають в одноразову поліпропіленову пробірку типу «Eppendorf» місткістю 1,5 см³, яка містить 100 мкл фізіологічного розчину, інтенсивно перемішують, а пробірку з приготуванням таким чином зразком ретельно закривають, маркують і доставляють у лабораторію.

Кров від хворих та підозрюваних у захворюванні тварин для серологічних досліджень відбирають дворазово (у перші дні хвороби і повторно через 2-3 тижні). Сироватки крові доставляють у лабораторію не

пізніше 20-24 год. з моменту відбору зразків. Сироватку обережно зливають у центрифужні пробірки і освітлюють центрифугуванням при 2000 об./хв впродовж 15-20 хв для осідання еритроцитів.

Ретроспективна діагностика

Ретроспективна діагностика хламідіозу базується на основі серологічних досліджень та виявлення наростання титру специфічних комплементзв'язуючих антитіл у сироватці крові хворих чи перехворілих тварин. Вищезгадану діагностику проводять за допомогою різних серологічних реакцій: зв'язування комплементу (РЗК) та її модифікацій – реакції непрямого зв'язування комплементу (РНЗК) і реакції тривалого зв'язування комплементу (РТЗК), реакції імунофлуоресценції (РІФ) Також застосовуються реакції гемаглютинації (РГА) і непрямой гемаглютинації (РНГА).

Наростання титру хламідійних антитіл в парних сироватках у 2-4 рази від попереднього рівня, установлене в РЗК (РТЗК) або РІФ (РНІФ), має діагностичне значення, а виявлення антитіл лише у одному зразку сироватки, навіть у титрі 1:10 і більше, вказує на ймовірність протікання хламідійної інфекції або на слідову реакцію, пов'язану із захворюванням в минулому.

Реакція зв'язування комплементу (РЗК)

В основі реакції лежить зв'язування комплементу специфічним комплексом «антиген-антитіло» (перша фаза реакції). Створення цього зв'язку перевіряється в другій фазі реакції шляхом додавання до комплексу сенсibiliзованих еритроцитів барана. Еритроцити піддаються гемолізу тільки в тому разі, якщо комплемент не буде зв'язаний в першій фазі реакції. Відсутність гемолізу означає, що в першій фазі реакції відбулося зв'язування комплементу комплексом антиген-антитіло.

При постановці РЗК використовують:

- комплементзв'язуючий групоспецифічний хламідійний антиген;

- контрольний антиген;
- хламідійну (позитивну) і контрольну (негативну) сироватки;
- комплемент (ліофілізовану, свіжу або консервовану сироватку крові морських свинок);
- гемолізін (стандартну сироватку крові кролів, імунізованих еритроцитами барана);
- досліджувані сироватки;
- 2,5 % суспензію еритроцитів барана.

Усі компоненти реакції розводять 0,85 % (фізіологічним розчином) NaCl, приготовленим на дистильованій воді з рН 7,0-7,2, за день або в день постановки досліду. Перед застосуванням фізрозчин кип'ятять протягом 5 хв і охолоджують.

При постановці реакції необхідне точне дозування компонентів, що досягається їх титруванням. Гемолізін титрують при одержанні нової серії або при підозрі на зниження її титру, але не рідше, ніж один раз у квартал .

Титрування гемолізіну. Гемолізін може бути консервований і неконсервований. Якщо гемолізін консервований гліцерином (у співвідношенні 1:1), то при виготовленні основного розведення 1:100 беруть 0,2 см³ гемолізіну (де 0,1 см³ гліцерину) і 9,8 см³ фізіологічного розчину, а якщо неконсервований – 0,1 см³ гемолізіну + 9,9 см³ фізіологічного розчину. Для титрування гемолізіну беруть штатив з двома рядами пробірок і готують розведення за схемою (табл. 1).

Із кожного готового розведення гемолізіну по 0,2 см³ переносять у відповідну пробірку другого ряду.

Для РЗК на хламідіоз гемолізін використовують в подвоєному титрі, тобто, якщо в нашому прикладі титр 1:1500, в реакцію треба брати 1:750.

Таблиця 1. Титрування гемолізіну

Компоненти	Номери пробірок							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Гемолізін (см ³), розведення 1:100	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Фізіологічний розчин	0,4	0,9	1,4	1,9	2,4	2,9	3,4	3,9
Одержане розведення гемолізіну	1:500	1:1000	1:1500	1:2000	1:2500	1:3000	1:3500	1:4000
Розведений гемолізін	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплемент 1:20	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Еритроцити барана 1:40	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Фізіологічний розчин	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяна баня 37-38°C 10 хвилин								
Результати	ПГ	ПГ	ПГ титр	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ЗГ

Примітка: ПГ – повний гемоліз;
 ЧГ – частковий гемоліз;
 ЗГ – затримка гемолізу.

Приготування гемолітичної системи. Еритроцити барана відмивають фізіологічним розчином шляхом центрифугування при 2500-3000 об./хв протягом 10-15 хв до повної прозорості надосадової рідини.

Змішують в рівних об'ємах 2,5 % суспензію еритроцитів барана (2,5 см³ осаду відмитих еритроцитів на 97,5 мл фізіологічного розчину) і гемолітичну сироватку в робочому розведенні, при чому завжди виливають гемолізін у суспензію еритроцитів, після чого поміщають в термостат при 37-38°C на 20-30 хвилин для сенсibiliзації.

Під час роботи гемолітичну систему зберігають при кімнатній температурі або в холодильнику при 4-6°C. Перед постановкою головного досліду РЗК кожного разу титрують комплемент.

Титрування комплементу. Сухий комплемент розчиняють фізіологічним розчином до початкового об'єму, вказаного на етикетці, і готують основне розведення 1:20 (0,5 см³ комплементу + 9,5 см³ фізіологічного розчину).

Титрування комплементу починають з дози 0,02 см³ до 0,2 см³ з інтервалом по 0,02 см³. Для цього в додатковий ряд пробірок вносять комплемент (розведений 1:20) в дозах 0,2; 0,4; 0,6 і т.д. до 2,0 см³ і додають в кожен пробірку (недостатню до 2,0 см³) кількість фізіологічного розчину, тобто 1,8; 1,6; 1,4 і т.д. Після чого із додаткового ряду комплемент переносять по 0,2 см³ в основний ряд пробірок. В усі пробірки розливають по 0,4 см³ фізіологічного розчину і по 0,4 см³ гемолітичної системи, струшують і ставлять на водяну баню на 30 хв при температурі 37-38 °С (табл. 2).

Таблиця 2. Схема розведення і титрування комплементу
для РЗК, РТЗК

Компоненти, см ³	Доза комплементу									
	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
Додатковий ряд пробірок										
Комплемент у розведенні 1:20	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
Фізіологічний розчин	1,8	1,6	1,4	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	—
Основний ряд пробірок										
Комплемент у відповідній дозі	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Фізіологічний розчин	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Гемолітична система	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяна баня 30 хвилин при 37-38°С										
Прикладний результат	++++	++++	++++	++	—	—	—	—	—	—

Титром (одиницею) комплементу вважають найменшу його дозу, яка дає повний гемоліз еритроцитів.

На прикладі, приведеному в таблиці 2, титр комплементу, розведеного 1:20, дорівнює 0,1 см³; подвоєний титр і буде його робочою дозою (0,2 см³).

Розрахунок кількості чистого комплементу, необхідного для постановки головного дослідження, роблять за формулою:

$$\frac{A \times B}{C} = x, \text{ де}$$

A – робоча доза комплементу;

B – кількість пробірок в реакції;

C – основне розведення комплементу.

Приклад:
$$\frac{0,2 \times 100}{20} = 1,0$$

Кількість розведеного комплементу, яка потрібна для всієї реакції (в даному випадку 100 пробірок), дорівнює 20 см³ (0,2×100), тому до 1,0 см³ чистого комплементу необхідно додати 19,0 см³ фізіологічного розчину.

Головний дослід РЗК.

Досліджувані сироватки крові досліджуються із специфічним антигеном в розведенні 1:5; 1:10 (доза сироватки 0,04, 0,02 см³), з контрольним антигеном (на специфічність) і без антигену (на антикомплементаційність) в розведенні 1:5. Досліджувані і контрольні сироватки інактивують в день постановки реакції в розведеному вигляді при температурі 59-63°C (в залежності від виду тварин) протягом 30 хвилин.

Інкубацію проводять у водяній бані 90 хвилин при 37-38°C.

Контролі головного дослідження РЗК і РТЗК:

1) хламідійна (позитивна) сироватка до її максимального титру (вказаному на етикетці), починаючи з розведення 1:5, із специфічним антигеном;

2) хламідійна (позитивна) сироватка в розведенні 1:5 з контрольним антигеном;

3) негативна (контрольна) сироватка в розведенні 1:5 і 1:10 із специфічним антигеном і в розведенні 1:5 з контрольним антигеном;

4) антиген специфічний і контрольний в подвійній дозі на антикомплементарність (комплемент+);

5) антиген специфічний і контрольний в подвійній дозі на гемотоксичність (комплемент–);

6) контроль гемолітичної системи на самовільний гемоліз.

Схема постановки головного дослідження РЗК і РТЗК та облік результатів представлені в таблиці 3.

Таблиця 3. Схема головного досліду РЗК і РТЗК

Компонент	Досліджувана сироватка			Контролі										
				Позитивний			Негативний			Антиген специфічний		Антиген контрольний		Гемолітична система
	1:5, 1:10	1:5 КА	1:5 БА	1:5 до граничного титру	1:15 КА	1:5 БА	1:5, 1:10	1:5 КА	1:5 БА					
										Антико мплемен тарність	Гемоток сичність	Антико мплемен тарність	Гемоток сичність	Гемоток сичність
Негативна сироватка							0,2	0,2	0,2					
Позитивна сироватка				0,2	0,2	0,2								
Досліджувана сироватка	0,2	0,2	0,2											
Фізіологічний розчин			0,2			0,2			0,2		0,2		0,2	0,6
Антиген контрольний		0,2			0,2			0,2				0,4	0,4	
Антиген специфічний	0,2	–	–	0,2	–	–	0,2	–	–	0,4	0,4			
Комплемент	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2		0,2		
Водяна баня 90 хвилин при 37-38°C (за схемою РЗК) або 16-18 год при 2-6°C (за схемою РТЗК)														
Гемсистема	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяна баня 30 хвилин при 37-38°C														
Результати	++++	–	–	++++	–	–	–	–	–	–	++++	–	++++	++++

Облік результатів в РЗК проводять двічі:

- перший раз – відразу після водяної бані;
- другий раз – після осідання еритроцитів на дно пробірки (через 3-4 год. після бані) або в наступний день після зберігання в холодильнику (4°C).

Відсоток гемолізу виражають у хрестах:

чотири хрести (++++) – відсутність гемолізу, надосадова рідина прозора і безколірна;

три хрести (++++) – гемоліз 25% еритроцитів;

два хрести (++) – гемоліз 50% еритроцитів;

один хрест (+) – гемоліз 75% еритроцитів;

мінус (–) – повний гемоліз, осад відсутній, рідина інтенсивно зафарбована гемоглобіном.

Позитивною вважають реакцію при затримці гемолізу еритроцитів на +++++, ++++ або ++ хрести в розведенні 1:10.

Сумнівною – при затримці гемолізу еритроцитів на + хрест в розведенні сироватки 1:10 і від + до +++++ хрестів в розведенні 1:5.

Негативною – при повному гемолізі еритроцитів в розведеннях 1:5 і 1:10.

Тварин, в сироватках крові яких одержані сумнівні результати, досліджують повторно в терміни, встановлені діючою інструкцією, а тварин, які дали двічі сумнівну реакцію, вважають позитивно реагуючими.

Постановка РЗК мікрометодом

Перед постановкою реакції сироватку крові інактивують у водяній бані протягом 30 хвилин при температурі 58-60°C. Потім готують двократне розведення сироваток, починаючи з 1:5.

Титрування гемолізіну проводять таким чином: із гемолізіну готують ряд розведень від 1:1000 до 1:10000. В лунки планшету для мікротитрування (U-подібної форми) вносять 50 мкл фізіологічного розчину, по 25 мкл

розведень гемолізіну, по 25 мкл розчину комплементу 1:10 і по 25 мкл 2 % суспензії еритроцитів барана. Результати враховують через 20 хвилин інкубації при температурі 37-38°C. В роботі використовують дві одиниці гемолізіну.

Титрування комплементу проводять таким чином: розчин комплементу 1:10 вносять у пробірки по 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 і 0,7 см³. Вказану кількість комплементу доводять фізіологічним розчином до об'єму 1,0 см³. Після цього у лунки планшету для мікротитрування вносять по 50 мкл фізіологічного розчину, додають по 25 мкл різних розведень комплементу і по 50 мкл гемолітичної системи (суміші подвоєного гемолізіну і 2 % еритроцитів, інкубованої протягом 20 хв при кімнатній температурі). Схему розведення і титрування комплементу приведено у таблиці 4.

Таблиця 4. Схема титрування комплементу

Компоненти	1	2	3	4	5	6	7
Додатковий ряд розведення комплементу							
Комплемент 1:10	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
Фізіологічний розчин	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3
Розведення комплементу	1:100	1:50	1:33,33	1:25	1:20	1:16,66	1:14,28
Титрація комплементу							
Фізіологічний розчин	50	50	50	50	50	50	50
Комплемент у розведенні від 1:100 до 1:14,28	25	25	25	25	25	25	25
Гемсистема	50	50	50	50	50	50	50
Термостат 37-38°C 30 хвилин							
Результати	++++	++++	++	— титр комплементу	— робочий титр	—	—

Суміш інкубують у термостаті протягом 30 хв при температурі 37-38°C, враховують реакцію. За титр комплементу приймають найбільше його розведення, яке дає повний гемоліз еритроцитів. В основному досліді використовують півтори дози комплементу.

Проведення дослідження.

В розведенні 1:5 вносять по 25 мкл сироватки у дві перші лунки двох рядів планшетів для мікротитрування і готують розведення від 1:10 до 1:160 на фізіологічному розчині. Для цього в лунки, починаючи з другої, вносять по 25 мкл фізіологічного розчину і роблять перекатку. Для контролю готують аналогічні розведення специфічної і негативної сироваток.

В один ряд лунок додають по 25 мкл специфічного антигену в робочому розведенні, в другий – по 25 мкл контрольного антигену або фізіологічного розчину. Потім у кожную лунку додають комплемент у робочому розведенні.

Планшети витримують у термостаті протягом 1 години при температурі 37-38°C. Потім у кожную лунку вносять по 50 мкл гемолітичної системи і витримують у термостаті 30 хв при температурі 37-38°C (табл. 5).

Обробка результатів.

Позитивною вважають реакцію при затримці гемолізу еритроцитів на +++++, +++ або ++ хрести в розведенні 1:10.

Сумнівною – при затримці гемолізу еритроцитів на + хрест в розведенні сироватки 1:10 і від + до +++++ хрестів в розведенні 1:5.

Негативною – при повному гемолізі еритроцитів в розведеннях 1:5 і 1:10.

Тварин, в сироватках крові яких одержані сумнівні результати, досліджують повторно в терміни, встановлені діючою інструкцією, а тварин, які дали двічі сумнівну реакцію, вважають позитивно реагуючими.

Таблиця 5. Схема постановки РЗК мікрометодом

Компонент	Негативний контроль			Позитивний контроль			Досліджувана сироватка			контроль			
	1:5	1:10	1:10 БА	1:5	1:10- 1:160	1:10 БА	1:5	1:10- 1:160	1:10 БА	Комплемент + антиген	комплемент	антиген	гемсистема
Негативна сироватка	25	25	25										
Позитивна сироватка				25	25	25							
Досліджувана сироватка							25	25	25				
Фізіологічний розчин			25			25			25		50	50	75
Антиген	25	25		25	25		25	25		25		25	
Комплемент	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25		
Термостат 37-38°C 60 хвилин													
Гемсистема	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Термостат 37-38°C 30 хвилин													
Результати	—	—	—	++++	++++	—	++++	++++	—	—	—	++++	++++

Реакція тривалого зв'язування комплементу (РТЗК)

Першу фазу РТЗК проводять в холодильнику при температурі 2-6°C протягом 16-18 годин, другу – на водяній бані 30 хвилин при температурі 37-38°C.

Гемолітичну систему одержують шляхом змішування рівних об'ємів гемолізину в потрібному титрі і 2,5 % суспензії еритроцитів барана. Суміш сенсibilізують при температурі 37-38°C протягом 30 хвилин.

Комплемент титрують так, як при постановці РЗК в гемолітичній системі (таблиця 2).

Головний дослід РТЗК.

У перший день розливають компоненти для головного дослід. Для цього інактивовані досліджувані сироватки розливають по 0,2 см³ в чотири пробірки: в першу, другу, третю сироватки в розведенні 1:5, в четверту – розведення сироватки 1:10. Після того в першу пробірку наливають 0,2 см³ фізіологічного розчину для контролю сироватки на антикомплементаРНість, в другу – 0,2 см³ контрольного антигену в робочому розведенні (контроль на специфічність), в третю, четверту – специфічний антиген в робочому титрі по 0,2 см³. В усі пробірки, які задіяні в досліді, заливають комплемент в подвійній дозі і штативи поміщають в холодильник.

Контролі головного дослід РТЗК такі ж, як при постановці РЗК.

На наступний день штативи з першою фазою реакції виймають з холодильника і після 20-30-хвилин при кімнатній температурі (18-22°C) у всі пробірки розливають гемолітичну систему в дозі 0,4 см³. Схема головного дослід реакції тривалого зв'язування комплементу наведена в таблиці 3.

Реакція непрямого зв'язування комплементу (РНЗК)

Суть цієї реакції полягає в тому, що сироватки деяких ссавців, зокрема свиней, на початку захворювання містять «неповні (блокуючі) антитіла», що при утворенні специфічного комплексу «антиген-антитіло» не зв'язують або не поглинають комплемент і тому вони не можуть бути виявлені методами

РЗК чи РТЗК.

Для виявлення таких антитіл у реакцію вводять додатковий компонент у вигляді позитивної сироватки, що містить повні антитіла проти збудника хламідійних інфекцій (умовно-індикаторна сироватка).

При наявності в досліджуваній сироватці неповних антитіл їх взаємодія із антигеном відбувається без участі комплементу, який, залишившись вільним, забезпечує гемоліз еритроцитів в гемолітичній системі (реакція позитивна). Якщо досліджувана сироватка не містить неповних антитіл, то антиген з'єднується із антитілами введеної позитивної (індикаторної) сироватки, утворюючи комплекс «антиген-антитіло-комплемент», в результаті гемоліз еритроцитів не відбудеться (негативна реакція).

В РНЗК використовуються такі ж компоненти, що і в РЗК, і хід постановки реакції (до головного досліду) проводиться так само, за винятком того, що на всіх підготовчих етапах реакція проводиться в об'ємі $1,2 \text{ см}^3$. Комплемент титрується в гемолітичній системі в об'ємі $1,2 \text{ см}^3$ і використовується в подвійній дозі. До $1,2 \text{ см}^3$ об'єм реакції доводиться на кожному етапі додаванням $0,2 \text{ см}^3$ фізіологічного розчину.

Титром (одиницею) комплементу вважають найменшу його дозу, яка дає повний гемоліз еритроцитів.

На прикладі, приведеному в таблиці 6, титр комплементу, розведеного 1:20, дорівнює $0,1 \text{ см}^3$, подвоєний титр і буде його робочою дозою (0,2).

Головний дослід РНЗК проводиться в три етапи. Сироватки досліджують у розведенні 1:5 і 1:10 зі специфічним антигеном і 1:5 із контрольним антигеном і без антигену. На першому етапі інкубують досліджувані сироватки зі специфічним антигеном у дозах по $0,2 \text{ см}^3$ впродовж 90 хв при $t \text{ } 37\text{-}38^\circ\text{C}$. На другому етапі в реакцію вводять додатково позитивну (індикаторну) сироватку (можна використовувати позитивну сироватку з набору для РЗК), розведену фізіологічним розчином до граничного титру, по $0,2 \text{ см}^3$, і одночасно в усі пробірки розливають комплемент по $0,2 \text{ см}^3$ у робочому розведенні згідно з результатами його

титрування.

Суміш (досліджувана сироватка, антиген, позитивна індикаторна сироватка і комплемент) інкубують впродовж 90 хв при t 37-38°C. На третьому етапі додають гемолітичну систему по 0,4 см³ і реакцію витримують 30 хв у водяній бані при 37-38°C.

Таблиця 6. Схема розведення і титрування комплементу

Компоненти, см ³	Доза комплементу									
	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
Додатковий ряд пробірок										
Комплемент у розведенні 1:20	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
Фізіологічний розчин	1,8	1,6	1,4	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	—
Основний ряд пробірок										
Комплемент у відповідній дозі	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Фізіологічний розчин	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Гемолітична система	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяна баня 30 хвилин при 37-38°C										
Прикладний результат	++++	++++	++++	++	—	—	—	—	—	—

Схеми головного дослідження РНЗК і обліку результатів наведені у таблицях 7 і 8.

Контролі головного дослідження РНЗК.

1. Специфічна хламідійна сироватка до її максимального титру (вказаному на етикетці), починаючи з розведення 1:5, із специфічним антигеном і додаванням по 0,2 см³ індикаторної сироватки;

2. Специфічна хламідійна сироватка до її максимального титру (вказаному на етикетці), починаючи з розведення 1:5, із специфічним антигеном і додаванням по 0,2 см³ фізіологічного розчину;

3. Специфічна хламідійна сироватка в розведенні 1:5 з контрольним антигеном;

4. Негативна (контрольна) сироватка в розведенні 1:5 і 1:10 із специфічним антигеном і додаванням по 0,2 см³ індикаторної сироватки;

5. Негативна (контрольна) сироватка в розведенні 1:5 і 1:10 із контрольним антигеном і додаванням по 0,2 см³ фізіологічного розчину;

6. Антиген специфічний і контрольний в подвійній дозі на антикомплементаРНість (комплементаРНість +);

7. Антиген специфічний і контрольний в подвійній дозі на гемотоксичність (комплементаРНість –);

8. Контроль гемолітичної системи на самовільний гемоліз.

Схема постановки головного досліду РЗК і РТЗК і облік результатів представлені в таблиці 3.

Облік результатів в РНЗК проводять через 60 хв після виймання штативів.

Таблиця 7. Схема постановки головного досліду РНЗК

Компоненти реакції	Досліджувана сироватка				Контролі												
	1:5	1:10	1:5 КА	1:5 БА	Негативний				Позитивний				Антиген специфічний		Антиген контрольний		Гемолітична система
					1:5	1:5, 1:10	1:5 КА	1:5 БА	1:5	1:5, 1:10 до оранж. титру	1:5 КА	1:5 БА	Антикомплє- ментарність	Гемотоксичність	Антикомплє- ментарність	Гемотоксичність	
Негативна сироватка					0,2	0,2	0,2	0,2									
Позитивна сироватка									0,2	0,2	0,2	0,2					
Досліджувана сироватка	0,2	0,2	0,2	0,2													
Фізіологічний розчин				0,2				0,2	0,2			0,2	0,2	0,4	0,2	0,4	0,8
Контрольний антиген			0,2		0,2		0,2				0,2				0,4	0,4	
Специфічний антиген	0,2	0,2			0,2	0,2			0,2	0,2			0,4	0,4			
Водяна баня 90 хвилин при 37-38°C																	
Комплємент у робочому розведенні	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—	0,2	—	—
Специфічна сироватка (індикаторна)	0,2	0,2	0,2	0,2	—	0,2	0,2	0,2	—	0,2	0,2	0,2	—	—	—	—	—
Водяна баня 90 хвилин при 37-38°C																	
Гемолітична система	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяна баня 90 хвилин при 37-38°C																	

Таблиця 8. Схема обліку результатів головного дослідження РНЗК

Сироватка	Розведення сироваток				Контролі		Гемолітична система	Результат
	1:5	1:5	1:5	1:10	антиген контрольний, 2 дози	антиген специфічний, 2 дози		
	без антигену	антиген контрольний	антиген специфічний					
Досліджувана № 1	—	—	—	—				позитивний
Досліджувана № 2	—	—	++++	++++				негативний
Специфічна	—	—	—	—	(і до граничного титру)			позитивний
Нормальна	—	—	++++	++++				негативний
Специфічна (без додавання індикаторної сироватки)	—	—	++++	++++	(і до граничного титру)			позитивний
Негативна (без додавання індикаторної сироватки)	—	—	—	—				негативний
Контролі на анти-комплементарність					—	—		
Контролі на гемотоксичність					++++	++++	++++	

Для з'ясування об'єктивної ознаки у визначенні результатів РЗК, РТЗК і РНЗК рекомендується здійснювати оцінку у відсотках гемолізу. Для цього із реакції відбирають п'ять пробірок з повним гемолізом і рідину із них зливають у одну пробірку. У цій рідині буде 100 % гемолізу. Із неї готують розведення з меншим відсотком гемолізу за наступною схемою (табл. 9).

Таблиця 9. Приготування розведень з меншим відсотком гемолізу

Компоненти	Номер пробірки								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Гемолізована рідина, см ³	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
Фізіологічний розчин, см ³	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Відсоток гемолізу	10	20	30	40	50	60	70	80	90

«Стандартні» пробірки готують перед обліком реакції. Ступінь гемолізу у пробірках із досліджуваними сироватками визначають шляхом їх

порівняння зі ступенем гемолізу у «стандартних» пробірках і відсоток гемолізу виражають у хрестах.

Ступінь затримки виражена хрестами і відповідно наступним відсоткам гемолізу еритроцитів:

чотири хрести (++++)	–	гемоліз еритроцитів	від 0 до 10
три хрести (++++)	–	гемоліз еритроцитів	від 10 до 40
два хрести (++)	–	гемоліз еритроцитів	від 40 до 70
один хрест (+)	–	гемоліз еритроцитів	від 70 до 90
мінус (–)	–	гемоліз еритроцитів	від 60 до 100

Реакція непрямой гемаглютинації (РНГА)

Реакція непрямой (пасивної) гемаглютинації – це високоспецифічна імунологічна реакція. Вона більш чутлива, ніж РЗК. Реакція ґрунтується на тому, що еритроцити тварин після обробки таніновою кислотою набувають властивості адсорбувати на своїй поверхні:

а) білкові молекули антигенів, з наступним аглютинуванням специфічними сироватками;

б) молекули сироваткових білків (антитіла), з наступним аглютинуванням при взаємодії з гомологічними антигенами.

Для проведення РНГА використовують такі матеріали і обладнання (згідно з методикою ВНИВИ, Казань):

- плексиглазові планшети з лунками U-подібної форми;
- одно- і багатоканальні піпетки зі змінними наконечниками на 20-50 мкл;
- буферний фізіологічний розчин рН 7,2 (БФР), який містить 1 % інактивованої сироватки крові коня (для одержання БФР рН 7,2 змішують 760 см³ 0,15 М розчину Na₂HPO₄·12H₂O (53,3 г солі до 100 см³ дистильованої води) і 240 см³ 0,15 М розчину KH₂HPO₄ (20,25 г солі до 1000 см³ дистильованої води); до 1000 см³ фізіологічного

розчину додають 200 см³ одержаного буферу, рН розчину контролюють на рН-метрі і при необхідності коректують шляхом додавання натрієвої чи калієвої солі (якщо рН нижче 7,2, то добавляють розчин натрієвої солі, а якщо рН вище 7,2, то добавляють розчин калієвої солі). До 99 см³ БФР рН 7,2 додають 1 см³ інактивованої конячої сироватки, розчин фільтрують і використовують для постановки РНГА.

Постановка РНГА.

Досліджувані і контрольні сироватки розводять 1:5 фізіологічним розчином та інактивують протягом 30 хвилин при 56-58°C.

В усі лунки планшету багатоканальною піпеткою вносять по 50 мкл БФР, після чого у перші лунки рядів вносять сироватки в розведенні 1:5 по 50 мкл і розводять 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120. Контролі: готують аналогічні розведення специфічної і негативної сироватки.

У всі лунки планшета за допомогою багатоканальної піпетки вносять по 20 мкл суспензії хламідійного еритроцитарного антигена і після змішування суміш сироватки і антигена залишають на 1-1,5 години при кімнатній температурі.

Результати реакції оцінюють візуально після осідання еритроцитів в контрольній лунці ряду у вигляді гудзика.

Реакція вважається позитивною, якщо еритроцити аглютинуються і утворюють на дні лунки осад у вигляді «парасольки».

Реакція вважається негативною, якщо еритроцити випадають в осад у вигляді «гудзика».

Діагностичним титром досліджуваної сироватки є розведення 1:10 і вище.

Імунологічні методи діагностики

Імунологічні методи діагностики хламідіозу засновані на

комплементарній взаємодії специфічного антигену (АГ) із антитілом (АТ) з наступним виявленням продукту цієї взаємодії флюорохромом або за допомогою кольорової біохімічної реакції. Цими методами виявляють у досліджуваному матеріалі (сироватка крові, ліквор, синовія, сеча, мокрота, зіскрібки зі слизових оболонок клоаки та кон'юнктиви) родоспецифічний (груповий) антиген або специфічні хламідійні антитіла – імуноглобуліни різних класів (А, М, G). Як діагностикум у першому випадку використовують хламідійні антитіла, а у другому – хламідійні антигени. На сьогодні найбільш розповсюдженими імунологічними методами для діагностики хламідіозу є імуноферментний аналіз (ІФА) і реакція імунофлюоресценції (РІФ).

Імуноферментний аналіз (ІФА)

Суть ІФА полягає у специфічній взаємодії антитіл і антигену із наступним приєднанням до отриманого комплексу антивидового імуноглобуліну, міченого ферментом, здатним викликати розкладання субстрату з утворенням кольорового продукту ферментативної реакції.

Чутливість цього методу при його застосуванні для діагностики захворювань, викликаних хламідіями або хламідіофілами, коливається у межах від 44 до 100 % в залежності від форми перебігу захворювання. Специфічність ІФА досягає 90 %. Недоліки імуноферментних тест-систем – специфічність і чутливість можуть варіювати в залежності від тест-системи.

ІФА зручний для скринінгових досліджень, оскільки можлива приборна і об'єктивна реєстрація результатів аналізу. Разом з тим, хоча специфічність ІФА за даними багатьох авторів досягає 90 %, можливе одержання як хибнонегативних, так і хибнопозитивних результатів. Якщо діагностикум кон'югований із пероксидазою, можна отримати значну кількість хибнопозитивних результатів, оскільки багато мікроорганізмів і клітини макроорганізма мають власні пероксидазні системи. Саме через це метод повсюдно відхилено при виявленні антигенів, але залишається провідним для серологічних досліджень. Хламідії мають відносно низьку

антигенну активність, внаслідок чого утворення і накопичення антитіл до них у організмі хворих тварин відбувається у малих кількостях. Тому, як і при застосуванні серологічних методів діагностики, кров повинна відбиратись у період загострення хвороби. Таким чином, постановка діагнозу на хламідіоз за одиничним аналізом можлива лише при наявності високого титру хламідійних антитіл, а також при наявності антитіл, переважно Ig класу М (показник первинної імунної відповіді).

Найбільш коректно використовувати визначення рівня хламідійних антитіл в динаміці, оскільки це дозволяє оцінювати перебіг захворювання і ефективність терапії, що проводиться. Для цього досліджують парні сироватки крові. Інтерпретацію одержаних результатів проводять з урахуванням характеру перебігу (гострий, хронічний) хламідійного процесу, а також періоду його перебігу (загострення, реконвалесценція) (табл. 10).

Таблиця 10. Інтерпретація одержаних результатів виявлення антитіл до антигенів хламідій за методом ІФА

Класи антитіл		Інтерпретація результатів дослідження
IgG	IgA	
—	—	Негативний результат або чутливість даної тест системи нижче детекційного рівня антитіл. У підозрілих випадках необхідно повторити через 2-3 тижні відбір матеріалу (сироватки) і протестувати паралельно з першим
+	+ або —	Свідчить про перенесену або латентну інфекцію
±*	±	Неможливість детекції наявності або відсутності рівня антитіл класу G і A до хламідій. Необхідно повторити дослідження нового зразка сироватки через 14-21 добу, а також порівняти рівень антитіл у парних сироватках. У випадках одержання повторного ± результату його розцінюють як негативний
+	+	Указує на гостру або загострення хронічної інфекції
—	+	Свідчить про наявність гострого або підгострого перебігу хвороби

±* – «сіра зона»

Чотирикратне і вище збільшення титру антитіл свідчить про загострення або прогресування захворювання. Зниження титру АТ в процесі

лікування свідчить про адекватність та ефективність терапії що застосовується. Хламідійні антитіла класу IgG можуть зберігатись в організмі після вилікування до 1 року і більше. Діагностична цінність ІФА у лабораторній діагностиці хламідійних інфекцій, за даними різних авторів, складає 50-70 %.

Для діагностики хламідіозу тварин за методом ІФА використовується значна кількість тест-систем, зокрема, «KIT CHLAMYDIA PS», «ХЛАМИ-ДС-R-IgG», «BioRad», тощо.

Загальні правила постановки імуноферментного аналізу:

1. ІФА – високочутливий тест. Для отримання об'єктивних результатів дуже важливо дотримуватись акуратності і чистоти;
2. Кон'югат реагує із субстратом у дуже малих (слідових) концентраціях. Тому необхідно виключати можливість будь-якої контамінації цих реагентів, а також використовувати хімічно чистий (ХЧ) лабораторний посуд.
3. Не можна використовувати один і той же посуд для приготування кон'югату і хромогену (субстрату).
4. Всі компоненти реакції необхідно вносити в центр лунки мікропланшету, щоб попередити потрапляння реагентів на поверхню планшету або навколо лунок.
5. Не можна допускати піноутворення під час внесення компонентів або промивання планшету.
6. Розчини реагентів слід готувати у необхідному об'ємі (на 1,2 плашки). Решту зберігати згідно з настановою до тест-системи.
7. Перед початком роботи усі компоненти набору необхідно довести до кімнатної температури (20-25 °C) протягом 30 хв. Інкують планшети у спеціальному термостаті, попередньо закривши їх кришками. При використанні звичайного термостату планшети слід вносити у вологу камеру або пластиковий пакет та тримати на одному рівні з метою однакового

нагрівання в усіх лунках (нерівномірне нагрівання може спричинити крайовий ефект).

8. Не можна допускати висихання вмістимого лунок після відмивання перед внесенням реагентів.

9. Для внесення реагентів та розливу сироваток необхідно використовувати одноразові наконечники.

10. Рекомендується після миття провести споліскування лабораторного посуду і пробірок 1-2 % розчином соляної кислоти, після чого промити декілька раз дистильованою водою. Бажано використовувати в роботі одноразовий посуд.

11. Під час зберігання планшет слід використовувати сикатив (компонент, призначений для поглинання вологи).

12. Не можна використовувати тест-системи з вичерпаним терміном придатності.

13. Не можна проводити ІФА у присутності агресивних випарів (кислот, лугів, альдегідів) або пилу, які можуть впливати на активність кон'югату.

14. Ферментативна реакція надзвичайно чутлива до впливу металів та їх іонів. Відповідно, ніякі металеві предмети не повинні контактувати із розчинами кон'югату або субстрату.

15. Розчин хромогену в субстратному буфері повинен бути безбарвним. Поява забарвлення відразу після приготування свідчить про те, що розчин не придатний для використання. У такому випадку готується свіжий розчин. Готувати даний розчин бажано в одноразовому пластиковому контейнері. Розчин хромогену необхідно захищати від світла!

16. Відмивання лунок є важливим етапом виконання ІФА. Необхідно дотримуватись рекомендованої кількості циклів промивання, заповнювати лунки та повністю їх звільняти. Помилки, допущені при промиванні, можуть призвести до хибних результатів.

17.Перед постановкою реакції слід уважно ознайомитись з настановою до набору діагностикумів, оскільки у тест-систем різних виробників можуть відрізнятись параметри інкубації, як за температурою, так і за часом.

18.Надзвичайно важливе значення має світлофільтр на імуноферментному аналізаторі. У кожній настанові до тест-системи указано, який світлофільтр потрібно встановити.

19.Перед розведенням компонентів треба вираховувати необхідний об'єм для тієї кількості зразків, які досліджуються.

20.Зберігати компоненти у розведеному вигляді слід виключно за рекомендаціями виробника!

21.Результати реакції є достовірними, якщо середнє значення оптичної щільності нормальної контрольної сироватки і позитивних контрольних сироваток знаходяться у межах показників, вказаних у настанові.

22.Розведення сироватки, яке рекомендоване для дослідження методом ІФА, залежить від кількості антигену, який сорбований на планшеті. Така концентрація є оптимальною, тому указане в настанові до тест-системи розведення повинне бути незмінним.

23.Не можна використовувати компоненти наборів різних фірм-виробників, так само, як використовувати набори іншої фірми, якщо використовується програмне забезпечення.

У даному посібнику не приводиться методика проведення ІФА, оскільки кожна тест-система має свої окремі особливості і підлягає регулярному удосконаленню. Тому при постановці ІФА слід використовувати інструкцію до тієї тест системи, яка буде застосовуватися у кожному конкретному випадку.

Виявлення хламідій та хламідofil методом реакції імунофлуоресценції (РІФ)

Цей метод може застосовуватись в прямій і непрямій модифікаціях. Пряма імунофлуоресценція (ПІФ) передбачає використання флуоресціюючої

хламідійної антисироватки, а метод непрямой імунофлуоресценції (НІФ) – імунну нефлуоресціюючу хламідійну сироватку з титром антитіл не менше 1:64-1:128 і відповідної антивидової флуоресціюючої сироватки, як правило, промислового виробництва.

Для дослідження методами ПІФ і НІФ із надісланого патологічного матеріалу мікроскопічних досліджень готують мазки-відбитки з тканин головного чи спинного мозку, легень, селезінки, печінки, нирок, яєчників чи сім'яників, лімфатичних вузлів.

Готуючи мазки-відбитки органи нарізають невеликими шматочками так, щоб розріз при наявності патологічних змін проходив на межі здорової і ураженої тканин, просушують їх на фільтрувальному папері і прикладають до знежиреного предметного скла так, щоб одержати тонкі відбитки. Приготовлений таким чином мазок висушують на повітрі і фіксують у 96 % етанолі впродовж 5 хв або наносять на мазок 2-3 краплини ацетону до повного його випаровування. Для приготування препарату бажано використовувати предметні скельця із лунками.

Скло із фіксованим препаратом може зберігатись при t 18-20°C протягом 5 діб.

Мазки зі слизових оболонок статевих органів чи кон'юнктиви готують безпосередньо після взяття зіскрібка, використовуючи одноразовий зонд, який має щіточку із спеціального синтетичного волокна з підвищеною адсорбцією типу «Medscand Medical», «Акцелон», «DNC Med» тощо. Матеріал відбирають коловими рухами і переносять на лунку предметного скла.

Прямий імунофлуоресцентний метод (ПІФ)

Для розведення реагентів і промивки препаратів використовують фосфатно-сольовий буферний розчин (ФСБР, рН 7,2). ФСБР готують послідовним розчиненням 6,8 г NaCl; 0,63 г KH_2PO_4 і 1,48 г Na_2HPO_4 у 1 дм^3 дистильованої води.

Техніка постановки: фіксований і промитий ФСБР препарат підсушують на повітрі і наносять на нього за допомогою мікропіпетки 30 мкл фарбуючої суміші, яка складається із флуоресціюючої хламідійної антисироватки і бичачого альбуміну, міченого родаміном, взятого у рівних об'ємах в подвоєних робочих розведеннях (наприклад, при робочому розведенні 1:64 використовують розведення реагенту 1:37). За допомогою наконечника піпетки або запаяної пастерівської піпетки рівномірно розподіляють реагент по усій поверхні лунки із матеріалом. Препарати інкубують у вологій камері (у чашці Петрі) при $t\ 37\pm0,5\ ^\circ\text{C}$ впродовж 30 хв, періодично перевіряючи їх стан і запобігаючи висиханню реагенту на препараті, що може спричинити хибнопозитивні результати, тому препарати, які висохли, бракуються. Після закінчення інкубації предметні стекла промивають ФСБР тричі по 5-10 хв і підсушують на повітрі. На препарат наносять нефлюоресціююче імерсійне масло і проглядають у люмінісцентному мікроскопі при комбінації світлофільтрів СЗ 24-3, ФС 1-2, БС 8-3, БСВ-2, СЗС-7-2 з використанням окуляру $\times 10$ і об'єктиву $\times 90$. Препарат рекомендується проглядати відразу ж після приготування. Змонтовані препарати можуть зберігатись при $t\ 2-8\ ^\circ\text{C}$ не більше 24 год.

Результат вважається позитивним, якщо у препараті виявляють розміщені позаклітинно яскраво-зелені або жовто-зелені округлої форми з рівними краями розміром близько 300 нм (приблизно 1/100 від епітеліальних клітин) елементарні тільця, що світяться на оранжевому тлі. Іноді спостерігаються ретикулярні тільця, розміри яких у 2-3 рази більші елементарних. Внутрішньоклітинні включення виявляються не більш, ніж у 10 % випадків.

Негативним результат вважається, якщо в препараті відсутнє специфічне яскраво-зелене або жовто-зелене світіння при наявності червоних епітеліальних клітин. Для того, щоб негативний діагноз можна було вважати достовірним, рекомендується проглядати все поле мазка не менше 5 хвилин.

Будь-який флюоресціюючий об'єкт неправильної форми або іншого кольору, а також маючий неяскраве зелене забарвлення, розглядається як артефакт.

У якості негативного контролю проводять мікроскопію мазків, приготовлених із завідомо негативних матеріалів, специфічне яскраво-зелене або жовто-зелене світіння при наявності червоних епітеліальних клітин повинно бути відсутнім.

Непрямий імунофлуоресцентний метод (НІФ). На фіксований препарат наносять 30 мкл нефлуоресціюючої хламідійної сироватки кроля, морської свинки, вівці, тощо, з титром антитіл не менше 1:64-1:128 (попередньо титр антитіл визначають в РЗК або РІФ). Препарат інкубують у вологій камері протягом 30-40 хв при $t\ 37\pm0,5\ ^\circ\text{C}$. Сироватку зливають і промивають препарат ФСБР тричі по 5-10 хв. Після підсушування на повітрі на мазок наносять суміш антивидової флуоресціюючої хламідійної сироватки (відповідно проти глобулінів кроля, морської свинки, вівці, тощо) і бичачого альбуміну, міченого родаміном в рівних об'ємах і в подвійних робочих розведеннях. Препарат знову вміщують у вологу камеру при $t\ 37\pm0,5\ ^\circ\text{C}$ на 30-40 хв, і після промивання і висушування досліджують за допомогою люмінісцентного мікроскопу так, як і при ПІФ.

Для контролю на інший препарат наносять контрольну негативну сироватку, інкубують у вологій камері і забарвлюють флуоресціюючою антивидовою сироваткою.

При наявності у препаратах антигену хламідій чи хламідофіл виявляють специфічне світіння у вигляді жовто-зелених гранул округлої і овальної форми на тьмяному зеленувато-сірому тлі. У контрольному препараті специфічне світіння повинно бути відсутнім.

Мікроскопічне виявлення у мазках та мазках-відбитках скупчень всередині клітин або позаклітинно морфологічно однорідних елементарних тілець округлої або овальної форми і забарвлених за Стемпом і Макіавелло в яскраво-червоний, за Романовським-Гімзою – у темно-фіолетовий, при

люмінісцентному методі – в зелений колір або які світяться у ППФ яскраво-зеленим чи жовто-зеленим і жовто-зеленим у НПФ світінням (рис. 4), величиною 200-400 нм, дає підставу підозрювати у господарстві наявність хламідійної інфекції.

Морфологічні методи виявлення збудника хламідіозу

Для виявлення хламідій за допомогою світлової мікроскопії, як і для реакції імунофлуоресценції, із надісланого патологічного матеріалу для мікроскопічних досліджень готують мазки-відбитки з тканин головного чи спинного мозку, легень, селезінки, печінки, нирок, яєчників чи сім'яників, лімфатичних вузлів.

Приготовані мазки-відбитки висушують на повітрі, фіксують їх над полум'ям спиртівки, забарвлюють і досліджують отримані препарати під імерсійною системою мікроскопу у збільшенні 90×7.

Виготовлені препарати фарбують за Стемпом, Маккіавелло або Романовським-Гімзою.

Забарвлення за методом Стемпа. Для цього використовують карболовий фуксин Циля за таким прописом: 1 г основного фуксину розчиняють у 10 см³ етилового спирту і 5 г карболової кислоти – у 100 см³ дистильованої води. Потім обидва розчини змішують і фільтрують через 5 шарів фільтрувального паперу. Цей розчин використовують як маточний. Він може зберігатись довгий час.

Техніка забарвлення: після фіксації тонких мазків-відбитків над полум'ям спиртівки впродовж 1-2 хв на предметне скло наносять карбол-фуксин в розведенні маточного розчину 1:5 на дистильованій воді, або фосфатно-буферному розчині з рН 7,4; після 15-хвилинної експозиції препарати промивають дистильованою водою; для диференціації наносять 0,05 % розчин сірчаної кислоти і після експозиції знову промивають

дистилятом; наносять малахітовий зелений у розведенні 1:100 і, після півхвилинної експозиції, промивають дистильованою водою та підсушують одержані препарати фільтрувальним папером.

При мікроскопії таких препаратів виявляють, що хламідії чи хламідофіли забарвлюються у яскраво-червоний колір, ядра клітин – в темно-синій на зеленуватому тлі (рис. 5).

Забарвлення за методом Маккіавелло. Готують розчини А, Б, С такого складу: розчин А – 250 мг фуксину основного розчиняють у 100 см³ бідистильованої води (цей розчин може зберігатись протягом 10 діб при t 4°C); розчин Б – 10 г лимонної кислоти розчиняють у 100 см³ бідистильованої води; розчин С – 1 г метиленового синього розчиняють у 100 см³ бідистильованої води.

Техніка забарвлення: мазки-відбитки фіксують над полум'ям і покривають фільтрувальним папером, через який наливають розчин А, попередньо відфільтрований через фільтрувальний папір. Забарвлюють впродовж 5-10 хв, промивають дистильованою водою і 20-30 с диференціюють у робочому розчині Б, який складається із 5 см³ розчину Б і 100 мл бідистильованої води. Препарати промивають проточною водою і дофарбовують розчином С впродовж 30 с, знову промивають водою і висушують на повітрі.

При мікроскопії таких препаратів виявляють, що хламідії чи хламідофіли забарвлюються у яскраво-червоний колір, клітини – у світло-синій, ядра клітин – в темно-синій або фіолетовий на синьому тлі.

Забарвлення за методом Романовського-Гімзи. Даний метод застосовується для виявлення внутрішньоклітинного розташування збудника і дає непогані результати при використанні якісного барвника Романовського-Гімзи, розведеного на нейтральній дистильованій воді або фосфатному буфері.

Техніка забарвлення: висушені на повітрі мазки-відбитки фіксують метиловим спиртом протягом 1 хв або спирт-ефіром (у рівних пропорціях)

впродовж 15-20 хв, промивають дистильованою водою, висушують фільтрувальним папером і забарвлюють азур-еозином наступним чином: на мазки-відбитки наносять барвник Романовського-Гімзи в розведенні 1:5 із таким розрахунком, щоб він покрив весь мазок. Через 1,5-2 години промивають дистильованою водою із нейтральним рН (6,8-7,0). Пофарбовані та висушені на повітрі препарати проглядають під імерсійною системою мікроскопу.

При мікроскопії таких препаратів виявляють, що хламідії або хламідіофіли забарвлюються у червоно-фіолетовий колір і локалізуються у цитоплазмі епітеліальних клітин колоніями або поодинокі, в залежності від стадії розвитку збудника. Вони часто виявляються біля ядра, нерідко зміщуючи його на периферію клітини, мають різноманітну правильну або неправильну сферичну форму, відрізняючись за кольором і внутрішньою структурою від ядра і цитоплазми. Дрібні, ранні включення з середнім діаметром від 200 до 400 нм мають темно-фіолетовий колір, а великі «зрілі» цитоплазматичні включення містять переважно дрібні зернисті структури, колір яких може варіюватись від рожевого до синьо-фіолетового. Часто на ранній стадії розвитку хламідії розташовуються в особливій вакуолі.

Молекулярно-генетичні методи

З розвитком молекулярної генетики останнім часом усе ширше в лабораторну практику, як гуманної так і ветеринарної медицини, впроваджуються методи індикації ДНК інфекційних агентів і збудників хламідіозу, зокрема. До таких, в першу чергу, слід віднести методи, основані на виявленні в досліджуваних зразках клінічного чи патологічного специфічних нуклеотидних послідовностей геному збудника. Найбільший інтерес серед цих методів викликає полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), основа якої полягає в багаторазовому повторенні циклів подвоєння (ампліфікації) специфічної ділянки нуклеотидної послідовності.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Оскільки ПЛР у лабораторній практиці ветеринарної медицини почала застосовуватись зовсім недавно і багато фахівців ветеринарної медицини практично необізнані в цьому питанні – вважаємо за необхідне більш детально описати цей метод.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) була розроблена Керрі Мюллісом у 1983 році, за що автору у 1995 році було присуджено Нобелівську премію. Розробці ПЛР-методу передували видатні відкриття в галузі молекулярної біології: по-перше, у 1971 році Клеппе із співавторами виклав основні принципи використання коротких, штучно синтезованих молекул ДНК (праймерів); по-друге, з'явилися прилади, що дозволяють автоматично синтезувати одноланцюгові фрагменти ДНК; і нарешті, був виявлений унікальний мікроорганізм – термостабільна бактерія *Thermus aquaticus*, ферментативна система якої не інактивується після тривалої інкубації при 95°C.

Принцип методу. Метод ПЛР оснований на принципі природної реплікації ДНК, що включає: розплетення подвійної спіралі ДНК, обмеження шуканого фрагменту ДНК і комплементарну добудову обох ланцюгів. У реакції беруть участь штучно синтезовані олігонуклеотиди, що повторюють будову ділянки гена, дезоксинуклеозидтрифосфати, які є будівельним матеріалом для створення обмеженого праймерами фрагменту і фермент Таq-полімераза, за допомогою якого відбувається відтворення специфічного фрагменту ДНК. Новосинтезовані фрагменти ДНК служать матрицею для синтезу нових ланцюгів у наступному циклі ампліфікації – це і є ланцюгова реакція. При цьому число сегментів ДНК, обмежених з обох кінців праймерами, з кожним циклом ПЛР збільшується експоненціально (наближається до залежності 2^n , де n – число циклів). Таким чином, якщо у зразку була лише одна дволанцюгова молекула ДНК, то за 30-40 циклів ампліфікації накопичується близько 10^8 копій молекул амплікону. Такої

кількості цілком достатньо для візуальної детекції цього фрагменту методом електрофорезу в агарозному або поліакріламідному гелі.

Контакт із досліджуваним матеріалом відбувається при його попередній обробці та виділенні ДНК. Тому на цих етапах суворо дотримуватись правил техніки безпеки, виробничої санітарії, протиепізоотичного режиму і особистої гігієни.

Застережені заходи. Робота повинна проводитись в окремих приміщеннях, укомплектованих необхідним устаткуванням, окремими комплектами автоматичних мікропіпеток зі змінними наконечниками, комплектом одноразових пробірок, наконечників і рукавичок та змінним лабораторним одягом.

Відбір та попередня обробка досліджуваних зразків. Зразки біологічного матеріалу від тварин для дослідження на хламідіоз за методом ПЛР слід відбирати з урахуванням місць локалізації збудника в організмі. Досліджуваними зразками для прижиттєвої діагностики можуть бути: епітеліальні зіскрібки зі слизових оболонок статевих органів, прямої кишки, кон'юнктиви; зразки сперми, синовії і фекалій. Зразками від абортплодів, загиблих та забитих тварин слугують біоптати тканин головного мозку, легень, селезінки, печінки та нирок. Також для дослідження використовуються шматочки плаценти та навколоплідні води.

Для відбору зіскрібків з слизових оболонок слід застосовувати виключно спеціальні одноразові урогенітальні мультизонди. Пробірки типу «Errendorf» місткістю 1,5 см³ зі 100 мкл фізіологічного розчину, у який струсили відібраний зіскрібок, маркують і направляють до ПЛР-лабораторії для виділення ДНК.

Зразки сперми, суглобової та навколоплідної рідин необхідно відцентрифугувати при 8-12 тис. об/хв протягом 1 хв. Надосадову рідину використовують для виділення ДНК.

Зразки фекалій відбирають безпосередньо з прямої кишки одноразовим пластиковим шпателем і поміщають у пробірку типу «Errendorf» місткістю

1,5 см³, яка містить 0,5 см³ фізіологічного розчину, і центрифугують при 2-2,5 тис. об/хв протягом 10 хвилин. Супернатант використовують для виділення ДНК.

Із зразків біоптатів (шматочки головного мозку, легень, селезінки, печінки, нирок, статевих залоз, лімфовузлів або плаценти) необхідно приготувати 10-20 % суспензії на стерильному фізіологічному розчині шляхом розтирання в стерильних хімічно чистих порцелянових ступках із стерильними піском або подрібненим склом і наступним центрифугуванням при 1,5 тис. об/хв протягом 25-30 хв. Супернатант використовується для виділення ДНК.

Для проведення ПЛР-аналізу необхідні такі матеріали і устаткування:

ЗОНА 1 (1 етап) – виділення ДНК із досліджуваного матеріалу:

- настільний або стаціонарний бокс із бактерицидною лампою (рис. 6);
- термостат на 25-100°C (рис. 7);
- мікроцентрифуга до 8-12 тис. об/хв (рис. 8);
- центрифуга/вортекс (рис. 9);
- окремий набір автоматичних мікропіпеток змінного об'єму (рис. 10);
- одноразові наконечники із аерозольним бар'єром;
- одноразові поліпропіленові пробірки типу «Eppendorf» об'ємом 0,5 і 1,5 см³.

ЗОНА 2 (2 етап) – постановка ПЛР (ампліфікація):

- програмований термостат (ампліфікатор, термоциклер) (рис. 11);
- настільний бокс або окремий стіл із бактерицидною лампою (рис. 6);
- окремий набір автоматичних мікропіпеток перемінного об'єму (рис. 10);
- одноразові наконечники;
- одноразові поліпропіленові пробірки типу «Eppendorf» об'ємом 0,2 або 0,5 см³;
- штативи для пробірок типу «Eppendorf» об'ємом, відповідно, 0,2 або 0,5 см³;
- термостат на 95°C (рис. 7);

- холодильник на 2-8°C або морозильник на мінус 20 °C для зразків ДНК.
- ЗОНА 3 (3 етап) – електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації:
- камера для горизонтального електрофорезу (рис. 12);
- джерело постійного струму з напругою 150-200 В;
- УФ-трансілюмінатор для проглядання гелів (рис. 13);
- фото- або web-камера для фотографування гелів;
- аквадистилятор;
- окрема автоматична піпетка на 10-40 мкл з одноразовими наконечниками;
- мірний циліндр на 1 дм³;
- колба конічна з термостійкого скла для плавлення агарози;
- електроплитка чи інше джерело тепла для плавлення агарози;
- ванночка для розчину бромистого етідію;
- ємність для дезактивації буфера і гелів, що містять бромистий етідій.

Виділення ДНК із клінічного зразка можна здійснювати різними методами. Застосування того чи іншого методу залежить від об'єкту дослідження, але сам метод повинен відповідати певним умовам, а саме нуклеїнова кислота має бути достатньо очищена від білків та інгібіторів термостабільної ДНК-полімерази, і водночас, зберігати нативність. При будь-якому методі виділення ДНК першим етапом є лізис клітин. Для цього використовують наступні підходи: осмотичний шок (H₂O), ферментативний (лізоцим), хімічний (луг-SDS, Triton X-100). Для деяких методів наступним етапом є деградація білків за допомогою ферментів (Протеїназа К, Проназа), або хімічних реагентів (гуанідінізотіоціонат, дітіотрейтол, β-меркаптоетанол). Для очищення досліджуваного матеріалу від білків однаково успішно застосовують фенольну, або сольову депротеїнізацію. Інший метод полягає в очищенні зразку від протеїнів і сполук, що містять метали шляхом кип'ятіння в присутності реагенту «Chelex-100», або зв'язуванням нуклеїнових кислот із сорбентом. Оскільки для вибору оптимального способу виділення ДНК слід враховувати такі критерії, як простота

методики, необхідний для проведення маніпуляцій час, відтворюваність та собівартість, рекомендованими для діагностичних досліджень хламідійних інфекцій за методом ПЛР є метод виділення ДНК за допомогою деградації білків гуанідінізотіоціонатом з наступним зв'язуванням нуклеїнових кислот із сорбентом та метод за допомогою реагенту «Chelex-100». Ці методи є стандартизованими в Україні.

Виділення ДНК із біологічних зразків за допомогою гуанідінізотіоціонату.

Для цього готують такі реагенти:

Розчин для лізису: в колбу об'ємом 50 см³ вносять 22 см³ 0,2 М розчину ЕДТА, рН 8,0 та додають 2,6 г «Тритону Х-100». Обережно перемішують до повного розчинення «Тритону Х-100».

Суспензія сорбенту: в колбу об'ємом 1000 см³ вносять наважку 60 г SiO₂, додають 500 см³ дистильованої води, залишають на 24 години при кімнатній температурі. Видаляють 440 см³ надосадової рідини та додають 500 см³ деіонізованої води, ретельно перемішують і залишають на 5 годин при кімнатній температурі. Видаляють 440 см³ надосадової рідини та додають 0,6 см³ 32 % соляної кислоти. Суспензія повинна мати рН 2,0.

Розчин для відмивки: 120 г гуанідінізотіоціонату розчиняють в 100 см³ 0,1 М тріс-НСІ буферу, рН 6,8.

Буфер для елюації: 0,1 мМ тріс-НСІ; 1 мМ ЕДТА, рН 8,0.

Методика виділення. У одноразові поліпропіленові пробірки типу «Eppendorf» об'ємом 1,5 см³, які містять досліджувані зразки, вносять 300 мкл розчину для лізису і 10 мкл суспензії сорбенту (суспензію сорбенту перед використанням ретельно перемішують).

Далі отриману суміш інкубують 15 хв при кімнатній температурі, декілька разів перемішуючи на вортексі або струшуванням і центрифугують 1 хв при 8-12 тис. об/хв. Надосадову рідину видаляють.

До осаду додають 100 мкл розчину для відмивання, вміст пробірки перемішують на вортексі або струшуванням і центрифугують 1 хв при 8-12 тис. об/хв. Надосадову рідину видаляють.

До осаду сорбенту додають 100 мкл 70 % розчину етанолу, вміст пробірки перемішують на вортексі або струшуванням і центрифугують 1 хв при 8-12 тис. об/хв. Надосадову рідину видаляють. Процедуру повторюють двічі.

Пробірки з незакритими кришками підсушують 5 хв при 50-55°C. (Пересушування осаду може призвести до незворотного зв'язування ДНК з сорбентом).

У пробірки із підсушеним сорбентом додають 50 мкл буферу для елюації, перемішують на вортексі або струшуванням та інкубують 5 хв при 50-55 °C.

Пробірки центрифугують 1 хв при 8-12 тис. об/хв. Надосадову рідину переносять у чисті поліпропіленові пробірки типу «Eppendorf». Для ампліфікації використовують 5 мкл розчину, що містить ДНК. Розчину виділеної ДНК достатньо для проведення 10-30 ампліфікацій. Зразки можуть зберігатись при мінус 4°C протягом тижня, а при мінус 20°C впродовж 6 місяців.

Виділення ДНК із біологічних зразків за допомогою реагенту "Chelex-100".

Для цього готують 5 % робочий розчин «Chelex-100»:

У мірну колбу об'ємом 100 см³ вносять 5 г «Chelex-100» і додають дистильованої води до об'єму 100 см³.

У одноразові поліпропіленові пробірки типу «Eppendorf» об'ємом 1,5 см³ вносять 1000 мкл стерильної дистильованої води.

У пробірки додають біологічний зразок об'ємом не більше 200 мкл. Суміш інкубують 15 хв при кімнатній температурі.

Пробірки центрифугують 1 хв при 8 тис. об/хв. Обережно видаляють надосадову рідину, залишивши близько 20 мкл рідини над осадом. Це повторюють декілька разів до повного знебарвлення осаду.

У пробірки додають 180 мкл 5 % стерильного водяного розчину «Chelex-100» та інкубують 15 хв при 56°C.

Вміст пробірки перемішують на вортексі або струшуванням та витримують 8 хв на водяній бані при 100°C.

Вміст пробірки перемішують на вортексі або струшуванням, центрифугують 1 хв при 8 тис. об/хв. Для ампліфікації використовують 5 мкл надосадової рідини, яка містить ДНК. Розчину виділеної ДНК достатньо для проведення 20-100 ампліфікацій. Зберігають зразки при мінус 20°C впродовж 6 місяців., після кожного розморожування зразки інтенсивно перемішують та центрифугують впродовж 5 хв при 6 тис. об/хв.

Вищезазначені методи виділення ДНК можуть застосовуватись із певними модифікаціями, а також можуть мати місце інші методи, реагенти та настанови для яких є складовими тест-систем, що використовуються у кожному конкретному випадку.

Проведення полімеразної ланцюгової реакції (ампліфікація).

Для постановки ПЛР використовують набори реагентів, які включають: ПЛР-буфер, суміш чотирьох дезоксинуклеозидтрифосфатів (дНТФ), пари специфічних праймерів, фермент *Taq*-полімерази, мінеральне масло, деіонізовану воду, контрольну ДНК, що копіюється. Нижче приведені короткі описи деяких компонентів ПЛР (рис. 14).

Праймери – короткі, довжиною 20-30 основ, одноланцюгові ДНК (дезоксиолігонуклеотиди), комплементарні ДНК-матриці, що копіюється. Праймери синтезують відповідно консервативним ділянкам ДНК інфекційних збудників, які рідко піддаються генетичним перебудовам, за принципом комплементарності. При застосуванні ПЛР для індикації ДНК хламідій і хламідofil найчастіше праймери підбирають на ділянки генів, що кодують 16 та 23S рибосомальної РНК та основний білок зовнішньої

мембрани – MOMP (Major Outer Membrane Protein) який називають також OMP-1 чи OMP-A і білок зовнішньої мембрани OMP-2, або на ділянку плазмідної ДНК.

Фермент Taq-полімераза, термостабільний фермент, приєднуючись до 3'-кінців праймерів, добудовує їх за принципом комплементарності.

Суміш дезоксинуклеозидтрифосфатів (дНТФ) – дезоксиаденозінтрифосфат (дАТФ), дезоксигуанозінтрифосфат (дГТФ), дезоксицитозінтрифосфат (дЦТФ) і дезокситимідінтрифосфат (дТТФ) – «будівельний матеріал», який використовується Taq-полімеразою для синтезу другого ланцюга ДНК.

ДНК, виділену із досліджуваного біологічного зразка, вносять в реакційну суміш під стерильне вазелінове масло, що запобігає випаровуванню. Пробірки поміщають у термоциклер (ампліфікатор) і проводять реакцію ампліфікації. Кожен цикл ампліфікації складається із трьох етапів: денатурації, відпалу праймерів, елонгації (синтезу). На стадії денатурації дволанцюгові молекули ДНК розплітаються з утворенням двох одноланцюгових молекул. На стадії відпалу праймери приєднуються до одного з ланцюгів ДНК-мішені. Відпал відбувається відповідно до правила комплементарності Чаргаффа: у дволанцюговій молекулі ДНК напроти аденіну знаходиться тимін, а напроти гуаніну – цитозін. Після відпалу праймерів Taq-полімераза починає комплементарну добудову другого ланцюга ДНК (синтез фрагмента – 3-я стадія) з 3'-кінця праймера (рис. 15). Продукти синтезу, що утворилися в першому циклі ампліфікації, служать матрицями для другого циклу ампліфікації. Повторюючи 3 стадії 35-45 разів за 1,5-2 години, одержують мільйони копій специфічної ділянки ДНК мікроорганізму (рис. 16).

Контроль реакції здійснюється одночасно з постановкою ПЛР. Позитивний контроль містить у собі усі компоненти реакції, але замість матеріалу клінічного зразка вноситься контрольний зразок – копії ДНК досліджуваного збудника. Негативний контроль містить у собі всі

компоненти реакції, але замість ДНК досліджуваного матеріалу вноситься відповідна кількість деіонізованої води. Негативний контроль необхідний для перевірки компонентів реакції на відсутність у них ДНК збудника і виключити хибнопозитивний результат.

Проведення електрофорезу. Ампліфікований фрагмент ДНК збудника виявляють методом електрофорезу у 1 % агарозному гелі в присутності 0,5 % розчину етидію броміду протягом 30-45 хвилин. Позитивний продукт ампліфікації видимий у вигляді смуги ДНК жовтогарячого (червоно-помаранчового) кольору, що розташовується на тому ж рівні, що і продукт позитивного контролю. При його відсутності в зразку результат вважають негативним (рис. 17).

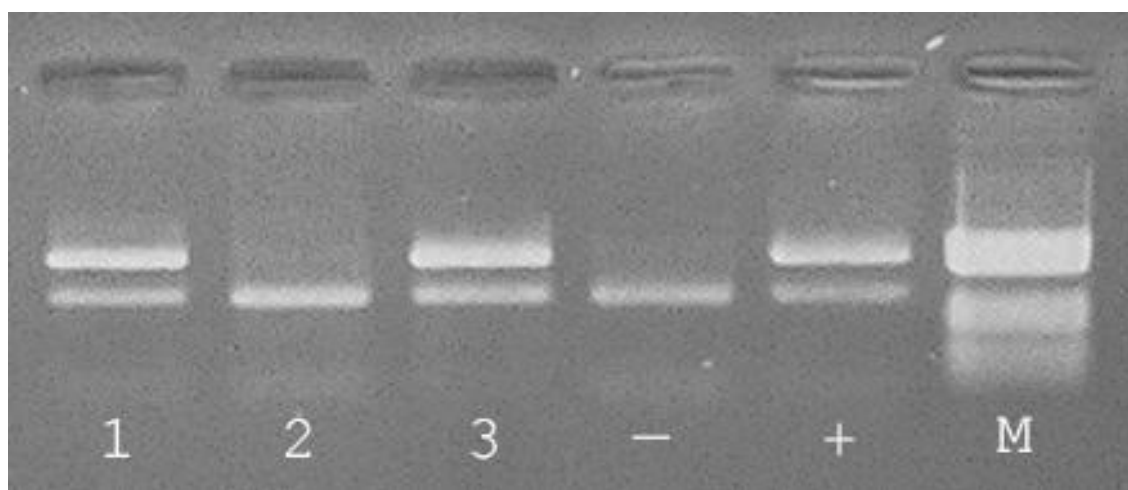


Рис. 17. Електрофореграма ПЛР-аналізу біологічних зразків від свиней на хламідіоз.

Примітка:

доріжки: 1-3 – досліджувані зразки:

1, 3 – позитивні результати;

2 – негативний результат;

доріжки: « – » – негативний та « + » – позитивний контроль;

доріжка: М – маркер молекулярної маси.

Переваги методу ПЛР:

1. Висока специфічність:

- у досліджуваному матеріалі виявляють ДНК збудників вірусних і бактеріальних інфекцій, як найбільш стійку частину генома, що не змінює

свою антигенну структуру ні за яких обставин: тривалий прийом антибіотиків, дія захисних сил імунної системи господаря та ін.;

- тест-набори містять праймери – синтезовані ділянки ДНК, специфічні до виду збудника, який визначається. Використання таких наборів, на відміну від імунологічних тест-систем, дозволяє уникнути реакції, пов'язаної з перехресно-реагуючими антигенами, і виключити хибнопозитивні результати в ПЛР;

- для обліку продуктів ПЛР використовується електрофорез у гелі. Дослідження продуктів ампліфікації в біологічному зразку проводиться паралельно з позитивним і негативним контролем, що дозволяє виключити хибнопозитивні результати.

2. Висока чутливість. Можливість нагромадження ДНК за допомогою ланцюгової реакції дозволяє підвищити ступінь чутливості щодо виявлення мікроорганізмів у досліджуваному матеріалі до 1-10 мікробних клітин на пробу у порівнянні з іншими методами, де він досягає 10^3 - 10^6 мікроорганізмів.

3. Можливість аналізу різного біологічного матеріалу (біопсійний матеріал, епітеліальні зіскрібки, сперма, синовія, фекалії тощо).

4. Невибагливість до умов збереження і транспортування зразків біологічного матеріалу. Для ПЛР-методу збереження живого збудника у зразку не має значення.

5. ПЛР дозволяє здійснювати діагностику латентних форм інфекції. Чутливість виявлення та ідентифікація збудників хламідіозу залежать від інтенсивності перебігу інфекції, виразності клінічних симптомів, концентрації збудника в досліджуваному матеріалі, від стану імунної системи організму, біологічних особливостей самих збудників. Хламідії і хламідіофіли можуть довгостроково знаходитися в латентній формі, бути присутніми у сечостатевому тракті в малих кількостях, змінювати свою структуру під дією антибіотиків. Усе перераховане вище утруднює діагностику і знижує чутливість та специфічність методів, заснованих на

імунологічних реакціях. Метод ПЛР, який базується на виявленні фрагменту ДНК, значно підвищує можливість діагностики хламідіозу.

6. Швидкість проведення досліджень за методом ПЛР. Уніфікований метод обробки біоматеріалу і детекції продуктів реакції та автоматизації процесу ампліфікації дозволяє провести повне дослідження протягом 4-4,5 годин.

7. Метод ПЛР, як найбільш специфічний і чутливий, може використовуватися для оцінки ефективності лікування (критерій виліковуваності) хворих. Відомо, що після тритижневого курсу застосування тетрациклінових антибіотиків пролонгованої дії або фторхінолових препаратів при лікуванні хламідіозу збудник інфекції в урогенітальному тракті хворих методом ІФА не виявляється, тоді як метод ПЛР дозволяє його виявити. Для вірогідності даних контроль виліковуваності повинен бути проведений не раніш, як через 1 місяць після закінчення лікувально-оздоровчих заходів, оскільки за цей період відбувається повна заміна циліндричного епітелію, який є місцем локалізації хламідій і хламідofil в статевому тракті.

Недоліки методу ПЛР:

Чутливість ПЛР може досягати математично можливої межі (детекції 1 копії ДНК-матриці), тому існує високий ступінь небезпеки одержання хибнопозитивних результатів. Це є основним і по суті єдиним недоліком ПЛР. Його причиною можуть бути такі види контамінації:

1. Перехресна контамінація від зразку до зразку (у процесі обробки клінічних чи патологічних зразків при рознесенні реакційної суміші), що призводить до появи спорадичних хибнопозитивних результатів;

2. Контамінація рекомбінантними плазмідами, які містять клоновані послідовності гену, що детектується ;

3. Контамінація продуктами ампліфікації (ампліконами) є найбільш частою причиною хибнопозитивних результатів, оскільки в процесі ПЛР-діагностики ампліфікони накопичуються у великих кількостях і дуже легко

переносяться з аерозолями і через прилади.

Дотримання основних принципів організаційної роботи ПЛР-лабораторії, дозволяє виключити можливість контамінації і, як її наслідок, появу хибнопозитивних результатів.

На сьогодні діагностичні дослідження на хламідіоз за методом ПЛР доки що не освоєні обласними державними лабораторіями ветеринарної медицини України, але проводяться Державним науково-дослідним інститутом з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» та Полтавською дослідною станцією Інституту ветеринарної медицини УААН.

Окрім ПЛР до молекулярних методів, які застосовують для діагностики хламідіозу, належать лігазна ланцюгова реакція (LCR) та транскрипційна ампліфікація (ТА), але ці методи на даний час не знайшли широкого застосування у лабораторній практиці.

Лігазна ланцюгова реакція вперше описана у 1989 році. В її основі лежить здатність лігування (зшивання) олігонуклеотидів, комплементарних певній ДНК-мішені, специфічним ферментом ДНК-залежною ДНК-лігази в присутності АТФ і іонів Mg^{2+} при наявності розриву фосфодіефірного зв'язку. В процесі реакції вже із другого циклу в реакційній суміші починає накопичуватись продукт, який є лігованим фрагментом ДНК, повністю ідентичним за структурою чотирьом праймерам тест-системи.

Транскрипційна ампліфікація – це новий метод молекулярної ампліфікації, який оснований на застосуванні ампліфікації шляхом транскрипції (ТА) і гібридизаційного захисту (ГЗ) для визначення рибосомальної РНК. Ампліфікація рРНК-мішені відбувається із утворенням проміжних ДНК-продуктів. Ампліфіковані послідовності (ампліфікони) виявляють із застосуванням гібридизації нуклеїнових кислот. Використовують комплементарний ампліфікону одноланцюговий ДНК-зонд, що несе хемілюмінісцентну мітку. Мічений ДНК-зонд гібридизується із ампліконом з утворенням стабільного гібрида РНК-ДНК. Відокремлення

гібридів від зондів, що не вступили в реакцію гібридизації, проводять за допомогою спеціального реагенту в люмінометрі.

Виділення збудника із патологічного матеріалу

Виділення та культивування хламідій та хламідофіл проводять шляхом зараження лабораторних тварин (білі миші, морські свинки) та курячих ембріонів 6-7-добової інкубації або перещеплюваних (постійних) культур клітин.

Обробка патологічного матеріалу

Зі зразків біоптатів мозку, легенів, лімфовузлів та паренхіматозних органів готують 20 % суспензію на стерильному фізіологічному розчині (рН-7,2) або розчині Хенкса шляхом розтирання в стерильних хімічно чистих фарфорових ступках зі стерильним піском (подрібненим склом) або гомогенізації Bag міхер (блендер), і центрифугують при 1,5 тис. об/хв протягом 25 хвилин. Супернатант використовують для зараження курячих ембріонів або лабораторних тварин чи для виділення ДНК при дослідженні за методом ПЛР.

Зі зразків сперми та суглобової рідини, також готують суспензії на стерильному фізіологічному розчині (20 % для зразків сперми і 40 % для суглобової рідини) розтираючи їх у стерильних ступках і центрифугуючи при 1,5 тис. об/хв протягом 5 хвилин. Осад відкидають, а супернатант також використовують для зараження курячих ембріонів або лабораторних тварин чи для виділення ДНК.

Зразки фекалій підготовлюють шляхом внесення їх у пробірки, що містять 0,5 см³ фізіологічного розчину і подальшим центрифугуванням при 2 тис. об/хв протягом 5 хв. Осад відкидають, супернатант використовують для виділення ДНК.

До суспензій додають антибіотики у такій комбінації: стрептоміцин 100-

200 мкг/мл, канаміцин 100 мкг/мл, гентаміцин 20 мкг/мл, ністатин 25 мкг/мл. Після витримування суміші при кімнатній температурі 2-3 години або 16-18 годин при 4-5°C. Дана надосадкова рідина є вихідним матеріалом для подальших досліджень на курячих ембріонах, лабораторних тваринах, культурі клітин за умови відсутності росту бактеріальної і грибної флори на засіяних середовищах (МПБ, МПА, Кітт-Тароцці, Вільсон-Блера, середовищі Чапека). Для виділення ДНК в ПЛР використовується надосадова рідина без додавання антибіотиків.

Зараження курячих ембріонів

Для використання з метою виділення і культивування збудників хламідіозу на курячих ембріонах бажано використовувати ВПФ-яйця або принаймні одержувати яйця від курей з господарств, благополучних щодо респіраторного мікоплазмозу птиці та орнітозу і де в раціон годівлі не додають антибіотики. Яйця інкубують в термостаті при температурі $37,5 \pm 0,5$ °C при відносній вологості повітря 55-60 %. На 6-7 день інкубації яйця проглядають в овоскопі, відмічають межу повітряної камери і місце розташування ембріона та вибраковують ті ембріони, у яких немає зародків. Після чого ватним тампоном, просякнутим 10 % настоякою йоду на 60 % спирті-ректифікаті, протирають шкаралупу в центрі пуги діаметром близько 1 см² і проколюють у ній отвір спеціальним пробійником над полум'ям спиртівки. За допомогою шприца з голкою діаметром 0,6-0,7 мм і довжиною 4 см супернатант суспензії в дозі 0,3-0,5 см³ вводять на глибину 3-4 см під кутом 45° до вертикальної осі в протилежному від зародка напрямку. Після ін'єкції місце проколу знову протирають настоякою йоду і заливають отвір розплавленим парафіном. Для кожного матеріалу використовують 6-10 курячих ембріонів.

Заражені ембріони інкубують у термостаті при температурі 37-38°C з відотною вологістю повітря 55-60 % і щоденно вранці та ввечері проглядають їх на овоскопі, контролюючи життєздатність. Ембріони, які

гинуть у перші 2-3 доби після зараження, вибраковуюються (неспецифічна загибель). Ембріони, які загинули в наступні дні, розтинають в умовах стерильного боксу і стерильним пінцетом, обережно відділяють жовткові міхури звільняючи їх від жовтка.

Частину жовткового міхура використовують для приготування 20-40 % суспензії на фізіологічному розчині або розчині Хенкса, що буде використовуватися для зараження ембріонів наступного пасажу за вищенаведеною методикою, але без додавання антибіотика за умови дотримання стерильності на усіх етапах роботи. Одержаний інфекційний матеріал також контролюють на бактеріальну стерильність шляхом висіву на поживні середовища (МПБ, МПА, кров'яний агар, тіогліколятний бульон). Частину жовткового міхура звільняють від жовтка з допомогою фільтрувального паперу і готують мазки-відбитки із забарвленням за Стемпом, Маккіавелло або Романовським-Гімзою. У позитивних випадках виявляють елементарні тільця-включення та проміжні форми збудника, які мають форму коків розміром 250-300-800 нм і розташовуються переважно у цитоплазмі епітеліальних клітин.

Ідентифікацію проводять в РІФ.

У першому пасажі ембріони гинуть від хламідій та хламідofil, як правило, на 8-11 добу після зараження, а в наступних пасажах – на 5-8 добу.

При негативних результатах першого зараження рекомендується проведення двох послідовних пасажів.

Зараження лабораторних тварин

Для зараження використовують 5-х білих мишей масою 16-20 г або 2-3-х морських свинок масою 300-350 г (краще вагітних).

Зараження білих мишей супернатантом вищезгаданих 10-20 % суспензій, приготовлених із патологічного матеріалу, проводять трьома способами: інтраназально (інтраторакально), інтраперитоніально та інтрацеребрально.

Інтраназально надосадову рідину суспензії досліджуваного матеріалу вводять мишам по $0,05-0,1 \text{ см}^3$ у кожен носовий хід. Інтраторакально – у грудну порожнину, через міжреберні тканини із правого боку в дозі $0,3-0,5 \text{ см}^3$.

За наявності в досліджуваному матеріалі збудника хламідіозу у лабораторних тварин відмічається підвищення температури, млявість і, як правило, вони гинуть на 7-10 добу після зараження. На розтині виявляють вогнищеву гіперемію легень і пневмонічні фокуси або пневмонію цілої долі легень. При дослідженні мазків-відбитків, виготовлених із уражених ділянок легень, виявляють скупчення елементарних тілець як всередині клітин, так і позаклітинно.

На 10 добу після зараження, якщо тварини вижили, їх забивають.

Для наступного пасажу використовують супернатант 20 % суспензії із легень мишей попереднього пасажу без додавання антибіотика, за умови дотримання стерильності на усіх етапах роботи.

Інтраперитоніально надосадову рідину суспензії досліджуваного матеріалу вводять мишам у черевну порожнину в дозі $1-2 \text{ см}^3$, а при наступних пасажах – $0,5-1 \text{ см}^3$ супернатант 20 % суспензії, приготовленої і шматочків печінки, селезінки та нирок мишей попереднього пасажу, але без додавання антибіотика, також за умови дотримання стерильності на усіх етапах роботи.

Адаптовані хламідії та хламідофіли викликають захворювання і загибель тварин через 5-10 діб в залежності від їх вірулентності. На розтині виявляють скупчення ексудату в черевній порожнині і певне збільшення селезінки та печінки. У мазках-відбитках, приготовлених із указаних органів, виявляють значне скупчення елементарних тілець у макрофагах і внутрішньоклітинно.

Для наступного пасажу використовують надосадову рідину 20 % суспензії із селезінки та печінки мишей попереднього пасажу із дотриманням стерильності на усіх етапах її приготування.

Інтрацеребрально (субдурально) супернатант суспензії досліджуваного матеріалу вводять мишам під тверду мозкову оболонку в дозі 0,1 см³.

Адаптація збудника до мозку мишей настає із 3-4 пасажу. У цьому випадку миші гинуть на 3-5 добу після зараження. Труп тварин мають характерне положення: згорблена спина, передні лапки зігнуті і підведені, задні лапки і хвіст витягнуті.

Для наступного пасажу використовують надосад 20 % суспензії, приготовленої зі шматочків головного мозку мишей попереднього пасажу без додавання антибіотика, відповідно, із дотриманням стерильності на усіх етапах роботи.

На 10 добу після зараження будь-яким із зазначених методів, якщо тварини вижили, проводять їх евтаназію ефіром або хлороформом, з паренхіматозних органів готують 20 % суспензію для проведення наступного пасажу.

Морські (гвінейські) свинки більш чутливі до інтраперитоніального зараження. Супернатант суспензії досліджуваного матеріалу вводять у черевну порожнину в дозі 2-3 см³. Клінічні прояви хвороби виникають на 5-21 добу і характеризуються підвищенням температури тіла до 40-41°C, яка тримається впродовж 2-3 діб. Загибель інфікованих морських свинок відмічається, як правило, у 80-100 % випадків. Слід зазначити, що окремі штами збудника хламідійної інфекції не викликають загибелі тварин. Наявність інфекції у таких випадках визначають за наростанням титру антитіл у сироватках крові серологічними або імунологічними методами. При розтині загинув свинки, що заражались інтраперитоніально або інтраторакально, відмічають напластування фібринозного ексудату на печінці і селезінці, а також незначне збільшення цих органів. Мікроскопією мазків-відбитків, приготовлених із ураженої печінки, виявляють значну кількість цитоплазматичних включень і елементарних тілець хламідій.

При зараженні лабораторних тварин та курячих ембріонів результати досліджень вважають позитивними у випадку виявлення збудника хламідіозу

у мазках-відбитках з органів методами світлової мікроскопії та імунофлуоресценції або фрагменту його ДНК у ПЛР у будь-якому із послідовних пасажів.

Виділення хламідій та хламідofil у перещеплюваних (постійних) культурах клітин

Беручи до уваги те, що збудники хламідіозу не розмножуються на звичайних живильних середовищах, а їх паразитизм обумовлений вираженою метаболічною залежністю від клітини-господаря, традиційні бактеріологічні методи діагностики цієї інфекції є непридатними. У даний час «золотим стандартом» лабораторного виявлення хламідій та хламідofil вважається культуральний метод (виділення збудника в культурі клітин *in vitro*). Його суть зводиться до зараження моношару культури клітин хламідійним матеріалом. Із цією метою частіше всього використовують клітини McCoy (CRL-1440 ATCC®), Hep-2 (CCL-2.2 ATCC®), HeLa- 229 (CCL-2.1 ATCC®), PL (CCL-148 ATCC®), African green monkey kidney (Vero), тощо, а також культуру мишачих фібробластів L-929 (CCL-1 ATCC®).

Практично усі представники бактерій родини *Chlamydiaceae* в стандартних умовах не здатні розмножуватись у культурах клітин. Тому з цією метою рекомендується цілий ряд методичних прийомів, які сприяють підвищенню адсорбції мікроорганізму на поверхні клітин, активації його поглинання клітиною і пригніченню її нормального метаболізму. Для цього широко застосовуються як самотійно, так і в різних комбінаціях центрифугування досліджуваного матеріалу на поверхні клітин ДЕАЕ-декстраном-полікатіоном, який активує поглинання клітинами макромолекул (хламідій чи хламідofil), обробку клітин 5-йод-2-дезоксиридином або циклогексимідом – антиметаболітами, які мають цитотоксичну дію, сповільнюють метаболізм еукаріотів (клітин господаря) і побічно стимулюють розмноження прокаріотів (хламідій чи хламідofil).

Для виділення хламідій та хламідофіл у практиці ветеринарної медицини частіше використовують перещеплювану культуру мишачих фібробластів L-929, оброблену ДЕАЕ-декстраном.

При цьому використовуються наступні середовища та реагенти:

- середовище 199 або ІГЛА без антибіотиків;
- сироватка крові великої рогатої худоби без антибіотиків, інактивована у водяній бані при $t\ 56\ ^\circ\text{C}$ протягом 30 хв;
- фетальна сироватка великої рогатої худоби, інактивована у водяній бані при $t\ 56\ ^\circ\text{C}$ протягом 30 хв;
- розчин Хенкса;
- ДЕАЕ-декстран (М.м 2.000.000) – основний 1 % розчин на дистильованій воді, стерилізований через фільтри Millipore (0,45 мкм) або автоклавуванням ($115\ ^\circ\text{C}$ впродовж 30 хв), розлитий по ампулах. Зберігати при $t - 20\ ^\circ\text{C}$. Робочий розчин ($90\ \text{мкг}/\text{см}^3$) готують *ex tempore* на розчині Хенкса;
- антибіотики: стрептоміцин, ністатін, канаміцин;
- плоскодонні пробірки із нейтрального скла (висота 45 мм, діаметр 13 мм), у які поміщають підготовлені покривні скельця діаметром 12 мм і закривають гумовими пробками. При відсутності таких пробірок використовують пеніцилінові флакони. З метою зниження трудомісткості та більш економного використання досить високих за вартістю інгредієнтів рекомендується використовувати планшети «ЛАВ-ТЕК» на 8, 16, 24, 48 та 96 кюветів. Після інкубації такі кювети знімаються із предметного скла, на якому вони містилися, а предметне скло із моношаром забарвлюється тим чи іншим методом і підлягає мікроскопії або ж підлягає дослідженню за методами ІФА чи ПЛР.

Для культивування клітин L-929 використовують ті, які адаптовані до середовища 199 або ІГЛА із додаванням 10 % сироватки великої рогатої худоби. Клітини вирощують в матрасах з нейтрального скла на $100\text{-}250\ \text{см}^3$

при використанні, відповідно, 15 або 25 см³ середовища із додаванням 10 % сироватки великої рогатої худоби.

При пересівах культуральне середовище зливають, клітини знімають зі скла шляхом внесення 0,02 % розчину Версена (10 хв при t 35 °C), версен зливають, клітини суспензують у середовищі 199. Суспензію клітин, яка містить 1,2×10⁵-2,0×10⁵ клітин у 1 см³, переносять у скляні плоскодонні пробірки (пеніцилінові флакони) із покривними скельцями. Моношар клітин на покривних скельцях вирощують при вертикальному положенні пробірок впродовж 24-48 год.

Зараження культури фібробластів мишей L-929 досліджуваним матеріалом: культуральне середовище із пробірок (флаконів) зливають. Моношар клітин покривають 1 см³ робочого розчину ДЕАЕ-декстрана 90 мкг/см³, витримують 30 хв при кімнатній температурі, розчин також зливають.

Матеріал, який необхідно дослідити на наявність збудника хламідіозу, стерильною піпеткою вносять по 0,2 см³ у чотири (або більше) плоскодонні пробірки (пеніцилінові флакони), нашаровуючи на моношар клітин. Пробірки із матеріалом центрифугують на горизонтальному роторі (2400g) 6000 об/хв впродовж 1 години при t 30-34 °C. Після центрифугування інокулянт зливають, обережно вносять 1 см³ середовища 199 із додаванням 5 % фетальної сироватки великої рогатої худоби і 5 % 0,5 м розчину глюкози та інкубують при t 35-36 °C 72 години.

У разі короткочасного первинного контакту матеріалу з антибіотиками в транспортному середовищі, або при підозрі на значне обсіменіння бактеріальною мікрофлорою в середовище також додають антибіотики: стрептоміцин (200 мкг/см³), ністатин (25 мкг/см³) і канаміцин (100 мкг/см³).

Оцінку результатів первинного зараження клітин проводять через 66-72 години, а при посіві матеріалу не на чотири, а на шість пробірок – через 48 і 72 години.

Покривні скельця із двох пробірок видаляють, промивають ФСБР, підсушують на повітрі і фіксують відповідно до методу забарвлення за Мая-Грюнвальда-Гімзи або за Романовського-Гімзи у холодному ацетоні 15-20 хв для забарвлення флуоресціюючими антитілами.

Забарвлення препаратів за методом Мая-Грюнвальда-Гімзи: на препарат наносять 5 крапель фарби Мая-Грюнвальда на 2-3 хв, промивають проточною водою 1-2 хв, після чого наносять свіжоприготовлений робочий розчин барвника Романовського-Гімзи (основний розчин барвника розводять дистильованою водою 1:20) на 15-20 хв. Препарат промивають проточною водою і підсушують фільтрувальним папером. Диференціюють у абсолютному етанолі 5-10 с, промивають, підсушують фільтрувальним папером, просвітлюють ксилолом (2-3 хв) і монтують у канадському бальзамі на предметному склі.

Перегляд препаратів здійснюють у світловому мікроскопі при середньому (40×7) і великому ($90, 100\times 7$) збільшеннях. При позитивних результатах в інфікованих клітинах виявляють характерні цитоплазматичні включення хламідій чи хламідофіл на тій чи іншій стадії розвитку (елементарні, ретикулярні або перехідні тільця), які забарвлюються у рожево-червоний колір на темно-синьому тлі.

Більш об'єктивний результат отримують при застосуванні методів ІФА та ПЛР.

При негативних результатах проводять 3 пасажі.

Таким чином, в останні роки для підтвердження діагнозу на хламідіоз застосовуються різноманітні лабораторні методи. Найбільш достовірними і досі вважаються культуральні методи, але набагато чутливішими у порівнянні з ними є молекулярно-генетичні. За діагностичною інформативністю їм поступаються імунологічні методи. Ще менш достовірними є серологічні та морфологічні методи, результати яких досить

суб'єктивні. Разом із тим кожен із методів лабораторної діагностики хламідіозу має свої переваги та недоліки. В зв'язку з цим правильний вибір діагностичного методу в різних ситуаціях має вирішальне значення для постановки діагнозу на хламідіоз.

ДИФЕРЕНЦІАЛЬНА ДІАГНОСТИКА

Диференціальна діагностика передбачає виключення захворювання великої рогатої худоби на бруцельоз, кампілобактеріоз (вібріоз), трихомоноз, сальмонельоз, пастерельоз, лістеріоз, парагрип-3, інфекційний ринотрахеїт, вірусну діарею, аденовірусну інфекцію, ентеротоксимію, кокцидіоз, мінеральну недостатність, авітаміноз А, аборти аліментарної етіології. При диференційній діагностиці слід приймати до уваги клінічно подібні кон'юнктивіти, що викликаються стафілококами, стрептококами, рикетсіями, *Moraxella bovis*, *Listeria monocytogenes*, мікоплазмами (*M. verecundum*, *M. bovoculi*), вірусом інфекційного ринотрахеїту, а також гельмінтами.

Кампілобактеріозом (вібріозом) хворіють статевозрілі корови та телиці, у яких основними клінічними ознаками є масові аборти, які відбуваються в першій або на початку другої половини вагітності, та їх ускладнення, що характеризуються затриманням посліду, вагінітами та метритами. Також хвороба характеризується неплідністю телиць та яловістю й перегулами корів. Телята народжуються слабкими та нежиттєздатними і гинуть у перші дні життя.

При кишковій формі **сальмонельозу** мають місце більше чи менше виражені симптоми ентериту. При колієнтеротоксимії у новонароджених телят виражений дифузний катаральний ентерит, який супроводжується поносом, викликаючи сильне зневоднення організму. Також можуть відмічатися напруження черевної стінки, болючість усього черева і тенезми. Смерть настає, у більшості випадків, через декілька діб. Ентеротоксимія може бути і клостридійної етіології, при якій запалення шлунково-кишкового тракту, особливо тонкого відділу кишечника, має різний характер – від гострокатарального до типового геморагічного ентериту. Разом зі змінами в кишечнику можуть бути встановлені виражена гіперемія селезінки й печінки, субепікардіальні петехіальні крововиливи, а також набряк легень і органів

центральної нервової системи. Клінічно це проявляється непритомним станом, хиткою ходою і судомами. Хворіють переважно телята у віці до 2 місяців, а найчастіше вже в перші доби життя. Хвороба зазвичай проявляється раптово. Основні симптоми – повна втрата апетиту, сильні коліки, часто з кровавим поносом і тенезмами. Видужують тварини рідко і лише через 10-12 діб. Іноді телята гинуть до клінічних проявів. Виявлення токсинів А, В, С і Д мікробів *Clostridium perfringens* у вмісті кишечника в поєднанні з даними клінічного і патологоанатомічного досліджень дозволяють поставити більш-менш точний діагноз.

Пастерельоз у ВРХ виникає в основному внаслідок порушення зоогігієнічних умов утримання тварин, або як вторинна інфекція. Клінічно пастерельоз жуйних тварин характеризується враженням шлунково-кишкового тракту, органів дихання та набряками у ділянці голови, шиї, підгруддя, кінцівок та статевих органів. При цьому аборти у корів відсутні.

Лістеріоз клінічно характеризується одностороннім лицевим паралічем; на розтині запальні процеси в порожнинах тіла не виявляються.

Парагрип-3 характеризується ознаками ураження респіраторного тракту, зокрема пневмонією і плевритом, які виявляються аускультативно. Захворювання, як правило, проявляється відразу після дії стресфакторів (транспортування, кастрація тощо). На розтині звичайно знаходять пневмонію, але рідко перитоніти та перикардити.

Інфекційним ринотрахеїтом одночасно захворює багато тварин із чіткими ознаками респіраторної інфекції. Для енцефаліту ринотрахеїтної етіології характерні в'ялість і дрижання м'язів, атаксія, утруднені рухи і опістотонус. Більшість хворих телят гине протягом декількох діб. На розтині перитоніт, плеврит і перикардит не виявляють. Хворобу слід диференціювати методами лабораторної діагностики.

У хворих на **вірусну діарею** з початком лихоманки і розладами діяльності шлунково-кишкового тракту з'являються ерозії в ротовій порожнині на носовому дзеркалі. На розтині ерозії виявляють також у

стравоході, присінку рубця, складках книжки і сичузі. Окрім того, ерозії та виразки можуть бути на слизових оболонках зовнішніх статевих органів і вінчику копит. Запальні процеси в порожнинах тіла відсутні.

Аденовірусна інфекція у молодняку перебігає з ознаками враження органів дихання та травлення. В гострий період хвороби тварини частково або повністю відмовляються від корму, відмічається діарея із ознаками зневоднення організму. Такі телята гинуть на 1-3 добу після появи перших симптомів хвороби, летальність сягає більше 60 %.

Гостра **колі-інфекція**, яка може супроводжуватися септицемією, призводить, як правило, до ентериту. В окремих випадках до сепсису, який протікає без поносу, приєднується менінгіт. Тварини лежать на боці з витягнутими кінцівками, у них відмічають депресію, опістотонус, розширення зрачків. Хвороба закінчується летально через декілька діб. У телят з проявами розладу діяльності центральної нервової системи встановлюють менінгіт та серофібринозний, фібринозний або гнійний менінгоенцефаліт.

При **авітамінізії А**, також спостерігаються порушення з боку центральної нервової системи. При цьому відмічають розлад рухів, підвищену збудливість, судоми і тимчасову втрату свідомості.

Такі симптоми, як невпевнена хода, часто перехрещена постановка тазових кінцівок і м'язові судоми, проявляються і при ензоотичній м'язовій дистрофії телят (білом'язева хвороба).

При **кокцидіозі** в слизовій оболонці кишечника, у його вмісті, де переважають слиз, фібрин і кров, мікроскопічно виявляються різноманітні стадії розвитку паразита.

Слід виключити **мінеральну недостатність**, яка характеризується остеомалаяцією і м'язевою дистрофією і зазвичай перебігає без температурних реакцій.

Важливо мати на увазі, що поліартрити і серозіти викликаються і мікоплазмами. У кожному окремому випадку при виділенні хламідій на

курячих ембріонах із синовії висівають досліджуваний матеріал на агарові елективні середовища для росту мікоплазм. Окрім того, необхідно пам'ятати, що у ягнят і телят, хворих хламідійним поліартритом, пупок завжди залишається неушкодженим.

У овець масові аборти відмічають не лише при хламідіозі, але й при захворюванні на бруцельоз, сальмонельоз, кампілобактеріоз (вібріоз), лептоспіроз, лістеріоз, Ку-гарячку, токсоплазмоз, а також при різних захворюваннях, викликаних грибами, і при ураженні умовно-патогенною мікрофлорою. При цьому інфекційні агенти можуть діяти як самостійно, так і асоційовано.

При **бруцельозі** на відміну від хламідіозу спостерігається висока яловість поголів'я і більш часта затримка посліду, розвиток метритів і ендометритів. Разом з тим, ці захворювання можуть перебігати одночасно. Виключають бруцельоз лабораторними дослідженнями.

Для **сальмонельозних** абортів характерні маceraція плода і відсутність некротичних змін в плаценті. При бактеріологічному дослідженні виділяють культуру *Salm. abortus*. При цьому не спостерігається стаціонарність захворювання. Часто в одній і тій же отарі реєструють і хламідійну, і сальмонельозну інфекції. Смертність овець при сальмонельозі різна: в одних випадках гинуть окремі тварини, в інших – 60-80 %.

Вібріоз овець також має подібні до хламідіозу клінічні ознаки. Відсоток абортів при даній інфекції може сягати 70. Характерною особливістю вібріозу овець є темно-коричневі витікання із матки після абортів, в яких виявляють збудника хвороби. Ці дві інфекції також можуть перебігати одночасно.

Лептоспіроз у овець має переважно гострий септичний перебіг. Окрім абортів характерними ознаками захворювання є жовтушність слизових оболонок, гематурія і гемоглобінурія. Загибель ягнят досягає 40-100 %. Виявлення лептоспір в сечі і аглютенінів в крові полегшує розпізнання хвороби.

При *лістеріозі* також мають місце аборти. Вони можуть досягати 45 %. Характерною ознакою лістеріозу овець є ураження нервової системи. Спочатку відмічають сонливість, кон'юнктивітом і ринітом, через 1-2 доби відмічаються судоми, викривлення ший, розширення зіниць і втрата зору. Хвороба триває від декількох годин до 10 діб і закінчується, як правило, летально.

Аборти у овець можуть викликати *рикетсії* і *найпростіші*. *Rickettsia Burneti* виділяється з плаценти, головного мозку і молока овець, що абортували. Для цього захворювання характерним є розвиток бронхопневмонії. Діагноз ставлять на підставі результатів лабораторних досліджень.

Встановлено також, що етіологічним чинником абортів у овець може бути *Toxoplasma gondii*. Збудник у неблагополучних отарах виділяється від 15-20 % досліджених плодів, кількість абортів при цьому може сягати 50 %.

При дослідженні аборт-плодів овець, окрім вищезазначених, виділяють і інші мікроорганізми: *E.coli*, диплококи, гриби.

У с в и н е й необхідно виключити бруцельоз, хворобу Ауєскі, парво- та ентеровірусну інфекції, лептоспіроз, токсоплазмоз, лістеріоз, сальмонельоз, гіповітамінози А і Е, а також аборти, викликані погрішностями в годівлі. Слід враховувати, що зустрічається і змішаний перебіг хламідіозу свиней з бруцельозом, лептоспірозом, сальмонельозом, у поросят перших діб життя – з колібактеріозом.

При *бруцельозі* аборти виникають на 4-12 тижні поросності, зазвичай без затримки посліду. У кнурів вражаються сім'яники та їх придатки. Хвороба може ускладнюватись ураженням суглобів, кісток. На відміну від хламідіозу при захворюванні на бруцельоз мають місце абсцеси у підшкірній клітковині, м'язах і навіть у паренхіматозних органах, а також, досить часто, муміфікація плодів.

Хвороба Ауєскі, хоча зазвичай у дорослих свиней має доброякісний перебіг, іноді перебігає в тяжкій формі, для якої характерні виражене

пригнічення, кашель, манежні рухи, клонічні судоми, паралічі кінцівок і глотки, після чого настає коматозний стан і загибель. У свиноматок можуть мати місце аборти. У поросят перебіг характеризується ураженням респіраторного тракту і центральної нервової системи (тварини хвилюються, сильно збуджені, у них судомно скорочуються окремі групи м'язів, розвивається кон'юнктивіт, риніт, температура тіла підвищується до 41-42°C, іноді мають місце епілептичні припадки). Подібні ознаки можуть спостерігатись і при хламідіозі, але відмінною ознакою хвороби Ауескі у поросят є висока летальність (до 100 %).

Парвовірусна інфекція свиней клінічно проявляється тільки у поросних свиноматок що характеризується порушенням репродуктивної функції: прохолостами, повторним приходом в охоту, безпліддям, муміфікацією плодів, народженням мертвих, слабких та нежиттєздатних поросят. Аборти зустрічаються рідко, в основному на ранніх стадіях супоросності. У кнурів-плідників хвороба перебігає у латентній формі, без характерних клінічних ознак. Також відсутні клінічні ознаки у новонароджених поросят, або вони малохарактерні для даної хвороби.

Ентеровірусна інфекція клінічно проявляється у поросят відлучного віку та підсвинків 4-10 місяців. Рідко хворіють дорослі свині і поросятасисуни. Летальність становить 5-10 %, а при ускладненні секундарною мікрофлорою може досягати 25-30 %. Характерною клінічною ознакою є профузний понос, який зазвичай чергується із запором, а також сильне виснаження. Фекалії водянисті, жовтого або жовто-зеленого кольору, іноді з домішкою крові. Також можуть мати місце порушення координації рухів, судомні скорочення окремих груп м'язів тулуба. Бувають випадки раптової загибелі поросят з апоплексичними симптомами, без діареї. Аборти серед свиноматок носять спорадичний характер. На розтині відмічають катаральне або геморагічне запалення травного каналу, складчастість слизової оболонки дна шлунка і товстого відділу кишечника, збільшення мезентеліальних лімфовузлів, селезінки, печінки та нирок.

Лептоспіроз досить часто має гострий та надгострий перебіг, що є не характерним для хламідіозу. У поросят відмічають рецидивуючу лихоманку, схуднення, анемію, жовтушність. Летальність сягає 50-70 %. Для лептоспірозних абортів, окрім муміфікації плодів, характерні також велика кількість ослаблених, нежиттєздатних поросят, висока смертність новонароджених та часті післяродові ускладнення у свиноматок. На розтинах трупів у більшості випадків під шкірою виявляють жовтушність тканин і множинні крововиливи, обширні геморагії на серозних і слизових оболонках. Нирки збільшені, бугристі, на розрізі під капсулою множинні крововиливи. При лептоспірозі більш вираженими ніж при хламідіозі є зміни міокарда, в якому спостерігається фрагментація окремих м'язових волокон. Обробка свиноматок ударними дозами стрептоміцину при лептоспірозі дає позитивний ефект, тоді як при хламідіозі вона є абсолютно безрезультативною. слід мати на увазі, що лептоспіроз нерідко перебігає одночасно з хламідіозом як змішана інфекція, тому при появі абортів і мертвонароджень слід повести лабораторні дослідження, направлені на виключення обох захворювань.

Токсоплазмоз характеризується абортами і розладом нервової і інших систем організму. При гострій формі інкубаційний період триває до 4 діб, ровивається лихоманка, іноді понос, парези і паралічі. Часто захворювання перебігає в хронічній і латентній формах. При розтині виявляють збільшення лімфовузлів, печінки і селезінки, катар слизових і серозних оболонок в різних органах, некротичні фокуси.

Лістеріоз у свиней різних вікових груп проявляється неоднаково. У свиноматок характеризується спорадичними абортами, у поросят та підсвинків хвороба проходить у нервовій формі з різко вираженими симптомами менінгоенцефаліту, у сисунів часто має місце септична форма. На розтині, при нервовій формі, виявляють ін'єкцію судин і набряк головного мозку, крововиливи в мозковій тканині та деяких внутрішніх органах, інколи гострокатаральні процеси в травному тракті. При септичній

формі відмічають гіперемію і набряк легень, гіперемію селезінки та лімфовузлів, застійні явища й крововиливи на серозних і слизових оболонках, дистрофічні процеси та некротичні осередки в печінці, нирках, селезінці, міокарді.

При *сальмонельозі* у свиноматок також зустрічаються аборти. Гострий перебіг захворювання характерний для поросят-сисунів та відлучного віку. При цьому спостерігається лихоманка, пригнічення, втрата апетиту, блювота, пронос. На 2-4 добу захворювання шкіра в ділянці підгруддя черева й вух набуває синьо-червоного забарвлення, погіршується загальний стан. Наприкінці хвороби температура тіла опускається за межі фізіологічної норми і поросята гинуть упродовж 5-10 діб з ознаками сильної слабкості. При підгострому перебігові відмічається ремітуюча лихоманка, проноси чергуються з запорами, апетит мінливий, спрага, швидке схуднення, задишка, кашель. тривалість хвороби – 20-30 діб. На розтинах виявляють катар слизової шлунка та тонкого відділу кишечника, гіперплазію мезентеріальних лімфовузлів та селезінки, значне збільшення, соковитість пейєрових бляшок і солітарних фолікулів. При хронічному, найбільш характерному для сальмонельозу перебігу, відмічаються хронічні ентерити і пневмонії. Шкіра хворих поросят бліда, набуває сіруватого кольору, з часом розвивається струпоподібна екзема. Спостерігається рецидивний понос, випорожнення зловонного запаху, жовто-сірого кольору, часто з домішками фібрину або згустками крові. Нерідко хвороба ускладнюється пневмонією, можуть мати місце виділення із носа, судоми, потовщення суглобів. Поросята відстають у рості і розвитку. На розтині основні зміни виявляють у товстому відділі кишечника – дифтеричні та виразково-некротичні процеси в сліпій ободовій частково в клубовій кишках, ураження пейєрових бляшок і солітарних фолікулів, які різко збільшені в об'ємі, просочені фібринозним ексудатом, у вигляді струпів виступають на поверхні висівкоподібного нальоту. Після їх некрозу та відторгнення з'являються виразки з піднятими краями та некротичними масами на дні. У тонкому відділі кишечника

відмічають госро-катаральне запалення, у лімфовузлах та паренхіматозних органах – некротичні осередки. Інколи спостерігають катаральну або катарально-гнійну бронхопневмонію.

У к о н е й виключають ринопневмонію, вірусний артерійт, бруцельоз, лістеріоз, сальмонельозний аборт кобил і кормові отруєння.

При *ринопневмонії* реєструють масові раптові аборти серед жеребих кобил зазвичай через 15-20 діб після зараження, незалежно від терміну вагітності, тоді як при хламідіозі вони, зазвичай, виникають в другій половині жеребності. Іноді у кобил після ринопневмонійного абортів розвиваються парези та паралічі, що закінчується летально. Окрім генітальної та нервової форм хвороба проявляється у респіраторній формі. Така форма перебігу трапляється частіше за інші. Вона характеризується лихоманкою, депресією, відсутністю апетиту, кон'юнктивітом, ринітом або ринофаренгітом. Легені при цьому уражуються рідко. Через 10-15 діб, зазвичай, настає одужання, але при ускладненні бактеріальною інфекцією захворювання може мати летальний кінець.

Вірусний артерійт завжди має гострий перебіг. При цьому 50-80 % жеребих кобил абортують, як і при ринопневмонії, на 15-20 добу після зараження. Взагалі захворювання характеризується лихоманкою, гіперемією слизових, світлобоязню, некротичними ураженнями дрібних артерій і вен, набряком повік, живота і кінцівок. У молодих тварин хвороба часто супроводжується діареєю, коліками і зневодненням організму. Хвороба триває 5-7 діб і при тяжкому перебігу до 30 % хворих гине. При більш легкому перебігові летальність не перевищує 5 %.

При *бруцельозі*, як і при хламідіозі, аборти у кобил відмічаються у другій половині вагітності. Часто аборти ускладнюються ендометритами та маститами. Хронічний бруцельоз часто проявляється бурситом в ділянці потилиці і холки, некрозами хрящів та остистих відростків, іноді орхітом та епідідимітом.

Лістеріоз у коней зустрічається досить рідко. При цьому відмічається загальна температурна реакція, пригнічення, порушення координації рухів, парези, паралічі кінцівок, гнійний кон'юнктивіт, жовтушність склери, риніт, в період вагітності уражується статеві система, що, у більшості випадків, призводить до абортів.

Сальмонельоз окрім абортів у кобил може мати гострий перебіг у лошат, що характеризується лихоманкою, відсутністю апетиту, діареєю, іноді гемоглобінурією. Лошата перших діб життя у більшості випадків гинуть.

Як видно із вищезгаданого, у кожного із видів тварин можуть мати місце чимало захворювань, які мають подібні до хламідіозу клінічні та патологоанатомічні ознаки, тому вирішальне значення має лабораторна діагностика.

ЛІКУВАННЯ

Враховуючи органну локалізацію та змішану етіологію – інтерстиціальну і міжклітинну тропію патогенних та проміжних форм інфекційного начала, підходи у лікуванні хламідіозу є подібними до лікування змішаних вірусно-бактеріальних інфекцій з використанням препаратів, здатних ефективно впливати на збудника на рівні базальних мембран та як засобів підтримки функціонального статусу органів і тканин ураження. Лікування повинно бути комплексним, етіопатогенетичним і залежати від наявності супутньої інфекції, від тривалості захворювання, характеру клінічних проявів і глибини дисбалансу імунної системи. Центральною ланкою в лікувальному комплексі при цій інфекції є антибіотики.

Чутливість хламідій до різних антибіотиків неоднакова: одні з них мають по відношенню до збудника бактерицидну, інші – бактеріостатичну дію. Цілий ряд антимікробних препаратів не виявляє впливу на розвиток і розмноження хламідій та хламідofil. Це такі антибіотики, як стрептоміцин, ристоцетин, ванкоміцин, канаміцин, мікостатин, поліміксін, мономіцин, неоміцин, біоцин і новобіоцин.

До сульфіламідних препаратів чутливими є лише представники виду *Chlamydia trachomatis* і окремі штами інших видів родини *Chlamydiaceae*. Разом з тим пероральне застосування сульфаніламідних препаратів, особливо при респіраторних та кишкових формах інфекції молодняку, є доцільним у загальному комплексі лікування.

Бета-лактимні антибіотики (пеніциліни і цефалоспорини) або аміноглікозиди (гентаміцин) повільно проникають в клітини і мають помірну або низьку активність у відношенні збудників хламідіозу. Механізм дії пеніциліну оснований на пригніченні синтезу клітинної стінки, але при лікуванні даного захворювання не має суттєвого хіміотерапевтичного ефекту. Антибіотики пеніцилінового ряду, в тому числі напівсинтетичні, а також

аміноглікозиди можуть бути застосовані лише для терапії при змішаній інфекції одночасно з антихламідійними препаратами.

Найбільше пригнічення активності хламідій мають антибіотики тетрациклінового ряду, макроліди та фторхінолони. Механізм дії цих препаратів на хламідій та хламідofil досить багатогранний. Зокрема, тетрацикліни пригнічують фермент, що приймає участь у синтезі ДНК, і інгібує до 90 % синтезу білка. Це перешкоджає виходу, адсорбцію і проникнення елементарних тілець збудника в здорові клітини. Застосування антибіотиків тетрациклінового ряду є досить ефективним у лікуванні хламідіозу, при умові підтримання терапевтичної концентрації препарату в організмі не менше ніж впродовж 21 доби.

Достатньо ефективними є антибіотики-макроліди, зокрема еритроміцин, причому для лікування вагітних самок препаратом вибору є саме він. Макроліди мають виражену бактеріостатичну дію у відношенні багатьох грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів, включаючи збудників хламідіозу. Еритроміцин назначають впродовж 15-20 діб.

Незважаючи на те, що тетрацикліни і макроліди використовуються декілька десятків років для лікування хламідійної інфекції, ці лікувальні засоби і на сьогодні широко застосовують, відповідно стійкість збудника до них не є суттєвою проблемою.

За даними різних дослідників лікування тетрациклінами та макролідами є ефективним для 75-90 % хворих на хламідіоз тварин.

Фторхінолони за ефективністю у відношенні хламідій та хламідofil дещо поступаються тетрациклінам і макролідам, але їх застосування є доцільним, особливо при змішаних інфекціях і ускладненому хламідіозі. Бактерицидна дія фторхінолонів основана на здатності блокувати фермент ДНК-гіразу, який приймає участь в синтезі ДНК, що призводить до тотальної деструкції ДНК збудника. Крім того, екстрахромосомальна ДНК (плазмідів або R-фактор) паразита також руйнується, і мікроорганізми втрачають

здатність до формування плазмідопосередкованої стійкості до дії різних факторів.

Досить ефективними для лікування хламідіозів є також тіланові препарати, які слід згодовувати разом із концормами впродовж 25-30 діб. Тілозин, як один із представників тіланів, є похідним декількох штамів актиноміцетів. Випускається у формі тілозинтартрату і тілозинфосфату. Препарат активний сам по собі, а при певних умовах утворює десмікозин, який легко очищається і має антибіотичну активність, подібну до активності тілозину. Тілозин і десмікозин подавляють життєдіяльність грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів. Адаптація мікробів до тіланів розвивається повільно, але коли виникає є досить стійкою.

Таким чином, із засобів етіотропної терапії при хламідіозах тварин застосовують: антибіотики тетрациклінового ряду пролонгованої дії (окситетрациклін-200, лімоксин, тетравет, тощо); антибіотики-макроліди (еритроміцин, рокситроміцин (рулід), кларитроміцин (клацид, клабакс, фромілід), азитроміцин (сумамед, зітромакс, азітрал, хемоцин), джозаміцин (вільпрафен); фторхінолонові препарати: байтрил, енрофлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин, тощо); тіланові препарати (тілозін, тіломіцин, фармазін). Указані антимікробні препарати слід застосовувати за схемами розробленими індивідуально для кожного випадку у дозах згідно інструкцій до їх використання.

Необхідно враховувати, що малі дози антибактеріальних препаратів і несистемне лікування можуть викликати у хламідій латентний стан і сприяти виникненню рецидивів.

При лікуванні хламідійних уретритів у самців велике значення має реакція сечі, оптимальний рівень рН якої (6,0-6,5) дозволяє ефективніше проводити антимікробну терапію уретри і сприяє швидкій регенерації ушкодженого епітелію сечовивідних шляхів.

В комплексній терапії хламідіозу, окрім етіотропних засобів, повинні бути передбачені заходи патогенетичного і симптоматичного характеру.

Антибіотикотерапію слід проводити в комплексі з симптоматичним лікуванням, вітамінотерапією (особливо вітамін Е), дієтичною годівлею та гарними умовами утримання.

Тривале застосування антибактеріальних препаратів, необхідне при лікуванні хламідіозу, негативно впливає на «нормальну» мікрофлору різних біотопів організму і перш за все кишкової. Для профілактики дисбактеріозу назначають пробіотики (біфідумбактерін, біфікол, лактобактерін, ПАБК, тощо).

Хламідійна діарея супроводжується втратою рідини і електролітів у організмі, тому для підтримки водного балансу і попередження зневоднення організму в ранні стадії діареї хворим тваринам слід давати всередину електролітні розчини.

Особливої уваги в комплексі заходів антихламідійної терапії заслуговує група препаратів – «Вобензим» і «Флогензим» (розробка німецької фірми «Мукос-Фарма»). Ця група медикаментів належить до нового напрямку у фармакології – так званим препаратам системної ензимотерапії. Препарат являє собою, образно кажучи, коктейль різних ферментів, до якого входять ензими, що стимулюють імунітет, і такі, що блокують синтез мікробної ДНК, ферменти, які інактивують беталактамазу, що виробляється окремими патогенними мікроорганізмами, і токсини які вони продукують. Крім того, ряд ферментів, що містяться у цих препаратах, мають протизапальні властивості і проявляють свою позитивну дію практично при будь-якій патології.

Доцільним є також застосування йодинолу. Випойка новонародженим телятам синього йоду 0,1 % концентрації в дозі 150-250 см³ впродовж трьох днів підряд, а потім через кожні 1-2 доби до появи перших ознак одужання, значно згладжує негативні клінічні прояви порушень і позитивно впливає на процеси травлення. Ягнятам 0,1 % розчин йодинолу задають в дозі 100-150 см³, за тією ж схемою. Йодинолом також можна намащувати пакети

вимені підсисних свиноматок. Позитивний вплив при цьому менш помітний, однак має місце.

Доцільно разом із застосуванням антихламідійних препаратів застосовувати імуноактивні засоби: циклоферон, спленоферон, нуклеїнат натрію, метилурацил, тимоген, тактивін, левамизол, препарати ехінацеї, тощо.

Випойка екстракту елеутерокока телятам в дозі 0,1 см³, а ягнятам і поросятam 0,05 см³ на 1 кг живої ваги протягом 7-10 діб, суттєво сприяє активізації захисних функцій організму тварин.

Існують повідомлення, що добрі результати у дорослого поголів'я великої рогатої худоби дають триразові підшкірні ін'єкції АСД-2 4-5 % концентрації на фізрозчині, або, що ще краще, на сироватці проти сальмонельозу та колібактеріозу в дозі 15-20 см³.

Для контролю ефективності лікування хламідіозів тварин зразки клінічного матеріалу від них слід піддавати лабораторним дослідженням. Надзвичайно важливо розрізняти клінічне і етіологічне вилікування від хламідіозу, причому встановлення етіологічного вилікування є істинним видужанням, оскільки свідчить про повну санацію організму від збудника захворювання.

Придатними для визначення критерію вилікованості вважаються майже усі методи лабораторної діагностики: ізоляція збудника на культурах клітин, курячих ембріонах чи лабораторних тваринах; виявлення специфічних антитіл у сироватці крові (РЗК, РТЗК, РНЗК, РГА, РНГА, ІФА); виявлення антигену хламідій в патологічному матеріалі за допомогою ІФА чи РІФ; виділення ДНК збудника хламідіозу у клінічному та патологічному матеріалах за методом ПЛР чи інших молекулярно-генетичних методів. Разом з тим, серологічні дослідження, через їх досить низьку чутливість, є малоефективними, особливо для свиней. Методи виділення хламідій та хламідофіл на культурах клітин, курячих ембріонах чи лабораторних тваринах потребують проведення багатьох пасажів, що є досить тривалим і

не завжди об'єктивним. Більш виправданим є застосування у визначенні критерію виліковуваності ІФА та РІФ. Найбільш точно ж визначити, яке вилікування від хламідіозу, клінічне чи етіологічне має місце, можна за допомогою ПЛР. Хоча, слід зазначити, що зразки від тварин для дослідження, у цьому випадку, потрібно відбирати не раніше як через 30 діб після закінчення антихламідійної терапії. Такий термін обумовлений тим, що за цей проміжок часу відбувається повна заміна епітелію слизових оболонок, в якому локалізується збудник і при ігноруванні вказаного застереження цілком ймовірно отримання хибнопозитивних результатів, оскільки збереження живого збудника для даного діагностичного тесту несуттєве, а тому виявлення ДНК збудника в досліджуваних зразках можливе навіть після його загибелі.

Застосування комплексної терапії при хламідійних інфекціях дає ефективне виліковування у 80-85 % випадків. У окремих тварин досягти повного звільнення від збудника не вдається. Зазвичай, у цю групу тварин входять особини з хронічною формою перебігу.

ЗАХОДИ ЩОДО ПРОФІЛАКТИКИ І ЛІКВІДАЦІЇ ЗАХВОРЮВАННЯ

Заходи попередження хламідіозу сільськогосподарських тварин проводять згідно з щорічно розробленими протиєпізоотичними планами на рівні районів, областей, країни.

У планах протиєпізоотичних заходів повинні бути передбачені обсяги лабораторних досліджень, визначений ступінь ураженості хламідіозом різних видів тварин, особливо в племінних господарствах та племоб'єднаннях.

З метою охорони тваринницьких об'єктів від занесення збудників хламідійних інфекцій необхідно:

- ферми і промислові комплекси, а також прилеглі до них території утримувати в належному санітарному стані;
- в'їзд на промислові комплекси і ферми забезпечити постійно діючим дезбар'єром і санпропускником;
- усі входи до приміщень обладнати килимками для дезінфекції взуття;
- працівникам тваринництва суворо дотримуватись правил особистої гігієни. З цією метою усі приміщення повинні бути обладнані рукомийниками та забезпечені милом, дезрозчинами для дезінфекції рук і рушниками;
- заборонити ввезення (введення) в господарства тварин з пунктів, неблагополучних щодо хламідійних інфекцій або де відмічаються аборти та мертвонародження нез'ясованої етіології;
- усіх тварин, що завозяться в господарство піддавати обов'язковому 30-добовому карантинуванню з проведенням періодичного клінічного огляду і вибіркової термометрії та поголовної лабораторної діагностики за методом ПЛР на латентну форму хламідіозу. При відсутності можливості проведення ПЛР-аналізу тварини підлягають обов'язковому серологічному дослідженню на хламідіоз, переважно за методом ІФА;

- не менше одного разу на рік досліджувати не менше 25 % племінних корів і нетелів, вівце- та свиноматок на виявлення хламідійної інфекції;
- плідників, які утримуються в племінних підприємствах та господарствах усіх форм власності, досліджувати на хламідіоз (бажано за ПЛР методом) один раз на рік, при умові відсутності завезення тварин з інших господарств. Забороняється комплектування таких господарств плідниками, які вакциновані проти хламідіозу;
- не допускати сумісного утримання тварин різних видів, обмежити контакт з домашніми та синантропними птахами.
- постійно організовувати на тваринницьких фермах заходи щодо знищення гризунів та ектопаразитів;
- з метою усунення несприятливих чинників стресу, сприяючих виникненню і розвитку хламідійних інфекцій, організувати повноцінну годівлю тварин, дотримуватись норми їх розміщення і створювати оптимальний мікроклімат в приміщеннях і належний ветеринарно санітарний стан на пасовищах і в місцях напування тварин;
- у разі виникнення підозри на хламідіоз (аборти та поява мертвонародженого приплоду у самиць, орхіти, баланопостити, зниження якості сперми у плідників, безпліддя, тощо) оперативно провести уточнення діагнозу з використанням епізоотологічного та лабораторних методів досліджень (переважно за ПЛР-методом).

При встановленні діагнозу на хламідійні інфекції з урахуванням епізоотичної ситуації, клінічних ознак, патологоанатомічних змін з обов'язковим підтвердженням лабораторними методами Головний державний інспектор ветеринарної медицини району повинен провести епізоотологічне розслідування спалаху захворювання і разом з керівництвом та спеціалістами ветеринарної медицини господарства (власником худоби) визначити об'єкт (господарство, ферму, фермерське чи селянське подвір'я) та межу неблагополуччя, розробити комплексний план заходів щодо ліквідації

захворювання і подати його районній (міській) держадміністрації для затвердження і прийняття рішення щодо введення карантинних обмежень.

За умов карантинних обмежень забороняються: увезення та вивезення тварин із господарств, за винятком відправки для забою на санітарну бойню; перегрупування тварин без дозволу лікаря ветеринарної медицини; вивіз всіх видів кормів, з якими стикалися хворі тварини (їх дозволяють згодовувати на місці хворим тваринам, або тим, що перехворіли); забій тварин у господарстві на тваринницьких фермах; вільне парування тварин, отримання сперми від хворих плідників; реалізація сперми, яка була отримана від плідників до захворювання без дослідження на контамінацію хламідіями; природне парування тварин; згодовування м'ясоїдним і всеїдним тваринам сирих продуктів від хворих тварин; доступ в тваринницькі приміщення осіб, не пов'язаних з годівлею, доглядом і утриманням тварин.

У неблагополучному щодо хламідіозу тварин господарстві необхідно щодня проводити клінічний їх огляд з обов'язковою термометрією. Хворих тварин слід ізолювати і піддати лікуванню з наступним щепленням антихламідійною вакциною. Вакцинація без санації є неефективною.

Усіх клінічно здорових тварини, які перебувають на території, неблагополучній щодо хламідіозу піддають профілактичній обробці антихламідійними препаратами з наступною вакцинацією.

Клінічно хворих малоцінних бугаїв-, жеребців-, кнурів- та баранів-плідників, слід відправляти на забій. Сперму, контаміновану хламідіями, потрібно знищувати. Високоцінних плідників інфікованих хламідіями чи хламідіофілами піддають лікуванню. Хоча не слід особливо вагатися з вибраковкою навіть цінних племінних тварин – латентних хламідієносіїв, у котрих хвороба набула хронічної форми і практично не підлягає лікуванню, оскільки з часом розміри збитків господарства можуть досягти на порядок, а то й кілька вищих, ніж ціна конкретної племінної тварини. Критерієм можливості використання плідника за його прямим призначенням повинна

бути лише підтверджена лабораторними дослідженнями повна санація організму від збудника хламідіозу.

Реалізація племінного молодняка з оздоровленого господарства здійснюється з дозволу Головного державного інспектора ветеринарної медицини району через 4 місяці після останньої вакцинації при умові підтвердження етіологічної виліковуваності стада методами лабораторної діагностики.

Молоко від корів неблагополучного щодо хламідіозу господарства пастеризують при 70°C протягом 30 хвилин. Молоко від клінічно хворих корів кип'ятять протягом 5 хвилин і використовують для годівлі тварин.

У період неблагополуччя господарства щодо хламідіозу проводять планову дезінфекцію приміщень, а також після кожного аборту або передчасних пологів місця, де виник аборт. Абортовані плоди, плодові оболонки, трупи своєчасно збирають у вологонепроникну тару і знезаражують у біотермічних ямах. Гній, підстилку складають у бурти і знезаражують біотермічним методом. Станки для групового утримання і інші приміщення, де знаходяться хворі телята, ягнята, поросята, лошата, телиці, нетелі і корови, підлягають щоденному чищенню і дезінфекції.

Для дезінфекції приміщень і предметів догляду за тваринами застосовують: гарячий (80°C) 3 % або холодний (20°C) 4 % розчин їдкого натру чи калі, 4 % розчин формаліну, 3 % розчин феносмоліну, розчин хлорного вапна з умістом 3 % активного хлору.

Посудину Дюара для збереження сперми чистять і дезінфікують 0,4-0,5 % розчином естостерилу впродовж 40 хвилин.

Для дезінфекції рук обслуговуючого персоналу використовують 0,5 % розчин хлораміну, 2 % розчин двовуглекислої соди.

Спецодяг і взуття знезаражують у параформаліновій камері.

Забій хворих тварин проводять на санбойні.

Оцінку м'яса, субпродуктів, знезараження шкір, одержаних від тварин, хворих хламідіозом, проводять згідно з «Правилами передзабійного

ветеринарного огляду тварин і ветеринарно-санітарної експертизи м'яса та м'ясних продуктів», затвердженими наказом Державного департаменту ветеринарної медицини Міністерства аграрної політики України від 07.06.2002 № 28 (7.05/4-02) та зареєстрованими в Міністерстві юстиції України 21.06.2002 року № 524/6812.

На неблагополучній щодо хламідіозу вівце-, козефермі стрижку тварин проводять в останню чергу після стрижки овець та кіз благополучних отар. Місця стрижки, інвентар, а також стригальний інструмент по закінченню роботи піддають механічному очищенню та дезінфекції. Отриману шерсть вивозять із господарств в тарі із щільної тканини безпосередньо на підприємства, де переробляють шерсть. Шкури, одержані від забитих або загинувших тварин неблагополучної групи (отари, ферми), дезінфікують.

Обслуговуючий персонал забезпечують спецодягом, мийними та дезінфекційними засобами, з ним проводять роз'яснювальну роботу щодо додержання правил особистої гігієни.

Обмеження із неблагополучного пункту знімають через 30 діб після виведення або одужання хворих тварин підтвердженого негативними результатами лабораторної діагностики (перевагу слід віддавати методу ПЛР) і проведення завершальних ветеринарно-санітарних заходів.

Своєчасна ізоляція хворих тварин, їх ефективне лікування або ж вибраковка зі стада (отари), робота за системою «все пусто – все зайнято» при ретельній і чітко спланованій дезінфекції тваринницьких приміщень є запорукою успіху в оздоровленні стада від хламідіозу. Безсистемність, непрофесійний підхід в боротьбі з хламідіозом – речі недопустимі, бо врешті-решт будуть зведені до пустої трати часу, сил, медикаментозних засобів, фінансових і моральних збитків на санітарних та карантинних заходах.

Слід усвідомити, що хламідійна інфекція, як вид інфекції проміжних форм мікроорганізмів, дуже складна і її важко подолати виключно одним із обраних методів боротьби. Ні окреме якісне і ефективне лікування, ні окремі упереджувальні чи ліквідаційні заходи не дадуть належного результату.

Лише запровадження комплексної лікувально-профілактичної-ліквідаційної системи заходів, робить можливим подолання інфекції в господарстві чи на певній адміністративній території.

ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Авзалов Ф. З. Хламидиоз быков-производителей / Ф. З. Авзалов, И. А. Курбанова // Ветеринария. – М. – 1987. – № 6. – С. 34-36.
2. Акулова Т. А. Особенности эпизоотического процесса и клинического проявления при этиологическом ассоциате с вирусами и бактериями хламидиоза крупного рогатого скота в хозяйствах Луганской области / Т. А. Акулова, С. А. Акулов // Збірник наук. праць Полтавської держ. агр. академії. – 2006. – С. 134-137.
3. Башмакова М. А. Хламидиоз. Современные подходы к диагностике и лечению / М. А. Башмакова, Е. Г. Бочкарев, В. М. Говорун и др. // Сб. научн. труд. РАМН. – 2001. – С. 36 - 72.
4. Болезни лошадей / [Калашник И. А., Горбатенко С. К., Заволока А. А. и др.] ; под ред. И. А. Калашника. – К. : Урожай, 1992. – 256 с.
5. Бортнічук В. А. Хламідіоз великої рогатої худоби / В. А. Бортнічук, О. М. Неволько // Сучасна ветеринарна медицина. – 2007. – № 2. – С. 22-24.
6. Бортничук В. А. Хламидиоз свиней : [справочное пособие] / Бортничук В. А. – К. : Урожай, 1991. – 192 с.
7. Волосянко Е. В. Хламидийная инфекция. Практические аспекты взаимодействия с иммунной системой макроорганизма / Е. В. Волосянко, В. Ю. Кассич, Т. Г. Нестеренко и др. // Ветеринарна біотехнологія. – 2008. – № 13 (2). – С. 57-66.
8. Гранитов В. М. Хламидиозы / Гранитов В. М. – М., 2000. – 191 с.
9. Домейка М. А. Биологическая характеристика хламидий – возбудителя энтерита телят: автореф. дисс. на соиск. науч. степени канд. вет. наук: спец. 16.00.03 «Ветеринарная микробиология и вирусология» / М. А. Домейка. – Тарту, 1986. – 25 с.
10. Інструкція щодо заходів з профілактики та боротьби з хламідіозом сільськогосподарських тварин. Затвердж. Держ. департаментом вет. медицини МАП України 21.12.2004 р., № 142.

11. Караваев Ю. Д. Диагностика, профилактика и меры борьбы с хламидиозами животных / Ю. Д. Караваев, И. А. Калугина, Л. П. Дьяконов и др. // Ветеринария. – М. – 1999. – № 2. – С. 28-30.
12. Каришева А. Ф. Спеціальна епізоотологія: [підручник] / Каришева А. Ф. – К.: Вища освіта, 2002. – С. 386-392.
13. Ксьонз І. М. Диагностика хламідіозу свиней та великої рогатої худоби за методом ПЛР у порівнянні із загальноновживаними методами лабораторної діагностики / І. М. Ксьонз // Ветеринарна біотехнологія (бюлетень ІВМ УААН). – К. – 2004. – № 4. – С. 124-130.
14. Ксьонз І. М. Застосування полімеразної ланцюгової реакції для діагностики хламідіозу свиней: дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 / Ксьонз Ігор Миколайович – Харків, 2002. – 145 с.
15. Ксьонз І. М. Моніторинг хламідійної інфекції тварин сільгосп підприємств Чорнобаївського району Черкаської області / І. М. Ксьонз, В. М. Юхно, О. М. Згура, А. Ф. Курман // Вісник ПДАА. – 2007. – Вип. 4 (47). – С. 123-126.
16. Курбанова И. А. Хламидийный энтерит телят: автореф. на соиск. науч. степ. канд. вет. наук: спец. 16.00.03 «Ветеринарная микробиология и вирусология» / – Казань, 1982. – 18 с.
17. Кужільний Г. Я., Урогенітальні заразні патології: трихомонози, вібріози, хламідіози: [Методичні рекомендації] / Кужільний Г. Я., Абрамов А. В. – К: ЦДЛВМ, 2006. – 49 с.
18. Лобзин Ю. В. Хламидийные инфекции / Лобзин Ю. В., Ляшенко Ю. И., Позняк А. Л. – СПб: ООО «Издательство ФОЛИАНТ», 2003. – 400 с.
19. Мавров И. И. Вопросы терапии урогенитальных инфекций / И. И. Мавров // Актуальные вопросы диагностики и лечения хламидийных инфекций. – М., 1990. – С. 80-82.
20. Меліхов С. В. Мінливість, родова і видова антигенність *Brucella ovis* та серологічна діагностика бруцеляовісної і хламідійної інфекції при змішаному перебігу: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. вет.

- наук: 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія та вірусологія» / С. В. Меліхов – Харків, 2003. – 19 с.
21. Митрофанов П. М. Хламидиоз крупного рогатого скота и меры борьбы с ним / Митрофанов П. М., Семенов В. А., Хамадеев Р. Х. – Чебоксары: РИЦ «Гранит», 2001. – 54 с.
22. Настанова із лабораторної діагностики хламідійних інфекцій сільськогосподарських тварин. Затвердж. Держ. департаментом вет. медицини МАП України 20.12.2006 р.
- 23.
24. Ненич Н. Епізоотична ситуація щодо хламідіозу тварин в Україні / Н. Ненич // Ветеринарна медицина України. – 2008. – № 2. – С. 12-15.
25. Обухов И. Л. Молекулярный механизм паразитизма хламидий и их внутриклеточное развитие / И. Л. Обухов // С.-х. биология. – 1997. – № 2. – С. 86-98.
26. Обухов И. Л. Хламидийные инфекции животных и птиц / И. Л. Обухов // Ветеринария. – 1996. – № 10. – С. 19-25.
27. Павленко М. С. Хламідійний енцефаломієліт великої рогатої худоби (епізоотологія, клініка, етіологія, діагностика): автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. вет. наук : спец. 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія та вірусологія» / М. С. Павленко – К., 1996. – 24 с.
28. Равилов А. З. Хламидиоз животных / А. З. Равилов, Х. З. Гафаров, Р. Х. Равилов // Ж. Ветерин. врач. – 2000. – № 1. – С. 51-58.
29. Равилов Р. Х. Хламидиоз собак и кошек / Рустам Хаметович Равилов. – М. : ООО «Аквариум-Принт», 2006. – 128 с.
30. Руководство по инфекционным болезням; под. ред. проф. Ю. В. Лобзина и проф. А. П. Казанцева. – СПб : ТИТ «Комета», 1996. – 720 с.
31. Самуйленко А. Я. Инфекционная патология животных. Т.V. Хламидиозы / А. Я. Самуйленко, В. Н. Сюрин, Е. С. Воронин. – М. : ВНИИТИБП, 2003. – 207 с.

32. Ушаков В. М. Урогенітальний хламідіоз великої рогатої худоби: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. вет. наук : спец. 16.00.08 «Епізоотологія та інфекційні хвороби» / В. М. Ушаков. – Одеса, 2003. – 18 с.
33. Применение реакции энзиммеченых антител при диагностике хламидиозного аборта овец. / Эпизоотол., эпидемиол., средства диагн., терапии и спец. профил. инф. бол., общих для чел. и животн. : матер. Всесоюзн. конф. / Шафикова Р. А., Гафаров Х. З., Равилов А. З. – Львов, 1988. – С. 107-108.
34. Профилактика хламидиоза в условиях промышленного свиноводства : матер. Межд. науч. конф. посвящ. 125-летию Казанской вет. академии / Хамадеев Р. Х., Хусаинов Ф. М., Равилов А. С. и др. – Казань, 1998. – Ч. 1. – С. 99-100.
35. Хламидиозы сельскохозяйственных животных / [Хазипов Н. З., Гафаров Х. З., Шафикова Р. А. и др.] ; под ред. Н. З. Хазипова, А. З. Равилова. – М. : Колос, 1984. – 223 с.
36. Штефан М. К. Эпизоотология и диагностика хламидиозного аборта овец и коз: автореф. дисс. на соиск. науч. степени канд. вет. наук: спец. 16.00.08 «Эпизоотология и инфекционные болезни» / М. К. Штефан – М., 1985. – 24 с.
37. Jorgensen D. M. Gestational psittacosis in a Montana sheep rancher / D. M. Jorgensen // Emerg. Infect. Dis. – 1997. – V.3. – P. 191-194.
38. Mardh P. A., Paavonen J., Puolakkeinen M. Chlamydia / P. A. Mardh, J. Paavonen, M. Puolakkeinen. – New York and London, 1990. – 398 p.
39. Papp J. R. Localization of chronic Chlamydia psittaci infection in the reproductive tract of sheep / J. R. Papp, P. E. Shewen // J. Infect. Dis. – 1996. – Vol. 174, № 6. – P. 302.
40. Rasmussen S. J. Secretion of proinflammatory by epithelial cells in response to Chlamydia infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial

- pathogenesis / S. J. Rasmussen, L. Eckmann, A. J. Quayle, L. Shen et al. // J. Clin. Invest. – 1997. – Vol. 99. – P. 77-87.
41. Schacter J. Chlamydial infections / J. Schacter, M. Grossmann // Ann. Rev. Med. – 1981. – № 32. – P. 45-61.
42. Stephens R. S. Chlamydia. Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity / R. S. Stephens – Washington : ASM Press, 1999. – P. 143-146.