

Endo's environment at five spots. The dishes were then incubated at 37 °C for 20–24 hours. The colonies were counted for the consequent determination and quantification of the aerobe bacterial air contamination including the coliform bacteria. The histopathological research were conducted according to the standard method.

Research results. Clinically the disease manifested with signs of functional respiratory system failure, serous inflammation of infraorbital sinuses, joint edema, and lameness. During the autopsy we encountered serous air sacculitis, pleuropneumonia, serous joint inflammation and more rarely splenomegaly, fibrinous perihepatitis. The E.coli isolates were most vulnerable to enrofloxacin, doxycycline, colistin and florfenicol, and O. rhinotracheale – to norfloxacin, levofloxacin, doxycycline and amoxycylav, which was noted during the containment of this mixed infection.

Conclusion. 1. Registered clinical course of escherichiosis and ornitobacteriosis in turkey-poults 6–8 weeks of age.

2. The effectiveness of the therapeutic efforts was related to the administration of enrofloxacin and doxycycline antibiotics for 10 days with concurrent use of complex vitamin-mineral-amino acid supplement "Biosupervit" and poultry premises sanitation using iodine monochloride.

Keywords: *Escherichia, ornitobacter, concurrent course turkeys*

УДК: 619:616.98:579.882.11:616-076

КОНЦЕНТРУВАННЯ, ОЧИСТКА ТА ВИЗНАЧЕННЯ ПЛАВУЧОЇ ЩІЛЬНОСТІ ЕПІЗООТИЧНОГО ІЗОЛЯТУ ЗБУДНИКА ХЛАМІДІОЗУ «V.OLEXANDRIVKA/11»

Ісаков М. М., Герілович А. П., Сапко С. А., Болотін В. І.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна, e-mail: admin@vet.kharkov.ua

У статті наведені результати власних досліджень щодо концентрування, очищення та визначення плавучої щільності збудника хламідіозу з використанням швидкісного ультрацентрифугування в градієнті щільності сахарози. Було визначено що плавуча щільність ізоляту «V.Olexandrivka/11» становить 1,194 г/см³.

Ключові слова: *антиген, ультрацентрифугування, плавуча щільність, збудник хламідіозу*

На розвиток тваринництва негативно впливає виникнення маловивчених інфекцій, діагностика яких пов'язана з певними труднощами, що, в свою чергу, ускладнює проведення ефективних лікувально-профілактичних заходів. До таких хвороб відносяться хламідіози, що вражають практично усі види сільськогосподарських тварин і наносять господарству велику економічну шкоду [1]. Не дивлячись на впровадження таких нових методів діагностики, як ПЛР у ветеринарній практиці основним і масовим дослідженням на хламідіоз у тварин залишається ретроспективні методи РЗК та ІФА, тому розробка сучасних діагностичних тест-систем неможлива без використання високоочищеного антигену збудника хламідіозу [2, 3]. На даний момент набули широкого розповсюдження, використання рекомбінантних антигенів. Використання рекомбінантних білків та синтетичних пептидів має ту перевагу, що працювати з ними найбільш безпечніше (при отриманні антигену, персонал не контактує із збудником хвороби), спрощується хід очистки та підвищується частота антигену разом з тим підвищується специфічність тест-системи [4]. Однак отримання та очищення рекомбінантних антигенів потребує застосування коштовного обладнання та реагентів, а також висококваліфікованих спеціалістів.

Метою наших досліджень було напрацювання культури клітин, інфікованої епізootичним ізолятом хламідії, та отримання очищеного препарату для подальшої роботи зі створення вітчизняних тест-систем для діагностики хламідіозу тварин.

Матеріали та методи. Для отримання хламідійного антигену використовували виробничий штам хламідій «V.Olexandrivka/11», який в минулих дослідженнях був протестований на лабораторних тваринах [5]. Роботу проводили за допомогою слідуєчого обладнання: ультрацентрифуги MSE Superspeed 65 (Англія), оптична проточна ячейка Uvicord sII (Швеція LKB), рефрактометр фірми Аббе. Моношар клітин McCoу, який виріс на покривному склі у пеніцилінових флаконах, покривали 1 см³ робочого розчину М.В. 500000 ДЕАЕ-декстрана (30 мкг/см³), який видаляли після 30 хв. контакту з клітинами за кімнатної температури. Інфекційний матеріал струшували після чого вносили по 400 мкл у пеніцилінові флакони, нашаровуючи на моношар клітин. Флакони центрифугували на горизонтальному роторі (3000 об/хв 1 год. за температури (30±0,5) °С) вносили 2 см³ ізолюючого середовища (з додаванням циклогексиміду 0,6 мкг/мсм³). Культуру клітин інкубували за температури (37±0,5) °С.

Концентрація культуральної рідини інфікованої збудником хламідіозу Було отримано 200 см³ культуральної рідини інфікованої «V.Olexandrivka/11». У 60 см³ центрифужні пробірки бакет-ротора 3×70 см³ MSE вносили по 15 см³ 25 % сахарози (приготованої на TSE-буфері), далі на неї нашаровували по 45 см³ культурального середовища, центрифугували впродовж 2 год. За температури (5±0,5) °С, 23 тис. об/хв. (70000×г). Осад ресуспензували TSE-буфером з кінцевим об'ємом 3 см³.

Очистка антигену збудника хламідіозу у градієнті сахарози. Було приготовано три градієнта по 23 см³ від 10–55 % сахарози на TSE-буфері, у пробірках бакет-ротора 3×25 см³ MSE. На градієнти нашаровували по 1 мл суспензії. Центрифугували 3 год. (за температури плюс 5 °С) при 25 тис. об/хв. Градієнт видавлювали з пробірок, підшарування на дно 65 % сахарозу. Сканували профілі седиментації через проточну оптичну ячейку Uvicord sll (Швеція LKB) та збирали фракції (1,4 см³). З фракцій відбирали аліквоти для визначення вмісту сахарози в кожній пробірці, на рефрактометрі Аббе. За цими даними на графіках будували шкалу щільності (S, г/см³) для визначення плавучої щільності збудника хламідіозу. Зібрані фракції об'єднувались, розводились охолодженим TSE-буфером та переосаджувалися у MSE бакет-роторі 6×16,5 см³ за температури (5±0,5) °С на протязі 1 год., при 28 тис. об/хв. (90000×g). Осад ресуспендували у невеликому об'ємі TSE-буфера. Перевірку отриманого антигену проводили за реакції зв'язування комплементу (РЗК) (мікротетом) з використанням «Набора для діагностики хламидіоза сільськогосподарських тварин в РСК и РДСК» на базі лабораторії вивчення бруцельозу ННЦ «ІЕКВМ» та позитивних референтних сироваток до групового хламідійного антигену.

Результати досліджень. Використовували четвертий пасаж епізоотичного ізоляту «V.Olexandrivka/11», який було виділено від хворого на хламідіоз теляти та адаптовано до перещеплюваної культури клітин McCoу. Концентрування та очищення хламідійного антигену проводили за допомогою градієнтного ультрацентрифугування. При цьому інфекційний титр був на рівні 4,2 log₂ ЕЛД_{50/см³}. Під час цих досліджень також встановлювали плавучу щільність хламідій шляхом побудови графіка, який враховував дані оптичного сканування профілю градієнта та зміну його щільності. Максимуми поглинання фракцій переносили на графік і таким чином встановлювали значення плавучої щільності (рис. 1).

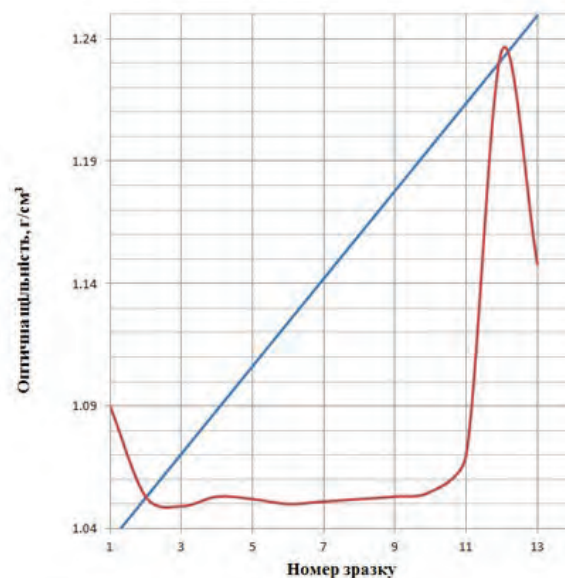


Рис. 1. Графік ультрацентрифугування штаму хламідії «V.Olexandrivka/11» у градієнті щільності сахарози

Графік зміни щільності градієнта будували трендовою лінією користуючись даними рефрактометричного вимірювання фракцій сахарози (від 10 % до 55 %), накладаючи її на результати оптичного сканування профілю цього градієнта (табл. 1).

Таблиця 1 – Результати рефрактометричного вимірювання фракцій сахарози

№ пробірки	% сахарози	S, г/см ³	№ пробірки	% сахарози	S, г/см ³	№ пробірки	% сахарози	S, г/см ³
1	9,7	1,037	17	52,9	1,245	33	10,6	1,025
2	14,2	1,056	18	11,8	1,046	34	14,6	1,060
3	17,1	1,068	19	17,0	1,068	35	17,5	1,071
4	19,3	1,078	20	19,2	1,078	36	20,3	1,085
5	21,5	1,088	21	21,7	1,089	37	23,4	1,094
6	24,6	1,102	22	24,7	1,103	38	26,4	1,109
7	28,1	1,119	23	28,5	1,121	39	29,7	1,125
8	31,3	1,113	24	31,7	1,135	40	32,6	1,139

9	34,4	1,148	25	34,5	1,148	41	35,3	1,151
10	37,5	1,163	26	37,8	1,164	42	38,0	1,172
11	40,3	1,178	27	40,6	1,179	43	41,1	1,183
12	42,7	1,190	28	43,7	1,195	44	43,8	1,196
13	44,9	1,202	29	46,5	1,210	45	45,8	1,204
14	47,3	1,215	30	49,2	1,225	46	48,4	1,213
15	49,3	1,226	31	51,3	1,237	47	51,1	1,221
16	51,4	1,237	32	53,8	1,250	48	53,4	1,223

Було отримано дві фракції, у першу з них увійшли зразки, які накопичувалися у пробірках №№ 10–14, 26–29, 42–45, у другу – №№ 16, 31, 47. Зібрані фракції були об'єднані та розбавлені охолодженим TSE-буфером та потім розчин переосаджували у MSE бакет-роторі 6×16,5 см³ за температури (5±0,5) °C на протязі 1 год, при 28 тис. об/хв. (90000×g). Осад ресуспендували у невеликому об'ємі TSE-буфера.

Згідно отриманих результатів встановлено, що перший пік дорівнював 1,194 г/см³, який відповідає 43,7 % розчину сахарози. У цьому діапазоні знаходився другий пік білку, який відповідав 45 % розчину сахарози. Таким чином для подальших досліджень обрали зразки фракцій № 10–14, 26–29, 42–45. Концентрація білку в цих зразках складала 0,25±0,03 мг/см³. Для оцінки активності та визначення робочого титру отриманого антигену проводили РЗК з референтними позитивними та негативними сироватками. За результатами цих тестувань встановлено, що оптимальна робоча концентрація антигену складала 25 мкг/см³, при цьому активність за РЗК була 1:128. Таким чином, очищений антиген виявився високоактивним по відношенню до позитивних референтних сироваток.

Висновки. 1. Плаваюча щільність ізоляту хламідії «V.Olexandrivka/11» в градієнті сахарози становить 1,194 г/см³.

2. Накопичення антигену збудника хламідіозу та ультрацентрифугування його в градієнті щільності сахарози (10–55 %) дозволяє отримати очищений та концентрований препарат, який може бути використаний в розробці конкурентоспроможної тест-системи для діагностики хламідіозу.

Список літератури

1. Бортничук, В.А. Хламидиоз свиней [Текст] / В.А. Бортничук – К.: Урожай, 1991. – С. 192
2. Евстифеев, В.В. Усовершенствование средств ретроспективной диагностики хламидиоза животных [Текст] / В.В. Евстифеев, Л.А. Барбарова, Д.И. Нигматулина // Ветеринарна медицина – 2013. - № 97. – С. 88-90.
3. Ксьонз, І.М. Хламидиоз тварин: монографія [Текст] / І.М. Ксьонз – Полтава: Оріяна, 2012. – С. 318.
4. Hoelzle L.E. Recombinant major outer membrane protein (MOMP) of Chlamydia abortus, Chlamydia pecorum, and Chlamydia suis as antigens to distinguish chlamydial species-specific antibodies in animal sera/ Hoelzle L.E., Hoelzle K., Wittenbrink M.M.// Vet. Microbiology-Vol. 103, #1–2, 2004, P. 85–90.
5. Данілова І.С. Вивчення імуногенних властивостей хламідійного інактивованого препарату в лабораторних умовах [Текст] / І.С. Данілова // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб. - Х., 2014. - Т.І, Вып.99. - С.50-52

CONCENTRATION, PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF BUOYANT DENSITY OF THE EPIZOOTIC CHLAMYDIA STRAIN «V. OLEXANDRIVKA / 11»

Isakov M. M., Gerilovych A. P., Sapko S. A., Bolotin V. I.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov, Ukraine

Despite the introduction of molecular genetic methods in veterinary practice the main mass in research for chlamydia are retrospective methods CFT and ELISA. Therefore, the development of modern diagnostic test systems is not impossible without the use of highly purified antigen of chlamydia pathogen.

The article presents the results of propriety research related to the concentration, purification and buoyant density estimation of chlamydia pathogen using a high-speed ultracentrifugation in sucrose density gradient. Two fractions were obtained by purification of the antigen; the protein concentration in these samples was 0.25±0.03 mg/cm³. Verification of the antigen was carried out using complement fixation test (CFT) (micromethod) using the “Kit for diagnosing chlamydial infection in animals by CFT” and positive reference sera to chlamydial group antigen. The results of these tests found that the optimum antigen concentration is 25 mg / cm³, and the activity was 1:128 in CFT. It was determined that the buoyant density of the antigen prepared from isolate «V. Olexandrivka / 11» is 1.194 g/cm³.

Thus, it was obtained a highly purified antigen of chlamydia that characterizes by high activity to the reference sera, which can be used for the development of retrospective diagnostic test systems.

Keywords: antigen, ultracentrifugation, floating density, pathogen Chlamydia