Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

УКРАЇНСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК

ПОЛТАВСЬКИЙ ФІЛІАЛ ІНСТИТУТУ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

На правах рукопису

# Ксьонз Ігор Миколайович

УДК 619:579.882.11

Застосування ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ для діагностики хламідіозу свиней

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія

## Дисертація

 на здобуття наукового ступеня

кандидата ветеринарних наук

**Науковий керівник:**

Стегній Борис Тимофійович,

доктор ветеринарних наук, старший

науковий співробітник

Полтава – 2002

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень 4

Вступ 6

Розділ I. Огляд літератури за темою і вибір напрямків досліджень 14

Розділ II. Матеріали і методи досліджень. 38

2.1. Виклад загальної методики і основних методів досліджень 38

2.2. ПЛР-метод діагностики хламідіозу 39

2.2.1. Виділення ДНК із клінічного зразка 40

2.2.2. Постановка ПЛР (ампліфікації) 40

2.2.3. Реєстрація результатів 41

2.3. Реакція зв’язування комплементу 43

2.3.1. Постановка головного досліду РЗК 47

2.4. Виділення та культивування хламідій на курячих ембріонах та лабораторних білих мишах 49

2.4.1. Обробка патологічного (клінічного) матеріалу 49

2.4.2. Зараження курячих ембріонів. 49

2.4.3. Зараження лабораторних білих мишей 50

2.5. Мікроскопічні дослідження 51

Розділ III. Результати власних досліджень 53

## 3.1. Визначення рівня гомології нуклеотидних послідовностей гена, що кодує 16S рибосомальної РНК Сhlamydia trachomatis, Сhlamydia suis та Сhlamydiophila psittaci..........................................................................53

3.2. Індикація збудника хламідіозу в препаратах біологічної промисловості методом полімеразної ланцюгової реакції....................56

3.3. Лабораторний дослід по експериментальному відтворенню хламідіозу свиней на поросятах-гнотобіотах......................................... 64

3.3.1. Результати досліду 69

3.4. Застосування ПЛР-аналізу для прижиттєвої діагностики хламідіозу свиней 82

3.5. Розробка і оцінка ефективності лікувально-оздоровчих заходів від хламідіозу свиней за результатами ПЛР-аналізу. ..................................116

3.6. Аналіз та узагальнення результатів .....130

Висновки 143

Список використаних джерел 146

Додатки 157

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ВБ – велика біла (порода свиней)

ВРХ – велика рогата худоба

ВПФ – вільний від патогенної флори

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

д.п.з. – діб після зараження

ЕТ – елементарне тільце

ІРЗК – інгібіторна реакція непрямого зв’язування комплементу

ІФА – імуноферментний аналіз

кДНК – кодуюча ДНК

к.с.п. – колективне сільськогосподарське підприємство

КЕ – курячі ембріони

мкл – мікролітр

мРНК – мітохондріальна РНК

НДІ – науково-дослідний інститут

нм – нанометр

н.п. – нуклеотидна послідовність

НРІФ – непряма реакція імунофлуоресценції

ОД – одиниці дії

ПАФ – приватна аграрна фірма

ПМ – полтавська м’ясна (порода свиней)

п.н. – пара нуклеотидів

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

РА – реакція аглютинації

РГА – реакція гемаглютинації

РГГА – реакція гальмування гемаглютинації

РЗК – реакція зв’язування комплементу

РМА – реакція мікроаглютинації

РН – реакція нейтралізації

РНГА – реакція непрямої гемаглютинації

РНЗК – реакція непрямого зв’язування комплементу

РНК – рибонуклеїнова кислота

РОЕ – реакція осідання еритроцитів

РТ – ретикулярне тільце

РТЗК – реакція тривалого зв’язування комплементу

СВК – сільськогосподарський виробничий кооператив

CПОП – сільськогосподарське приватно-орендне підприємство

СТФ – свино-товарна ферма

ТАЕ – тріс + ацетат + етилендіамінотетраацетат

ТОВ – товариство з обмеженою відповідальністю

УААН – Українська академія аграрних наук

ХДЗВА – Харківська державна зооветеринарна академія

ВСТУП

Хламідіоз свиней (Chlamydiosis suum) посідає досить значне місце в інфекційній патології даного виду тварин. Його збудником є мікроорганізм, який у 1980 році рішенням юридичної комісії Міжнародної асоціації мікробіологічних товариств було виключено з царства вірусів і віднесено до класу Microtatobiotes, де він займав самостійний таксон Chlamydiales, родини Chlamydiaceae, роду Chlamydia. На той час було відомо чотири види цих мікроорганізмів: C.psittaci, C.pecorum, C.pneumoniae та C.trachomatis. Розвиток молекулярної біології дозволив виявити нові мікроорганізми з характерним для хламідій циклом розвитку, і разом з визначенням генома вже відомих збудників це призвело до необхідності чергового перегляду їх номенклатури. Згідно з новою таксономічною класифікацією збудник хламідіозу відносять до порядку Chlamydiales родини Chlamydiaceae, до складу якої входить два роди: Сhlamydia і Chlamydіophila. Рід Сhlamydia включає такі види: Сhlamydia trachomatis, Сhlamydia suis і Сhlamydia muridarum. До роду Сhlamydiophila входить 6 видів: Сhlamydiophila psittaci, Сhlamydiophila pneumoniae, Сhlamydiophila pecorum, Сhlamydiophila caviae, Сhlamydiophila felis і Сhlamydiophila abortus. До мікроорганізмів, які викликають захворювання свиней належать Сhlamydia suis, Сhlamydiophila psittaci, Сhlamydiophila pneumoniae, Сhlamydiophila pecorum та Сhlamydiophila caviae.

Хламідії мають вигляд дрібних грам-негативних коків з характерною для прокаріотів структурою, які містять ДНК і РНК. Їм притаманний унікальний цикл внутрішньоклітинного розвитку, що включає дві стадії життєвого циклу існування мікроорганізму: елементарне тільце (ЕТ) – високоінфекційна форма збудника розміром 250-300 нм і ретикулярне (ініціальне) тільце (РТ) – малоінфекційна форма розміром 600-1500 нм. Також виявлені перехідні тільця – проміжні форми існування хламідій [1, 2, 3].

Основним джерелом хламідійної інфекції свиней є свиноматки та кнури-плідники, які передають збудника потомству. Здорові тварини заражаються аерогенним, аліментарним та насамперед статевим шляхами. У дорослих тварин у більшості випадків хламідії не викликають гострого перебігу, а зумовлюють довготривалу латентну інфекцію.

Найбільш характерною ознакою хламідіозу у свиноматок є аборти і народження мертвих та нежиттєздатних поросят. Передвісників абортів або патологічних опоросів у свиноматок, як правило, не буває. У кнурів хламідіоз також має переважно хронічний перебіг, а коли з’являються такі симптоми як орхіти, баланопостити, поліартрити, то хвороба знаходиться вже в тій стадії, коли проведення лікувальних заходів не дає бажаних результатів. Таким чином, виникає ситуація, при якій в період безсимптомного перебігу захворювання відбувається інтенсивне перезараження репродуктивного свинопоголів’я, що має особливо тяжкі наслідки для племінних свиногосподарств, оскільки втрата репродуктивної здатності свиноматок та кнурів-плідників зводить нанівець багаторічну напружену селекційну роботу. Також досить значні економічні збитки несуть свиногосподарства за рахунок недоодержання приплоду та високої летальності (до 70 %) серед молодняку перших днів життя. Існує також і загроза здоров’ю людей при контакті з хворими на хламідіоз тваринами [4].

У зв’язку з цим вирішальне значення має своєчасна діагностика даного захворювання. Але саме діагностика хламідіозу становить виключну проблему для лабораторій ветеринарної медицини через те, що існуючі методи лабораторної діагностики далекі від досконалості і не відповідають сучасним вимогам.

На даний час одним з найбільш важливих прямих методів виявлення хламідій вважається виділення і культивування збудника на 6-7-денних курячих ембріонах, що знаходяться в стадії розвитку, і на лабораторних тваринах. Останній є загальноприйнятим еталоном для інших методів лабораторної діагностики. Але він має ряд істотних недоліків, що ускладнюють його використання в лабораторіях ветеринарної медицини. Перш за все, це високий ризик інфікування персоналу, тому роботи по виділенню збудника необхідно проводити у спеціальній лабораторії. Метод культивування трудомісткий, займає багато часу (необхідно провести від трьох до шестити пасажів на КЕ або лабораторних тваринах, що забирає час від 2 до 5 тижнів). Успіх досліджень в значній мірі залежить від швидкості доставки патматеріалу в лабораторію. Транспортування матеріалу також потребує певних умов доставки. Необхідність присутності живого збудника у зразках патологічного матеріалу, що підлягають аналізу, значно знижує чутливість методу на завідомо позитивних зразках [3]. До того ж, остаточний результат при культуральному методі одержують за допомогою мікроскопічних досліджень мазків-відбитків з жовткових міхурів або хоріоналантоїсних оболонок курячих ембріонів, або з біоптатів лабораторних тварин, на яких пасажувався збудник. Самий же мікроскопічний метод діагностики, в свою чергу, є в деякій мірі суб’єктивним, і його результати знаходяться у прямій залежності від якості приготовлених зразків. До того ж і культуральний і мікроскопічний методи практично дають можливість постановки лише групового діагнозу. Серологічні методи дослідження (РЗК, РТЗК, РГА, РНГА, РМА, РН, тощо), хоча і дають змогу постановки індивідуального діагнозу, але недостатньо чутливі через те, що так само, як і вищезгадані діагностичні методи, потребують достатньо високої концентрації збудника в організмі і практично неефективні на ранніх стадіях захворювання [5].

Виходячи з цього, гостро постала проблема пошуку альтернативних методів лабораторної діагностики хламідіозу свиней, що відповідали б сучасним вимогам.

**Актуальність теми.** Впровадження нових високочутливих та точних лабораторних методів діагностики хламідіозу свиней у практичну роботу лабораторій ветеринарної медицини є однією з умов благополуччя свинарських господарств щодо даного інфекційного захворювання.

Аналіз джерел вітчизняної та закордонної літератури показує, що найбільш поширеними методами лабораторної діагностики хламідіозу свиней є виділення та культивування збудника на курячих ембріонах або лабораторних тваринах, морфологічні методи виявлення хламідій та застосування серологічних реакцій. Всі ці методи не є достатніми, і об’єктивний діагноз можна поставити лише комплексно з урахуванням епізоотичної ситуації і результатів патологоанатомічних досліджень [1 - 4, 6].

В останні роки в лабораторну діагностику інфекційних захворювань тварин і людини, у тому числі і хламідіозу, впроваджуються новітні методи, такі як імуноферментний аналіз (ІФА) та ДНК-технології, зокрема полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) [3, 7 - 13].

Впровадження методу ПЛР-аналізу для діагностики хламідіозу свиней в практику лабораторій ветеринарної медицини України забезпечує швидку і точну постановку діагнозу на будь-яких стадіях захворювання та виявлення тварин-хламідієносіїв, що є одним з найважливіших складових в системі заходів щодо своєчасної ліквідації джерел хламідійної інфекції в свинарських господарствах та недопущення її розповсюдження.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота проводилася згідно з завданнями державної тематики науково-дослідних робіт Полтавського філіалу Інституту ветеринарної медицини Української академії аграрних наук, номер державної реєстрації 0197U012760 “Розробити та удосконалити засоби діагностики та профілактики хламідіозу свиней”(1996-2000 рр.) та 0101U002306 “Вивчити патогенез, удосконалити комплекс заходів діагностики, профілактики і боротьби з хламідіозом тварин”(2001-2005 рр.). Автор є одним із відповідальних виконавців цих тематик.

**Мета і задачі дослідження.** Метою даної роботи є науково-експериментальне обгрунтування застосування методу полімеразної ланцюгової реакції для діагностики хламідіозу свиней з використанням наборів реагентів, призначених для діагностики хламідіозу людини, розробка методів відбору та попередньої обробки проб клінічного та патологічного матеріалів від свиней різних статевих та вікових груп для цього діагностичного методу з метою одержання стабільних результатів, розробка ефективних схем оздоровчих заходів при вказаній інфекції, впровадження даних розробок у ветеринарну практику.

Для досягнення мети необхідно було вирішити такі задачі:

- визначити принципову можливість застосування ПЛР-методу для діагностики хламідіозу свиней з використанням праймерів та інших реагентів ПЛР-набору, призначеного для діагностики хламідіозу людини при випробуванні в експериментальних та виробничих умовах;

- розробити методи відбору проб та попередньої обробки проб патологічного матеріалу від аборт-плодів, загиблих та забитих свиней для проведення діагностики хламідіозу ПЛР-методом;

- розробити методи відбору та попередньої обробки проб клінічного матеріалу від свиней для прижиттєвої діагностики хламідіозу ПЛР-методом;

- розробити схеми лікувально-оздоровчих заходів від хламідіозу свиней з контролем їх ефективності методом ПЛР;

- розробити рекомендації по застосуванню методу ПЛР для діагностики хламідіозу свиней.

Об’єкт дослідження – хламідіоз свиней.

Предмет дослідження – молекулярно-генетична тест-система для виявлення збудника хламідіозу свиней.

**Наукова новизна одержаних результатів**. Вперше в Україні застосовано, науково та експериментально обгрунтовано діагностичний аналіз на хламідіоз свиней методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням наборів реактивів, призначених для діагностики хламідійних інфекцій людини.

В експериментальних умовах відтворено хламідіоз на поросятах-гнотобіотах з контролем розвитку інфекційного процесу за допомогою загальноприйнятих методів лабораторної діагностики та ПЛР.

Встановлено значну перевагу ПЛР в порівнянні з загальноприйнятими методами лабораторної діагностики хламідіозу свиней щодо індикації збудника хвороби.

Розроблено і запропоновано методи відбору проб клінічного та патологічного матеріалу від свиней різних вікових та статевих груп для ПЛР-аналізу.

Розроблено і відпрацьовано схеми лікувально-оздоровчих заходів від хламідіозу свиней при застосуванні методу ПЛР для контролю їх ефективності.

**Практичне значення одержаних результатів**. В результаті проведених досліджень теоретично і експериментально обгрунтована доцільність застосування полімеразної ланцюгової реакції для діагностики хламідіозу свиней усіх статево-вікових груп на будь-якій стадії розвитку хвороби, в тому числі на ранніх стадіях захворювання, при латентному перебігові та для виявлення хламідієносіїв, що має особливе значення для племінних господарств.

На підставі лабораторних та господарських дослідів доведено принципову можливість використання методу полімеразної ланцюгової реакції з використанням наборів реактивів, призначених для діагностики хламідійних інфекцій людини, з метою ефективної лабораторної діагностики хламідіозу свиней.

За матеріалами досліджень розроблені “Методичні рекомендації по діагностиці хламідіозу свиней методом полімеразної ланцюгової реакції з застосуванням набору фірми “Літех”, які затверджені Державним департаментом ветеринарної медицини Міністерства аграрної політики України. До Держдепартаменту ветеринарної медицини Міністерства аграрної політики України подано низку пропозицій до проекту “Інструкції по заходах з профілактики і ліквідації хламідіозу сільськогосподарських тварин”.

Запропоновані і впроваджені схеми лікувально-оздоровчих заходів від хламідіозу свиней в 10-ти господарствах різних форм власності Полтавської та Дніпропетровської областей.

**Особистий внесок здобувача.** Експериментальні дослідження, аналіз отриманих результатів та їх узагальнення виконані автором особисто. Освоєння і опрацювання методу ПЛР для діагностики хламідіозу свиней проведені в творчій співдружності з фахівцями лабораторії генетики Інституту свинарства ім. О.В. Квасницького УААН.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації були повідомлені та обговорені на:

- I-й міжвузівській конференції молодих вчених і аспірантів “Інфекційна патологія молодняку сільськогосподарських тварин і птиці” 9-11 червня 1999 р., м.Суми;

- Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених “Стан та перспективи розвитку ветеринарної науки”, 6-7 жовтня 1999 р., м.Харків;

- Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених “Проблеми патології тварин та шляхи їх вирішення”, 11 жовтня 2000 р., м.Київ;

- III-й Міжнародній конференції "Біоресурси та віруси", 11-15 вересня 2001 року, м.Київ;

- ІІ-й Всеукраїнській науково-практичній конференції ветеринарних патологів, 21–24 листопада 2001 р., м.Київ;

* засіданнях вченої ради Інституту ветеринарної медицини УААН (1997-2002 рр), м.Київ;
* міжлабораторному засіданні Інституту ветеринарної медицини УААН , 13 вересня 2001 р, м.Київ.

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 8 робіт, з них статей у фахових наукових виданнях 5 (3 одноосібних), в т.ч. в журналах “Ветеринарна медицина України” (м.Київ); “Тваринництво України” (м.Київ), “Вісник Сумського державного аграрного університету”, “Вісник Полтавського державного сільськогосподарського інституту”, в міжвідомчому тематичному науковому збірнику ІЕКВМ УААН “Ветеринарна медицина” (м.Харків), збірнику наукових праць ХДЗВА (м.Харків), матеріалах Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених: “Проблеми патології тварин та шляхи їх вирішення” (м.Київ), тезах ІІІ-ї Міжнародної конференції “Біоресурси і віруси” (м.Київ).

ВИСНОВКИ

1. У дисертації наведено нове вирішення проблем лабораторної діагностики хламідіозу свиней. Існуючі насьогодні методи недостатньо ефективні, що в значній мірі пов’язано з їх низькою чутливістю і специфічністю, тривалістю та трудомісткістю проведення досліджень.

Впровадження методу ПЛР для діагностики хламідіозу в практику лабораторій ветеринарної медицини дає можливість постановки точного діагнозу на дане захворювання за короткий час (4 – 4,5 год) при дослідженні проб клінічного або патологічного матеріалу, відібраного від свиней усіх вікових і статевих груп в будь-якій стадії розвитку інфекційного процесу, включаючи латентний перебіг, а також виявлення хламідієносіїв.

2. Порівняльним аналізом секвенованих послідовностей нуклеїнових кислот гена, який кодує 16S рибосомальної РНК Chlamydia trachomatis, Chlamydia suis і Сhlamydiophila psittaci, нами виявлено рівень гомології ≈
93 %, що свідчить про консервативність вказаного гена для різних видів збудника хламідіозу.

3. Дослідженням специфічних та контрольних хламідійних антигенів для РЗК і орнітозних алергенів для внутрішньошкірної проби, 6 проб патологічного матеріалу від поросят-гнотобіотів з досліду по експериментальному відтворенню хламідіозу та 530 проб біоматеріалу від 442 свиней різних вікових та статевих груп встановлено, що для діагностики хламідіозу свиней за методом ПЛР є придатним набір реагентів “Полімік”, ТУ-9398-405-17253567-96, виробництва Московської науково-виробничої фірми “Літех”, призначений для діагностики хламідійних інфекцій людини, в якому підібрана система праймерів, комплементарних ділянкам генів, що кодують 16S рибосомальної РНК хламідії.

4. Дослідження специфічних та контрольних хламідійних антигенів для РЗК і орнітозних алергенів для внутрішньошкірної проби свідчать про високу чутливість і специфічність методу ПЛР. Індикація ДНК хламідій відбувається в розведеннях специфічних антигенів у 1000 – 8000 разів вищих за граничний титр розведень в РЗК при відсутності в контрольних препаратах.

5. Порівняння результатів досліджень на хламідіоз проб клінічного матеріалу від інфікованих свиней за загальновживаними методами і результатами ПЛР свідчать, що чутливість РЗК складає ≈ 27 %, методу виділення і культивування хламідій на білих мишах та курячих ембріонах ≈ 90 %, мікроскопічного ≈ 70 % в порівнянні з результатами ПЛР, які прийняті за 100 %.

6. Встановлено, що для прижиттєвої діагностики хламідіозу за методом ПЛР придатні зскрібки з слизової оболонки статевих органів або прямої кишки та супернатант 10–20 % відцентрифугованих супензій сперми або зависі фекалій, а від загиблих та забитих свиней і аборт-плодів - супернатант відцентрифугованих 10 % суспензій з біоптатів (шматочки головного мозку, легень, селезінки, печінки та нирок) на фізіологічному розчині.

7. В експерименті по штучному відтворенню хламідіозу на поросятах-гнотобіотах встановлено, що розвиток інфекції протікає без прояву клінічних ознак (температура тіла і показники загального аналізу крові знаходяться в межах фізіологічної норми) та видимих патологоанатомічних змін в органах. Разом з тим, гістологічними дослідженнями встановлено, що хламідії викликають набряк мозкової тканини, потовщення стінок кровоносних судин та розширення навколосудинних просвітів головного мозку, розширення міжальвеолярних перетинок та потовщення стінок кровоносних судин легень.

8. На основі розроблених схем лікувально-оздоровчих заходів при хламідіозі свиней і контролю їх ефективності по індикації збудника за методом ПЛР встановлено, що високий терапевтичний ефект забезпечує
2-3-кратне внутрім’язове введення антибіотиків тетрациклінового ряду пролонгованої дії з інтервалом в 5 – 7 діб.

9. За результатами впровадження методу ПЛР для виявлення хламідій у свиней розроблені “Методичні рекомендації по діагностиці хламідіозу свиней методом полімеразної ланцюгової реакції з застосуванням набору фірми “Літех”, які затверджені Головою Державного департаменту ветеринарної медицини Міністерства аграрної політики України.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Хламидиозы сельскохозяйственных животных / Хазипов Н.З.,
 Гафаров Х.З. Шафикова Р.А. и др. – М.: Колос, 1984. - 223 с.
2. Бортничук В.А. Хламидиоз свиней: Справочное пособие. - К.: Урожай, 1991.- 192 с.
3. Обухов И.Л. Хламидийные инфекции животных и птиц // Ветеринария. - 1996.- № 10.- С. 19-25.
4. Ветеринария. Большой энцеклопедический словарь // Гл. ред.
В.П. Шишков. – М.: НИ “Большая Российская энциклопедия”, 1998. – С. 556.
5. Павленко М.С. Хламідійний енцефаломієліт великої рогатої худоби (епізоотологія, клініка, етіологія, діагностика): Автореф. дисс. ...канд. вет. наук: 16.00.03 / Націон. аграрн. ун-т. – К., 1996. – 24 с.
6. Малохатько Л. Хламідіоз // Ветеринарна медицина України.- 1998.-
№ 3.- С. 13.
7. Домейка М.А. Биологическая характеристика хламидий – возбудителя энтерита телят: Автореф. дисс. … канд. вет. наук: 16.00.03 // Тарту, 1986. - 25 с.
8. Никулина В.Г., Нагиева Ф.Г., Анджапаридзе О.Г. и др. Индикация антихламидийных антител в человеческих сыворотках в конкурентном иммуноферментном анализе с использованием моноклональных антител // Дерматология и венерология. - 1993. - № 6. - С. 26-33.
9. Караваев Ю.Д., Калугина И.А., Дьяконов Л.П. и др. Диагностика, профилактика и меры борьбы с хламидиозами животных // Ветеринария.- 1999.- № 2. - С. 28-30.
10. Thierie D., Wittenbrink M.M., Fischer D., Krauss H. Evaluation of the polymerase chain reaction (PCR) for detection of Chlamydia psittaci in abortion material from ewes. // Int J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.- 1992. - Vol. 277(4). - P. 53.
11. Papp J.R., Shewen P.E. Localization of chronic Chlamydia psittaci infection in the reproductive tract of sheep. // J.Infect.Dis. - 1996.- Vol. 174, № 6. -
P. 302.
12. Erlich H.A. PCR technology. Stockton Press, New York. - 1989. - 527 p.
13. Вишняков И.Ф., Цыбанова Л.Я., Молчанова Т.В. Иммуноферментный анализ при диагностике инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных // Вопросы ветеринарной вирусологии, эпизоотологии и микробиологии: Тез. докл. научн.
конф. - Покров. - 1983. - С. 66 - 75.
14. Настенко В.Д., Гавшин О.О., Хандкарян В.М. і ін. Новий біотехнологічний метод діагностики хламідіозу свиней та його переваги // Ветеринарна медицина України – 2001. - № 3. - С. 36 - 37.
15. Терских И.И. Орнитоз и другие хламидийные инфекции. - М.: Медицина, 1979. - 223 с.
16. Anagnoste D., Sarateanu D., Surdan C., Sorodoc G. Repartitia germenilor ornitoza-psittacozici in onl de gaina embrionat. Studii si secretari intramicrobiol. - "Acad. R. P. R." – 1962. - Vol. 13. - № 6. - P. 725 - 730.
17. Costerion J.W., Poffenroth L., Wilton J.C. The effect of purification on the ultrastructure and infectivity of egg attenuated Chlamydia psittaci GBC // Can. J. Microbiol. - 1975. - № 21. - P. 1448 - 1463.
18. Francis R.D., Gordon F.B. Cultivation of viruses of the psittacosis group in the allantoic cavity of chick embryos. // Proc. Soc. Exp. Biol. - 1975. -
Vol. 59. - P. 270 - 272.
19. Piraino F., Abel C. Plaque assay for Psittacosis Virus in monolayers of chick embryo fibroblasts // J. Bact. - 1964. - Vol. 87. - A. 6.- P. 1503.
20. Бортничук В.А., Иванченко Г.А. Электронно-микроскопическое исследование хламидий, выделенных от свиней, в клетках желчного мешка куриных эмбрионов // Микробиол. журнал. - 1984. - Т. 46. -
Вып. 1. - С. 51 - 56.
21. Фирсова Г.Д. Испытание на белых мышах патогенных свойств хламидий, выделенных от свиней // Сб. научн. тр. Донск. СХИ. - 1980. - Вып. 2.- С. 123.
22. Фирсова Г.Д. Диагностика и мероприятия по борьбе с хламидиозом свиней // Меры борьбы с болезнями сельскохозяйственных животных Северного Кавказа. - Новочеркасск, 1986 (1987) – С. 27 - 28.
23. Справочник по болезням свиней / Под.ред. А.И.Собко и И.Н.Гладенко.- К., 1981. - С. 118 - 119.
24. Guscetti F., Hoop P., Schiller I., Corboz L., Sydler T., Pospischil A. Experimental enteric infection of gnotobiotic piglets with a Chlamydia psittaci strain of avian origin // J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. - 2000. - Vol. 47. - № 8. - P. 72.
25. Guscetti F., Schiller I., Sydler T., Corboz L., Pospischil A. Experimental Chlamydia psittaci serotype 1 enteric infection in gnotobiotic piglets: histopathological, immunohistochemical and microbiological findings // Vet. Microbiol. - 1998. - Vol. 62. - № 4. - P. 251 - 263.
26. Rogers D.G., Andersen A.A. Conjunctivitis caused by a swine Chlamydia trachomatis like organism in gnotobiotic pigs // J. Vet. Diagn. Invest. - 1999.- Vol. 11, № 4. - P. 341 - 344.
27. Higaschi N. Electron microscopyc studies on the vode of reproduction of trachoma virus and psittacosis virus in Cell Cultures // Ex. Md. Pathol. - 1965. - Vol. 4.- P .24 - 29.
28. Kordova N., Wilt J.C., Burnet L., Martin C. Electron microscopy of the in vivo internalization of virulent Chlamydia psitt. - G. B. C. Strain // Can. J. Microbiol. - 1975. - Vol. 21. - P. 945 - 953.
29. Armstrong J.A., Valentine R.C., Fildes C. Structure and replication of the trachoma agent in Cell Culture as shown by electron microscope // J. Gen. Microbiol. - 1963. - Vol. 30, № 1. - P. 59 - 73.
30. Gordon F.D., Nichols R.L., Quan A.L. Immunotyping of Chlamydia trachomatis with fluorescent antibody: Retention of immunospecificity in Cell Culture passage, and typing with infected cell monolayers // Trachoma and related disorders caused by chlamydial agents. – Excerpta - Medica. - 1971.- P. 358 - 362.
31. Zolenkova L., Strauss J. Fluorescent antibodies in the diagnosis of psittacosis // Cs.Epidem. - 1963. - Vol. 12. - P. 140 - 145.
32. Овчинников Н.М., Беднова В.Н., Делекторский В.В. Лабораторная диагностика заболеваний, передающихся половым путем. – М., 1987. - С. 269 - 277.
33. Набли Б., Таризо М. Окрашивание микроорганизмов группы ПЛТ по модифицированному методу Гименеж // Бюл. ВОЗ. - 1967. - Т. 37. - № 1.- С. 155 - 156.
34. Faye P., Charton A., Le Layce C., Bernard C. Application de techniques de fluorescence et d’immunofluorescence al’etude morphologique et immunologique de guelques souches de virus de L’avortement de brevis // Bull. Acad. Vet. France. - 1968. - Vol. 41. - № 9. - P. 363.
35. Сологуб Т.И., Болоцкий И.А., Щербань Г.П. Результаты РСК с орнитозным антигеном и сыворотками крови свиноматок, давших мертворожденный приплод // Сб. научн. тр. СКЗНИВИ. - 1973. -
Вып. 16. - С. 37 - 38.
36. Щербань Н.Ф., Фирсова Г.Д. Хламидиоз свиней. - Новочеркасск, 1977. - 257 с.
37. Бортнічук В.А., Яцишин А.Й., Затуловський Б.Г. Ензоотичний аборт свиней (природа захворювання) // Вісн. с.-г. науки. - 1977. - № 9. -
С. 96 - 99.
38. Wehr I., Blohm H., Schmidt V. Untersuchungen zur Bedeutung der Chlamydien bei der infektiosen Keratokonjunctivitis des Rindes. Wissenchschaftl. - Zeitschrift. - 1980. - Vol. 29. - № 1. - P. 61 - 65.
39. Stors J., Thornlev W. Serologische und etiologische studien uber die intestinale psittacose – lymphogranuloma – infektion der Schafe // Zbl. Veterinärmed.-1960. - Vol. 13. - № 14. - P. 34.
40. Богданас И.И. Серолого-диагностические исследования при изучении влияния хламидий на распространение заболеваний телят // Материалы отчетно-научн. конф. Литов. НИИ ветеринарии. - Вильнюс. - 1973. –
С. 5 - 73 .
41. Mulis K.B., Faloоna F.A. In Methods in ensymology. Academic Press. - London. - 1987. - Vol. 155. - P. 50 - 335.
42. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. New Biotechnological methods: PCR. // Science. - 1985. -
Vol. 230. - P. 1350.
43. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. White T.J. PCR protocols, a guide to methods and applications. Acad. Press. San Diego, California. - 1990. -
231 p.
44. Erlich H.A. PCR technology. Stockton Press, New York. - 1989. - 337 p.
45. Wright D.K., Manos M.M. In PCR protocols: a guide to methods and applications. Acad.Press. San Diego, California. - 1990. - 231 p.
46. Saiki R.K., Scharf F., Faloona F. et al. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // Ibid. - 1985. - Vol. 230. - P. 1350 - 1354.
47. Southern E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // J. Mol. Biol. - 1975. - Vol. 98. - P. 503 - 517.
48. Saiki R.K., Gelfand D., Staffel S. et al. Primer-directed enzymatic amplification with a thermostable DNA polymerase // Science. - 1988. -
Vol. 239. - P. 487 - 491.
49. Херрингтон С., Макги Дж. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. - М.: Мир, 1999. - 558 с.
50. Глазко В.И. ДНК-технологии животных. - под ред. А.А.Созинова. – К., 1997. - 173 с.
51. Rychlik W., Spencer W.J., Rhoads R.E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro // Nucl. Acids Res. - 1990. - Vol. 18, № 21, - P. 6409 - 6412.
52. Duning A.M., Nalmud P., Humphries S.F. Errors in the polimerase chain reaction // Nucl. Acids Res. - 1988. - Vol. 16. - P. 10 - 393.
53. Stephens R.S., Kalman S., Lammel C. et al. Chlamydia trachomatis genom sequenizing // Science. - 1998. - Vol. 282. - P. 754 - 759.
54. Palmer L., Falkow S. A common plasmid of Chlamydia trachomatis // Plasmid. - 1986. - Vol. 16. - P. 52 - 62.
55. Hatt C.,Ward M.E., Clarke I.N. Analysis of the entire nucleotide sequence of the cryptic plasmid of Chlamydia trachomatis serovar L1. Evidence for involvement in DNA replication // Nucleic Acids Res. - 1988. - Vol. 16. -
P. 40 - 67.
56. Peterson E.M., Markoff B.A., Schachter J.de la Maza L.M. The 7,5-Kb plasmid present in Chlamydia trachomatis is not essential for the growth of this microorganism // Plasmid. - 1990. - Vol. 23.- P. 8 - 144.
57. Ricci S., Cevenini R., Cosco E. et al. Transcriptional analysis of the Chlamydia trachomatis plasmid pCT identifies temporally related transcripts, anti-sense RNA and sigma 70-selected promoters // Mol. Gen. Genet. - 1993. - Vol. 237. - P. 26 - 318.
58. Solbrig M.V., Wong M.L., Stephens R.S. Developmental stage-specific plasmid supercoiling in Chlamydia trachomatis // Mol.Microbiol. - 1990. - Vol. 4 - P. 15 - 41.
59. Rasmussen S., Timms P. Detection of Chlamydia psittaci using DNA probes and the polymerase chain reaction // FEMS Microbiol. Lett. - 1991. -
Vol. 15. - № 61. – P. 73 - 169.
60. Caldwell H.D., Kromhout J., Schachter J. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis // Infect. Immun. - 1981. - Vol. 31. - P. 76 - 1161.
61. Newhall W.J., Jones R.B. Disulfide-linked oligomers of the major outer membrane protein of chlamydiae // J. Bacteriol. - 1983. - Vol. 153. - P. 998 - 1001.
62. Batteiger B.E., Newhall W.J., Jones R.B. Differences in outer membrane proteins of the lymphogranuloma venereum and trachoma biovars of Chlamydia trachomatis // Infect.Immun.- 1985.- Vol. 50. - P. 94 - 488.
63. Hackstadt T., Todd W.J., Caldwell H.D.Disulfide-mediated interaction of the Chlamydiae major outer membrane protein: role in the differentiation of Chlamydiae //J.Bacteriol. - 1985. - Vol. 161.- P. 25 - 31.
64. Hatch T.P., Miceli M., Sublett J.E. Synthesis of disulfide-bonded outer membrane proteins during the developmental cycle of Chlamydia psittaci and Chlamydia trachomatis. // J.Bacteriol. - 1986. - Vol. 165. - P. 85 - 379.
65. Stephens R.S., Sanchez-Pescador R., Wagar E.A. et al. Diversity of Chlamydia trachomatis major outer membrane protein genes // J. Bacteriol. - 1987. - Vol. 169. - P. 38 - 85.
66. Zhang Y.X., Stewart S., Joseph T. et al. Protective monoclonal antibodies recognize epitopes located on the major outer membrane protein of Chlamydia trahomatis // J.Immunol. - 1987. - Vol. 138. - P. 81 - 575.
67. Stephens R.S., Wagar E.A., Shoolnik G.K. High-resolution mapping of serovar-specific and common antigenic determinants of the major outer membrane protein of Chlamydia trahomatis // J. Exp. Med. - 1988.-
Vol. 167. - P. 8 - 31.
68. Baehr W., Zhang Y.X., Joseph T., et al. Mapping antigenic domains expressed by Chlamydia trachomatis major outher membrane protein
genes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1988. - Vol. 85. - P. 400 - 404.
69. Yuan Y., Zhang Y.X., Watkins N.G., Caldwell H.D. Nucleotide and deduced amino acid suquences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 Chlamydia trachomatis serovars // Infect. Immun. - 1989. - Vol. 57. - P. 9 - 40.
70. Zhang Y.X., Stewart S.J., Calduell H.D. Protective monoclonal antibodies to Chlamydia trachomatis serovar – and serogroup-specific major outer membrane protein determinants // Infect. Immun. - 1989. - Vol. 57. -
P. 8 - 636.
71. Allen J.E., Cerrone M.C., Beatty P.R., Stephens.R.S. Cysteine-rich outer membrane proteins of Chlamydia trachomatis display compensatory sequence changes between biovariants // Mol. Microbiol. -1990. - Vol. 4. - P. 50 - 1543.
72. Башмакова М.А., Бочкарев Е.Г., Говорун В.М. и др. Хламидиоз. Современные подходы к диагностике и лечению: Сб. научн. труд. РАМН. - 2001. С. - 36 – 72.
73. Su H., Watkins N.G., Zhang Y.X., et al. Chlamydia trachomatis – host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin // Infect. Immun. -1990. - Vol. 58. - P. 25 - 1017.
74. Kaltenboeck D., Kousoulas K.G., Storz T. Detection and strain differentiation of Chlamydia psittaci mediated by a two – step polymerase chain reaction // J. Clin. Microbiol. - 1991. - Vol. - 29, N 9. - P. 75 - 1969.
75. Koehler J.E., Birktlund S., Stephens R.S. Overexpression and surface localization of the Chlamydia trachomatis major outer membrane protein in Escherichia coli // Mol. Microbiol. – 1992. - Vol. 6. - P. 94 - 1087.
76. Kaltenboeck B., Storz J. Biological properties and genetic analysis of the omp A locus in clamydiae isolated from swine //Am. J. Vet. Res. - 1992. - Vol. 53. – N 9. - P. 7 - 1482.
77. Black C.M., Tharpe J.A., Russell H. Distinguishing Chlamydia species by restriction analysis of the major outer membrane protein gene // Mol. Cell Probes. – 1992. - Vol. 6. - N 5.-P. 395 - 400.
78. Kaltenboeck B., Kousoulas K.G., Storz J. Two-step polymerase chain reactions and restriction endonuclease analyses detect and differentiate omp A DNA of Chlamydia spp // J. Clin. Microbiol. - 1992. - Vol. 30. - N 5. -
P. 104 - 1098.
79. Murdin A.D., Su H., Manning D.S., et al. A poliovirus hVbrid expressing a neutralization epitope from the main outer membrane protein of ChlamVdia trachomatis is highlV immunogen. // Infect. and Immun. - 1993. - Vol. 61. - P. 14 - 406.
80. Kaltenboeck B., Kousoulas K.G., Storz J. Structures of and allelic diversitV and relationships among the major outer membrane protein (omp A) genes of the four chlamydial species. // J. Bacteriol. - 1993. - Vol. 175. - N 2.-
P. 487 - 502.
81. Yang C.L., Maclean I., Brunham R.C. DNA sequence polymorphism of the Chlamydia trachomatis omp 1 gene // J. Infect. Dis. - 1993. - Vol. 168. -
N 5. - P. 30 - 1225.
82. Swanson A.F., Kuo C.C. Binding of the glycan of the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis to Hela cells // Infect. Immun. - 1994. - Vol. 62. - P. 8 - 24.
83. Kuo C.C., Takahashi N., Swanson A.F. et al. An N-linked high mannose type oligosaccharide, expressed at the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis, mediates attachment and infectivity of the microorganism to Hela cell // J.Clin.Invest. - 1996. - Vol. 98. - P. 8 – 281.
84. Su H., Raymond L., Rockey D.D. et al. A recombinant Chlamydia trachomatis major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epitelial cells. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1996. - Vol. 93. - P. 8 - 111.
85. Sukes J.F., Studdert V.P., Anderson G. et al. Comparison of Chlamydia psittaci from cats with upper respiratory tract disease by polymerase chain reaction analysis of the omp A gene. // J. Vet. Rec. -
1997. - Vol. 140. - N 12. - P. 3 - 310.
86. Martin J.L., Cross G.F. Comparison of the omp 1 gene of Chlamydia psittaci between isolates in Victorian Koalas and other animal species // Aust.
Vet. J.- 1997. - Vol. 75. - N8. - P. 82 - 579.
87. Schiller I., Koesters R., Weilenmann R. et al. Polymerase chain reaction (PCR) detection of porcine Chlamydia trachomatis and ruminant Chlamydia psittaci serovar 1 DNA in formalin-fixed intestinal specimens from swine. // Zentralbl. Veterinarmed. - 1997. - Vol. 44. - N 3. - P. 91 - 185.
88. Kaltenboeck B., Schmeer N., Schneider R. Evidence for numerous omp 1 allels of porcine Chlamydia trachomatis and novel chlamydial species obtained by PCR // J. Clin. Microbiol. - 1997. - Vol. 35. - N 7. - P. 1835 - 41.
89. Everett K.D. Chlamydia and Chlamydiales: more than meets the eye. // Vet. Microbiol. - 2000. - Vol. 75. - N 2.- P. 26 - 109.
90. Demkin V.V., Edelstein M.V., Zimin A.L. et al. Detection of sequence variation in PCR-amplified fragments of omp-2 gene from three species of the family Chlamydiaceae using agarose gel electrophoresis containing bis benzimide – PEG // FEMS Microbiol. Left. - 2000. - Vol. 184. - N 2. - P. 8 - 215.
91. Wagar E.A., Stephens R.S. Developmental – form-specific DNA-binding protein in Chlamydia spp. // Infect. Immun. - 1988. - Vol. 56. - P. 84 - 167.
92. Allen J.E., Stephens R.S. Identification by sequence analysis of two-site posttranslational processing of the cysteine-rich outer membrane protein 2 of Chlamydia trachomatis serovar L 2 // J. Bacteriol. - 1989. - Vol. 171. -
P. 91 - 285.
93. Raulston J.E., Davis C.H., Schmiel D.H. et al. Molecular characterization and outer membrane association of a Chlamydia trachomatis protein related to the hsp 70 family of proteins // J. Biol. Chem. -1993. - Vol. 268. - N 23. - P. 139 - 147.
94. Rockey D.D., Rosquist J.L. Protein antigens of Chlamydia psittaci present in infected cells but not detected in the infectious elementary body. // Infect.Immun. – 1994. - Vol. 62. - P. 106 - 112.
95. Rockey D.D., Heinzen R.A., Hackstadt T. Cloning and characterization of a Chlamydia psittaci gene coding for a protein localized in the inclusion membrane of infected cells. // Mol. Microbiol. - 1995. - Vol. P. 26 - 617.
96. Ting L.M., Hsia R.C., Haidaris C.G., Bavoil P.M. Interaction of outer evelope proteins of Chlamydia psittaci GPIC with the Hela cell surface // Infect. Immun. – 1995. - Vol. 63. - P. 8 - 360.
97. Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний. Материалы 2-ой Всерос. конф. - М. -
1998. - 167 с.
98. Pollard D.R. et al. New oligonucleotide primers based on PCR-amplified 119 b.p. DNA fragment of gene coding 16S r RNA in Chlamydia trachomatis // Mol. Cell Prob. - 1989. - Vol. 53. - P. 45 - 431.
99. Takahashi T., Masuda M.,Tsurumo T., Mory Y., Takashima I., Hiramune T., Kikuchi N. Phylogenetic Analyses of Chlamydia psittaci strains from birds based on 16 S r RNA Gene Sequence // J. Clin. Microbiol. - 1997. - Vol.
35. - N 11. - P. 2908 - 2914.

100 ТУ-9398-405-17253567-96. Наборы реагентов для обнаружения ДНК Chlamydia trachomatis, Mycoplasma Hominis, Ureaplasma urealyticum (ПОЛИМИК) в биологических пробах методом полимеразной цепной реакции. Инстр. по примен. - M., НПФ "ЛИТЕХ". - 1996. - 4 с.

101 Применение полимеразной цепной реакции в диагностике инфекционных заболеваний. Методы лечения. Материалы 1-oй Всероссийской конференции. - Сочи. - 1996. - 160 с.

102 Everett K.D. et al. Rapid detection of the Chlamydiaceae and other families in the order Chlamydiales: three PCR tests. J. Clin Microbiol. - 1999. -
Vol. 37. - P. 575 - 580.

103 Meijer A. Use of the broad range PCR assay for the identification and classification of bacteria in the order Chlamydiales.- 4 th European Chlamydia Congress " Chlamydia 2000". Abstract book. Helsinki, 2000.
Р. 1 - 46.

104 Меркурьева Е.К. Биометрия в селекции и генетика сельскохозяйственных животных.- М.: Колос, 1970. - 423 с.

1. Плохинский Н.А. Руководство по биометрии для зоотехников.- М., 1969.- С. 76 - 86.

Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>



