

РАЗДЕЛ 3.3.

ПТИЦЫ

ГЛАВА 3.3.1.

ХЛАМИДИОЗ ПТИЦ

РЕЗЮМЕ

Хламидиоз птиц вызывает бактерия Chlamydophila psittaci. Хламидиоз птиц, возникающий у людей и всех видов птиц, изначально назывался пситтакоз, но позднее был введен термин орнитоз для обозначения болезни, возникающей у домашних и диких птиц, в то время как для названия болезни, возникающей у попугаев, оставили термин «пситтакоз». Эти болезни схожи, если ими заражается человек. Род Chlamydia был недавно разделен на два рода: Chlamydia и Chlamydophila. Предложение объединить их в один род Chlamydia находится на рассмотрении, но оно еще не принято на момент публикации данной статьи. Птичьи штаммы Chlamydophila psittaci включают минимум пятнадцать генотипов, некоторые из них коррелируют с видами птиц, от которых их обычно выделяют. Хламидиоз, так как он возникает у млекопитающих естественным образом и не передается от птиц, вызывается абсолютно разными видами организма.

В зависимости от вирулентности хламидийного штамма и защиты птицы-хозяина, хламидии вызывают перикардит, конъюнктивит, синусит, аэросаккулит, пневмонию, латеральный носовой аденит, перитонит, гепатит и сплениит. Генерализованные инфекции вызывают повышение температуры, истощение, вялость, диарею и иногда шок и смерть. Рекомендуются специальные условия работы в лаборатории (уровень биобезопасности 3), так как штаммы хламидиоза птиц могут вызывать серьезное заболевание и возможную смерть у человека. Течение болезни у попугаев изучено лучше всего, а инфекция у уток и индеек вызывает особую озабоченность, так как передача болезни людям происходит обычно во время работы с птицами и убоя. Диагностика хламидиоза птиц требует выделения и идентификации организма, демонстрации хламидий в тканях или четырехкратного повышения уровня специфических гуморальных антител, а также проявления типичных клинических признаков.

Идентификация возбудителя: *Выделение хламидий требует инокуляции яиц с развивающимися эмбрионами или клеточных культур и тестирования на хламидии с помощью цитохимического окрашивания или методов иммуногистохимии. Прямая инокуляция проб в культуры клеток предпочтительна, так как они также чувствительны к выделению большинства птичьих штаммов хламидий, как и куриные эмбрионы. Клеточные культуры затем окрашивают в реакции иммунофлюоресценции или другими подходящими красителями в соответствующих случаях с целью демонстрации наличия включений.*

Обычно проводят гистохимическое окрашивание мазков-отпечатков печени, сердца и селезенки. Метод позволяет проводить быструю диагностику, но требует опыта.

Для выявления хламидий у птиц используются твердофазные иммуноферментные анализы (ИФА), разработанные для выявления антигена *Chlamydophila trachomatis* у людей. Многие из ранних тестов были разработаны с использованием моноклональной и поликлональной антисыворотки к эпитопам липополисахарида, некоторые из которых можно было использовать для других грамотрицательных бактерий. Их применение при скрининге отдельных птиц вызывает сомнение, так как им недостает чувствительности и специфичности.

Молекулярные средства (традиционная полимеразная цепная реакция или ПЦР в реальном времени, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов, ДНК микрочип или секвенирование) и иммуногистохимическое окрашивание гистологических срезов широко используются в диагностических лабораториях. Все эти методы - экспресс-методы и не требуют живого агента. Современные ПЦР тесты нацелены на *ompA* ген или рибосомные РНК гены (16S–23S). Существуют валидированные и стандартизированные протоколы как для видоспецифичных, так и для специфичных для семейства анализов. Гнездовая ПЦР и ПЦР в реальном времени могут быть такими же чувствительными, как и выделение. В последнее время становится популярным применение иммуногистохимического окрашивания гистологических срезов, поскольку недавно было разработано и появилось в доступе оборудование для автоматизированного окрашивания.

Серологические тесты: Реакция связывания комплемента (РСК) - стандартный серологический тест на антитела к хламидиям. Модифицированная прямая РСК может применяться с большинством сывороток. Антигеном является группоспецифический липополисахаридный антиген, присутствующий во всех штаммах. Возникновение высоких титров в РСК у большинства особей в стадии с клиническими признаками предположительно является признаком активной инфекции. Демонстрация четырехкратного повышения титров у отдельной птицы считается диагностическим критерием текущей инфекции.

Можно применять другие серологические тесты, такие как ИФА, реакция латекс-агглютинации, реакция агглютинации элементарных частиц, реакция микроиммунофлюоресценции и реакция иммунодиффузии в агаровом геле. Эти тесты имеют ценность в особых случаях и могут заменить РСК; однако, пока данные о достоверности и воспроизводимости в сравнении с другими тестами отсутствуют.

Требования к вакцинам: Не существует коммерческих вакцин против хламидиоза у домашней птицы. Единственный современный метод контроля-использование антибиотиков. *Chlamydophila psittaci* восприимчивы к определенным антибиотикам. Решение о выборе препарата принимается самостоятельно каждой страной.

А. ВВЕДЕНИЕ

Хламидиоз птиц вызывает бактерия *Chlamydophila psittaci*. Болезнь у птиц изначально называлась пситтакоз, но позднее был введен термин орнитоз, с целью дифференциации болезни, возникающей у домашних и диких птиц и болезни, возникающей у попугаев. Два синдрома на данный момент считаются одним и тем же заболеванием (Andersen & Vanrompay, 2003). Их разделение в прошлом основано на предположении, что у людей орнитоз протекает в более мягкой форме, чем пситтакоз.

Однако следует отметить, что болезнь у людей, инфицируемых от индеек и уток, часто такая же тяжелая, как и болезнь, которой заражаются от попугаев.

Заражение птиц *Chlamydophila psittaci* происходит одинаково во всем мире, и болезнь обнаруживали у 465 видов птиц (Kaleta & Taday, 2003). Вспышки хламидиоза птиц у попугаев и на фермах по содержанию домашней птицы являются причиной значительного экономического ущерба (Европейская Комиссия, 2002). Инфекция может стать причиной системной болезни, иногда со смертельными случаями. Клинические признаки обычно неспецифические и сильно различаются по своей тяжести в зависимости от вида и возраста птицы, а также штамма хламидий. Хламидиоз птиц может вызывать вялость, гипертермию, нетипичные выделения, выделения из носа и рта и снижение яйценоскости. Уровни смертности также сильно отличаются. У непродуктивных домашних птиц наиболее частые клинические признаки: конъюнктивит, истощение и потеря веса, диарея, желтоватые экскременты, синусит, биливердинурия, выделения из носа, чихание, слезотечение, нарушение дыхания (Mohan, 1984). Многие птицы, особенно старые попугаи, могут не демонстрировать клинических признаков; несмотря на это, они часто могут выделять возбудителя в течение долгого периода времени. Аутопсия пораженных птиц часто демонстрирует мультифокальный некротический гепатит, увеличение печени и селезенки, фибринозный аэросаккулит, перикардит и перитонит (Andersen & Vanrompay, 2003; Vanrompay *et al.*, 1995). Гистологические поражения указывают на инфекцию, но не являются патогномоничными, кроме случаев, когда присутствующие хламидии поддаются обнаружению.

Таксономия семейства *Chlamydiaceae* сейчас находится на рассмотрении (Kuo *et al.*, 2011), но в контексте этой главы разделение на два рода *Chlamydia* и *Chlamydophila* было сохранено (Everett *et al.*, 1999a). Род *Chlamydia* включает *C. trachomatis* (человек), *C. suis* (свиньи) и *C. muridarum* (мыши, хомяки), *C. psittaci* (птицы и пр.), *C. felis* (кошки), *C. abortus* (овцы, козы, КРС), *C. caviae* (морские свинки), *C. pecorum* (овцы, КРС) и *C. pneumonia* (человек и другие). В то время, как большинство из этих организмов являются высокоспецифичными в отношении своих хозяев, *C. pneumonia* и *C. psittaci* имеют более широкий круг хозяев. О последнем сообщалось, что он возникает не только у людей и птиц, но и у КРС, овец, свиней, лошадей и других животных (Sachse *et al.*, 2009a).

Птичьи штаммы, ассоциированные с хламидиозом птиц, принадлежат видам *Chlamydophila psittaci*. До недавнего времени выделяли девять различных генотипов на основе гена *ompA*, кодирующего основной белок наружной мембраны (МОМР). Считается, что семь из этих "классических сероваров" в основном возникают в определенном отряде или классе птиц и два у хозяев, не являющихся птицами, то есть генотип А у попугаев, В у голубей, С у уток и гусей, D у индеек, Е у голубей, уток и других, Е/В у уток, индеек и голубей, F у мелких попугаев, WC у КРС и M65 у грызунов. Большинство птичьих генотипов также спорадически выявлялись в изолятах, выделенных при зоонозной передаче инфекции людям, в частности А, В и Е/В (Gaede *et al.*, 2008; Heddema *et al.*, 2006; Vanrompay *et al.*, 2007). В тоже время были введены подгруппы для трех более гетерогенных генотипов, а именно А-VS1, А-6BC, А-8455, ЕВ-Е30, ЕВ-859, ЕВ-ККСР, D-NJ1, D-9N и были предложены шесть новых предполагаемых генотипов, чтобы охватить штаммы, которые не были до этого типированы, а именно 1V, 6N, Mat116, R54, YP84 и CPX0308, тем самым доводя общее количество генотипов до 15 (Sachse *et al.*, 2008).

Недавние исследования указывают на то, что *C. psittaci* не единственный хламидийный агент, возникающий у птиц (Gaede *et al.*, 2008; Laroucau *et al.*, 2009). Таксономическая

классификация этих новых агентов внутри или вне семейства *Chlamydiaceae* все еще требует определения и их эпидемиологическая важность все еще не совсем ясна. По-видимому, они широко распространены среди уток, кур и голубей, а некоторые штаммы действуют как факультативные патогены. Важно использовать диагностические методы, которые способны дифференцировать эти организмы и *C.psittaci*.

Антибиотики на данный момент единственное средство борьбы. *Chlamydophila psittaci* восприимчивы к ряду антибиотиков: их выбор зависит от страны. Наиболее часто используются хлортетрацилин, доксицилин и другие тетрациклины. Необходимо поддерживать лечение в течение длительного времени. В отношении непродуктивных птиц, рекомендуемый период - 45 дней (Smith *et al.*, 2005; Vanrompay *et al.*, 1995).

1. Риск зоонозов и требования к биобезопасности

Штаммы хламидиоза птиц могут инфицировать людей, и поэтому следует обращаться с ними осторожно в условиях биозащиты 3 (Smith *et al.*, 2005), как описано в Главе 1.1.4. *Биобезопасность и биозащита: Стандарты управления биологическими рисками в ветеринарной лаборатории и виварии*. В большинстве случаев заражение происходит через вдыхание инфекционных аэрозолей. В то время как болезнь у попугаев лучше всего изучена, инфекция у уток и индеек вызывает особую озабоченность, так как передача болезни людям происходит обычно во время работы с птицами и при убойе (Dickx *et al.*, 2010). Послеубойные обследования инфицированных птиц и работа с культурами должны проводиться в ламинарных боксах или с использованием другого необходимого защитного оборудования. Следует проводить соответствующие процедуры деконтаминации зоонозных агентов, так как заражение человека может стать результатом кратковременного воздействия бактерий. Инкубационный период обычно составляет 5 – 14 дней, однако известны и более долгие периоды инкубации. Инфекции человека варьируют от бессимптомных до серьезных системных заболеваний с интерстициальной пневмонией и энцефалитом. Болезнь редко бывает смертельной у пациентов, получающих надлежащее лечение, поэтому знание об опасности и ранняя диагностика очень важны. Инфицированные люди обычно страдают от головной боли, озноба, общего недомогания и миалгии с признаками респираторных проблем или без них. Поражение легких широко распространено; однако аускультаторные результаты могут показаться нормальными или не позволяющими оценить весь масштаб поражения. Диагностика может быть сложной и обычно проводится посредством тестирования парных сывороток на наличие антител к хламидиям с помощью реакции фиксации комплемента. У людей тетрацилин, доксицилин или азитромицин являются предпочтительными лекарственными средствами, при отсутствии противопоказаний. Длительность лечения зависит от лекарственного средства, но должно продолжаться минимум 14 дней в случае использования тетрацилина.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

1. Идентификация возбудителя

Предпочтительный метод для идентификации хламидиоза птиц это выделение и идентификация организма. Но по причине требуемого для этого времени, необходимости проб высокого качества и опасности для лабораторного персонала, часто используются другие методы. Например, гистохимическое окрашивание мазков экссудата и фекалий, и мазков-отпечатков тканей, иммуногистохимическое

окрашивание цитологических и гистологических препаратов, твердофазные иммуноферментные анализы (ИФА) с захватом антигена, традиционная полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ОТ-ПЦР, ПЦР-ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов), ДНК микрочип, основанный на системах выявления и идентификации или секвенировании.

1.1. Отбор и обработка проб

Выбор проб для отбора зависит от видимых признаков болезни. Их следует отбирать в асептических условиях. Контаминантные бактерии могут помешать выделению хламидий. Пробы, взятые в случаях острого заболевания, должны включать воспалительный или фибринозный экссудат из органов с поражениями или в непосредственной близости от них, глазные и носовые экссудаты, мазки-отпечатки печени, цельную кровь и пробы тканей из почек, легкого, перикардия, селезенки и печени. В случаях диареи, следует культивировать содержимое толстой кишки или экскременты. У живых птиц предпочтительными пробами являются мазки из зева и носа (Andersen, 1996). Также можно использовать кишечные экскременты, клоакальные мазки, конъюнктивальные соскобы и перитонеальный экссудат.

Надлежащее обращение с клиническими пробами необходимо для предотвращения потери инфективности хламидий во время транспортировки и хранения. Специальная среда, состоящая из сахарозы/фосфата/глутамата (СФГ), была разработана для риккетсий и доказала свою пригодность для транспортировки полевых проб хламидий. Среда, рекомендуемая для хламидий (Spencer & Johnson, 1983), состоит из СФГ буфера: сахарозы (74,6 г/литр), KH_2PO_4 (0,512 г/литр), K_2HPO_4 (1,237 г/литр) и L-глутаминовой кислоты (0,721 г/литр), который можно стерилизовать автоклавированием или фильтрацией. Следует добавить fetalную телячью сыворотку (10%), ванкомицин, канамицин и стрептомицин (200–500 мкг/мл), амфотерицин В и гентамицин (50 мкг/мл). Добавление антибиотиков сокращает эффект контаминации, даже если пробы транспортируются при температуре окружающей среды. При отсутствии холодильного хранения, организм остается жизнеспособным до 30 дней и при 4°C до 34 дней (Spencer & Johnson, 1983). Эта среда также может быть использована в качестве лабораторного разбавителя и для замораживания хламидий.

Контаминированные пробы должны быть подвергнуты предварительной обработке до заражения животных или культур клеток. Существует три основных метода: обработка антибиотиками (Bevan *et al.*, 1978), обработка антибиотиками параллельно с центрифугированием на низкой скорости (Andersen & Vanrompay, 2003; 2005) и обработка антибиотиками с последующей фильтрацией (Andersen & Vanrompay, 2005; Bevan *et al.*, 1978). Может использоваться ряд антибиотиков, которые не ингибируют хламидии. Пробы гомогенизируют в забуференном фосфатом физиологическом растворе (ФБР), рН 7,2, содержащем в максимальном объеме следующие компоненты: стрептомицин (1 мг/мл), ванкомицин (1 мг/мл) и канамицин (1 мг/мл). Может быть использован гентамицин (200 мкг/мл). Амфотерицин В (50 мкг/мл) может быть добавлен для контроля роста дрожжей и грибов. Следует избегать использования пенициллина, тетрациклина и хлорамфеникола, так как они ингибируют рост хламидий.

Если контаминация слабая, пробы следует гомогенизировать в растворе антибиотиков до инокуляции куриным эмбрионам или культурам ткани. Пробы часто оставляют в растворе антибиотиков на 24 часа при 5°C до инокуляции. Сильно контаминированные пробы, такие как пробы фекалий, следует гомогенизировать в антибиотиках, а затем центрифугировать при 500 *g* в течение 20 минут. Поверхностный слой и нижний слой удаляют. Надосадочную жидкость собирают и повторно центрифугируют. Полученная надосадочная жидкость используется для инокуляции. Пробы пропускают через фильтр со средним размером пор 450-800 мкм, если контаминация сохраняется.

1.2. Выделение в культуре ткани

Использование культуры клеток - наиболее удобный метод для выделения *S. psittacci*. Наиболее часто используемые клеточные линии: от зеленой мартышки (BGM), McCoy, HeLa, африканской зеленой мартышки (Vero) и L клетки (Vanrompay *et al.*, 1992). Клетки выращивают как монослои, используя стандартную среду для культивирования ткани, содержащую 5-10% фетальную телячью сыворотку и антибиотики, которые не ингибируют хламидии (как описано выше).

При выборе оборудования для культивирования клеток, важно помнить, что:

- i) Хламидии могут быть идентифицированы с помощью прямой или непрямой иммунофлюоресценции или некоторых других соответствующих методов окрашивания;
- ii) Инокулум обычно центрифугируют до образования монослоя для повышения его инфективности;
- iii) Может потребоваться проведение слепого пассажа пробы на 4 – 5 день для повышения чувствительности выделения;
- iv) Необходимо будет изучать пробу от двух до трех раз в течение одного любого пассажа; и
- v) *Chlamydia* может быть заразна для людей.

Небольшие плоскодонные виалы, а именно мензурки с однослойной культурой (3,7 мл, 15 x 45 мм), или бутылочки с покровными стеклами 12 мм в диаметре, отвечают таким требованиям (Bevan *et al.*, 1978). Ряд виал, часто от четырех до шести, заражают каждой пробой для фиксации и окрашивания на различных интервалах и для возможности повторного пассажа очевидно негативных проб через 6 дней после инокуляции. При тестировании множества проб, можно также использовать 96-луночные чашки, так как они облегчают работу. Однако следует отметить, что проблемой может стать перекрестная контаминация между пробами.

Хламидии можно выделять из клеток, которые нормально реплицируются, но предпочтительно использование нереплицирующихся клеток, так как они могут обеспечить повышенный объем питательных веществ для роста хламидий. Супрессированные клетки также можно наблюдать в течение длительных периодов. Деление клеток хозяина также можно подавить либо посредством облучения или, что делается чаще, с помощью цитотоксических химических веществ. Последние включают 5-йод-2-дезоксинуридин, цитохалазин В, циклогексимид и эметин гидрохлорид. Наиболее часто используется циклогексимид, и его можно добавлять в среду с коэффициентом 0,5 – 2,0

мкг/мл во время заражения монослоя (Andersen & Vanrompay, 2003; 2005; Bevan *et al.*, 1978). Эметин удаляют после обработки и заменяют средой. Монослой сначала обрабатывают в течение 5 минут эметином (0,5 мкг/мл), после чего эметин удаляют и заменяют культуральной средой; монослой затем готов для использования. Рост большинства штаммов хламидий будет увеличен посредством обработки монослоя одним из этих препаратов.

Прикрепление хламидий к клеткам усиливается центрифугированием инокулята на монослой при 500 – 1500 *g* в течение 30 – 90 минут при 37°C. Инокулят удаляют и заменяют тканевой культуральной средой, содержащей ингибитор деления клеток, а затем инкубируют при 37 – 39°C. Культуры необходимо регулярно проверять на наличие хламидий с помощью соответствующего метода окрашивания. Это обычно делается на второй или третий день, а также на четвертый и пятый. Культуры, которые на пятый день оказываются отрицательными, собирают и подвергают повторному пассажу. При повторном пассаже хламидий, клетки и культуральная среда должны подвергаться пассажу без использования циклов замораживания-оттаивания, разрушающей клетки, так как это уничтожит хламидии.

До окрашивания культур сначала удаляют среду, культуры промывают ФБР и фиксируют ацетоном в течение 2-10 минут. Время фиксации будет зависеть от используемого сосуда для культивирования. Так как ацетон смягчает большинство пластиков, то предпочтительно использовать смесь из 50% ацетона и 50% метилового спирта.

Можно применять ряд методов окрашивания для демонстрации хламидийных включений. Предпочтительным методом является прямая иммунофлюоресценция (Andersen & Vanrompay, 2005; Bevan *et al.*, 1978; Moore & Petrak, 1985). Хламидийную антисыворотку, конъюгированную флуоресцеином, наносят на инфицированные клетки и инкубируют в камере влажности в течение 30 минут при 37°C. Покровные стекла трижды моют, сушат на воздухе, устанавливают и проводят исследование. Хламидийные включения светятся зеленым светом. В продаже есть коммерческие конъюгированные препараты с использованием моноклональных антител, которые являются высокоспецифичными. Конъюгаты можно также приготовить из поликлональной сыворотки, но важно получить специфичную антисыворотку с высокими титрами. Поликлональную антисыворотку также можно приготовить на кроликах, морских свинках, овцах и козах. Овцы и козы являются отличными источниками, по причине объема и высоких титров, которые легко получить после инфицирования. Затем готовят конъюгаты с помощью стандартных методов (Andersen & Vanrompay, 2003; 2005).

Хламидийные включения также можно продемонстрировать с помощью непрямой реакции флуоресцирующих антител и иммунопероксидазного анализа (Andersen & Vanrompay, 2005; Page, 1974). Прямое окрашивание можно проводить с помощью красителей Гименеза, Гимзы, Циля-Ниелсена или Маккиавелло. За исключением иммунофлуоресценции все эти красители имеют преимущество в использовании стандартных световых микроскопов.

1.3. Выделение в яйцах

Куриные эмбрионы все еще используют для первичного выделения хламидий. Стандартная процедура это введение до 0,5 мл инокулята в желточный мешок СПФ эмбриона 6-7 дневного возраста (Andersen & Vanrompay, 2003; 2005). Затем яйца инкубируют во влажной атмосфере при 39°C, а не при 37°C, так как размножение хламидий значительно увеличивается при более высоких температурах. Репликация организма обычно вызывает смерть эмбриона в течение 3 – 10 дней. Если смерти не происходит, обычно проводят два дополнительных слепых пассажа до того, как признают пробу отрицательной. Хламидийные инфекции вызывают типичное полнокровие сосудов мембраны желточного мешка. Их собирают и гомогенизируют как 20% (вес к объему) суспензию в буфере SPG, и могут заморозить для сохранения штамма, или инокулировать в яйца или на культуру клеток.

Организм можно идентифицировать посредством приготовления антигена из инфицированного желточного мешка и тестирования прямым окрашиванием мазков с помощью подходящих штаммов или антигена в серологическом тесте. Монослой клеточных культур можно инокулировать суспензией желточного мешка и исследовать с помощью реакции прямой иммунофлюоресценции через 48-72 часа на наличие хламидийных включений. Типичные включения – внутрицитоплазматические, круглые или шляпообразные тельца. С некоторыми вирулентными штаммами включения быстро прорываются, и хламидийный антиген распространяется по цитоплазме.

1.4. Дифференциация между видами/штаммами

Chlamydophila psittaci можно идентифицировать с помощью ПЦР-ПДРФ (Everett & Andersen, 1999) или видоспецифичной традиционной ПЦР (Messmer *et al.*, 1997; Sachse & Hotzel, 2003; Van Loock *et al.*, 2005), или ПЦР в реальном времени (Everett *et al.*, 1999b; Geens *et al.*, 2005; Pantchev *et al.*, 2009; доработано Sachse *et al.*, 2009b). Технология ДНК микрочипа доказала свою эффективность в дифференциации всех девяти видов семейства *Chlamydiaceae* (Sachse *et al.*, 2005).

Серотипирование в своей классической форме (Andersen, 1991; 1997) проводится редко, так как серовар-специфичные моноклональные антитела невозможно купить у коммерческого поставщика. Генотипирование, напротив, является практической альтернативой, так как i) классические генотипы А-F эквивалентны соответствующим серотипам и ii) девять из последних недавно определенных генотипов нельзя охарактеризовать посредством серотипирования, по причине отсутствия специфических антител. Генотипы А-F можно выявить с помощью ПЦР-ПДРФ (Vanrompay *et al.*, 1997). Процедура ДНК микрочипирования, которая доказала свою эффективность в дифференциации всех на данный момент известных генотипов (Sachse *et al.*, 2008; 2009a), может быть использована для генотипирования штаммов *C. psittaci* из культуры ткани и образцов ткани. К тому же все генотипы можно идентифицировать полным секвенированием гена *ompA*.

Как упоминалось выше, *C. psittaci* - не единственный возбудитель хламидиоза, встречающийся у птиц. Следует учитывать недавно описанные возбудители (Gaede *et al.*, 2008; Laroucau *et al.*, 2009), если определенный образец от птицы дает положительный результат в общем тестировании на хламидии, например *Chlamydiaceae*-специфичная ПЦР или иммуногистохимия, но является отрицательным в видоспецифичном тестировании на *C. psittaci*. В этом случае

частичное или полное секвенирование гена *ompA* и 16-23S rРНК оперона установит идентичность штамма. Заражение птиц *S.abortus* – редкое явление, но его также следует учитывать как возможный дифференциальный диагноз.

1.5. Гистохимическое окрашивание

Красители Гимзы, Гименеза, Циля-Ниелсена или Маккиавелло обычно используются для выявления хламидий в мазках-отпечатках печени и селезенки. Следующий модифицированный метод по Гименезу используется несколькими лабораториями (Andersen & Vanrompay, 2005):

1.5.1. Модифицированный метод Гименеза или окрашивание по Пиерс ванн дер Кампу

i) Реагенты:

a) Раствор 1:

Дистиллированную H_2O (450,0 мл) и фенол (5,0 мл) добавить к основному фуксину (2,5 г) и 95% этиловому спирту. Инкубировать при 37°C в течение 48 часов. Профильтровать и хранить в темном месте при комнатной температуре.

b) Раствор 2:

Na_2HPO_4 (11,65 g); $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ (2,47 g); дистиллированная H_2O , рН 7,5 (до 1,0 литра).

c) Раствор 3:

Раствор 1 (20,0 мл); и раствор 2 (25,0 мл). Дать постоять в течение 10 минут, профильтровать и использовать.

d) Раствор 4:

0,5% лимонная кислота.

e) Раствор 5:

Зеленый прочный (0,2 g); дистиллированная H_2O (100,0 мл); и ледяная уксусная кислота (0,2 мл).

f) Раствор 6:

Раствор 5 (20,0 мл); и дистиллированная H_2O (50,0 ml).

ii) Процедура для мазков следующая:

a) Фиксировать в метиловом спирте в течение 5 минут.

b) Окрасить в Растворе 3 в течение 10 минут и промыть водопроводной водой.

c) Контрастно окрасить в Растворе 6 в течение 2 минут.

d) Сполоснуть в водопроводной воде и сушить естественным образом на воздухе.

iii) Процедура для парафиновых срезов следующая:

- a. Депарафинизировать и гидратировать дистиллированной H₂O.
- b. Окрашивать в Растворе 3 в течение 10 минут и сполоснуть в водопроводной воде.
- c. Погрузить в Раствор 4 до тех пор, пока красный краситель не перестанет вытекать из среза. Сполоснуть водопроводной водой.
- d. Контрастно окрасить в Растворе 6 в течение 20 погружений.
- e. Окунуть в 95% спирт, с двумя сменами спирта, каждый раз погружать 5 раз. Дегидратировать, очистить и заделать.

Хламидии окрасятся в красный цвет на зеленом фоне.

1.6. Иммуногистохимическое окрашивание

Иммуногистохимическое окрашивание можно использовать для выявления хламидий в цитологических и гистологических препаратах. Этот метод более чувствителен, чем гистологическое окрашивание, но необходимо наличие некоторого опыта, так как следует учитывать, что перекрестные реакции с некоторыми бактериями и грибами имеют такую же морфологию.

Наиболее широко используемые процедуры иммуногистохимического окрашивания могут быть адаптированы для получения удовлетворительных результатов. Выбор первичных антител очень важен. Используются как поликлональные, так и моноклональные антитела. Так как формалин негативно влияет на хламидийные антигены, рекомендуется приготовить поликлональные антитела к очищенным хламидиям, инактивированным формалином. Используемый хламидийный штамм не очень важен, так как антитела будут в основном к группа-реагирующим антигенам. Моноклональные антитела также следует выбирать для реакций на хламидии, фиксированные формалином. Можно использовать пул групп-реагирующих моноклональных антител.

1.7. Твердофазные иммуноферментные анализы

ИФА широко применяется в качестве наборов для диагностики хламидиоза у человека. Эти тест наборы выявляют антиген липополисахарида (групп-реагирующий) и способны выявлять все виды *Chlamydiaceae*. Ряд таких наборов был протестирован на использование для выявления хламидий у птиц (Vanrompay *et al.*, 1994), но ни один из них не получил сертификат на выявление *C. psittaci*. Проблемой в отношении некоторых из этих тестов является то, что хламидийный липополисахарид имеет общие эпитопы с другими грамотрицательными бактериями, и эти эпитопы могут перекрестно реагировать, что приводит к большому числу ложноположительных результатов. Эта проблема была частично решена или устранена полностью в наборах, недавно разработанных посредством тщательного отбора используемых моноклональных антител. Этим наборам, однако, все еще не хватает чувствительности, так как все еще необходимо несколько сотен организмов для получения положительной реакции. Большинство диагностов полагают, что диагностику хламидиоза птиц

можно проводить, если получена сильная положительная реакция в ИФА от птиц с признаками пситтакоза. По причине некоторого количества ложноположительных результатов, положительный результат от отдельной птицы без признаков заболевания не считается значимыми, но указывает на необходимость дальнейшего тестирования с помощью других методов.

1.8. Системы выявления ДНК

1.8.1. Полимеразная цепная реакция

ПЦР методы заменяют выделение при выявлении хламидий из тканей животных. Риска заражения для лабораторного персонала избегают посредством инактивации пробы до проведения тестирования. Чувствительность и специфичность обычно выше соответствующих показателей у выделения. Существующие ПЦР тесты для выявления *C. psittaci* нацелены на ompA ген или 16S-23S rРНК ген (Everett *et al.*, 1999b; Geens *et al.*, 2005; Messmer *et al.*, 1997; Pantchev *et al.*, 2009; Sachse & Hotzel, 2003; Van Loock *et al.*, 2005; и доработано Sachse *et al.*, 2009b). Чувствительность и специфичность меняются в зависимости от подготовки пробы и ПЦР тестирования. Следует учитывать реагенты, разработанные для стабилизации ДНК, если предполагается задержка в обработке пробы (DeGraves *et al.*, 2003). ДНК пробы можно приготовить с помощью недорогих реагентов или с помощью коммерчески доступных наборов (Andersen & Vanrompay, 2005). Чувствительность повышается нацеливанием на относительно короткий ДНК сегмент с помощью гнездовой процедуры или с помощью методов ПЦР в реальном времени. Гнездовая ПЦР может иметь равные характеристики с выделением в чувствительности и специфичности (Messmer *et al.*, 1997; Sachse & Hotzel, 2003; Van Loock *et al.*, 2005). Однако риск контаминации повышается, если при работе с реакциями не применяется чрезвычайная осторожность (см. Глава 1.1.6. *Принципы и методы валидации диагностических тестов для инфекционных болезней*). За последние несколько лет ПЦР в реальном времени стала предпочтительным методом в диагностических лабораториях благодаря быстрой скорости проведения, высокой производительности и легкости стандартизации (Sachse *et al.*, 2009b). Эта технология требует флуоресцентно-меченого зонда и специального оборудования, что повышает затраты. Его чувствительность может быть равноценна чувствительности гнездовой системы, но проблемы контаминации и трудозатраты снижаются, так как он основан на одной реакции в закрытой системе (Everett *et al.*, 1999b; Geens *et al.*, 2005; Pantchev *et al.*, 2009).

1.8.2. Процедура ПЦР в реальном времени (Pantchev *et al.*, 2009)

Это анализ проводится как дуплексная амплификация, которая включает внутренний контроль амплификации. Для данного анализа был определен предел выявления двух включение-образующих единиц на реакционную смесь.

- i) *C. psittaci*-специфичными олигонуклеотидами являются праймеры CppsOMP1-F (5'-CAC-TAT-GTG-GGA-AGGTGC-TTC-A-3') и CppsOMP1-R (5'-CTG-CGC-GGA-TGC-TAA-TGG-3'), а также MGB® зонд CppsOMP1-S (FAM-CGC-TAC-TTG-GTG-TGA-C-TAMRA). Система внутреннего контроля амплификации включает праймеры EGFP1-F (GAC-CAC-TAC-CAG-CAG-AAC-AC) и EGFP10-R (CTT-GTA-CAG-CTC-GTC-CAT-GC), а также TaqMan зонд EGFP-HEX (HEX-

AGC-ACC-CAG-TCC-GCC-CTG-AGC-A-BHQ1). Плазмид IC2 служит в качестве матрицы внутреннего контроля амплификации¹.

- ii) Амплификация проводится в 96-луночных микротитрационных планшетах на термоциклере Mx3000P или подобном оборудовании. Каждая 25-мкл реакция содержит 12,5 мкл 2 × TaqMan универсального ПЦР мастер-микса, обогащенного ROX² или аналогичным продуктом. Конечная концентрация равна 0,9 мкл для каждого праймера *C. psittaci*, 0,3 мкл для каждого праймера внутреннего контроля амплификации и 0,2 мкМ для каждого зонда.
- iii) ДНК матрицу внутреннего контроля амплификации (0,5 мкл, содержащих 10⁴ копий) добавляют в каждую реакцию, затем доводят до конечного объема водой.
- iv) Используются следующие циклические параметры: первоначальный цикл нагрева при 95°C в течение 10 минут (один этап денатурации), 45 циклов при 95°C в течение 15 секунд и при 60°C в течение одной минуты (отжиг и удлинение).
- v) Пороговое значение цикла (Ct) подсчитывается автоматически с помощью специального программного обеспечения. Ct значения выше 36 следует воспринимать с осторожностью, так как они могут представлять собой перекрестную реакцию с родственными микроорганизмами. В таких случаях соответствующие пробы следует исследовать повторно с помощью альтернативного теста.

1.8.3. ДНК микрочип

Технология ДНК микрочипирования недавно доказала свою мощную эффективность в диагностике хламидиоза (Sachse *et al.*, 2005). Анализ для выявления и идентификации *Chlamydiaceae* spp. включает идентификацию *C. psittaci*. Она была валидирована и признана пригодной для рутинной диагностики (Borel *et al.*, 2008). Ее чувствительность сравнима с чувствительностью ПЦР в реальном времени, а специфичность даже выше, так как контрольная ДНК гибридизирована до 36 специфических олигонуклеотидных зондов. Этот методологический подход позволяет выявлять смешанные хламидийные инфекции и идентифицировать неожиданные виды хламидий непосредственно из клинических проб.

2. Серологические тестирования

2.1. Модифицированная реакция связывания комплемента на *Chlamydomphila*

Описанный здесь тест - широко используемая модифицированная реакция связывания комплемента для выявления антител. Реагенты довольно простые для приготовления и стандартизации. Существуют другие РСК и у каждой есть свои преимущества. Модифицированная прямая РСК проводится в 96-луночных круглодонных планшетах. Этапы инкубирования обычно проводятся помещением планшетов на водяную баню при 37°C. Хламидийный антиген можно приготовить либо на основе инфицированных желточных мешков или препаратов культуры ткани. Модифицированная прямая РСК отличается от прямой РСК, при которой нормальную ненагретую сыворотку кур от кур без

¹ Доступно у Intype IC-DNA, Labordiagnostik Leipzig, Germany.

² Доступно у Applied Biosystems

антител к хламидиям добавляют в разведение комплемента. Нормальная сыворотка повышает чувствительность процедуры СК, поэтому ее можно использовать для тестирования сывороток от птиц, чьи антитела обычно не связывают комплемент от морских свинок.

2.1.1. Процедура теста

i) Разведение сыворотки

Рисунок 1 представляет предлагаемый паттерн для проведения теста в круглодонных 96-луночных планшетах. Все сыворотки должны быть инактивированы при 60°C в течение 30 минут до использования. Сыворотку разводят в веронал (барбитурат)-буферном растворе (ВБР), как показано на Рисунке 1. Разведения проводят на планшете, добавляя 100 мкл ВБР в каждый ряд лунок А и Е, а затем добавляя 25 мкл неразведенной сыворотки, положительной сыворотки или отрицательной сыворотки в каждую из трех лунок. Это дает исходное разведение 1/5. Затем 25 мкл ВБР добавляют в каждую лунку рядов В – D и рядов F – H. Делают двукратные разведения с помощью 25 мкл микропипетки от ряда А до D и от ряда Е до H. Соответствующий объем удаляют из первого и последнего рядов, чтобы получить 25 мкл на лунку. Дилютеры дважды моют в дистиллированной воде и один раз в ВБР между сыворотками.

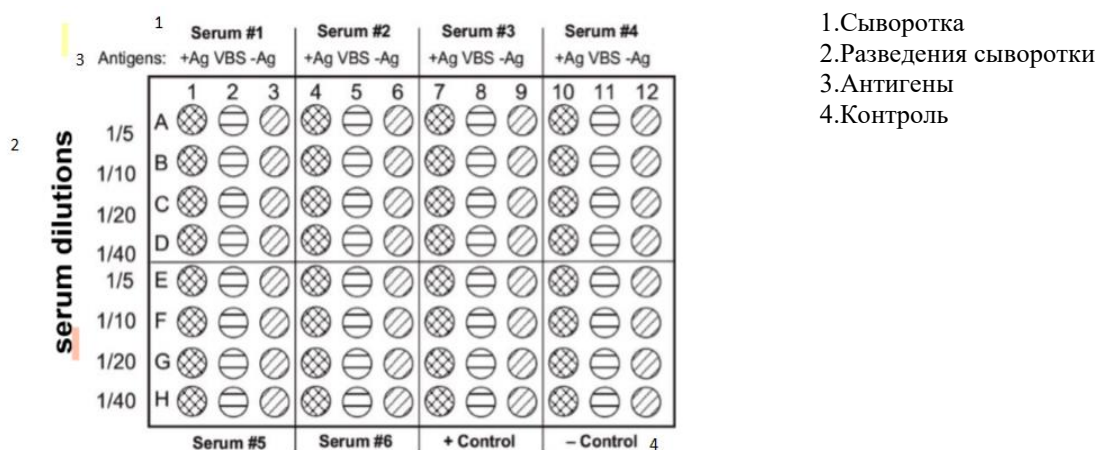


Рис. 1 Предлагаемый паттерн проведения для модифицированной реакции связывания комплемента при использовании 96-луночного планшета.

ii) Добавление антигена

В каждую лунку в колонках 1, 4, 7 и 10, добавить 25 мкл положительного хламидийного антигена. В колонки 2, 5, 8 и 11 добавить 25 мкл ВБР (антикомплементарные контрольные лунки), и в колонки 3, 6, 9 и 12 добавить 25 мкл отрицательного антигена (нормальный желточный мешок или культура ткани, приготовленные также как и хламидийный антиген). Хламидийные антигены хранятся неразведенными при 4°C и разведенными до надлежащей концентрации в ВБР до использования.

iii) Добавление комплемента

Комплемент хранят при -70°C и он подлежит размораживанию и разведению в ВБР до добавления антигена. Свежую куриную сыворотку добавляют до разведения комплемента, чтобы получить 5% концентрацию в комплементе. Разведения комплемента проводят, как и в предыдущих тестах или титрованиях. Необходимо дать комплементу постоять на ледяной бане в течение 15 минут. Разведенный комплемент следует хранить при 4°C после стабилизации и использовать в течение 2 часов: 50 мкл комплемента добавляют в каждую лунку сразу же после добавления антигенов. Планшеты инкубируют непокрытыми на водяной бане при 37°C в течение 2 часов.

iv) Добавление эритроцитов овцы

Смешать 4% стандартизированных эритроцитов овцы с равным объемом ВБР. Конечное разведение инкубировать на водяной бане при 37°C в течение 15 минут для сенсibilизации эритроцитов. В каждую лунку добавить 50 мкл сенсibilизированных эритроцитов. Планшеты затем инкубировать в течение 1 часа на водяной бане при 37°C . Планшеты можно центрифугировать при 400 g в течение 5 минут до считывания результатов или их можно хранить в холодильнике при 4°C в течение ночи до считывания.

v) Интерпретация результатов

Лунки часто считают 1+, 2+, 3+ или 4+, что соответствует сокращению гемолиза на 25, 50, 75 или 100%. Положительная реакция равна 2+ или выше, что равно 50% или меньше лизису эритроцитов овцы. Это указывает на то, что комплемент был связан антителами до добавления эритроцитов. Отрицательные лунки отмечены полным лизисом клеток: комплемент остается несвязанным и реагирует с эритроцитами и гемолизином с целью продуцирования лизиса эритроцитов.

Тесты дают недостоверные результаты, когда сыворотка антикомплементарна, а положительная реакция возникает в разведении с ВБР в качестве антигена. Неспецифические реакции сыворотки дают положительные реакции, как в положительных, так и в отрицательных лунках.

2.1.2. Реагенты

i) Приготовление антигена

Самые простые методы начинаются с выращивания хламидий в культуре клеток. Два метода, описанные ниже, продуцируют антигены, которые можно использовать в микрореакции связывания комплемента. Процедуры очень похожи: обе включают рост хламидий в культуре клеток, инактивацию хламидий, частичную очистку антигена, механическое разрушение и разведение в соответствующем буфере. Выбранный метод будет зависеть от доступного оборудования.

Первая процедура (Grimes, 1985; Grimes *et al.*, 1970) начинается с того, что хламидии и дебрис культуры клеток собирают при проявлении цитопатических эффектов. Культуру инактивируют добавлением фенола в конечную концентрацию 1,0%, инкубируют в течение 24 часов при 37°C и концентрируют

центрифугированием при 10 000 g в течение 1 часа. Осадок восстанавливают до 10% от оригинального объема с помощью ВБР, pH 7,2, содержащего 1,0% фенол и 1,0% глицерин.

Осадок затем гомогенизируют в омнимиксере на самой высокой скорости три раза в течение одной минуты, параллельно охлаждая на ледяной бане. Гомогенат центрифугируют в течение 15 минут при 100 g для удаления дебриса. Некоторые процедуры предполагают параллельный подогрев антигена в течение 30 минут на кипящей водяной бане. Надосадочную жидкость сохраняют и разводят до желаемой концентрации.

Во время второй процедуры для продуцирования антигена для РСК (Bracewell & Bevan, 1986), антиген готовят из L клеток, инфицированных штаммом попугаев. Среду клеточной культуры удаляют, а клетки подогревают в течение 40 минут при 56°C. Клетки лизируются в дистиллированной воде, хламидии разрушаются ультразвуком, а затем становятся изотоническими в ВБР. Антиген тестируют, используя эталонную рековалесцентную овечью сыворотку, и используют в двух единицах в микрореакции СК.

Существует ряд процедур для подготовки антигена из инфицированных желточных мешков, некоторые из которых довольно сложные. Однако с помощью нижеописанной процедуры довольно легко приготовить неочищенный антиген из инфицированных желточных мешков, который хорошо работает в модифицированной прямой реакции СК. Штамм *Chlamydia*, адаптированный к яйцам, используется для заражения яиц с 6-7-дневными развивающимися эмбрионами через желточный мешок. Желточные мешки отбирают от эмбрионов, которые погибли между 3 и 7 днем после заражения. Собранные желточные мешки разводят 1/3 в ФБР, буфере Tris или среде культуры ткани, а затем автоклавируют в течение 20 минут. Суспензию охлаждают и затем тщательно гомогенизируют. Рекомендуются использование высокоскоростного тканевого гомогенизатора в течение 3-5 минут. После гомогенизации добавляют фенол для получения конечной концентрации в 0,5% фенола (приготовить 5% феноловый стоковый раствор и добавить 1 мл на каждые 9 мл антигена). Антигенный препарат приготавливают, выдерживают в течение 3 дней, а затем используют надосадочную жидкость после центрифугирования в течение 20 минут при 1000 g. Антиген можно хранить в течение длительного времени при 4 °С.

ii) *Приготовление сенсibilизированных эритроцитов овцы*

Дефибринированные эритроциты овцы сохраняют посредством смешивания в равном объеме раствора Олсевера. Их можно хранить при 4°C в течение 4 недель. Промыть 25 мл стоковых эритроцитов в 25 мл ВБР. Центрифугировать при 400 g в течение 10 минут. Аспирировать ВБР и ресуспендировать в 50 мл ВБР. Повторить промывание всего три раза. После последнего промывания развести эритроциты овцы в пропорции 2,2 мл от эритроцитарной массы до 98 мл ВБР. Эритроциты затем можно стандартизировать посредством оптической плотности: смешать 1 мл разведенных, промытых эритроцитов с 14 мл дистиллированной воды, определить коэффициент поглощения с помощью спектрофотометра и стандартизировать до 0,25 при длине волны 550 мм. Полученные результаты можно использовать в следующей формуле для определения необходимого разведения:

$$\text{Конечный объем эритроцитов} = \frac{(\text{коэффициент поглощения} \times \text{объем})}{0,25 \text{ желаемого коэффициента поглощения}}$$

Эритроциты сенсibiliзируют быстрым добавлением равного объема ВБР, содержащего соответствующее разведение гемолизина (разведение определяется титрованием). Инкубировать при 37°C в течение 15 минут до использования.

iii) *Веронал буферный раствор*

ВБР готовится как 5 х стоковый раствор и разводится 1/5 с дистиллированной водой до использования. Следующая формула дает 4 литра. К дистиллированной воде добавить барбитал натрия (7,5 г); барбиталовая вода (растворить в кипящей воде) (11,5 г); MgSO₄·7 H₂O (4,056 г); NaCl (170,0 г); и CaCl₂ (0,078 г). Добавить дистиллированную H₂O, чтобы довести объем до 4-х литров.

iv) *Титрация комплемента*

Комплемент неустойчив и его качество ухудшится при неправильном обращении. Обычно его следует хранить в замороженном виде при -70°C в аликвотах, которые используются одновременно во избежание повторного замораживания. Для получения желаемой рабочей концентрации (2 единицы на опытную лунку), сначала добавить 5% нормальной куриной сыворотки с целью повышения чувствительности, как описывалось раньше. Затем подсчитать исходную точку на основе предыдущих партий. Хорошая исходная точка это разведение 1/30 после того, как была добавлена куриная сыворотка. Установить серию пробирок с различными объемами комплемента в ВБР. ВБР должен содержать антиген для использования в реакции и учитывать любые антикомплементарные свойства антигена. Распространенный метод – это развести 0,10 мл комплемента + 0,90 мл ВБР; 0,12 мл комплемента + 0,88 мл ВБР и т.д. до 0,25 мл комплемента + 0,75 мл ВБР. Инкубировать пробирки в течение 2 часов на водяной бане при 37°C. Добавить 0,5 мл сенсibiliзированных эритроцитов овцы в каждую пробирку. Инкубировать еще один час на водяной бане при 37°C. Самое высокое разведение, дающее полный гемолиз, равно 1 единице. В двойном объеме – равно 2 единицам. Следующую формулу можно использовать для получения 2 единиц/0,5 мл:

$$x = (d_i) (v) / 2dh$$

где:

x = обратная величина желаемого разведения комплемента для получения 2 единиц комплемента/на лунку
d_i = обратная величина исходного разведения комплемента, используемого в титрации (1/30)
v = объем добавляемого разведенного комплемента
dh = двойной объем комплемента, дающий полный гемолиз в титровании

v) *Титрование гемолизина*

Гемолизин можно получить из коммерческих источников. Он должен быть стандартизирован с помощью титрования. Рекомендуется следующая процедура:

Подготовить 1/100 разведение стокового гемолизина в ВБР. Из этого приготовить 1/300, 1/400 и 1/500 разведения в пробирках. Из каждого из этих разведений, сделать 0,5 мл двукратные разведения в ВБР для общего титрования.

Чтобы определить концентрацию гемолизина добавить еще по 0,5 мл в каждое разведение: 0,5 мл комплемента на 1/30 разведения, 0,5 мл несенсибилизированных эритроцитов овцы при 0,25 оптической плотности и 1,5 мл ВБР. Инкубировать в течение 1 часа при 37°C, а затем центрифугировать при 400 g в течение 5 минут. Одна единица гемолизина это разведение, которое дает полный лизис эритроцитов овцы. Раствор гемолизина подготавливается в ВБР разведении, содержащем 2 единицы гемолизина. Затем это добавляют в равный объем эритроцитов овцы в надлежащей концентрации.

vi) *Титрование антигена и положительная контрольная сыворотка*

Для стандартизации РСК необходимо иметь титры, как антигена, так и положительной контрольной сыворотки. Если титр известен или для положительной сыворотки, или для антигена, то титр другого компонента можно определить в РСК с использованием разведений титруемого компонента. Если же неизвестны титры ни положительной сыворотки, ни антигена, то можно использовать общее титрование (шахматная доска) для определения предельных разведений, как антигена, так и антител, когда начинается гемолиз. Очень важно получить точные показатели этих титров.

Как для антигена, так и для положительной контрольной сыворотки используются 4 единицы. Единица это наивысшее разведение, которое дает положительный результат в тесте. Это значит, что если разведение в 1/160 дает положительный результат в тесте, тогда разведение 1/140 имеет 4 единицы и используется в тесте.

Комплемент-связывающие антитела обычно появляются в течение 7–10 дней инфекции. Для положительной диагностики необходимо четырехкратное повышение титра антител в РСК. Предположительный диагноз с помощью серологических тестов можно сделать только, если присутствуют типичные клинические признаки, и большинство птиц имеют титры антител > 1/64.

в) Другие тесты

Были разработаны другие серологические тесты, но их специфичность не была еще достаточно оценена. ИФА для групп-специфических хламидийных антител более быстрая и чувствительная, чем РСК; ее можно автоматизировать. Оценки ИФА для выявления антител как к *S. trachomatis*, так и к *S. psittaci*, указывают на то, что тесты высокочувствительны, но им не хватает специфичности. Разрабатываются новые тесты, использующие пептиды или рекомбинантные антигены, которые могут решить проблему специфичности (Sachse *et al.*, 2009b).

Другие тесты включают реакцию иммунодиффузии в агаровом геле (Page, 1974), реакцию латекс-агглютинации, реакцию агглютинации элементарных частиц (Grimes & Arizmendi, 1996; Grimes *et al.*, 1994) и реакцию микроиммунофлуоресценции. Реакция иммунодиффузии менее чувствительна, чем РСК. Реакция латекс-агглютинации будет

выявлять антитела к *C. psittaci*, она очень легкая и быстрая в использовании (Grimes *et al.*, 1993). Латексные бусинки сенсibilизируют очищенным хламидийным антигеном, тщательно смешивают с тестовой сывороткой на стеклянном планшете и вращают в течение 2 минут для усиления агглютинации. Результаты теста считывают на темном фоне. Сыворотку, дающую положительные реакции, следует тестировать повторно с несенсибилизированными бусинками с целью устранения возможной неспецифической агглютинации. Реакция латекс-агглютинации и прямая РСК коррелируют в 72,5% тестов со спаренными сыворотками. Реакция латекс-агглютинации имеет чувствительность 39,1% и специфичность 98,8%, что схоже с прямой РСК (Grimes *et al.*, 1993). Тест выявляет как IgM, так и IgG, но лучше всего в выявлении IgM. Предлагалось его использование в выявлении недавних или активных инфекций. Реакция агглютинации элементарных частиц выявляет только IgM, что указывает на текущую инфекцию. Реакция микроиммунофлуоресценции быстрая и легкая в проведении, однако, флюоресцентно-конъюгированная антивидовая сыворотка не всегда доступна.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

В настоящее время не существует коммерческих вакцин против хламидиоза у домашней птицы. Попытки изготовить вакцину имели ограниченный успех, и большинство из них основаны на бактеринах, изготовленных посредством инактивации формалином концентрированных суспензий хламидий. Существует доказательство, что иммунитет вовлекает клеточно-опосредованные иммунные ответы (Beeckman, & Vanrompaey, 2010; Smith *et al.*, 2005), но производство вакцины не было направлено на реакции этого типа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ANDERSEN A.A. (1991). Serotyping of *Chlamydia psittaci* isolates using serovar-specific monoclonal antibodies with the micro-immunofluorescence test. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 707–711.
- ANDERSEN A.A. (1996). Comparison of pharyngeal, fecal, and cloacal samples for the isolation of *Chlamydia psittaci* from experimentally infected cockatiels and turkeys. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 8, 448–450.
- ANDERSEN A.A. (1997). Two new serovars of *Chlamydia psittaci* from North American birds. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 9, 159–164.
- ANDERSEN A.A. & VANROMPAY D. (2005). Chlamydiosis. In: *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, Fifth Edition*. Submitted USA.
- ANDERSEN A.A. & VANROMPAY D. (2003). Avian Chlamydiosis (Psittacosis, Ornithosis). In: *Diseases of Poultry, Eleventh Edition*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 863–879.
- BEECKMAN D.S. & VANROMPAY D.C. (2010). Biology and intracellular pathogenesis of high or low virulent *Chlamydia psittaci* strains in chicken macrophages. *Vet. Microbiol.*, 141, 342–353.
- BEVAN B.J., CULLEN G.A. & READ W.M.F. (1978). Isolation of *Chlamydia psittaci* from avian sources using growth in cell culture. *Avian Pathol.*, 7, 203–211.
- BOREL N., KEMPF E., HOTZEL H., SCHUBERT E., TORGERSON P., SLICKERS P., EHRLICH R., TASARA T., POSPISCHIL A. & SACHSE K. (2008). Direct identification of chlamydiae from clinical samples using a DNA microarray assay – a validation study. *Mol. Cell. Probes*, 22, 55–64.
- BRACEWELL C.D. & BEVAN B.J. (1986). Chlamydiosis in birds in Great Britain. 1. Serological reactions to chlamydia in birds sampled between 1974 and 1983. *J. Hyg. (Camb.)*, 96, 447–451.
- DEGRAVES F.J., GAO D. & KALTENBOECK B. (2003). High-sensitivity quantitative PCR platform. *Biotechniques*, 34 (1), 106–115.
- DICKX V., GEENS T., DESCHUYFFELEER T., TYBERGHIEN L., HARKINEZHAD T., BEECKMAN D.S., BRAECKMAN L. & VANROMPAY D. (2010). *Chlamydia psittaci* zoonotic risk assessment in a chicken and turkey slaughterhouse. *J. Clin. Microbiol.*, 48 (9), 3244–3250.
- EUROPEAN COMMISSION (2002). SCAHAW (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare). Avian chlamydiosis as a zoonotic disease and risk reduction strategies. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, SANCO/AH/R26/2002, available at: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scah/out73_en.pdf
- EVERETT K.D.E. & ANDERSEN A.A. (1999). Identification of nine species of the Chlamydiaceae using PCR-RFLP. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 803–813.

EVERETT K.D.E., BUSH R.M. & ANDERSEN A.A. (1999a). Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 415–440.

EVERETT K.D.E., HORNUNG L.J. & ANDERSEN A.A. (1999b). Rapid detection of the Chlamydiaceae and other families in the order Chlamydiales: three PCR tests. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 575–580.

GAEDE W., RECKLING K.-F., DRESENKAMP B., KENKLIES S., SCHUBERT E., NOACK U., IRMSCHER H.-M., LUDWIG C., HOTZEL H. & SACHSE K. (2008). Chlamydophila psittaci infections in humans during an outbreak of psittacosis from poultry in Germany. *Zoonoses & Public Health*, 55, 184–188.

GEENS T., DEWITTE A., BOON N. & VANROMPAY D. (2005). Development of a Chlamydophila psittaci species-specific and genotype-specific Real-Time PCR. *Vet. Res.*, 36, 1–11.

GRIMES J.E. (1985). Direct complement fixation and isolation attempts for detecting Chlamydia psittaci infection of psittacine birds. *Avian Dis.*, 29, 837–877.

GRIMES J.E. & ARIZMENDI F. (1996). Usefulness and limitations of three serologic methods for diagnosing or excluding chlamydiosis in birds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 209, 747–750.

GRIMES J.E., GRUMBLES L.C. & MOORE R.W. (1970). Complement fixation and haemagglutination antigens from a chlamydial (ornithosis) agent grown in cell cultures. *Can. J. Comp. Med.*, 34, 256–260.

GRIMES J.E., PHALEN D.N. & ARIZMENDI F. (1993). Chlamydia latex agglutination antigen and protocol improvement and psittacine bird anti-chlamydial immunoglobulin reactivity. *Avian Dis.*, 37, 817–824.

GRIMES J.E., TULLY T.N. JR, ARIZMENDI F. & PHALEN D.N. (1994). Elementary body agglutination for rapidly demonstrating chlamydial agglutinins in avian serum with emphasis on testing cockatiels. *Avian Dis.*, 38, 822–831.

HEDDEMA E.R., VAN HANNEN E.J., DUIM B., VANDENBROUCKE-GRAULS C.M. & PANNEKOEK Y. (2006). Genotyping of Chlamydophila psittaci in human samples. *Emerg. Infect. Dis.*, 12, 1989–1990.

KALETA E.F. & TADAY E.M. (2003). Avian host range of Chlamydophila spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol.*, 32, 435–462.

KUO C.-C., STEPHENS R.S., BAVOIL P.M. & KALTENBOECK B. (2011). Genus Chlamydia Jones, Rake & Stearns 1945, 55. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Vol. 4, Krieg N.R., Staley J.T., Brown D.R., Hedlund B.P., Paster B.J., Ward N.L., Ludwig W. & Whitman W.B., eds. Springer, Heidelberg, pp. 846–865; DOI: 10.1007/978-0-387-68572-4.

LAROUCAU K., VORIMORE F., AAZIZ R., BERNDT A., SCHUBERT E. & SACHSE K. (2009). Isolation of a new chlamydial agent from infected domestic poultry coincided with

- cases of atypical pneumonia among slaughterhouse workers in France. *Infect. Genet. Evol.*, 9, 1240–1247.
- MESSMER T.O., SKELTON S.K., MORONEY J.F., DAUGHARTY H. & FIELDS B.S. (1997). Application of a nested, multiplex PCR to psittacosis outbreaks. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 2043–2046.
- MOHAN R. (1984). Epidemiologic and laboratory observations of *Chlamydia psittaci* infection in pet birds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 184, 1372–1374.
- MOORE F.M. & PETRAK M.L. (1985). *Chlamydia* immuno reactivity in birds with psittacosis: Localization of chlamydiae by the peroxidase antiperoxidase method. *Avian Dis.*, 29, 1036–1042.
- PAGE L.A. (1974). Application of an agar gel precipitin test to the serodiagnosis of avian chlamydiosis. *Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnosticians.*, 17, 51–61.
- PANTCHEV A., STING R., BAUERFEIND R., TYCZKA J. & SACHSE K. (2009). New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. *Vet. J.*, 181, 145–150.
- SACHSE K. & HOTZEL H. (2003). Detection and differentiation of *Chlamydiae* by nested PCR. In: *PCR Detection of Microbial Pathogens*, Sachse K. & Frey J., eds. Humana Press., New Jersey, USA, 123–136.
- SACHSE K., HOTZEL H., SLICKERS P., ELLINGER T. & EHRLICH R. (2005). DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydophila*. *Mol. Cell Probes*, 19, 41–50.
- SACHSE K., LAROUCAU K., HOTZEL H., SCHUBERT E., EHRLICH R. & SLICKERS P. (2008). Genotyping of *Chlamydophila psittaci* using a new DNA microarray assay based on sequence analysis of *ompA* genes. *BMC Microbiol.*, 8, 63.
- SACHSE K., LAROUCAU K., VORIMORE F., MAGNINO S., FEIGE J. MÜLLER W., KUBE S., HOTZEL H., SCHUBERT E., SLICKERS P. & EHRLICH R. (2009a). DNA microarray-based genotyping of *Chlamydophila psittaci* strains from cell culture and clinical samples. *Vet. Microbiol.*, 135, 22–30.
- SACHSE K., VRETOU E., LIVINGSTONE M., BOREL N., POSPISCHIL A. & LONGBOTTOM D. (2009b). Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections (review). *Vet. Microbiol.*, 135, 2–21.
- SMITH K.A., BRADLEY K.K., STOBIERSKI M.G. & TENGELSEN L.A. (2005). Compendium of measures to control *Chlamydophila psittaci* (formerly *Chlamydia psittaci*) infection among humans (psittacosis) and pet birds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 226, 532–539.
- SPENCER W.N. & JOHNSON F.W.A. (1983). Simple transport medium for the isolation of *Chlamydia psittaci* from clinical material. *Vet. Rec.*, 113, 535–536.
- VAN LOOCK M., VERMINNEN K., MESSMER T.O., VOLCKAERT G., GODDEERIS B.M. & VANROMPAY D. (2005). Use of a nested PCR-enzyme immunoassay with an internal control to detect *Chlamydophila psittaci* in turkeys. *BMC Infect. Dis.*, 5, 76.

VANROMPAY D., BUTAYE P., SAYADA C., DUCATELLE R. & HAESEBROUCK F. (1997). Characterization of avian *Chlamydia psittaci* strains using *omp1* restriction mapping and serovar-specific monoclonal antibodies. *Res. Microbiol.*, 148, 327–333.

VANROMPAY D., DUCATELLE R. & HAESEBROUCK F. (1992). Diagnosis of avian chlamydiosis; specificity of the modified Gimenez staining on smears and comparison of the sensitivity of isolation in eggs and three different cell cultures. *J. Vet. Med. [B]*, 39, 105–112.

VANROMPAY D., DUCATELLE R. & HAESEBROUCK F. (1995). *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Vet. Microbiol.*, 45, 93–119.

VANROMPAY D., VAN NEROM A., DUCATELLE R. & HAESEBROUCK F. (1994). Evaluation of five immunoassays for detection of *Chlamydia psittaci* in cloacal and conjunctival specimens from turkeys. *J. Clin. Microbiol.*, 32, 1470–1474.

VANROMPAY D., HARKINEZHAD T., VAN DE WALLE M. , BEECKMAN D., VAN DROOGENBROECK C., VERMINNEN K., LETEN R., MARTEL A. & CAUWERTS K. (2007). *Chlamydia psittaci* transmission from pet birds to humans. *Emerg. Infect. Dis.*, 13, 1108–1110.

*

**

NB: Существует Справочная лаборатория МЭБ по хламидиозу птиц
(см. Таблицу в Части 3 *Кодекса по наземным животным* или сайт МЭБ:
<http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).
Пожалуйста, свяжитесь со Справочными лабораториями МЭБ для получения подробной информации по диагностическим тестам и реагентам хламидиозу птиц