

УДК 636.09:[616.98+579.834]636.028

АНТОНІК І. І., канд. с.-г. наук, e-mail: primavera1a@mail.ru,
КУЧЕРЯВЕНКО О.О., канд. вет. наук, e-mail: leptospiros2016@mail.ru,
ДЯЧЕНКО Г.В., e-mail: leptospiros2016@mail.ru
Інститут ветеринарної медицини НААН

СУЧАСНІ АСПЕКТИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЛЕПТОСПИРОЗУ (ОГЛЯДОВА СТАТТЯ)

У статті наведено аналіз сучасних інформаційних даних наукової літератури, щодо сучасних аспектів лабораторної діагностики лептоспірозу, які базуються на комплексі методів, що використовуються в різних комбінаціях залежно від поставлених завдань та можливостей лабораторії. Описано класичні та сучасні методи діагностики лептоспірозу, можливість їх використання на певному етапі встановлення діагнозу хворої тварини. Встановлено необхідність удосконалення лабораторних методів з подальшим їх використанням на практиці. Особливу увагу приділено впровадженню нових молекулярних технологій, що дають можливість своєчасному встановленню діагнозу, спрощують лабораторну діагностику лептоспірозу.

Ключові слова: лептоспіроз, лептоспіри, лабораторна діагностика, методи.

Вступ. Лептоспіроз є однією з найбільш розповсюджених природно-вогнищевих зооантропонозних інфекцій диких, домашніх тварин та людини, що характеризується поліморфізмом клінічних проявів, значно поширений в світі і до теперішнього часу продовжує залишатися актуальною епізоотологічною, епідеміологічною, екологічною проблемою.

У джерелах спеціалізованої літератури підкреслюється значущість лептоспірозу як ре-емерджентного інфекційного захворювання що проявляється великими спалахами в країнах, в яких реєструвався раніше – Нікарагуа, Бразилії, Індії, Малайзії, США, державах Південно-Східної Азії та ін.), і як емерджентного – для туристів тропічних країн і країн з помірним кліматом [1, 4, 17, 20, 28]. Лептоспіроз, згідно з прийнятою Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ) в 2003 р. програмою боротьби з зоонозами, відноситься до найбільш значущих хвороб, так як завдає значного економічного і соціального збитку у багатьох країнах світу [2–4, 8, 26]. Економічні збитки від лептоспірозу в сільському господарстві пов'язані зі зменшенням надоїв, загибеллю приплоду при абортах, загибеллю молодняка в перші дні його життя та масовими перегулами маточного поголів'я, що негативно впливає на відтворення стада.

Нині значне зростання захворюваності на лептоспіроз не лише серед тварин різних видів, а й серед людей потребує розроблення комплексних науково обґрунтованих планів загально профілактичних, діагностичних, протиєпізоотичних і протиєпідемічних заходів.

Встановлено, що лептоспірози представляють собою єдину нозологічну форму, важкість захворювання, яких обумовлена лептоспірами різних серогруп, що істотно відрізняються [6–8,10]. Нині кількість серологічних груп і сероварів

лептоспир збільшується у зв'язку з ідентифікацією нових ізолятів, виділених від тварин, людей та з навколишнього середовища. Відомо, що деякі серологічні групи лептоспир виявляють у певних видів господарів і переносників. Реєструються випадки захворювання тварин лептоспірозом, спричинені екзотичними патогенними штамми лептоспир, які набувають форми епізоотії [2, 5, 7, 9].

Незважаючи на численні дослідження, деякі питання патогенезу, імуногенезу, механізми формування важких форм і ускладнень досі залишаються невивченими [7, 8, 14]. Поліморфізм клінічних проявів, схожість симптомів при інших бактеріальних і вірусних інфекціях, часті прояви хвороби в атиповій формі нерідко ведуть до пізньої діагностики і несвоєчасного етіотропного лікування, що не задовольняє клінічну практику [2, 7, 8, 13, 19].

Діагностика лептоспірозу у людей, сільськогосподарських і диких тварин ґрунтується на сукупності епізоотолого-епідеміологічних, клінічних та патологоанатомічних даних з обов'язковим підтвердженням діагнозу лабораторними дослідженнями [6, 9, 10, 21].

Діагноз на лептоспіроз ставиться комплексно, але вирішальне значення має лабораторна діагностика. Для лептоспірозу характерний «феномен айсберга». Надводна, видима частина – це клінічно хворі та абортвані тварини, яких легко виявити і вжити відповідних заходів. Підводна, невидима, але значно більша частина це – лептоспіроносії, які виділяють лептоспири із сечею і інфіковані тварини, що мають антитіла до лептоспир у сироватці крові. Ця група тварин не має зовнішніх ознак захворювання, але служить основним джерелом лептоспірозу, і несе основну загрозу зараження для здорових тварин і людини.

Переважаання випадків безсимптомного перебігу хвороби, складність диференціальної діагностики, відсутність виражених проявів інфекції у тварин-лептоспіроносіїв висувають лабораторні методи досліджень на перше місце в діагностиці лептоспірозу.

Таким чином, лише добре організована лабораторна діагностика дозволяє своєчасно діагностувати лептоспірозу інфекцію, планувати і проводити ефективні проти епізоотичні та протиепідемічні заходи [9, 10].

Мета роботи. Проаналізувати сучасні інформаційні дані, літературні джерела, огляди щодо сучасних аспектів лабораторної діагностики лептоспірозу.

Матеріали та методи досліджень. Мета-аналіз проведено на основі опублікованих даних щодо досліджень лептоспірозу, авторефератів дисертаційних робіт, наукових статей, монографій. Використано пошукові електронні ресурси мережі Internet.

Результати досліджень та їх обговорення. Сучасна лабораторна діагностика лептоспірозу базується на комплексі мікробіологічних, імунологічних та молекулярно – біологічних методів [5, 8, 10, 18, 21]. Їх використовують в комбінаціях залежно від фази захворювання та діагностичних можливостей лабораторій (табл. 1).

Таблиця 1

Методи лабораторної діагностики лептоспірозу (за даними Кисельової Е.Ю., Бренєвої Н.В., Носкова А.К., та ін. [4]).

Метод досліджень	Мішень	Період хвороби	Специфічність методу
Бактеріологічний метод	Збудник	Перший тиждень (лептоспиремія)	Патогенні лептоспіри
РМА	АГ	Другий тиждень – до декількох місяців	Серогрупа
Перехресна РМА	Збудник	При виділенні культури	Серогрупа
ІФА, ІХА	АГ (Lg G)	Кінець другого тижня – до декількох місяців	Патогенні лептоспіри
ІФА, ІХА	АГ (Lg M)	Гострий період	Патогенні лептоспіри
ПЦР у реальному часі	16 S рRНК	Перший тиждень	Патогенні лептоспіри
Гніздова ПЦР	LipL 32	Перший тиждень	Патогенні лептоспіри
МФА, ІФА, ІХА Магнімуносорбція Латекс-аглотинація	АГ	Перший тиждень (лептоспиремія)	Залежно від задач
РМА з панеллю моноклональних антитіл	АГ	Ідентифікація культури	Сероваріант Нідерланди, Референс-центр ВОЗ по лептоспірам
Мультилокусне секвенування (MLST)	Геномна ДНК	Ідентифікація культури	Видова (геномний вид); Міжнародний ресурс mist.net
Пряме білкове профілювання на маспектрометрі Microflex LT	Білки клітини	Ідентифікація культури	Видова (геномний вид)
Мультиплексна лігазна реакція з гібридацією	Геномна ДНК (SNP)	Ідентифікація культури	Видова (геномний вид);

Оскільки лептоспірозна інфекція характеризується поліморфізмом клінічних проявів та постійними змінами в етіологічній структурі, лабораторні методи досліджень залишаються чільним засобом постановки діагнозу на лептоспіроз.

До основних методів лабораторної діагностики лептоспірозу належать: бактеріологічні; серологічні, реакція макроаглотинації реакція зв'язування комплекта, реакція гемаглотинації реакція латексної аглотинації, реакція імуноадсорбції, імуноферментний аналіз; молекулярно-генетичні (полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

Бактеріологічна діагностика ґрунтується на методах виявлення лептоспір в досліджуваному матеріалі шляхом мікроскопії та (або) виділення культур.

Вона складається з наступних етапів:

- мікроскопія в темному полі;
- бактеріологічний метод, що включає ізоляцію лептоспир на спеціальних поживних середовищах та їх ідентифікацію;
- біологічний метод;
- диференціація виділених культур [5].

Особливість бактеріоскопічного дослідження – мікроскопія в темному полі препарату «Роздавлена крапля» (рис. 1), приготованого з проб крові, сечі, тканини паренхіматозних органів. Наявність тонких, гнучких, рухливих сріблястих ниток з вигнутими кінцями свідчить про присутність в досліджуваних зразках живих лептоспир [4, 8, 10,15].

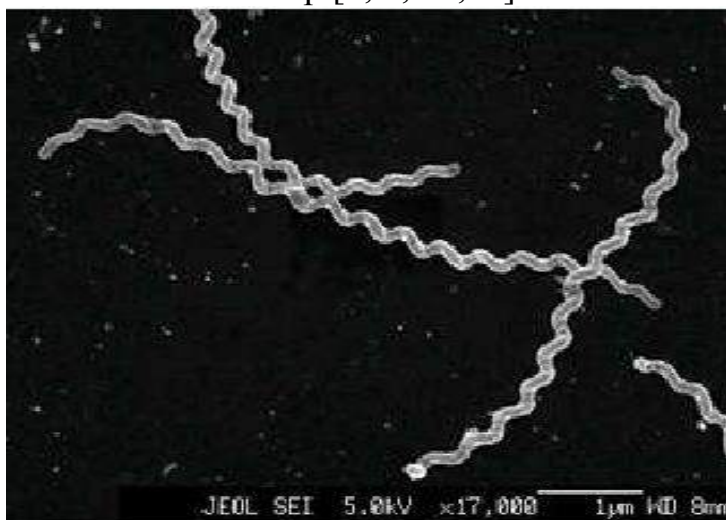


Рис. 1. Живі лептоспіри в темному полі мікроскопа в препаратах раздавленної каплі.

Для підвищення діагностичної ефективності прямої бактеріоскопії, її необхідно поєднувати з такими серологічними методами, як метод флуорисціюючих антитіл, люмінесцентна мікроскопія (рис. 2).

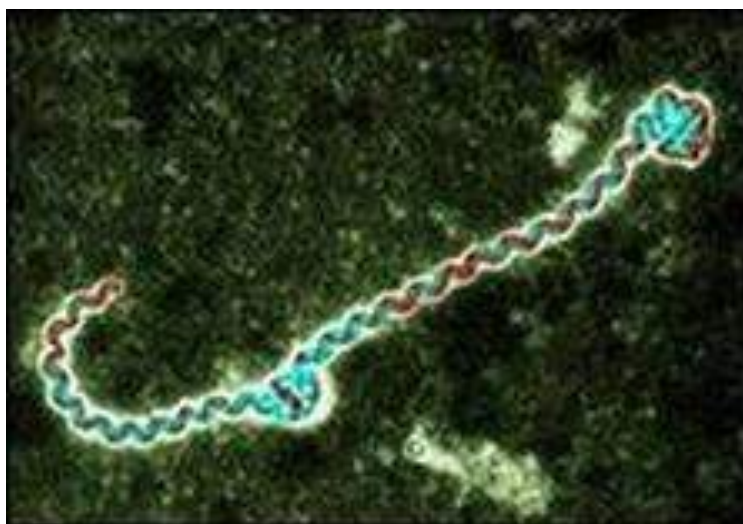


Рис. 2. Лептоспіри в темному полі люмінесцентного мікроскопа.

Лептоспіри резистентні до впливу анілінових барвників, тому для їх виявлення в органах і тканинах використовують забарвлення мазків-відбитків за Романовським-Гімза або імпрегнацію сріблом гістологічних зрізів по Вартину-Стеррі. Застосування цих прийомів відкриває додаткові можливості виявлення збудника в органах і тканинах, а також дозволяє оцінити клітинну реакцію на їх присутність. Виявлення лептоспир в тканинах використовується за підтвердження лептоспірознаї природи захворювань з летальними наслідками [7, 17, 19].

Паралельно з бактеріоскопічним методом використовують і **бактеріологічний метод досліджень**, який передбачає виділення патогенних лептоспир з живих або мертвих тканин макроорганізму (хворих тварин, органів із трупів, абортіваних плодів) та об'єктів зовнішнього середовища (води, ґрунту тощо), також виділення чистих культур на сироваткових середовищах, ідентифікація за антигенною будовою (РА, реакція аглютинації-лізису).

До недоліків бактеріологічного методу відносять:

- тривалий час культивування, а також ряд технічних складнощів виділення лептоспир:
- вплив на зростання лептоспир хімічного складу скла, з якого виготовляють пробірки;
- необхідність дуже ретельної (за особливими вимогами) обробки та миття посуду;
- точне дотримання послідовності і рецепту приготування середовищ;
- точне дотримання методики посіву;
- ретельне спостереження за ростом лептоспир не менше 3 місяців.

При культивуванні лептоспир необхідно виключати можливість забруднення сторонньою мікрофлорою, оскільки життєдіяльність інших мікроорганізмів призводить до утворення токсичних продуктів, зміни рН середовища і, як наслідок, пригнічує ріст і призводить до загибелі мікроорганізмів [4, 7, 8, 16, 20].

Класична ідентифікація виділених культур лептоспир. Лептоспіри відносяться до повільно ростучих мікроорганізмів, тому виділення культури має значення тільки для ретроспективного підтвердження клінічного діагнозу, але, безумовно, необхідним і для ідентифікації та вивчення біологічних властивостей збудників, що циркулюють в різних осередках лептоспірозів [4, 5, 8, 10]. Виявлення патогенних лептоспир в крові або в іншому досліджуваному матеріалі свідчить про лептоспірозна етіологію захворювання [27].

Класична ідентифікація складається з наступних етапів:

1. Диференціація патогенних і сапрофітних лептоспир.
2. Встановлення серогрупової належності.
3. Визначення серовара.

Диференціацію патогенних і сапрофітних лептоспир виконують за біологічними і культурально-біохімічними властивостями. Для цього використовують температурний і бікарбонатний тести, а також резистентність до 8-азагуаніну. Внаслідок того, що лептоспіри є повільно ростучі організми,

недоліком цих тестів є тривалість їх постановки (від 7 до 21 дня). Для експрес-диференціації рекомендується застосовувати визначення ділянок генів патогенних лептоспир методом ПЛР.

Ідентифікацію до серогрупи проводять за допомогою комерційних наборів типових сироваток або методом перехресної РМА, для постановки якої необхідно розташовувати гіперімунні специфічні сироватки до еталонних штамів лептоспир. Серогрупи не мають офіційного таксономічного статусу, основним таксоном лептоспир є серовар (серологічна класифікація) [4, 5, 10, 19, 22, 24, 25]. Однак у зв'язку з недоступністю методів ідентифікації до серовара, вона є не обов'язковою, при підтвердженні діагнозу досить вказати серогрупу збудника [5,15].

Для визначення серовара використовують: абсорбційний тест перехресної аглютинації; факторний аналіз сироватки; типування з використанням панелей моноклональних антитіл, які виготовляє тільки один інститут світу – Інститут тропічних захворювань (Нідерланди, Референс-центр ВОЗ по лептоспірозу).

Для виділення культури з досліджуваного матеріалу більш ефективним є метод постановки біологічних проб. Біологічний метод в діагностиці лептоспірозу використовують в установах, що мають спеціалізоване приміщення для роботи з тваринами. Зараження тварин матеріалом підозрілим на наявність лептоспир можна використовувати з метою:

- виділення культур лептоспир з контамінованого сторонньою мікрофлорою матеріалу (тканини органів, сеча, вода відкритих водойм, ґрунт і т. п.);
- очищення культур патогенних лептоспир від сторонньої мікрофлори;
- визначення вірулентності штамів лептоспир;
- моделювання інфекційного процесу.

Універсальної лабораторної моделі для діагностики і вивчення лептоспірозу не існує, оскільки сприйнятливість тварин до зараження лептоспірозом різних серогруп варіює в залежності від їх виду [9, 21]. За рівних умов молоді особини більш сприйнятливі до інфекції, ніж дорослі тварини того ж виду. Симптоми і тяжкість захворювання у них більш виражені.

Матеріалом для дослідження біологічним методом є: кров, сеча, спинномозкова рідина, тканини органів людей і тварин, підозрілих на зараженість лептоспірами, а також вода, харчові продукти та інші об'єкти навколишнього середовища. Досліджуваний матеріал вводять тваринам внутрішньочеревно, підшкірно, внутрішньовенно [9].

Метод біологічних проб на практиці може бути застосований для виділення збудника лептоспірозу із зволоженого ґрунту, води і мулу водойм в місцях передбачуваного зараження людей і тварин. Під час дослідження відібраних проб доцільно проводити вимірювання рН, оскільки в середовищі з великими відхиленнями від оптимуму лептоспир не виживають (оптимум 7,2–7,4) [4, 5, 9, 12].

Провідне місце в лабораторній діагностиці лептоспірозу належить **серологічним методам досліджень**. З їх допомогою виявляють специфічні антитіла (АТ) в крові хворих і перехворілих, а також виявляють антигени лептоспір в біологічних рідинах. «Золотим стандартом» серологічної діагностики лептоспірозу вважають реакцію аглютинації-лізису з живими культурами лептоспір, яку розробили в 1927 р Schuffneri Mochtax [3, 5, 7, 21, 30]. В даний час, за рекомендації ВОЗ, застосовують її модифікацію – реакцію мікроаглютинації (РМА) з набором еталонних культур.

РМА має високу чутливість і специфічність. Найважливішими факторами, що визначають специфічність РМА, є чистота і ідентичність антигенів. Останню контролюють в лабораторіях не рідше 2 разів на рік із застосуванням гіперімунних кролячих антисироваток або моноклональних антитіл. РМА ретроспективна; за отриманими результатами неможливо диференціювати гостре захворювання від перенесеного кілька років назад. Однак РМА дозволяє визначити серогрупу збудника, що важливо для проведення епідеміологічного розслідування і цілеспрямованого пошуку джерела інфекції.

Основними недоліками РМА при лептоспірозі є:

- значні витрати часу і праці на її постановку;
- необхідність застосування великої кількості антигенів лептоспір різних серогруп;
- варіабельність якості використовуваних живих антигенів лептоспір;
- потенційна небезпека зараження спеціалістів, які проводять серологічне дослідження;
- суб'єктивність оцінки результатів; можливість перехресних реакцій;
- технічні складності під час дослідження великої кількості зразків.

Реакція макроаглютинації на склі (слайд-аглютинація)

використовується для попереднього тестування сироваток хворих тварин з підозрою на лептоспірозу інфекцію та масового скринінгу. Техніка постановки реакції проста, тому вона може бути використана в лабораторіях будь-якого рівня оснащення.

Реакція аглютинації латексних або полімерних частинок за чутливістю поступається РМА, але простіша в постановці і дозволяє отримати результат в більш короткий термін. Крім того, аглютиніни виявляються в більш ранні терміни в більш високому титрі, ніж в РМА. Як носіїв зовнішніх мембранних антигенів лептоспір використовують латексні частинки або частки полі-DL-лактид-поліетиленгліколю.

Реакція ґрунтується на склеюванні під дією антитіл латексних частинок, сенсibilізованих антигенами лептоспір. Облік реакції проводиться візуально на предметному склі протягом 1–3 хвилин [4, 8, 10, 15].

Реакцію зв'язування комплекменту (РЗК) рідко використовують для серологічної діагностики лептоспірозу. Комплекмент зв'язуючі антитіла з'являються у тварин інфікованих серогрупами *Icterohaemorrhagiae* і *Canicola* через 4 дня після зараження, а через 9–10 тижнів вони зникають. Тест не

дозволяє диференціювати серовари лептоспир [4, 8, 10, 12]. Незважаючи на те, що в роботах науковців описані позитивні результати, РЗК не отримала широкого застосування для діагностики лептоспірозу у тварин.

Реакція імуноадсорбції. У реакції імуноадсорбції вивчають проби сироватки тварин, аглютинуючі лептоспери декількох серологічних груп в рівному високому титрі або ті, що мають найбільш високий титр щодо лептоспир, раніше не відомих як збудників лептоспірозу у сільськогосподарських тварин.

З метою ранньої діагностики лептоспірозу і серологічного скринінгу також використовуються більш прості тести з родоспецифічними антигенами лептоспир (імуноферментний аналіз та ін.)

Імуноферментний аналіз (ІФА) – метод, у якому в якості маркера використовують ферменти. Завдяки простоті, високій чутливості, специфічності, швидкості отримання результатів, універсальності застосування, можливості проведення масових досліджень, твердофазні імуноферментні системи (ТІФА) зручні для виявлення імунних комплексів та мають велике практичне значення в серологічній діагностиці інфекційних захворювань.

На сьогодні для визначення антитіл найчастіше застосовують непрямий варіант ТІФА та «сандвіч-метод». За непрямого ТІФА на тверду фазу сорбують АГ, а потім вносять у реакційну суміш досліджуваний матеріал, що містить специфічні АТ. Після інкубації та відмивання незв'язних компонентів в лунки додають противидові антитіла, мічені ферментом (АТ). Внаслідок реакції утворюється потрійний комплекс АГ1-АТ1-АТ2, який потім візуалізується шляхом ферментативної реакції після додавання проявника. «Сандвіч-метод» (іноді називають також «подвійним антигенним сандвічем») базується на застосуванні однакових антигенів (або різних імунодомінуючих антигенів того самого збудника) – немічених (у складі сорбенту) та мічених ферментом (у складі кон'югату). Внаслідок реакції виникає потрійний комплекс АГ-АТ-АГ, який потім візуалізується шляхом ферментативної реакції після внесення проявника [4, 8, 11, 14, 22, 24].

Застосування в ІФА моноклональних антитіл дозволяє підвищити якість досліджень, оскільки моноклони мають високу специфічність і однакову афінність. Перевага цього тесту полягає в тому, що він дозволяє диференціювати свіжий і давній випадки інфекції за рахунок виявлення типів антитіл (IgM і IgG). Цей метод дозволяє одномоментно дослідити велику кількість зразків. Однією з основних переваг ІФА є відсутність необхідності роботи з живими лептоспірами, що робить цей метод менш безпечним порівняно з РМА. Основний недолік ІФА полягає в тому, що він вимагає місцевої стандартизації для з'ясування переривання титру, оскільки у інфікованих тварин Ig M можуть підтримуватися на низьких рівнях протягом ряду років.

Метод флуоресціюючих антитіл (МФА) призначений для виявлення лептоспир незалежно від серогрупової приналежності в різному патологічному матеріалі (кров, паренхіматозні органи, трансудат, спинномозковій рідині,

сеча хворих і загиблих тварин) і об'єктів навколишнього середовища (вода, ґрунт) [4, 5, 8, 21]. Дослідження проводиться з використанням лептоспірозних сироваток у комплексі з антивидовою флуоресціюючою сироваткою. Підготовлені відповідним чином мазки переглядають на люмінесцентному мікроскопі. Пофарбовані флуоресціюючим глобуліном лептоспіри мають зеленувате рівномірне світіння всієї поверхні мікроба на відміну від контурного сяючого світіння інших видів мікроорганізмів. Діагноз встановлюють за морфологією лептоспір та інтенсивністю світіння, що оцінюють за системою трьох хрестів. Поряд з МФА в індикації лептоспір застосовується і непрямий метод флуоресціюючих антитіл (НМФА), при постановці якого використовуються антивидовий лептоспірозний флуоресціюючий глобулін.

Молекулярно-біологічні методи досліджень. Серед методів лабораторної діагностики лептоспірозу найбільш сучасними і чутливими вважаються молекулярно-біологічні, а саме постановка полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Полімеразно-ланцюгова реакція вважається одним з найбільш точних і швидких методів діагностики багатьох інфекційних захворювань.

Існують два основні методи полімеразно-ланцюгової реакції:

1. Класичний метод – виділення генетичного матеріалу збудника методом електрофорезу;

2. ПЛР в режимі «реального часу».

В основі цього методу лежить багаторазове циклічне повторення трьох процесів:

1. Денатурація ДНК в зразку що досліджується.

2. Гібридизація (відпал) ДНК що досліджується зі специфічними зондами (праймерами).

3. Синтез комплементарних ланцюгів ДНК за допомогою ДНК-полімерази.

За допомогою ПЛР можливо виявляти навіть одиничні ДНК лептоспір в більшості зразків, в культурі, в навколишньому середовищі. Рання діагностика лептоспірозу має велике значення оскільки, тяжка форма лептоспірозу може перебігати блискавично.

Для детекції та аналізу ДНК лептоспір на даний час і застосовується полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ), мультилокусне секвенування. З розробкою сучасних молекулярно-генетичних технологій в даний час з'явилася і генетична класифікація, яка не збігається з серологічною, штами одного сероваріанта можуть належати до різних видів лептоспір.

Метод ПЛР використовують як для індикації так і ідентифікації лептоспір, так і для експрес-діагностики лептоспірозу [2–4, 5, 7, 9, 12, 16, 19]. В якості досліджуваного клінічного матеріалу використовують проби крові, сечі, спинномозкової рідини, шматочки паренхіматозних органів, ґрунт, вода, мул, контаміновані лептоспірозом [4, 5, 10]. Найбільш специфічними ділянками

ДНК для лептоспир є гени, що кодують ліпопротеїн зовнішньої мембрани лептоспир *Lip L32* і *16S* РНК патогенних генотипів збудника [4, 9, 21, 23, 25]. В даний час можна констатувати заміщення стандартної ПЛР з електрофоретичною детекцією, модифікаціями з флуоресцентною реєстрацією накопичення ДНК, перевага якої полягає у високій чутливості і специфічній детекції продуктів реакції в реальному часі з кількісною оцінкою. Однак ПЛР з електрофоретичною детекцією все ж необхідна для напрацювання фрагментів ДНК з метою їх подальшого детального дослідження: клонування, визначення нуклеотидної послідовності [12, 23].

ПЛР-аналіз характеризується високою специфічністю чутливістю і високою діагностичною ефективністю на першому тижні захворювання (починаючи з 1-х діб), навіть на фоні антибіотикотерапії [17]. У зв'язку з цим його можна рекомендувати як метод ранньої експрес-діагностики лептоспірозу [4, 5, 12, 25]. Діагностична ефективність лабораторних досліджень при лептоспірозах може бути значно підвищена за рахунок паралельного використання серологічного тесту (РМА) і ПЛР незалежно від фази захворювання [4, 5].

Нині Всесвітньою організацією Здоров'я запропоновано наступні молекулярно – генетичні методи для характеристики лептоспир [26,27]:

- ПЛР з довільним праймером (AP-PCR) або дактилоскопія довільно ампліфікованого поліморфною ДНК (RAPD);
- аналіз з використанням ендонуклеаз рестрикційних (REA);
- аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (RFLP);
- аналіз поліморфізму довжини ампліфікованого фрагмента (AFLP);
- гель-електрофорез в пульсуючому полі (PFGE);
- аналіз секвенування ДНК.

На даний час застосовується мультилокусне секвенування для визначення видової належності та внутрішньовидового типування *Leptospira spp.* [4, 12, 23]. Суть якого полягає в молекулярному аналізі попередньо відібраного, клонованого і протестованого простими методами фрагмента ДНК. В процесі секвенування отримують формальний опис первинної структури лінійної макромолекули у вигляді послідовності мономерів в текстовому форматі. Отже, в результаті отримані послідовності ділянок генів, цілих генів, тотальної м-РНК і навіть повних геномів мікроорганізмів порівнюють з даними, що зберігаються в базах NCBI та *Leptospira.mlst.net* [4, 12, 23].

В повсякденній практиці для швидкої і надійної ідентифікації мікроорганізмів також може бути використана перспективна методика видової ідентифікації представників роду *Leptospira* – MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption (Ionization Time Of Flight – часопролітної з матрично-активованою лазерною десорбцією) іонізацією) масспектрометрія [12, 23]. Звичайно цей метод також є високо чутливим, швидким із низькою вартістю витратних матеріалів. Що стосується саме діагностики лептоспірозів цей метод до кінця не розроблено, перш за все, тому що лептоспіри ростуть тільки на спеціальних рідких поживних середовищах, виділення культури займає тривалий час. І потребує занадто багато роботи.

Мультиплексна лігазна реакція гібридизацією (Multiplex Ligase Probe Amplification – MLPA), базується на технологіях контрольних точок (check-points) з визначенням до 25 нуклеотидних замін (SNP) в форматі ДНК-мікрочіпа запропонована нині для видової ідентифікації лептоспир [4, 12, 23]. На сьогоднішній день існує більш простий варіант MLPA в форматі ПЛР в реальному часі (CHECK-MDR REAL-TIME PCR), де кілька фрагментованих лігазними ферментами ділянок генів бактерій напрацьовуються одночасно в полімеразній реакції і детектуються.

Аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ) використовують для молекулярного типування лептоспірозних ізолятів з ціллю географічного розповсюдження. Суть цього методу полягає в порівнянні різних патернів сегментації (смуг), отриманих в процесі обробки ферментами ДНК збудників. ПДРФ включає екстракцію ДНК з однорідної популяції мікроорганізмів, розщеплення ДНК рестриктазами і електрофорез розщепленої ДНК в агарозному гелі, для більш повного аналізу проводять блотінг по Southern на нітроцелюлозних мембранах та гібридизацію з використанням специфічного зонда.

Переваги ПЛР-діагностики:

- Дослідження займає всього кілька годин, на відміну від тривалих класичних мікробіологічних методів;
- Висока специфічність від 95% до 100%, тому що фрагмент ДНК що досліджується є унікальним для кожного конкретного мікроорганізму;
- Висока чутливість методу, виявити збудника можна, навіть якщо в досліджуваному зразку він представлений всього однією клітиною;
- Ідентифікувати збудника можна як якісним, так і кількісним методом. Це дуже важливо при виділенні умовно-патогенних мікроорганізмів, які в невеликій кількості не викликають захворювання;
- Можливість визначити генотип збудника. Це є необхідною умовою для раціонального лікування і прогнозу можливих ускладнень.

Недоліки:

- Можливість отримання як невірно позитивного, так і помилково негативного зразка при недотриманні правил забору зразка, помилок при проведенні дослідження;
- Велика вартість проведення дослідження.

Отже, враховуючи проаналізовані наукові джерела, можна підсумувати, що лептоспіроз – зооантропоноз, який є небезпечним як для тварини, так і для людини, який завдає значних соціальних та економічних збитків, за невчасної та некваліфікованої допомоги стає смертельним захворюванням. Тому важливим завданням постає швидка постановка заключного діагнозу. Особливу увагу слід звернути на те, що проведення своєчасної лабораторної діагностики з використанням сучасних молекулярно-генетичних досліджень повинно буди невід'ємною частиною сучасної лабораторної діагностики лептоспірозу.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Проведений аналіз наукової літератури свідчить про різноманітність розроблених класичних та сучасних методів лабораторної діагностики лептоспірозу.

Бактеріологічний аналіз є досить складним, трудомістким і далеко не завжди успішним. Труднощі бактеріологічного методу дослідження обумовлені необхідністю приготування спеціальних поживних середовищ безпосередньо перед висівом, примхливістю лептоспир і тривалістю їх зростання, переважно на рідких поживних середовищах.

Метод біологічних проб найбільш ефективний для ізоляції чистих культур, однак технічно його можна виконати виключно в лабораторіях, що мають спеціалізовані приміщення для роботи з тваринами.

Метод мікроскопії в темному полі порівняно простий і дає найбільш швидкий результат, але при малій кількості бактерій в досліджуваному матеріалі він є не інформативним.

Серологічні методи на виявлення АТ ретроспективні, їх застосування можливе лише з другого тижня захворювання.

Молекулярно-біологічні методи, зокрема, метод полімеразно-ланцюгової інфекції добре зарекомендував себе на практиці, але наявні високочутливі тест-системи до цього часу не сертифіковані.

Для досягнення найкращих результатів в діагностуванні лептоспірозу необхідно удосконалити наявні на сьогоднішній день лабораторні методи. Особливу увагу слід приділити впровадженню нових молекулярно-генетичних технологій, що значно спрощує лабораторну діагностику та надає можливість своєчасно встановити діагноз уже в перші дні захворювання, а також розшири межі для подальших удосконалень лабораторної діагностики лептоспірозу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ананьина Ю.В. Эпидемиологические принципы профилактики лептоспирозов / Ю.В. Ананьина // Дезинфекционное дело. – 2007. – № 3. – С. 39–42.
2. Ваганова А.Н. Адаптация ПЦР для диагностики лептоспироза и эпидемиологического надзора за лептоспирозной инфекцией / А.Н.Ваганова [и др.] // Национальные приоритеты России. – 2011. – № 2 (5). – С. 162–164.
3. Дранкин Д.И. Лептоспироз / Д.И.Дранкин, М.В. Годлевская. – Саратов.: Изд-во Саратов. ун-та, 1988. – 272 с.
4. Киселева Е.Ю. Методы лабораторной диагностики лептоспирозов: особенности постановки, преимущества и недостатки / Е.Ю Киселева. [и др.] // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН – 2015. – Вып. 3.(103) – С. 85- 93.
5. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство; изд. 2-е, перераб. и доп. / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: ЗАО «Шико», 2013. – С. 360 .
6. Лебедев В.В. Иктерогеморрагический лептоспироз / В.В.Лебедев [и др.]. Под ред. В.В. Лебедева. – Краснодар: Советская Кубань, 2001. – 208 с.
7. Малахов Ю.А. Лептоспироз животны / Ю.А.Малахов [и др.]– М.: Медгиз, 2000. – 621 с.
8. Павленко А.Л. Особенности эпидимиологии лептоспироза на современном этапе / А.Л. Павленко // Запорожский медицинский журнал. –2013. – № 6. – С. 69.

9. Першина М.Ю. Анализ геномного полиморфизма лептоспир в полимеразной цепной реакции с произвольными праймерами/ М.Ю. Першина [и др.] // МГМВ. – 1998. – №1. – С. 29–32.
10. Покровский В.И. Инфекционные болезни и эпидемиология: Учебник / В.И. Покровский [и др] . – 2-е изд. – М.: ГЭОТАР Медиа, 2007. – 816 с.
11. Практичний посібник по роботі з імуноферментною тест-системою для визначення антитіл проти лептоспир «ІФА-лептоспіроз-ВРХ» / Н. В. Іванська [та ін.]. – Київ : Науково-виробнича компанія Діапроф-Мед, 2003. – 28 с.
12. ПЦР в реальном времени / Д. В. Ребриков [и др..] – Москва : БИНОМ, Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.
13. Самсонова А.П. Применение ПЦР-анализа при исследовании лептоспирозов в Европейской части России / А.П. Самсонова [и др.] // Национальные приоритеты России. – 2009. – № 2. – С. 166–167.
14. Случай повторного лептоспироза / С.О. Майорова [и др.] // Клиническая медицина – 2007. – № 3. – С. 71–72.
15. Сокол А.М. Особливості клініки і діагностики безжовтяничних форм лептоспірозу на сучасному етап / А.М. Сокол [та ін.] // Буковинський медичний вісник. – 2008. – Т. 12. – № 3. – С. 30–32.
16. Ahmed A, A simple and rapid molecular method for *Leptospira* species identification. *Infection* / A. Ahmed, R.M. Anthony, R.A.Hartskeerl // *Genetics and Evolution*. – 2010. – 10. – P. 955-962.
17. Kamath S.A. Re-emerging of infections in urban India / S.A. Kamath, S.R. Joshi // *Focus Leptospirosis. J Assoc Phys India*. – 2003. – № 51. – P. 247-248.
18. Kingsote B. Leptospirosis in Livestok / B. Kingsote // *The Canadian Veterinary Journal*. – 1985. – Vol. 26. – P. 235–236.
19. Ozgur A. Leptospirosis; Diagnosis, Treatment and Prevention:A Review / A. Ozgur // *British Microbiology Research Journal* –2016. – 13 (6). – P. 1 – 5. RMA
20. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends/ [G. Pappasa, Ph. Papadimitrioua, V. Siozopouloua, L. Christoub, N. Akritidisc] // *International J. of Inf. Diseases*. – 2008. – Vol. 12. – Issue 4. – P. 351–357.
21. A review on leptospirosis / Ningal P. Suvarna, Manoj B. Kothule, Nilesh Y. Jadhav // *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2015. –Vol 4. – Issue 9. – P. 1531–1543.
22. Vivek K.N. Neuroleptospirosis / K.N. Vivek, B. Padmakumar // *JK Science*. – 2004. – Vol. 6. – № 4. – P. 218–219.
23. Verma R. Evaluation and comparison of native and recombinant LipL21 protein-based ELISAs for diagnosis of bovine leptospirosis / R. Verma, S.K. Srivastava // *Journal of Veterinary Science*. – 2012.– V. 13. – N.1. – P. 99–101.
24. Vijayachari P Leptospirosis: an emerging global public health problem / P. Vijayachari, A.P. Sugunan, A.N. Shriram // *J Biosci*. – 2008. – №. – 33. – P. 557–569.
25. Waleed Alorry. Leptospirosis: Transmission, Diagnosis and Prevention / Waleed Alorry, M. Arahou, R. Hassikou // *Innovative Space of Scientific Research Journals*. – 2016. – Vol. 15, No. 3. P. 457-467.
26. World Health Organization Human Leptospirosis audience for diagnosis, Surveillance and control (7th ed.). – 2003. – WHO, USA. – № 20. – P. 61–69.
27. World Health Organization (2007). Leptospirosis: laboratory manual. – 69 p.
28. Zavitsanou A. Leptospirosis: epidemiology and preventive measures / A. Zavitsanou, F. Babatsikou // *Health Science Journal*. – 2008. – Vol. 2. – Issue 2. – P. 75–82.

СОВРЕМЕННОЕ АСПЕКТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛЕПТОСПИРОЗА (ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ) / Антоник И.И., Кучерявенко О.О., Дьяченко А.В.

В статье приведен анализ современных информационных данных научной литературы, о современных аспектов лабораторной диагностики лептоспироза, основанные на комплексе методов, используемых в различных комбинациях в зависимости от поставленных задач и возможностей лаборатории. Описаны классические и современные методы диагностики лептоспироза, возможность их использования на определенном этапе установления диагноза больного животного. Установлена необходимость совершенствования лабораторных методов с последующим их использования на практике. Особое внимание уделено внедрению новых молекулярных технологий, дающих возможность своевременному установлению диагноза, упрощают лабораторную диагностику лептоспироза.

Ключевые слова: Лептоспироз, лептоспиры, лабораторная диагностика, методы.

MODERN ASPECTS OF LEPTOSPIROSIS LABORATORY DIAGNOSTICS (REVIEW) / Antonik I., Kucheryavenko O., Dyachenko A.

Introduction. *Leptospirosis is one of the most widespread natural focal zoonotic infections of wild, domestic animals and humans, which characterized by polymorphism of clinical manifestations. Is widespread in the world and remains up to date a topical epizootological, epidemiological, ecological challenge.*

The diagnostics of leptospirosis should be comprehensive but decisive importance has laboratory diagnostics.

Thus, the only well-organized laboratory diagnostics enables timely diagnosis Leptospira infection, planing and take effective anti-epizootological and anti-epidemiological measures.

The goal of the work. *To analyze current data of literary sources, review of modern aspects of leptospirosis laboratory diagnosis.*

Materials and methods. *Meta-analysis was performed on the basis of published data on leptospirosis research, dissertation abstracts, scientific articles and monographs and electronic resources.*

Results of research and discussion. *Modern leptospirosis laboratory diagnosis is based on complex of microbiological, immunological and molecular biological methods. They are used in combinations depending on the phase of disease and diagnostic capabilities of laboratories*

Conclusions and prospects for further research. *The analysis of scientific literature showed a variety of developed classical and modern methods of leptospirosis laboratory diagnosis.*

Bacteriological analysis is complex, labor intensive and not always successful.

Biological assay method is the most effective for the isolation of pure cultures, but technically it can be performed exclusively in laboratories with specialized facilities to work with animals.

Method of microscopy in a dark field is relatively simple and gives the fastest result, but with a small number of bacteria in the samples or research material it is not informative.

Serological methods for antibodies have retrospective character. They are use only possible in the second week of the disease. Molecular biological techniques, such as polymerase chain infection worked well in practice but the available highly sensitive test kits have not been certified yet.

For best results in the leptospirosis diagnosis there is need to improve laboratory techniques available today. Particular attention should be given to the introduction of new molecular genetic technology, which greatly simplifies laboratory diagnostics and enables to confirm the diagnosis

timely in the first days of the disease, as well as expand the boundaries for further improvement of leptospirosis laboratory diagnosis .

Keyword: leptospirosis, leptospira, laboratory diagnostics, method

REFERENCES

1. Ananjina, Y.V (2007). Epidemiologicheskie principy profilaktiki leptospirozov. [Epidemiological principles of leptospirosis prophylaxis]. *Dezinfekcionnoe delo – Disinfection*, 3, 39-42 [in Russian].
2. Vaganova, A.N., Stoyanova, N.A., & Tokarevich, N.K. (2011). Adaptatsia PCR dlja diagnostiki leptospiroza i epidemiologitseskogo nadzora za leptospirosnoi infektsiej [PCR adaptation for leptospirosis diagnostics and epidemiological surveillance of leptospirosis infection]. *Nacional'nye priority Rossii – National priorities in Russia*, 2 (5), 162-164 [in Russian].
3. Drankin, D.I, & Godlevskaya M.V.(1988). *Leptospiroz [Leptospirosis]*. Saratov: Sarat. universitet [in Russian].
4. Kiseleva, Ye., Breneva.N., & Noskov A.K. (2015). Metody laboratornoy diagnostyky leptospiroza: osobennosti postanovki, preimushchestva i nedostatki [Methods For leptospirosis laboratory diagnostics features of experimentation, advantages and limitations]. *Bulleten VCNTSKK SO RAMN – Bulletin VCNTSKK SO RAMN*, 3(103), 85-93 [in Russian].
5. Onishchenko, GG, & Kutiryov, VV (eds.) (2013). *Laboratornaya diagnostica opasnih infekzionnih bolezney [Laboratory diagnostics of dangerous infectious diseases: Practical guidance]*. Moscow: ZAO «Shyko» [in Russian]
6. Lebedev, V.V Avdeev, M.G, & Shubich, M.G. (2001). *Iktterogemorragichesky Leptospirosis [Icterohemorrhagic leptospirosis]*. Krasnodar: Sovetskaya Kuban [in Russian].
7. Malakhov, Y.A, Panin ,A.N, & Soboleva, G.L. (2000). *Leptospiroz zhivotnyh [Leptospirosis in animals]*. Moscow: Medgyz [in Russian].
8. Pavlenko, A.L. (2013). Osobennosti Epidemiologii Leptospiroza na sovremennom etape [Features of leptospirosis epidimiology in current stage]. *Zaporozhye medicinskie zhurnal – Zaporozhye Medical Journal*, 6, 69 [in Russian].
9. Pershina, M.Y., Shaginyan, I.A., Ananjina, Y.V., & Prozorovsky. S.V. (1998). Analiz genomnogo polimorfizma leptospir v polimeraznoj cepnoj reakcii s proizvol'nymi prajmerami [Analysis of *Leptospira* genome polymorphism in polymerase chain reaction with random primers]. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.*, 1, 29-32 [in Russian].
10. Pokrovsky, V.I., Pak, S.G., Briko, N.I., & Danilkin, B.K. (2007). *Infekzionnie bolezni i epidemiologiya [Infectious diseases and epidemiology]*. Moskva: GETAR Media [in Russian].
11. Iwanski, N.V. et al. (2003). *Praktychnyi posibnik po roboti z imunofermentnoyu test-systemoyu dlya vyznachennya antytil protyu leptospir «IFA-leptospiroz-VRH» [Practical Guide to work with the ELISA test system for the detection of antibodies against leptospira «ELISA– bovine leptospirosis»]*. Kyiv: Naukovo-vyrobnycha kompaniya Diaprof-Med [in Ukrainian].
12. Rebrikov, D.V. (2009). *PCR «v realnom vremeni» [Real time PCR]*. Moskva: Binom, laboratoriya znaniy [in Russian].
13. Samsonova, A.P., Petrov, E.M., & Ananjina, Y.V. (2009). Primenenie PCR-analiza pri issledovanii leptospirozov v Evropejskoj chasti Rossii [Using PCR-analysis in leptospirosis examination in the European part of Russia]. *Nacional'nye priority Rossii – National priorities in Russia*, 2, 166-167 [in Russian].
14. Mayorov, S.O. at al (2007). Sluchay povtornogo leptospiroza [Recurrent case of leptospirosis]. *Klinicheskaya medicina – Clinical Medicine*, 3, 71-72 [in Russian].
15. Socol, A.M. (2008). Osoblyvosti kliniku i diagnostyky bezzhovtyaniyuchnyuh form leptospirozu na suchasnomy etapi [Features of clinics and diagnostics anicteric leptospirosis forms at the present stage]. *Bukovyunskyi medychnyi visnyk – Bukovina medical messengers*, 12, No. 3, 30-32 [in Ukrainian].
16. Ahmed, A., Anthony, R.M., & Hartskeerl, R.A. (2010). A simple and rapid molecular method for *Leptospira* species identification. *Infection, Genetics and Evolution*, 10, 955-962.

17. Kamath, S.A., & Joshi, S.R. (2003). Re-emerging of infections in urban India – Focus Leptospirosis. *J Assoc Phys*, 51, 247-248.
18. Kingsote, B. (1985). Leptospirosis in Livestok. *The Canadian Veterinary Journal*, 26, 235-236.
19. Ozgur, A. (2016). Leptospirosis; Diagnosis, Treatment and Prevention: a Review. *British Microbiology Research Journal*, 13 (6), 1-5.
20. Pappas, G., Papadimitriou, P., Siozopoulou, V., Christou, L., & Akritidis, N. (2008). The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends (review). *Int. J. Infect. Dis.*, 12, 351-357.
21. Suvarna, P. Ningal, & Manoj, B. Kothule (2015). A review on leptospirosis. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, Is. 9, 1531-1543.
22. Vivek, K.N., & Padmakumar, B. (2004). Neuroleptospirosis. *JK Science*, Vol. 6, 4, 218-219.
23. Verma, R., & Srivastava, S. (2012). Evaluation and comparison of native and recombinant *LipL21* protein-based ELISA for diagnosis of bovine leptospirosis. *Journal of Veterinary Science*, 13, N.1, 99-101.
24. Vijayachari, P, Sugunan, A.P., & Shriram, A.N. (2008). Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci.*, 33, 557-569.
25. Waleed, Alorry, Arahou, M., & Hassikou R. (2016). Leptospirosis: Transmission, Diagnosis and Prevention. *Innovative Space of Scientific Research Journals*, 15, No. 3, 457-467.
26. WHO (2003). World Health Organization Human Leptospirosis audience for diagnosis, Surveillance and control. (7th ed.). USA, 20, 61-69.
27. World Health Organization (2007). Leptospirosis: laboratory manual.
28. Zavitsanou, A., & Babatsikou F. (2008). Leptospirosis: epidemiology and preventive measures. *Health Science Journal*, 2, Is. 2, 75-82.

УДК: 57.086.83:594.1

БАБКІН М.В., канд. вет. наук, e-mail: babkinmv@yandex.ua,

ГАВРАСЬЄВА Н.В., канд. вет. наук, e-mail: gari-nata@ukr.net,

КУЗЬМИЧ Г.С., e-mail: 80505752885@mail.ru

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

ОТРИМАННЯ ПЕРВИННОЇ КУЛЬТУРИ КЛІТИН З ПРІСНОВОДНИХ МОЛЮСКІВ

*Наведено результати отримання за допомогою різних методів первинної культури прісноводного молюска, клас двостулкові (*Bivalvia*), а саме: ферментативного, механічного та комбінації обох методів. Досліджено, що найбільший вихід клітин прісноводного молюска спостерігали при використанні комбінованого методу отримання первинної культури клітин та при використанні комбінації 2 поживних середовищ DMEM та F-12 (1:1) + 20% ембріональної сироватки ВРХ. Також підібрано оптимальну температуру +20 і +25°C для культивування первинної культури. За температури 37C° міграцію клітин прісноводного молюска не спостерігали. Отримана культура може бути використана в біотехнології, ветеринарній та гуманній медицині.*

Ключові слова: прісноводні молюски, первинна культура клітин, поживні середовища для культивування культур клітин.