

УДК 579.889.9:616.37-078

С.І. Похил, О.М. Тимченко,  
Н.А. Чигиринська, І.І. Торяник,  
Л.В. Килипко, Є.І. Семеренська

**ВИКОРИСТАННЯ БІЛИХ НЕЛІНІЙНИХ  
МИШЕЙ ІЗ ШТУЧНО СФОРМОВАНИМ  
ІМУНОКОМПРОМЕТОВАНИМ СТАНОМ  
ДЛЯ БІОЛОГІЧНОГО МЕТОДУ  
ВИЯВЛЕННЯ ЗБУДНИКІВ  
ТРАНСМІСИВНИХ БАКТЕРІАЛЬНИХ  
ІНФЕКЦІЙ (АНАПЛАЗМОЗУ,  
БАРТОНЕЛЬОЗУ, ЕРЛІХІОЗУ)**

ДУ “Інститут мікробіології та імунології  
імені І.І. Мечникова Національної академії  
медичних наук України”, лабораторія нових  
та маловивчених інфекційних захворювань,  
м. Харків, Україна

В наш час біологічний метод (БМ), який ґрунтується на експериментальному відтворенні інфекційного процесу у лабораторних тварин, застосовується у медичній та ветеринарній практиці для діагностики різних інфекційних захворювань: туляремії, сибірської виразки, лептоспірозу, лістеріозу та інших.

Після встановлення у кінці ХХ-го століття етіологічного значення у захворюваності людей та тварин групи нових збудників трансмісивних бактеріальних інфекцій — анаплазмозу (АІ), бартонельозу (БІ), ерліхіозу (ЕІ) науковцями різних країн світу здійснюються розробки по створенню лабораторних моделей експериментального відтворення у піддослідних тварин цих захворювань [11, 12, 19]. Кінцевою метою таких досліджень є: вивчення патогенезу АІ, БІ, ЕІ і закономірностей перебігу імунологічних реакцій та формування специфічного і неспецифічного імунітету проти їх збудників; визначення в умовах *in vivo* ефективності методів лабораторної діагностики, засобів етіотропної терапії та імунопрофілактики цих захворювань; встановлення видів тварин, які відіграють роль природного джерела (“хазяїна”) інфекції та механізмів передачі патогенів, а також розробка способів виділення збудників АІ, БІ, ЕІ та дослідження їх біологічних властивостей, у тому числі й пато-

генного потенціалу. В Європі (у тому числі й в Україні) домінуючими видами збудників захворювань людей на АІ, БІ, ЕІ, відповідно, є: *Anaplasma phagocytophilum* (викликає гранулоцитарний анаплазмоз людини — ГАЛ); *Bartonella henselae* (викликає хворобу від котячих подряпин — ХКП, бацилярний ангіоматоз — БА, пеліозний гепатит, ендокардит, гостру або хронічну бактеремію, нейроретиніт, енцефаліт, менінгіт, менінгоенцефаліт, енцефаломієліт) та *B. quintana* (викликає БА, окопну гарячку, ендокардит, хронічну бактеремію); *Ehrlichia muris* (викликає моноцитарний ерліхіоз людини — МЕЛ). Тому переважна більшість розроблюваних у світі лабораторних моделей спрямована на дослідження саме цих — найбільш клінічнозначимих патогенів. При цьому, у першу чергу, використовуються ті види тварин, які є природним хазяїном вказаних збудників. В якості таких тварин для досліджень АІ були використані коні, велика рогата худоба, вівці, білохвості олені, собаки, деревинні щури та білоногі миші [10, 15, 16]; для вивчення БІ — домашні коти, собаки, койоти, примати та бавовняні щури [8, 12, 14], а для ЕІ — собаки та білохвості олені [17, 21]. Використання вказаних тварин хоча і дозволяє в експерименті досить подібно відтворювати природний перебіг АІ, БІ, ЕІ у ссавців та людей, але має ряд суттєвих недоліків, пов’язаних із їх недоступністю для широкого застосування в діагностичній практиці, високою вартістю таких тварин, труднощами утримання останніх в умовах лабораторії та технічною складністю проведення на них експериментів, а також обмеженнями щодо можливості створення уніфікованої лабораторної моделі для всієї групи трансмісивних бактеріальних інфекцій, що пов’язано із здатністю кожного виду патогенів розмножуватись і накопичуватись лише у певному виді чутливих до них тварин тощо. Тому в останні роки відмічена тенденція зростання кількості досліджень, які спрямовані на розробку технічно більш зручних моделей експериментального відтворення АІ, БІ, ЕІ, що ґрунтуються на використанні найбільш поширених лабораторних тварин — найчастіше мишей, значно рідше щурів, мурчаків, кролів [9, 10, 13, 14, 19]. Слід зазначити, що у звичайних білих нелінійних лабораторних мишей перебіг експериментальної

AI, BI, EI характеризується повною відсутністю або надзвичайно слабо вираженими симптомами захворювання (яке майже ніколи не закінчується загибеллю піддослідних тварин) без суттєвого розмноження та накопичення у їх організмі збудників та швидкою елімінацією останніх, навіть за умов наявності бактеремії у цих тварин на початковому етапі після їх зараження [9, 13, 19, 21]. Вказані обставини спонукають дослідників застосовувати спеціальні (генетичноклоновані) сингенні лінії мишей із вродженим імунокомпрометованим станом, що характеризуються високим рівнем чутливості до збудників різних інфекційних захворювань [9, 10, 13]. Однак, такі лінійні імунокомпрометовані лабораторні тварини є відносно дорогими, досить дефіцитними, потребують спеціально створених умов для їх ізольованого утримання та розмноження, що запобігало б загибелі тварин при випадковому зараженні будь якою інфекцією. Це суттєво ускладнює стабільне (безперервне) забезпечення лінійними імунокомпрометованими тваринами бактеріологічних лабораторій і широке практичне їх використання для БМ діагностики AI, BI, EI [10, 13, 17].

Метою роботи було проведення експериментальної оцінки ефективності використання білих нелінійних мишей із штучно сформованим імунокомпрометованим станом для виявлення найбільш клінічно значимих видів збудників AI, BI, EI у зразках біологічного матеріалу різного походження.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Узагальнена схема-алгоритм проведених досліджень складалась із таких послідовних етапів: підготовка зразків досліджуваного біологічного матеріалу; зараження підготовленими зразками лабораторних тварин із штучно сформованим імунокомпрометованим станом; відбір від передчасно сконалих і морталізованих піддослідних тварин зразків секційного матеріалу — тканин і органів, які потенційно найбільш інтенсивно уражаються вказаною групою патогенів; верифікація етіології AI, BI, EI у тварин методом ПЛР-детекції найбільш клінічно значимих видів збудників у відібраних зразках секційного матеріалу.

При виконанні роботи було досліджено 87 зразків біологічного матеріалу різного походження, які потенційно могли містити збудники AI, BI, EI: 24 — гомогенати кліщів родини *Ixodidae*

(*Ixodes ricinus*, n=121; *Dermacentor reticulatus*, n=119), зібрані у Харківській та Полтавській областях; 11 — кров від укушених кліщем собак (*Canis familiaris*) та 10 — кров від домашніх котів (*Felis domestica*), відібраної під час надання тваринам допомоги у ветеринарній клініці “Айболіт” (м. Харків); 12 — кров від укушених кліщем овець (*Ovis aries*) ДП “Ветеринарна медицина” (Харківська обл.); 22 — кров від людей, що постраждали від укусу кліща, та 8 — кров пацієнтів із клінічним проявом захворювання подібного на BI (ХКП, БА), яким надавалась медична допомога у комунальному закладі охорони здоров’я “Харківська обласна клінічна лікарня № 02003652”. Усі зразки досліджуваного матеріалу зібрано у період весна—осінь 2011 і 2012 роках.

Основні особливості підготовки зразків біологічного матеріалу для виявлення БМ збудників AI, BI, EI полягали у наступному. Зразки крові відбирали з використанням вакуумних систем забору крові VENOSAFETM, Terumo Europe N.V. (Бельгія) і пробірок VF-052SDK (робочий об’єм 2 мл) із антикоагулянтом K2 EDTA (який не володіє антимікробною активністю). Відібрані зразки крові одноразово заморожували (при температурі близько  $-20^{\circ}\text{C}$ ) і розморожували (при кімнатній температурі) для руйнування клітин крові та вивільнення із них клітин і мікроколоній патогенів. Зразки біологічного матеріалу твердої консистенції (кліщі, секційний матеріал від тварин) підлягали ретельній гомогенізації (шляхом подрібнення та розтирання) і розведенню стерильною дистильованою водою у співвідношенні близько 1:9 (об’єм/маса, відповідно) з подальшим перемішуванням до утворення рівномірної суспензії. Перед гомогенізацією поверхня кліщів дезінфікувалась шляхом занурення останніх на 10 хв у 70% етиловий спирт. Гомогенізації підлягало все тіло кліща, так як збудники AI, BI, EI можуть знаходитись у різних його тканинах і органах (слинних залозах, лімфі, кишечнику, тощо). Для приготування одного зразку гомогенату використовували 10 кліщів імаго одного виду, зібраних у одній місцевості. Лабораторним тваринам вводили супернатант суспензії гомогенованих зразків, який відбирали після відстоювання (упродовж 5 хв) і самовільного осадження в осад великорозмірних частинок. Усі маніпуляції при відборі та підготовці для дослідження зразків біологічного матеріалу здійснювали з дотриманням правил асептики для запобігання додатковій їх контамінації сторонньою мікрофлорою.

При проведенні досліджень були використані миші (n=101, самці і самки) лабораторні білі нелінійні (*Mus musculus* L.), які представляли три відмінні за призначенням групи: група № 1 — контрольні інтактні тварини (n=7); група № 2 — контрольні тварини із штучно сформованим імунокомпрометованим станом (n=7); група № 3 — піддослідні тварини з імунокомпрометованим станом, які були заражені зразками досліджуваного біологічного матеріалу різного походження (n=87), що потенційно могли містити збудники АІ, Бі, ЕІ.

Штучний імунокомпрометований стан у лабораторних тварин створювався шляхом одноразової підшкірної ін'єкції їм 250 мкг/кг лікарського препарату “Циклофосфан®” (виробництва ВАТ “Київмедпрепарат”, м. Київ, Україна) за 3–4 години перед інокуляцією тваринам зразків досліджуваного біологічного матеріалу. Останній в об'ємі 0,3 мл вводили шляхом інтраперитонеальної ін'єкції. Термін спостереження за зараженими тваринами становив 8–10 діб. При спостереженні виявляли передчасну загибель тварин і виникнення у них клінічних ознак захворювання: зниження рухливості та апетиту, інертність при тактильному і звуковому подразненні, згорблена посадка, кульгавість, метеоризм, втрата близько 30% маси тіла. Відбір секційного матеріалу від загиблих та морталізованих тварин (методом гіпернаркозування хлороформом) відбувався в умовах ветеринарної операційної віварію ДУ “ІМІ НАМН” у чіткій відповідності до вимог, які стосувались правил та схеми відбору органів-мішеней [3].

Для точної верифікації етіології інфекційного процесу у загиблих та морталізованих тварин застосовували ПЛР у стандартному форматі. При цьому верифікація етіології АІ, Бі, ЕІ ґрунтувалась на виявленні основних видів збудників цих інфекцій (*A. phagocytophilum*, *B. henselae* і *V. quintana*, *E. muris* відповідно) у зразках крові (відібраної шляхом пункції серця із дотриманням правил асептики) у піддослідних тварин, заражених зразками біологічного матеріалу. При відтворенні ПЛР використовували комерційні набори реагентів фірми “IsoGene Lab. Ltd.” (м. Москва, РФ) [18]: “Комплект реактивів для універсальної пробопідготовки” — Diatom®DNA Prep 100 (включає реактиви для виділення та очищення із зразків біологічного матеріалу ДНК з метою подальшої ампліфікації визначеного її фрагменту); “Набори реагентів для ампліфіка-

ції ДНК” — Gene Pak®PCR test: E2136 (включає реакційні суміші із системою праймерів (СП) Ерh для ампліфікації специфічного фрагменту геному *A. phagocytophilum*) і E 2138 (включає реакційні суміші із СП Еmu для ампліфікації специфічного фрагменту геному *E. muris*); “Набор реагентів для ампліфікації ДНК” — Gene Pak®DNA PCR Core (включає універсальні реакційні суміші, які не містять будь-яких СП, а можуть бути використаними для ампліфікації специфічних фрагментів геному *B. henselae* і *V. quintana* при додаванні спеціально синтезованих СП); “Маркер молекулярной массы ДНК, M50, M100” — GenePak™ DNA Ladder M50, M100 (включає суміші фрагментів ДНК різної молекулярної маси, які відрізняються на 50 або 100 пар нуклеотидів, відповідно, і використовуються для порівняльного встановлення розміру утворених ампліконів при відтворенні ПЛР із синтезованими СП [20]); “Универсальный внутренний контроль УВК-90” (включає набори реактивів для моніторингу можливих втрат ДНК при її виділенні із досліджуваних зразків біологічного матеріалу і для визначення можливого інгібування ПЛР у процесі її відтворення; використовується разом із іншими наборами реагентів для ампліфікації ДНК фірми “IsoGene Lab. Ltd.”). При використанні усіх вказаних наборів дотримувались правил, викладених в інструкціях їх виробника (табл. 1), представлено відомості щодо походження СП, межі специфічної детекції (виявлення) найбільш клінічнозначимих видів збудників АІ, Бі, ЕІ, локуси (гени) ампліфікації фрагменту їх геному, розміри утворених ампліконів, посилання на літературне джерело, у якому наведено протокол технології відтворення ПЛР із кожною СП.

Для встановлення факту розмноження і накопичення збудників АІ, Бі, ЕІ у піддослідних тварин групи № 3 вибірково (з урахуванням позитивного результату ПЛР) методом реакції непрямої імуофлюоресценції (РНІФ) [5, 7] було проведено порівняльне визначення кількості корпускулярного антигену (клітин і мікроколоній) бактерій родів *Anaplasma*, *Bartonella*, *Ehrlichia* у зразках досліджуваного біологічного матеріалу, якими заражались піддослідні тварини, та у зразках секційного матеріалу від останніх — тканинах і органах, що потенційно можуть містити найбільшу кількість клітин збудників АІ, Бі, ЕІ (кров, селезінка, кістковий мозок, печінка, лімфовузли). Статистична обробка результатів

**Система праймерів та відомості щодо протоколу досліджень методом ПЛР-детекції  
найбільш клінічнозначимих видів збудників АІ, Бі, ЕІ**

Система праймерів	Межі специфічної детекції видів збудників АІ, Бі, ЕІ	Локус (ген) ампліфікації	Розмір амплікону (пар нуклеотидів)	Літературне джерело
<b>Eph</b> (комерційна) фірма “IsoGene Lab.ltd.” (м. Москва, РФ)	<i>A. phagocytophilum</i>	16SpPHK	227	[18]
<b>BartogltA(f)</b> 5'TTCCgCCTTATgggTTTTgg3'	<i>B. henselae</i>  <i>B. quintana</i>	<i>gltA</i>	246	[20]*
<b>Bartohenselae(r)</b> 5'CATTTCTgTTggAAATCCTag3'				
<b>Bartoquintana(r)</b> 5'TTTTAAAgTAATgCCAgAATAA3' (синтезована) НВ фірма “Литех” (м. Москва, РФ)				
<b>Emu</b> (комерційна) фірма “IsoGene Lab.ltd.” (м. Москва, РФ)	<i>E. muris</i>	16SpPHK	223	[18]

**Примітка.** f (forward) — прямий праймер, r (reverse) — зворотній праймер; \* — розміри ампліконів визначені авторами розрахунковим методом множинного вирівнювання.

досліджень здійснювалась як викладено у посібнику [1].

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Доцільність і перспективність проведення експериментальних досліджень з метою оцінки ефективності використання білих нелінійних мишей для виявлення БМ у зразках біологічного матеріалу різного походження збудників інфекційних захворювань ґрунтується на можливості штучно сформувати (індукувати) у піддослідних тварин набутий імунікомпрометований стан (шляхом уведення їм хімічних сполук з імунідепресивною дією), що створює сприятливі умови *in vivo* для розмноження і накопичення патогенів. На сьогодні уже існує великий перелік лікарських препаратів, які характеризуються різнотипними механізмами імунідепресії без прояву протибактерійної активності [2, 6]. Це дозволяє здійснювати оптимальний вибір саме тих препаратів, які забезпечують найбільш адекватне відтворення потрібного імунікомпрометованого стану у піддослідних тварин із уникненням при цьому небажаної бактерицидної (або пригнічуючої) дії на збудники АІ, Бі, ЕІ. Наш вибір вітчизняного лікарського препарату “Циклофосфан®” (виробник ВАТ “Київмедпрепарат”) саме й обґрунтовується детально вивченими механізмами його імунідепресивної дії, відсутністю протибактерійної активності, дешевизною і загальною доступністю цього препарату [6]. Оптимальною

для уведення тваринам є й емпірично визначена нами (у попередніх дослідженнях) доза препарату 250 мкг/кг. Вказана доза, з одного боку, є достатньою для формування досить вираженого і стійкого імунікомпрометованого стану, а з іншого боку — не призводила до непередбачуваної загибелі піддослідних тварин, на відміну від уведення 500, 750 і 1000 мкг/кг, що супроводжувалось їх загибеллю у близько 8, 17 і 25% випадків, відповідно. Крім того, запропонований нами підшкірний спосіб ін'єкції препарату, на відміну від інтрабрюшинного [4], забезпечує більш рівномірне надходження препарату у систему кровообігу та кровотворні органи, знижує швидкість елімінації препарату із організму тварини, що забезпечує формування більш тривалого у часі (до 7–10 діб) імунікомпрометованого стану — достатнього для розмноження і накопичення збудників АІ, Бі, ЕІ у органах та тканинах заражених тварин [8, 13, 14, 17, 19]. До того ж, інтраперитонеальний метод уведення тваринам зразків досліджуваного біологічного матеріалу забезпечує велику площу для аплікації збудників АІ, Бі, ЕІ і підвищує вірогідність контакту останніх із клітинами-мішенями (макрофагами, лейкоцитами, еритроцитами та іншими), інтрацелюлярно в яких вказані патогени здатні розмножуватись [11, 12, 19].

Визначення та порівняння рівня морбідності (передчасної загибелі і захворюваності) у трьох відмінних груп лабораторних тварин дозволи-

ло встановити, що на відміну від контрольних тварин груп № 1 і № 2, у піддослідних тварин групи № 3 виникає клінічно виражене захворювання у 67,8% випадків, яке може призводити у 39,0% випадків до передчасної загибелі тварин на 3–10 добу після їх зараження. При цьому, у подальшому із використанням методу ПЛР було встановлено, що безпосередньо перебіг АІ, БІ, ЕІ може бути причиною передчасної загибелі піддослідних тварин (у 17,4, 13,0 і 8,7% випадків, відповідно), або супроводжуватись виникненням у них клінічних ознак захворювання без загибелі тварин упродовж терміну спостереження (у 43,8, 33,3 і 25,0% випадків, відповідно), або перебігати при відсутності виражених симптомів інфекції (у 31,3, 41,6 і 25,0% випадків, відповідно). Крім того, представлені результати аналізу морбідності тварин групи № 3 підтвердили і той передбачуваний постулат, що у лабораторних тварин із штучно сформованим імунокомпрометованим станом зростає чутливість не лише до збудників АІ, БІ, ЕІ, а й до інших патогенів, які можуть міститись у зразках досліджуваного матеріалу, що уводяться цим тваринам. Важливим є й той, добре відомий на сьогодні факт, що клішеві інфекції, як правило, є змішаними (мікстними), а не моноінфекціями [9, 12, 16, 21]. Тобто, унаслідок укусу кліща в організм потерпілого (людини, тварини) одночасно можуть потрапляти декілька видів збудників із подальшим розвитком мікстного інфекційного захворювання (АІ з БІ,

АІ з ЕІ, БІ з ЕІ, тощо). Тому, цілком необхідним є уточнення (верифікація) етіології інфекційного процесу у піддослідних тварин, заражених зразками біологічного матеріалу різного походження, які потенційно можуть містити збудники різних трансмісивних бактеріальних інфекцій.

Результати виявлення методом ПЛР найбільш клінічнозначимих видів збудників АІ, БІ і ЕІ у вихідних зразках досліджуваного біологічного матеріалу і у крові піддослідних тварин, заражених цими ж зразками представлено в табл. 2 і 3, відповідно. Доцільність відбору саме зразків крові з метою точної верифікації етіології інфекційного процесу у загиблих та морталізованих тварин обґрунтовується простотою виконуваних для цього експериментальних маніпуляцій, а також повним співпаданням отриманих нами (позитивних і негативних) результатів ПЛР при вибіркового паралельному дослідженні зразків крові та інших кровотворних органів (селезінки, кісткового мозку, печінки, лімфовузлів), відібраних від одних і тих самих піддослідних тварин. Порівняльний аналіз результатів досліджень, наведених у табл. 2 і 3 демонструє суттєве ( $p < 0,05$ ) зростання (з 14,9 до 36,8% випадків) частоти виявлення трансмісивних бактерійних патогенів за умови дослідження одних і тих самих зразків біологічного матеріалу з використанням запропонованого БМ. При цьому, частота виявлення *A. phagocytophilum* зросла з 6,9 до 18,4%, *B. quintana* — з 2,3 до 3,4%, *B. henselae* — з 4,6 до

Таблиця 2

**Результати виявлення методом ПЛР найбільш клінічнозначимих видів збудників АІ, БІ, ЕІ у зразках біологічного матеріалу різного походження**

Походження зразків біологічного матеріалу	Кількість досліджуваних зразків	Позитивний результат ПЛР із СП			
		Eph	BartogltA(f) + Bartoquintana(r)	BartogltA(f) + Bartohenselae(r)	Emu
		абс.ч. (%)	абс.ч. (%)	абс.ч. (%)	абс.ч. (%)
Гомогенати іксодових кліщів	24	4 (16,7)	0	0	1 (4,2)
Кров від котів, які отримували ветеринарну (хірургічну) допомогу	10	—	1 (10,0)	4 (40,0)	—
Кров від собак, укушених кліщем	11	0	0	0	—
Кров від овець, укушених кліщем	12	2 (8,3)	0	0	0
Кров від людей, які постраждали від укусу кліща	22	0	0	0	0
Кров хворих пацієнтів із клінічним проявом захворювання подібного на БІ	8	—	1 (12,5)	0	—
Всього	87	6 (6,9)	2 (2,3)	4 (4,6)	1 (1,1)

Примітка. “—” — дослідження не проводилось.

**Результати виявлення методом ПЛР найбільш клінічнозначимих видів збудників АІ, Бі, ЕІ у зразках крові від піддослідних тварин**

Кров від піддослідних тварин, заражених зразками біологічного матеріалу різного походження	Кількість досліджуваних зразків	Позитивний результат ПЛР із СП			
		Eph	BartogltA(f) + Bartoquintana(r)	BartogltA(f) + Bartohenselae(r)	Emu
		абс.ч. (%)	абс.ч. (%)	абс.ч. (%)	абс.ч. (%)
Гомогенатами іксодових кліщів	24	7 (29,2)	0	1 (4,2)	2 (8,3)
Зразками крові від котів, які отримували ветеринарну (хірургічну) допомогу	10	—	1 (10,0)	6 (60,0)	—
Зразками крові від собак, укушених кліщем	11	1 (9,1)	0	0	1 (9,1)
Зразками крові від овець, укушених кліщем	12	5 (41,7)	0	0	0
Зразками крові від людей, які постраждали від укусу кліща	22	3 (13,6)	0	0	1 (4,5)
Зразками крові пацієнтів із клінічним проявом захворювання подібного на Бі	8	—	2 (25,0)	2 (25,0)	—
Всього	87	16 (18,4)	3 (3,4)	9 (10,3)	4 (4,6)

Примітка. “—” — дослідження не проводилось.

10,3%, *E. muris* — з 1,1 до 4,6% випадків. Частка мікстної інфекції, обумовленої *A. phagocytophilum* в поєднанні із *B. henselae* або із *E. muris*, становила 6,3% і була виявлена у двох тварин, заражених гомогенатами кліщів. Відмічене зростання частоти виявлення збудників АІ, Бі, ЕІ вірогідно обумовлено розмноженням і накопиченням патогенів в організмі імунокомпрометованих заражених тварин. Це підтвердили результати порівняльного визначення кількості корпускулярного антигену бактерій родів *Anaplasma*, *Bartonella*, *Ehrlichia* у зразках досліджуваного біологічного матеріалу, якими заражались піддослідні тварини, та у зразках секційного матеріалу від останніх. В усіх досліджених зразках секційного матеріалу (кров із серця, селезінка, кістковий мозок, печінка, лімфатичні вузли) відмічено накопичення до високих концентрацій (від  $9,7 \cdot 10^5$  до  $1,3 \cdot 10^8$  корпускул/мл, г) вказаних антигенів, які перевищували більш ніж у  $10^2$ – $10^3$  раз їх концентрацію у відповідних зразках біологічного матеріалу, якими були заражені тварини.

### ВИСНОВКИ

Білі нелінійні мишей із штучно сформованим (шляхом підшкірного уведення лікарського препарату “Циклофосфан®”) у дозі 250 мкг/кг) імунокомпрометованим станом здатні (впродовж 8–10 діб) накопичити до високої концентрації

(близько  $10^5$ – $10^8$  корпускул/мл, г) збудники АІ, Бі, ЕІ у крові та органах гемопоезу після інтраабдомінального уведення цим тваринам зразків біологічного матеріалу різного походження, якщо останні містять вказані патогени. При цьому, інфекційний процес у піддослідних тварин може перебігати у формі клінічно вираженого захворювання із передчасною загибеллю тварин, супроводжуватись виникненням клінічних ознак захворювання без їх загибелі, або перебігати при відсутності виражених симптомів інфекції.

Білі нелінійні миші із штучно сформованим імунокомпрометованим станом можуть бути використані для виявлення збудників трансмісивних бактеріальних інфекцій (АІ, Бі, ЕІ) БМ, технологія відтворення якого включає ряд послідовних етапів: підготовка зразків досліджуваного біологічного матеріалу; зараження підготовленими зразками лабораторних тварин із штучно сформованим імунокомпрометованим станом; відбір крові від передчасно сконалих і морталізованих піддослідних тварин; детекція методом ПЛР у зразках крові від тварин найбільш клінічнозначимих видів збудників АІ, Бі, ЕІ. Використання БМ при дослідженні 87 зразків біологічного матеріалу різного походження дозволило підвищити рівень виявлення вказаних патогенів у 2,7, 2,0, 4,2 раз, відповідно.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
2. Медицинский справочник лекарств. АТХ-классификация: Иммунодепрессанты. — 2011. — Режим доступа: <http://www.ros-med.info/reestr-ls>.
3. Ноздрачев А.Д., Поляков Е.Л. Анатомия мыши: (лабораторные животные) / под ред. акад. А.Д. Ноздрачева. — СПб.: Лань, 2001. — 464 с.
4. Пат. 2118850 С1, Российская Федерация, G09B23/28. Способ моделирования иммунодефицитного состояния по системе нейтрофильных гранулоцитов / Н.В. Колесникова, И.В. Нестерова, Г.А. Чудилова — № 95100681/14; заявл. 17.01.1995; опубл. 10.09.1998.
5. Пат. № 56975 Україна, С12N1/20. Спосіб діагностики анаплазмозної інфекції шляхом виявлення антигену збудника в реакції непрямой імунофлюоресценції (РНІФ) / С.І. Похил, О.М. Тимченко, Н.А. Чигиринська, І.А. Костириця, В.М. Козько, К.В. Юрко — № u201004219; заявл. 12.04.2010; опубл. 10.02.2011, Бюл. № 3.
6. Телегин Л.Ю. Экспериментальная фармакогенетика циклофосфамида: Автореф. дис. ... д-р мед. наук: 14.03.06 — Фармакология, клиническая фармакология / Л. Ю. Телегин. — М., 2010. — 46 с.
7. Тимченко О.М. Результати випробовування експериментальних зразків РНІФ-тест-систем для діагностики бартонельозної інфекції // Медиц. сьогодні та завтра — 2008. — № 4. — С. 48–53.
8. An immunocompromised murine model of chronic Bartonella infection / L. Chiaraviglio, S. Duong, D.A. Brown, R. Birtles, J. Kirby // *Americ. J. Pathol.* — 2010. — Vol. 176, № 6. — P. 2753–2763.
9. Bakaletz L.O. Developing animal models for polymicrobial diseases // *Microbiology.* — 2004. — Vol. 2, № 7. — P. 552–568.
10. Borjesson D.L., Barthold S.W. The mouse as a model for investigation of human granulocytic ehrlichiosis: current knowledge and future directions // *Compar. Medic.* — 2002. — Vol. 52, № 5. — P. 403–413.
11. Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish Ehrlichia species isolate / A. Egenvall, A. Bjoersdorff, I. Lilliehook, O. Engvall, E. Karlstam, K. Artursson, A. Hedhammer, A. Gunnarsson // *Vet. Rec.* — 1998. — Vol. 143. — P. 412–417.
12. Experimental and natural infection with Bartonella henselae in domestic cats / R. Abbott, B. Chomel, R. Kasten, K. Floyd-Hawkins, Y. Kikuchi Y, J. Koehler, N. Pedersen // *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* — 1997. — Vol. 20, № 1. — P. 41–51.
13. Experimental infection of C3H/HeJ mice with the NY18 isolate of Anaplasma phagocytophilum / U. Blas-Machado, J. Fuente, E. F. Blouin, C. Almazan, K. Kocan, J. Mysore // *Vet. Pathol.* — 2007. — Vol. 44, № 1. — P. 64–73.
14. Experimental infection of cotton rats with three naturally occurring Bartonella species / M. Kosoy, R. Regnery, O. Kosaya, J. Chids // *J. Wildlife Dis.* — 1999. — Vol. 35, № 2. — P. 275–284.
15. Experimental infection of white-tailed deer with Anaplasma phagocytophilum, etiologic agent of human granulocytic anaplasmosis / C. Tate, D. Mead, M. P. Luttrell, E. Howerth, V. Dugan, U. Munderloh, W. Davidson // *J. Clin. Microbiol.* — 2005. — Vol. 43, № 8. — P. 3595–3601.
16. Experimental inoculation with human granulocytic Ehrlichia agent derived from high- and low-passage cell culture in horses / N. Pusterla, J. Madigan, K. Asanovich, J. Chae, E. Derock, C. Leutenegger, J. Pusterla, H. Lutz, J. Dumler // *J. Clin. Microbiol.* — 2000. — Vol. 48, № 3. — P. 1276–1278.
17. Feng H.M., Walker D.H. Mechanisms of immunity to Ehrlichia muris: a model of monocytotropic ehrlichiosis // *Infect. and Immun.* — 2004. — Vol. 72, № 2. — P. 966–971.
18. Gene Pak® DNA PCR test. Набор реагентов для обнаружения ДНК возбудителей инфекционных заболеваний методом полимеразной цепной реакции. ТУ 9398-001-73867468-2005 / Инструкция // ООО “Лаборатория Изоген”. — Июль 2010. — 14 с.
19. Granulocytic ehrlichiosis in the laboratory mouse / E. Hodzic, J. Ijdo, P. S. Feng, P. Katavolos, W. Sun, C. Maretzki, D. Fish, E. Fikrig, S. Telford III, S. Barthold // *J. Infect. Dis.* — 1998. — Vol. 177, № 3. — P. 737–745.
20. Molecular detection of Bartonella quintana, B. koehlerae, B. henselae, B. clarridgeiae, Rickettsia felis, and Wolbachia pipientis in cat fleas, Franse / J. Rolain, M. Franc, B. Davoust, D. Raoult // *Emer. Infect. Dis.* — 2003. — Vol. 9, № 3. — P. 338–342.
21. Paddock C., Childs J. Ehrlichia chaffeensis: a prototypical emerging pathogen // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2003. — Vol. 16, № 1. — P. 37–64.

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БЕЛЫХ НЕЛИНЕЙНЫХ МЫШЕЙ С ИСКУССТВЕННО СФОРМИРОВАННЫМ ИММУНОКОМПРОМИСНЫМ СОСТОЯНИЕМ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ТРАНСМИССИВНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ (АНАПЛАЗМОЗА, БАРТОНЕЛЛЕЗА, ЭРЛИХИОЗА)

С.И. Похил, Е.Н. Тимченко, Н.А. Чигиринская, И.И. Торяник, Л.В. Килипко, Е.И. Семеренская

Проведена экспериментальная оценка эффективности использования белых нелинейных мышей с искусственно сформированным (путем подкожного введения лекарственного препарата “Циклофосфан®” в дозе 250 мкг/кг) иммунокомпромисным состоянием для биологического метода (БМ) выявления наиболее клинически значимых видов возбудителей анаплазмоза (*A. phagocytophilum*), бартонеллеза (*B. henselae*, *B. quintana*) и эрлихиоза (*E. muris*). Использование БМ при исследовании 87 образцов биологического материала различного происхождения позволило повысить уровень выявления указанных возбудителей анаплазмоза, бартонеллеза, эрлихиоза в 2,7, 2,0 и 4,2 раза, соответственно.

### THE ACCOUNTING OF WHITE UNLINEAR MICE WITH THE FEIGNEDLY FORMED IMMUNOCOMPROMISE STATUS FOR THE BIOLOGICAL METHOD'S DETECTION OF THE TRANSMISSED BACTERITIC INFECTION'S AGENTS (ANAPLASMOSIS, BARTONELLOSIS, EHRLICHIOSIS)

S.I. Pokhil, Ye. M. Timchenko, N.A. Chigirinsky, I.I. Torianik, L.V. Kilipko, E.I. Semersky

The experimental appraisal effectiveness of application the white unlinear mice with the feignedly formed (subcutaneous injection of the “Cyclophosphan” in dose of the 250 mcg/kg) immune and compromise status for the biological method's (BM) of the detection more clinically significant agent's species of the anaplasmosis (*A. phagocytophilum*), bartonellosis (*B. henselae*, *B. quintana*), ehrlichiosis (*E. muris*) has been conducted. The accounting BM in investigation (examine) of the 87 different origin biological material's pattern's it has allowed to raise the level of appointed agents detection in compliance with 2,7-, 2,0- and 4,2-fold.