

## **CHLAMYDIA sp. sp. KINDLAKSTEGEMINE JA LOKALISATSIOON VASIKATE JA PÕRSASTE KESKNÄRVISÜSTEEMIS**

N. Koslov, J. Kärner

**ABSTRACT. Detection and Localisation of Chlamydia sp. sp. in the Central Nervous System in Calves and Piglets.** Our numerous and long-term studies have demonstrated the localization of Chlamydia in the brain and spinal cord of calves and piglets, which were stillborn, weaklings, died postnatally or were slaughtered at the age of 3 months. The animals were obtained from various districts in Estonia. Chlamydia were detected by determining chlamydial antigen (lipopolysaccharide) in the brain applying the immunofluorescence method and electron-microscopic studies.

Chlamydial antigen was revealed in the brain samples taken from 65 calves of the total of 105, i.e. 61,9%. The antigen was most common in stillborn calves – in 18 cases of the total of 23, consequently 78,3%. 57,3% of postnatally dead or slaughtered calves (47 cases out of the 82 investigated animals) had an infected CNS. It should be underlined that the percentage of infected calves was higher in 1-week old animals (61,8%). In the calves between 8–14 days after birth the percentage of the infected animals was 56,3% and it was diminished in the animals at the age of 1,5–3 months (50%). Of the investigated piglets the CNS was infected by chlamydial antigen in 28 animals, i.e. 49,1%. In the 5 stillborn piglets the positive sample was found only in one animal. Among the dead piglets and slaughtered weaklings the positive test was detected in 27 animals, i.e. 51,9% of all the investigated piglets in this category. Most of the infected piglets died on the 1–3rd day postnatally or were slaughtered (16 piglets of 22, i.e. 72,7%). Considerably high was the percentage of infected animals at the age of 15–30 days (77,8%), lower in the piglets which died 4–14 days or 1–3 month after birth (20% and 18,2% respectively).

Our electronmicroscopical investigation demonstrated the presence of vacuoles in the brain and spinal cord containing elementary and reticulate bodies with typical size and structure for Chlamydia.

**Keywords:** Chlamydia, calves, piglets, brain, spinal cord.

Klamüdiiosne nakkus avastati imetajatest loomadest esimesena noorveistel (McNutt, 1940). Selgus, et klamüüdiad põhjustavad vasikatel nakkuslikku entsefaliiti ja meningiiti. Hilisemates uurimistes selgus, et haigestuda võivad peale vasikate ka vanemad veised (Menges *et al.*, 1953). Et teistel loomaliikidel seda nakkust ei tuvastatud, hakati haigust nimetama veiste sporaadiliseks entsefalomüeliidiks. Hiljem, sealhulgas ka meie andmetel (Koslov *et al.*, 2000), tehti kindlaks klamüüdiate etioloogiline roll haigusetkitajana paljudel kodu- ja ulukloomaliikidel.

Klamüdiioosi uurimisega loomadel oleme tegelnud alates 1987. aastast ning oma uurimistulemusi korduvalt tutvustanud (Koslov, 1996, 1998; Koslov *et al.*, 1996, 2000).

Klamüüdiad on obligatoorsed rakusisesed parasiidid ning nende paljunemine ilma elusrakuta ei ole võimalik. Klamüüdiate parasiteerimise omapära on selles, et nad oma paljunemise alguses ei häiri ega riku peremeesraku elufunktsiooni. Klamüüdiate elutsükel on keeruline, selles võib eristada põhiliselt kahte morfoloogiliselt ja funktsionaalselt erinevat rakuvormi – nakkuslikku elementaarkehakest ja mittenakkavat reproduktiivset retikulaarkehakest. Rakk nakatub elementaarkehakestega. Nakkus algab elementaarkehakese adsorbeerumisega peremeesraku pinnale, kust see sopistub endotsütoosi teel koos rakumembraaniga raku tsütoplasmasse, moodustades seal vakuooli (fagosoomi). Selles vakuoolis toimub kogu arengutsükel. Elementaarkehake hakkab kiiresti suurenema ning diferentseeruma retikulaarkehakeseks, mis omakorda hakkab poolduma binaarse jagunemise teel, kasutades selleks peremeesraku energiavaru. Ligikaudu 24 tundi pärast nakatumist diferentseeruvad selles suurenenud vakuoolis (inklusioonis) retikulaarkehakesed elementaarkehakesteks. Replikatsioonitsükel kestab 48–72 tundi ning lõpeb peremeesraku rebenemise ja lagunemisega ning elementaarkehakete vabanemisega. Valminud inklusioon võib sisaldada ligikaudu  $10^4$  klamüüdia elementaarkehakest ning hõlmata 75% peremeesraku kogumahust.

Klamüdiios on statsionaarse iseloomuga haigus, kuna klamüdiioosi puhul haigusetkitaja persisteerub pikka aega selle infektsiooni läbipõdenud peremeesorganismis (näiteks mao-sooletraktis ja suguelundeis).

Meie uurimistöö algusaastail kehtis Eestis veel sotsialistlik põllumajandus oma kolhooside ja sovhooside suurfarmidega, kus peeti sadu lüpsilehmi ja noorloomi. Nii kirjanduse andmeil kui ka meie uurimistest on selgunud, et veiste klamüdiios, mis põhjustab klamüdiiosse abordi, entsefalomüeliidi, vasikate klamüdiiosse gastroenteriidi, bronhopneumoonia, esineb sagedamini ja kulgeb raskemini suurfarmides. Paljudes suurfarmides ei olnud loomade söötmise ja zoohügieenilised pidamistingimused vajalikul tasemel, esines palju stressifaktoreid, mis üldjuhul vähendavad emaorganismi vastupanuvõimet ning toovad kaasa latentse klamüdiiosse infektsiooni aktiveerumise. Suhteliselt tavaline oli farmidevaheline karjade täiendamine ja uuendamine ilma

eriliste ettevaatusabinõudeta. Abordid ja surnult sündinud vasikad esinesidki peamiselt esmaspoegijatel või sissetoodud loomadel. Sissetoodud vastuvõtlike loomade organismis teevad klamüüdiad läbi passaaži, nende virulentsus tõuseb ning tagajärjeks on uute haiguspuhangute teke.

Väikefarmid on rohkem suletud süsteemid loomade väiksema vahetuse tõttu. Sellistes farmides esineb klamüdioosi tagajärjel aborte ja vasikate surnultsündide vähem, kuna kord aborteeritud või surnud vasika sünnitanud loomad omandavad immuunsuse. Samuti on täheldatud, et väikefarmides kulgevad vasikatel gastroenteriidid ja bronhopneumooniad kergemini ning surmaga lõppevaid juhtumeid on vähem.

Oma uurimistöö käigus selgitasime, et tol perioodil langes 56 suurmajandi karjades abortide, surnultsündide, lõppemiste ja hädatapmistega tõttu välja kokku 9765 vasikat ehk 15,4%. Selle aja statistika andmeil oli Eestis tervikuna vasikate kadu 1986. ja 1987. aastal vastavalt 15,5% ja 15,3%. Seega võime oma uurimistöö põhjal väita, et üheks surnultsündide ja elujõuetute vasikate sündimise oluliseks põhjuseks oligi klamüdioos, mis sageli oli assotsieerunud viirushaigustega (Koslov, 1994, 1996).

Meie uurimistöö alguses oli tuntud kaks klamüüdioliiki: *Chlamydia trachomatis* ja *Chlamydia psittaci*, hiljem lisandusid neile veel *Chlamydia pneumoniae* (Grayston *et al.*, 1989) ja *Chlamydia pecorum* (Fukushi, Hirai, 1992). Praeguseks ajaks on kindlaks tehtud, et *Chlamydiaceae* sugukonnas ei ole ainult perekond *Chlamydia* eespool mainitud nelja liigiga, vaid tegelikult on kaks perekonda: *Chlamydia* ja *Chlamydophila* kokku 9 liigiga (Everett *et al.*, 1999).

Nii kirjandusest kui ka meie uurimustest on selgunud, et klamüüdiad põhjustavad väga erinevaid patoloogiaid: pneumoonia, keratokonjunktiviit, suguteede patoloogia, abort, mastiit, gastroenteriit, meningoentsefaliit, perikardiit, kuid klamüdioos võib esineda ka kliiniliste haigustunnusteta (Storz, Krauss, 1985; Koslov, 1996; Koslov *et al.*, 2000).

Kuni viimase ajani peeti selle patoloogia põhjustajateks loomadel *Chlamydia psittaci*'t ja *Chlamydia pecorum*'it, *Chlamydia trachomatis*'t ja *Chlamydia pneumoniae*'t aga inimeste patogeeniks, kuid ka neid liike on isoleeritud loomadelt. Meie oma uurimistöödes ei ole seni liiki määratud.

Mis puutub aga klamüdioosi puhul kesknärvisüsteemi uurimisse, siis seda on kirjanduse põhjal teinud üksikud teadlased (McNutt, 1940; Menges *et al.*, 1953; Bortničuk, 1991; Rasputina, 1992; Piercy *et al.*, 1999). Singh *et al.* (1988) on teinud kindlaks eksperimentaalselt nakatatud pühvlivasikatel pärast nende tapmist ajus ja väikeajus ning seljaajus otsese immunofluorestsentsmeetodiga klamüüdiaantigeeni. Kirjanduses puuduvad andmed selle kohta, et loomade aju oleks klamüdioosse nakkuse korral uuritud elektronmikroskoopiliselt, küll on aga seda tehtud Alzheimeri haiguse puhul inimeste aju uurimisel ning on avastatud *Chlamydia pneumoniae*'le iseloomulikud elementaar- ja retikulaarkehakesed (Balin *et al.*, 1998). Meie oleme elektronmikroskoopiliselt uurinud klamüdioosihaigete vasikate ja põrsaste pea- ja seljaaju alates 1996. aastast (Koslov *et al.*, 1996; Koslov, 1996, 1998).

Käesolevas artiklis avaldame oma pikaajalise uurimise tulemused vasikate ja põrsaste pea- ja seljaajus klamüüdiaantigeeni kindlakstegemise kohta ning pea- ja seljaaju elektronmikroskoopilise uurimise tulemused, mis peaks veenvalt tõestama pea- ja seljaaju tabandumist klamüüdiatega.

## Materjal ja meetodika

Klamüüdiade kindlakstegemiseks loomade ajus kasutasime immunofluorestsentsmeetodit (IF-meetod). Varasematel uurimisaastatel kasutasime klamüüdiaantigeeni (lipopolüsahhariidi) kindlakstegemiseks monoklonaalseid diagnostilisi antikehi, mis olid ette nähtud *C. trachomatis*'e kindlakstegemiseks kaudsel meetodil (Diagnostic antibodies for *Chlamydia trachomatis* antigen detection by indirect immunofluorescence, dry "Chlamyscan", valmistaja "Bioservice", Moskva). Hiljem kasutasime diagnostilisi antikehi, mis olid ette nähtud *Chlamydia trachomatis*'e määramiseks otsesel immunofluorestsentsi meetodil ("S.T.D-test, Chlamydia", valmistaja AS "Detstom-1", Moskva, ning "Chlamy-Slaid", valmistaja AS LAB-diagnostika, Moskva). Paaril viimasel aastal oleme kasutanud DAKO IMAGEN<sup>TM</sup> Chlamydia, Code № K 6101 antikehi, mis on ette nähtud *Chlamydia* kindlakstegemiseks inimeste urogenitaaltrakti ja silma proovides ning rakukultuurides.

Klamüüdia avastamiseks valmistati ajust äigepreparaadid, mida töödeldi vastavalt diagnostiliste antikehade tootja eeskirjadele. Test loeti positiivseks instruksioonis ettenähtud tingimustel. Osa teste tehti paralleelselt aju deparafineeritud histolõikudel.

Kokku uuriti 105 vasika ja 57 põrsa pea- ja seljaaju. Vasikatest oli 23 surnult sündinud, lõpnud ja tapetud vasikaid oli 82 (tabel 1). Elujõuetud ja haiged vasikad tapeti sünnist alates kuni 4 nädala vanuseni. 57 põrsast oli 5 surnult sündinud, 22 lõppesid või tapeti 1–3 päeva vanuses, 10 lõppesid 4–14 päeva vanuses, 9 vanuses 15–30 päeva ja 11 vanuses 1–3 kuud (tabel 3).

Ajuproovid elektronmikroskoopiliseks uurimiseks fikseeriti 1–3 tunni jooksul 2,5–1% glutaaraldehüüdi-paraformaldehüüdi segus või 4% paraformaldehüüdi lahuses fosfaatpuhvril (pH 7,2–7,4). Proovitükid lõigati umbes 1 mm<sup>3</sup> plokkideks ja osmeeriti 1 tunni vältel 1% OsO<sub>4</sub> vesilahuses ning sisestati epovaiku EPON812. Õhukesed lõigud valmistati ultramikrotoomil Reichert OM-2, värviti 2% uranüülatsetaadi ja pliitsitraadiga ning uuriti/fotografeeriti mikroskoobiga JEM-100S. Immunoelektronmikroskoopiliseks uurimiseks kasutati Balini ja kaasautorite (Balin *et al.*, 1998) meetodit. Koetükid töödeldi enne sisestamist vastavalt eelnimetatud protokollile,

kuid inkubeeriti primaarantikehaga öö läbi – kasutati *Chlamydia pneumoniae* monoklonaalsete antikehade (kloon MM402) asemel DAKO CT12 *Chlamydia* monoklonaalseid antikehi (Batch 128/201).

Elektronmikroskoopiliselt uuriti 11 vasika pea- ja seljaaju (tabel 4), neist 7 tapeti uurimise eesmärgil vanuses 0 päevast 4 nädalani, ülejäänud neljast vasikast oli üks surnult sündinud, kolm aga lõppenud vastavalt 2 ja 3 päeva ning 2 nädala vanuselt.

Elektronmikroskoopiliselt uuriti 6 põrsa piklikku ja seljaaju, neist kõik olid uurimise eesmärgil tapetud ajavahemikus vahetult pärast sündimist kuni 3 päeva vanuseni (tabel 5). Klamüüdiaantigeen tehti neist kindlaks viiel põrsal (tabel 5).

## Uurimistulemused ja nende analüüs

**Vasikad.** Klamüüdiaantigeeni kindlakstegemiseks vasikate pea- ja seljaajus kasutasime IF-meetodit (joonised 1, 2). Uurimistulemused on toodud tabelis 1, kust nähtub, et kokku uuriti 105 vasika pea- ja seljaaju. Positiivne oli uuring 65 vasika puhul e 61,9%-l. Uurituist olid 23 surnult sündinud vasikad, neist 18 e 78,3%-l oli uuring positiivne. Lõpnud ning uurimise, sealhulgas elektronmikroskoopilise uurimise eesmärgil tapetud elujõuetuid haigeid vasikaid uuriti kokku 82, neist 47 e 57,3% andsid positiivse tulemuse. Vasikate vanuse lõikes olid tulemused järgmised: 34 vasikast, kes olid 0–7 päeva vanuselt lõpnud või tapetud, oli uuring positiivne 21-l e 61,8%-l, 8–30 päeva vanustel oli proov positiivne 18-l e 50,3%-l. 16 vasikast, kes lõppesid 1,5–3 kuu vanuselt, oli proov positiivne 8-l e 50%-l.

Tabelis 2 on toodud andmed 1994. aastast kuni 2002. aastani erinevaist maakondadest pärinevate vasikate uurimistulemuste kohta. Tabelist nähtub, et uuritavad vasikad pärinesid seitsmest maakonnast. 1994. aastal uuriti 4 vasika aju, kes pärinesid kõik Tartu maakonnast ja andsid klamüüdioosile positiivse tulemuse. 1995. aastal uuriti 24 vasika aju. Vasikad pärinesid kolmest maakonnast, positiivselt reageeris 23 vasikat, kes kõik pärinesid Tartu ja Põlva maakonnast. 1996. aastal uuriti 6 vasika aju, neist viiel saadi klamüüdioosile positiivne tulemus (kõik vasikad olid Tartu maakonnast). 1997. aastal uuriti 14 vasika aju, neist oli uuring positiivne 7 vasikal e 50%-l. Uuritavaist vasikaist oli 6 Tartu ja üks Jõgeva maakonnast. 1998. aastal oli uuritud 19 vasika ajuproov klamüüdioosile positiivne 8 vasika puhul, kes kõik pärinesid Tartu maakonnast. 1999. aastal uuriti klamüüdioosile 6 vasika aju, positiivse tulemuse andis neist 3 vasika aju uuring (üks vasikas oli Jõgeva ja 2 Tartu maakonnast). 2000. aastal uuriti neljast maakonnast kokku 20 vasika aju, positiivne tulemus saadi 6 puhul (2 Tartu ja 4 Jõgeva maakonnast), negatiivseks osutus uuring Tartu maakonnast pärineval 7 ja Järva maakonnast pärineval 4 vasikal, samuti Harju- ja Jõgevamaalt pärinevatel vasikatel. 2001. aastal uuriti 8 vasika aju. Vasikad pärinesid Tartu ja Jõgeva maakonnast. Positiivne reaktsioon saadi 7 vasika puhul. 2002. aastal uuritud Viljandi ja Valga maakonnast pärineva 4 vasika aju uuring andis positiivse tulemuse ühel vasikal kummastki maakonnast.

Tabelist 2 nähtub, et kõige rohkem on uuritud vasikaid Tartu maakonnast – 70 vasikat. Nende aju uuring andis positiivse tulemuse 43 juhul e 61,4%. Vasikad pärinesid 6 majandi suurfarmidest, mõni üksik vasikas ka väikemajapidamisest. Järvamaalt oli uurimuse all 23 vasikat, positiivne resultaat saadi aju uuringul 17 vasika puhul e 73,9%-l. Vasikad pärinesid 4 suurfarmist. Jõgeva maakonnast uuriti 5 vasika aju, positiivne tulemus klamüüdioosile saadi 2 vasika puhul, kusjuures mõlemad vasikad pärinesid ühest ja samast suurfarmist (teise majandi vasikad osutusid klamüüdioosi suhtes negatiivseteks). Valgamaalt oli uurimisel 2 vasikat, kes pärinesid ühest ja samast suurfarmist. Neist ühe aju puhul saadi klamüüdioosile positiivne tulemus, teine jäi negatiivseks. Harjumaalt uuriti ühe suurfarmi vasikat, aju uuring klamüüdioosile oli negatiivne. Viljandi maakonnast pärines 2 vasikat, neist ühe puhul saadi klamüüdioosile positiivne, teise puhul aga negatiivne tulemus.

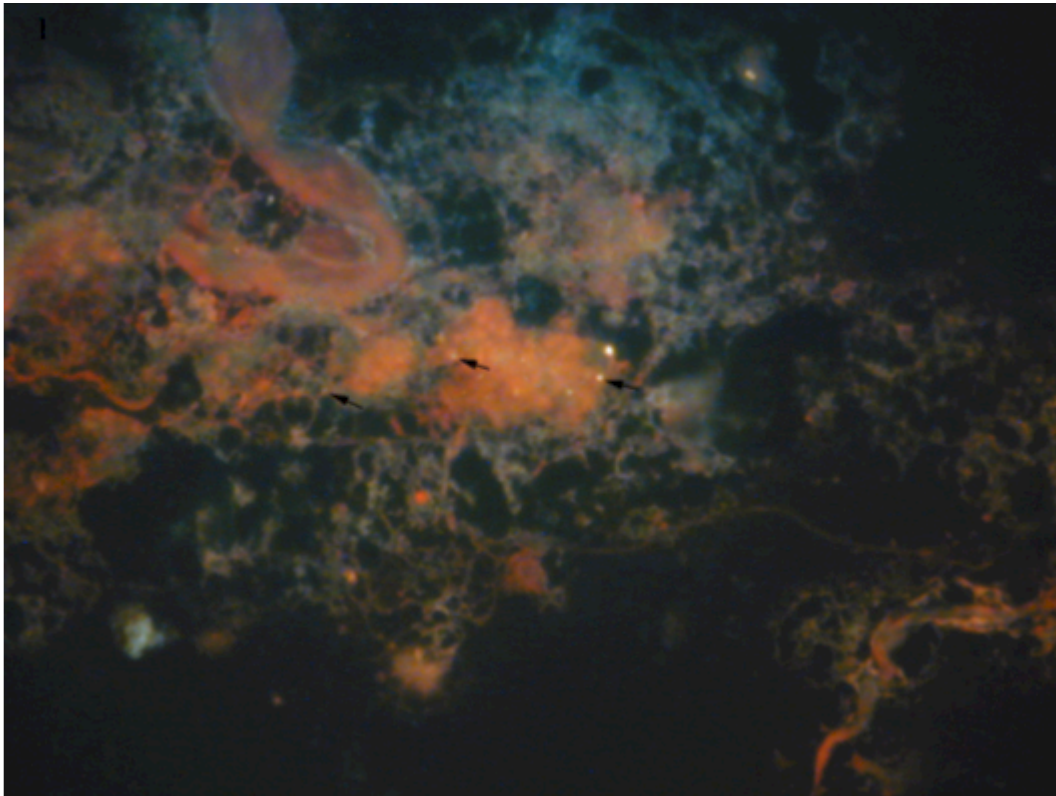
**Tabel 1.** Vasikate pea- ja seljaaju klamüüdiauurimistulemused

**Table 1.** Results of chlamydial investigations in the brain and spinal cord

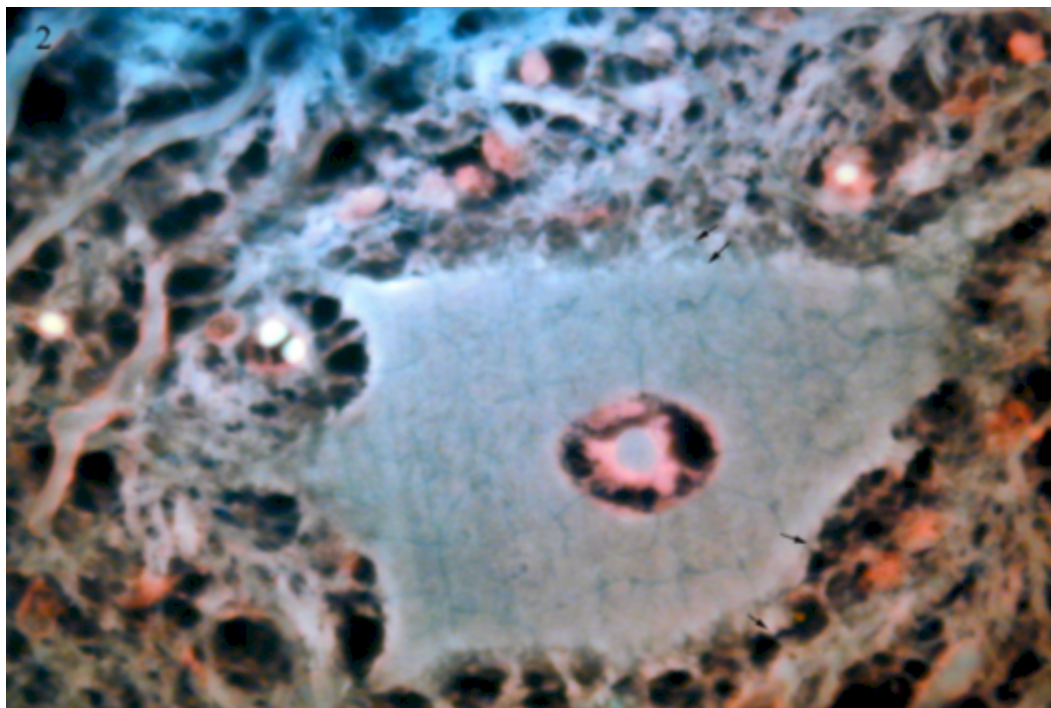
Uuringu liik <i>Method of investigation</i>	Surnult-sündinud <i>Still-born</i>	Lõpnud, tapetud <i>Died, slaughtered</i>	Vasikate vanus <i>Age of calves</i>			Kokku <i>In all</i>	
			0–7 p/d	8–30 p/d	1,5–3 kuud/m	Arv <i>No</i>	%
IF*-meetodil, kokku <i>By IF*-method, in all</i>	23	82	34	32	16	105	
Neist positiivsed <i>Of them positive</i>	18	47	21	18	8	65	61,9
%	78,3	57,3	61,8	56,3	50		
Negatiivsed <i>Negative</i>	5	35	13	14	8	40	38,1
%	21,7	42,7	38,2	43,7	50		

IF\*-meetod – immunofluorestsentsmeetod

IF\*-method – immunofluorescence method



**Joonis 1.** Vasika (nr 623) piklikust ajust valmistatud ägepreparaat, mis on värvitud DAKO IMAGEN™ Chlamydia test-reagendiga. Joonisel on näha väikesi helendavaid elementaarkehakestega sarnanevaid struktuure (nooled)  
**Figure 1.** Smear preparation from the medulla oblongata of calf No 623, stained by DAKO IMAGEN™ Chlamydia test reagent. In Figure one can see small luminous structures resembling elementary bodies (arrows)



**Joonis 2.** Sama vasika pikliku aju deparafiniseeritud histoloog, mis on värvitud DAKO IMAGEN™ Chlamydia test-reagendiga. Joonisel on näha närviraku vahetus läheduses väikesi helendavaid elementaarkehakestega sarnanevaid struktuure (nooled)  
**Figure 2.** Deparaffinized slice from the medulla oblongata of the same calf, stained by DAKO IMAGEN™ Chlamydia test reagent. In Figure one can see small luminous structures in the immediate neighbourhood of the nerve cell resembling elementary bodies (arrows)

**Tabel 2.** Vasikate pea- ja seljaaju klamüüdiauringu tulemused IF\*-meetodil aastatel 1994–2002 maakondade lõikes  
**Table 2.** Results of the investigations of the brain and spinal cord of calves by IF\*-method in 1994–2002

Aasta Year	Maakond District	Uuritud vasikaid kokku Investigated calves in all	Neist reageeris Of them			
			posit	%	negat	%
1994	Tartu	4	4	100	0	
1995	Tartu	14	14	100	0	
	Järva	8	7	87,5	1	12,5
	Põlva	2	2	100	0	
1996	Tartu	6	5	83,3	1	16,7
1997	Tartu	12	6	50	6	50
	Jõgeva	2	1	50	1	50
1998	Tartu	19	8	42,1	11	57,9
1999	Tartu	5	2	40	3	60
	Jõgeva	1	1	100	0	
2000	Tartu	9	2	22,2	7	47,8
	Järva	8	4	50	4	50
	Harju	1			1	100
	Jõgeva	2			2	100
2001	Tartu	1	1	100		
	Järva	7	6	85,7	1	14,3
2002	Viljandi	2	1	50	1	50
	Valga	2	1	50	1	50
Kokku In all 1994–2002	Tartu	70	42	60	28	40
	Järva	23	17	73,9	6	26,1
	Põlva	2	2	100		
	Jõgeva	5	2	40	3	60
	Harju	1			1	100
	Viljandi	2	1	50	1	50
	Valga	2	1	50	1	50
		105	65	61,9	40	38,1

IF\*-meetod – immunofluorestsentsmeetod

IF\*-method – immunofluorescence method

Nagu toodud andmeist nähtub, esines kõigist maakondadest (välja arvatud Harjumaalt) pärinevatel vasikatel pea- ja seljaajus klamüüdiaantigeeni.

Tabelist 1 nähtub, et surnult sündinud vasikate ajus tehti klamüüdiaantigeen kindlaks 78,6%-l uurituist, millest järeldub, et looted nakatusid klamüüdiatega juba intrauteriinselt. Tabelist nähtub samuti, et mida nooremalt olid vasikad lõpnud või tapetud, seda enamal neist tehti piklikus ja seljaajus kindlaks klamüüdiaantigeen. 0–7 päeva vanustest vasikatest oli nakatunud klamüüdioosi 61,8% uurituist, 8–30 päeva vanustest 56,3% ja 1,5–3 kuu vanustest 50%.

**Põrsad.** Põrsaste pea- ja seljaajus klamüüdiaantigeeni kindlakstegemiseks kasutati samuti IF-meetodit. Uurimistulemused on toodud tabelis 3. Tabelist nähtub, et uuriti kokku 57 põrsa ja kesiku aju, neist oli surnult sündinuid 5, lõpnuid 46 ja tapetuid 6. Lõpnud põrsaste ja kesikute vanus oli 0 päevast 3 kuuni, tapetud põrsaste vanus 0 päevast 3 päevani. Kõik nad oli sünnijärgselt elujõuetud ning tapeti uurimise, sh elektronmikroskoopi-lise uurimise eesmärgil, et teha neil kindlaks klamüüdioos.

Tabelist 3 nähtub, et uuritud 57 põrsa ajus tehti klamüüdiaantigeen kindlaks 28-l e 49,1%. Surnult-sündinud 5 põrsast tehti antigeen kindlaks ühe põrsa ajus, lõpnud põrsastest 22-l e 47,8% ning uurimise eesmärgil tapetud põrsastest viiel e 83,7%-l. Tabelist ühtlasi nähtub, et klamüüdiaantigeen tehti kindlaks just esimese 3 päeva jooksul lõpnud põrsastel (68,8%), mis viitab intrauteriinsele nakkusele. Samuti oli 15–30 päeva vanuselt lõpnud põrsastel see näitaja suhteliselt kõrge (77,8%).

**Tabel 3.** Lahatud põrsaste pea- ja seljaaju laboratoorsete klamüüdiauringute tulemused  
**Table 3.** Results of the laboratory chlamydial investigations of the brain and spinal cord in dissected piglets

Uuringu liik <i>Method of investigation</i>	Surnultsünd <i>Stillborn</i>	Lõpnud ja tapetud <i>Died and slaughtered</i>	Loomade vanus <i>Age of the animal</i>						Kõik kokku <i>In all</i>	neist <i>of them</i>		
			1-3 päeva/d	neist <i>of them</i>		4-14 päeva/d	15-30 päeva/d	1-3 kuud/m		surn. sünd still- born	lõpnud died	tapetud slaugh- tered
			kokku <i>in all</i>	lõpnud died	tapetud slaugh- tered	lõpnud died	lõpnud died	lõpnud died				
IF*-meetod <i>IF*-method</i>												
kokku / <i>in all</i>	5	52	22	16	6	10	9	11	57	5	45	6
neist positiivsed <i>of them positive</i>	1	27	16	11	5	2	7	2	28	1	22	5
%		51,9	72,7	68,8	83,3	20	77,8	18,2	49,1	20	47,8	89,3
negatiivsed <i>negative</i>	4	25	6	5	1	8	2	9	29	4	24	1
%	80	48,1	27,3	31,2	16,7	80	28,6	81,8	50,9	80	52,2	16,7

**Tabel 4.** Elektronmikroskoopiliselt uuritud lahatud vasikate pea- ja seljaaju laboratoorsete uuringute tulemused  
**Table 4.** Results of laboratory investigations of the brain and spinal cord of electronmicroscopically investigated calves

Vasika number <i>No of calves</i>	Uuringu aasta <i>Year of investigation</i>	Vasika vanus <i>Age of the calf</i>	t/s s/d	Klamüüdiat uuring <i>Investigations of Chlamydia</i>			Viroloogilise uuringu tulemused <i>Results of virological investigation</i>
				IF-meetodil <i>By IF-method</i>		Elektronmikroskoopia <i>By electronmicroscopy</i>	
				Uuringu objekt <i>Subject of investigation</i>	Tulemus <i>Result</i>	Uuringu objekt <i>Subject of investigation</i>	
133	1994	5 p/d	t/s			4	
258	1995	0 p/d	t/s	4, 10, 12	posit	4 10	AD, IBR RS
496	1998	4 n/w	t/s	4, 10	negat	9	negat
560	1999	10 p/d	t/s	4, 11, 12	posit	4 10	negat
605	2000	14 p/d	t/s	4, 5, 6, 10	posit	4, 5, 6, 10	AD
602	2000	10 p/d	t/s	4, 6, 9, 12	negat	4	negat
621	2001	5 p/d	t/s	4	negat	4 10	negat
622	2001	Ss/Sb		4	posit	4	
623	2001	3 n/w	l/d	4	posit	4	
638	2002	3 p/d	l/d	10	negat	10	
639	2002	2 p/d	l/d	4, 10	negat	10	IBR

Märkus/Comment: t/s – tapetud/slaughtered; Ss/Sb – surnult sündinud / stillborn; l/d – lõpnud/died;

IF-meetod – immunofluorestsentsmeetod / IF-method – immunofluorescence method

4 – piklik aju / medulla oblongata; 5, 6 – väikeaju/cerebellum; 9 – ajusild/pons; 10 – seljaaju kaelaosa / cervical; 11 – rinnaosa/thoracic; 12 – nimmeosa / lumbar part of spinal cord

**Table 5.** Elektronmikroskoopiliselt uuritud lahatud pörsaste pea- ja seljaaju laboratoorsete uuringute tulemused  
**Table 5.** Results of laboratory investigations of the brain and spinal cord of electronmicroscopically investigated piglets

Pörsa number <i>No of piglets</i>	Uuringu aasta <i>Year of investigation</i>	Pörsa vanus, päeva <i>Age of the piglets, days</i>	Tapetud <i>Slaughtered</i>	Klamüüdiade uuring / <i>Investigations of chlamydia</i>		
				IF*-meetodil <i>By IF*-method</i>		Elektronmikroskoopia <i>By electronmicroscopy</i>
				Uuringu objekt <i>Subject of investigation</i>	Tulemus <i>Result</i>	Uuringu objekt <i>Subject of investigation</i>
391	1996	3 p/d	t/s	4, 12 11	posit negat	4 9
395	1996	1 p/d	t/s	4, 9	negat	4 9 10 11
447	1997	2 p/d	t/s	4, 10	posit	4 10
448	1997	2 p/d	t/s	4, 10, 11, 12	posit	4
555	1999	0 p/d	t/s	4	posit	4 11
556	1999	0 p/d	t/s	4	posit	4 11

Märkus/Comment: t/s – tapetud/slaughtered;

IF-meetod – immunofluorestsentsmeetod / *IF-method – immunofluorescence method*;

4 – piklik aju / *medulla oblongata*; 9 – ajusild/pons; 10 – seljaaju kaelaosa / *cervical*; 11 – rinnaosa/thoracic; 12 – nimmiosa / *lumbar part of spinal cord*

Pörsad pärinesid neljast maakonnast. Kõige rohkem uuriti pörsaid Tartu maakonnast – 48, kes pärinesid 6 seakasvatusfarmist (vastavalt 22, 13, 6, 2, 4 ja 1 pörsast). Lääne-Virumaalt uuriti ühe farmi, Viljandimaalt ühe ja Valgamaalt samuti ühe farmi pörsaid. Analüüsides uurimise tulemusi selgus, et klamüüdiaantigeen tehti kindlaks just nende farmide pörsastel, kus neid oli rohkem lõpnud ja suuremal arvul ka uuritud.

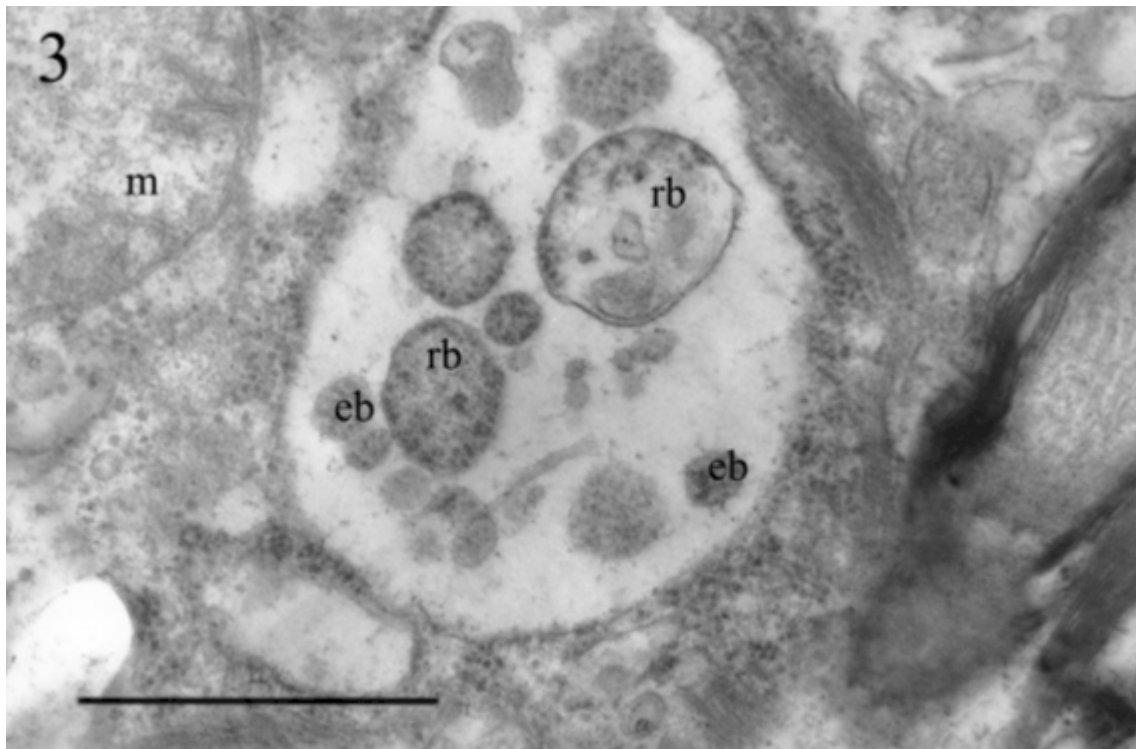
Ühtegi positiivset tulemust ei saadud Tartu maakonnast kahest seafarmist pärinevatel pörsastel, samuti Viljandi maakonnas asuvast suurest seafarmist pärinevatel pörsastel.

Uurimise eesmärgil tapetud pörsad pärinesid Tartumaa kahest seafarmist, kus lõpnud pörsastel tehti juba varem ajus kindlaks klamüüdiaantigeen.

Elektronmikroskoopiliste uurimustega avastati *Chlamydia*'le iseloomulikud elementaar- ja retikulaarkehakesed nii vasikate (joon 3, 4, 4b) kui ka pörsaste kesknärvisüsteemis (joon 5, 6).

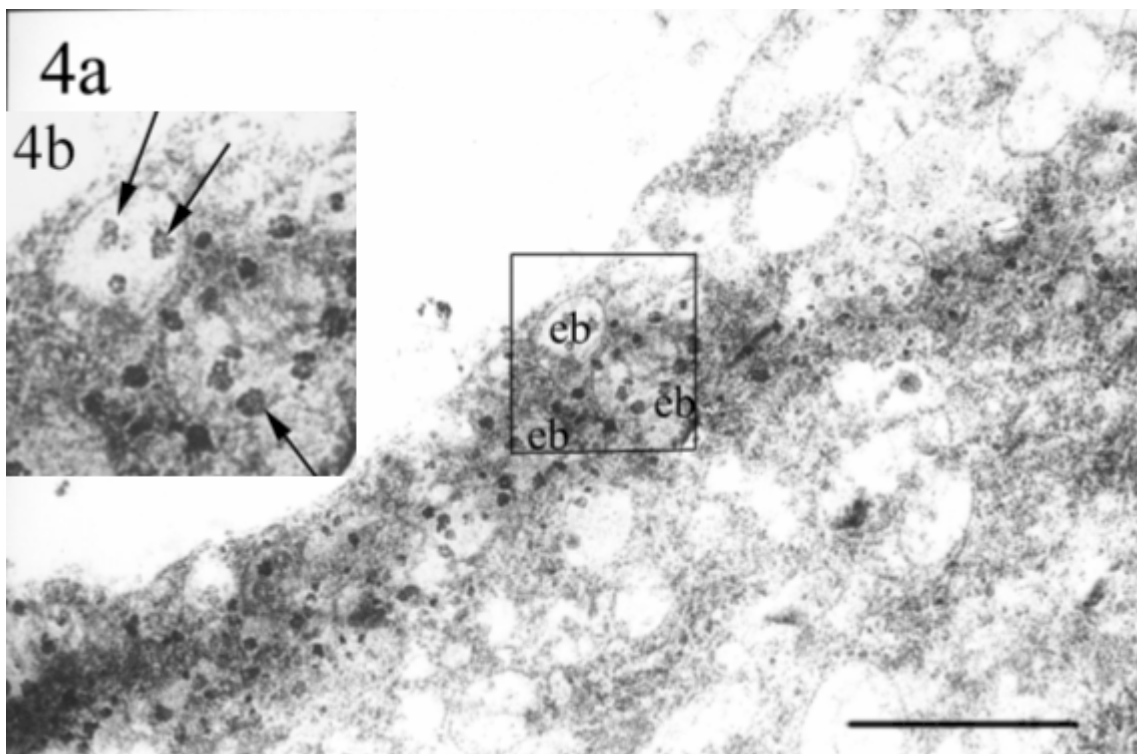
Raske on saadud materjalil selgitada, millistes rakkudes vaadeldavad struktuurid esinevad. Kõige tõenäosemaks tuleb pidada nende paiknemist astroglia rakkudes. Vasikate kesknärvisüsteemis olid iseloomulikud suuremad inklusioonid (kirjanduses nimetatud ka *parasitophorus vacuoles*), kus esineb nii elementaar- kui ka retikulaarkehakesi. Pörsastele on iseloomulikud *Chlamydia* arengutsükli nooremad vormid, kus üksikud elementaar- ja retikulaarkehakesed on vastumbritsetud fagosoomi membraaniga. Mõlemale uuritud liigile on iseloomulik suurenenud mõõtmetega mitokondrite esinemine. *Chlamydia* antikeha tuvastamine ultrastruktuuride tasemel on raskendatud niigi halvasti säilinud ajustruktuuride edasisel kahjustusel immuunreaktsiooni läbiviimisel. Siiski on suurem tõenäosus positiivse märgi lokalisatsioon elementaarkehakesel (joon 4a, 4b).





**Joonis 3.** Erinevas arenguastmes klamüüdiataolised struktuurid (eb – elementaarkehakesed; rb – retikulaarkehakesed) intratsellulaarses vakuolis (fagosoomis) vastündinud vasika piklikus ajus. Muud tähistused: m – suurenenud mitokonder; mõõteskaala – 1  $\mu\text{m}$

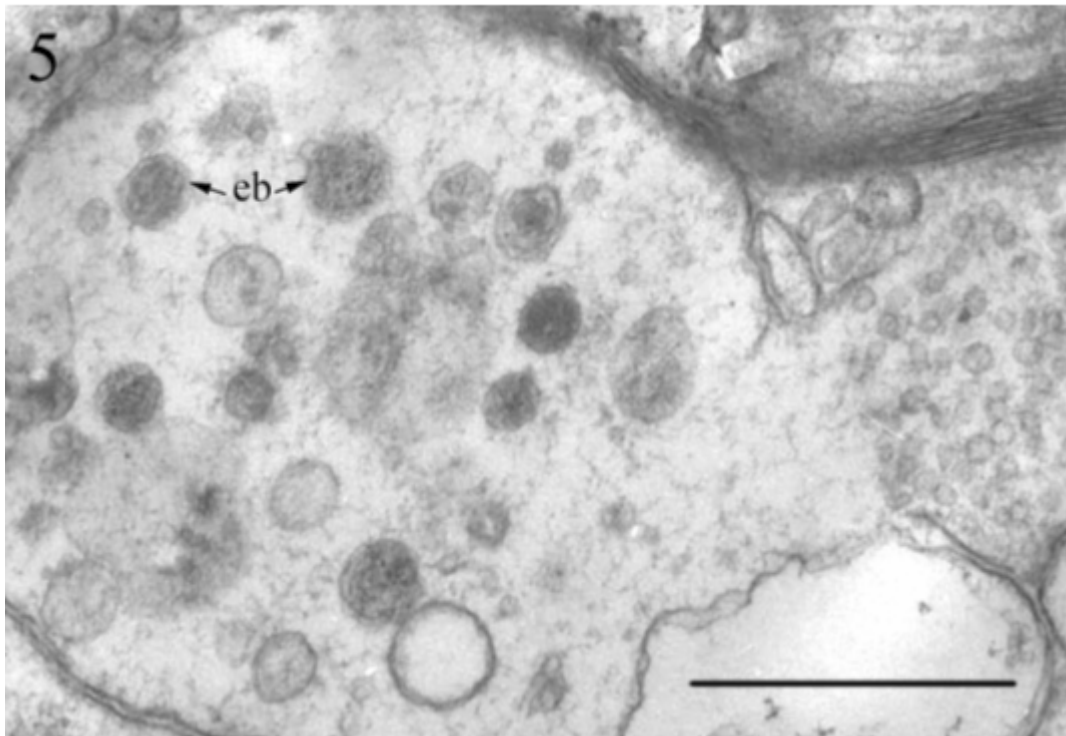
**Figure 3.** Chlamydia-like structures on the different developmental stages (eb – elementary bodies, rb – reticular bodies) in the intracellular vacuole of the medulla oblongata of a newborn calf. m – enlarged mitochondrion. Bar – 1  $\mu\text{m}$



**Joonis 4a.** Klamüüdia elementaarkehakestega sarnased struktuurid (eb) on kolmenädalase vasika piklikus ajus värvunud immunotsütokeemiliselt. Suurendatud alas (4b) näitavad nooled positiivsetele struktuuridele. Mõõteskaala – 1  $\mu\text{m}$

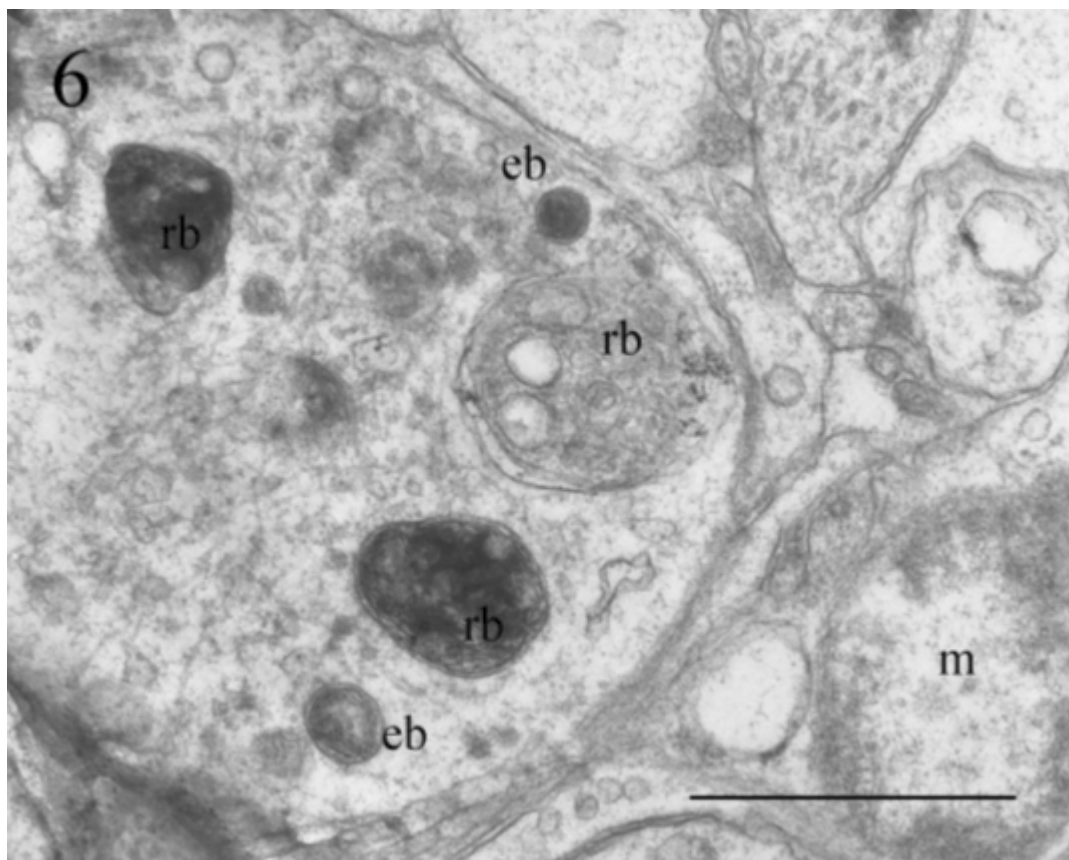
**Figure 4a.** Chlamydia-like elementary bodies (eb) in the medulla oblongata of a 3-week old calf are stained by immunocytochemical reaction. By Balin et al. (1998). Bar – 1  $\mu\text{m}$





**Joonis 5.** Klamüüdia elementaarkehakestega sarnased struktuurid (eb) 2-päevase pörsa seljaajus. Mõõteskaala – 1  $\mu\text{m}$

**Figure 5.** Chlamydia-like elementary bodies (eb) in the spinal cord of a 2-day weakling piglet. Bar – 1  $\mu\text{m}$



**Joonis 6.** Klamüüdiatele tüüpilised elementaarkehakesed (eb) ja retikulaarkehakesed (rb) 2-päevase elujõuetu pörsa seljaajus. m – suurenenud mitokonder. Mõõteskaala – 1  $\mu\text{m}$

**Figure 6.** Chlamydia-like elementary bodies (eb) and reticular bodies (rb) in a 2-day weakling piglet. m – enlarged mitochondrion. Bar – 1  $\mu\text{m}$

## Kokkuvõte

Läbiviidud pikaajaliste uuringutega on tuvastatud, et klamüüdiad võib kindlaks teha surnult sündinud ja lõpnud vasikatel ning põrsastel juba varem teadaolevate elundsüsteemide tabandumise kõrval ka kesknärvisüsteemis – pea- ja seljaajus. Uuringud põhinesid surnultsündinud, sünnijärgselt elujõuetute tapetud ning haiguste tagajärjel lõpnud vasikate ja põrsaste pea- ja seljaajus klamüüdiaantigeeni – lipopolüsahhariidi – kindlakstegemisel immunofluorestsentsmeetodil monoklonaalsete antikehadega ning positiivselt reageerinud loomade pea- ja seljaaju elektronmikroskoopilisel uurimisel. Elektronmikroskoopilise uurimisega õnnestus meil vasikate ja põrsaste piklikus ajus, ajusillas ja seljaajus kindlaks teha klamüüdiatele iseloomulikke rakusiseseid inklusioone neis leiduvate elementaar- ja retikulaarkehakestega sarnanevate struktuuridega. Saadud uurimistulemused kinnitavad, et klamüüdiad tabandavad vasikaid ja põrsaid juba looteeas, kutsudes neil esile müeloentsefalopaatia, mis on ilmselt ka üheks vasikate ja põrsaste surnultsündide ning sünnijärgselt elujõuetute vasikate ja põrsaste lõppemise põhjuseks juba esimestel elupäevadel.

## Kirjandus

- Balin, B. J., Gerard, H. C., Arking, E. J., Appelt, D. M., Branigan, P. J., Abrams, J. T., Whittum-Hudson, J. A., Hudson, A. P. 1998. Identification and localisation of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimers brain. – *Med Microbiol Immunol*, 187, 23–42.
- Bortničuk: Бортничук В. А. 1991. Хламидиоз свиней. – Киев, Урожай, 191 с.
- Everett, K. D., Bush, R. M., Andersen, A. A. 1999. 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 Pt 2, 415–440.
- Fukushi, H., Hirai, K. 1992. Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. – *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42(2), 306–308.
- Grayston, J. T., Kuo, C. C., Campell, L. A., Wang, S.-P. 1989. *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. strain TWAR. – *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39, 88–90.
- Koslov, N. 1994. Vasikate klamüüdiiosist ja selle esinemisest Eestis. – *Eesti Loomaarstlik Ringvaade*, 1, 18–21.
- Koslov, N., Lepp, E., Lokk, V., Song, J. 1996. About Causes of Pre- and Early Postnatal Mortality in Calves and Pathological Changes Found in them. – *Estonian Veterinary Review Supplemental: Acta Veterinaria Baltica*, 23–29.
- Koslov, N. 1998. Detection of *Chlamydia* Species in Calves Brain and Spinal Cord and the Following Pathohistological Changes. – *Estonian Veterinary Review Supplemental: Acta Veterinaria Baltica*, 18–21.
- Koslov, N. 1996. Vasikate perinataalsest surevusest ja selle põhjustest Eestis. – *Agraarteadus*, 1, 66–83.
- Koslov, N., Lepp, E., Lokk, V., Song, J., Kirts, T., Järveots, T. 2000. Klamüüdioosi epizootoloogia, etioloogia, patogeneesi ja patoloogiliste muutuste uurimine erinevatel loomaliikidel Eestis. – *Agraarteadus*, 3, 219–231.
- McNutt, S. H. A. 1940. Preliminary Report on an Infectious Encephalomyelitis of Cattle. – *Veterinary Medicine*, 35, 228–230.
- Menges, R. W., Harsfield, G. S., Wenner, H. A. 1953. Sporadic Bovine Encephalomyelitis, I, The Natural Histology of the diseases in Cattle. – *The American Journal of Hygiene*, 57, 1, 1–14.
- Piercy, D. W. T., Griffiths, P. C., Teale, C. J. 1999. Encephalitis related to *Chlamydia psittaci* infection in a 14-week-old calf. – *Vet Record*, 144, 126–128.
- Rasputina: Распутина О. В. 1992. Патоморфология и патогенез хламидиоза телят. – Автореф. дисс. канд. вет. наук. – Улан-Уде, 16 с.
- Singh, C. K., Kumar, N., Roy, K. S., Randharva, S. S., Srivastava, A. K. 1988. Experimental Chlamydiosis in Buffalo Calves: Alterations in Central Nervous System. – *Egypt. J. Vet. Sci.*, 25, 1, 49–59.
- Storz, J., Krauss, H. 1985. *Chlamydia*. In: *Handbuch der Bakteriellen Infektionen bei Tieren* (eds. H. Bobel & Schliesser). – Veb Gustav Fischer, Jena, 447–531.

## Tänuavaldus

Uurimistöo on valminud Eesti Teadusfondi toetusel (uurimistoetused 1907 ja 4107). Täname TÜ zooloogia ja hüdrobioloogia instituudi doktoranti Dagni Krinkat ja laboranti Mare Tamme elektronmikroskoopiliseks uurimiseks vajalike preparaatide valmistamise eest.