

ЯКОВЛЕВ СЕРГЕЙ ИГОРЕВИЧ

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СРЕДСТВ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ
ПРОФИЛАКТИКИ ХЛАМИДИОЗА ЖИВОТНЫХ**

4.2.3 – инфекционные болезни и иммунология животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Москва – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»), г. Казань

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент
Евстифеев Виталий Валерьевич

Официальные оппоненты: **Еремец Владимир Иванович** – доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по научной работе ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности»

Татарникова Наталья Александровна – доктор ветеринарных наук, профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней ФГБОУ «ВО Пермский ГАТУ»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

Защита состоится «__» _____ 2022 г. в «__» часов на заседании диссертационного совета 24.1.249.01, созданного на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН) по адресу: 109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, корп. 1, тел.: +7 (495) 970-03- 67.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН и на сайте <http://www.viev.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Ездакова Ирина Юрьевна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Животноводство является одним из основополагающих направлений продовольственной безопасности любого государства, что обуславливает постоянное развитие и совершенствование различных сфер деятельности производственных агропромышленных комплексов мясного и молочного направлений. Эффективность ведения животноводства складывается из многих факторов, одним из которых является эпизоотическое благополучие. Возбудители инфекционных заболеваний представляют потенциальную угрозу здоровью животных, а иногда наносят колоссальный ущерб этой отрасли. А некоторые из возбудителей болезней, являясь классическими антропозоонозными инфекциями, такими как хламидиоз (Sachse K et al, 2015), представляют потенциальную угрозу не только производственной сфере, но и здоровью людей. Поэтому обеспечение эпизоотического благополучия является одной из первостепенных задач, стоящих перед ветеринарными специалистами и учеными, работающими в этой области науки.

Хламидиоз – это контагиозное, инфекционное заболевание антропонозной и зоонозной природы вызываемое группой этиологически родственных микроорганизмов семейства Chlamydiaceae рода Chlamydia (Федорова В.А и др, 2019; Laroucau K, 2019). Представители этого рода микроорганизмов имеют широкое распространение в природе. В настоящее время хламидии были выявлены у большинства видов сельскохозяйственных животных (крупный рогатый скот, овцы, козы, свиньи, лошади), птиц, людей, а также у некоторых видов рыб, членистоногих и моллюсков (Origlia J.A et al, 2019). Клинические признаки хламидийных инфекций очень обширны, и патологические процессы могут локализоваться в различных органах и системах пораженного организма, как в острой, так и в хронической форме.

В настоящее время, в мировой научной литературе достаточно часто появляются сведения, описывающие клинические случаи течения хламидийных инфекций у разных видов сельскохозяйственных и диких животных. Наиболее значимый ущерб, наносимый хламидиями, животноводческой сфере связан с абортными, рождением нежизнеспособного и слабого молодняка и в меньшей степени с бронхопневмониями, артритами, кератоконъюнктивитами и энцефалитами.

Инфицирование животных благополучного стада способно вызывать до 40-60% абортных среди всего маточного поголовья. По некоторым данным, среди всех этиологических факторов абортных, у поголовья мелкого рогатого скота, хламидийная инфекция, занимает лидирующее положение, вызывая 23-39% случаев.

Помимо этого, с такой же периодичностью, освещаются результаты проведения современных диагностических лабораторных исследований в результате которых удавалось установить бессимптомные формы течения хламидиоза животных. Которые, как известно, на данный момент, способны переходить в острые формы течения инфекционного процесса на фоне снижения общей резистентности организмов животных, вызванных ухудшением условий содержания, кормления и воздействия различных факторов внешней среды.

Постоянное циркулирование хламидий в различных популяциях искусственно изолированных животных (хозяйствах и т.д.) подтверждается многочисленными серологическими и молекулярно-генетическими исследованиями осуществляемыми на территории РФ и других стран.

В подавляющем большинстве случаев хламидийные инфекции вызывают у животных комплекс симптомов, которые могут различаться даже среди представителей одного стада, в связи, с чем клиническая диагностика осложняется полиморфизмом клинических проявлений. Также следует учитывать тот факт, что хламидиоз часто протекает в коалиции с другими распространенными вирусными или бактериальными патогеннами, поэтому при выявление вторых, исследования на хламидиоз как правило не проводятся. Главной причиной проведения комплекса лабораторных исследований на хламидиоз, на данный момент, являются аборт, так как их наличие в хозяйстве приводит к значительным экономическим потерям.

На протяжении многих лет изучения хламидий, в медицинской и ветеринарной практиках, сформировалось достаточно четкое понимание физиологии, биологических и биохимических свойств этого вида микроорганизмов. Были разработаны и внедрены в ветеринарную практику основные принципы, методики и оборудование для осуществления диагностических, лечебных и профилактических мероприятий, направленных на борьбу с этой инфекцией (Евстифеев В.В, 2015, De la Maza L.M et al, 2017). Большинство из них разработаны и производятся на основе антигенактивных и иммуногенных штаммов, выделенных десятилетия назад. За годы систематического пассирования на одних и тех же лабораторных биологических моделях, их антигенные и иммуногенные качества постепенно снижаются.

Учитывая стремительное развитие различных отраслей биологических наук и полученных в ходе этого развития научных данных, появились факты, свидетельствующие о мутациях штаммов, циркулирующих в окружающей среде. Эти мутации обуславливают перестройку биохимических антигенных структур полевых штаммов хламидий и делает их невосприимчивыми к воздействию искусственного специфического иммунитета, выработанного под воздействием вакцинных препаратов на основе лабораторных штаммов.

Немаловажным фактором, определяющим целесообразность изучения хламидийных инфекций, является ввоз в Россию высокопродуктивного крупного и мелкого рогатого скота из других стран. В связи, с чем возрастает угроза возникновения вспышек инфекционных заболеваний, в том числе и хламидиоза. Поэтому наиболее актуальным направлением исследований, в этой области, является выделение новых штаммов хламидий, изучение их антигенной структуры и иммуногенности с целью использования их для создания тест-систем и конструирования универсальных вакцин с широким спектром действия, способных создавать иммунитет против всех нозологических форм хламидийной инфекции у представителей всех видов сельскохозяйственных животных.

Цели и задачи исследования.

Целью нашего исследования явилось усовершенствование средств специфической профилактики хламидиоза животных путем изыскания штамма хламидий, обладающего актуальным антигенным спектром.

Для реализации поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- 1) Провести клинико-эпизоотологическое обследование в неблагополучном хозяйстве с целью выделения изолята хламидий;
- 2) Изучить иммунобиологические свойства изолята хламидий;
- 3) Провести сравнительный анализ антигенных и иммуногенных свойств имеющихся производственных штаммов хламидий и нового изолята;
- 4) Провести секвенирование генома нового штамма хламидий с целью определения его родоспецифичности, изучения молекулярно-генетических свойств, депонирования в базу данных GenBank и сравнения с другими штаммами;
- 5) Депонировать новый штамм хламидий в коллекцию микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»;
- 6) Провести комплекс лабораторных исследований с целью оценки антигенной активности и иммуногенности экспериментального вакцинного препарата на основе нового штамма хламидий.

Степень разработанности проблемы. С 40-х годов прошлого столетия в научной литературе периодически освещаются сведения, описывающие клинические случаи, результаты серологических, и молекулярно-генетических исследований, подтверждающих этиологическую роль представителей рода *Chlamydia* в заболеваниях сельскохозяйственных животных в разных странах мира (Федорова В.А и др, 2019, Евстифеев В.В. 2015).

За годы исследований ученым удалось выяснить концептуальные особенности жизненного цикла хламидий, а также изучить их биологические, антигенные и иммуногенные свойства. На базе этих знаний были разработаны

средства лечения, диагностики и профилактики хламидиозов сельскохозяйственных животных (Евстифеев В.В. 2015).

Весомый вклад в решение проблем, связанных с диагностикой и специфической профилактикой хламидийных инфекций сельскохозяйственных животных, внесли ученые ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» Равилов А.З., Хамадеев Р.Х., Гаффаров Х.З., Шафикова Р.А., Равилов Р.Х., Хусаинов Ф.М., Евстифеев В.В. и др. За последние 50 лет ими были изучены и описаны клинические случаи проявления острых форм хламидийных инфекций у различных видов сельскохозяйственных и плотоядных животных. В ходе этих исследований были выделены некоторые производственные штаммы хламидий, на основе антигенов которых были разработаны и внедрены в ветеринарную практику диагностические препараты для проведения серологической диагностики и непосредственной идентификации хламидий в патологическом материале (РИФ, РТГА, РСК, ИФА и ПЦР). Некоторые из них были успешно внедрены в широкую ветеринарную практику (Евстифеев В.В. 2015).

Несмотря на чувствительность хламидий к целому ряду антибиотиков, их использование не эффективно для оздоровления хозяйств ввиду специфического жизненного цикла хламидий, который на определенной стадии протекает внутри клетки-хозяина и не доступен для действия препаратов. Применение антибиотиков приводит лишь к кратковременному эффекту и переходу инфекции в хроническую форму.

Наиболее эффективной стратегией борьбы с данным видом патогенна является вакцинопрофилактика. В настоящее время для профилактики хламидиозов животных (свиньи, КРС, МРС, лошади) применяются ранее разработанные эмульсионные моно- и полиштаммовые вакцины (Евстифеев В.В. 2015). Многолетний опыт применения данных биопрепаратов указывает на их способность вызывать выработку протективного иммунитета к некоторым видам хламидийных инфекций у вакцинированных животных. Однако, учитывая способность этого вида микроорганизмов к паразитированию на различных биологических моделях в ассоциации с другими штаммами или даже видами хламидий, а также наличие эволюционно обоснованного широкого спектра антигенных модификаций среди представителей данного вида микроорганизмов, обитающих во внешней среде, имеется необходимость изыскания новых зоонозных и высокоиммуногенных штаммов хламидий с целью использования их протективных антигенов для конструирования новых дизайнов биологических препаратов.

Научная новизна.

В результате проведенных исследований из патологического материала абортировавшей на фоне хламидийной инфекции козы впервые в России выделен,

секвенирован и депонирован в базу данных GenBank штамм хламидий, отнесенный к виду *C.psittaci*.

Изучение иммунобиологических свойства нового штамма *C.Psittaci* «АМК-16» показало, что он серийно пассируется на развивающихся куриных эмбрионах, обладает уникальным, по сравнению с производственными штаммами, антигенным спектром и более высокой иммуногенностью.

Выделенный штамм «АМК-16» депонирован в коллекцию микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», паспортизирован и серийно пассируется в лабораторных условиях на развивающихся куриных эмбрионах согласно СТО 00492374-001-2021.

Впервые, на основе антигена из нового штамма хламидий «АМК-16», изготовлена экспериментальная серия вакцины, лабораторные испытания которой показали её преимущество над вакцинными препаратами, созданными на основе антигенов производственных штаммов, выделенных от разных видов сельскохозяйственных животных, десятилетиями ранее, и как следствие, доказана целесообразность применения нового штамма хламидий «АМК-16» в разработке и производстве новых ветеринарных препаратов.

Методология и методы исследований. Для осуществления исследований, запланированных с целью выполнения поставленных задач, были применены стандартные процедуры с использованием различных материалов и естественно восприимчивых животных, а именно, в работе использовали бактериологические, вирусологические (культивирование хламидий, титрование хламидий, экспериментальное заражение лабораторных животных), серологические (иммуноферментный анализ, реакция связывания комплемента), физико-химические (приготовление растворов заданной молярности, центрифугирование, эмульгирование) методы. Подробное описание методологии проведенных исследований отражено в главе «Материалы и методы».

Практическая значимость.

Проведено депонирование штамма «АМК-16» в Коллекцию микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», что позволило пополнить коллекцию уникальным штаммом *C.psittaci* зоонозного происхождения.

Секвенирован и депонирован в базу данных GenBank геном зоонозного штамма *C. psittaci* «АМК-16» выделенного от коз.

Результаты проведенных исследований позволяют рекомендовать штамм *C. psittaci* «АМК-16» в качестве производственного для создания эффективных средств специфической профилактики хламидиоза животных.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность полученных экспериментальных данных была подтверждена посредством проведения статистической обработки цифрового материала по методу

вариационной статистики с применением критерия достоверности по Стьюденту, расчеты проводились на персональном компьютере с использованием пакета программного обеспечения Microsoft Excel 2010.

Основные результаты исследований доложены и обсуждены на научно-практической конференции: «Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых «Наука и инновации в АПК XXI века» (Казань, 2018 г.), на конгрессе «The 44th FEBS congress» (Краков, 2019 г.), на международной научно-практической конференции: «Сельское хозяйство и продовольственная безопасность: технологии, инновации, рынки, кадры» Посвященная 100-летию аграрной науки, образования и просвещения» (Казань, 2019 г.), международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки продукции сельского хозяйства» Мосоловские чтения (Йошкар-Ола, 2020 г.), национальной научно-практической конференции «Современные проблемы и перспективы развития естествознания» (Уфа, 2020 г.), на международной практической конференции, посвященной 100-летию Армавирской биофабрики: «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов» (Армавир, 2021 г.), на национальной научно-практической конференции молодых ученых и студентов: «Фундаментальные и прикладные исследования: естественные науки» (Уфа, 2021 г.), на международной научно-практической конференции: «Инновационная деятельность в агропромышленном комплексе: теоретические и практические аспекты» (Омск, 2021 г.)

Публикации результатов исследования. По теме научных исследований опубликовано 18 статей, в том числе 8 статей – в изданиях рекомендованных ВАК РФ, 2 статьи - в издании включенном в базы Scopus и Web of Science.

Основные положения, выдвигаемые на защиту:

1. Результаты изучения иммунобиологических и молекулярно-генетических свойств штамма хламидий «АМК-16»;
2. Результаты сравнительного анализа антигенных и иммуногенных свойств производственных штаммов хламидий и нового штамма хламидий «АМК-16»;
3. Результаты изучения антигенной активности и иммуногенности экспериментальных образцов вакцины на основе антигена штамма «АМК-16» на лабораторных животных.
4. Обоснование целесообразности дальнейшего использования штамма хламидий «АМК-16» в создании и последующем производстве ветеринарных препаратов.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 138 страницах компьютерного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, заключение, практические предложения, список сокращений, список использованной литературы и приложения. Работа иллюстрирована 15 таблицами и 15 рисунками. Список используемой литературы включает 177 источников, из них 102 иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы исследований

Работа выполнена в период с 2016 по 2020 гг. в лаборатории вирусных антропоозоозов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань) согласовано тематическому плану НИР.

Изоляты и штаммы. В работе были использованы следующие штаммы и изоляты хламидий: вакцинный штамм *C.psittaci* «250»; вакцинный штамм *C.psittaci* «РС-85»; вакцинный штамм *C.psittaci* «Ростиново-70»; изолят *C.psittaci* «АМК-16».

Животные. В исследованиях были использованы экспериментально инфицированные и естественно больные животные: козы Зааненской породы 200 голов; кролики живой массой 2,0-2,5 кг в количестве 7 голов; морские свинки живой массой 20-250 г в количестве 48 голов; белые мыши живой массой 16-20 г в количестве 540 голов.

Куриные эмбрионы. Культивирование хламидийной биомассы и определение инфекционного титра изолята «АМК-16» осуществляли на развивающихся 4-5 суточных куриных эмбрионах.

Диагностические препараты. Серологические исследования сыворот крови проводили с применением «Набора антигенов и сывороток для серологической диагностики хламидиозов сельскохозяйственных животных» (РОСС RU.ФВ01.Н00022) производства ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (г. Казань).

Обнаружение антигена хламидий в патологическом материале осуществляли в реакции иммунофлуоресценции (РИФ) используя «Набор флуоресцирующих иммуноглобулинов и контрольных сывороток для диагностики хламидиозов сельскохозяйственных животных» производства ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (№РОСС RU.ФБ01.В20238).

Вакцины. Экспериментальные серии моновакцин из разных штаммов хламидий изготавливали по технологии, разработанной ранее [Евстифеев В.В. 2015].

Питательные среды, реактивы, растворы и сыворотки. Оценку стерильности штаммов и экспериментальных серий вакцин проводили на питательных средах: мясо-пептонный агар (МПА); мясо-пептонный бульон (МПБ); среда Сабуро; среда Китта-Тароцци.

В ходе проведения работы использовали следующие реактивы: раствор хлорида натрия (рН 7,2-7,4), 0,1 М фосфатно-буферный раствор (рН 7,2-7,4), масло иммерсионное, ланолин безводный, фуксин основной, малахитовый зеленый, фенол, спирт этиловый, серную кислоту, воду дистиллированную, натрий углекислый кислый, натрий хлористый, сахарозу, квасцы алюмокалиевые, гентомицин, стрептомицин, нистатин и др.

2.2. Методы исследований

Клинико-эпизоотологический анализ. Исследования на хламидиоз осуществляли согласно «Методических указаний по лабораторным исследованиям на хламидийные инфекции животных», утвержденных зам. руководителя Департамента ветеринарии Министерства сельского хозяйства и Продовольствия РФ от 30 июня 1999г.

Серологические исследования. Пробы сывороток крови лабораторных и сельскохозяйственных животных исследовали в реакции связывания комплемента (РСК).

Выявление хламидийного антигена в патологическом материале осуществляли в реакции иммунофлуоресценции (РИФ).

Исследования на стерильность проводили путем высева исследуемых образцов вакцинных препаратов и культур хламидий на бактериальные среды с последующей экспозицией в течение 10 суток при температуре 37⁰С.

Исследования на безвредность. Оценку безвредности антигенов хламидий и экспериментальных образцов вакцин проводили путем постановки биопробы на белых мышах и морских свинках.

Материалы для заражения. Для заражения лабораторных животных применяли 10% суспензии содержащие моно- и поликультуры хламидий.

Определение инфекционного титра изолята хламидий "АМК-16" проводили на развивающихся 6 суточных эмбрионах кур.

Расчет инфекционного титра изолята хламидий «АМК-16» производили по методу Рида и Менча.

Оценка патогенных свойств изолята хламидий "АМК-16". Патогенность изолята «АМК-16» определяли на лабораторных животных (белые мыши, морские свинки) путем постановки биопробы. Инфекционный материал животным вводился интраназальным, внутрибрюшинным и подкожным способами.

С целью подтверждения хламидийной этиологии гибели животных производили их вскрытие. Из пораженных органов делали мазки-отпечатки, которые окрашивали по модифицированному методу Стемпа и просматривали под иммерсионной системой светового микроскопа для выявления элементарных телец хламидий, что являлось подтверждением специфической гибели животных.

Изучение антигенной активности изолята «АМК-16». Исследование проводили на морских свинках. Животные были разделены на 4 группы. 1 и 2 группы животных инфицировали живой 10% суспензией изолята «АМК-16» интраназально (0,2 см³) и внутрибрюшинно (0,4 см³) соответственно. 3 и 4 группам животных вводился инактивированный нативный антиген изолята хламидий «АМК-16» интраназально (0,2 см³) и внутрибрюшинно (0,4 см³) соответственно. Инактивацию антигена проводили формалином (0,2%) с экспозицией 24 часа при температуре 37⁰С. На 30 сутки после введения инфекционного материала и антигена проводили взятие крови. Сыворотки исследовали в РСК.

Оценка иммуногенности производственных штаммов и изолята хламидий «АМК-16».

Иммуногенность изолята «АМК-16» оценивали на белых мышах. Лабораторные животные были разделены на 8 групп по 20 мышей. Животные 1-4 групп были иммунизированы инактивированной 10%-й суспензией из изолята «АМК-16». Животные 5-8 групп не иммунизировались (контроль).

На 30 сутки после иммунизации было проведено заражение белых 10% суспензиями из штаммов («РС», «250» и «Ростиново-70») и изолята «АМК-16». Каждым штаммом заражали по 2 группы животных: опытную и контрольную.

Срок наблюдения за инфицированными животными составил 14 суток. Иммуногенность изолята оценивали по разнице выживших животных в испытуемой и контрольной группах.

Оценку иммуногенности 3-х производственных штаммов хламидий проводили по аналогичной схеме. Отличие заключалось в том, что иммунизацию проводили инактивированными антигенами из производственных штаммов, а заражение проводили изолятом «АМК-16».

Молекулярно-генетические исследования. Секвенирование генома и плазмиды проводили на платформе 2 поколения секвенирования Illumina HiSeq 2500 и платформе 3 поколения секвенирования Oxford Nanopore MinION. Построение филогенетического дерева проводили с использованием программного обеспечения MEGA X.

Оценку эффективности вакцины проводили по требованиям, предусматривающим проверку на стерильность, безвредность, антигенную активность и иммуногенность.

Оценка антигенной активности вакцин, приготовленных из антигенов штаммов хламидий «250», «РС-85» и «АМК-16». Оценку антигенной активности экспериментальных серий вакцин проводили на морских свинках. Вакцины животным вводили подкожно в дозе $0,2 \text{ см}^3$, с ревакцинацией в той же дозе через 14 дней. В течение последующих 180 суток систематически отбирались пробы сывороток крови и исследовались в РСК.

Оценка иммуногенности вакцин, приготовленных из антигенов штаммов хламидий «250», «РС-85» и «АМК-16».

Исследование иммуногенности экспериментальной серии вакцины на белых мышях проводилось аналогичным методом, описанным в пункте «**Оценка иммуногенности изолята хламидий «АМК-16»**», отличительной чертой явилось использование вакцинного препарата для иммунизации животных вместо инактивированной суспензии изолята хламидий «АМК-16». Заражение белых мышей проводили штаммами «250», «РС-85» и «АМК-16».

Оценку эффективности вакцины из штамма «АМК-16» проводили в остром опыте на кроликах (самках). Животные были разделены на 2 группы по 3 и 2 головы соответственно. 1 группа была иммунизирована вакциной внутримышечно в дозе $0,5 \text{ см}^3$ последующей ревакцинацией через 14 суток.

На 30 сутки после иммунизации животных 2-х групп скрещивали с самцами.

На 17-19 сутки беременности кроликов проводили контрольное заражение всех кроликов 10% суспензией, содержащей три штамма хламидий («250», «РС-85», «АМК-16»). Животных заражали внутрибрюшинно в дозе $1,0 \text{ см}^3$.

На протяжении всего исследования у животных отбирались пробы сывороток крови и исследовались в РСК.

Иммуногенные свойства вакцинного препарата оценивали по результатам исхода беременности кроликов, наличию или отсутствию клинических признаков хламидийной инфекции, а также по результатам вирусологических исследований (выделение хламидий на РКЭ).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Клинические особенности течения хламидийной инфекции в козоводческом хозяйстве и выделение нового изолята хламидий

В 2016 году с целью выявления этиологии систематически проявляющихся массовых аборт у коз в одном из козоводческих хозяйств Высокогорского района Республики Татарстан нами проводились клинико-эпизоотологические исследования. Исследования проводились в течение 7-ми месяцев. Максимальное количество абортов и мертворождений пришлось на первые два месяца исследований, в этот период были зарегистрированы специфические для хламидийной инфекции патологические процессы, связанные с нарушением функции воспроизводства у 6 и 8 беременных коз соответственно. Начиная с 5-го

месяца от начала исследования удалось снизить количество абортос до 1-2 случаев в месяц. Помимо абортос и мертворождений на ферме наблюдались частые случаи рождения недоразвитых козлят, а также систематически выявлялись взрослые и не половозрелые особи с ярко выраженными клиническими признаками пневмонии, артритов и конъюнктивитов. С целью постановки точного диагноза были исключены другие инфекции.

Серологические исследования проводили выборочно. Для этого были отобраны по 10 проб сывороток крови от животных различных половозрастных групп (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты серологических исследований сывороток крови различных половозрастных групп коз

№	Группа животных	Всего проб	Положительных проб
1	Козлы-производители	10	4
2	Козе-матки	10	1
3	Козлята 2-3 мес.	10	2
Количество положительных проб			7
Процент положительных проб			23%

В группе козлов-производителей было выявлено 4 положительные пробы. В группе козе-маток 1 и в группе козлят в возрасте 2-3 месяцев – 2 положительные пробы.

Общее количество положительных проб составило 23%.

В таблице 2 представлены результаты исследований патологического материала.

Таблица 2 – Результаты исследования патологического материала на хламидиоз

№	Вид патологического материала	Количество проб	Методы исследований		
			Микроскопические исследования	Выявление антигена в РИФ	Выделение на КЭ
1	Абортированные плоды	4	3	3	2
2	Козлята гипотрофики	4	2	2	2
Всего положительных образцов			5	5	4
Процент положительных образцов			63%	63%	50%

Как видно из таблицы, из 4 абортированных плодов и 4 козлят-гипотрофиков в 5-ти случаях из 8-ми удалось обнаружить хламидии, в ходе проведения микроскопических исследований и выделения антигена в РИФ, что составило 63% от общего количества исследуемых проб. Выделить хламидии на куриных эмбрионах удалось в 50 % случаях.

3.2. Определение инфекционного титра изолята хламидий "АМК-16" на куриных эмбрионах

Инфекционный титр изолята определяли путем последовательных заражений эмбрионов кур различными концентрациями инфекционного материала (Таблица 3).

Таблица 3 – Результаты выживаемости куриных эмбрионов после заражения различными концентрациями изолята хламидий «АМК-16»

Разведения инфекционного материала, \log_{10}	Фактические данные			Кумулятивные данные		
	Пало/общ	Выжило	Пало	Выжило	Пало	Процент летальности
10^{-1}	10/10	0	10	0	49	100
10^{-2}	10/10	0	10	0	39	100
10^{-3}	9/10	1	9	1	29	97
10^{-4}	8/10	2	8	3	20	87
10^{-5}	6/10	4	6	7	12	63
10^{-6}	4/10	6	4	13	6	31
10^{-7}	2/10	8	2	21	2	7

Далее, расчет производится по следующей формуле:

$$\lg LD_{50} = \lg B - \frac{b-50}{b-a} \lg d \quad 1)$$

Где:

$\lg LD_{50}$ – искомое разведение вируса;

B – Разведение вызвавшее гибель более 50% живых систем;

b – Процент, соответствующий разведению, дающему эффект более 50% (в данном случае 63%);

a – Процент, соответствующий разведению, дающему эффект менее 50% (в данном случае 31%);

d – Коэффициент разведения (в данном случае коэффициент равен 10).

$$\lg LD_{50} = \lg 10^{-5} - \frac{63 - 50}{63 - 31} \lg d = -5 - \frac{13}{32} 1 = -5 - 0,4 = -5,4.$$

На основании результатов полученных в ходе проведенного исследования и произведенных расчетов, было установлено, что титр изолята хламидий «АМК-16» равен - $\lg 10^{5,4} LD_{50}/0,3$ мл.

3.3. Оценка патогенности и антигенной активности изолята хламидий «АМК-16» на лабораторных животных

Патогенность изолята хламидий определяли путем постановки биопробы на восприимчивых лабораторных животных, а именно на белых мышах и морских свинках.

В таблице 4 представлены результаты 3-х серий опытов по оценке патогенности изолята «АМК-16» на белых мышах. Инфицирование животных проводили 3-мя способами.

Таблица 4 – выживаемость белых мышей после экспериментального заражения изолятом «АМК-16»

№	Серия исследований	Способ заражения	Штамм для заражения	Кол-во павших животных	Процент павших животных
1	1 серия опытов	Интраназальный	«АМК-16»	20/20	100%
2		Внутрибрюшинный		14/20	70%
3		Подкожный		5/20	25%
4	2 серия опытов	Интраназальный		20/20	100%
5		Внутрибрюшинный		14/20	70%
6		Подкожный		5/20	25%
7	3 серия опытов	Интраназальный		20/20	100%
8		Внутрибрюшинный		15/20	75%
9		Подкожный		7/20	35%
Средний процент павших животных при интраназальном методе заражения					100%
Средний процент павших животных при внутрибрюшинном методе заражения					71,6%
Средний процент павших животных при подкожном методе заражения					28,3%

Средний процент смертности животных при заражение интраназальным способом составил 100%. В группах белых мышей инфицированных внутрибрюшинно смертность была равна 71,6%. Смертность мышей инфицированных подкожно в среднем составила 28,3%.

В таблице 5 представлены результаты 3-х серий экспериментального заражения **морских свинок**. Заражение проводили 10% суспензией изолята «АМК-16» двумя способами: внутрибрюшинно и интраназально.

Таблица 5 – Выживаемость морских свинок после заражения изолятом «АМК-16»

№	Серия опытов	Способ инфицирования	Количество павших животных	Процент павших животных
1	1 серия	Интраназальный	1/4	25%
2		Внутрибрюшинный	0/4	Переболели
3	2 серия	Интраназальный	1/4	25%
4		Внутрибрюшинный	0/4	Переболели
5	3 серия	Интраназальный	1/4	25%
6		Внутрибрюшинный	0/4	Переболели

В группах морских свинок инфицированных путем внутрибрюшинных инъекций, специфического падежа зафиксировано не было, но были выявлены

характерные симптомы экспериментальной хламидийной инфекции. В группах морских свинок зараженных интраназально смертность составила 25%. У животных этой группы также отмечались аналогичные клинические признаки экспериментальной хламидийной инфекции и добавились симптомы бронхопневмонии.

В таблице 6 представлены результаты выживаемости белых мышей и морских свинок, зараженных изолятом «АМК-16» и производственными штаммами хламидий депонированных в коллекцию микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

Таблица 6 – Результаты исследований патогенности штаммов хламидий на белых мышках и морских свинках

№ п.п.	Наименование штаммов	Средний % гибели белых мышей			Средний % гибели морских свинок	
		в/б	и/н	п/к	в/б	и/н
1	Ростиново-70	64±7	78±3	34±4	47±6	45±5
2	250	80±9	97±2	34±4	Переболел	Переболел
3	РС-85	73±2	57±2	54±3	Переболел	Переболел
4	ЛС-87	34±3	73±2	31±4	Переболел	25±2
5	СК-89	85±4	91±3	45±5	45±5	45±5
6	МЗ-89	67±3	69±5	45±5	Переболел	Переболел
7	АМК-16	71,6±2	100	28,3±5	Переболел	25±1

Во всех случаях инфицирование производилось аналогичными способами. Как видно из таблицы 5 по сочетанию всех своих характеристик вирулентности для белых мышей и морских свинок изолят хламидий «АМК-16» отличается от производственных штаммов хламидий депонированных в коллекцию микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

3.3.3. Оценка антигенной активности изолята хламидий «АМК-16» на лабораторных животных

С целью изучения антигенных свойств изолята «АМК-16» проводили серологические исследования сывороток крови морских свинок. Исследования в РСК проводили на 30 сутки после заражения и введения антигена (Таблица 7).

Таблица 7 – Результаты серологических исследований крови морских свинок.

№ группы	Метод заражения	Тип суспензии	Средний титр
1 группа	Интраназальный	Живая	1:21
2 группа	Внутрибрюшинный	Живая	1:16
3 группа	Интраназальный	Инактивированная	1:5
4 группа	Внутрибрюшинный	Инактивированная	1:13

В группе животных, зараженных интраназальным способом, средний титр хламидийных антител был равен показателю 1:21. В группе морских свинок инфицированных внутрибрюшинно данный показатель был равен титру 1:16. В группе животных, иммунизированных инактивированной суспензией интраназально, средний титр антител составил 1:5. В 4-й группе

иммунизированной внутрибрюшинно Средний титр был равен 1:13. В трех группах морских свинок средние титры комплементсвязывающих хламидийных антител в конце исследования оказались выше диагностического титра равного 1:10.

3.4. Изучение иммуногенности изолята хламидий «АМК-16»

Иммуногенность изолята оценивали на белых мышах. Результаты биопробы представлены в Таблица 8.

Таблица – 8 Количество павших животных в группах белых мышей, иммунизированных изолятом «АМК-16», в последствие заражения производственными штаммами хламидий

№	Группа	Штамм для иммунизации	Штамм для заражения	Количество павших животных	Процент павших животных	Индекс защиты
1	1 группа	«АМК-16»	«АМК-16»	4/20	20%	3,2
2	5 группа	Контроль		13/20	65%	
3	2 группа	«АМК-16»	«РС-85»	6/20	30%	2,3
4	6 группа	Контроль		14/20	70%	
5	3 группа	«АМК-16»	«250»	8/20	40%	1,8
6	7 группа	Контроль		15/20	75%	
7	4 группа	«АМК-16»	«Ростиново-70»	5/20	25%	2,4
8	8 группа	Контроль		12/20	60%	
Средний индекс защиты по всем группам						2,4
Средний индекс защиты в группах зараженных производственными штаммами						2,1

В 1 группе иммунизированных белых мышей, зараженных изолятом «АМК-16», был выявлен наименьший процент смертности, который составил 20%. Индекс защиты в данном случае был равен 3,2. В группе иммунизированных животных, инфицированных штаммом «Ростиново-70» процент павших составил 25%, индекс защиты равнялся 2,4. В 3 группе иммунизированных белых мышей зараженных штаммом "РС-85" процент павших оказался выше и составил 30%. Индекс защиты в этом случае был равным 2,3. Наименее адаптированными к экспериментальной хламидийной инфекции оказались иммунизированные белые мыши зараженные штаммом "250". Процент павших животных составил 40%, индекс защиты равнялся 1,8.

Далее было необходимо сравнить способность антигенов некоторых производственных штаммов, депонированных в коллекцию микроорганизмов нашего центра, вызывать выработку иммунитета к хламидийной инфекции вызываемой изолятом «АМК-16».

Исследование проводили по аналогичной схеме. 1, 2 и 3 группы мышей иммунизировали 10%-ми инактивированными суспензиями, из штаммов: «РС-85», «250» и «Ростиново-70» соответственно. 4 группа контроль (Таблица 9).

В первой группе мышей, иммунизированных штаммом «РС-85», процент павших составил 50%, индекс защиты равнялся 1,4. Во второй группе животных, иммунизированных штаммом «250» в пало 45% мышей, индекс защиты составил 1,5.

Таблица 9 – Выживаемость иммунизированных белых мышей после заражения изолятом «АМК-16»

№	Группа	Штамм для иммуни-зации	Штамм для заражения	Кол-во выживших животных	Процент выживших животных	Индекс защиты
1	Иммунизированные	«РС-85»	«АМК-16»	10/20	50%	1,4
2	Иммунизированные	«250»		11/20	55%	1,5
3	Иммунизированные	«Ростиново-70»		14/20	70%	2,3
4	Контроль	-		6/20	30%	-
Средний показатель индекса защиты в группах иммунизированных производственными штаммами					1,7	

В третьей группе животных, иммунизированных штаммом «Ростиново-70» наблюдали наиболее низкий процент павших животных который был равен 30%, индекс защиты в этом случае составил 2,3.

3.5. Депонирование штамма «АМК-16» в коллекцию микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»

В ходе проведенных исследований, было установлено, что штамм хламидий «АМК-16» не контаминирован бактериальной, грибковой и микоплазменной микрофлорой. Штамм системно пассируется на развивающихся куриных эмбрионах со значительным выходом хламидийной биомассы.

Видовая принадлежность штамма «АМК-16» подтверждена секвенированием. Идентифицирована и депонирована в GenBank полная последовательность генома. Анализ сборки генома позволил выявить хромосому длиной 1152497 п.н. Помимо генома удалось секвенировать кольцевую криптическую плазмиду длиной 7552 п.н.

Гомология плазмиды штамма «АМК-16» и эталонной плазмиды рода *S.pittaci* «pSpA1» составила 99,98%. Что также позволило подтвердить таксономическое положение данного штамма в классификации известных микроорганизмов.

Исходя из вышеизложенного нами был разработан «Стандарт ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» штамм хламидий «АМК-16» – возбудитель аборта коз» СТО 00492374-001-2020 утвержденный врио директора ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» от 15 декабря 2021 г

Штамм хламидий «АМК-16» был депонирован в коллекцию микроорганизмов ФГБНУ «Федеральный центр токсикологический, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ») (рег. №11) от 5 сентября 2017 г. – штамм *S. Psittaci* «АМК-16» возбудитель хламидиоза коз

3.6. Оценка антигенной и иммуногенной активности экспериментальной вакцины на основе антигена штамма «АМК-16»

В дальнейшем, с целью усиления иммуногенных свойств исследуемых штаммов, нами были сконструированы три экспериментальные серии вакцин на основе оригинального масло-ланолинового адьюванта: вакцина из штамма «250»; вакцина из штамма «РС-85»; вакцина из штамма «АМК-16».

3.6.1. Оценка антигенной активности экспериментальной серии вакцины на основе антигена штамма «АМК-16» на морских свинках

Оценку антигенной активности вакцины на основе штамма «АМК-16» проводили на 12 морских свинках. Животные были разделены на 3 группы. Иммунизацию животных проводили тремя вакцинными препаратами:

Каждой вакциной иммунизировали по одной группе морских свинок, подкожно, в дозе 0,2 мл. В течение 6 месяцев у животных систематически отбирались пробы сывороток крови и исследовались в РСК (Рисунок 1).

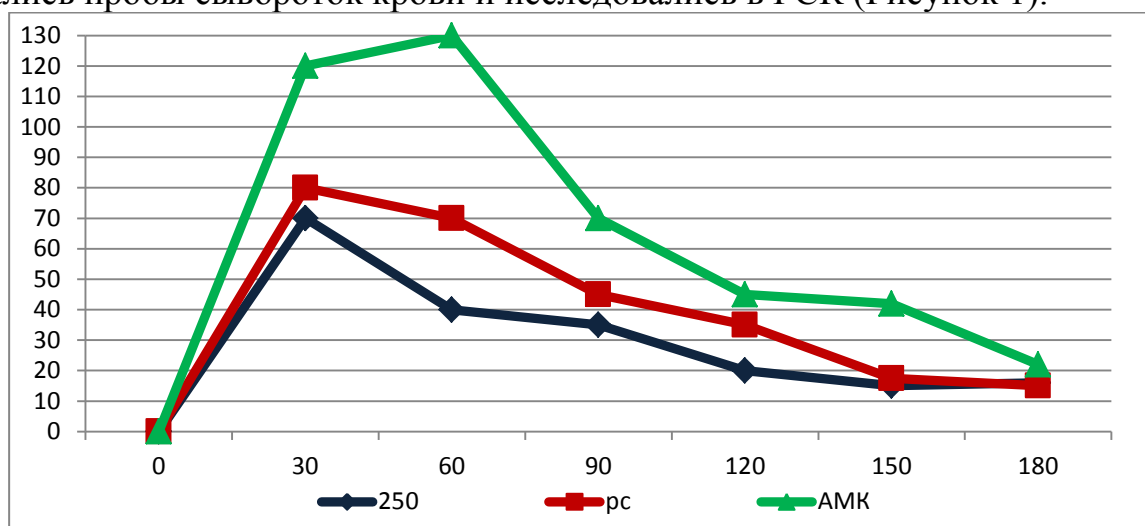


Рисунок 1 - Динамика накопления комплементсвязывающих хламидийных антител в крови морских свинок иммунизированных вакцинными препаратами на основе штаммов «250», «РС-85» и «АМК-16».

Как видно из рисунка 1, в группах животных иммунизированных вакцинами на основе штаммов «250» и «РС-85» максимальные титры комплементсвязывающих хламидийных антител были в пределах титров 1:70 и 1:80 соответственно. Далее наблюдали равномерный спад уровня специфических антител.

В группе морских свинок иммунизированных вакциной из штамма «АМК-16» максимальный титр был выявлен на 60 сутки и равнялся показателю 1:130. Далее наблюдали снижение уровня хламидийных антител. На протяжении всего исследования концентрация специфических антител была выше в группе животных иммунизированных вакциной из штамма «АМК-16».

3.6.2. Оценка иммуногенности экспериментальной серии вакцины из штамма АМК-16 на белых мышах

Оценку иммуногенности вакцины на основе штамма «АМК-16» проводили в остром опыте на белых мышах. Результаты представлены в таблице 10.

Таблица 10 - Выживаемость белых мышей, иммунизированных вакцинным препаратом на основе штамма «АМК-16» и в последующем зараженных различными штаммами хламидий

№ группы	Группа	Препарат для иммунизации	Штамм для заражения	Кол-во выживших животных	Процент выживших животных	Индекс защиты
1	Иммунизированные	Вакцина на основе штамма «АМК-16»	«АМК-16»	17/20	85%	4,6
4	Контроль	Не вакцинировались		6/20	30%	
2	Иммунизированные	Вакцина на основе штамма «АМК-16»	«250»	15/20	75%	3,2
5	Контроль	Не вакцинировались		4/20	20%	
3	Иммунизированные	Вакцина на основе штамма «АМК-16»	«РС-85»	16/20	80%	3,25
6	Контроль	Не вакцинировались-		7/20	35%	
Средний показатель индекса защиты	3,6					

В первой группе среди иммунизированных животных зараженных штамм «АМК-16» процент павших составил 15%. Индекс защиты был равен 4,6.

Во второй группе после заражения штаммом «250» процент павших животных в иммунизированной группе составил 25%. Индекс защиты оказался равным 3,2.

В третьей группе иммунизированных животных, инфицированных штаммом «РС-85» пало 20% мышей, Индекс защиты в этой группе составил 3,25.

На основании этих данных было установлено, что вакцина на основе штамма «АМК-16» вызывает выработку специфического иммунитета к хламидийным инфекциям у белых мышей, способного защитить их от заражения гетерологичными в антигенном отношении штаммами хламидий.

3.6.3. Оценка эффективности экспериментальной серии вакцины на основе антигена штамма «АМК-16» в остром опыте на кроликах

Оценку эффективности вакцины из штамма «АМК-16» проводили в остром опыте на кроликах.

На Рисунке 2 представлена динамика накопления хламидийных антител в сыворотках крови вакцинированных и контрольных кроликов.

На 7 день после введения вакцины, в крови вакцинированных кроликов были выявлены антитела в среднем титре 1:6. На 45 сутки, средний титр достиг показателя 1:120. Максимальный уровень антител был зафиксирован на 7-е сутки после заражения 1:133. Далее наблюдали спад уровня хламидийных антител. На 30-е сутки после заражения средний титр был равен 1:53. На 45 день, концентрация хламидийных антител повысилась до среднего титра 1:66.

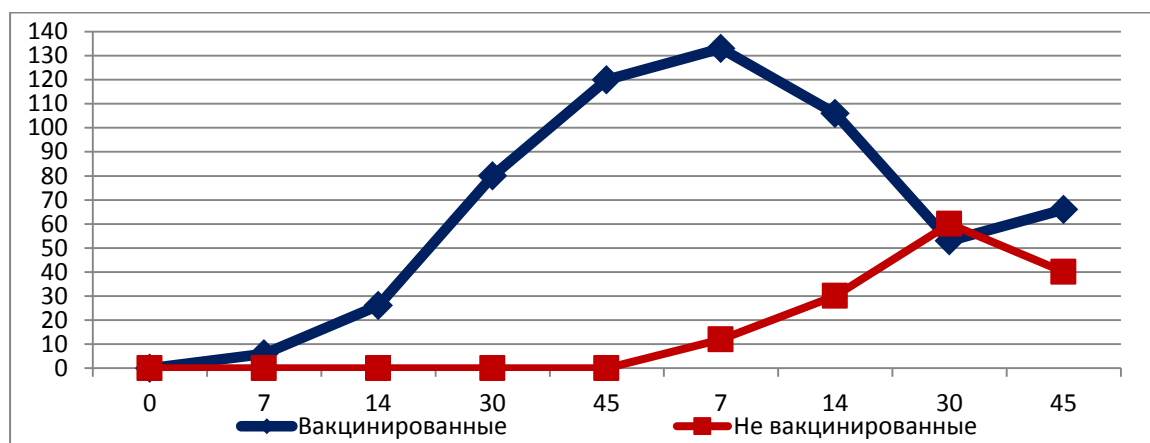


Рисунок 2 - Динамика накопления титров хламидийных комплементсвязывающих антител у вакцинированных и контрольных кроликов до и после заражения

В контрольной группе животных хламидийные антитела впервые были выявлены на 7 день после заражения в среднем титре 1:12. Максимальный средний титр в этой группе был выявлен на 30 день после заражения и был равен 1:60. К 45 дню после инфицирования средний титр хламидийных антител в контрольной группе был равен показателю 1:40.

Результаты исхода беременности кроликов опытной и контрольной групп представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Результаты исхода беременности кроликов опытной и контрольной групп, после экспериментального заражения комбинированной из нескольких штаммов культурой хламидий

Наименование группы	Номера животных	Препарат для иммунизации	Материал для заражения	Исход беременности	Кол-во плодов
Опытная (вак-ные)	1	Вакцина на основе штамма «АМК-16»	10% суспензия из штаммов «250», «РС-85», «АМК-16»	Роды	4
	2			Роды	4
	3			Роды	5
Исход беременности по группе				Роды	13
Контрольная (не вак-ные)	4	Контроль	10% суспензия из штаммов «250», «РС-85», «АМК-16»	Аборт	4
	5			Мертворождение	5
Исход беременности по группе				Аборт, мертворождение	9

Как видно из таблицы в группе иммунизированных кроликов родились 13 голов живых и развитых крольчат. В контрольной группе животных мы наблюдали рождения мертвых крольчат и аборт.

Хламидийная этиология абортов и мертворождений была подтверждена микроскопическими исследованиями внутренних органов плодов и животных контрольной группы. В 50% случаев удалось реизолировать хламидий на КРЭ.

У кроликов контрольной группы были выявлены ярко выраженные поражения внутренних органов, которые характеризовались увеличением печени и селезенки, а также воспалительными процессами в легких (рисунок. 3, 4).



Рисунок 3 – Легкие вакцинированного кролика после заражения



Рисунок 4 – Легкие не вакцинированного кролика после заражения

Испытание вакцины из штамма «АМК-16» показало, что введение данного вакцинного препарата лабораторным животным, вызывало выработку специфического иммунитета, способного защитить животных от экспериментального заражения вирулентными штаммами хламидий, вызывающими аборт у разных видов сельскохозяйственных животных.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из результатов проведенных исследований нами были сформулированы следующие выводы:

1. На основании результатов проведенных клинико-эпизоотологических исследований в козоводческом хозяйстве Высокогорского района Республики Татарстан, где наблюдались массовые аборты, была установлена их хламидийная этиология и описаны характерные особенности течения хламидийной инфекции у коз. Из проб патологического материала абортированных плодов и трупов козлят гипотрофиков был выделен новый штамм *C. psittaci* «АМК-16».

2. Изучение биологических свойств штамма хламидий «АМК-16» показало, что он серийно пассируется в желточном мешке развивающихся эмбрионов кур, при этом его инфекционный титр был равен $\log 10^{-5,4} LD_{50}/0,3$ мл.

3. В результате оценки патогенных свойств штамма хламидий «АМК-16» установлено, что он является патогенным для различных лабораторных моделей (белые мыши, морские свинки, кролики), а его вирулентность зависит от способа инфицирования животных.

4. На основании изучения антигенных свойств было доказано, что заражение морских свинок и кроликов штаммом хламидий «АМК-16» вызывает у них формирование гуморального иммунитета на 28-30 сутки после заражения, с

образованием комплементсвязывающих антител в титрах 1:10 – 1:40. При этом уровень антител зависит от способа заражения животных.

5. Изучение иммуногенных свойств штамма хламидий АМК-16, доказало его способность вызывать у лабораторных животных формирование иммунитета к хламидийным инфекциям. Так иммунизация мышей инактивированным антигеном «АМК-16» защищала животных от заражения вирулентной культурой гетерологичных штаммов хламидий.

6. В результате изучения иммунобиологических свойств штамма хламидий «АМК-16» установлена корреляция (прямая зависимость) между вирулентностью и антигенной активностью штамма.

7. Сравнительный анализ патогенных и иммуногенных свойств штамма хламидий «АМК-16» и производственных штаммов хламидий, депонированных в коллекцию микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», выявил различия в их антигенной структуре. При этом наименьший процент гомологии штамма АМК-16 был установлен с производственными штаммами «250» и «РС-85».

8. Впервые в России секвенирована и депонирована в базу данных GenBank NSBI полная нуклеотидная последовательность генома зоонозного штамма *C.psittaci* («АМК-16») выделенного от коз при аборте. Анализ сборки генома выявил хромосому, длиной 1152497 п.н. Помимо генома была секвенирована кольцевая криптическая плазмида длиной 7552 п.н. Гомология плазмиды штамма «АМК-16» и эталонной плазмиды рода *C.psittaci* «pCrA1» составила 99,98 %, что позволило определить таксономическое положение выделенного штамма в классификации известных микроорганизмов.

9. Проведенные исследования показали, что штамм хламидий «АМК-16» является стерильным, пассируется серийно на развивающихся эмбрионах кур, отличается оригинальностью антигенного дизайна, что послужило предпосылкой для его депонирования в коллекцию микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» и разработки «Стандарта ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» штамм хламидий «АМК-16» – возбудитель аборта коз» СТО 00492374-001-2021.

10. Штамм хламидий «АМК-16» в сочетании с оригинальным масло-ланолиновым адьювантом вызывает выработку специфических хламидийных антител у морских свинок. При этом максимальный титр антител выявлялся на 60 сутки после иммунизации и на протяжении всего срока исследования был выше, чем у животных, иммунизированных аналогичными вакцинами на основе штаммов хламидий «250» и «РС-85», что говорит о его более высокой антигенной активности.

11. Вакцина на основе антигена штамма «АМК-16» вызывает выработку специфического иммунитета к хламидийным инфекциям у белых мышей,

способного защитить их от заражения гетерологичными в антигенном отношении штаммами хламидий.

12. Оценка эффективности применения вакцины на основе штамма «АМК-16» в остром опыте на кроликах показала, что экспериментальный вакцинный препарат вызывает выработку стойкого иммунитета у лабораторных животных к ассоциированной хламидийной инфекции и защищает беременных кроликов от абортов.

5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Евстифеев, В.В. «Разработка и усовершенствование биологических препаратов для диагностики и специфической профилактики хламидиоза животных» автореферат. дис... д-ра. био. наук: 06.02.02. / Евстифеев Виталий Валерьевич. – Казань, 2015. – С.47.
2. Федорова В.А. Хламидиозы животных и человека/ В.А. Федорова, В.Л. Мотин// Наука. – М. 2019. – С. 137.
3. De la Maza L.M., Zhong G., Brunham R.C. Update on Chlamydia trachomatis Vaccinology // Clin. Vaccine Immunol. 2017. Vol. 24(4). P. e00543–16.
4. Laroucau K., Vorimore F., Aaziz R. et al. Chlamydia buteonis, a new Chlamydia species isolated from a red-shouldered hawk // Syst. Appl. Microbiol. 2019. Vol. 42(5). P. 25997.
5. Origlia J.A., Cadario M.E., Frutos M.C. et al. Detection and molecular characterization of Chlamydia psittaci and Chlamydia abortus in psittacine pet birds in Buenos Aires province, Argentina // Rev. Argent. Microbiol. 2019. Vol. 51(2). P. 130–135.
6. Sachse K., Bavoil P.M., Kaltenboeck B. Emendation of the family Chlamydiaceae: Proposal of a single genus, Chlamydia, to include all currently recognized species // Systematic and Applied Microbiology. 2015. Vol. 38(2). P. 99–103.

6. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Яковлев С.И.** Изучение некоторых биологических свойств хламидий, выделенных при аборте коз / С.И.Яковлев, В.В. Евстифеев, Ф.М. Хусаинов // Материалы всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Наука и инновации в АПК XXI века», Казань, 15.03.2018 г., С.33-34.
2. Хусаинов Ф.М. Клинико-эпизоотологическое проявление хламидиозного аборта коз/ Ф.М. Хусаинов, В.В. Евстифеев, Г.И. Хусаинова, Р.З. Хамидуллина, И.Р.Фазулзянов, **С.И. Яковлев**// Ветеринарный врач. – 2018. - №3. – С.40-44.
3. Хусаинов Ф.М. Течение хламидиозного аборта у коз/ Ф.М. Хусаинов, В.В. Евстифеев, Г.И. Хусаинова, **С.И. Яковлев**//Ученые записки

казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.э. Баумана. 2019. –Т. –239. –№ 3. –С. 227-231.

4. Хусаинов Ф.М. Хламидиоз коз / Ф.М. Хусаинов, В.В. Евстифеев, **С.И. Яковлев** // Пермский аграрный вестник. 2019. –№ 1. –(25). –С. 144-149.

5. Зайцев С.С. Результаты пилотного секвенирования штамма хламидий зоонозного происхождения на платформе illumina hiseq 2500 / С.С. Зайцев, Ю.В. Салтыков, **С.И. Яковлев**, В.В. Евстифеев, О.С. Ларионова, В.А. Федорова // Журнал «Молекулярная генетика,микробиология и вирусология». 2019. –№ 37. – С.27.

6. Fedorova V. The molecular characteristics of chlamydia psittaci strain from cattle isolated in the southeastern european region of russia (volga region) / V.Fedorova, S. Zaitsev, Y. Saltykov, F. Khusainov, **S. Yakovlev**, O.Larionova, O.Ulyanova, V. Motin // The 44th febs congress krakow, Poland 2019. –№9. – P.97.

7. Valentina A. Feodorova Data of de novo genome assembly of the Chlamydia psittaci strain isolated from the livestock in Volga Region, Russian Federation / Valentina A. Feodorova, Sergey S. Zaitsev, Mariya A. Khizhnyakova, Yury V. Saltykov, Vitaly V. Evstifeev, Fidail M. Khusainov, **Sergey I. Yakovlev**, Olga S. Larionova, Vladimir L. Motin // Data in brief 2020. –29. –P. 105190.

8. Vitaly V. Evstifeev Development of associated vaccine against Piv-3, Ibr, Bvd and chlamydiosis of cattle / Vitaly V. Evstifeev Ilgizar R. Akbashev, **Sergey I. Yakovlev**, Maxim I. Klyatskiy, IIsur G. Galimzyanov // Bio Web of Conferences 17. – 00149. – (2020) – P. 00149.

9. Хусаинов Ф.М. Изучение этиологии заболеваемости коз в условиях сельскохозяйственного предприятия / Ф.М. Хусаинов, В.В. Евстифеев, **С.И. Яковлев** // Ветеринария сельскохозяйственных животных. Издательский дом «Панорама»(Москва). – 2020. - № 1.- С. 23-27.

10. Евстифеев В.В. Биологические свойства нового изолята хламидий, выделенного от абортировавшей козы / В.В. Евстифеев, Ф.М. Хусаинов, **С.И. Яковлев**, Г.И. Хусаинова // Материалы международной научно практической конференции «Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки продукции сельского хозяйства» Мосоловские чтения. Йошкар-Ола. 2020. – С. 432-435.

11. Яковлев С.И. Изучение антигенной и иммуногенной активности универсальной вакцины против хламидиоза сельскохозяйственных животных на лабораторных животных / **С.И. Яковлев**, В.В. ЕвстифеевФ.М. Хусаинов,Г.И. Хусаинова, Р.З. Хамидуллина // Материалы научно-практической конференции «Современные проблемы и перспективы развития естествознания». Уфа.- 8-9-июня 2020.- Том 2. – С.-40-45.

12. Хусаинова Г.И. Иммунологические особенности пород овец романовская и советский меринос при получении хламидийных специфических сывороток / Г.И. Хусаинова, Р.З. Хамидуллина, И.Р. Акбашев, **С.И. Яковлев**, Ф.М. Хусаинов, И.И. Самарханов// Национальная научно-практическая конференция «Современные проблемы и перспективы развития естествознания» - Уфа.- 8-9- июня 2020.- Том 1. – С.-130-134.

13. Евстифеев В.В. Разработка ассоциированной вакцины против ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и хламидиоза крупного рогатого скота / В.В. Евстифеев, В.Г., Гумеров Ф.М. Хусаинов, И.Г.Каримуллина И.Р.Акбашев **С.И. Яковлев** // Ветеринарный врач. – 2020. –№6, –С.21-27.

14. Vitaly V. Evstifeev Study of The Immunobiological Properties of a New Chlamydia Isolate Obtained from Goats During Chlamydia Abortion / Vitaly V. Evstifeev, **Sergey I. Yakovlev**, Fidail M. Khusainov, Gulnara I. Khusainova, Svetlana V. Ivanova, Vali G. Gumerov Ilsiyyar G. Karimullina, Razina Z., Khamidullina, Rustam Kh. Ravilov, Danil N. Mingaleev, Anatoly I. Trubkin, Darya D.Morozova // International Journal of Pharmaceutical Research Jan - Mar 2021. –Vol 13. –Issue 1. – P.3208-3215.

15. Евстифеев, В.В. Сероиммунологический мониторинг респираторных и желудочно-кишечных заболеваний крупного рогатого скота в различных скотоводческих хозяйствах Приволжского федерального округа за 2019 год / В.В. Евстифеев, В.Г. Гумеров, Ф.М. Хусаинов, Г.И. Хусаинова, И.Р. Акбашев, **С.И. Яковлев**, Р.З. Хамидуллина // Иппология и ветеринария. –2021. –№1. – С. 85-92.