

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ,  
РАДИАЦИОННОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ»

На правах рукописи

**ЯКОВЛЕВ СЕРГЕЙ ИГОРЕВИЧ**

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СРЕДСТВ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ  
ПРОФИЛАКТИКИ ХЛАМИДИОЗА ЖИВОТНЫХ**

4.2.3 – инфекционные болезни и иммунология животных

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент,

Евстифеев Виталий Валерьевич

**Казань – 2022 г.**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ.....	4
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
2.1. Характеристика хламидийной инфекции животных.....	13
2.1.1. Краткая история открытия.....	13
2.1.2. Классификация хламидий.....	16
2.1.3. Биологические свойства.....	20
2.1.4. Эпизоотология хламидийной инфекции.....	25
2.2. Диагностика хламидиоза животных.....	28
2.3. Меры борьбы и профилактика хламидиозов животных.....	33
2.3.1. Меры борьбы.....	33
2.3.2. Профилактика.....	35
3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	41
3.1. Материалы исследований.....	41
3.2. Методы исследований.....	44
4. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	54
4.1. Клинические особенности течения хламидийной инфекции в козоводческом хозяйстве и выделение нового изолята хламидий.....	55
4.2. Определение инфекционного титра изолята хламидий "АМК-16" на куриных эмбрионах.....	59
4.3. Оценка патогенности и антигенной активности изолята хламидий «АМК-16» на лабораторных животных.....	61
4.3.1. Оценка патогенности изолята «АМК-16» на белых мышах.....	62
4.3.2. Оценка патогенности изолята «АМК-16» на морских свинках...	67
4.3.3. Оценка антигенной активности изолята хламидий «АМК-16» на лабораторных животных.....	71
4.4. Изучение иммуногенных свойств изолята хламидий «АМК-16».....	75
4.5. Депонирование штамма «АМК-16» в коллекцию микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».....	84

4.6. Оценка антигенной и иммуногенной активности вакцины на основе антигена штамма «АМК-16».....	86
4.6.1. Оценка антигенной активности вакцины на основе антигена штамма «АМК-16» на морских свинках.....	87
4.6.2. Оценка иммуногенности вакцины из штамма АМК-16 на белых мышах.....	93
4.6.3. Оценка эффективности вакцины на основе антигена штамма «АМК-16» в остром опыте на кроликах.....	97
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	106
6. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	109
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	110
7. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	111
8. ПРИЛОЖЕНИЯ.....	130

## 1. ВВЕДЕНИЕ

**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 [120, 149], 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 [56, 124,]. 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 [89, 121, 137, 142]. 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 абортами, рождением нежизнеспособного и слабого молодняка и в меньшей степени с бронхопневмониями, артритами, кератоконъюнктивитами и энцефалитами.

Инфицирование животных благополучного стада способно вызывать до 40-60% аборт среди всего маточного поголовья. По некоторым данным, среди всех этиологических факторов аборт, 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 патогенными, поэтому при выявлении вторых, исследования на хламидиоз как правило не проводятся. Главной причиной проведения комплекса лабораторных исследований на

хламидиоз, на данный момент, являются аборты, 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 [19, 20, 44, 66, 95]. 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 [55, 64, 128, 132, 159].

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 [62, 124, 88].

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 [7, 19, 20, 59, 66, 67].

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 [19]. В настоящее время для профилактики хламидиозов животных (свиньи, КРС, МРС, лошади) применяются ранее разработанные эмульсионные моно- и полиштаммовые вакцины [20, 44, 66]. 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 44<sup>th</sup> 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.

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1. Характеристика хламидийной инфекции животных.

#### 2.1.1. Краткая история открытия

С начала зарождения жизни и последующего эволюционного развития различных её форм в природе сформировались четкие «правила» взаимодействия живых существ. Наиболее известными типами взаимоотношений между всеми когда-либо существовавшими и имеющимися на данный момент организмами являются протокооперация, аменсализм, комменсализм, конкуренция, мутуализм, хищничество и паразитизм. В наше время термин - паразитизм достаточно часто ассоциируются с представителями различных низкоразвитых форм жизни, которые в подавляющем большинстве случаев вызывают те или иные патологические процессы у животных и людей.

С развитием письменности, когда людям удалось фиксировать свои наблюдения и делать некие выводы относительно различных болезней, возникающих непосредственно у представителей человеческих социальных групп, в которых они существовали и разводимых ими животных, появились источники, опираясь на которые, можно проследить историю развития инфекционной патологии.

Говоря о хламидийных инфекциях, достаточно часто в различных литературных источниках приводятся сведения о том, что данный вид патогенов был документально зафиксирован еще 4700-3500 лет тому назад, вызывая заболевание под названием «трахома» (термин трахома появился в 60 г. н.э.) [19, 56, 146]. В XV в. до н.э. в Египетских папирусах Эберса даже был описан метод лечения данного заболевания солями меди [56, 69, 161] .

Упоминания об этом заболевании были зафиксированы также во II-I в.в. до н.э. в Греции и Риме.

Сам термин Трахома появился в 60 г. н.э., его автором был сицилийский врач Педаниус Диоскоридес, но наиболее детальное описание этой инфекции

принадлежит древнеримскому медику, хирургу и философу греческого происхождения Галену (II в.н.э.), который описал четыре основных стадии течения данного заболевания [19, 56, 146].

Давая объективную оценку вышеизложенного, нельзя утверждать, что все ранее зафиксированные эпизоды течения инфекционного процесса, методы лечения и их результаты имеют какое-либо отношение к хламидийным инфекциям. Однако, на данный момент, согласно современным представлениям, полученным в результате стремительного развития научных методов изучения окружающей нас среды, имеются данные подтверждающие, что данный вид микроорганизмов существует на протяжении примерно 700 млн лет [93].

Наиболее подлинное понимание об инфекционных процессах протекающих в макроорганизмах было достигнуто научным мировым сообществом только после создания в 1674 г. Левенгуком микроскопа, позволившего доказать существование не видимых человеческим глазом живых существ (простейших, микробов).

В 1893 г. ученый E. Nocard установил взаимосвязь между бактериями и инфекционным заболеванием (пситтакоз) вызываемым ими. Данный вид микроорганизмов часто изолировали от попугаев и в некоторых случаях от людей, контактировавших с данным видом птиц. Также E. Nocard предложил название для данного вида микроорганизма «бацилла пситтакоза» [19]. В 1930 г. пятью независимыми друг от друга научными группами были получены неопровержимые научные данные, которые подтвердили взаимосвязи между пситтакозом попугаев и человека вызываемого не фильтруемыми микроорганизмами ведущими (паразитический) «внутриклеточный образ жизни» [19, 140]. В дальнейшем было установлено, что переносчиками данного заболевания («Пситтакоз») могут являться и другие виды птиц [19, 41, 113].

Также в 1930 г. ученым R.D. Lillie были описаны внутриклеточные грамотрицательные микроорганизмы кокко-видной формы вызывающие

патологические процессы у попугаев в людей со схожей для пситтакоза клинической картиной, но успехов в изоляции данного вида микроорганизмов достигнуто, к сожалению, не было [56, 124].

Первыми, кто внес наиболее основательный вклад в понимание биологических особенностей хламидий (на тот момент этого термина не существовало) была группа ученых под руководством профессора S.P. Bedson [19]. Научным коллективом под его руководством был описан жизненный цикл, иммунитет, антигенный состав возбудителя пситтакоза, а также был предложен способ проведения серологических исследований на основе методики постановки реакции связывания комплемента (РСК) [19, 79, 81].

Выделение культуры хламидий (тогда еще возбудителя трахомы) удалось осуществить L. Halberstädter и S. von Prowazek в 1907 г. [19, 111, 146]. Выделенный ими микроорганизм они назвали «chlamydozoa» (от греч. Chlamys – хламида или плащ) [19].

Учитывая морфологию, уникальный жизненный цикл и биологию хламидий, многие ученые, занимавшиеся изучением данного вида микроорганизмов приходили к ошибочным умозаключениям, считая их вирусами. Так в 1957–1958 гг. профессором F.F. Tang впервые была изолирована чистая культура трахомы от человека. Учитывая тот факт, что изоляция данного патогена производилась с использованием вирусологических методов, а именно посредством инфицирования развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ), было сделано ошибочное предположение о вирусной этиологии этого заболевания (тогда это заболевание получило название «вирус трахомы») [56, 167, 168, 169].

От сельскохозяйственных животных возбудитель хламидиоза впервые был выделен профессором Stemp в 1950 г [19, 27]. В настоящее время описано обширное количество клинических случаев течения хламидийной инфекции у различных видов сельскохозяйственных и плотоядных животных [8, 19, 25, 29, 56, 61, 73].

### 2.1.2. Классификация хламидий

За годы изучения хламидий, классификация и номенклатура этого вида микроорганизмов претерпевали значительное количество метаморфоз.

В 1907 году L. Halberstädter и S. von Prowazek отнесли данный вид микроорганизмов к таксону Chlamydozoa. В этом же году S. von Prowazek было предложено родовое имя Chlamydozoon, на тот момент этот род включал всего один вид - *C. bombucis* [56, 111].

В 1930 году ученым R.D. Lillie было предложено включить возбудитель пситтакоза в род Rickettsia. Учитывая связь данного заболевания с попугаями, было предложено видовое название psittaci [56, 125].

A. Busacca в 1933-1935 годах, сравнивая возбудителя трахомы с микроорганизмом выделенным L. Halberstädter и S. Prowazek предложил выделить данный микроорганизм в отдельный вид, который он назвал Rickettsia trachomae, причиной этому стало сходство морфологических и тикториальных свойств возбудителя трахомы и риккетсий [19, 140]. В 1937 году Foley и Parrot переименовали данный микроорганизм в *R. trachomatis*. В это же время в литературных источниках в качестве синонима *R. trachomatis* периодически использовался термин - *Chlamydozoon trachomatis*[56].

В 45 годах прошлого столетия Мошковский С.Д. объединил микроорганизмы вызывающие конъюнктивиты у животных и трахому и поместил их в новое семейство под названием – Chlamydozoaceae [140].

С 1945 года в научном мировом сообществе было предпринято не менее семи попыток пересмотра таксономического положения хламидий. В последствие эту группу этиологически схожих микроорганизмов стали обозначать как группу агентов Psittacos Lymphogranuloma venereum Trachoma (PLT). Немного позже ученое сообщество пришло к выводу, что все микроорганизмы PLT группы должны принадлежать к одному роду, так как имеют схожую морфологию, цикл развития и общий групповой антиген.

Исходя из этого было предложено объединить этих микробов в род *Chlamydia* по фамилиям авторов - *Chlamydia* Jones, Rake и Stearns [56, 140].

Не редко хламидий причисляли к вирусам, начиная с 1966 года этот термин официально был признан некорректным и был заменен термином «бактерия». Однако, научные споры о промежуточном положении хламидий между вирусами и бактериями велись еще до начала XXI века. Конец этим дискуссиям положило первое секвенирование генома хламидий [56, 140].

Начиная с 1966 года хламидии были отнесены к порядку *Chlamydiales* семейству *Chlamydiaceae* роду *Chlamydia* и считались облигатными внутриклеточными бактериями, с уникальным двухфазным циклом развития.

До 80-х годов род *Chlamydia* включал в себя только два вида: *trachomatis* и *psittaci*. Это было обусловлено их различиями биохимических характеристик и морфологических признаков, на основании этого штаммы, выделенные от людей относили к *Chlamydia trachomatis*, а изолированные от животных и птиц к *Chlamydia psittaci*. Позднее, с развитием молекулярно генетических, серологических методов исследований удалось идентифицировать еще два вида хламидий, они получили наименования: *Chlamydia pneumoniae* и *Chlamydia pecorum* [56, 109].

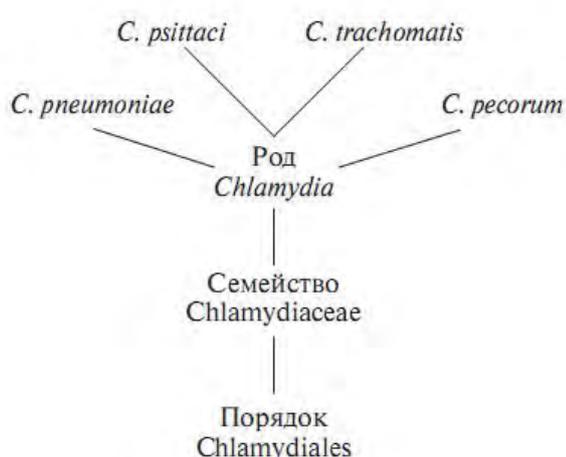


Рисунок 1 - Классификация хламидий до 1999 г.

[56, 156]

В 1999 году на основании данных исследования рибосомальной РНК К. Everett была предложена следующая модификация имеющейся систематики хламидий: было предложено четыре семейства, а семейство Chlamydiaceae разделить на два рода (Рисунок 2) [56, 161].

Род *Chlamydia* оказался представлен тремя видами: *C. trachomatis*, *Chlamydia muridarum* и *Chlamydia suis*. Род *Chlamydophila* – шестью видами: *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila pneumonia*, *Chlamydophila pecorum*, а также *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila caviae*, *Chlamydophila felis*, которые были выделены в самостоятельные виды из *C. psittaci*, поскольку различались между собой по ряду молекулярно-генетических характеристик и фенотипических признаков [56, 156].

К 2009 году, в связи со стремительными развитиями молекулярной биологии, позволившим осуществит полногеномное секвенирование с дальнейшим детальным изучением генома хламидий, появились научные факты, позволившие вновь пересмотреть классификацию этого вида микроорганизмов.

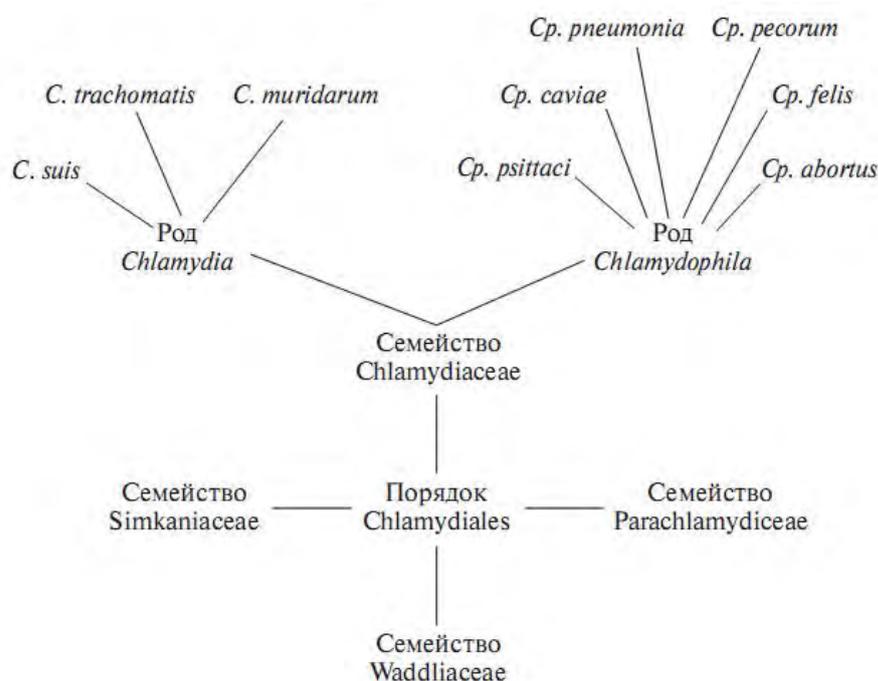


Рисунок 2 - Классификация хламидий, принятая в 2000 году.

[56, 156]

На основании полученных данных в порядок Chlamydiales были включены четыре семейства, и все патогенные хламидии были объединены в семейство Chlamydiaceae, которое включало всего один род Chlamydia представленный девятью на тот момент известными видами хламидий (Рисунок 3) [56, 156, 161].

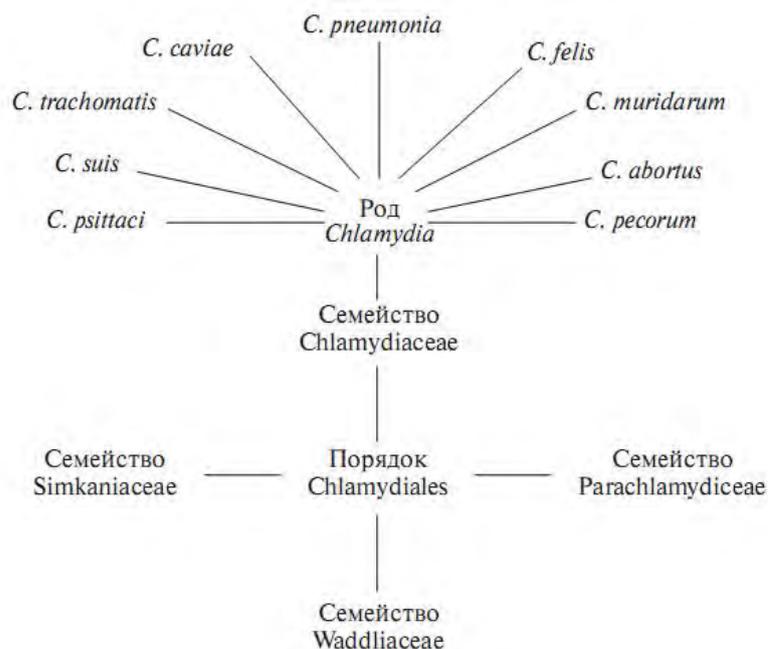


Рисунок 3 - Классификация хламидий в 2009 г.  
[56, 156, 161]

В последующие десять лет, классификация хламидий также претерпела некие изменения. За этот промежуток времени были выделены и изучены в достаточной мере еще 8 родов хламидий. Исходя из этого с 2019 году классификация хламидий выглядит следующим образом: порядок Chlamydiales включает в себя четыре семейства (Simkaniaceae, Waddliaceae, Parachlamydiaceae и Chlamydiaceae), семейство Chlamydiaceae в свою очередь включает в себя 17 родов (*C. pecorum*, *C. suis*, *C. trachomatis*, *C. sanzinia*, *C. caviae*, *C. ibidis*, *C. avium*, *C. poikilothermis*, *C. corallus*, *C. gallinaceae*, *C. serpentis*, *C. pneumoniae*, *C. felis*, *C. muridarum*, *C. psittaci*, *C. buteonis* и *C. abortus*) (рисунок 4) [56, 124, 149].

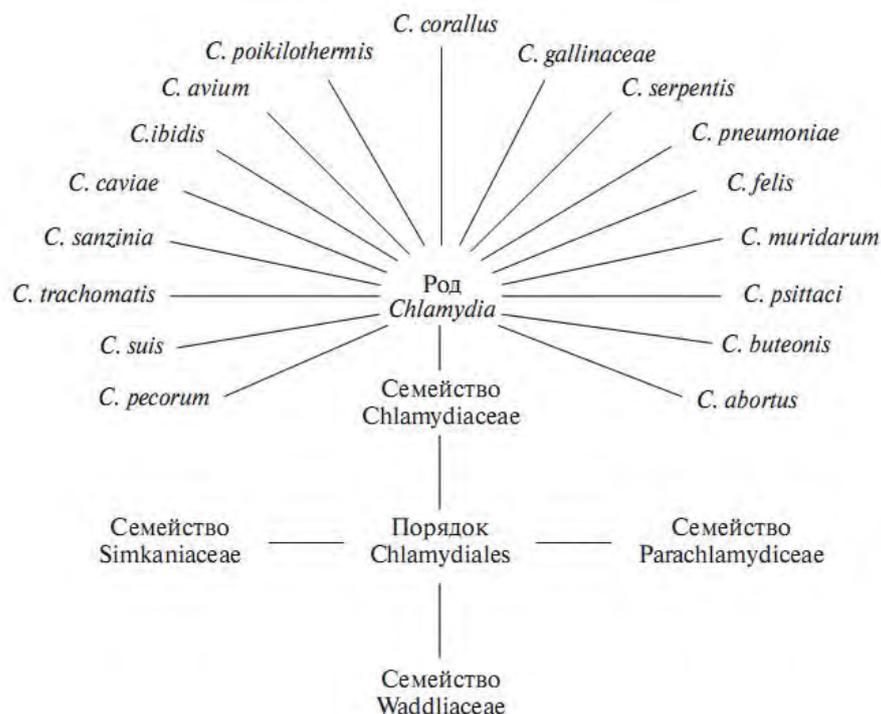


Рисунок 4 - Классификация хламидий в 2019 г.  
[56, 124]

### 2.1.3. Биологические свойства

Хламидии являются облигатными внутриклеточными паразитами человека и животных. Уникальный жизненный цикл данного вида микроорганизмов обуславливает наличие двух форм существования хламидий в окружающей их среде (элементарные тельца, ретикулярные тельца) [15]. Размеры хламидий варьируются относительно их формы, так размер ЭТ колеблется в пределах 200-300 нанометров, а размер РТ в пределах 0,8-1,5 мкм.

Клеточная стенка состоит из белков, фосфолипидов и липополисахарида (ЛПС) [19, 56].

**Резистентность к факторам внешней среды.** Хламидии слабо адаптированы к условиям существования во внешней среде. Воздействие повышенных температур является для них губительным, они инактивируются через 30 мин при температуре 50 °С, через 10 мин при 70 °С, а температура 90°С вызывает их инактивацию через 1 мин. Эфир убивает хламидии через 30 минут, 0,5% раствор фенола вызывает их инактивацию в течение 24 часовой

экспозиции. Хламидии имеют высокую чувствительность к таким дезинфицирующим средствам как хлорамин (2 %), калий перманганат (0,5 %), перекись водорода (25 %), 70 %-й этанол, нитрат серебра (0,05 %), лизол (2 %) и калий йодат (0,1 %). Низкие температуры способствуют сохранению их активности, при температурах  $-50^{\circ}\text{C}$  –  $-70^{\circ}\text{C}$  хламидии могут сохраняться годами [5, 19, 56, 154, 155].

**Жизненный цикл** хламидий изучен в достаточной степени. На первом этапе, элементарные тельца хламидий проникают в эпителиальные клетки инфицированного макроорганизма, этот процесс осуществляется посредством эндоцитоза. Следующий этап характеризуется образованием вакуоли во внутриклеточном пространстве пораженной эукариотической клетки с последующим метаморфическим преобразованием элементарных телец в ретикулярные тельца. Через 8-20 часов происходит размножение хламидий путем бинарного деления (3-й этап). Четвертый этап включает в себя некую вариативность исхода деления хламидий, обусловленных воздействием различных факторов окружающей среды. Наиболее часто на этом этапе происходит накопление большого количества РТ и ЭТ внутри образовавшейся вакуоли и последующий выход инфекционных элементарных телец из поражённой клетки в внеклеточное пространство инфицированного макроорганизма. Далее процесс повторяется в других клетках различных тканей организма хозяина. Воздействие антибиотиков на 4 стадии жизненного цикла хламидий может вызвать приостановку активного деления хламидий внутри пораженной клетки, что считается проявлением хронической формы персистирующей инфекции [6, 19, 56, 85, 99, 108, 131].

Также следует отметить, что взаимодействие элементарных телец с лимфоцитами и макрофагами не всегда приводит к их лизису, что обуславливает их способность к циркуляции в лимфо- и кровотоке [56, 148]. Этот процесс также приводит к хронической форме течения хламидийной инфекции [122].

По своей структуре хламидии достаточно схожи с классическими представителями прокариот, но в отличие от них не имеют метаболических механизмов для осуществления самостоятельного размножения. Хламидии зависят от клетки хозяина в отношении снабжения их аминокислотами, нуклеотидами и ферментами для синтеза АТФ [112, 172].

Также, говоря о концептуальных различиях хламидий и других прокариотических организмов, следует отметить, что в составе клеточной стенки хламидий отсутствует полимер пептидогликан [97, 101].

Хламидии обладают факторами токсичности, которые обусловлены наличием эндотоксина, прочно связанного с клеточной стенкой элементарных телец [134].

Секвенирование генома хламидий показало, что хламидии являются типичными грамотрицательными бактериями и имеют механизмы осуществления горизонтального переноса генов и рекомбинации. Размер геномов в среднем варьируется в пределах 1000-1500 кб. У большинства секвенированных штаммов разных видов хламидий была выделена криптическая плазмида. Имеются научные данные, что у некоторых штаммов *S. suis* эта плазмида интегрирована в геном. Размер криптической плазмиды у хламидий колеблется в пределах 7-7,5 кб [56, 175].

С развитием современных метагеномных технологий удалось выявить некультивируемые формы хламидий, персестирующих в тканях пациентов с бесплодием и вызывающих сальпингиты [56, 114, 170].

На данный момент у шести видов хламидий были детектированы бактериофаги [56].

Химическая структура оболочки хламидий включает в свой состав белково-углеводно-липидный комплекс (масса 400-500 кД). Белок составляет пятьдесят процентов этого комплекса, углеводы – 40% и на долю липидов в этой структуре отводится 9%. Липидная часть этих молекул представлена в виде фосфолипидов, а именно нейтральных жиров и лецитина [19, 173].

Помимо этого невысокую чувствительность хламидий к воздействию на них пенициллина обуславливает наличие в их клеточной стенке мурамовой кислоты [19, 56].

В ходе изучения биологических свойств хламидий было установлено, что данный вид микроорганизмов не обладает способностью синтезировать собственные молекулы аденозинтрифосфата. Потребность хламидий в таких аминокислотах как лейцин, цистеин и триптофан была выявлена в ходе проведения исследований под руководством Н. Morgana и J. Badera [19]. Глюкоза играет важную роль в процессах осуществления роста хламидий [19]. Чувствительность хламидий к сульфаниламидным препаратам обусловлена отсутствием необходимости в потреблении хламидиями фолиевой кислоты. Также экспериментально доказано, что представителям вида *C. psittaci* для размножения необходим гистидин [19, 53]. Эта характерная отличительная черта применяется при проведении дифференциальной диагностики [19].

На данный момент известны следующие антигены хламидий: основной белок наружной мембраны MOMP, термостабильные пептиды Hsp70 и Hsp60, Pgp3, специфический орнитозный антиген и ЛПС лишенный O-специфических боковых цепей, типичный для грамотрицательных бактерий.

Хламидии обладают специализированным секреторным аппаратом типа III (T3SS), который позволяет бактериям вводить факторы вирулентности непосредственно в цитозоль клетки-мишени чувствительного хозяина с последующей дезорганизацией механизмов адаптивного иммунного ответа [56, 174].

В последнее время с появлением новых современных методов диагностики появляется все больше данных, указывающих на то, что достаточно часто хламидийные инфекции протекают в коалиции нескольких видов хламидий имеющих различные генетические варианты [56, 92, 104, 138, 141, 137].

Ранее считалось, что характерной особенностью разных родов хламидий является их видовая специфичность, а именно строгое соответствие

определенному виду животных. На данный момент, с развитием молекулярно-генетических методов анализа, в научной литературе все чаще появляются сообщения о том, что хламидии, выделенные от разных видов животных и людей, имеют возможность инфицирования ранее считавшихся не специфичными для данного вида хламидий биологических моделей. Например, штаммы *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* ранее традиционно считавшимися возбудителями хламидиоза только людей, за последние 15 лет были выделены у диких, домашних и сельскохозяйственных животных [86, 96, 139, 142]. Начиная с 1996 г. *C. psittaci* не считают возбудителем хламидийных генитальных инфекций у сельскохозяйственных животных, отводя главную роль в этиологии этих патологических процессов *C. abortus* [126, 141]. Но данный вид хламидий (*C. psittaci*) систематически выделяется из клинических и патологических образцов абортировавших сельскохозяйственных животных, птиц и людей [138].

Более детальное изучение генома хламидий позволило обнаружить у хламидий систему «адаптивной микробной иммунной системы» CRISPR [56, 94, 136]. Основная функция CRISPR у хламидий, как и у других микроорганизмов, связана с обеспечением бактерий РНК-опосредованным адаптивным иммунитетом в виде «защиты» от вирусов, бактериофагов, плазмид или мобильных генетических элементов [56, 57, 84, 118].

Являясь грамотрицательными бактериями, хламидии обладают способностью к точковым мутациям, гомологичным рекомбинациям и горизонтальному переносу генов, это обуславливает их способность приобретать резистентность к противобактериальным препаратам (антибиотикам) [56, 164, 153, 152, 117].

#### **2.1.4. Эпизоотология хламидийной инфекции**

Широкое распространение хламидийной инфекции в природе и наличие обширного перечня хозяев (травоядные и плотоядные животные, птицы, люди) обусловлено антропозоонозной природой этого микроорганизма [19]. Этому, в первую очередь, способствуют биологические особенности хламидий, и их способность адаптироваться к паразитированию на различных биологических моделях. В естественных условиях хламидии первостепенно поражают слизистые оболочки инфицированного организма. В дальнейшем инфекция распространяется по другим тканям и системам органов инфицированного макроорганизма (органы пищеварения, дыхания, мочеполового тракта и тд).

Клинические признаки хламидийной инфекции обширны и могут характеризоваться кишечной, респираторной, генитальной, артритной, кератоконъюнктивитной, абортивной и энцефаломиелитной формами инфекционного процесса. Инфекция также может протекать остро, подостро и хронически [19].

Подвержены заражению хламидиозом животные всех возрастов, не зависимо от половой принадлежности и породы [19, 37].

Масштаб течения инфекции в хозяйствах напрямую связан с резистентностью инфицированных организмов, поэтому условия кормления, содержания и численность поголовья скота на производственных комплексах играют важную роль в этом процессе [19, 37, 49, 129, 133, 159].

Инфицирование животных происходит в следствии их контакта с больными животными, распространяющих возбудителя хламидиоза с выделяемыми ими секретами, и абортиванными плодами. Характерными для хламидиоза путями заражения животных являются: аelementарный, лактогенный, аэрогенный, плацентарный и контактный [19, 28].

На данный момент не вызывает сомнения утверждение, что обострение течения хламидийной инфекции активизируется по мере снижения иммунитета

и на фоне не соблюдения условий кормления и содержания животных [19, 32, 74, 75, 102, 121, 127, 135].

Смертность животных, вызванная хламидийными энцефалитами, достигает 50-60 %, но процент заболеваемости животных достаточно низкий, и наиболее часто подобные случаи наблюдаются в летне-осенний период [19].

Аборты хламидийной этиологии представляют существенную угрозу производственной деятельности животноводческих комплексов.

В нашей стране о данном заболевании первые сообщения в научной литературе были сделаны Носовым И.И. и Волковой А.А. [19]. Начиная с 1965 по 1998 годы были проведены глубокие масштабные эпизоотологические, вирусологические и серологические исследования учеными Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института (г. Казань) [19, 7, 65]. Эти исследования проводились в неблагополучных по абортам животноводческих хозяйствах, специализирующихся на разведении крупного рогатого скота, свиней, коз, овец и лошадей в Тамбовской, Ярославской, Кировской областях, республиках Татарстан, Карелия, Удмуртия, а также Красноярского края [19]. Большой вклад в понимание возникновения и развития эпизоотического процесса вызываемого хламидиями на территории нашего государства в 1985-2003 гг. внес Хамадеев Р.Х [19, 59].

Диагностика хламидиоза сельскохозяйственных животных осложняется отсутствием специфических клинических признаков течения заболевания. Количество симптомов очень обширно и разнообразно. Наиболее часто отправной точкой для проведения лабораторных исследований на хламидиоз являются аборты с неизвестной этиологией. Симптомы инфекции не всегда бывают ярко выраженными, достаточно часто инфекция протекает латентно. В ходе протекания хронической формы хламидийной инфекции у инфицированных животных развиваются различные осложнения [13, 19].

У КРС, овец и коз клиническое течение хламидийной инфекции может быть разнообразным. Это обусловлено различными физиологическими

факторами (возраст животных, их пол и общая резистентность организма), а также патогенностью штаммов [19, 35, 51, 57].

У рогатого скота, в подавляющем большинстве случаев, характерным клиническим признаком хламидиоза являются аборты наступающие во второй половине срока беременности, достаточно часто после этого развивается хроническое бесплодие [36, 19]. Молодняк полученный от больных коров в подавляющем большинстве случаев рождается недоразвитым, с симптомами артритов конъюнктивитов, пневмонии и отставанием в росте. Не редко телята рождаются мертвыми [36, 19].

Как правило, в подавляющем большинстве случаев перед абортом у животных отмечается повышение температуры тела [19]. Не редко у абортировавших животных отмечается задержание последа, а также развиваются вагиниты и метриты, которые в последующем приводят к бесплодию. Очень часто хламидийные аборты протекают на фоне микс-инфекций бактериальной или вирусной этиологии, что достаточно часто приводит к гибели животного [19].

Основные клинические проявления хламидийной инфекции у молодняка обычно характеризуются артритами, полиартритами, бронхопневмониями, кератоконъюнктивитами и энцефаломиелитами. Как правило у новорожденных отмечают диарею, и повышение общей температуры тела. К 3-10 дням жизни у телят начинают проявляться клинические признаки артритов, конъюнктивитов, бронхопневмоний. На фоне этого животные начинают худеть и к 10 суткам после первых признаков инфекции телята погибают [19, 51, 59].

Достаточно высокий процент инфицирования молодняка наблюдается при хламидиозном кератоконъюнктивите, причем инфицированию подвержены животные различных половозрастных групп. Симптомы инфекции характеризуются слезотечением, светобоязнью, гиперемией сосудов, отеком конъюнктивы век и глазного яблока [19, 51]. У некоторых животных развивается катаральный, фиброзный или гнойный кератит. В подавляющем большинстве случаев распространенность кератоконъюнктивита хламидийной

этиологии распространяется на 10-30% инфицированных животных, но имеются зафиксированные данные, что данная патология распространялась до 90% поголовья молодняка в хозяйстве [19].

Наиболее выраженные клинические признаки хламидийной бронхопневмонии проявляются у телят начиная с 20-дневного возраста и периодически фиксируются у животных до 5-6 месячного возраста. Как правило у животных сначала отмечается повышение температуры тела и снижение аппетита, в дальнейшем появляются выделения из носовой полости, кашель и хрипы в легких [51, 19].

Симптомами хламидийной инфекции у быков являются орхиты, уретриты, баланопаститы, незначительное увеличение семенников, их болезненность и малоподвижность. Мочеиспускания болезненны, быки, в поведении быков заметно несколько возбужденное состояние, из препуция выделяется густой экссудат[19].

У быков течение инфекционного процесса, чаще всего, протекает без выраженных клинических признаков, однако эти животные являются распространителями инфекции, выделяя хламидий с различными секретами [19].

## **2.2. Диагностика хламидиоза животных**

Учитывая широкое разнообразие клинических форм хламидийной инфекции и возможности бессимптомного или латентного течения, диагноз на хламидиоз ставится комплексно с учетом оценки клинико-эпизоотологических, патоморфологических, вирусологических и серологических исследований [19, 35].

Предварительный диагноз ставится на основании результатов клинико-эпизоотологических и патоморфологических исследований, важное внимание при этом уделяют наличию в хозяйстве гастроэнтеритов, полиартритов, бронхопневмоний и конъюнктивитов у молодняка, а также абортов,

мертворождаемости и массовых гинекологических заболеваний у самок [19, 56, 60].

Окончательно диагноз можно подтвердить только на основании результатов лабораторных исследований [19, 56]. В эту процедуру входит комплекс исследований: микроскопия мазков-отпечатков с целью обнаружения элементарных телец хламидий в патологическом материале; проведение серологических исследований, направленных на выявление специфических хламидийных антител (РСК, РНГА, ИФА) или непосредственной идентификации антигена хламидий в патологическом материале (РИФ); выделение культуры хламидий на развивающихся куриных эмбрионах, перевиваемых культурах клеток или лабораторных животных [19, 56].

Антигенный состав хламидий разгадан не полностью, в первую очередь это связано с их уникальным жизненным циклом, который обуславливает их размножение внутри клеток инфицированных организмов, в связи с этим имеются трудности при выделении чистой культуры хламидий. [19, 42].

Антигенный состав хламидий включает в себя группоспецифический и видоспецифический антигены [19, 56].

Группоспецифический антиген это липополисахарид, активная часть которого представлена 2-кето-3-дезоксооктановой кислотой. [19]. Этот антиген достаточно стабилен, способен выдерживать нагревание до 133 °С, выдерживает лиофилизацию, устойчив к воздействию таких ферментов как трипсин, папаин, ДНК-аза, РНК-аза, однако не выдерживает воздействия низкой температуры [19]. Молекулярная масса этого антигена равна примерно 2000 кД. Отличительной чертой данного химического соединения от других липополисахаридных комплексов грамотрицательных бактерий является уникальный для хламидий домен [19, 87]. Углеводная природа этого антигена подтверждается его разрушением при обработке его перйодитом калия. Под воздействием эфира липидная фракция этого антигена расщепляется. Антиген не содержит белка, это подтверждается его устойчивостью к действию протеолитических ферментов [19].

Видоспецифический антиген представлен белком. Молекулярная масса этого антигена равна 155 кД. Этот антиген является поверхностным он тесно связан с липидом. Видоспецифический антиген является термостабильным (денатурирует при 60 °С) и выдерживает воздействие фенола [19, 46, 48, 98].

Попадая в организм хозяина хламидии способны вызывать выработку преципитирующих, агглютинирующих, комплементсвязывающих и других видов антител [19].

Наиболее выраженными антигенными свойствами обладают белки МОР и ОР 2 с молекулярными массами 38-45 кД и 60 кД соответственно. Они содержатся в основном на поверхности элементарных телец хламидий и составляют 60% от поверхностного белка, являясь при этом основными серотипирующими иммуногенными антигенами [19,].

Штаммы хламидий, выделенные при аборте отличаются от штаммов, вызывающих пневмонии и полиартриты по своим патогенным свойствам выраженных в виде тропизма к определенным тканям инфицированных организмов, что обусловлено их различиями в антигенной структуре [19, 151].

Наиболее чувствительными биологическими моделями при изучении хламидийной инфекции являются белые мыши. В процессе изучения вирулентности, патогенности и иммуногенности изолятов и штаммов хламидий, выделенных от сельскохозяйственных животных, применяют подкожный, интраназальный, внутрибрюшинный, внутривенный и интрацеребральный методы инфицирования [40, 58, 72, 123].

В процессе исследования штаммов хламидий выделенных от животных, также в качестве биологической модели используют морских свинок. Имеются сведения, утверждающие, что данный вид животных более чувствителен к внутримозговому и внутрибрюшинному способу инфицирования и в тоже время менее чувствителен к интраназальному способу экспериментального введения инфекционного материала [19, 40, 45].

С целью выделения живой культуры и осуществления систематического пассирования штаммов хламидий достаточно часто используют 6-8 дневные куриные эмбрионы [60].

Помимо куриных эмбрионов и лабораторных животных для изоляции хламидий используют культуры клеток. Сущность этого метода сводится к осуществлению экспериментального заражения монослоя культуры клеток исследуемым патологическим материалом. По некоторым сведениям специфичность данного метода составляет почти сто процентов, однако чувствительность не превышает 40%-60%, что на данный момент к сожалению не соответствует современным требованиям. [19, 50]. На данный момент этот метод не рекомендован для осуществления рутинной лабораторной диагностической работы [17, 19, 36, 89].

На первых этапах проведения лабораторных исследований патологических материалов на наличие в них хламидий, проводят исследования мазков-отпечатков под иммерсионной системой светового микроскопа [19, 31, 52, 83, 158,].

Окраску хламидий чаще всего проводят модифицированным методом Стемпа: Хламидии в мазках-отпечатках обнаруживаются в виде красно-фиолетовых точек на синевато-зеленоватом фоне препарата. При этом хламидии выявляются как вне клеток, так и внутри их [19].

Значимая роль в комплексе проведения лабораторной диагностики хламидиозов животных отводится серологической диагностике. Но выявление в сыворотках крови исследуемых животных специфических хламидийных антител не дает полного основания для постановки точного диагноза, однако указывает на тот факт, что животные контактировали с данным видом микроорганизмов. И для подтверждения наличия хламидийных антител в сыворотках животных появляется необходимость проведения более тщательных лабораторных мероприятий [12, 16, 19, 64, 78, 90].

Из серологических реакций в диагностике хламидиоза применяются: реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), реакция связывания комплемента (РСК) и иммуноферментный анализ (ИФА) [12, 16, 56].

В нашей стране наибольшее распространение получила реакция связывания комплемента (РСК). Впервые этот метод был использован для обнаружения специфических комплементсвязывающих хламидийных антител в сыворотках крови еще в 1935 году. В последующем данный метод был изучен многими исследователями [2, 10, 12, 19, 22, 66, 82, 155].

В настоящее время за диагностический титр в РСК считается разведение сыворотки 1:10 [1, 19, 59, 63, 67, 71, 130,].

Несмотря на широкое применение данной реакции в диагностике хламидиоза она имеет и один недостаток, который характеризуется низкой чувствительностью при хроническом и латентном течении инфекции, что обусловлено низкой концентрацией специфических антител в сыворотке крови инфицированных животных. [19, 68]. Экспериментально доказано, что РСК позволяет выявлять только половину инфицированных животных с латентной формой течения инфекционного процесса [19, 150].

Наиболее современным и точным методом осуществления серологических диагностических исследований является иммуноферментный анализ (ИФА). Этот метод является более чувствительным и специфичным, по отношению к ранее разработанным серологическим тестам.

Экспериментально установлено, что иммуноферментный анализ в 5-40 раз более чувствительнее, чем реакция связывания комплемента [19, 16].

Чувствительность метода ELISA составляет 90 %, чувствительность реакции связывания комплемента не превышает 45 % [19, 66].

В результате развития молекулярно-генетических методов исследований в настоящее время появилась возможность проведения диагностических лабораторных исследований направленных на индикацию нуклеиновых кислот различных микроорганизмов в разных клинических образцах инфицированных животных. Основными из них в настоящее время являются секвенирование и

полимеразная цепная реакция (ПЦР). На данный момент молекулярно-генетические методы исследования дают наиболее точные результаты. Современные методы генодиагностики по многим параметрам (специфичность, скорость проведения исследований) превосходят микробиологические и серологические методы исследований [19].

Впервые геном хламидий был секвенирован в 1998 году коллективом ученых под руководством Stephens [19, 160]. В процессе изучения генома хламидий удалось выделить 894 гена. У 604 из них удалось определить функциональное значение [19].

Консервативным хромосомным локусом в геноме хламидий является ген, кодирующий 16S РНК. Этот ген очень стабилен и как у всех прокариот является основой для проведения филогенетических исследований и определения таксономического положения хламидий в классификации микроорганизмов [19].

В настоящее время для лабораторной диагностики хламидийных инфекций широко применяется реакция ПЦР. Основным преимуществом этого метода является его высокая чувствительность (примерно 95%) и специфичность (почти 100%). Перечень биоматериалов для проведения исследований достаточно обширный (ткань, цельная кровь, сыворотка крови, мокрота, моча, ликвор, синовиальная жидкость, сперма, секрет предстательной железы, фекалии, соскобы, swabs и т.д.) [17].

Среди недостатков ПЦР отмечают высокие требования к качеству оборудования, квалификации персонала лаборатории и обеспечению биобезопасности проводимых диагностических работ, потенциальной контаминации биоматериала в процессе его доставки, возможности получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов, особенно в случае инфицирования человека и животных атипичными вариантами возбудителя [54, 55, 104, 105].

## **2.3. Меры борьбы и профилактика хламидиозов животных**

### **2.3.1. Меры борьбы**

Наиболее эффективными мерами борьбы с хламидийной инфекцией сельскохозяйственных животных является соблюдение правил системы ветеринарно-санитарных мероприятий, а именно охрана животноводческих комплексов от заноса возбудителя хламидиоза, своевременное проведение диагностических мероприятий при возникновении случаев заболевания животных [19], лечение и изоляция больных животных, систематическая иммунизация животных против хламидиоза и повышение неспецифической резистентности восприимчивых животных [19].

Однозначных ответов относительно вопросов о целесообразности проведения терапевтических мероприятий против хламидийных инфекций на животноводческих комплексах нет. На данный момент ведутся исследования и имеются разработанные и внедренные в ветеринарную практику препараты и методы лечения хламидиозов животных [19, 11, 14, 18, 35, 39].

Лечебные мероприятия в животноводческих комплексах неблагополучных по хламидийной инфекции проводят с применением антибиотиков. Имеется огромный перечень выпускаемой антимикробной продукции, которая используется для лечения инфицированных хламидиями животных [21]. Однако, целый ряд противобактериальных препаратов не оказывают необходимого терапевтического действия на хламидии. В этот перечень входят неомицин, ристоцетин, ванкомицин, стрептомицин, канамицин, полимиксин и др [19, 109, 166].

Учитывая тот факт, что размножение хламидий происходит во внутриклеточном пространстве, то при выборе антимикробных препаратов следует выбирать те, которые имеют возможность проникать внутрь клеток. Эффективны в борьбе с хламидиями антибиотики тетрациклинового ряда, фторхинолоны и макролиды [19, 38, 69, 103]. Механизм действия антибиотиков

тетрациклинового ряда сводится к подавлению фермента участвующего в синтезе ДНК и ингибирования до 90% синтеза белка [19, 110].

Достаточно эффективными из антибиотиков тетрациклинового ряда оказались такие препараты, как тетрациклин, хлортетрациклин, дитетрациклин окситетрациклин гидрохлорид, дибиомицин и другие.

Из макролидов наиболее эффективным считается эритромицин [30], который оказался наиболее безопасным препаратом для лечения беременных животных [88].

Антибиотик - джозамицин из группы макролидов, также показал высокую эффективность при лечении хламидийной инфекции [19].

По эффективности применения при лечении хламидийных инфекций Фторхинолоны менее эффективны чем антибиотики их группы макролиды, наиболее часто их советуют применять при смешанных бактериальной и хламидийной инфекциях.

Принцип действия фторхинолонов сводится к их способности блокировать фермент, обеспечивающий синтез ДНК хламидий, что в свою очередь ведет к полной деструкции их ДНК [19]. Помимо этого, разрушаются и плазмиды хламидий и они становятся не способными к формированию плазмидоопосредованной устойчивости к воздействию различных факторов [19].

Только в ветеринарной практике применяется препарат тилозин, обладающий выраженным противохламидийным действием.

На данный момент, многолетний опыт применения антибиотиков для лечения хламидиоза сельскохозяйственных животных показал свою экономическую и практическую неэффективность, так как затраты на химиотерапевтические мероприятия достаточно большие а положительный эффект лечения достигается не всегда.

### 2.3.2. Профилактика

Учитывая тот факт, что лечение больных хламидиозом животных в условиях животноводческих комплексов является трудозатратным, экономически не выгодным и как выяснилось не всегда эффективным, то наиболее выгодная стратегия борьбы с данным видом патогенна сводится к проведению комплекса вакцинно-профилактических мероприятий и созданию благоприятных условий содержания и кормления животных.

Тема возможности выработки специфического иммунитета у инфицированных хламидиями животных и людей, а также поиск и разгадка этих механизмов была актуальна среди научного мирового сообщества, занимавшегося этой проблемой, с начала открытия хламидий и остается такой, по сей день. За годы исследований было установлено, что переболевание хламидиозом не всегда создает стойкий иммунитет и невосприимчивость к последующему инфицированию данным видом патогена. Сейчас известно, что специфические особенности иммунного ответа млекопитающих организмов, инфицированных хламидиями, связаны с комплексом различных факторов, а именно: с разнообразием хозяев и связанных с этим процессов адаптации к ним хламидий; полигостальностью возбудителя; с разнообразием сайтов инфекции, клеток и механизмов, вовлеченных в локальный ответ; видоспецифическими характеристиками представителей различных видов хламидий.

Внедренные в медицинскую и ветеринарную практики методы проведения оценки серологического статуса инфицированных организмов доказывают наличие механизмов выработки иммунного ответа различных организмов вследствие контакта с хламидиями. Однако, в процессе клинических наблюдений за выздоровевшими и в последующем снова инфицированными организмами было установлено, что случаи реинфицирования хламидиозом не являются редкостью [100, 115, 177]. В то же время имеются научные данные, констатирующие возможность создания «кратковременного» протективного иммунитета к хламидиозу [95, 116, 119,

143, 145, 176, 147]. Эти данные создают фундамент для разработки эффективных вакцинных препаратов, способных вызывать выработку стойкого протективного иммунитета к хламидийной инфекции.

За годы паразитирования в различных макроорганизмах, хламидиям в процессе эволюции удалось выработать ряд механизмов, позволяющих им обходить защитные иммунные реакции инфицированных животных. К этим механизмам можно отнести: стратегии выживания во внутриклеточном и внеклеточном пространстве, способность дифференцировки в персистентные формы, вмешательство в апоптоз-индуцирующие сигнальные пути таргетных клеток, влияние на механизмы врожденного и адаптивного иммунитета и ограничение воспалительной реакции [77, 91, 106, 144].

Имеются сведения полученные многими учеными, которые свидетельствуют о передаче специфических хламидийных антител ягнятам, жеребят, поросятам и телятам вместе с молозивом матери [19, 9, 128, 163]. Эта тенденция прослеживается на протяжении первых 5-6 суток после рождения. Концентрация специфических хламидийных антител в крови молодняка в этот период регистрируется в титрах 1:40-1:1280 [19]. Данный механизм (колостральный иммунитет) является эволюционно закрепленным способом передачи хламидийных антител новорожденным животным с целью обеспечения их специфическим хламидийным иммунитетом в первые дни жизни. [19].

Сравнительные исследования различных штаммов хламидий показали, что штаммы выделенные при различных формах течения хламидийной инфекции (конъюнктивиты, пневмонии, аборты, артриты и др.) отличаются друг от друга антигенными свойствами и иммуногенностью. Имеются научные сведения, что животные ранее переболевшие хламидиозом после повторного инфицирования более чем через месяц после выздоровления повторно не заражаются [19, 74, 162].

С момента установления этиологической роли хламидий при абортах и других клинических форм инфекционного процесса, велись и ведутся

исследования по созданию наиболее эффективной вакцины против хламидиоза сельскохозяйственных животных [19]. Первая вакцина против хламидиоза была апробирована на овцах коллективом ученых под руководством Mc Ewen A.D [19]. Иммунизацию проводили вакциной, приготовленной из инактивированных формалином, искусственно инфицированных желточных оболочек куриных эмбрионов и плацентарной ткани овец, также искусственно зараженных. Испытания данного вакцинного препарата на лабораторных и производственных моделях показало его эффективность [19, 33]. В ходе этих исследований было установлено, что вакцинный препарат, приготовленный из плацентарной ткани овец, вызывал выработку наиболее высокого проективного противохламидийного иммунитета [19].

В последующем этим же коллективом ученых был создан вакцинный препарат на основе адьюванта. Добавление адьюванта в состав вакцины позволило повысить ее иммуногенные свойства [3, 4, 19]. Дальнейшие исследования в этой области, проведенные другими исследователями, также подтвердили необходимость включения адьювантов в состав противохламидийных вакцин [19, 13, 62, 43].

Позднее, Караваевым Ю.Д и Налетовым И.Н. была разработана эмульсионная инактивированная вакцина против хламидиоза овец, результаты исследований которой показали, что в течение года этот препарат предохранял от хламидийного аборта 98% суягных овец [19, 23, 26].

Использование данного препарата для осуществления иммунизации животных других видов не дал положительных результатов [19].

На территории РФ для иммунизации овец против хламидийной инфекции применяется эмульсионный вакцинный препарат. Исследования иммуногенности этого препарата показали, что он способен вызывать выработку специфического иммунитета у животных и как следствие предотвращать до 90% аборт у иммунизированных овец [19, 24]. Однако применение этого биопрепарата для иммунизации других видов животных

привело к получению неудовлетворительных результатов, аналогично предыдущему вакцинному препарату [19].

Сравнительные исследования вакцинных препаратов на основе различных адъювантов были проведены Хамадеевым Р.Х. [19]. Были происследованы три вида вакцин на основе трех принципиально разных типов адъювантов: гелевой, сорбированной и эмульсионной. В ходе этих исследований было установлено, что наиболее высокий уровень иммунного ответа вызывает вакцина на основе эмульсии [19, 65]. Серологические исследования сыворотки крови иммунизированных тремя типами вакцин овец показали, что специфические антитела в наиболее высоких титрах вырабатывались у животных иммунизированных эмульсионной вакциной [19].

В последующем был разработан метод получения концентрированного антигена хламидий, содержащего в своем составе минимальное количество балластных веществ, который применялся для создания вакцины. В качестве сырья для создания нового антигена они использовали содержащую хламидии биомассу, представленную гомогенатом желточных оболочек инфицированных куриных эмбрионов. Первичное деструктурирование тканей оболочек желтков куриных эмбрионов они производили трехкратным замораживанием и оттаиванием хламидиосодержащей биомассы, а инактивацию хламидий осуществляли 0,4% концентрацией формальдегида. Очистку и концентрирование хламидий проводили путем двуступенчатого центрифугирования. [19, 48, 34].

Багдонас И.И. и коллектив ученых под его руководством изучали возможность создания хламидийной вакцины на основе первично-трипсинизированных клеток почек эмбрионов коров. В процессе создания экспериментального препарата они обрабатывали хламидиосодержащую жидкость мертиолятом и инактивировали в течение 10 суток. Серологические исследования показали, что максимальный титр комплементсвязывающих хламидийных антител в крови иммунизированных этой вакциной телят был равен показателю 1:32 [19].

В Венгрии фирмой «Филаксия» было запущено массовое производство инактивированной эмульсионной противохламидийной вакцины, способной создавать протективный иммунитет у иммунизированных животных с продолжительностью до 1 года. Применение данного препарата снижало количество аборт в 2-3 раза [19].

Помимо разработки инактивированных вакцин, также были предприняты попытки создания аттенуированных вакцинных препаратов [19, 132, 157 ].

При учете эффективности применения живых вакцин исследователи пришли к выводу, что они более перспективны по сравнению с инактивированными препаратами, но в силу обстоятельств эти препараты не нашли широкого применения в ветеринарии. Прежде всего это связано с тем, что живые вакцины имели ограниченный срок хранения. Срок хранения таких вакцин не превышал 7-14 суток.[19].

В заключение всего вышеизложенного, хотелось бы еще раз заострить внимание на том, что хламидийная инфекция имеет широкое распространение среди различных видов животных, в частности сельскохозяйственных. Это обусловлено жизненным циклом и биологическими свойствами хламидий, а именно их способностью адаптироваться к паразитированию на различных биологических моделях (животных). Полиморфность клинических признаков и возможность бессимптомного течения хламидийной инфекции у животных не всегда позволяет вовремя ее диагностировать. В связи с чем животноводческие комплексы несут значительные экономические потери. Как показывает многолетняя практика, лечебные мероприятия с применением химиотерапевтических средств не всегда эффективны по отношению к хламидийной инфекции. Поэтому наиболее эффективной стратегией борьбы с данным патогеном является вакцинопрофилактика. В связи с этим имеется необходимость разработки новых более эффективных средств специфической профилактики хламидийных инфекций.

### 3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1. Материалы исследований

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

**Изоляты и штаммы.** В работе были использованы следующие производственные штаммы и изолят хламидий:

- изолят *C.psittaci* «АМК-16», выделенный из патологического материала абортировавшей козы в неблагополучном по хламидиозу козоводческом хозяйстве Высокогорского района РТ в 2016 году, культивируемый на развивающихся куриных эмбрионах;

- штамм *C.psittaci* «250», депонированный в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», выделенный из патологического материала абортированного плода коровы в Куйбашевской области в 1973 году, культивируется на развивающихся куриных эмбрионах, инфекционный титр  $10^{-6,5}LD_{50}/0,3 \text{ ml}$ ;

- штамм *C.psittaci* «РС-85», депонированный в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», выделенный из патологического материала абортированного плода свиньи в Горьковской области в 1984 году, культивируется на развивающихся куриных эмбрионах, инфекционный титр  $10^{-6,5}LD_{50}/0,3 \text{ ml}$ ;

- штамм *C.psittaci* "Ростиново-70", депонированный в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», выделенный из патологического материала абортированного плода овцы в Ярославской области в 1970 году, культивируется на развивающихся куриных эмбрионах, инфекционный титр  $10^{-7,5}LD_{50}/0,3 \text{ ml}$ ;

**Животные.** В исследованиях были использованы экспериментально инфицированные и естественно больные животные:

- 1) Козы Зааненской породы 200 голов;
- 2) Кролики живой массой 2,0-2,5 кг в количестве 7 голов;
- 3) Морские свинки живой массой 200-250 г в количестве 48 голов;
- 4) 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. В ходе выделения и культивирования штаммов, а также проведения исследований было использовано более 3000 шт. развивающихся эмбрионов кур.

**Диагностические препараты.** Для оценки сывороток крови лабораторных и сельскохозяйственных животных на наличие в их составе специфических комплементсвязывающих хламидийных антител применяли «Набор антигенов и сывороток для серологической диагностики хламидиозов сельскохозяйственных животных» (РОСС RU.ФВ01.Н00022) производства ФГБУ «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.** В экспериментах использовали:

- 1) Экспериментальную серию вакцины на основе антигена штамма хламидий «250» инактивированную эмульсионную;
- 2) Экспериментальную серию вакцины на основе антигена штамма хламидий «РС-85» инактивированную эмульсионную;
- 3) Экспериментальную серию вакцины на основе антигена штамма хламидий «АМК-16» инактивированную эмульсионную.

**Питательные среды, реактивы, растворы и сыворотки.** Оценку стерильности культур штаммов и экспериментальных серий вакцин проводили на питательных средах:

- 1) Мясо-пептонный агар (МПА);
- 2) Мясо-пептонный бульон (МПБ);
- 3) Среда Сабуро;
- 4) 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 по ГОСТ 1373, ланолин безводный, фуксин основной по ТУ 6-09-3804, малахитовый зеленый по ТУ 6-09-1551, фенол по ТУ 6-09-5303, спирт этиловый по ГОСТ 18300, Серную кислоту по ГОСТ 4204, воду дистиллированную по ГОСТ 6709 (рН-5,6), натрий углекислый кислый по ГОСТ 4201, натрий хлористый по ГОСТ 4233, сахарозу, квасцы алюмокалиевые, гентомицин, стрептомицин, нистатин и др.

Работу проводили с использованием следующей аппаратуры и оборудования: микроскоп Nikon Eclipse E-200, низкотемпературный холодильник РР-130, весы ТИП СИ-Wa-31, гомогенизаторы, термостаты, водяная баня, центрифуги, автоклав, пробирки стеклянные по ГОСТ 2536, шприцы инъекционные, иглы инъекционные, ножницы, стекла предметные по ГОСТ 9284, автоматические пипетки с регулируемым объемом, стеклянные цилиндры вместимостью 500 и 1000 см<sup>3</sup>.

### 3.2. Методы исследований

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

Оценку эпизоотической ситуации проводили с учетом данных статистической и ветеринарной отчетности хозяйства, собственных наблюдений и результатов исследований клинических образцов патологических биоматериалов от больных коз.

На протяжении всего исследования в неблагополучном по хламидиозу козоводческом хозяйстве систематически проводились клинические осмотры всего поголовья коз, с целью выявления животных с клиническими признаками бронхопневмоний, конъюнктивитов и артритов скакательных или запястных суставов. Диагноз на конъюнктивит считали положительным при наличии серозных или гнойных истечений из глаз с ярко выраженным покраснением конъюнктивы. Хламидийную этиологию этого патологического процесса подтверждали микроскопическими исследованиями глазных смывов.

Особое внимание в ходе проведения клинических осмотров уделялось оценки походки новорожденных козлят. Артрит диагностировали на основании наличия визуально заметных патологических изменений в суставах живых и павших особей. Диагноз подтверждали лабораторными исследованиями патологических материалов.

Бронхопневмонию диагностировали при наличии кашля, серозных истечений из носовой полости у живых особей, а также в ходе проведения патологоанатомических и лабораторных исследований павших животных.

Идентификацию выделенного патогенна, проводили по морфологическим и тинкториальным свойствам - микроскопически, по

групповой антигенной специфичности – серологически (в РИФ и РСК), и молекулярно генетически (ПЦР).

**Серологические исследования.** Пробы сывороток крови животных исследовали в реакции связывания комплемента (РСК). Исследования проводили с использованием «Набора антигенов и сывороток для серологической диагностики хламидиозов сельскохозяйственных животных» (РОСС RU.ФВ01.Н00022), по инструкции утвержденной Заместителем руководителя Россельхознадзора от 3 марта 2008 года.

Реакцию ставили в пробирках Флоринского в общем объеме компонентов реакции 1мл. Инактивацию сывороток проводили в течении 30 мин, титрование проводили путем двукратных разведений, начиная с 1:5. Титрование комплемента в гемолитической системе проводили перед постановкой реакции используя его удвоенную дозу. Гемолитическую систему готовили из 2,5%-ной смеси отмытых эритроцитов барана и стандартной гемолитической сыворотки. Реакцию проводили при 37 °С в водяной бане. Разведение сыворотки равное 1:10 принимали за диагностический титр, сомнительным результатом считали разведение 1:5.

Выявление хламидийного антигена в патологическом материале осуществляли в реакции иммунофлуоресценции (РИФ).с применением «Набор флуоресцирующих иммуноглобулинов и контрольных сывороток для диагностики хламидиозов сельскохозяйственных животных» (№РОСС RU.ФБ01.В20238). Реакцию ставили согласно инструкции утвержденной Заместителем руководителя Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору РФ 3 марта 2008 года.

Наличие хламидийного антигена в мазках отпечатках выявляли по наличию внутриклеточного ярко-зеленовато-желтого свечения различных по величине гранул на тусклом серовато-зеленом фоне клеток. Оценку интенсивности свечения проводили по четырехкрестовой системе. Положительным результатом считали свечение на 3 и 4 креста. Сомнительным результатом реакции считалось свечение на 1 или 2 креста.

**Исследования на стерильность.** Наличие или отсутствие не специфической микрофлоры в образцах культур штаммов и экспериментальных серий вакцин оценивали путем высева их на бактериальные питательные среды: мясо-пептонный агар (МПА), мясопептонный бульон (МПБ), Сабуро и среду Китта-Тароцци (МППБ) с последующей экспозицией в течении 10 суток при температуре 37<sup>0</sup>С. За положительный результат считали отсутствие колоний культур микроорганизмов на питательных средах.

**Исследования на безвредность.** Оценку безвредности антигенов хламидий и экспериментальных образцов вакцин проводили на белых мышах и морских свинках путем внутрибрюшинного введения суспензий с исследуемыми образцами в дозах 0,3 см<sup>3</sup> и 0,5 см<sup>3</sup> соответственно и последующим наблюдением за их физическим состоянием в течение 14 суток. Результаты биопробы оценивали по общему состоянию животных и по наличию или отсутствию падежа после иммунизации.

**Выделение хламидий.** Изоляцию культуры хламидий проводили путем заражения куриных эмбрионов 10% суспензиями, приготовленными из органов абортированных плодов и недоразвитых козлят. Материал для заражения готовили из пораженных тканей путем их гомогенизирования, последующего суспендирования до 10 % концентрации 0,15М фосфатно-солевым буфером с добавлением антибиотиков. Далее суспензию центрифугировали при 3000 об/мин с целью удаления балластных веществ и выдерживали при 4 °С в течении 12 часов для устранения токсичности. Получившейся суспензией инфицировали куриные эмбрионы в желточный мешок в дозе 0,3 см<sup>3</sup>. Наблюдение за зараженными эмбрионами проводили в течение 14 суток после инфицирования. Из желточных оболочек павших на 4-14 сутки куриных эмбрионов делали препараты для микроскопии с целью подтверждения хламидийной этиологии гибели эмбрионов.

**Микроскопия мазков-отпечатков.** Идентификацию хламидий проводили путем микроскопических исследований мазков-отпечатков, приготовленных из пораженных тканей абортированных плодов, тканей

органов лабораторных и сельскохозяйственных животных, желточных оболочек инфицированных куриных эмбрионов и хламидийной биомассы. Мазки-отпечатки окрашивали по модифицированному методу Стемпа и исследовали под иммерсионной системой светового микроскопа. Результат исследования считался положительным, если на зеленом фоне препарата выявлялись окрашенные красным цветом элементарные тельца хламидий.

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

Суспензии для заражения готовили из желточных оболочек павших на 5, 6 и 7 сутки, после заражения, эмбрионов кур. Инфицированные желточные оболочки гомогенизировали в химической ступке, ресуспендировали 0.15М фосфатно-солевым буфером с добавлением стрептомицина и нистатина до конечной концентрации желточных оболочек в суспензии равной 10 %. Удаление балластных веществ осуществляли путем центрифугирования полученной смеси при 3000 об/мин на протяжении 20мин. Устранения токсичности добивались 12 часовой экспозицией получившейся суспензии при 4 °С.

**Патологоанатомическое вскрытие** проводилось по методике профессора Трофимова И.Т. Казань 1959 г.

**Определение инфекционного титра изолята хламидий "АМК-16" на куриных эмбрионах.** Инфекционный титр изолята определяли на развивающихся 6 суточных эмбрионах кур. Для заражения, из исследуемого материала (инфицированные желточные оболочки), готовили 10 %-ную ( $10^{-1}$ ) суспензию на 0.15М фосфатно-солевом буфере с добавлением антибиотиков и последующими процедурами для удаления балластных веществ и токсичности. Далее из исходной концентрации инфекционного материала делали последовательные 10-кратные разведения до концентрации 1:10000000 ( $10^{-7}$ ) используя тот же буферный раствор. Заражение куриных эмбрионов производили в желточный мешок в дозе 0.3 см<sup>3</sup>, по 10 штук на каждое разведение. Последующее инкубирование зараженных эмбрионов кур при

температуре 37 °С длилось в течении 8 суток. Специфической считали гибель куриных эмбрионов павших на 4-8 сутки.

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. Для проведения эксперимента были отобраны белые мыши мужского пола, живой массой от 16 до 20 грамм и морские свинки мужского пола, живой массой 200- 250 грамм. Белые мыши были укомплектованы в 3 группы по принципу аналогов по 20 животных в каждой. В дальнейшем животные всех групп были инфицированы подкожным, внутрибрюшинным и интраназальным методами 10 %-ной суспензией приготовленной из инфекционного материала изолята «АМК-16». Наблюдение за инфицированными животными велось в течение 14 суток после заражения. В это время проводилась ежедневная оценка их общего состояния и фиксировалось время гибели с момента заражения.

Из морских свинок были укомплектованы 2 аналогичные группы. Животных 1-й группы инфицировали 10 %-ной суспензией интраназальным методом в дозе 0,1 см<sup>3</sup>. 2-я группа животных была заражена внутрибрюшинным методом в дозе 0,5 см<sup>3</sup>. В течение 30 суток после заражения за морскими свинками велось ежедневное наблюдение с целью выявления специфических симптомов, характерных для экспериментальной хламидийной инфекции у данного вида животных, которые характеризуются взъерошенностью шерстного покрова, слезотечениями и отказом от корма. Также в этот период фиксировались падежи животных.

С целью подтверждения хламидийной этиологии гибели животных производилось 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».** В качестве биологической модели для оценки антигенных свойств изолята «АМК-16» использовали морских свинок. Животные были разделены на 2 группы. Первая группа морских свинок была инфицирована 10 % суспензией содержащей инфекционный материал из желточных оболочек павших на 4-5 сутки после заражения куриных эмбрионов внутрибрюшинным методом в дозе 0,5 см<sup>3</sup>. Животные 2-й группы были инфицированы интраназальным методом той же суспензией в дозе 0,2 см<sup>3</sup>.

Оценку антигенной активности инактивированного нативного антигена изолята хламидий «АМК-16» проводили также на морских свинках. Антиген вводили внутрибрюшинным методом в дозе 0,5 см<sup>3</sup>. Для инактивации антигена 10 % суспензию содержащую живую культуру хламидий обработали раствором формалина в конечной концентрации 0,2% с экспозицией 24 часа при температуре 37 °С.

Пробы сывороток крови у животных всех групп отбирались в начале исследования и на 30 сутки после введения инфекционного материала и инактивированного антигена. Оценку наличия в сыворотке крови комплементсвязывающих хламидийных антител проводили в РСК. Реакцию ставили с использованием «Набора антигенов и сывороток для серологической диагностики хламидиоза сельскохозяйственных животных».

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

Иммуногенную активность изолята «АМК-16» по отношению к производственным штаммам хламидий «250», «РС-85», «Ростиново-70» оценивали на белых мышах живой массой от 16 до 20 г. Лабораторные животные были разделены на 8 групп по 20 мышей в каждой. В начале эксперимента белые мыши 1-4 групп были иммунизированы инактивированной 10%-й суспензией содержащей инактивированный антиген изолята «АМК-16».

Инактивированный антиген животным вводили внутривенно в дозе 0.2 см<sup>3</sup>. Период иммунизации длился 28 суток, на 14 сутки после первой прививки была проведена ревакцинация. Животных 5-8 групп не иммунизировали (контроль).

На 29 сутки после иммунизации было проведено заражение белых мышей 4-мя 10 % суспензиями, приготовленными из 3-х производственных штаммов хламидий («РС-85», «250» и «Ростиново-70») и исследуемого изолята. 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 испытываемой и контрольной группах.

Оценку иммуногенности 3-х производственных штаммов хламидий по отношению к изоляту «АМК-16» оценивали по аналогичной схеме. Отличие заключалось в том, что иммунизацию проводили инактивированными антигенами приготовленными из производственных штаммов, а контрольное заражение производили живой культурой изолята «АМК-16».

**Индекс защиты.** Индекс защиты вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A}{B} \quad 1)$$

Где

X – Индекс защиты;

A – Количество павших животных в контрольной группе;

B – Количество павших животных в иммунизированной группе.

**Молекулярно-генетические исследования.** Видовую принадлежность изолята определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Исследование проводили в ФГБУ «Татарская межрегиональная ветеринарная лаборатория». Инактивацию хламидий проводили путем нагревания биомассы при температуре 60 °С в течение 60 минут. Хламидийную ДНК экстрагировали гуанидинизотиоцианатным методом («Рибосорб» ЦНИИЭМ). В качестве

праймера использовали фрагмент гена OmpI хламидий 5GPF5'-ACGCATGCAAGACACTCCTCAAAGCC-3' и 3GPB5'-ACGAATTCCTAGGTTCTGTAGCGGGAC-3'. Амплификацию участка генома проводили в термоцикле «Терцик».

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. При построении дендрограммы были использованы полногеномные последовательности нуклеотидов следующих штаммов: «6BC» (GenBank № CP002549), «RD1» (GenBank № FQ482149), «WS/RT/E30» (GenBank № NC 018622), «GR9» (GenBank № CP003791), «VS225» (GenBank № NC 018621), «Mat116» (GenBank № CP002744), «Full127» (GenBank № NZ CP033059), «NJ1» (GenBank № CP003798), «WC» (GenBank № NC 018624), «GIMC 2004:CpsAP23» (GenBank № NZ CP024455), «GIMC 2005:CpsCP1» (GenBank № NZ CP024451), «GIMC 2003:Cps25SM» (GenBank № NZ CP024453) и «Rostinivi-70» (GenBank № CP047319).

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

**Оценка антигенной активности экспериментальных серий вакцин, приготовленных из антигенов штаммов хламидий «250», «РС-85» и «АМК-16».** Оценку антигенной активности экспериментальных серий вакцин проводили на морских свинках, путем введения вакцин лабораторным животным и последующей систематической оценкой серологического статуса иммунизированных животных. Вакцины морским свинкам вводили подкожно в дозе 0,2 см<sup>3</sup>, с последующей ревакцинацией в той же дозе через 14 суток. Длительность исследования составила 180 суток, серологические исследования проводились каждые 30 суток.

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

Исследования иммуногенности экспериментальных серий вакцин на белых мышах проводились аналогичным методом, описанным в пункте «**Оценка иммуногенности изолята хламидий «АМК-16»**», отличительной чертой явилось использование экспериментальных серий вакцинных препаратов для иммунизации животных вместо инактивированной суспензии изолята хламидий «АМК-16». Заражение белых мышей проводили штаммами «250», «РС-85» и «АМК-16».

Оценку эффективности экспериментальной серии вакцины из антигена штамма «АМК-16» по отношению к хламидийной полиинфекции, вызванной 3-мя штаммами хламидий («250», «РС-85» и «АМК-16») проводили в остром опыте на кроликах в 6 этапов:

1-й этап включал в себя иммунизацию 5 самок кроликов экспериментальной серией вакцины из штамма «АМК-16» внутримышечно в дозе 0,5 см<sup>3</sup> с последующей ревакцинацией через 14 суток.

На 2-м этапе осуществляли проведение серологических исследований сывороток крови иммунизированных кроликов. Исследования проводили на 7, 14, 30 и 45 сутки после иммунизации и на 7, 14, 30 и 45 сутки после заражения кроликов.

На 3-м этапе, через 30 суток после первичной иммунизации кроликов, животных 2-х групп (опытной 3 головы и контрольной 2 головы) спаривали с самцами.

На 17-19 сутки беременности (4 этап) производили заражение 2-х групп кроликов 10% суспензией, содержащей три производственных гетерологичных штамма хламидий, выделенных от разных видов сельскохозяйственных животных. Инфицирование животных проводили внутрибрюшинно в дозе 1,0 см<sup>3</sup>.

5-й этап включал в себя оценку исхода беременности кроликов двух групп, после заражения.

Заключительный (6-ой) этап включал в себя проведение бактериологических и вирусологических исследований патологических материалов.

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).

#### 4. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Стремительное развитие таких научных дисциплин как микробиология, иммунология и биохимия внесли огромный вклад в понимание причины возникновения различных не управляемых патологических процессов в популяциях сельскохозяйственных животных, содержащихся на определенных, искусственно ограниченных территориях (фермах, комплексах и т.д.). На данный момент выявлено, идентифицировано и в достаточной мере изучено, колоссальное количество патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, вызывающих те или иные патологические процессы у животных, содержащихся на производственных комплексах. Вместе с тем, также разработаны меры борьбы и профилактики большинства известных инфекций, но до сих пор те или иные патогенные микроорганизмы циркулируют в различных искусственно сформированных с производственной целью, группах животных. Важная роль в процессе поиска возникновения причины того или иного инфекционного патологического процесса в животноводческих хозяйствах отводится на долю клинико-эпизоотологических и лабораторно-диагностических мероприятий. С этой целью ранее были обобщены и систематизированы научные данные о физиологических особенностях, а в частности тропизме различных видов патогенных агентов. На основании этих данных удалось объединить в условный перечень возбудителей различных инфекционных заболеваний, вызывающих патологические процессы в тех или иных системах органов животных и за счет этого сократить количество лабораторных исследований.

Достаточно часто патологические процессы, вызываемые различными микробами, и в частности вирусами, не наносят значительного критического ущерба животноводческой сфере. В таких случаях обычно диагностируются сезонно протекающие респираторно-кишечные инфекции, профилактика которых проводится постоянно. Но, помимо бактерий и вирусов, паразитирование которых на макроорганизмах характеризуется определенными

клиническими признаками, существуют не менее опасные патогенные микроорганизмы, способные паразитировать практически во всех органах и тканях пораженного организма и быть при этом не замеченными.

В этом и состоит коварность хламидийной инфекции! В процессе своего «присутствия», в организме пораженных животных, хламидии способны вызывать большое количество патологических процессов в различных системах органов, которые схожи с клиническими признаками наиболее распространенных инфекций и достаточно часто это происходит в ассоциации с ними, что при обнаружении вторых оставляет не идентифицированными хламидии.

Учитывая тот факт, что одним из наиболее колоссальных ущербов, наносимых животноводческой сфере, приходится на долю аборт, то в таких случаях диагностический перечень возможных патогенных агентов расширяется. Поэтому хламидийная инфекция у животных, в подавляющем большинстве случаев, идентифицируется в ходе проведения лабораторных исследований направленных на выявление этиологии аборт, когда исключено присутствие наиболее известных патогенов.

#### **4.1. Клинические особенности течения хламидийной инфекции в козоводческом хозяйстве и выделение нового изолята хламидий**

В 2016 году в одном из козоводческих хозяйств Высокогорского района Республики Татарстан, специализирующемся на разведение коз Зааненской породы, регистрировались аборт неизвестной этиологии. С целью выявления причины данной патологии сотрудниками лаборатории вирусных антропоозоонозов проводились клинко-эпизоотологические исследования в этом производственном комплексе.

Систематическое наблюдение за животными проводили в течение семи месяцев. Наиболее частые эпизоды аборт коз регистрировались в первые два месяца исследования. В первый месяц были выявлены патологические

процессы, связанные с нарушением функции воспроизводства (аборты) у 6 беременных коз. Максимальное количество абортот было зарегистрировано во 2 месяце от начала исследования, их число было равно 8 эпизодам. К 5 месяцу исследования, когда уже была установлена этиологическая причина абортот и применялись специфические меры лечения и профилактики хламидийной инфекции, количество абортот не превышало 1-2 случаев в месяце.

Абортот у коз регистрировали всегда во второй половине срока беременности. Не редко у абортотировавших коз выявляли задержку последа, эндометриты и вагиниты. Помимо этого, также регистрировали следующие клинические признаки: повышение температуры тела до 42 °С, серозно-гнойные выделения из половых органов, исхудание вследствие отказа от корма, вялость (животные преимущественно лежали). Одна коза после абортот пала. Среди всего поголовья коз систематически регистрировались случаи бронхопневмоний и конъюнктивитов.

Достаточно часто наблюдали случаи рождения недоразвитых козлят, некоторые из них погибали на 2-3 сутки после рождения. У выживших козлят регистрировали ярко выраженные клинические признаки бронхопневмоний, конъюнктивитов, артритов и отставания в росте.

В результате проведения клинико-эпизоотологических исследований было установлено, что количество абортот и рождения козлят гипотрофиков составило 9% от общего числа окотившихся коз.

У козлов-производителей выраженных клинических признаков болезни выявлено не было.

Клинико-эпизоотологические и лабораторные исследования проводили совместно с государственной ветеринарной службой Республики Татарстан. Проведенные лабораторные исследования позволили исключить бактериальные и микоплазменные инфекции, такие как: колибактериоз, пастереллез, бруцеллез, сальмонеллез, туберкулез, микоплазмоз, сибирская язва и т.д.

Лабораторные исследования, нацеленные на выяснение этиологической роли хламидий в патологических процессах у коз в исследуемом хозяйстве,

включали в себя проведение серологических исследований сывороток крови, выявление специфического хламидийного антигена в патологическом материале методом РИФ, проведение микроскопических исследований, а также выделение культуры хламидий на развивающихся куриных эмбрионах.

Выборочные серологические исследования проводили в реакции связывания комплемента (РСК). Для этого, были отобраны по 10 проб сывороток крови от животных различных половозрастных групп: козлы производители, козе-матки и козлята в возрасте 2-3 месяцев.

Результаты исследования сывороток крови отобранных животных на наличие в их составе комплементсвязывающих хламидийных антител представлены в таблице 1.

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

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

Как видно из таблицы 1, наибольшее количество положительных проб сывороток крови было выявлено в группе козлов-производителей, скорее всего это связано с тем, что на ферме процесс случки животных производился путем естественного осеменения, вследствие чего данная половозрастная группа животных имела более частые «социальные» контакты с представителями другой половозрастной группы (козы-матки). Также следует учитывать, что количество козлов-производителей в стаде не превышало 10%. В группе коз-маток из 10 исследуемых проб сывороток крови, отобранных от не беременных животных, не имеющих выраженных клинических признаков инфекционной патологии, положительной оказалась одна проба. В третьей половозрастной

группе животных, а именно козлят в возрасте 2-3 месяцев из 10 проб сывороток крови положительными оказались 2 образца. В этой группе животных также отбирались пробы крови от клинически здоровых животных.

Общее количество положительных проб сывороток крови исследуемых животных трех половозрастных групп составило 7 образцов из 30. Процент положительных проб был равен 23%.

Идентификацию хламидий проводили путем микроскопических исследований мазков-отпечатков, приготовленных из пораженных тканей абортированных плодов и павших на 2-3 дневном сроке жизни козлят гипотрофиков. С целью подтверждения результатов микроскопии, в дальнейшем проводили исследования этих же патологических материалов в реакции иммунофлюоресцентного анализа (РИФ).

Изоляцию культуры хламидий проводили путем заражения куриных эмбрионов суспензиями, приготовленными из органов абортированных плодов и недоразвитых козлят.

Результаты микроскопических, иммунофлюоресцентных и вирусологических (выделение патогенна на развивающихся куриных эмбрионах) исследований представлены в таблице 2.

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%

Исходя из результатов исследований, представленных в таблице, нами было установлено, что в 3-х мазках-отпечатках из 4-х, приготовленных из

тканей органов абортированных плодов, были выявлены элементарные тельца хламидий. В мазках-отпечатках, приготовленных из паренхиматозных органов козлят гипотрофиков, удалось идентифицировать хламидии в 2-х препаратах из 4-х. Положительными оказались 5 препаратов из 8. В ходе проведения иммунофлюоресцентных исследований были получены аналогичные результаты, что в процентном соотношении составило 63 %.

В результате инфицирования куриных эмбрионов 10 % суспензией, приготовленной из тканей абортированных плодов и козлят гипотрофиков, удалось выделить культуру хламидий в 2 и 2 случаях соответственно. Далее, адаптация изолята к новой биологической модели (куриные эмбрионы) была подтверждена многочисленными последовательными пассажами.

#### **4.2. Определение инфекционного титра изолята хламидий "АМК-16" на куриных эмбрионах**

После адаптации изолята «АМК-16» к новой биологической модели путем проведения 10 последовательных пассажей на развивающихся куриных эмбрионах, было необходимо установить его инфекционный титр ( $LD_{50}$ ).

Инфекционный титр изолята определяли путем последовательных заражений эмбрионов кур различными концентрациями инфекционного материала. Суспензию для заражения готовили из инфицированных желточных оболочек, которые гомогенизировали и ресуспендировали в 0,15М фосфатно-солевом буфере до 10 %-ной концентрации с добавлением антибиотиков. Получившуюся смесь титровали до конечной концентрации 1:10000000 ( $10^{-7}$ ) путем проведения последовательных 10-кратных разведений.

Куриные эмбрионы инфицировали в желточный мешок, в дозе 0,3 мл, по 10 штук на каждое разведение. Инфицированные эмбрионы инкубировали в термостате при температуре 37-38 °С и относительной влажности 80% в течение 10 суток. На протяжении этого времени эмбрионы овоскопировали по 2 раза в сутки. Специфической считали гибель инфицированного эмбриона,

произошедшую не ранее 4 дня после заражения. Эмбрионы, павшие в первые 3 суток эксперимента, выбраковывались. Хламидийную этиологию гибели куриных эмбрионов, павших на 4-10 сутки, подтверждали микроскопически. Для этого готовили мазки отпечатки, которые в последующем окрашивались по модифицированному методу Стемпа и исследовались под иммерсионной системой светового микроскопа с целью выявления элементарных телец хламидий. При обнаружении однородных мелких красных элементарные телец хламидии на зеленоватом фоне препарата, эмбрион считали павшим от хламидийной инфекции.

В таблице 3 представлены результаты выживаемости куриных эмбрионов после заражения изолятом хламидий «АМК-16». Как видно из таблицы, наивысший процент смертности отмечался в 1 и 2 группах инфицированных КЭ, заражение которых проводилось суспензиями равными разведениям  $1:10$  ( $10^{-1}$ ) и  $1:100$  ( $10^{-2}$ ) соответственно. Начиная с третьей группы (разведение  $10^{-3}$ ) процент гибели куриных эмбрионов начал снижаться. При этом, наиболее информативные данные, позволяющие рассчитать инфекционный титр нового изолята, находились в промежутке между разведениями инфекционного материала, указывающими на показатели смертности выше и ниже 50 %. В нашем случае это разведения  $1:00000$  ( $10^{-5}$ ) и  $1:1000000$  ( $10^{-6}$ ), вызывающие 63 % и 31 % гибели развивающихся куриных эмбрионов, соответственно.

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:

$$\lg LD_{50} = \lg B - \frac{b-50}{b-a} \lg d \quad 2)$$

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).

$$\lg LD_{50} = \lg 10^{-5} - \frac{63-50}{63-31} \lg d = \quad 3)$$

$$= -5 - \frac{13}{32} 1 = -5 - 0,4 = -5,4.$$

Титр в обратных  $\log_{10}$  равен: -5,4

На основании результатов полученных в ходе проведенного исследования и произведенных расчетов, была определена концентрация изолята хламидий «АМК-16» способная вызывать гибель 50 % куриных эмбрионов в дозе 0,3 мл ( $LD_{50}/0,3$ ), равная разведению инфекционного материала  $10^{-5,4}$ . Т.е., другими словами, титр изолята хламидий «АМК-16» равен -  $\lg 10^{5,4} LD_{50}/0,3$  мл.

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

Основной характеристикой новых штаммов микроорганизмов являются их способность вызывать гибель лабораторных моделей и стимулировать выработку специфических антител. Исходя из этих показателей определяется перспектива перевода этих штаммов в производственные или просто коллекционные. Поэтому следующим этапом исследований явилось проведение

сравнительной оценки вирулентных свойств и специфичности тропизма исследуемого изолята и производственных штаммов хламидий, выделенных от разных видов сельскохозяйственных животных. Для этого было необходимо изучить патогенность изолята «АМК-16» для лабораторных животных и сравнить с имеющимися данными аналогичных исследований.

#### **4.3.1. Оценка патогенности изолята «АМК-16» на белых мышах**

Оценку патогенных свойств изолята хламидий «АМК-16» проводили путем постановки биопробы. С целью получения наиболее объективных статистических данных, которые позволили бы провести сравнительный анализ патогенности нового изолята с имеющимися производственными штаммами хламидий депонированных в коллекцию микроорганизмов ФГБНУ «ФЦИРБ-ВНИВИ», было проведено 3 серии опытов. Для каждой серии исследований были отобраны по 60 голов белых мышей (самцы). Из них, по принципу животных-аналогов, были сформированы 3 группы по 20 мышей в каждой. Материал для заражения готовили из инфицированных желточных оболочек куриных эмбрионов на 0,15М фосфатно-солевом буфере с добавлением стрептомицина и гентамицина. Получившейся 10 % суспензией проводили заражение белых мышей. Животных первой группы инфицировали под легким эфирным наркозом интраназальным методом в дозе 0,1 см<sup>3</sup>. Животным второй группы инфекционный материал вводили подкожно в дозе 0,3 см<sup>3</sup>. Заражение третьей группы животных проводили внутрибрюшинным методом в дозе 0,3 см<sup>3</sup>.

На протяжении всего эксперимента животные находились в стандартных условиях кормления и содержания.

Наблюдение за мышами велось на протяжении 14 суток после введения инфекционного материала. В этот промежуток проводили осмотр инфицированных животных и фиксировали даты гибели. Хламидийную этиологию гибели подтверждали микроскопически. Для этого, из пораженных

органов, павших после заражения белых мышей, делали мазки отпечатки, которые окрашивались по модифицированному методу Стемпа и исследовались под иммерсионной системой светового микроскопа.

Реизоляцию культуры хламидий «АМК-16» проводили на развивающихся куриных эмбрионах. Для этого, из пораженных органов, в тканях которых были обнаружены хламидии, готовили суспензии для заражения. С этой целью кусочки инфицированных органов гомогенизировали и доводили до 10 % концентрации 0,15М фосфатно-солевым буфером с добавлением антибиотиков. Заражение куриных эмбрионов проводили в желточный мешок. Специфической, считали гибель куриных эмбрионов, произошедшую не ранее 4 суток после заражения.

В таблице 4 представлены результаты 3-х серий опытов изучения патогенных свойств изолята «АМК-16» на белых мышах.

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

№	Серия исследований	Способ заражения	Штамм для заражения	Кол-во павших животных (пало/ всего)	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%

Наибольший процент гибели белых мышей наблюдали в группах инфицированных интраназальным методом. В ходе постановки 3-х серий опытов все экспериментально зараженные белые мыши пали в промежутках со вторых по седьмые сутки исследований. Процент смертности лабораторных моделей в этих группах составил 100 %. На протяжении всего срока наблюдения за инфицированными животными этих групп нами были отмечены следующие клинические признаки экспериментальной хламидийной инфекции, которые характеризовались малоподвижностью, взъерошенностью шерстного покрова, слезотечением и одышкой.

В группах животных, экспериментальное заражение которых проводили путем внутрибрюшинной инъекции, специфический падеж, в среднем, составил 71,6 %. Смертность животных в этих группах, на протяжении всех 3-х серий опытов варьировалась в пределах 14-15 особей. У животных этой группы также наблюдали выраженные клинические признаки ухудшения состояния здоровья, такие как малоподвижность, слезотечение, шерсть потеряла блеск и была взъерошена.

Самый низкий процент гибели лабораторных животных наблюдали в группах белых мышей, инфицирование которых проводили путем введения инфекционного материала подкожно. Специфическая гибель животных в этих группах составила 28,3 %. У животных этой группы также наблюдались аналогичные клинические проявления хламидийной инфекции, как у животных первой и второй групп.

На рисунке 5 представлены средние значения выживаемости белых мышей при различных способах инфицирования изолятом «АМК-16».

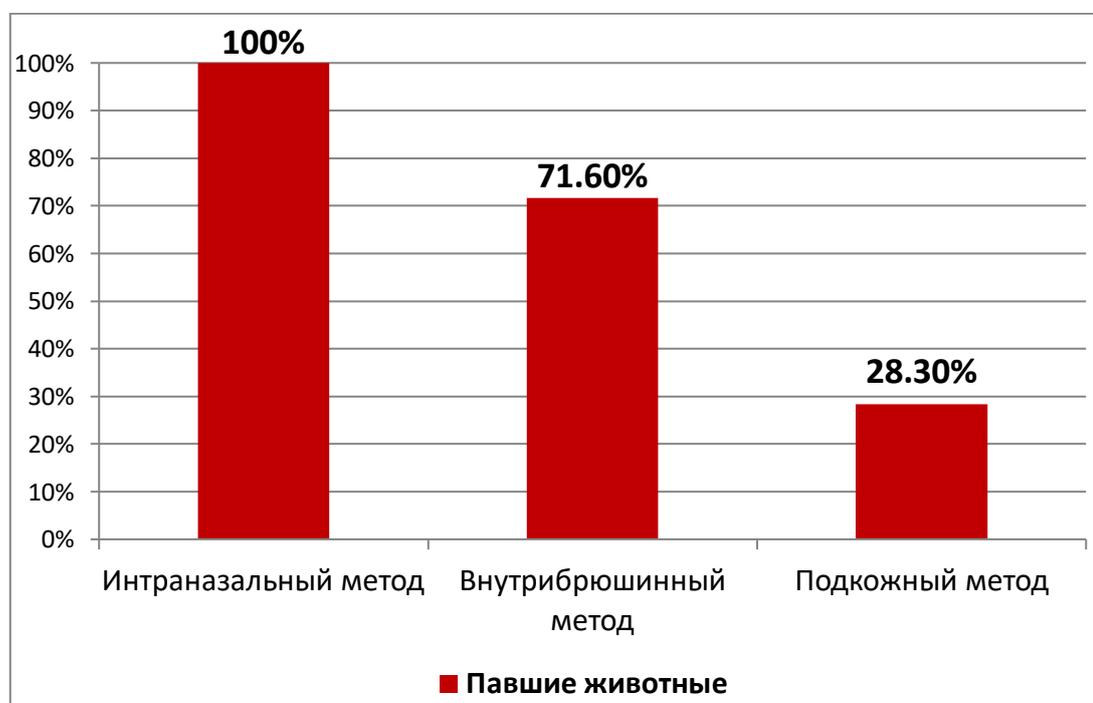


Рисунок 5 – Средний процент гибели белых мышей после заражения изолятам «АМК-16».

Исходя из полученных данных, нами было установлено, что изолят хламидий «АМК-16» является патогенным для белых мышей и его вирулентность коррелируется со способом инфицирования биологических моделей. Так нами было доказано, что исследуемый изолят вызывает 100 % гибель при интраназальном способе заражения, 71,6 % – при внутрибрюшинном и 28,3 % – при подкожном способе инфицирования (Рисунок 2).

**Сравнительный анализ** патогенных свойств изолята «АМК-16» и штаммов, депонированных в коллекцию микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», проводили путем сопоставления средних процентов гибели лабораторных моделей при различных способах инфицирования производственными штаммами и изолятом «АМК-16». В таблице 5 отражены результаты исследований, проведенных в 2015 году Евстифеевым В.В., согласно требованиям, предъявляемым к производителям биопрепаратов (Указание Главного госинспектора РФ №22-7/443 от 08.05.92 г. «О порядке выдачи разрешения на право выпуска ветеринарных препаратов и аттестации предприятия») и в связи с аттестацией производства выпускаемых ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» биологических препаратов по приказу директора ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» №98-к от 13.04.2007 г [19].

В таблице первые шесть позиций представлены производственными штаммами хламидий, которые депонированы в коллекцию микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 7-ая позиция отражает результаты исследований патогенных свойств нового изолята хламидий «АМК-16».

Таблица 5 – Результаты исследований патогенности штаммов хламидий на белых мышах.

№ п.п.	Наименование штамма	Средний % гибели белых мышей при заражении		
		в/б	и/н	п/к
1	Ростиново-70	64±0,7	78±0,3	34±0,4
2	250	80±0,9	97±0,2	34±0,4
3	РС-85	73±0,2	57±0,2	54±0,3
4	ЛС-87	34±0,3	73±0,2	31±0,4
5	СК-89	85±0,4	91±0,3	45±0,5
6	МЗ-89	67±0,3	69±0,5	45±0,5
7	АМК-16	71,6±0,4	100±0	28,3±2

Из таблицы видно, что при подкожном способе инфицирования схожий, с новым изолятом, относительно низкий процент смертности имеют 3 производственных штамма: «Ростиново-70» (34 %), «250» (34 %) и «ЛС-87» (31 %). При внутрибрюшинным способе инфицирования наиболее схожие характеристики имеют вакцинные штаммы «РС-85» (73 %) и «МЗ-89» (67 %). При интраназальном методе заражения достаточно близкий процент летальности имеет вакцинный штамм «250» (97 %). По сочетанию всех своих характеристик вирулентности для белых мышей изолят хламидий «АМК-16» отличается от производственных штаммов хламидий, депонированных в коллекцию микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ.

#### 4.3.2. Оценка патогенности изолята «АМК-16» на морских свинках

Определение патогенности изолята хламидий на морских свинках также проводили в 3-х сериях опытов. Для каждой серии опытов были отобраны по 8 морских свинок. Из них были сформированы две группы по 4 особи. Инфицирование животных проводили 10 % суспензией приготовленной из желточных оболочек павших куриных эмбрионов вследствие заражения изолятом хламидий «АМК-16».

Животных первой группы заражали интраназально под легким эфирным наркозом в дозе 0,1 см<sup>3</sup>. Заражение второй группы морских свинок производили внутрибрюшинным методом в дозе 0,4 см<sup>3</sup>. Наблюдение за животными велось в течение 30 суток после введения инфекционного материала. В этот период проводили ежедневные клинические осмотры морских свинок и фиксировали падеж животных. Этиологию гибели подтверждали микроскопическими исследованиями пораженных органов павших животных и реизоляцией хламидий на развивающихся куриных эмбрионах.

В таблице 6 отражены результаты экспериментального заражения морских свинок изолятом хламидий «АМК-16».

Таблица 6 – Выживаемость морских свинок после заражения изолятом «АМК-16»

Серия опытов	Способ инфицирования	Количество павших животных	Процент павших животных
1 серия	интраназальный	1/4	25%
	внутрибрюшинный	0/4	Переболели
2 серия	интраназальный	1/4	25%
	внутрибрюшинный	0/4	Переболели
3 серия	интраназальный	1/4	25%
	внутрибрюшинный	0/4	Переболели

Во всех группах инфицированных животных, заражение которых проводили интраназальным методом, наблюдали по 1 эпизоду гибели морских свинок в интервале с 12 по 15 сутки после заражения. В этот период у всех представителей данной группы выявляли симптомы, специфичные для экспериментальной хламидийной инфекции у данного вида животных, которые

характеризовались взъерошенностью шерстного покрова, слезотечениями из глаз, отказом от корма, повышением температуры тела в среднем на 2 °С, гнойными истечениями из носовой полости и одышкой.

В группах морских свинок, зараженных путем введения инфекционного материала в брюшную полость, на протяжении 30 дневного срока исследования специфического падежа животных не наблюдали. В этот период у всех представителей группы, зараженных внутрибрюшинно морских свинок, выявляли аналогичные с первой группой симптомы, за исключением одышки.

На рисунке 6 представлены данные выживаемости морских свинок после экспериментального заражения изолятом «АМК-16».

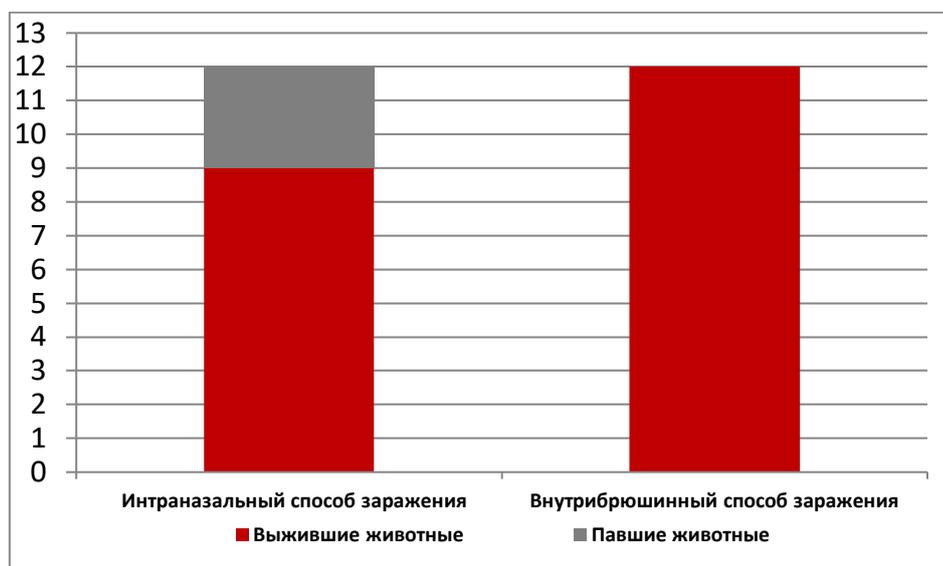


Рисунок 6 – выживаемость морских свинок после инфицирования изолятом хламидий «АМК-16»

Средний процент гибели морских свинок в группах инфицированных интраназальным методом составил 25 %, из 12 исследуемых животных к 30 суткам исследования в живых остались 9 особей. В группах морских свинок, заражение которых проводили внутрибрюшинно, специфического падежа не наблюдали, к концу эксперимента в живых остались 12 морских свинок из 12.

При проведении вскрытия подопытных животных, проводимого по мере их падежа, нами были обнаружены очаговые поражения легких, дряблость печени, увеличение сердца, почек и селезенки. В мазках-отпечатках,

приготовленных из пораженных органов морских свинок, выявлялись элементарные тельца хламидий, что свидетельствовало о специфической гибели животных от развития хламидийной инфекции.

Проведенные исследования показали, что изолят «АМК-16» является патогенным для морских свинок. Наиболее патогенным оказался интраназальный способ инфицирования вызвавшей гибель 25 % зараженных животных. Клинические признаки экспериментальной хламидийной инфекции наблюдали у лабораторных животных всех групп. Хламидийная этиология их проявления была подтверждена лабораторными исследованиями.

В таблице 7 представлены результаты выживаемости морских свинок после заражения производственными штаммами хламидий и изолятом «АМК-16».

Первые шесть позиций отражают результаты аналогичных исследований патогенных свойств производственных штаммов хламидий проведенных Евстифеевым В.В. в 2015 [19], седьмая позиция отражает результаты исследований нового изолята хламидий «АМК-16».

Таблица 7 – Результаты исследований патогенности и вирулентности штаммов хламидий на морских свинках.

Наименование штамма	Средний % гибели морских свинок при заражении	
	в/б	и/н
Ростиново-70	47±0,6	45±0,5
250	Переболел	Переболел
РС-85	Переболел	Переболел
ЛС-87	Переболел	25±0,2
СК-89	45±0,5	45±0,5
МЗ-89	Переболел	Переболел
АМК-16	Переболел	25±0

Как видно из таблицы, ранее аналогичную картину эксперимента на морских свинках наблюдали при изучении патогенных свойств вакцинного штамма «ЛС-87», выделенного от свиней. Как и в нашем случае, при внутрибрюшинном способе заражения, специфического падежа животных не наблюдали, а смертность в результате интраназального способа инфицирования морских свинок составила 25 %. Однако результаты исследований патогенности штамма «ЛС-87» на белых мышах кардинально отличались от результатов, полученных в ходе проведения аналогичных исследований изолята «АМК-16», что позволяет считать данный штамм уникальным.

#### **4.3.3. Оценка антигенной активности изолята хламидий «АМК-16» на лабораторных животных**

Оценку антигенной активности изолята «АМК-16» проводили с использованием двух биологических моделей: морские свинки и кролики. На первом этапе проводили серологические исследования сывороток крови морских свинок.

На 30 сутки после заражения морских свинок двумя способами (интраназально, внутрибрюшинно) описанными в главе 3.3.2. у всех выживших животных был произведен забор крови. Оценку наличия специфических комплементсвязывающих хламидийных антител в сыворотках крови осуществляли в реакции связывания комплемента (РСК).

Для проведения статистической оценки гуморального статуса инфицированных животных из каждой серии опытов по оценке патогенности изолята «АМК-16» на морских свинках нами были отобраны по 2 пробы сывороток крови с самыми высокими и самыми низкими титрами из групп животных, инфицированных интраназальным и внутрибрюшинным методом.

Результаты серологических исследований сыворотки крови морских свинок представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты серологических исследований крови морских свинок.

Номер жив-го	Группа	Метод заражения	Тип суспензии	Титр антител в РСК	Средний титр
1	1 группа	Интраназальный	Живая	1:10	1:21
2				1:20	
3				1:20	
4				1:20	
5				1:40	
6				1:20	
7	2 группа	Внутрибрюшинный	Живая	1:20	1:16
8				1:10	
9				1:20	
10				1:20	
11				1:10	
12				1:20	
13	3 группа	Интраназальный	Инактивированная	1:5	1:5
14				1:5	
15				-	
16				1:5	
17				1:10	
18				1:5	
19	4 группа	Внутрибрюшинный	Инактивированная	1:10	1:13
20				1:20	
21				1:10	
22				1:10	
23				1:10	
24				1:20	

Как видно из таблицы, на 30 сутки после заражения в 1 группе морских свинок, инфицированных интраназальным методом, титры хламидийных комплементсвязывающих антител варьировались в пределах от 1:10 до 1:40. Средний титр был равен показателю 1:21.

Во второй группе морских свинок, инфицированных путем внутрибрюшинной инъекции 10 % суспензии изолята «АМК-16», титры антител в РСК варьировались в пределах 1:10 – 1:20, средний титр специфических хламидийных антител на 30 день после заражения был равен 1:16.

В двух группах морских свинок, инфицированных разными методами, титры хламидийных антител находились выше диагностического титра (1:10).

Оценку антигенной активности инактивированного антигена изолята «АМК-16» проводили на 12 морских свинках, которые были разделены на 2 группы по 6 особей (3 и 4 группы в таблице 8). Для экспериментальной иммунизации животных готовили 10 % суспензию из желточных оболочек павших куриных эмбрионов на 0,15М фосфатно-солевом буфере. Для удаления балластных веществ проводили центрифугирование при 3000 оборотов на протяжении 20 минут. Инактивацию инфекционного материала проводили формалином в конечной концентрации 0,2 % с 24 часовой экспозицией при 4 °С. В последующем, для очистки антигена от формалина, его центрифугировали при 5000 об/мин в течение 30 минут, далее осажденный антиген ресуспендировали 0,15М фосфатно-солевым буфером до 10 % концентрации. Антиген вводили морским свинкам 3-ей группы интраназально, под легким эфирным наркозом, в дозе 0,1 см<sup>3</sup>, 2 раза с интервалом в 14 суток. Последней группе морских свинок (4 группа) антиген вводили посредством внутрибрюшинной инъекции в дозе 0,4 см<sup>3</sup>, также 2 раза с интервалом в 14 суток. На 30 сутки исследования производили забор крови. В дальнейшем сыворотку исследовали в реакции связывания комплемента с целью обнаружения комплементсвязывающих хламидийных антител.

Результаты серологических исследований сыворотки крови морских свинок, иммунизированных инактивированным антигеном «АМК-16», представлены в таблице 8.

Как видно из таблицы, у пяти животных из шести 3 группы морских свинок титры специфических хламидийных антител варьировались в пределах 1:5 – 1:10, у одного животного через 30 суток после введения антигена специфических хламидийных антител в крови выявлено не было. Средний титр в этой группе был равен показателю 1:5.

В 4 группе морских свинок введение антигена которым производили посредством внутрибрюшинной инъекции концентрация

комплементсвязывающих антител варьировалась в пределах показателей 1:10-1:20. Средний титр в этой группе иммунизированных мышей равнялся титру 1:13.

Так нами было установлено, что введение живой культуры хламидий «АМК-16», а также инактивированного антигена этого изолята вызывает выработку комплементсвязывающих хламидийных антител у морских свинок. Наиболее высокий уровень специфических хламидийных антител был выявлен у животных, инфицированных интраназальным методом, в этой группе животных также наблюдали наиболее ярко выраженные клинические проявления экспериментальной хламидийной инфекции, некоторые из которых завершились летальным исходом для инфицированных морских свинок. В группах животных, заражение которых производили посредством внутрибрюшинной инъекции, титры хламидийных антител были несколько ниже, чем в группах инфицированных интраназальным методом, но все равно были выше диагностического титра. В группах животных, которым вводили инактивированный антиген, также наблюдали ответную иммунную реакцию. В группе морских свинок, иммунизацию которых проводили внутрибрюшинным методом, уровень комплементсвязывающих антител был в пределах диагностического титра. Наименее эффективным оказался способ иммунизации морских свинок интраназальным методом, уровень концентрации специфических хламидийных антител в этом случае не превысил показателя 1:5.

Помимо морских свинок, также проводили исследования на двух кроликах. Для этого животных сначала инфицировали живой культурой изолята «АМК-16», а в последующем исследовали сыворотки крови в РСК с целью выявления специфических антител. Заражение производили 10 % суспензией, приготовленной из желточных оболочек инфицированных куриных эмбрионов внутрибрюшинным методом в дозе 0,5 см<sup>3</sup>. Наблюдение за кроликами велось на протяжении 42 суток (6 недель). В этот период у инфицированных животных наблюдали повышение температуры тела в

среднем на 2 градуса, к 30 суткам исследования температура плавно пришла в пределы нормы. Также у зараженных животных наблюдали серозные истечения из носа, а у одного кролика одышку. Серологические исследования проводили на 30 и 42 сутки с момента инфицирования. Для этого из ушной краевой вены производили забор крови, сыворотку которой исследовали в реакции связывания комплемента с целью обнаружения специфических комплементсвязывающих антител.

На 30 сутки исследования концентрация специфических хламидийных антител в сыворотке крови двух кроликов, зараженных изолятом «АМК-16», была равна показателям 1:40 и 1:20 соответственно.

К 42 суткам исследований концентрация титров комплементсвязывающих хламидийных антител у первого кролика снизилась до титра 1:20, у второго кролика осталась на том же уровне.

Результаты серологических исследований показали, что изолят хламидий «АМК-16» вызывает выработку специфических хламидийных антител у морских свинок и кроликов. Исследования на морских свинках с их заражением и последующей оценкой серологического статуса показали, что у животных, инфицированных интраназальным методом, при котором у животных было отмечено наиболее острое течение, экспериментальной хламидийной инфекции также наблюдались наиболее высокие показатели уровня концентрации комплементсвязывающих хламидийных антител в сыворотке крови. Исследование на кроликах также подтвердило, что инфицирование лабораторных животных патогенным изолятом «АМК-16» вызывает выработку у них специфических хламидийных антител.

#### **4.4. Изучение иммуногенности изолята хламидий «АМК-16»**

Иммуногенные свойства изолята хламидий «АМК-16» исследовали на белых мышах. Для этого были отобраны 160 белых мышей. Из них были сформированы 8 групп по 20 особей в каждой. На первом этапе исследования

проводили иммунизацию мышей 1, 2, 3 и 4 групп инактивированной 10% суспензией. Суспензию готовили из инфицированных желточных оболочек, инактивацию проводили формалином в конечной концентрации 0,2% в течение 24 часов. Очистку элементарных телец хламидий осуществляли центрифугированием и последующим ресуспендированием осадка содержащего хламидии 0,15М фосфатно-солевым буфером. Иммунизацию белых мышей проводили путем внутрибрюшинной инъекции инактивированной суспензии в дозе 0,3 см<sup>3</sup>. Через 14 суток после первой прививки проводили ревакцинацию. Иммунитет у животных вырабатывался в течение одного месяца. По истечению этого срока проводили экспериментальное заражение животных всех групп тремя различными производственными штаммами хламидий и изолятом «АМК-16». Каждым штаммом было заражено 2 группы мышей, вакцинированные и контрольные:

- группы 1 (вакцинированные) и 5 (интактные) были заражены изолятом *C.psittaci* «АМК-16», с инфекционным титром -  $10^{-5,4}LD_{50}/0,3$  ml, выделенного из патологического материала абортировавшей козы;

- группы 2 и 6 - вакцинный штамм *C.psittaci* «РС-85», с инфекционным титром -  $10^{-6,5}LD_{50}/0,3$  ml, выделенный из патологического материала абортированного плода свиньи;

- группы 3 и 7 - вакцинный штамм *C.psittaci* «250», с инфекционным титром -  $10^{-6,5}LD_{50}/0,3$  ml, выделенный из патологического материала абортированного плода коровы;

- группы 4 и 8 - производственный штамм *C.psittaci* "Ростиново-70", с инфекционным титром -  $10^{-7,5}LD_{50}/0,3$  ml, выделенный из патологического материала абортированного плода овцы;

Для заражения из инфицированных желточных оболочек павших КЭ последнего пассажа каждого штамма хламидий готовили 10 % суспензии. Каждым штаммом заражали по 2 группы белых мышей: опытную (иммунизированную) и контрольную. Заражение производили внутрибрюшинно, в дозе 0,2 см<sup>3</sup>. Наблюдение за животными проводили в

течение 12 суток после инфицирования. В этот период велось ежедневное наблюдение за экспериментально зараженными животными, падеж фиксировали. Способность изолята «АМК-16» вызывать выработку иммунитета к хламидийным инфекциям, вызванными различными штаммами хламидий оценивали путем проведения сравнительного анализа количественного показателя выживших животных в опытной и контрольной группах.

На рисунке 7 представлены результаты выживаемости белых мышей в 1 (иммунизированной) и 5 (контрольной) группах после заражения изолятом хламидий «АМК-16».

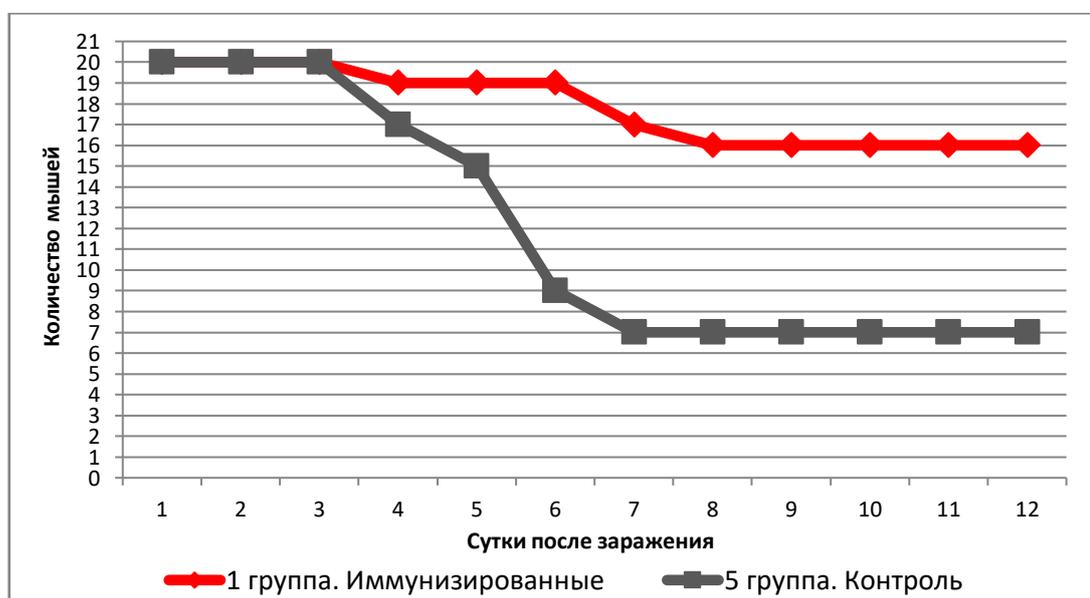


Рисунок 7 – Выживаемость белых мышей после заражения изолятом хламидий «АМК-16»

В первой группе белых мышей иммунизированных антигеном изолята хламидий «АМК-16» и в последующем зараженных живой культурой этого изолята, процент выживших животных составил 80 %. В промежутке с третьего по восьмой день исследования пали 4 белые мыши. В живых остались 16 особей из 20. В группе не иммунизированных белых мышей (5 группа) в промежутке с 3 по 7 сутки пало 13 мышей из 20, процент выживших животных не превысил 35 %. Индекс защиты составил 3,2.

На рисунке 8 представлены результаты выживаемости белых мышей 2 (иммунизированной) и 6 (контрольной) групп после заражения вакцинным штаммом *Chl. Psittaci* «РС-85».

Во второй группе белых мышей иммунизированных антигеном изолята «АМК-16» и в последующем инфицированных живой культурой производственного штамма хламидий «РС-85», выделенного от свиней, процент выживших животных был чуть ниже и составил 70 %. В промежутке с четвертого по девятый день от хламидийной инфекции пали 6 белых мышей. В живых остались 14 особей из 20. В контрольной группе, не иммунизированных животных, в промежутке с третьего по 10 сутки скончались 14 белых мышей, а процент выживших животных составил всего 30%. Индекс защиты в этой группе иммунизированных животных ровнялся 2,3

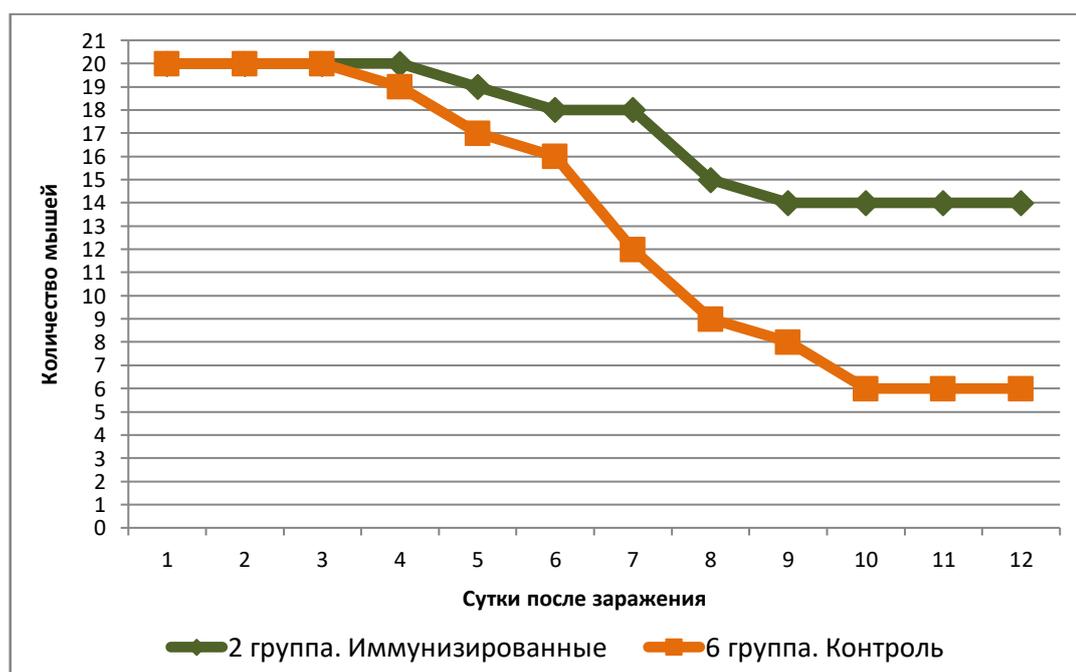


Рисунок 8 – Выживаемость белых мышей после заражения вакцинным штаммом хламидий «РС-85»

На рисунке 9 представлены результаты выживаемости белых мышей 3 (иммунизированной) и 7 (контрольной) групп после заражения вакцинным штаммом хламидий «250» выделенного от крупного рогатого скота.

В третьей группе мышей, иммунизированных антигеном изолята «АМК-16» и в последующем экспериментально зараженных живой культурой штамма хламидий «250» наблюдали наиболее низкий процент выживаемости. В промежутке с пятого по девятые сутки эксперимента от хламидийной инфекции пало 8 белых мышей. Процент выживших животных в иммунизированной группе составил всего 60 %. В контрольной группе процент выживших животных составил только 25 %. В промежутке с 3 по десятые сутки пали 15 белых мышей из 20. Индекс защиты составил 1,8.

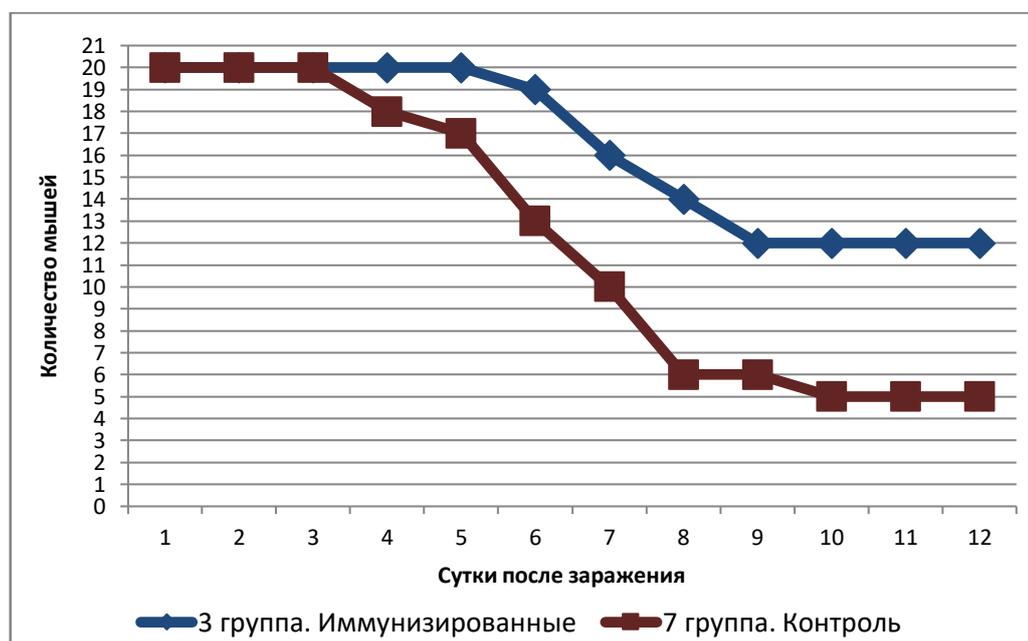


Рисунок 9 – Выживаемость белых мышей после заражения вакцинным штаммом хламидий «250».

На рисунке 10 представлены результаты выживаемости белых мышей 4 (иммунизированной) и 8 (контрольной) групп после заражения производственным штаммом хламидий «Ростиново-70», выделенного от овец.

В четвертой группе мышей иммунизированных антигеном изолята «АМК-16» и в последующем инфицированных производственным штаммом хламидий «Ростиново-70» на девятые сутки эксперимента в живых осталось 15 животных. Процент выживших по группе составил 75 %. В контрольной группе животных, после экспериментального заражения, в промежутке со второго по

седьмой день скончались 12 белых мышей. Процент выживших животных составил 40 %. Индекс защиты составил 2,4.

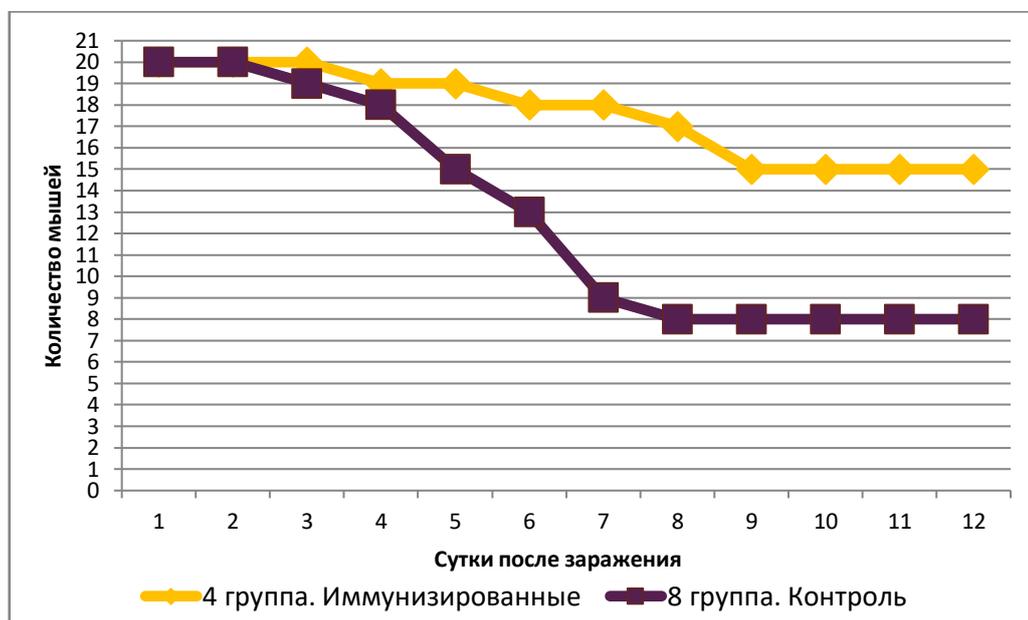


Рисунок 10 – Выживаемость белых мышей после заражения производственным штаммом хламидий «Ростиново-70».

В таблице 8 представлены показатели индекса защиты иммунизированных животных после заражения производственными штаммами хламидий и изолятом «АМК-16».

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 группа	«АМК-16»	«АМК-16»	4/20	20%	3,2
5 группа	-		13/20	65%	
2 группа	«АМК-16»	«РС-85»	6/20	30%	2,3
6 группа	-		14/20	70%	
3 группа	«АМК-16»	«250»	8/20	40%	1,8
7 группа	-		15/20	75%	
4 группа	«АМК-16»	«Ростиново-70»	5/20	25%	2,4
8 группа	-		12/20	60%	
Средний индекс защиты по всем группам					2,4
Средний индекс защиты в группах зараженных производственными штаммами					2,1

Как видно из таблицы 8 наиболее высокий индекс защиты был зафиксирован в группе животных иммунизированной антигеном «АМК-16» и зараженной этим же изолятом. В этом случае этот показатель был равен 3,2. В группах иммунизированных белых мышей, зараженных производственными штаммами хламидий, этот показатель был несколько ниже. Так в группах, заражение которых проводили культурами штаммов «Ростиново-70» и «РС-85» индекс защиты был равен 2,3 и 2,4 соответственно. Наиболее низкий индекс защиты был выявлен в группе иммунизированных мышей инфицированных вакцинным штаммом «250», в этой группе данный показатель был равен 1,8. Средний показатель индекса защиты по всем группам составил 2,4, а в группах зараженных только производственными штаммами 2,1.

Далее необходимо было сравнить способность антигенов некоторых производственных штаммов, депонированных в коллекции микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», вызывать выработку иммунитета к хламидийной инфекции вызываемой изолятом «АМК-16».

Исследование проводили по аналогичной схеме. Из белых мышей были сформированы 4 группы по 20 особей. 1, 2 и 3 группы мышей иммунизировали 10% инактивированными суспензиями, каждая из которых была приготовлена из одного из следующих штаммов: «РС-85», «250» и «Ростиново-70». Иммунизацию проводили двукратно с интервалом 14 суток внутривнутрино в дозе 0,3 мл. Через месяц после первой прививки проводили заражение всех групп белых мышей 10% суспензией живой культуры изолята «АМК-16». Наблюдение за мышами велось в течение 12 суток.

Результаты выживаемости белых мышей после иммунизации и экспериментального заражения представлены в таблице 9.

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

Группа	Штамм для иммуни-зации	Штамм для заражения	Кол-во выживших животных	Процент выжи-вших животных	Индекс защиты
Иммунизированные	«РС-85»	«АМК-16»	10/20	50%	1,4
Иммунизированные	«250»		11/20	55%	1,5
Иммунизированные	«Ростиново-70»		14/20	70%	2,3
Контроль	-		6/20	30%	-
Средний показатель индекса защиты в группах иммунизированных производственными штаммами					1,7

В первой группе мышей иммунизированных антигеном штамма «РС-85» после заражения в живых остались 10 белых мышей из 20. Процент

выживших животных составил 50 %. Во второй группе животных, иммунизацию которых проводили антигенным штаммом «250» после заражения в живых остались 11 белых мышей из 20. В третьей группе мышей иммунизированных антигеном штамма «Ростиново-70» наблюдали наиболее высокий процент выживших животных равный 70 %.

Наиболее высокий индекс защиты был выявлен в группе белых мышей, иммунизированных производственным штаммом «Ростиново-70», выделенного от овец, в этой группе этот показатель был равен 2,3. В группах иммунизированных штаммами «РС-85», выделенного от свиней, и «250», выделенного от крупного рогатого скота данный показатель был равен 1,4 и 1,5 соответственно. Средний показатель индекса защиты в группах иммунизированных производственными штаммами был равен 1,7.

Исходя из этого, нами было установлено, что антиген изолята хламидий «АМК-16» вызывает выработку иммунитета у белых мышей к хламидийным инфекциям. Средний индекс защиты в группах животных иммунизированных изолятом «АМК-16» и в последующем инфицированных производственными штаммами хламидий составил 2,1. В группах мышей иммунизированных этими же производственными штаммами и инфицированными живой культурой изолята «АМК-16» средний индекс защиты оказался ниже и был равен 1,7. Это указывает на различие в антигенной структуре производственных штаммов и изолята хламидий «АМК-16».

Таким образом, установлено, что наибольший процент гомологии у штамма «АМК-16» наблюдался со штаммом «Ростиново-70», а со штаммами «250» и «РС-85» установлен наименьший процент антигенной гомологии, что говорит о различии в антигенной структуре этих двух штаммов со штаммом «АМК-16» и определяет целесообразность их совместного использования в составе вакцины с целью расширения антигенного спектра препарата.

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

Проведенные исследования по изучению иммунобиологических свойств выделенного штамма АМК показали, что он является патогенным для лабораторных животных (белые мыши, морские свинки, кролики), вызывает выработку специфических хламидийных антител у иммунизированных животных и обладает выраженной иммуногенной активностью. Инфекционная активность штамма «АМК-16» для развивающихся куриных эмбрионов равна  $10^{-5,4}LD_{50}/0,3 \text{ ml}$ . Это послужило предпосылкой для его дальнейшего депонирования в коллекцию микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

Для этого было необходимо провести исследования на стерильность штамма, установить возможность его систематического пассирования на развивающихся куриных эмбрионах, установить его видовую принадлежность, разработать СТО, лиофилизировать и передать для хранения.

Результаты исследования штамма на стерильность показали, что суспензии штамма «АМК-16» не дают роста на питательных средах МПА, МПБ, МППБ и Сабуро на протяжении 14 дней после внесения исследуемого материала, что свидетельствует об отсутствии его контаминации бактериальной, грибковой и микоплазменной микрофлорой.

Установлено, что штамм системно пассируется на развивающихся куриных эмбрионах со значительным выходом хламидийной биомассы.

Видовая принадлежность штамма «АМК-16» была определена методом ПЦР с видоспецифичными праймерами, что позднее было подтверждено полногеномным секвенированием.

По результатам ПЦР было установлено, что изолят хламидий «АМК-16» относится к семейству Chlamydiaceae, роду Chlamydia, виду *C. psittaci* (Приложение 1).

Идентифицирована и депонирована в GenBank полная последовательность генома (GenBank №CP047319). Секвенирование генома

проводилось с использованием оборудования 2-го и 3-го поколения секвенирования, а именно на платформах Illumina HiSeq 2500 и Oxford Nanopore MinION. Анализ сборки генома позволил выявить хромосому длиной 1152497 п.н. Помимо генома удалось секвенировать кольцевую криптическую плазмиду длиной 7552 п.н. (GenBank № CP047320.1) (Приложение 2).

Результаты филогенетического анализа представлены на рисунке 11.

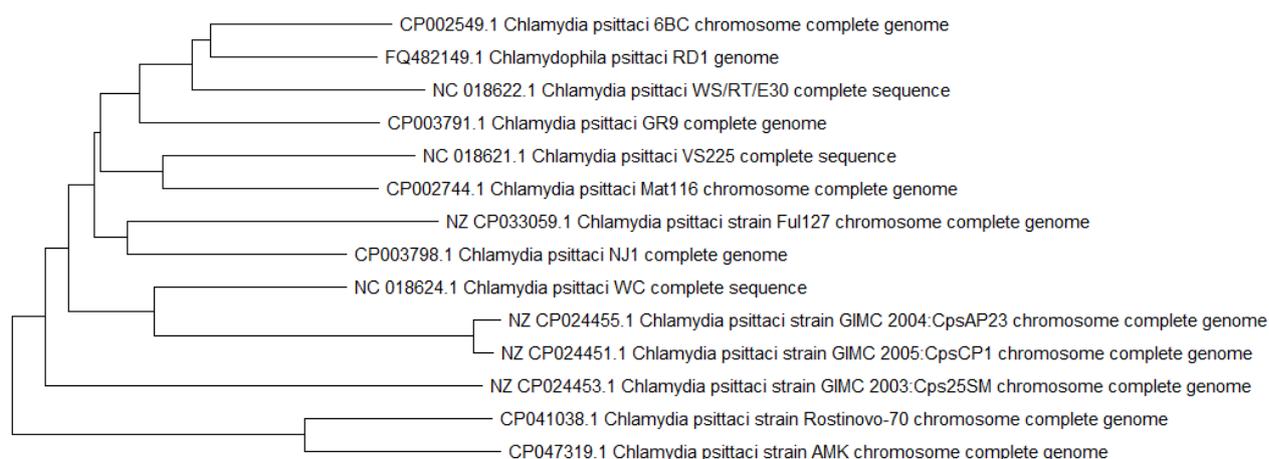


Рисунок 11 – Дендрограмма, построенная на основе анализа нуклеотидных последовательностей геномов 13 штаммов *C. psittaci*, депонированных в базу данных GenBank, и штамма «АМК-16»

Как видно из рисунка 11 штамм «АМК-16» входит в отдельный кластер от 12 штаммов хламидий. Штамм «Ростинова-70» объединен в одну кладу со штаммом «АМК-16». Гомология между данными штаммами составляет 99,98%. Штамм «Ростинова-70» был выделен от овец, около 50-ти лет назад, в том же регионе, где был изолирован штамм «АМК-16».

Гомология плазмиды штамма «АМК-16» и эталонной плазмиды рода *C.psittaci* «рСрА1» 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 (Приложение 3).

Разработанный стандарт включает в себя характеристику штамма «АМК-16», технические требования к помещению и оборудованию для хранения и поддержания штамма, требования безопасности при работе со штаммом, правила хранения и работы с инфекционным материалом, методы испытания, правила приемки, необходимые условия для хранения штамма и его транспортировки.

Соответствие штамма хламидий «АМК-16» «Стандарту ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» штамм хламидий «АМК-16» – возбудитель аборта коз» СТО 00492374-001-2021 было подтверждено проведением комиссионного испытания. Характеристики показателей внешнего вида, наличия посторонних примесей, плесени, трещин флаконов, нарушения укупорки, контаминации бактериями и грибами, активность и специфичность соответствовали требованиям СТО 00492374-001-2021 (Приложение 4).

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 (Приложение 5, 6).

#### **4.6. Оценка антигенной и иммуногенной активности экспериментальной серии вакцины на основе антигена штамма «АМК-16»**

Оценка эффективности любых вакцинных препаратов включает в себя проведение комплекса лабораторных исследований, включающих оценку антигенной активности и иммуногенности вакцины на различных лабораторных биологических моделях.

#### **4.6.1. 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 по 4 особи. Иммунизацию животных проводили тремя вакцинными препаратами:

- 1 экспериментальная серия вакцины приготовленная из антигена штамма *C.psittaci* «250», выделенного от крупного рогатого скота с инфекционным титром  $-10^{-6,5}LD_{50}/0,3$  ml;

- 2 экспериментальная серия вакцины приготовленная из антигена штамма *C.psittaci* «РС-85», выделенного от свиней, с инфекционным титром  $-10^{-6,5}LD_{50}/0,3$  ml;

- 3 экспериментальная серия вакцины приготовленная из антигена штамма *C.psittaci* «АМК-16», выделенного от коз, с инфекционным титром  $-10^{-5,4}LD_{50}/0,3$  ml.

Антигены для вакцин готовили из желточных оболочек куриных эмбрионов, инфицированных определенными штаммами хламидий. Желточные оболочки гомогенизировали и ресуспендировали фосфатно-солевым буфером до 10 % концентрации. Балластные вещества удаляли путем центрифугирования при 3000 об/мин. С целью инактивации хламидий, получившуюся надосадочную жидкость обрабатывали раствором формалина до конечной концентрации 0,2 % и выдерживали в термостате при 37 °С в течение 48 часов. Далее, получившуюся инактивированную 10 % суспензию хламидий каждого штамма центрифугировали при 18000 об/мин в течение 2 часов, с целью осаждения хламидийной биомассы. Осадок хламидий ресуспендировали фосфатно-солевым буфером до 10 % концентрации.

В дальнейшем из получившихся антигенов готовили вакцинные препараты. В качестве компонента, усиливающего эффективность и увеличивающего длительность искусственного активного иммунитета, вызванного антигенной составляющей вакцины, использовали оригинальный

масло-ланолиновый адъювант [19]. Процентное соотношение компонентов адъюванта было следующее: ПЭС – 92 %; ланолин – 8 %. Количественное соотношение антигена и адъюванта в вакцинах было равно 1:1.

С целью подтверждения отсутствия, в получившихся экспериментальных вакцинных препаратах, обсеменения чужеродной микрофлорой, не отвечающей стандарту антигенной композиции вакцин, а также наличия больших концентраций химических соединений, способных вызывать токсический эффект проводили исследования на стерильность и безвредность.

Результаты исследований на стерильность и безвредность представлены в таблице 10

Таблица 10 – Результаты испытания трех экспериментальных серий вакцин на стерильность и безвредность.

Вакцинный препарат	Стерильность				Безвредность
	МПБ	МПА	МППБ	Сабуро	Количество павших и заболевших мышей
Вакцина из штамма «250»	Стерильно	Стерильно	Стерильно	Стерильно	Все здоровы
Вакцина из штамма «РС-85»	Стерильно	Стерильно	Стерильно	Стерильно	Все здоровы
Вакцина из штамма «АМК-16»	Стерильно	Стерильно	Стерильно	Стерильно	Все здоровы

Исследования на стерильность и безвредность показали, что все вакцинные препараты стерильны и безвредны.

До введения вакцин у всех исследуемых животных, был проведен забор крови с целью исследования сывороток на наличие специфических хламидийных антител. Исследования в РСК показали, что животные ранее не контактировали с хламидийным антигеном.

Каждой вакциной иммунизировали по одной группе лабораторных животных, иммунизацию морских свинок проводили путем подкожной инъекции в дозе 0,2 см<sup>3</sup>. Животные содержались под наблюдением в течение 6 месяцев. В этот промежуток времени у всех животных систематически отбирались пробы крови, которые в последующем исследовались в реакции связывания комплемента с целью мониторинга уровня комплементсвязывающих хламидийных антител, выработанных у лабораторных животных в результате ответных иммунных реакций на введение экспериментального препарата. Серологические исследования проводили каждые 30 суток после введения вакцины.

В таблице 11 представлены результаты исследований сывороток крови исследуемых морских свинок в реакции связывания комплемента.

Таблица 11 – Титры хламидийных антител в крови иммунизированных морских свинок

Номер жив	Группа	Вакцина на основе штамма	Титры антител в РСК					
			30 сутки	60 сутки	90 сутки	120 сутки	150 сутки	180 сутки
1	1 группа	«250»	1:20	1:40	1:20	1:10	1:10	1:10
2			1:80	1:40	1:40	1:20	1:20	1:10
3			1:40	1:20	1:40	1:20	1:10	1:10
4			1:160	1:80	1:40	1:20	1:20	1:40
Средние титры по группе			1:75	1:45	1:30	1:17,5	1:15	1:17,5
5	2 группа	«РС-85»	1:40	1:80	1:40	1:40	1:20	1:10
6			1:160	1:80	1:80	1:40	1:20	1:20
7			1:40	1:40	1:20	1:20	1:10	1:10
8			1:80	1:80	1:40	1:40	1:20	1:20
Средние титры по группе			1:80	1:70	1:45	1:35	1:17,5	1:15
9	3 группа	«АМК-16»	1:160	1:80	1:80	1:40	1:40	1:20
10			1:80	1:80	1:40	1:20	1:10	1:10
11			1:80	1:40	1:80	1:40	1:40	1:20
12			1:160	1:320	1:80	1:80	1:80	1:40
Средние титры по группе			1:120	1:130	1:70	1:45	1:42	1:22,5

В первой группе морских свинок, иммунизированных вакциной на основе штамма «250» на 30 сутки исследования были выявлены комплементсвязывающие хламидийные антитела в титрах от 1:20 до 1:160. К 60 суткам исследования концентрация хламидийных антител в крови иммунизированных морских свинок начала снижаться, уровень специфических антител варьировался в пределах от 1:20 до 1:80. Такая тенденция продолжалась до конца исследования. На 150 сутки эксперимента

концентрация комплементсвязывающих антител не превышала показателей от 1:10 до 1:20. На следующий месяц у трех животных из четырех уровень комплементсвязывающих хламидийных антител был равен 1:10 и у одной морской свинки концентрация хламидийных антител увеличилась до титра 1:40.

Во второй группе иммунизированных животных, вакцинацию которых проводили вакциной на основе штамма «РС-85», на 30 сутки исследования уровень специфических антител был несколько выше, чем в первой группе и варьировался в пределах от 1:40 до 1:160. Со второго месяца исследований также наблюдали снижение концентрации специфических антител в сыворотке крови иммунизированных морских свинок. Но до 150 суток исследования уровень хламидийных антител был немного выше, чем в первой группе. К 180 суткам исследования концентрация специфических хламидийных антител в крови лабораторных животных варьировалась в пределах титров от 1:10 до 1:20.

В третьей группе иммунизированных морских свинок на 30 сутки после введения вакцинного препарата на основе штамма «АМК-16» уровень комплементсвязывающих антител был в пределах титров от 1:80 до 1:160. Через месяц концентрация хламидийных антител в крови иммунизированных животных варьировалась в пределах показателей от 1:40 до 1:320. Далее, до конца исследований, наблюдали снижение уровня хламидийных антител в сыворотке крови иммунизированных морских свинок. К 180 суткам исследования концентрация специфических антител в крови лабораторных животных была в пределах титров от 1:10 до 1:40, но в среднем по группе была выше чем первой и второй групп животных.

На рисунке 12 представлена динамика накопления специфических хламидийных антител в крови иммунизированных животных трех групп.

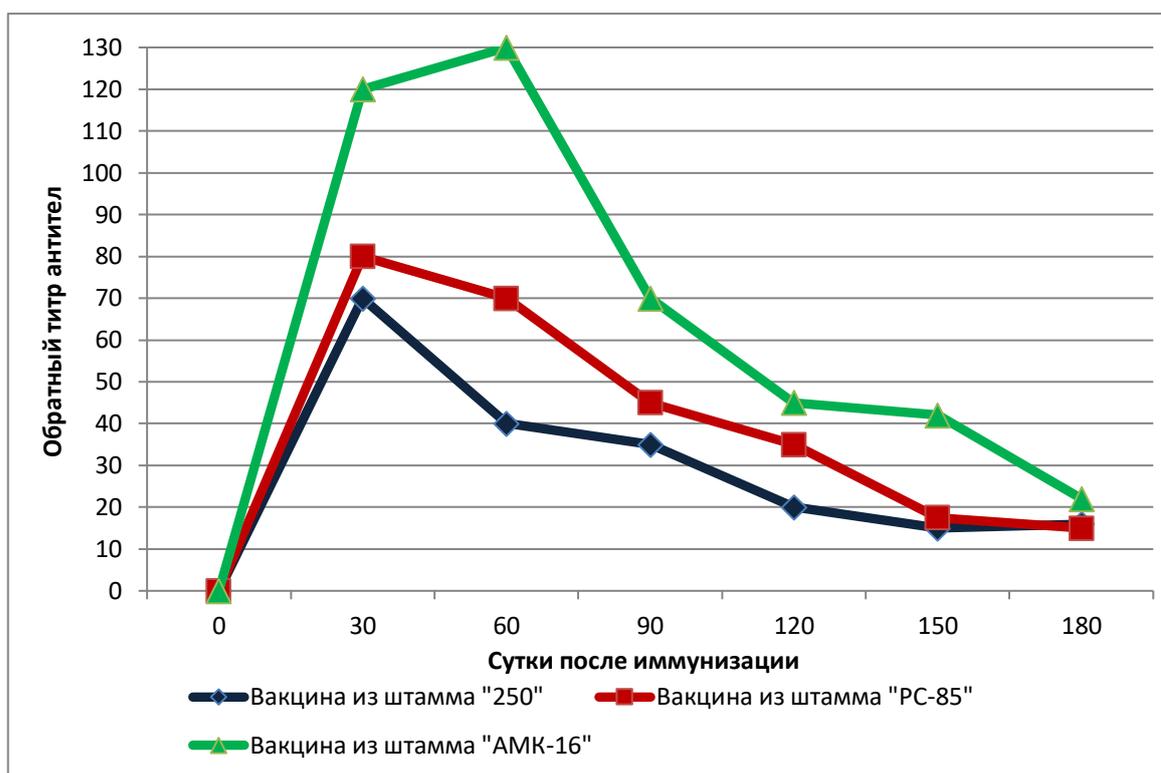


Рисунок 12 – Динамика накопления комплементсвязывающих хламидийных антител в крови морских свинок иммунизированных вакцинными препаратами на основе штаммов «250», «PC-85» и «AMK-16».

Как видно из рисунка 12, в группах животных иммунизированных вакцинами на основе штаммов «250» и «PC-85» максимальные титры комплементсвязывающих хламидийных антител выявлялись на 30 сутки исследования. Далее наблюдали равномерный спад уровня специфических хламидийных антител, который продолжался до 150 суток исследования. К 180 суткам эксперимента уровень хламидийных антител в этих группах оставался примерно на этом же уровне. В группе морских свинок, иммунизированных вакциной на основе антигена штамма «AMK-16», рост титров специфических антител также был зафиксирован на 30 сутки исследования, он был выше в среднем по группе и был равен показателю 1:120. В первой и второй группах этот показатель не превысил средних титров по группам 1:70 и 1:80, соответственно. Максимальный титр хламидийных антител в третьей группе лабораторных животных был выявлен на 60 сутки исследования и был равен показателю 1:130. Далее наблюдали снижение уровня комплементсвязывающих хламидийных антител в крови иммунизированных животных. Но на

протяжении всего исследования их концентрация была выше, чем у животных других двух групп.

По результатам проведенных исследований нами было установлено, что новый штамм хламидий «АМК-16» в сочетании с оригинальным масло-ланолиновым адьювантом вызывает выработку специфических хламидийных антител у морских свинок. Максимальный титр выявлялся на 60 сутки после иммунизации и на протяжении всего исследования был выше, чем у животных иммунизированных вакцинами на основе штаммов хламидий «250» и «РС-85».

#### **4.6.2. 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. Для этого были отобраны белые мыши в количестве 120 голов. Животные были разделены на 6 групп по 20 особей.

Животных 1, 2 и 3 групп иммунизировали вакциной, изготовленной на основе антигена штамма «АМК-16». Животные 4, 5 и 6 групп не иммунизировались (контроль).

Иммунизацию проводили подкожно в дозе 0,1 см<sup>3</sup>, через 14 суток проводили повторную иммунизацию в той же дозе. Через 30 суток после иммунизации проводили заражение всех групп животных 3 гетерологичными штаммами хламидий внутрибрюшинным методом в дозе 0,3 см<sup>3</sup>.

Заражение проводили по следующей схеме:

1) 1 и 4 группы заражали штаммом *C.psittaci* «АМК-16», с инфекционным титром -  $10^{-5,4}LD_{50}/0,3$  ml, выделенный из патологического материала абортировавшей козы;

2) 2 и 5 группы заражали штаммом *C.psittaci* «250», с инфекционным титром -  $10^{-6,5}LD_{50}/0,3$  ml, выделенный из патологического материала абортированного плода коровы;

3) 3 и 6 группы заражали штаммом *C.psittaci* «РС-85», с инфекционным титром -  $10^{-6,5}LD_{50}/0,3$  ml, выделенный из патологического материала абортированного плода свиньи.

Наблюдение за животными велось в течение 14 суток после заражения.

В таблице 12 представлены результаты выживаемости белых мышей после экспериментального заражения тремя штаммами хламидий.

Таблица 12 – Выживаемость белых мышей, иммунизированных экспериментальным вакцинным препаратом на основе «АМК-16» и в последующем зараженных различными штаммами хламидий.

Номер группы	Группа	Препарат для иммунизации	Штамм для заражения	Кол-во выживших животных (выжило/пало)	Процент выживших животных	Индекс защиты
1	Иммунизированные	Вакцина на основе штамма «АМК-16»	«АМК-16»	17/20	85%	4,6
4	Контроль	-		6/20	30%	
2	Иммунизированные	Вакцина на основе штамма «АМК-16»	«250»	15/20	75%	3,2
5	Контроль	-		4/20	20%	
3	Иммунизированные	Вакцина на основе штамма «АМК-16»	«РС-85»	16/20	80%	3,25
6	Контроль	-		7/20	35%	
Средний показатель индекса защиты					3,6	

Исходя из результатов исследований иммуногенности вакцины на основе антигена штамма «АМК-16», нами было установлено, что в первой группе иммунизированных животных и в последующем инфицированных 10% суспензией содержащей штамма хламидий «АМК-16», в живых после заражения остались 17 белых мышей из 20. Процент выживших животных составил 85 %. В контрольной группе животных, инфицированных этим же штаммом, процент выживших животных составил 30 %, в живых к 14 суткам наблюдений осталось 6 белых мышей из 20. Индекс защиты вакцины в первой группе животных был равен 4,6.

Во второй группе иммунизированных белых мышей после контрольного заражения вакцинным штаммом хламидий «250», процент выживших животных составил 75 %. После инфицирования в живых остались 15 белых мышей из 20, 5 белых мышей пали. В контрольной группе животных в результате заражения этим штаммом пало 16 мышей из 20. Процент выживших животных не превысил 20%. Индекс защиты вакцины в группе был равен 3,2.

В третьей группе животных иммунизированных вакциной на основе штамма «АМК-16» и инфицированных штаммом хламидий «РС-85» процент выживших животных составил 80 %, после контрольного заражения в живых остались 16 белых мышей из 20. В контрольной группе лабораторных животных после инфицирования этим штаммом специфический падеж составил 35 %, от хламидийной инфекции пали 13 белых мышей из 20. Индекс защиты вакцины в этой группе составил 3,25.

Средний индекс защиты по всем трем группам иммунизированных животных был равен показателю 3,6.

На основании этих данных было установлено, что 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.

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

Исследование проводили на 5 кроликах (самках), которые были разделены на 2 группы (3 кролика в первой и 2 кролика во второй). Животных первой группы иммунизировали вакциной на основе антигена штамма «АМК-16». Вакцину вводили внутримышечно в дозе 0,5 мл. Через 14 суток проводили ревакцинацию в той же дозе. Животные 2 группы не иммунизировались (контроль). На 30 сутки после иммунизации проводили скрещивание крольчих всех групп с самцами. На 17-19 сутки беременности кроликов проводили заражение животных всех групп. Для заражения использовали 10% суспензию, содержащую в равных соотношениях штаммы хламидий: «АМК-16», «РС-85» и «250». Заражение производили внутрибрюшинно в дозе 1,0 см<sup>3</sup>. Далее за животными велось ежедневное наблюдение. Так же на протяжении всего исследования систематически отбирались пробы сывороток крови с целью изучения их в реакции связывания комплемента на наличие специфических комплементсвязывающих хламидийных антител. Иммуногенность вакцины учитывали по результатам исхода беременности кроликов в испытуемых и контрольных группах, а также по общему физическому состоянию и по результатам лабораторных исследований.

В таблицах 13 и 14 представлены результаты серологических исследований сывороток крови кроликов в период иммунизации и после заражения.

Таблица 13 – Динамика титров хламидийных антител у кроликов в период иммунизации.

Номер кроликов	Титры антител в сыворотке крови после вакцинации				
	До вакцинации	7 сутки	14 сутки	30 сутки	45 сутки
1	-	1:5	1:40	1:40	1:160
2	-	1:5	1:20	1:160	1:160
3	-	1:10	1:20	1:40	1:40
Средний титр		1:6	1:26	1:80	1:120

Таблица 14 – Динамика уровня хламидийных антител в крови вакцинированных и не вакцинированных кроликов после контрольного заражения хламидиями.

Номера кроликов	Группы	Титры антител				
		До заражения	7 сутки	14 сутки	30 сутки	45 сутки
1	Опытные (вакцинированные)	1:160	1:160	1:80	1:40	1:80
2		1:160	1:160	1:80	1:40	1:80
3		1:40	1:80	1:160	1:80	1:40
Средний титр		1:120	1:133	1:106	1:53	1:66
1	Контрольные (не вакцинированные)	-	1:20	1:40	1:80	1:40
2		-	1:5	1:20	1:40	1:40
Средний титр		-	1:12	1:30	1:60	1:40

На основании результатов серологических исследований, представленных в таблице 13, было установлено, что все иммунизированные кролики до введения вакцинного препарата не контактировали с хламидийным антигеном. На 7 сутки после иммунизации лишь у одного кролика из трех концентрация комплементсвязывающих хламидийных антител была в пределах диагностического титра (1:10). У остальных животных титры хламидийных антител были равны 1:5.

К 14 суткам исследования у двух кроликов из трех титры специфических антител выросли до показателя 1:20 и у одного кролика титр хламидийных антител поднялся до показателя 1:40. К 30 суткам эксперимента уровень комплементсвязывающих хламидийных антител в крови двух иммунизированных кроликов достиг показателей 1:40 и у одного животного 1:160. К 45 суткам исследования у двух кроликов концентрация специфических хламидийных антител была равна титру 1:160 и у одного кролика осталась на том же уровне (1:40).

Как видно из таблицы 14 на 7 сутки после контрольного заражения животных концентрация специфических хламидийных антител в крови двух иммунизированных кроликов осталась на том же уровне (1:160), у одного кролика уровень специфических хламидийных антител достиг титра 1:80.

К 14 суткам, после экспериментального заражения, уровень циркулирующих в крови хламидийных антител у двух вакцинированных животных снизился до титра 1:80, а у одного кролика наоборот повысился до 1:160. К 30 суткам после заражения уровень хламидийных антител в крови всех иммунизированных кроликов упал на одно разведение и варьировался в пределах 1:40-1:80. На 45 сутки у двух кроликов иммунизированной группы концентрация специфических хламидийных антител в сыворотке крови была равна показателю 1:80 и у одного кролика 1:40.

В группе не иммунизированных животных, как видно из таблицы 3, до экспериментального заражения никто не контактировал с хламидийным антигеном. На 7 сутки после заражения концентрация специфических

хламидийных антител в крови контрольных кроликов достигла титров 1:5 и 1:20. К 14 суткам после заражения титры хламидийных антител были равны показателям 1:40 и 1:20. На 30 сутки наблюдали максимальные титры 1:80 и 1:40. И к 45 суткам титры специфических хламидийных антител у двух кроликов были равны титру 1:40.

На Рисунке 13 представлена динамика накопления поствакцинальных антител в сыворотке крови вакцинированных и контрольных кроликов до и после заражения.

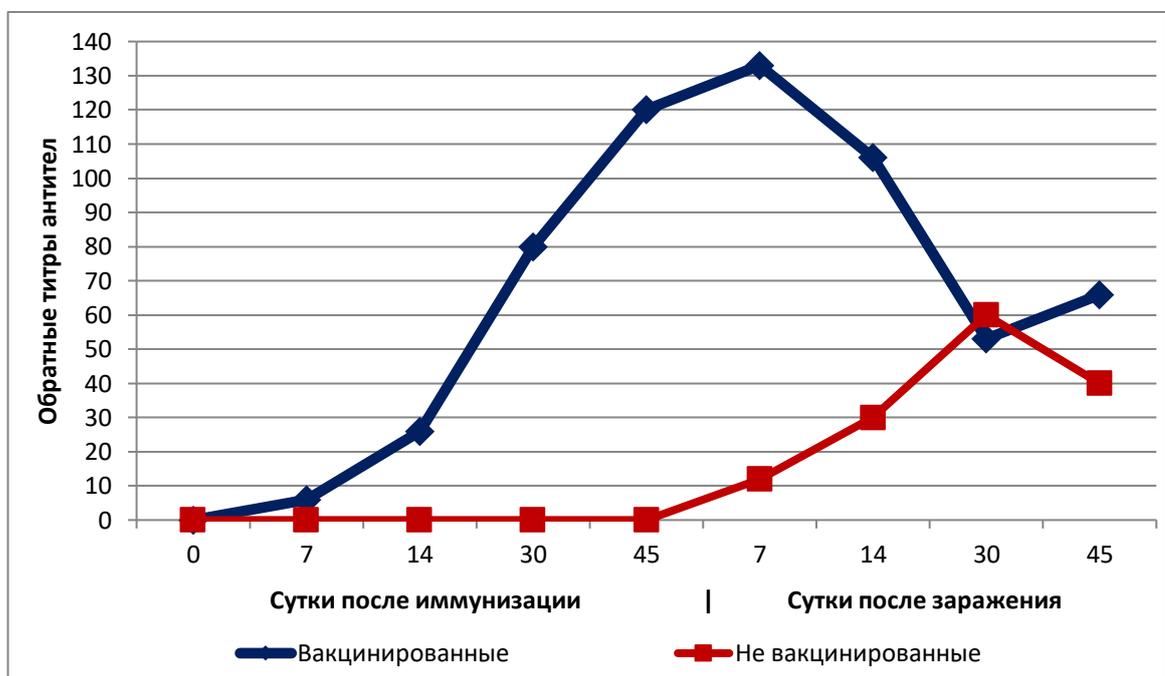


Рисунок 13 – Динамика накопления титров хламидийных комплементсвязывающих антител у вакцинированных и контрольных кроликов до и после заражения

Как видно из рисунка 13 рост титров комплементсвязывающих антител в крови иммунизированных кроликов начался с 7 суток исследования, средний титр на данный момент был равен 1:6. К 14 суткам концентрация хламидийных антител в среднем была равна 1:26. К 30 и 45 суткам исследования средние титры специфических хламидийных антител повысились до показателей 1:80 и 1:120 соответственно. Максимальный титр

комплементсвязывающих хламидийных антител у иммунизированных кроликов был достигнут на 7 сутки после заражения и был равен, в среднем по группе, 1:133. Начиная с 14 суток после инфицирования, средние титры хламидийных антител начали постепенно снижаться. Так с 14 по 30 сутки после заражения средние титры хламидийных антител снизились до показателя 1:53. На 45 сутки после инфицирования средний титр хламидийных антител в иммунизированной группе был равен 1:66.

В контрольной группе животных хламидийные антитела впервые были выявлены на 7 сутки после заражения в среднем титре 1:12. Максимальный средний титр комплементсвязывающих хламидийных антител в контрольной группе был выявлен на 30 сутки после заражения и был равен 1:60. К 45 суткам после инфицирования средний титр хламидийных антител в контрольной группе снизился до показателя 1:40.

Результаты исхода беременности кроликов опытной и контрольной групп представлены в таблице 15.

Таблица 15 – 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	Результаты исследования: 1.Микроскопически 2.Реизолированы на РКЭ;
Опытная (вакцинированные)	1	Вакцина на основе штамма «АМК-16»	10% суспензия из штаммов «250», «РС-85» и «АМК-16»	Роды	4	Отрицательно Отрицательно
	2			Роды	4	Отрицательно Отрицательно
	3			Роды	5	Отрицательно Отрицательно
Исход беременности по группе				Роды	13	Отрицательно
Контрольная (не вакцинированные)	4	Не иммунизировались	10% суспензия из штаммов «250», «РС-85» и «АМК-16»	Аборт	4	Положительно Положительно
	5			Мертворождение	5	Положительно Положительно
Исход беременности по группе				Аборт, мертворождение	9	Положительно

Как видно из таблицы 15 в группах иммунизированных кроликов родились 13 голов живых и развитых крольчат. В контрольных группах животных мы наблюдали рождения мертвых крольчат и аборт.

В тканях внутренних органов крольчат, родившихся от иммунизированных животных, в ходе проведения микроскопических исследований хламидий обнаружено не было. При исследовании внутренних органов крольчат, родившихся от контрольных (не иммунизированных) животных, хламидии были обнаружены в мазках отпечатках и в последующем реизолированы на развивающихся куриных эмбрионах, что явилось подтверждением хламидийной этиологии абортов и мертворождений.

В ходе проведения патологоанатомического вскрытия кроликов нами были отмечены ярко выраженные поражения внутренних органов у кроликов контрольных групп, которые характеризовались увеличением печени и селезенки, а также воспалительными процессами в легких (рисунок 15).

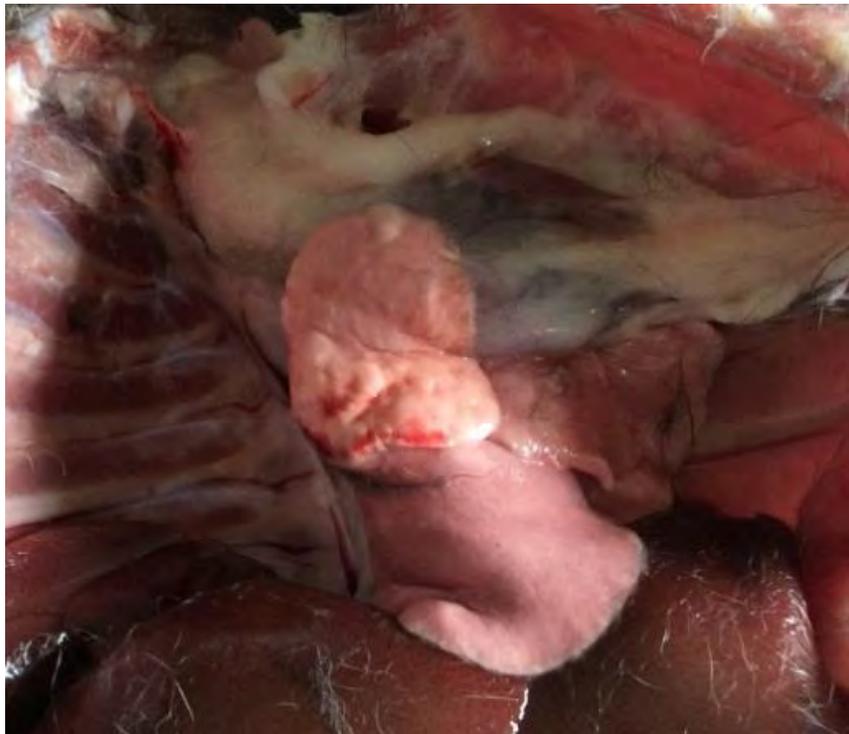


Рисунок 14 – Легкие вакцинированного кролика после заражения

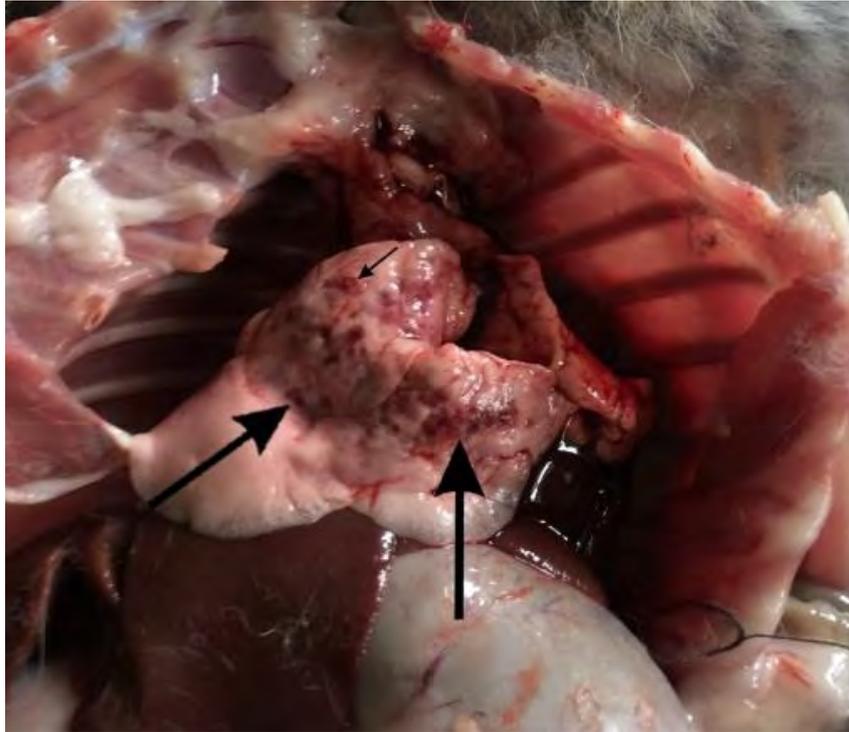


Рисунок 15 – Легкие не вакцинированного кролика после заражения

Испытание вакцины на основе антигена штамма «АМК-16» в остром опыте на 5 кроликах показало, что введение данного вакцинного препарата кроликам в дозе 0,5 см<sup>3</sup> обеспечивало формирование стойкого иммунитета, способного защитить беременных крольчих от экспериментального заражения вирулентными штаммами хламидий, вызывающими аборт у разных видов сельскохозяйственных животных.

## 5. 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 аборт, 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* «рСрА1» 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 адъювантом 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.

## **6. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что штамм хламидий «АМК-16» является уникальным, обладает выраженными антигенными свойствами и высокой иммуногенностью. Исходя из этого штамм хламидий «АМК-16» рекомендован для дальнейшего использования в производстве иммунобиологических препаратов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФА	иммуноферментный анализ
КРС	крупный рогатый скот
К. сп.	коэффициент специфичности
МЛА	масло-ланолиновый адъювант
МПА	мясопептонный агар
МПБ	мясопептонный бульон
НИВИ	научно-исследовательский ветеринарный институт
ОЛТ	орнитоз-лимфогранулема-трахома
ПЛТ	пситтакоз лимфогранулемы трахомы
ПЭС	полиэтилсилоксан
РАН	Российская академия наук
РКЭ	развивающиеся куриные эмбрионы
РНГА	реакция непрямой гемагглютинации
РНК	рибонуклеиновая кислота
РСК	реакция связывания комплемента
Т.е.	то есть
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	перекись водорода
NaCl	натрий хлор
ХАО	хориоаллантоисная оболочка
ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности - Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт»

## 7. СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атамась, В.А. Некоторые вопросы эпизоотологии хламидиоза крупного рогатого скота / В.А. Атамась // Лечебно-профилактические меры против незараз, и заразн, заболеваний с.-х. животных. – 1987. – С. 83-87.
2. Багдонас, И.И. Изучение экспериментальной пневмонии телят, зараженных возбудителем группы хламидий / И.И. Багдонас, А. Лабутинас // Труды Литовского НИИВ. – 1976. – С. 5–14.
3. Белоусов, Б.И. Опыт разработки ассоциированной вакцины для иммунизации овец против абортос инфекционной патологии / Б.И. Белоусов, А.А. Маслак А.А. // Тез докл. науч.-практ. конф. – Курск, 1998. – С. 47-53.
4. Белоусов, В.И. Влияние различных адъювантов на активность лептоспирозного антигена в составе ассоциированной вакцины против хламидиоза, кампилобактериоза, сальмонеллеза и лептоспироза овец / В.И. Белоусов, А.К. Елисеев // Всерос. научн. конф.: инф. бол. мел. с.-х животных. – М., 1998. – С. 43–45.
5. Бортничук, В.А. Хламидиоз свиней / В.А. Бортничук. Киев: «Урожай», 1991. – С. 191.
6. Бочкарев, Е. Г. Хламидиоз. Современные подходы к диагностике и лечению. Пособие для врачей / Е.Г. Бочкарев, Ю.В. Сергеев, М.А. Башмакова, В.М. Говорун, А.М. Савичева, Т.М. Парфенова. М.: ИАКИ, - 2000. – С. 401.
7. Гаффаров, Х.З. Инфекционные болезни рогатого скота хламидийной, микоплазменной и вирусной этиологии, разработка диагностических и лечебно-профилактических препаратов: автореф. дис. ... докт. вет. наук: 16.00.03 / Гаффаров Харис Зарипович. – Казань, 1986. С. 45.
8. Гаффаров, Х.З. Материалы по изучению вирусных респираторных заболеваний телят в хозяйствах Татарской АССР: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 / Гаффаров Харис Зарипович. - Казань, 1969. – С. 28.
9. Гиззатуллина, Н.К. Экспериментальная разработка вакцин против хламидиозного аборта овец и коз / Р.Х. Хамадеев, И.А. Курбанов,

Т.Г. Габдулхаев, Х.З. Гафаров, А.З. Юсупов // Тез. докл. Всесоюзн. конф.: Бол. овец и меры борьбы с ними. – Чита, – 1980. – С. 37-40.

10. Гизатуллин, Х.Г. Иммунопрофилактика болезней животных / Х.Г. Гизатуллин, Н.З. Хазипов. – Москва: «Колос», 1981. – С. 122.

11. Глазкова, Л.К. Состояние факторов неспецифической защиты организма женщин при хламидиозе / Л.К. Глазкова, Н.М. Герасимова // Вестник дерматологии и венерологии. 1998. – №1. – 1998, С. 7–10.

12. Горовиц, Э.С. Обоснование рациональной схемы серодиагностики спородического орнитоза / Э.С. Горовиц, О.А. Тимашева // Сб. трудов Под редакцией А.А.Шаткина. – Москва, 1982. – С. 27–29.

13. Гришаев, М.П. Комплексная лабораторная диагностика хламидийной инфекции, обусловленной *Chl. trachomatis*. ПЦР в диагностике и контроле лечения инфек. заболеваний. / М.П. Гришаев, О.Н. Гришаева, Е.Ю. Косова, С.В. Липатникова, И.А. Сыщенко // Сб. трудов 2-й Всерос. науч. - практ. конф. – Москва, 1998. – С. 51-52.

14. Делекторский, В.В. Хламидиоз. Бактериальный вагинит (клиника, диагностика, лечение). Пособие для врачей / В.В. Делекторский, Г.Н. Яшкова, С.А. Мазурчук. – Москва, 1995. – С. 30.

15. Дилекторский, В.В. Современное представление о роли хламидий в патологии урогенитального тракта / В.В. Дилекторский, Г.Н. Яшкова. – «Медицина». – 1994.

16. Домейко, М.А. Некоторые методические особенности проведения иммуноферментного анализа для изучения хламидиозов крупного рогатого скота / М.А. Домейко, В.П. Ришкявичене, В.И. Люткивячене // Ферментативные препараты в ветеринарии и животноводстве: Тезисы докладов науч. - практ. конф., 28-29 сентября 1989. – С. 32-33

17. Домейка М., Савичева А.М., Соколовский Е., Баллард Р., Унемо М. Руководство по лабораторной диагностике инфекций урогенитального тракта. СПб.: Изд-во Н-Л, 2012. – С. 288.

18. Дубенский, В.В. Комплексное лечение хламидийных и гонорейно-хламидийных инфекций у мужчин лейкоинтерфероном и фторхинолонами: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.10 / Дубенский Валерий Викторович. – М., 1993. – С. 16.

19. 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.

20. Евстифеев В.В. Усовершенствование средств специфической профилактики хламидиоза крупного рогатого скота // Достижения науки и техники АПК. 2015. Т. 29, № 3. С. 54–55.

21. Егоров, А.М. Хламидии. Молекулярная организация клетки и некоторые особенности патогенеза инфекции / А.М. Егоров, Ю.О. Сазыкин // Ж. Антибиотики и химиотерапия. 2000. – №4. – С. 3–5.

22. Казанцев, А.А. Орнитоз / А.А. Казанцев - Л., Медицина. – 1973. – С. 204.

23. Караваев, Ю.Д., Налетов Н.И. Вакцинопрофилактика хламидиозного аборта овец / Тр. ВИЭВ. – 1981. – № 53. – С.95–102.

24. Караваев, Ю.Д. Изучение комплементсвязывающей активности различных штаммов возбудителя аборта овец / Ю.Д. Караваев / Профилактика и меры борьбы с болезнями овец: Тез. докл. науч. совещания. – М., 1973. – С.162–164.

25. Караваев, Ю.Д. Хламидиозный аборт овец (этиология, диагностика, специфическая профилактика): автореф. дис. ... докт. вет наук: 16.00.03 / Караваев Юрий Дмитриевич. – М., 1987. – С. 39.

26. Ковалев, В.Л. Краевая эпизоотология и специфическая профилактика хламидиозного аборта овец и коз (на примере Таджикской ССР): автореф. дис. ... докт. вет. наук: 16.00.03 / Ковалев В.Л. – К., 1987. – С. 33.

27. Крюков Н.Н., Караваев Ю.Д., Поярков В.Н. Выделение и идентификация вируса при массовых абортах овец // Труды Всерос. НИИ экспериментальной ветеринарии. Т. 37. М., 1970. С. 136–140.
28. Куваева, И.Б. Обмен веществ организма и кишечная флора / М.: Медицина. – 1989.
29. Курбанов, И.А. Возбудители группы ОЛТ в этиологии аборт коров / И.А. Курбанов, О.М. Попова, И.И. Терских, Х.Г. Гиззатуллин // Ветеринария. – 1973. – № 7. – С. 36-39.
30. Кутлин, А.В. Иммунодиагностические препараты на основе моноклональных антител к *Chl. trachomatis* / А.В. Кутлин, А.А. Шаткин, Э.И. Дробышевская // Ж. Микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1996. – № 6. – С. 42–44.
31. Мавров, И.И. Лечение осложненных урогенитальных инфекций. Хламидийные инфекции / И.И. Мавров, А.Г. Клетной // М., 1986. – С. 82–85.
32. Милтиныд, А.П. Гонорея и смешанная гонококко-хламидийная инфекция мочеполовых органов: автореф. дис. ... докт. мед. наук: 03.00.07. / Милтиныд А.П. – М.: 1991. – С. 49.
33. Мартинов, С. Проучвания на хламидийна инфекция при говета в стада с абортю / С. Мартинов // Вет. Мед. Науки. – 1984. – Т.10. – С.28–38.
34. Мартинов, С. Приложение на концентрирована и перечистана вакцина срещу хламидия аборт на овце / С. Мартинов, Г. Попов // Вет. мед. науки. – 1985. – Т. 22. - №5. – С. 25–31.
35. Мартынова, Р.В. Хламидии и хламидиозы: клиника, биология и диагностика / Р.В. Мартынова, Н.И. Колкова, А.А. Шаткин // Рос. мед. вестн. 1997. – Т.2. – № 3. – С.49–55.
36. Митрофанов, П.М. Хламидиоз крупного рогатого скота и меры борьбы с ним / П.М. Митрофанов, В.А. Семенов, Р.Х. Хамадеев // ЧГСА Мин. с.-х. и П ЧР, Чебоксары, 2001. – С. 31–42.
37. Никитин, А.В. Современные противомикробные препараты и иммунная система. Врач / А.В. Никитин. – 1997. – 204 с.

38. Новиков, А.И. / Тез. Докладов Сибирской науч.-практ. конф. дерматовенерологов: «Современные направления в диагностике и лечении урогенитального хламидиоза». - Новосибирск, – 1998. – С. 20.
39. Новикова, Л.А. Комбинированная терапия урогенитального хламидиоза клацидом и неовиром / Л.А. Новикова, Т.М. Бахметьева, А.Г. Буракова, Л.Р. Бялик // Актуальные вопросы дерматологии и венерологии: Сб. трудов юбил. конф., посвящ. 5-летию кафедры кож и венер. болезней РГМУ. М., 1997. – С. 48–49.
40. Оболадзе Д.Б. Выделение и изучение биологических свойств возбудителя энзоотического аборта овец: автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.07. / Оболадзе Д.Б. – М., 1969. – 22 с.
41. Обухов, И.Л. Орнитоз / И.Л. Обухов, А.Н. Панин, К.Н. Груздев, Д.А. Васильев. Учебное пособие. – Ульяновск. – 1998. – С. 54.
42. Обухов, И.Л. Серологические методы / И.Л. Обухов // Хламидиоз кошек. – М.: «Медицина», 1994. – Разд. 2. – С. 43.
43. Огнянов, Д. Неориккетсиозите катозоонози / Д. Огнянов // Вет. Сб. – 1976. – Т.74. – №9. – С. 12-15.
44. Орлянкин Б.Г. Современная классификация хламидий // Ветеринария. 2006. – № 1. С. 23–26.
45. Осмоналиев, А.К. Патогенные свойства местных штаммов хламидий аборта овец / А.К. Осмоналиев, Б.Н. Гусев, Ц.П. Хандуев // Инф. бол. жив. и вопр. прир. очагов. – 1989. – № 11. – С. 34-38.
46. Поляков, А.А. Выживаемость возбудителя хламидиозного аборта овец и режимы дезинфекции / А.А. Поляков, Т.Ш. Кулешов // Ветеринария. – 1983. – № 7. – С.24–26.
47. Попова, О.М. Сравнительное изучение чувствительности видоспецифического и группового комплементсвязывающих антигенов возбудителя орнитоза к физикохимическим воздействиям / О.М. Попова, Н.С. Савосина // Тез докл. всесоюзн. науч. конф. «Разработка апробация и гос. контроль вет. препаратов». – М., 1981. – С. 151–152.

48. Попов, Г. Метод за получавана ваксина срещу хламидийния аборт по овцете и приложение и на морски свинчете / Г. Попов, С. Мартинов // Ветер. – Мед. науки. – 1983. – Т. 20. – №1. – С. 9–16.
49. Самуйленко, А.Я. Инфекционная патология животных / А.Я. Самуйленко, В.Н. Сюрин, Е.С. Воронин. - Том V. Хламидиозы. – М.: ВНИИТИБП, 2003. – С. 207.
50. Скрипкин Ю.К., Кубанова А.А., Аковбян В.А. Проблема диагностики и лечения урогенитального хламидиоза в России // Антибиот. и химиотер. 1996. – Т. 41(2). – С. 5–8.
51. Теплякова, О.В. Экспериментальный хламидиоз телят / О.В. Теплякова // Научно-техн. беллетень «Диагностика и меры борьбы с хламидиозом с.-х животных», вып. 24.– Новосибирск, 1986. – С.17–21.
52. Терских, И.И. Возбудитель орнитоза и другие представители хламидиоза / И.И. Терских // Вестн. АМН СССР. 1964. – №3. – С.67-78.
53. Терских, И.И. Орнитоз и другие хламидийные инфекции / И.И. Терских. М.: «Медицина». – 1979. – 270 с.
54. Федорова В.А., Полянина Т.И., Салтыков Ю.В., Зайцев С.С., Ласкавый В.Н., Ульянова О.В., Мотин В.Л. Детекция *Chlamydia trachomatis* у овец с энзоотическим хламидийным абортom // Ветеринария. 2016. – № 1. – С. 22–25
55. Федорова В.А., Салтыков Ю.В., Филонова Н.Н., Субботина И.А., Зайцев С.С., Ларионова О.С., Евстифеев В.В., Ульянова О.В., Ревзина Е.М., Ульянов С.С., Мотин В.Л. Детекция «нового шведского» варианта *Chlamydia trachomatis* у крупного рогатого скота // Ветеринария. 2019. – № 7. – С. 27–31.
56. Федорова В.А. Хламидиозы животных и человека/ В.А. Федорова, В.Л. Мотин// Наука. – М. 2019. – С. 137.
57. Фомченко, И.В. Некоторые эпизоотологические данные хламидиоза крупного рогатого скота / И.В. Фомченко // Уч. записки Т. 34: Матер. междунар. науч. - практ. конф., посвященной 70-летию клинических кафедр, 14-15 апреля. – Витебск, 1998. – С. 176–178.

58. Хазипов, Н.З. Иммуитет и специфическая профилактика / Н.З. Хазипов, Ю.Д. Караваяев // Хламидиозы сельскохозяйственных животных. – М.: «Колос», – 1984. – С. 193–200.
59. Хамадеев, Р.Х. Изучение энзоотического аборта овец в Татарской АССР и усовершенствование методов лабораторной диагностики этого заболевания: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 / Хамадеев Рифнур Хазиевич – Казань, 1975. – С. 26.
60. Хамадеев, Р.Х. Методы лабораторной диагностики / Р.Х. Хамадеев // Хламидиозы сельскохозяйственных животных. – М., «Колос». – 1984. – С. 152–193.
61. Хамадеев, Р.Х. Накопление комплементсвязывающих антител при вирусном аборте овец / Р.Х. Хамадеев, Х.З. Гаффаров, А.А. Додукин // Ветеринария. 1973. – № 5. – С. 113–115.
62. Хамадеев, Р.Х. Оценка иммуногенной активности полиштаммовой вакцины против хламидиоза крупного рогатого скота / Р.Х. Хамадеев, Ф.М. Хусаинов // Матер. науч.-произв. конф. по проблеме ветеринарии и животноводства. – Казань, 1995. – С.42.
63. Хамадеев, Р.Х. Разработки и испытание полиштаммовой вакцины против хламидиоза крупного рогатого скота / Р.Х. Хамадеев, Ф.М. Хусаинов // Матер. науч. - практ. конф. по проблемам ветерин. и животноводства, – Казань, 1994. – С. 28–29.
64. Хамадеев Р.Х. Течение хламидиоза и его профилактика на свинокомплексе/ Хамадеев Р.Х., Хусаинов Ф.М., Равилов А.З., Евстифеев В.В.// Магзянов Ф.З., Ветеринария. 2000.– № 12. – С. 14.
65. Хамадеев, Р.Х. Хламидиозы рогатого скота и свиней: автореф. дис. ... докт. вет. наук: 16.00.03 / Хамадеев Рифнур Хазиевич – Казань, 1991. – 40 с.
66. Хусаинов, Ф.М. Иммунобиологические свойства хламидий, разработка и усовершенствование средств лабораторной диагностики и специфической профилактики хламидиозов сельскохозяйственных

животных: дис. ... докт. вет. наук: 16.00.03. / Хусаинов Фидаиль Мингалеевич. – Казань, 2007. – С. 323.

67. Хусаинов, Ф.М. Клинико-эпизоотологическое проявление хламидиозов крупного рогатого скота в хозяйствах среднего Поволжья и Предуралья / Хусаинов Ф.М., Евстифеев В.В., Барбарова Л.А. // Ветеринарный врач, 2006. – №1. – С. 32–37.

68. Хусаинов, Ф.М. Иммуноморфологическая оценка эффективности инактивированной эмульсионной вакцины против хламидиоза свиней / Хусаинов Ф.М., Авзалов Ф.З., Евстифеев В.В. // Ветеринарный врач. 2008. – №3. С. 26–29.

69. Шафикова, Р.А. Применение реакции энзиммеченных антител при диагностике хламидиозного аборта овец / Р.А. Шафикова, Х.З. Гаффаров // Эпизоотол., эпидемиол., сред. диагн., терапии и спец. профил. инфек. бол., общих для чел. и жив.: Матер. Всесоюзн. конф. – Львов, 1988. – С. 107–108.

70. Шафикова, Р.А. Хламидиозы и таксономическое положение хламидий / Р.А. Шафикова // Хламидиозы сельскохозяйственных животных. – М.: «Колос», – 1984. – С. 5–14.

71. Шахтмейстер, И.Я. Рокситромицин (рулид) в терапии урогенитального хламидиоза / И.Я. Шахтмейстер. Вестник дерматологии и венерологии, – № 1. – 1999. – С. 59.

72. Щербань, Г.П. Хламидиоз свиней / Г.П. Щербань, Г.Д. Фирсова, Т.Г. Воскресенская // Ж. Ветеринария. 1978. – № 9. – С. 55–58.

73. Щербань, Г.П. Энзоотический (вирусный) аборт овец / Г.П. Щербань, Н.Ф. Щербань // Ж. Ветеринария. 1974. – № 8.

74. Щербань, Н.Ф. Об этиологии вирусного аборта овец / Н.Ф. Щербань, Г.П. Щербань, А.Г. Ирский // Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии: Сборник научных трудов. 1967. – №2. – С. 205.

75. Яковлев, В.П. Антибактериальные препараты группы фторхинолонов / В.П. Яковлев // Рус. мед. журн. – 1997. – С. 1405–1413.

76. Ata, F.A. Storz J. Antigenc structure and clearance of chlamydiae from blood of convalescent sheep / F.A. Ata, J. Storz // *Amer. J. Vet. Res.* – 1973. – Vol. 34. – №7. – P. 915–917.
77. Bastidas R.J., Elwell C.A., Engel J.N., Valdivia R.H. Chlamydial intracellular survival strategies // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2013. Vol. 3(5). P. a010256.
78. Becerra, V.M. Tissue culture adaptation and pathogenic properties of an ovine Chlamydial abortion strain / V.M. Becerra, J. Stors // *Zbl. Vet. Med.* – 1974. – B21. - P. 290–301.
79. Bedson S.P. The Harben Lectures, 1958. The psittacosis-lymphogranuloma group of infective agents. Lecture 1. The history and characters of these agents // *Jour. Roy. Inst. Pub. Hlth. and H'yg.* 1959. Vol. 22. P. 67–68.
80. Bedson S.P. The psittacosis-lymphogranuloma venereum group of viruses // *Br. Med. Bull.* 1953. Vol. 9(3). P. 226–227.
81. Bergey D.H., Breed R.S. Bergey's manual of determinative bacteriology by American Society for Microbiology. 7th ed. Baltimore, Williams Wilkins Co., 1957. P. 1094.
82. Blanco, L.A. Ultraestructura de una Chlamydia de origen bovino / L.A. Blanco, P.T. Barrera, M.A. Macrotequi // *An. Inst. Nac. Investig Ayr. Ser.: Hig Sanid anim.* 1975. – № 2. – P.37–55.
83. Boklisch, H. Berliner und Munichner Tierarzbliche Wocheurshrift / H. Boklisch, C. Ludwig, S. Lange. 1991. – P. 104–119.
84. Brouns S.J., Jore M.M., Lundgren M. et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes // *Science.* 2008. Vol. 321. P. 960–964.
85. Brunham, R. Postabortal C.trachomalis salpingilis: correlating rick with antigen-specific serological responses and with neutralization / R. Brunham. [et al.] *J. Inf. Dis.*, 1987. – V.155 – P. 749–755.
86. Busch M., Thoma R., Schiller I. et al. Occurrence of chlamydiae in the genital tracts of sows at slaughter and their possible significance for

reproductive failure // J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. 2000. Vol. 47(6). P. 471–480.

87. Campbell, L.A. Detection of *Chlamydia trachomatis* deoxyribonucleic acid in women with tubal infertility / L.A. Campbell, Patton DL, Moore DE, Cappuccio AL, Mueller BA, Wand SA. *Fertil Steril* 1993; 59:45-50.

88. Carbolos, D.S. Jesus Protective immunity against *Chl. psittaci* serotype 1 strains / D.S. Carbolos, S. Jesus, B. Francoise, S. Armel, R. Annie // *Infec. Dis. Obstet. and Gynecol.* – 1996. – V.4. – №3 – P. 197–198.

89. Carolin, M. Black. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Rev.* 1997. – № 1. – P. 160–184.

90. Chang, J.J. Structural studies of the surface projections of *Chlamydia trachomatis* by electron microscopy / J.J. Chang // *J. Med. Microbiol.* 1997. – V.46. – №12. – P. 1013–1018

91. Chen H., Wen Y., Li Z. Clear Victory for *Chlamydia*: The subversion of host innate immunity // *Front. Microbiol.* 2019. Vol. 10. P. 1412.

92. Chisu V., Foxi C., Tanda A., Masala G. Molecular evidence of *Chlamydiales* in ticks from wild and domestic hosts in Sardinia, Italy // *Parasitol. Res.* 2018. Vol. 117(4). P. 981–987.

93. Clarke I.N. Evolution of *Chlamydia trachomatis* // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2011. Vol. 1230. P. 11–18.

94. De Bary M., Bertelli C., Jacquier N. et al. ESCCAR international congress on *Rickettsia* and other intracellular bacteria // *Microbes Infect.* 2015. Vol. 17(10). P. 680–688.

95. 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.

96. Deptula W., Ruczkowska J., Szenfeld J. Immunologic status in cattle naturally infected with the microorganisms *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci* // *Vet. Med. (Praha).* 1990. Vol. 35(2). P. 73–80.

97. Dhingra, P.N. Chlamydia group antigen/ P.N. Dhingra, L.P. Agarwal, V.M. Mahajan // *Zbl. Vet.Med.* 1981. – B. 28. – № 4. – P. 336–340.
98. Dhir, S.P. Immunochemical studies on chlamydial group antigen / S.P. Dhir, S. Hakomori, G.E. Kenny G.E. [ et al] // *J. Immunol.* – 1972. – №109. – P.116–122.
99. Dilbeck, P.E. 28 th Annual Procttdings of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians / P.E. Dilbeck, J.F. Evermann, S. Kraft, S. Tyler. – 1985. – P. 285.
100. Dunne E.F., Chapin J.B., Rietmeijer C.A. et al. Rate and predictors of repeat Chlamydia trachomatis infection among men // *Sex. Transm. Dis.* 2008. Vol. 35. P. 40–44.
101. Eb, F. Role du laboratoire a l'homme / F.Eb // *Rev. Fr. Lab.* 1991. – V. 227. – № 20. – P. 63–66.
102. Egerman, R.S. The tetracyclines / R.S. Egerman // *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1992. – P. 551–561.
103. Eissenberg, L.G. Chl. psittaci elementary body envelopes: Ingestion and inhibition of phagolysosome fusion / L.G. Eissenberg, P.B. Wyrick, C.H. Davis, J.W. Rumpp J.W. // *Infect. and Immunol.* – 1983. – V.40. – №2. – P. 741–751.
104. Feodorova V., Sultanakhmedov E., Saltykov Y., Zaitsev S. et al. First Detection of Chlamydia trachomatis 'Swedish' Variant (nvCT) in a Russian Couple with Infertility // *Open Microbiol. J.* 2018. Vol. 12. P. 343–352.
105. Feodorova V., Zaitsev S., Saltykov Y., Evstifeev V., Khusainov F., Yakovlev S., Larionova O., Ulyanova O., Motin V. The molecular characteristics of Chlamydia psittaci strain from cattle isolated in the Southeastern European Region of Russia (Volga Region) // *FEBS OpenBio.* 2019. Vol. 9. P. 97.
106. Fischer A., Rudel T. Subversion of Cell-Autonomous Host Defense by Chlamydia Infection // *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 2018. Vol. 412. P. 81–106.

107. Foggie, A. Preparation of vaccines against enzootic abortion of ewes / A. Foggie // Commonwealth bureau of animal health the veterinary bulletin. 1973. – Vol. 43. – №11. – P. 587–590.
108. Fukuchi, H. Seroepidemiological surveillance of *Chl. psittaci* in cats and dogs in Japan / H. Fukuchi, H. Ogawa, N. Ninamoto [et al] // Vet.Res. 1985. – V.117. – №19. – P. 503–504.
109. Grayston, J.T. *Chl pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. strain TWAR / J.T. Grayston, C.C. Kuo, L.A. Campbell, S.P. Wang // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1989. – №39. – P. 88–90
110. Greig, A. Field studies on the efficacy of a long acting preparation of oxytetracycline in controlling outbreaks of enzootic abortion of sheep / A. Greig, K.A. Zinklter // Veter. Rec. 1985. – Vol. 117. – №24. – P. 627–628.
111. Halberstaedter L., Prowazek S. Ueber Zelleinschlusse parasitarer Natur Beim Trachom // Arb. Gesundhamt. 1907. Vol. 26. P. 44–47.
112. Hatch, T.P. Utilization of L-cell nucleoside triphosphates by *Chlamydia psittaci* for ribonucleic acid synthesis / T.P. Hatch // J. Bacteriol. 1975. – V. 122. – P. 393–400.
113. Heagen, E. Uber eine auf den Menschen Ubertragbare Viruskrankheit bei Sturm Vogeln und ihre Beziehung zur Psittakose / E. Heagen, G. Mauer // Zbl. Bakt. Abt. 1. Orig. – 1938. – 143. – P. 81–88.
114. Hebb J.K., Cohen C.R., Astete S.G. et al. Detection of novel organisms associated with salpingitis, by use of 16S rDNA polymerase chain reaction // J. Infect. Dis. 2004. Vol. 190(12). P. 2109–2120.
115. Hosenfeld C.B., Workowski K.A., Berman S. et al. Repeat infection with *Chlamydia* and *Gonorrhea* among females: a systematic review of the literature // Sex. Transm. Dis. 2009. Vol. 36(8). P. 478–489.
116. Hu V.H., Holland M.J., Burton M.J. Trachoma: protective and pathogenic ocular immune responses to *Chlamydia trachomatis* // PLoS Negl. Trop. Dis. 2013. Vol. 7(2). P. e2020.

117. Jeffrey B.M., Suchland R.J., Eriksen S.G. et al. Genomic and phenotypic characterization of in vitro-generated *Chlamydia trachomatis* recombinants // BMC Microbiol. 2013. Vol. 13. P. 142.
118. Jinek M., Jiang F., Taylor D.W. et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation // Science. 2014. Vol. 343(6176). P. 1247997.
119. Johnson A.P., Osborn M.F., Thomas B.J. et al. Immunity to reinfection of the genital tract of marmosets with *Chlamydia trachomatis* // Br.J. Exp. Pathol. 1981. Vol. 62(6). P. 606–613.
120. Kalmar I.D., Dicxk V., Dossche L., Vanrompay D. Zoonotic infection with *Chlamydia psittaci* at an avian refuge centre // Vet. J. 2014. Vol. 199(2). P. 300–302.
121. Kaltenboeck, B. Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane (ompA) genes of the four chlamydial species / B. Kaltenboeck, K.G. Kousoulas, J. J. Storz // Bacteriol. 1993. –V.175. – № 2. – P. 487-502.
122. Koehler, L. Persistent, nonproductive infection of human peripheral monocytes with *Chlamydia trachomatis* serovar K is due to an intracellular growth arrest at an early stage of the chlamydial development / L. Koehler, E. Nettelbreker, On N, H. Zeidler, W.H. Drommer // Abstracts of Proceedings of the 8<sup>th</sup> international Symposium of Human Chlamydial Infections. Gouvieux-Chantilly, France. –12-24 June. – 1994. – P. 427–430.
123. Kuo, C.C. A mouse of *C. trachomatis* pneumonitis / C.C. Kuo, W.J. Chen // J. Inf. Diss. – 1980. – V. 141. – P. 198–202
124. 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.
125. Lillie R.D. Psittacosis-rickettsia-like inclusions in man and in experimental animals // Publ. Hlth. Rep. Wash. 1930. Vol. 45. P. 773–778.

126. Longbottom D., Livingstone M., Maley S. et al. Intranasal infection with *Chlamydia abortus* induces dose-dependent latency and abortion in sheep // PLoS One. 2013. Vol. 8(2). P. e57950
127. Martin, J. Zur Chlamydieninfektion des Schweines. 2. Mitt.: Pathologisch-histologische Besonderheiten der experimentellen Chlamydienpneumonie des Schweines / J. Martin // «Arch. exp. Veterinarmed». - 1983. - V. 37, 6. - P. 939-949.
128. Mc Nutt, S.H. An active agent isolated with arthritis (Prem. Report.) / S.H. Mc Nutt, T.S. Zeith // Ameer. J. Vet. Res. - 1945. - Vol.6. - P.247-252.
129. Miels, W. Die Immunoperoxidase-methode zum Nachweis von Virus- und Chlamydien-antigenen / W. Miels, J. Hentchke, W. Becker, P. Teufel // Zbl. Vet. Med. B. 1974. - V.21. - S.48-58.
130. Mitscherlich, E. Die Bekämpfung des Virusabort der Schafes / E. Mitscherlich // Berl. und Munch. Tierarztl. Wochen. - 1965. - B.78. - №5. - S.81.
131. Morter, R. Chlamydial diseases / R. Morter // Mod. Vet. Pract. - 1981. - V.62. - №6. - P. 467-468.
132. Moulder, J.W. Биохимия внутриклеточного паразитизма / J.W. Moulder. - М.: Мир, 1965. - С. 197.
133. Mozikava, K. Modulatory effect of antibiotics on cytokine production by human monocytes in vitro. Antimicrob. Agents and Chemoter / K. Mozikava, H. Watabe, M. Araake [et al]. 1996. -V. 40, 6. - P. 1366-1370.
134. Nettleman, M.D. Conservation of the major outer membrane protein of *Chl. trachomatis* within a serovar / M.D Nettleman, B.E. Batteiger, C.E. Wilde, R.W. Jones // Abstr. Ann. Meet Am. Sos. Microbiol. - Washington. D.C., 1986. - P. 92-96.
135. Oellerich, M. Evaluation of EMIT adapted to the Bio centrifugal analyzer (Cobas). / M. Oellerich, R. Haeckel, L.H. Haind. Clin. Biochem. 1982. - V. 20. - P. 765-772.

136. Oliva G., Sahr T., Buchrieser C. Small RNAs, 5' UTR elements and RNA-binding proteins in intracellular bacteria: impact on metabolism and virulence // *FEMS Microbiol. Rev.* 2015. Vol. 39(3). P. 331–349.
137. 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.
138. Osman K.M., Ali H.A., Eljakee J.A. et al. Antimicrobial susceptibility and molecular typing of multiple *Chlamydiaceae* species isolated from genital infection of women in Egypt // *Microb. Drug. Resist.* 2012. Vol. 18(4). P. 440–445.
139. Ozbek A. Can *Chlamydia trachomatis* human biovars cause abortion in cattle. An immunohistochemical study on a new host-pathogen relationship / A. Ozbek, E. Ozbek, Y. Kalkan, A. Temur, O.F. Küçükkalem // *Mikrobiol. Bul.* 2008. Vol. 42(4). P. 599–605.
140. Page L.A. Revision of the family *Chlamydiaceae* Rake (Rickettsiales): unification of the psittacosis – lymphogranulema venereum – trachoma group of organisms in the genus *Chlamydia* Jones, Rake and Stearns, 1945 // *Intern. J. of Systematic Bacteriology.* 1966. Vol. 16(2). P. 223–252.
141. Pantchev A., Sting R., Bauerfeind R. et al. New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydomphila psittaci* and *Chlamydomphila abortus* from tissue samples // *Vet. J.* 2009. Vol. 181(2). P. 145–150.
142. Pospisil L., Canderle J. *Chlamydia (Chlamydomphila) pneumoniae* in animals: a review // *Vet. Med.* 2004. Vol. 49(4). P. 129–134.
143. Patterson T.L., Rank R.G. Immunity to reinfection and immunization of male guinea pigs against urethral infection with the agent of guinea pig inclusion conjunctivitis // *Sex. Transm. Dis.* 1996. Vol. 23(2). P. 145–150.
144. Rajeeve K., Das S., Prusty B.K., Rudel T. *Chlamydia trachomatis* paralyzes neutrophils to evade the host innate immune response // *Nat. Microbiol.* 2018. Vol. 3(7). P. 824–835.

145. Rank R.G., Batteiger B.E., Soderberg L.S. Susceptibility to reinfection after a primary chlamydial genital infection // *Infect. Immun.* 1988. Vol. 56(9). P. 2243–2249.
146. Rank R. Chlamydia // *Vaccines for biodefence and emerging and neglected diseases* / Eds. Barret A.D.T., Stanberry L.R. Academic Press, 2009. Ch. 44. P. 845–867.
147. Rank R.G., Whittum-Hudson J.A. Protective immunity to chlamydial genital infection: evidence from animal studies // *J. Infect. Dis.* 2010. Vol. 201. Suppl. 2. P. 168–177.
148. Rolf, A. Weber-Rolfs I. PCR: Clinical Diagnostics and Research / A. Rolf, I. Shuller, U. Finckh. Berlin:Springer-Verlag. – 1992. – P. 231.
149. 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.
150. Saiki R.K., Scharf S., Falloona F. et al. // *Science.* – 1985. – V.230. – P. 1350-1354.
151. Samoilovich, S.R. Hybridoma technology: new developments of practical interest / S.R. Samoilovich, C.B. Dugan, A.J. Macario // *J. Immunol. Meth.* – 1987. – V.101. – №2. – P.153–170.
152. Sandoz K.M., Eriksen S.G., Jeffrey B.M. et al. Resistance to a novel anti-chlamydial compound is mediated through mutations in *Chlamydia trachomatis* sec. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. Vol. 56(8). P. 4296–4302.
153. Sandoz K.M., Rockey D.D. Antibiotic resistance in Chlamydiae // *Future Microbiol.* 2010. Vol. 5(9). P. 1427–1442.
154. Schachter, J. Chlamydia as agents of human and animal disease / J. Schachter, J. Storz, M.L. Tarizzo, K. Bogel // *Bull. World Health Organ.* 1973. – P. 49, 443–449.

155. Schachter, J. Serotyping of Chlamydia: isolates of bovine origin / J. Schachter, J. Banks, N. Sugg [et al] // *Infect. and Immunol.* 1975. – V.II. – №5. – P.905-907.
156. Schautteet K., Vanrompay D. Chlamydiaceae infections in pig // *Vet. Res.* 2011. Vol. 42(1). P. 29.
157. Shewen, P.E. Chlamydial infection in animals: a review / P.E Shewen. *Can. Vet. J.*, 1980. – P. 2–11, 21
158. Spears, P. Biotyping of *Chl. psittaci* based on inclusion morphology and response to Diethylaminoethyl-dextran and Cycloheximide / P. Spears, J. Storz // *Infect. Immunol.* – 1979. – №24. – P. 224–232
159. Stamp, J.T. Enzootic abortion in ewes: I .Transmission of the disease / J.T. Stamp // *J. Vet. Res.* – 1950. – V.62. – P.251–259.
160. Stephens, R.S. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of human *Chlamydia trachomatis* / R.S. Stephens, S. Kalman, C. Lammel [et al]. *Science.* 1998. – V. 282. – P. 754–759.
161. Stephens R.S., Meyers G., Eppinger M., Bavoil P.M. Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of *Chlamydia* resolved // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2009. Vol. 55(2). P. 115–119.
162. Storz, J. Episootic bovine abortion in the intermanntain region / J. Storz, J.W. Coll, R.W. Jones, M.L. Minner // *Cornell Vet.* – 1967. – Vol. 57. – P. 21–37.
163. Studdert, M.J. Bedsonia abortion of sheep / M.J. Studdert, D. Mc Kercher D // *Immunological studies. Res. Vet.* 1968. – V. 9. – P. 331–336.
164. Suchland R.J., Sandoz K.M., Jeffrey B.M. et al. Horizontal transfer of tetracycline resistance among *Chlamydia* spp. in vitro // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009. Vol. 53(11). P. 4604–4611.
165. Szymańska-Czerwińska M., Mitura A., Niemczuk K. et al. Dissemination and genetic diversity of chlamydial agents in Polish wildfowl: isolation and molecular characterisation of avian *Chlamydia abortus* strains // *PLoS ONE.* 2017. Vol. 12(3). P. e0174599.

166. Takahashi, T. Shedding and transmission of *Chl. psittaci* in experimentally infected chickens / T. Takahashi // *Avian Dis.* – 1988. – V.32. – №.4. – P.650–658.
167. Tang F.F., Chang H.L., Huang Y.T., Wang K.C. Studies on the etiology of trachoma with special reference to isolation of the virus in chick embryo // *Chin. Med. J.* 1957. Vol. 75(6). P. 429–447.
168. Tang F.F., Huang Y.T., Chang H.L., Wong K.C. Further studies on the isolation of the trachoma virus // *Acta. Virol.* 1958. Vol. 2(3). P. 164–170
169. Tang F.F., Huang Y.T., Chang H.L., Wong K.C. Isolation of trachoma virus in chick embryo // *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 1957. Vol. 1(2). P. 109–120.
170. Taylor-Brown A., Polkinghorne A. New and emerging chlamydial infections of creatures great and small // *New Microbes New Infect.* 2017. Vol. 18. P. 28–33.
171. Thygeson P. Trachoma virus; Historical background and review of isolates // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1962. Vol. 98(1). P. 6–13.
172. Todd, W.J. Ultrastructural changes in host cellular organelles in the course of chlamydial developmental cycle / W.J. Todd, A.M. Doughri, J. Storz // *Zentralbl. Bakteriol. [Orig. A]* 236, 1976. – P. 359–373.
173. Trusozynski, M. Bedsonie-drobnoustroje gruppy psittacosis-lymphogranuloma-venerium trachoma (PLT) / M. Trusozynski // *Med. Weter.*, 1971. – Vol. 27. – №8. – S. 466–468.
174. Verbeke P., Welter-Stahl L., Ying S. et al. Recruitment of BAD by the *Chlamydia trachomatis* vacuole correlates with host-cell survival // *PLoS Pathog.* 2006. Vol. 2(5). P. e45.
175. Wills J.M., Watson G., Lusher M. et al. Characterisation of *Chlamydia psittaci* isolated from a horse // *Vet. Microbiol.* 1990. Vol. 24(1). P. 11–19.

176. Wolner-Hanssen P., Patton D.L., Holmes K.K. Protective immunity in pigtailed macaques after cervical infection with *Chlamydia trachomatis* // Sex. Transm. Dis. 1991. Vol. 18(1). P. 21–25.

177. Xu F., Stoner B.P., Taylor S.N. et al. Use of home-obtained vaginal swabs to facilitate rescreening for *Chlamydia trachomatis* infections: two randomized controlled trials // Obstet. Gynecol. 2011. Vol. 118(2 Pt 1). P. 231–239.

## 8. ПРИЛОЖЕНИЯ

## Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору

Испытательный центр ФГБУ  
«Татарская межрегиональная ветеринарная лаборатория»  
г. Казань, ул.Родины, 25 а, тел/факс (843) 237-94-20, 237-75-40  
e-mail: trvl\_bird@mail, сайт: www.tatmvl.ru  
ОКПО 27889651, ОГРН 1021603641883  
ИНН/КПП 1660014160/166001001  
Лицензия № 16.11.13.001.Л.000013.06.19  
от 27.06.2019 г.  
Срок действия бессрочно



## Протокол исследований № Г 1469 от «14» ноября 2019 г.

**При исследовании:** биологического материала (штамм хламидий «АМК-16»), инактивированного, упакованного в ампулы под вакуумом (Сопроводительная от 14 ноября 2019 г.)

**заказчик:** ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»

**адрес заказчика:** Республика Татарстан, г. Казань, Научный городок - 2

**место отбора проб:** пробы представлены заказчиком

**дата поступления:** 14.11.2019 г.

**даты проведения исследований:** 14.11.2019 г.

**регистрационный номер образца:** Г-3045-19

**получен следующий результат:** при исследовании поступившего материала методом полимеразной цепной реакции выявлен геном микроорганизмов семейства *Chlamydiaceae* и возбудителя хламидиоза *Chlamydophila psittaci*.

Ответственный за оформление  
протокола исследований

Тюлькин С.В.

GenBank Send to: [Change](#)

 Due to the large size of this record, sequence and annotated features are not shown. Use the "Customize view" panel to change the display.

## Chlamydia psittaci strain AMK chromosome, complete genome

NCBI Reference Sequence: NZ\_CP047319.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

---

[Go to:](#)

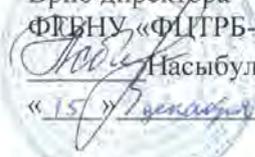
<p>LOCUS NZ_CP047319 1152497 bp DNA circular CON 18-JAN-2022</p> <p>DEFINITION Chlamydia psittaci strain AMK chromosome, complete genome.</p> <p>ACCESSION NZ_CP047319</p> <p>VERSION NZ_CP047319.1</p> <p>DBLINK <a href="#">BioProject: PRJNA224116</a>  <a href="#">BioSample: SAMN13684682</a>  <a href="#">Assembly: GCF_009857155.1</a></p> <p>KEYWORDS RefSeq.</p> <p>SOURCE Chlamydia psittaci (Chlamydomphila psittaci)</p> <p>ORGANISM <a href="#">Chlamydia psittaci</a>            Bacteria; Chlamydiae; Chlamydiales; Chlamydiaceae;            Chlamydia/Chlamydomphila group; Chlamydia.</p> <p>REFERENCE 1 (bases 1 to 1152497)</p> <p>AUTHORS Feodorova,V.A., Zaitsev,S., Khizhnyakova,M.A., Saltykov,Y.V.,            Evstifeev,V., Khusainov,F.M., Yakovlev,S.I., Larionova,O.S. and            Motin,V.L.</p> <p>TITLE Study of protective immune response elicited by the Chlamydia            psittaci AMK strain in livestock</p> <p>JOURNAL Unpublished</p> <p>REFERENCE 2 (bases 1 to 1152497)</p> <p>AUTHORS Feodorova,V.A., Zaitsev,S., Khizhnyakova,M.A., Saltykov,Y.V.,            Evstifeev,V., Khusainov,F.M., Yakovlev,S.I., Larionova,O.S. and            Motin,V.L.</p> <p>TITLE Direct Submission</p> <p>JOURNAL Submitted (03-JAN-2020) Laboratory for Molecular Biology and            Nanobiotechnology, Federal Research Center of Virology and            Microbiology, Branch in Saratov, 53-rd Strelkovoi Divizii, Saratov            410028, Russian Federation</p> <p>COMMENT <a href="#">REFSEQ INFORMATION</a>: The reference sequence is identical to  <a href="#">CP047319.1</a>.            The annotation was added by the NCBI Prokaryotic Genome Annotation            Pipeline (PGAP). Information about PGAP can be found here:  <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/</a></p> <p>##Genome-Assembly-Data-START##            Assembly Date :: 01-JUN-2019            Assembly Method :: Unicycler v. 0.4.7            Assembly Name :: AMK            Genome Representation :: Full            Expected Final Version :: Yes</p>	<p><a href="#">Change</a></p> <p><a href="#">Custom</a></p> <hr/> <p><a href="#">Analyze</a></p> <p><a href="#">Run BLA</a></p> <p><a href="#">Pick Prim</a></p> <p><a href="#">Highlight</a></p> <hr/> <p><a href="#">Related</a></p> <p><a href="#">Assembl</a></p> <p><a href="#">BioProje</a></p> <p><a href="#">BioSam</a></p> <p><a href="#">Protein</a></p> <p><a href="#">Taxonom</a></p> <p><a href="#">Compon</a></p> <p><a href="#">Genome</a></p> <p><a href="#">Identical</a></p> <p><a href="#">PubMed</a></p> <hr/> <p><a href="#">LinkOu</a></p> <p><a href="#">Order G</a></p> <p><a href="#">Order S</a></p> <p><a href="#">Order UI</a></p> <hr/> <p><a href="#">Recent</a></p> <hr/> <p> <a href="#">Chk</a>  <a href="#">cont</a></p> <p> <a href="#">AMI</a></p>
---	--

СТО 00492374-001-2021

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации  
Департамент образования, научно-технологической политики  
и рыбохозяйственного комплекса  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ,  
РАДИАЦИОННОЙ  
И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ»  
(ФГБНУ «ФЦТРЕ-ВНИВИ»)

---

УТВЕРЖДАЮ

Врио директора  
ФГБНУ «ФЦТРЕ-ВНИВИ»  
  
Насыбуллина Ж.Р.  
«15» / декабрь 2021 г.



СТАНДАРТ ФГБНУ «ФЦТРЕ-ВНИВИ»

ШТАММ ХЛАМИДИЙ «АМК-16» – ВОЗБУДИТЕЛЬ АБОРТА КОЗ

СТО 00492374-001-2021

Казань  
2021



## АКТ

о проверке соответствия качества штамма хламидий «АМК-16» – возбудителя аборта коз требованиям СТО 00492374-001-2021

Казань

8 декабря 2021 г.

Мы нижеподписавшиеся сотрудники ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», зам. директора по научной работе и инновационному развитию ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» Василевский Н.М., зав. отделением вирусологии Евстифеев В.В. ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», ведущий научный сотрудник лаборатории вирусных антропозоонозов Хусаинов Ф.М., младший научный сотрудник лаборатории вирусных антропозоонозов Яковлев С.И., составили настоящий акт о проверке соответствия качества штамма хламидий «АМК-16» – возбудителя аборта коз требованиям СТО 00492374-001-2021 разработанного ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

Лиофилизированный штамм хламидий «АМК-16» – возбудителя аборта коз хранится в спец. лаборатории ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

Контроль качества штамма проводили по следующим показателям: внешний вид, наличие посторонних примесей, плесени, трещин ампул, контаминации бактериальной, грибковой микрофлорой, микоплазмами, инфекционная активность и специфичность.

Результаты проверки отражены в таблице.

#### Заключение

В результате проведенных проверок установлено следующее:

1. Штамм хламидий «АМК-16» – возбудителя аборта коз относится к порядку Chlamydiales, семейству Chlamydiaceae, роду Chlamydia, виду *C. psittaci*.

2. Штамм хламидий «АМК-16» – возбудителя аборта коз стерильны в отношении бактериальной и грибковой микрофлоры.

Таблица

Результаты испытания соответствия качества штамма хламидий «АМК-16» – возбудителя аборта коз требованиям СТО 00492374-001-2021

Наименование показателей	Характеристика и норма
Внешний вид	Сухая гомогенная масса в виде таблетки белого цвета запаянная в ампулах (Master seed)  Working seed представляют собой аморфную массу тёмно-розового цвета
Наличие посторонних примесей, плесени, трещин флаконов, нарушение укупорки	Не обнаружено
Контаминация бактериями и грибами	Стерильны
Активность	Инфекционная активность штамма хламидий «АМК-16» составила $10^{-5,4}$ ЭЛД <sub>50</sub> /0,3 мл – в нативном виде и $10^{-4,8}$ ЭЛД <sub>50</sub> /0,3 мл – в лиофилизированном виде
Специфичность	В мазках отпечатках из желточных оболочек инфицированных куриных эмбрионов (КЭ) штаммом хламидий «АМК-16» в РИФ выявлялось специфическое свечение  При проверке антигенной специфичности штамма хламидий «АМК-16» в РСК со стандартными антигенами и сыворотками была установлена их принадлежность к роду хламидий

3. Штамм хламидий «АМК-16» – возбудителя аборта коз специфичны и обладают выраженной инфекционной активностью для развивающихся эмбрионов кур.

4. Штамм хламидий «АМК-16» – возбудителя аборта коз может использоваться в качестве производственного при изготовлении препаратов

для диагностики и специфической профилактики и соответствует требованиям СТО 00492374-001-2021.

Подписи:

- |  |   |                  |
|--|---|------------------|
| 1. Зам. директора ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»                                |   | Василевский Н.М. |
| 2. Зав. отделения вирусологии<br>ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»                 |   | Евстифеев В.В.   |
| 3. Ведущий научный сотрудник лаборатории<br>вирусных антропозоонозов |   | Хусаинов Ф.М.    |
| 4. Младший научный сотрудник лаборатории<br>вирусных антропозоонозов |  | Яковлев С.И.     |



Министерство сельского хозяйства РФ  
Департамент ветеринарии и животноводства

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ, РАДИАЦИОННОЙ  
И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)

420075, г. Казань, Научный городок-2 тел. (843) 239-53-20, 239-53-11  
тел./факс: (843) 239-71-73, 239-71-33. e-mail: vnivi@mail.ru ИНН – 1660022161, КПП – 166001001

«5» сентября 2017 г.

ПАСПОРТ  
на штамм хламидий

1. Наименование штамма, / принятая международная терминология / условное обозначение или номер	<i>Chlamydia psittaci</i> – возбудитель хламидиоза коз, штамм «АМК-16»
2. Где, кем, когда и от какого вида животного выделен	Лаборатория вирусных и хламидийных инфекций ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Авторы: Ф.М. Хусайнов, В.В. Евстифеев, С.И. Яковлев. Штамм выделен в 2016 году от козы
3. Характеристика штамма / эпизоотический, вакцинный, производственный	Эпизоотический
4. Основные свойства, характеризующие штамм / таксономия: вид, к которому отнесен штамм	Штамм относится к порядку Chlamydiales, семейству Chlamydiaceae, роду Chlamydia, виду <i>C. psittaci</i>
5. Где / в каком учреждении храниться штамм	Штамм хранится в лаборатории вирусных и хламидийных инфекций
6. Преобладающий тропизм / нейротропность и др.	Пантропный
7. Примененный способ хранения штамма в учреждении (t °C)	Хранится в нативном состоянии при температуре минус -40 °C
8. Восприимчивые животные / естественно восприимчивые и лабораторные / методы заражения	Козы; белые мыши – к интраназальному, внутрибрюшинному, подкожному заражению; куриные эмбрионы (КЭ) – к заражению в желточный мешок
9. Серологическая характеристика / антигенные свойства штамма	Штамм имеет антигенную активность в РСК
10. Титр штамма	Титр определен на КЭ и составляет $10^{5,4}$ ЭЛД <sub>50</sub> /0,3 см <sup>3</sup> для нативного материала. Основная гибель КЭ наблюдается на 6-11 сутки после заражения
11. Температура хранения (t °C)	-40 °C
12. Дополнительные сведения о штамме	Стерилен в отношении бактерий и грибов. Штамм «АМК-16» прошел более 10 пассажей на КЭ сохраняя исходные биологические свойства

Зав. лаб. вирусных и хламидийных инфекций, д.б.н., доцент

В.В. Евстифеев

Зав. лаб. коллекции микроорганизмов, к.б.н.

С.В. Иванова

**Министерство сельского хозяйства Российской Федерации  
Департамент образования, научно-технологической политики  
и рыбохозяйственного комплекса  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ, РАДИАЦИОННОЙ  
И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ»  
(ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)**

420075, г. Казань, Научный городок-2 тел. (843) 239-53-20, 239-53-11  
тел./факс: (843) 239-71-73, 239-71-33. e-mail: vniivi@tupko.ru ИНН – 1660022161, КПП – 166001001

**СПРАВКА**

№ 2 от «14» сентября 2021 г.  
о депонировании штамма «АМК-16» –  
возбудителя хламидиоза коз

Авторы: Евтифеев В.В., Хусаинов Ф.М., Яковлев С.И. (Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, 420075, г. Казань, Научный городок -2).

Штамм «АМК-16» – возбудителя хламидиоза коз, выделенный в 2016 г. из плаценты козы, отнесен к порядку Chlamydiales, сем. Chlamydiaceae, роду Chlamydia, виду *C. psittaci*.

Штамм депонирован «5» сентября 2017 г.

Штамму «АМК-16» – возбудителя хламидиоза коз присвоен регистрационный номер (ссылка): №11 в Федеральном центре токсикологической, радиационной и биологической безопасности (420075, г. Казань, Научный городок -2, ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»).

Местом хранения штамма «АМК-16» – возбудителя хламидиоза коз определена коллекция микроорганизмов Федерального центра токсикологической, радиационной и биологической безопасности (г. Казань, Научный городок-2).

Врио директора  
ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»

 Насыбуллина Ж.Р.

Зав. отделения бактериологии  
ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»

 Косарев М.А.

Зав. лабораторией коллекции  
штаммов микроорганизмов

 Артемьева Е.А.