

На правах рукописи

**БАКИРОВ ИЛЬЯС ХАСАНОВИЧ**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ  
ХЛАМИДИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЖИВОТНЫХ**

16 00 03 – ветеринарная микробиология, вирусология,  
эпизоотология, микология с микотоксикологией  
и иммунология  
03 00.07 – микробиология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук



Казань – 2007

Работа выполнена в ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им Н Э Баумана» и ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности» (г Казань)

Научный руководитель доктор ветеринарных наук, профессор  
**Равилов Рустам Хаметович**

Научный консультант кандидат биологических наук,  
**Вафин Рамиль Ришадович**

Официальные оппоненты доктор ветеринарных наук, профессор  
**Хазипов Нариман Залилович**

доктор ветеринарных наук, профессор  
**Фанзов Тагир Хадиевич**

Ведущее учреждение ФГОУ ВПО «Чувашская государственная сельскохозяйственная академия»

Защита состоится **30 мая 2007** года в **14** часов на заседании диссертационного совета Д-220 034 01 при ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им Н Э Баумана» (420074 г Казань, ул Сибирский тракт, 35)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им Н Э Баумана» (420074 г Казань, ул Сибирский тракт, 35)

Автореферат разослан 26 апреля 2007 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
профессор



Ежкова М С

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Хламидиоз – контагиозная болезнь человека и животных, которая характеризуется широким спектром клинических проявлений заболевания – абортными, мертворождениями, рождением нежизнеспособного приплода, пневмониями, конъюнктивитами, энтеритами, артритами, энцефалитами, уретритами и другими клиническими признаками. Частое латентное, стертое или хроническое течение инфекционного процесса при хламидиозе, значительно усложняет контроль хламидийных энзоотий. Лабораторные методы диагностики хламидиоза, основанные на обнаружении возбудителя путем световой и люминесцентной микроскопии, выделения инфекционного агента на куриных эмбрионах, выявлении в сыворотках крови больных и переболевших животных специфических антител, имеют ряд недостатков, связанных с низкой чувствительностью и специфичностью, а также длительностью получения ответа. Кроме того, возбудитель хламидиоза – внутриклеточный паразит со своеобразным циклом развития, геномика которого в настоящее время является перспективным объектом исследований микробиологов [Rasmussen S J, Timms P, 1992].

Исходя из этого, ведущим направлением в исследовании хламидиоза является молекулярно-биологические методы индикации и идентификации хламидий – ПЦР, анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов, секвенирование ДНК и другие [Grayston J T, 1989, Kaltenboeck B et al, 1992, Everett K D et al, 1999, Hartley J C, 2001].

На сегодняшний день таксономия и классификация хламидий постоянно совершенствуется, главным образом благодаря анализу генома микроорганизма [Kaltenboeck B et al, 1992, Everett K D et al, 1999]. По мнению некоторых исследователей в настоящее время изучаются штаммы, которые являются кандидатами на регистрацию новых видов хламидий.

Современная таксономия хламидий базируется на нуклеотидной последовательности консервативных видоспецифичных генетических маркеров – 16S и 23S фрагментов РНК, хотя для классификации видов хламидий также пригодны гены, кодирующие белки наружной мембраны (omp1 и omp2) хламидий [Zimmerman P A, 1989, Kaltenboeck B et al, 1992, Everett K D et al, 1999, Hartley J C, 2001], что позволяет более точно характеризовать виды хламидий по генетическому признаку.

**Цель и задачи исследований.** Целью работы являлись молекулярно-генетические исследования штаммов хламидий на предмет их таксономической

принадлежности, на основании сравнительного анализа участков генов, кодирующих синтез белков наружной мембраны (omp1 и omp2) возбудителя

В соответствии с целью работы для решения были поставлены следующие задачи

- протестировать протоколы ПЦР-амплификации фрагментов omp1- и omp2-генов хламидий с использованием электрофоретического анализа продуктов реакции, при выделении ДНК возбудителя из клинических образцов,
- определить нуклеотидную последовательность амплифицируемых фрагментов omp1- и omp2-генов у хламидий штаммов «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93»,
- произвести сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей участков генов, кодирующих синтез белков наружной мембраны (omp1 и omp2) у разных штаммов хламидий,
- провести филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей участков генома хламидий штаммов «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93»,
- изолировать новый штамм хламидий от кошек, изучить его биологические свойства

**Научная новизна.** Подобран регламент выполнения полимеразной цепной реакции с препаратами ДНК хламидий для праймеров Ch1 и Ch2, 5GPF и 3GPB

Показана возможность дифференциации хламидий внутри вида путем электрофоретического разделения продуктов рестрикции амплификатов в агарозном геле

Впервые определены нуклеотидные последовательности амплифицируемых фрагментов omp1- и omp2-генов у хламидий штаммов «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93»

Впервые проведен филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей исследуемых штаммов хламидий («Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93»)

Изолирован новый штамм хламидий от кошек при конъюнктивите, а также изучены его биологические свойства

**Практическая ценность.** Апробированы молекулярно-генетические методы, позволяющие дифференцировать хламидий как внутри рода, так и внутри вида

Полученные результаты могут быть использованы для определения видовой принадлежности штаммов хламидий в медицинских и ветеринарных лабораториях. Данные опубликованы в глобальной электронной базе данных

European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Англия, GenBank (NCBI), США, DNA Data Bank of Japan (DDBJ), Япония

Результаты исследований позволили подтвердить хламидийную природу конъюнктивитов среди поголовья кошек в г Казани. Изолированный при этом штамм возбудителя хламидиоза обладает выраженными антигенными и иммуногенными свойствами

**Апробация работы.** Основные положения диссертации доложены на

- Научно-практической конференции “Ветеринарная медицина домашних животных” (Казань, 2005 и 2006 гг ),
- Ежегодных итоговых заседаний проблемных советов ФГОУ ВПО “Казанская академия ветеринарной медицины им Н Э Баумана” (2004-2006 гг ),
- Научно-практической конференции молодых ученых ФГОУ ВПО “Казанская академия ветеринарной медицины им Н Э Баумана” (Казань, 2006 г ),
- XIV Московском международном ветеринарном конгрессе (Москва, 2006 г )

**Публикация результатов исследований.** По теме диссертации опубликовано 11 научных работ

**Основные положения, выдвигаемые для защиты:**

- протоколы полимеразной цепной реакции со специфичными праймерами для эффективной индикации и идентификации хламидий,
- рестрикционная картина и нуклеотидная последовательность фрагментов генома хламидий штаммов «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93»,
- филограммы хламидий, построенные на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов *omp1*- и *omp2*-генов,
- характерные биологические свойства нового штамма хламидий, изолированного от кошек

**Объем и структура диссертационной работы.** Диссертация изложена на 123 страницах компьютерного текста (текстовый редактор “Microsoft Word 2003”, стиль “Times New Roman”, размер шрифта 14 пт, интервал полуторный) и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований (4 главы), обсуждение результатов исследования, выводы, практические предложения и указатель литературы (всего 220 источников, в том числе 208 иностранных и 12 ссылок на сайты Internet) Диссертация иллюстрирована 10 таблицами и 9 рисунками. Прилагаются документы, подтверждающие научно-практическую ценность работы

## 2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в 2004-2007 гг на кафедре эпизоотологии с/х животных, кафедре патологии мелких животных и оперативной хирургии ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им Н Э Баумана», лабораториях вирусологии и биохимии ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности»

На отдельных этапах работы исследования проводили совместно со старшим научным сотрудником, к в н. Евстифеевым В В и старшим научным сотрудником, к в н Ахмадеевым Р М, за что выражаем им свою искреннюю благодарность

В работе были использованы имеющиеся в нашем распоряжении 4 штамма хламидий «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93», выделенные соответственно от овцы, коровы, песца и собаки Также в нашей работе был использован вновь выделенный нами штамм хламидий от кошки при конъюнктивите – «КК-05» Все штаммы адаптированы к размножению в куриных эмбрионах

В работе в качестве лабораторных моделей были использованы 6-7 дневные развивающиеся куриные эмбрионы – 200 шт, белые мыши массой 10-25 гр – 320 гол, морские свинки массой 150-350 гр – 25 гол, котята 2-3-месячного возраста – 7 гол

Для амплификации фрагмента *omp2*-гена хламидий использовали семействоспецифичные праймеры, сконструированные Hartley J C с соавт [2001] Для амплификации фрагмента *omp1*-гена хламидий использовали специфичные праймеры, сконструированные Kaltenboeck В с соавт [1992]

Секвенирование продуктов амплификации *omp2*-гена с праймерами Ch1 и Ch2 и *omp1*-гена с праймерами 5GPF и 3GPB штаммов хламидий «Ростиново-70», «250» «ПП-87» и «КС-93» выполнено на приборе ABI-300 в лабораториях НПО «СибЭнзим»

Секвенированные последовательности исследованных штаммов хламидий *omp2*- и *omp1* генов были проанализированы в сравнении с опубликованными геномами штаммов 6 видов рода *Chlamydophila psittaci*, *abortus*, *felis*, *caviae*,

рнеумонае и ресогум, используя программу CLUSTAL W (v 1,83) Multiple Sequence Alignments При построении филограммы использовали алгоритм NJ

Код входа в базы данных Генбанка (англ GenBank accession number-A/N) последовательности omp1- гена соответственно – X56980, M73037, AF269282, NC\_000922, M73034, последовательности omp2-гена соответственно – M61116, U76760, AF367407, U41759, U76761, X53511

Выделение, идентификацию и изучение биологических свойств (патогенность, токсичность, антигенность и иммуногенность) нового штамма хламидий проводили общепринятыми методами В качестве серологических тестов использовали РСК, РИФ и ИФА

## 2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.2.1. Индикация хламидий в ПЦР по локусу omp1-гена с праймерами 5GPF и 3GPB и их идентификация путем анализа ПДРФ

После проведения ПЦР, используя праймеры 5GPF и 3GPB, с экстрактами ДНК штаммов хламидий «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93» у всех 4 штаммов были зарегистрированы одинаковые результаты в виде одного цельного ампликона длиной 1378 пн При последующем эндонуклеазном расщеплении продуктов амплификации ферментом HaeIII были получены 2 дискретных фрагмента длиной 1070 и 308 пн

Результаты анализа ПДРФ ПЦР-продуктов (с праймерами 5GPF и 3GPB) имеющихся в нашем распоряжении штаммов хламидий показывают, что они отличаются от других микроорганизмов рода *Chlamydomphila* (таблица 1)

#### 1 Результаты ПЦР участка omp1-гена представителей рода *Chlamydomphila* и анализа ПДРФ после обработки ампликонов ферментом HaeIII

шт Ростиново-70		С abortus шт B577		С psittaci шт 6BC		С felis шт FEPN		С caviae шт GPIC	
-	HaeIII	-	HaeIII	-	HaeIII	-	HaeIII	-	HaeIII
1378	1070 308	1372	1372	1411	987 424	1381	1073 257 51	1372	642 302 201 197 30

### 2.2.2. Индикация хламидий в ПЦР по локусу *omp2*-гена с праймерами Ch1 и Ch2 и их идентификация методом анализа ПДРФ

После проведения ПЦР, используя праймеры Ch1 и Ch2, с экстрактами ДНК штаммов хламидий «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93» у всех 4 штаммов были зарегистрированы одинаковые результаты в виде одного цельного ампликона длиной 587 пн. При последующем эндонуклеазном расщеплении продуктов амплификации ферментом *AluI* были получены 4 дискретных фрагмента длиной 192, 160, 140 и 95 пн.

Результаты анализа ПДРФ ПЦР-продуктов (с праймерами Ch1 и Ch2) имеющихся в нашем распоряжении штаммов хламидий показали, что они отличаются от представленных референтных штаммов микроорганизмов рода *Chlamydomphila* (таблица 2).

2 Результаты ПЦР участка *omp2*-гена представителей рода *Chlamydomphila* и анализа ПДРФ после обработки ампликонов ферментом *AluI*

шт Ростиново-70		С abortus шт S26/3		С psittaci шт 6BC		С felis шт FEPN		С caviae шт GPIC		С pneumoniae шт IOL207		С pecorum шт W73	
-	<i>AluI</i>	-	<i>AluI</i>	-	<i>AluI</i>	-	<i>AluI</i>	-	<i>AluI</i>	-	<i>AluI</i>	-	<i>AluI</i>
587	192	587	352	587	227	590	225	590	355	584	457	587	394
	160		235		220		140		140		127		193
	140				140		95		95				
	95						85						
							45						

### 2.2.3. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей секвенированных штаммов

Нуклеотидные последовательности амплифицированных участков *omp1*- и *omp1*-генов штаммов «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93» имели между собой 100% гомологию. Поэтому при филогенетическом анализе были использованы полученные нами данные по секвенированию фрагментов ДНК штамма хламидий «Ростиново-70».

Гетерогенность указанного штамма хламидий с официально зарегистрированным видам рода *Chlamydomphila* по нуклеотидной последовательности фрагментов *omp2*- и *omp1*-генов представлены в таблице 3. Филогенетический анализ выравненных последовательностей фрагментов *omp1*- и *omp2*-генов штамма «Ростиново-70» с некоторыми штаммами официально зарегистрированных видов хламидий позволил определить его гетерогенность, которая в

сравнении с ближайшим аналогом – *Chlamydomphila abortus* – составляет соответственно 14 и 1,36%

### 3 Гетерогенность изучаемых штаммов хламидий с представленными микроорганизмами рода *Chlamydomphila*

Штамм	Ген	<i>C abortus</i>	<i>C psittaci</i>	<i>C felis</i>	<i>C caviae</i>	<i>C pneumoniae</i>	<i>C pecorum</i>
Ростиново-70	omp2	1,36%	3,58%	10,17%	10%	22,09%	27,77%
	omp1	14%	21%	21%	22%	30%	32%

С использованием алгоритма NJ программы CLUSTAL W (v 1,83) Multiple Sequence Alignments [<http://align.genome.jp>] нами были построены филограммы, которые дали родословные дендрограммы анализируемых видов рода *Chlamydomphila* по амплифицированным фрагментам omp2- и omp1-генов (рисунок 1)

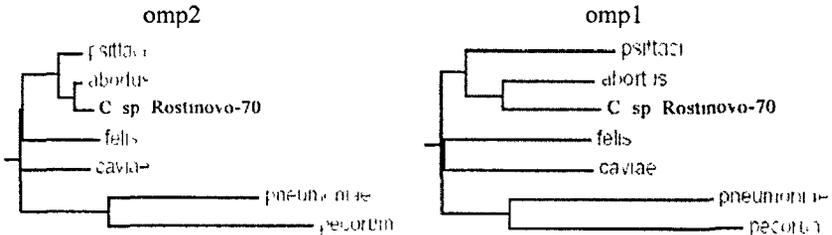


Рис 1 Филограммы представителей рода *Chlamydomphila*, построенные по сравнительному анализу нуклеотидных последовательностей амплифицированным фрагментам omp2- и omp1-генов

Последовательности omp1- и omp2-генов ДНК штамма хламидий «Ростиново-70» опубликованы на сайте NCBI (GenBank, США) [<http://ncbi.nlm.nih.gov>], в системе EMBLE-EBI (European Bioinformatics Institute, Англия) [<http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz>], а также DDBJ (DNA Data Bank of Japan, Япония) [<http://srs.ddbj.nig.ac.jp/cgi-bin/wgetz>]

#### 2.2.4. Выделение нового штамма хламидий от кошек

В качестве клинического материала для выделения возбудителя хламидиоза были использованы смывы с конъюнктивы у кошки с признаками острого конъюнктивита. Хламидии были выделены на развивающихся куриных эмбрионах в первом же пассаже, штамм был назван «КК-05» («Казанский коша-

чий – 2005 года выделения»), специфическая гибель в первом пассаже наступала на 8-12 сутки после заражения

Для идентификации хламидий из очищенной культуры изолята готовили комплементсвязывающий антиген, который испытывали в РСК в параллельных реакциях с иммунной сывороткой, полученной путем гипериммунизации морской свинки штаммом «КК-05», а также стандартными антигенами и позитивными сыворотками, изготовленными из возбудителя хламидиоза овец (штамм «Ростиново-70») и орнитоза (штамм «Лори») (таблица 4)

#### 4 Результаты идентификации штамма хламидий «КК-05» в РСК

Гипериммунные сыворотки, полученные к штаммам хламидий	Антигены		
	«КК-05»	«Ростиново-70»	«Лори»
«КК-05»	160 <sup>x</sup>	320	20
«Ростиново-70»	160	640	40
«Лори»	10	80	20

Обозначение <sup>x</sup> – обратная величина титров антител

Приведенные в таблице 4 данные свидетельствуют о принадлежности штамма микроорганизмов «КК-05» к хламидиям. В настоящее время штамм адаптирован к размножению в развивающихся куриных эмбрионах, прошел 15 пассажей, для длительного хранения хламидиосодержащий материал указанного штамма был подвергнут лиофилизации. Инфекционный титр нативного материала штамма «КК-05» составил  $10^{-5.5}$  ЭЛД<sub>50</sub>/0,3 мл

#### 2.2.5. Биологические свойства вновь выделенного штамма хламидий

Патогенность штамма, выделенного от кошки, для лабораторных животных изучали на белых мышах и морских свинках

Изолят показал наибольшую вирулентность для белых мышей, при интрацеребральном, внутривенном и интраназальном заражении. При этом гибель 100% инфицированных лабораторных животных наступала при всех трех методах введения хламидиосодержащей суспензии. При сравнительном изучении чувствительности белых мышей к разным способам введения хламидиосо-

держашего материала наименьшая патогенность хламидий была выявлена при подкожной инъекции. При этом способе инфицирования у белых мышей реакция на введение суспензий хламидий составляла 40% от общего числа зараженных (таблица 5)

#### 5 Патогенность штамма «КК-05» для лабораторных животных

Вид животных	Кол-во животных	Способ заражения	Доза заражения	Процент летальности
Морские свинки	4	и/н	0,1	0
	4	и/ц	0,05	0
	4	в/б	2,0	0
	4	п/к	2,0	0
Белые мыши	10	в/в	1 0	100
	10	и/н	0,05	100
	10	и/ц	0,03	100
	10	в/б	0,5	50
	10	п/к	0,5	40

Клиническая картина у белых мышей при внутривенном заражении характеризовалась взъерошенностью шерстного покрова, нарушением координации движения (динамическая и статическая атаксия), снижением подвижности на вторые, а затем гибелью на 3-6 сутки после заражения. При вскрытии у павших обнаруживали увеличение и полнокровие печени и селезенки. При интраназальном инфицировании белые мыши заболели на 5-9 день. У них развивалась вялость, отсутствие пищевой возбудимости, шерсть теряла блеск, наблюдался конъюнктивит. Гибель зараженных животных наступала на 12-15 сутки после введения возбудителя. При вскрытии трупов наблюдали очаговое или генерализованное поражение легких. При интрацеребральном инфицировании заболевание наступало на 3-4 сутки и характеризовалось резким угнетением, атаксией как статической, так и динамической в начальной стадии и параличами в терминальной. Белые мыши погибали на 5-8 сутки при бурном нарастании нервных явлений. У некоторых лабораторных животных отмечали конъюнктивит. При вскрытии трупов отмечали отек мозга, яркое проявление рисунка сосудов мозга, увеличение печени и селезенки. После внутривенного введения хламидиосодержащей суспензии у подопытных лабораторных животных разви-

васаль типичная картина хламидиоза генерализованного характера, смерть в таком случае наступала на 3-4 сутки

При внутрибрюшинном и подкожном инфицировании у подопытных белых мышей на 4-7 сутки отмечали развитие слабых признаков заболевания в виде угнетения, отсутствия пищевой возбудимости и других неспецифических симптомов У некоторых животных (соответственно у 50 и 40% из числа зараженных) болезнь приобретала злокачественный характер и они погибали на 15-20 сутки При вскрытии у павших обнаруживали скопление жидкости в брюшной полости и увеличение селезенки (при внутрибрюшинном инфицировании)

В мазках-отпечатках, приготовленных из головного мозга и паренхиматозных органов (легкие, печень, селезенка и почки) белых мышей, при световой и люминесцентной микроскопии обнаружены морфологические структуры хламидий Из патологического материала от павших белых мышей во всех случаях хламидии были реизолированы и идентифицированы

При внутрибрюшинном и интраназальном введении 10%-ной хламидио-содержащей суспензий у морских свинок наблюдалась слабо выраженная реакция повышение температуры тела до 39,4-39,6<sup>0</sup>С, угнетенное состояние, снижение пищевой возбудимости, развитие конъюнктивита на 2-3 сутки после инфицирования, однако на 4-5 сутки клиника заболевания исчезала и гибели этих лабораторных животных мы не наблюдали Подкожное и интрацеребральное введение инфекционного материала также не вызывало гибель подопытных лабораторных животных

Оставшиеся в живых после инфицирования морские свинки были убиты через месяц после заражения Перед этим у них из сердца брали кровь для выявления в сыворотке специфических антител в РСК и ИФА При внутрибрюшинном инфицировании титры антител составили 1 5-1 40 и 1 100-1 200, при подкожном инфицировании 1 5-1 20 и 1 100 соответственно

В мазках-отпечатках, приготовленных из головного мозга и паренхиматозных органов (легкие, печень, селезенка и почки) убитых морских свинок, при световой и люминесцентной микроскопии были обнаружены соответственно мор-

фологические структуры и специфическое свечение скопления антигена хламидий в клетках

Возбудитель был реизолирован из тканей и органов инфицированных морских свинок. Установлено, что при интрацеребральном инфицировании возбудитель, в основном, локализовался в головном мозге и селезенке, при подкожном – в печени, селезенке и почках.

С целью изучения патогенности штамма «КК-05» для кошек были заражены шесть месячных котят, 3 из них подкожно, 3 – внутривентрально. При этом у инфицированных животных наблюдали повышение температуры тела на  $1-1,5^{\circ}\text{C}$ , нарушение пищевой возбудимости и угнетенное состояние.

У двух котят (по одному зараженному подкожно и внутривентрально) были зарегистрированы признаки одностороннего конъюнктивита.

Путем исследования в РСК и ИФА установлено накопление специфических антител в сыворотках крови зараженных котят в титрах 1 5-1 80 и 1 100-1 400 соответственно. При вскрытии вынужденно убитых животных были обнаружены увеличение и дистрофия печени, кровоизлияния под капсулой почек и увеличение поджелудочной железы. При помощи световой и люминесцентной микроскопии были обнаружены соответственно морфологические структуры и антиген хламидий в патологическом материале.

При определении токсичности штамма изолированного от кошек на белых мышях, путем внутривенного введения 10%-ной свежеприготовленной хламидиосодержащей суспензии, было установлено, что изолят хламидий от кошек не обладает токсичностью, т.е. не наблюдается гибели белых мышей в течение первых 24 часов после введения им указанного инфекционного материала.

Результаты изучения антигенной активности штамма хламидий «КК-05» представлены в таблице 6. Данные таблицы 6 показывают, что из трех штаммов выделенных от плотоядных, наибольшую антигенную активность в перекрестных исследованиях имеют штаммы «ПП-87» и «КК-05». По этим свойствам они сравнимы с производственным штаммом «Ростиново-70», используемым

при изготовлении специфических антигенов и сывороток для диагностики хламидиозов сельскохозяйственных животных в РСК

### 6 Характеристика антигенных свойств штаммов хламидий

Гипериммунные сыворотки, полученные к штаммам	Титр антител при исследовании сывороток в РСК с антигеном из штамма				
	«КК-05»	«Ростиново-70»	«250»	«ПП-87»	«КС-93»
«КК-05»	320 <sup>x</sup>	320	40	320	160
«Ростиново-70»	320	640	160	320	160
«250»	320	512	160	—	—
«ПП-87»	320	640	40	640	160
«КС-93»	20	320	—	160	160

Примечание <sup>x</sup> - приведена обратная величина титров антител

Для изучения иммуногенных свойств штамма хламидий «КК-05» были получены очищенные и сконцентрированные культуры хламидий по схеме, описанной в предыдущих главах. Затем хламидии были инактивированы 0,4%-ным (в конечной концентрации) формалином в течение 5 суток при 37<sup>0</sup>С. Взвесь, содержащую белок в количестве 30 мг/мл, вводили белым мышам внутрибрюшинно в дозе 0,5 мл.

Через 20 дней опытных и контрольных (интактных) белых мышей заражали 10%-ной взвесью желточных оболочек КЭ, инфицированных штаммом хламидий «КК-05», имеющей инфекционный титр 10<sup>-5,5</sup> ЭЛД<sub>50</sub>/0,3 мл, в дозе 0,5 мл. Было проведено три серии опытов по 20 мышей в каждой. Полученные результаты представлены в таблице 7.

### 7 Характеристика иммуногенных свойств штамма хламидий «КК-05»

Группы белых мышей	Количество белых мышей в опыте	Количество павших животных	Эффективность иммунизации (%)
опытные	30	4	86,7
контрольные	30	30	-

Проведенные исследования показывают, что однократное внутрибрюшное введение инактивированных формалином хламидий штамма «КК-05» защищает от заражения через 20 дней этим же штаммом 86,7 % белых мышей

### 2.2.6. Молекулярно-генетические исследования нового штамма хламидий

Учитывая тот факт, что видоспецифические праймеры 5GPF и 3GPB, сконструированные Kaltenboeck В с соавт [1993], эффективно иницируют амплификацию локуса *omp1*-гена ДНК хламидий рода *Chlamydophila*, в том числе и *Chlamydophila felis*, мы использовали эти праймеры для идентификации указанного штамма хламидий

При исследовании нового штамма «КК-05» методом ПЦР по фрагменту *omp1*-гена, с использованием праймеров 5GPF и 3GPB, нами был получен 1 ампликон размером от 1370-1390 пн

Представленные данные указывают на его принадлежность к виду *Chl psittaci* по признанной в нашей стране классификации микроорганизмов семейства *Chlamydiaceae* в 1992 году [Ma J J et al , 1987]

Более точные размеры полученного ампликона и сайты его рестрикции различными ферментами можно установить путем прямого секвенирования. Исследования в этом направлении будут продолжены

## 3. ВЫВОДЫ

- 1 Полимеразная цепная реакция с видоспецифичными и семейственно-специфичными искусственно синтезированными олигонуклеотидными праймерами 5GPF/3GPB и Ch1/Ch2 соответственно является эффективным средством индикации и идентификации хламидий
  - ПЦР с экстрактами ДНК хламидий штаммов «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93», используя праймеры 5GPF и 3GPB, дает одинаковые результаты в виде одного цельного ампликона длиной 1378 пн, при последующей рестрикции которого ферментом *HaeIII* образуется 2 дискретных фрагмента длиной 1070 и 308 пн,
  - ПЦР с экстрактами ДНК указанных штаммов хламидий, используя прай-

меры Ch1 и Ch2, также дает одинаковые результаты в виде одного цельного ампликона длиной 587 пн, при последующей рестрикции которого ферментом AluI образуется 4 дискретных фрагмента длиной 192, 160, 140 и 95 пн

- 2 Анализ нуклеотидных последовательностей амплифицируемых фрагментов *omp1*- и *omp2*-генов свидетельствует об их высокой внутривидовой консервативности у штаммов «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93» со 100% гомологией
- 3 Охарактеризованные нами штаммы «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93» могут быть соотнесены в новый оригинальный вид хламидий, ранее системно не изученный молекулярно-биологическими методами и, соответственно, не рассмотренный юридической комиссией Международной ассоциации Микробиологических обществ
  - филогенетический анализ выравненных нуклеотидных последовательностей фрагмента *omp1*-гена штамма «Ростиново-70» с некоторыми штаммами официально зарегистрированных видов хламидий позволил определить его гетерогенность, которая в сравнении с ближайшим аналогом – видом *Chlamydomphila abortus* – составляет 14%,
  - филогенетический анализ выравненных нуклеотидных последовательностей фрагмента *omp2*-гена позволил определить его гетерогенность, которая в сравнении с ближайшим аналогом – видом *Chlamydomphila abortus* – составляет 1,36%
- 4 Филограммы на основе выравнивания нуклеотидных последовательностей *omp1*- и *omp2*-генов изучаемых штаммов и некоторых представителей официально зарегистрированных видов хламидий свидетельствуют, что по генетическому критерию первые занимают промежуточное положение между видами *Chlamydomphila abortus* и *Chlamydomphila psittaci*
- 5 Изолирован новый штамм хламидий («КК-05») от кошек при конъюнктивите, который обладает характерными биологическими свойствами
  - инфекционный титр штамма для куриных эмбрионов составляет  $10^{-5.5}$  ЭЛД<sub>50</sub>/0,3 мл,

- при интрацеребральном, внутривенном и интраназальном инфицировании белых мышей штамм вызывает гибель 100%, а при внутрибрюшном и подкожном – 50 и 40% зараженных животных,
- заражение штаммом морских свинок и котят не вызывает их гибели,
- инфицирование штаммом белых мышей, морских свинок и котят вызывает образование специфических антител, выявляемых в РСК и ИФА в диагностических титрах,
- штамм не обладает токсичностью,
- по антигенной активности штамм хламидий «КК-05» сравним с производственным штаммом «Ростиново-70»,
- однократное внутрибрюшное введение инактивированных формалином хламидий штамма «КК-05» защищает от заражения через 20 дней этим же штаммом 86,7 % иммунизированных белых мышей

#### 4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

- 1 Полученные данные позволят повысить уровень знаний о природе хламидий и эффективно использовать полученную информацию при научных исследованиях и в практической деятельности ветеринарных специалистов
- 2 Протестированы протоколы проведения ПЦР с использованием видо- и семействоспецифичных праймеров 5GPF/3GPB и Ch1/Ch2 соответственно, которые позволяют проводить эффективную индикацию и идентификацию хламидий как в клиническом, так и в патологическом материале.
- 3 Материалы исследований опубликованы на интернет-сайтах GenBank (NCBI), США, European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Англия, DNA Data Bank of Japan (DDBJ), Япония
- 4 Полученные данные используются в учебном процессе на кафедре эпизоотологии, кафедре патологии мелких животных и оперативной хирургии ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им НЭ Баумана»

**5. СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

- 1 Бакиров, И Х Индикация и идентификация хламидий в ПЦР со специфическими праймерами / Бакиров И Х , Вафин Р Р , Равилов Р Х , Исаков Г М // Материалы научно-практической конференции «Ветеринарная медицина домашних животных», Казань, 2005 – С 26-30
- 2 Бакиров, И Х Результаты секвенирования штаммов хламидий, выделенных от сельскохозяйственных и мелких животных / Вафин Р Р , Равилов Р Х , Гафаров Х З , Равилов А З , Исаков Г М , Бакиров И Х , Вафин Р Р // Материалы научно-практической конференции «Ветеринарная медицина домашних животных», Казань, 2005 -С 34-37
- 3 Бакиров, И Х Новый штамм хламидий, изолированный от кошек при конъюнктивите/ Евстифеев В В , Хусаинов Ф М , Бакиров И Х , Равилов Р Х , Кашов В Н , Исаков Г М // Материалы научно-практической конференции «Ветеринарная медицина домашних животных», Казань, 2005 – С 45-47
- 4 Бакиров, И Х Анализ результатов секвенирования штаммов хламидий / Бакиров И Х // Материалы научно-практической конференции «Научно-практическая конференция молодых ученых», Казань, 2006 - С 7
- 5 Бакиров, И Х Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов продуктов амплификации хламидий / Бакиров И Х , Вафин Р Р // Материалы научно-практической конференции «Научно-практическая конференция молодых ученых», Казань, 2006 - С 8
- 6 Бакиров, И Х Выделение нового штамма хламидий при конъюнктивите у кошек / Евстифеев В В , Хусаинов Ф М , Бакиров И Х , Кашов В Н , Исаков Г М , Равилов Р Х // Материалы всероссийского ветеринарного конгресса «Международный Московский конгресс по болезням мелких домашних животных», Москва, 2006 – С 5
- 7 Бакиров, И Х Биологические свойства штамма хламидий, выделенного при конъюнктивите у кошек / Бакиров И Х , Равилов Р Х , Евстифеев В В , Хусаинов Ф М , Кашов В Н , Исаков Г М // Материалы научно-практической конференции «Ветеринарная медицина домашних животных», Казань, 2006 - С 56-59

- 8 Бакиров, И Х Хламидиоз кошек / Бакиров И Х, Рапилов Р Х , Исхаков Г М , Евстифеев В В , Хусаинов Ф М // Ученые записки КГАВМ – Казань 2006 - С 19-26
- 9 European Bioinformatics Institute, England [Электронный ресурс] / EMBL-EBI, England, Вафин Р Р , Рапилов Р Х , Гафаров Х З , Рапилов А З , Исхаков Г М , Бакиров И Х , Кашов В Н, Вафин Р Р - Электрон дан - European Bioinformatics Institute, England, 2006- – Режим доступа [http //srs ebi ac uk/srsbin/cgi-bin/wgetz](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz), свободный
- 10 DNA Data Bank of Japan [Электронный ресурс]/ DDBJ, Вафин Р Р , Рапилов Р Х , Гафаров Х З , Рапилов А З , Исхаков Г М , Бакиров И Х , Кашов В Н , Вафин Р Р - Электрон дан - DNA Data Bank of Japan, 2006- – Режим доступа [http //srs ddbj nig ac jp/cgi-bin/wgetz](http://srs.ddbj.nig.ac.jp/cgi-bin/wgetz), свободный
- 11 GenBank NCBI, USA[Электронный ресурс] /GenBank NCBI, Вафин Р Р , Рапилов Р Х , Гафаров Х З , Рапилов А З , Исхаков Г М , Бакиров И Х , Кашов В Н , Вафин Р Р - Электрон дан - GenBank NCBI, USA, 2006-–Режим доступа [ttp //www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=74423036](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=74423036), [http //www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=74423038](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=74423038), код входа DQ177459, DQ177460 – Загл с экрана

*Отпечатано в ООО «Печатный двор»  
г. Казань, ул. Журналистов, 1/16, оф. 207  
Тел. 272-74-59, 541-76-41, 541-76-51  
Лицензия ПД №7-0215 от 01.11.2001 г.  
Выдана Поволжским межрегиональным  
территориальным управлением МПТР РФ  
Подписано в печать 25.04.2007г. Усл. п. л. 1,19  
Заказ № К-6377 Тираж 100 экз. Формат 60x84 1/16  
Бумага офсетная Печать - ризография*