

шую государственные испытания, были получены нормативные документы: «Инструкция по применению тест-системы для выявления *Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum* методом полимеразной

SUMMARY

The characteristic of the developed test - system for revealing *Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum* by a method polymerase chain reaction (PCR) with the help nested primers.

цепной реакции (ПЦР) с помощью гнездовых праймеров» и Технические Условия на эту тест-систему ТУ 9388-001-05095732-2006 (Россельхознадзор, регистр. № ПБР-1-2.6/01846 от 20 февраля 2007 года).

Литература

1. Nicholson L.A. Phylogenetic relationship of *Fusobacterium necrophorum* A, AB, and B biotypes based upon 16S rRNA gene sequence analysis/ L.A. Nicholson, C.J. Moppow, L.A. Corner et al.// Int. J. Svst. Bacteriol. – 1994. – Vol. 44. – № 2. – P 315–319.
2. Самолов А.А. *Fusobacterium necrophorum*: морфологические, биологические свойства, классификация/ А.А. Самолов // Научное обеспечение ветеринарных проблем в животноводстве: Сб. науч. тр./РАСХН. Сиб. отд-ие. ИЭВ-СибДВ. – Новосибирск, 2000. – С. 399–406.
3. Соломаха О.И. Некоторые морфологические особенности *Fusobacterium necrophorum*/ О.И. Соломаха, Л.В. Кириллов, И.Б. Павлова// Аграрная Россия. – 2000. – № 3. – С.59–61.
4. Методические указания по лабораторной диагностике некробактериоза. (Утвер. ГУВ Юсгропрома СССР 1 июня 1987 г.). – М. – 1987.
5. Resenchuk S.M. Alignment service: creation and processing of alignments of sequences of unlimited length/ S.M. Resenchuk, V.M. Blinov // Comput. Appl. Biosci. – 1995. – № 11. – P 7–11.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. // Молекулярное клонирование. – 1984. – С. 205–240.
7. Maxam F.M., Gilbert W. In: Methods in Enzymology. – 1980. – Vol. 65. – Part. I. – P 499–550.
8. Семенихин В.И., М.А. Филипенко, Н.В.Некрасова, Е.А. Храпов, А.А. Самолов. Генотипирование патогенного биотипа АВ *Fusobacterium necrophorum necrophorum subsp. necrophorum*/ В.И. Семенихин, М.А. Филипенко, Н.В.Некрасова, Е.А. Храпов, А.А. Самолов. // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2003, – № 1. – С.86–90.
9. Семенихин В.И. Транспозоны в передаче патогенных свойств *Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum* биотипа АВ/ А.С. Донченко, В.М. Блинов, Д.В. Сараев, А.А. Самолов, С.В. Лопатин // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2003. – № 4. – С. 84–87.

УДК: 619:616.98:579.882.11:616-076

М.А. Шибаев, С.А. Дудников, Л.Б. Прохвятилова

(ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГУ «ВНИИЗЖ»)

г. Владимир)

ВЫЯВЛЕНИЕ *CHLAMYDOPHILA PECORUM* С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ: ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И РАСПРОСТРАНЕНИЕ

Введение

Хламидиозы – заболевания, обусловленные представителями семейства *Chlamydiaceae* (хламидии), характеризующиеся широким спектром патогенности для разных видов-возрастных групп позвоночных, принадлежащих практически ко всем филогенетическим ветвям, и значительной вариацией форм инфекционного процесса (от бессимптомного носительства до острой манифестной инфекции) и клинических форм: энцефалитной, конъюнктивальной, респираторной, кардиоваскулярной, гастроэнтеральной, генитальной и др. (15, 3, 23).

Хламидии – группа грамотрицательных облигатных внутриклеточных паразитов с характерной для прокариот структурой,

имеющих общую морфологическую характеристику и схожие тинкториальные свойства (10, 3).

Согласно действующей классификации семейство *Chlamydiaceae* разделено на два рода: *Chlamydia* и *Chlamydophila*. В род *Chlamydia* входит три вида: *Chlamydia trachomatis*; *Chlamydia muridarum* и *Chlamydia suis*. Род *Chlamydophila* включает *Chlamydophila pecorum* (*Chl. pecorum*), *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila felis*, *Chlamydophila caviae*, *Chlamydophila pneumoniae*(7, 10).

Возбудители хламидиоза крупного рогатого скота (КРС) относятся к роду *Chlamydophila*, видам: *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila abortus* и *Chl. pecorum*.

Хламидиоз КРС, вызываемый *Chl. pe-*

corum широко распространен в стадах КРС и наносит экономический ущерб животноводческим хозяйствам, особенно при ассоциативной инфекции с вирусными, бактериальными и микоплазменными патогенами. Восприимчивы к заболеванию животные независимо от возраста и породы. Возбудитель ассоциируется с пневмониями, гастроэнтеритами, энцефалитами, полиартритами, уретритами и кератоконъюнктивитами, но часто болезнь протекает в смешанной форме и, как правило, превалирует у телят до 7 месячного возраста. Хламидийная инфекция редко ограничивается локальными поражениями. Чаще всего она последовательно поражает эпителиальный покров слизистых оболочек респираторного, кишечного и урогенитального трактов (2, 4, 5, 12, 13, 14).

Кроме широкого полиморфизма клинических проявлений, для инфекции КРС вызванной *Chl. pecorum* характерны также латентная и персистентная формы инфекционного процесса, которые значительно усложняют эпидемиологический надзор за данным возбудителем и организацию эффективных лечебно - профилактических мероприятий (2). Поэтому в формировании стратегии научно-обоснованных ветеринарно-санитарных и противоэпизо-отических мероприятий при данной инфекции важно обнаружение возбудителя при разных формах заболевания. С этой целью на протяжении последних лет был разработан ряд лабораторных методов прямой и ретроспективной диагностики хламидиозов. Метод выделения возбудителя в культуре клеток или в куриных эмбрионах считается общепринятым эталоном для прямых методов выявления хламидий, однако к недостаткам, существенно затрудняющим его широкое применение, следует отнести трудоемкость и длительность выполнения. К тому же возможность дифференциации хламидий при использовании данного метода ограничивается уровнем семейства или рода (8, 18).

Серологические методы, вследствие перекрестных реакций основных антигенных детерминант хламидий и высокого уровня вариабельности антигенных структур, а также особенностей формирования иммунного ответа, не всегда обладают достаточной специфичностью и чувствительностью (6, 9, 15).

Что касается молекулярно - биологических методов, то в настоящее время они довольно успешно применяются для выявления *Chl. pecorum*, однако, большая их часть

предусматривает использование техники секвенирования или рестрикционного анализа, что увеличивает объем временных и материальных затрат на проведение исследований (11, 14, 16, 17, 19).

Несмотря на разнообразие существующих диагностических методов и широту распространения *Chl. pecorum* в стадах КРС многих стран мира, данных (на момент исследования) о распространенности и генетическом разнообразии популяции вышеуказанного микроорганизма в целом по Российской Федерации (РФ) и в отдельных регионах в изученной литературе нами не обнаружено. Это видимо, связано с отсутствием популяционных исследований в этом направлении.

Целью нашего исследования было:

разработка тест-системы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) для специфической детекции *Chl. pecorum*;

изучение генетического разнообразия *Chl. pecorum* на территории РФ; оценка превалентности данного возбудителя в Центральном Федеральном Округе (ЦФО) РФ;

выявление статистически значимой связи эпидемиологических критериев инфицирования *Chl. pecorum* с клиническими проявлениями, сопровождающимися поражением респираторного тракта у КРС.

Материалы и методы

Данные о нуклеотидных последовательностях гена *ompA* микроорганизмов *Chlamydomphila pecorum*, *Chlamydomphila abortus*, *Chlamydomphila psittaci*, *Chlamydomphila felis*, *Chlamydomphila caviae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia suis* и др. были получены из компьютерной базы данных Genbank (21). Анализ нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей проводили с помощью пакета программ «BioEdit Sequence Alignment Editor» (Hall T.A., версия 70.5.2, 2005) и программы множественного выравнивания программы ClustalW. Выбор праймеров проводили с помощью программы OLIGO (версия 4.0).

Биологические образцы. Исследовались образцы патологического материала от крупного рогатого скота (легкие, тонкий отдел кишечника, фекалии, плаценты и абортированные плоды, сперма, головной мозг, ткани суставов и др.), поступавших для исследования в ФГУ ВНИИЗЖ в течение 2006-2008гг.

Для изучения распространенности *Chl. pecorum* в Центральном Федеральном округе (ЦФО) проводили отбор проб (мазки из

носовой полости от телят в возрасте от 15 дней до 7 месяцев) в ряде хозяйств (n=13) семи областей ЦФО (Московская, Владимирская, Тамбовская, Брянская, Белгородская, Тверская, Костромская). Выбор хозяйств был сделан квазислучайно, согласно предъявляемым требованиям минимальной территориальной репрезентативности выборки в географически удаленных друг от друга точках, исходя из 95% уровня вероятности и 10% превалентности болезни в популяции (минимая превалентность). Это давало нам для бесконечно большой популяции значение в 30 проб из каждого хозяйства. Для непосредственного выбора конечной единицы (животное) применяли простой случайный выбор без возвращения единицы внутри кластера (1). Отбор образцов для анализа осуществляли с использованием одноразовых транспортных систем, состоящих из стерильной пластиковой пробирки и аппликатора с тампоном (COPAN, Италия) с добавлением в качестве транспортной среды стерильного физиологического раствора хлорида натрия. В итоге было отобрано 390 образцов.

В названии изолятов, выявленных в настоящем исследовании цифрами(1, 2, 3, 4) обозначены N-хозяйства одной области; латинские строчные буквы (a, b, c) означают изоляты, выявленные в одном хозяйстве (стаде).

С целью оценки специфичности разработанного теста, в работе были использованы штаммы и изоляты следующих микроорганизмов: *Chlamydomydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia varigena*, *Pasteurella multocida* (серотипы A, B, D), *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides*, *Mycoplasma mycoides subsp. capri*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovigenitalium*, *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Acholeplasma granularum*, *E.coli*, микроорганизмы рода *Haemophilus*, микроорганизмы рода *Campylobacter*, микроорганизмы рода *Salmonella*, микроорганизмы рода *Streptococcus*.

Суммарную ДНК из культуральной бактериосодержащей суспензии и патологического материала от животных выделяли с использованием универсального набора реагентов для пробоподготовки (ООО «Компания Биоком», Россия), в соответствии с инструкцией к набору.

Амплификация кДНК. Полимеразную цепную реакцию осуществляли при помощи программируемого амплификатора RTC-100TM (MJ Research, Inc., США) в реакционной смеси следующего состава: 3мкл кДНК, 10 пмоль праймера PECF-2 и 20 пмоль праймера PECF-4, 2 mM MgCl₂, 200 мкМ каждого dNTP, 1,25 ед. Go Taq® ДНК-полимеразы, 5 мкл 5x Green Go Taq® Flexi буфера для Go Taq® ДНК-полимеразы (Promega, США) и деионизированная вода до объема 25 мкл. Амплификацию проводили при следующих временных и температурных режимах:

- один цикл 4 мин. при 90°C;
- сорок циклов: 30 с при 94°C, 30 с при 60°C и 30 с при 72°C;
- один цикл 5 мин при 72°C.

Продукты реакции анализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

Продукты ПЦР очищали с помощью набора реактивов «Wizard® PCR Preps DNA Purification System» (Promega, США) согласно методике производителя.

Секвенирование. Нуклеотидную последовательность фрагмента гена *ompA* выявленных изолятов *Chl. pecorum* определяли методом прямого секвенирования амплифицированных фрагментов ДНК с помощью автоматического секвенатора ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, США).

При анализе специфичности разработанных праймеров для ПЦР пользовались ресурсом BLAST NCBI (20).

Филогенетический анализ проводили с применением алгоритма NJ (в том числе с использованием метода численного ресэмплинга «бутстреп») в реализации пакета MEGA, версия 4.0.

Расчет некоторых эпизоотологических

Таблица 1

Структура праймеров

Наименование праймеров	Первичная структура праймеров	Локализация праймеров
PECF-2	5'- GCA-ATC-TAA-ACC-TCG-CGT-TCA-AGA-A-3'	505 – 529 ¹
PECF-4	5'- TCA-AGT-AAA-GTT-GCT-CCC-AT(A/G)-GAA-A -3'	942 – 966 ¹

¹ – соответствует нуклеотидной последовательности штамма 66P130 *Chlamydomydia pecorum* (номер доступа в Genbank M73034);

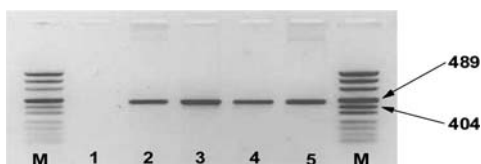


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР
Обозначения дорожек: М – маркер молекулярных весов ДНК pUS Mix Marker, 8 (стрелками обозначены длины фрагментов п.н.); №1 – вода (отрицательный контроль ПЦР); 2, 3, 4, 5 – полевые изоляты *Chlamydia pecorum*.

показателей (χ^2 , Re, Rne, OR и AR) проводили методом вероятностного расчета с использованием матрицы формата 2x2 («латинского квадрата»)(1), с помощью компьютерной программы STATISTICA 6 (StatSoft, Inc, 2001).

Результаты и обсуждение

Основополагающей задачей при создании полноценной и надежной тест-системы на основе ПЦР для видоспецифичной детекции *Chl. pecorum* являлся выбор оптимальной генетической мишени, что затруднено наличием ограниченного количества генов, нуклеотидные последовательности которых были бы в достаточной степени изучены у всех представителей семейства *Chlamydiaceae*. В результате компьютерного анализа нуклеотидных последовательностей генов штаммов и изолятов всех видов семейства *Chlamydiaceae*, депонированных в базе данных GenBank, мы пришли к выводу, что ген *OmpA*, учитывая наличие достаточно представительной выборки нуклеотидных последовательностей данного гена, является оптимальным генетическим локусом для дизайна видоспецифичных праймеров и создания системы специфичной детекции *Chl. pecorum*. В результате чего, нами была сконструирована пара специфических праймеров, фланкирующих фрагмент генома вышеуказанного микроорганизма (табл. 1). Ожидаемая длина амплифицируемого фрагмента составила 461 п.н. (рис.1).

Оптимизацию условий реакции (концентрация ионов магния, концентрация праймеров, температурные и временные режимы ПЦР) выполнили на полевом изоляте *Chl. pecorum*.

С целью анализа специфичности разработанной нами методики ее проверили на биологических материалах, содержащих как гетерологичные микроорганизмы – *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis* и др., так и *Chl. pecorum*. По результатам электрофореза продуктов ПЦР фактические разме-

ры амплифицированных фрагментов соответствовали расчетным. Для полученных ампликонов определили первичную структуру и проанализировали с помощью online программы BLAST NCBI (20).

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что разработанная тест-система на основе ПЦР пригодна для специфичного выявления генома *Chl. pecorum* в биологических материалах от животных.

Для части изолятов, выявленных в настоящем исследовании, были определены первичные структуры и соответствующие им аминокислотные последовательности. Филогенетический анализ с использованием нуклеотидных последовательностей, опубликованных в GenBank, показал, что популяция *Chl. pecorum*, циркулирующая на территории Российской Федерации, характеризуется высокой генетической гетерогенностью (Рис. 2). Уровень сходства между изолятами варьировал от 69 до 100 процентов по нуклеотидным и от 71% до 100% по аминокислотным последовательностям. Из филограммы можно заключить, что исследованные изоляты формируют 13-15 групп (включая одиночные изоляты) различающиеся на 13 и более процентов по нуклеотидным последовательностям изученного фрагмента гена *ompA*.

Также следует отметить, что некоторые изоляты, выявленные на территории РФ (calf/Bryansk/1c/2008, calf/Bashkiria/2/2008, calf/Kostroma/1c/2008, calf/Moscow/1b/2008, calf/Moscow/2a/2008 и др.), показали 100% уровень генетической гомологии с изолятами, выявленными на территории Германии, Великобритании, США, Австрии и Франции в 1989-1993 гг. (bos taurus/Germany/EU350135, cattle/England/1989/EU684923, cattle/USAM73034, us scrofa/Austria/1993/M73039, goat/France/1989/ EU684933). (Рис. 2, табл. 2). Представленное генетическое разнообразие данного микроорганизма и циркуляция на территории России изолятов, идентичных выявленным за рубежом, возможно, является следствием широкого списка государств, из которых проводится импорт КРС (включая сперму и эмбрионы), увеличением доли импортного в совокупной структуре поголовья (22); а также указывает на то, что они, вероятно, относительно медленно эволюционировали в сходных условиях.

Не менее важным и эпизоотически значимым фактом нашего исследования было то, что в 10 из 12 хозяйств, в которых выявляли присутствие *Chl. pecorum* (83%) реги-

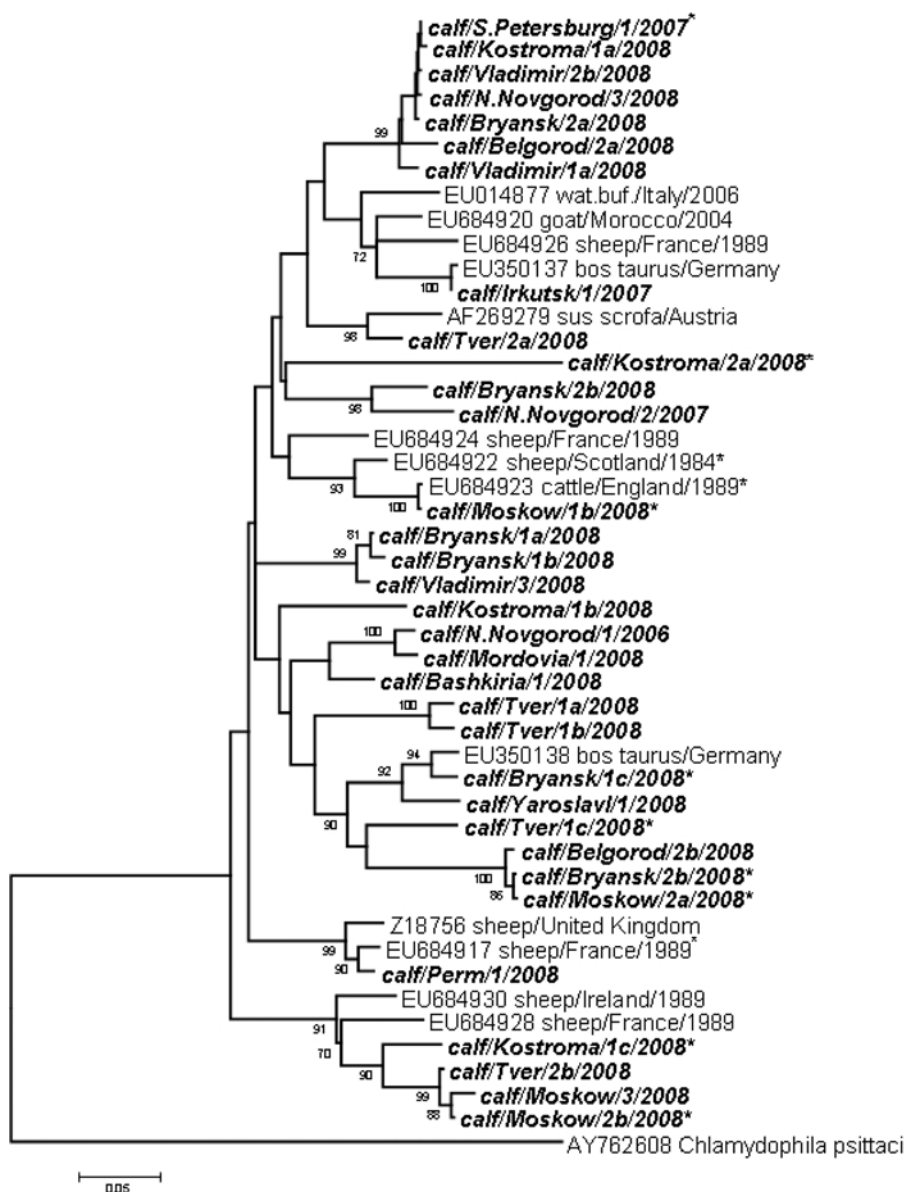


Рис. 2. Филограмма, демонстрирующая положение изолятов, выявленных на территории РФ (выделены курсивом и жирным шрифтом) по отношению к опубликованным (доступным) в Genbank изолятам *Chl. pecorum*. Дендрограмма получена методом NJ (с использованием метода численного ресэмплинга «бутстреп») по фрагменту гена *ompA*, содержащего III и IV варибельные домены (529-892)¹. Для укоренения древа использовали нуклеотидную последовательность соответствующего фрагмента гена *ompA* *Chlamydia psittaci* (AY762608).

* - группа штаммов и изолятов имеющих идентичные нуклеотидные последовательности (табл.2).

¹ - соответствует нуклеотидной последовательности штамма 66P130 *Chlamydia pecorum* (номер доступа в Genbank M73034);

стрировали одновременное присутствие нескольких различных генетических форм изучаемого микроорганизма. При этом, в отдельных стадах, уровень различий между изолятами составлял 28%.

Особый интерес представляет изолят (*calif/Moscow/1b/2008*), выявленный в одном из хозяйств Московской области от телен-

ка с клиническими признаками поражения респираторного тракта. Данный изолят обладает 100% генетической гомологией со штаммом L71 *Chl. pecorum*, выделенным в Австрии от дикого кабана с признаками полиартрита (*sus scrofa/Austria/1993/M73039*). Другой российский изолят (*calif/Moscow/2a/2008*), также выявленный у те-

Группы штаммов и изолятов, имеющих идентичные нуклеотидные последовательности фрагмента гена *ompA*

Представитель группы идентичных штаммов и изолятов	Штаммы и изоляты, имеющие идентичные нуклеотидные последовательности, не показанные на дендрограмме
calf/S.Petersburg/1/2007	calf/Belgorod/1a/2008 calf/Belgorod/1b/2008 calf/Moskow/4/2007 calf/Moskow/2c/2008 calf/N.Novgorod/4/2008 calf/Vladimir/4/2007 calf/Kostroma/3/2008 calf/Vladimir/2a/2008 calf/Yaroslavl/2/2006
sheep/France/1989/EU684917	cattle/USA/1993/M73042 sheep/France/1989/EU684919 cattle/USA/1993/AJ440240 cattle/England/EU684916 cattle/USA/1940/EU837071 sheep/Tunisia/EU684918 sheep/USA/1967/EU684921
calf/Moskow/2a/2008	goat/France/1989/ EU684933 goat/France/1989/ EU684931 calf/Moskow/1a/2008 goat/France/1989/EU684932
calf/Tver/1c/2008	calf/Vladimir/1c/2008 calf/Vladimir/1b/2008
calf/Moskow/1b/2008	sus scrofa/Austria/1993/M73039 sus scrofa /Austria/1993/AF269280
calf/Kostroma/1c/2008	cattle/USA/M73034
calf/Moskow/2b/2008	bos taurus/Germany/EU350136
cattle/England/1989/EU684923	calf/Bashkiria/2/2008
sheep/Scotland/1984/U684922	capra aegagrus/New Zealand/AY055109
calf/Bryansk/2b/2008	calf/Belgorod/3/2008
calf/Bryansk/1c/2008	bos taurus/Germany/EU350135
calf/Kostroma/2a/2008	calf/Kostroma/2b/2008

ленка с клиническими признаками поражения респираторного тракта был идентичен изолятам, выделенным из фекалий коз во Франции (goat/France/1989/ EU684931, goat/France/1989/EU684932, goat/France/1989/EU684933), по крайней мере по изученному фрагменту гена *ompA*. Данные факты, возможно, могут свидетельствовать об отсутствии специфичности для хозяина межвидового барьера и строгого тканевого тропизма при инфекции, обусловленной *Chl. pecorum*. Подобное предположение позволяет объяснять столь широкое генетическое разнообразие популяции данного вида бактерий, циркулирующей на территории РФ.

Одной из задач нашей работы являлось изучение широты распространения *Chl. pecorum* в популяции КРС Центрального Федерального Округа РФ. Обследование 13 стад, расположенных в 7 регионах страны, входящих в ЦФО, с использованием разработанной тест - системы показало, что стадная превалентность инфицирования *Chl. pecorum* телят весьма высока и составляет 92,3% (положительные пробы выявлены в 12 из 13 обследованных хозяйств). Индивидуальная превалентность составила 22,7% (положительные результаты ПЦР установлены в 81 из 390 проб).

Из вышесказанного вытекают опасения, что при столь высоком показателе

Матрица формата 2x2 двух дихотомических переменных: инфицированности и клинического статуса

Результаты тестирования (ПЦР)	клинический статус		
	Заболевшие	Здоровые	
Chl. pecorum «+»	53 (a)	28 (b)	81
Chl. pecorum «-»	142 (c)	167 (d)	309
	195	195	390

стадной превалентности по изучаемой инфекции в ЦФО, возможно, имеется потенциальная угроза здоровью людей, поскольку роль *Chl. pecorum* в патологии человека до настоящего времени окончательно не выяснена. Однако данное предположение требует дальнейшего всестороннего изучения.

При проведении исследований патологического материала от КРС, поступавшего из животноводческих хозяйств РФ в течение 2006-2008 гг., в большинстве случаев выявление *Chl. pecorum* ассоциировалось с признаками поражения респираторного тракта у животных (согласно данным сопроводительной документации к патологическому материалу и опроса ветеринарных специалистов животноводческих хозяйств).

Клиническая эпидемиология устанавливает, по возможности в рамках доказательной медицины, связь результатов диагностических исследований с реальной ситуацией, прогнозом и избираемыми мерами борьбы и профилактики. В нашем случае представлял интерес вопрос: насколько положительный диагноз, полученный с использованием разработанного метода (ПЦР), соотносим с заражением животных *Chl. pecorum* и развитием соответствующих клинических признаков поражения респираторного тракта. Для этого было проведено сравнение результатов диагностических исследований животных с клиническими признаками поражения респираторного тракта с клинически здоровыми животными. По клиническому статусу животных с клиническими признаками поражения респираторного тракта расценивали как «заболевших», а без соответствующих признаков считали «условно здоровыми».

Результаты тестирования образцов от животных в ПЦР так же делили дихотомически на инфицированных (*Chl. pecorum* «+») и не инфицированных (*Chl. pecorum* «-»). Результаты исследований 390 проб представлены в таблице 3.

Эпидемические критерии ассоциации результатов диагностического теста (в на-

шем случае ПЦР) и клинических признаков поражения респираторного тракта были оценены по следующим показателям: хи – квадрат (χ^2), абсолютный риск проявления клинических признаков поражения респираторного тракта среди инфицированных ($Re = a/(a+b)$) и неинфицированных ($Rne = c/(c+d)$) животных, соотношение шансов ($OR = ad/bc$)- и атрибутивный риск ($AR = Re - Rne$). При этом данные показатели позволяют выносить суждение о следующих параметрах связи клинических признаков поражения респираторного тракта и положительных результатов исследования на инфицирование *Chl. pecorum* в разработанной тест системе (ПЦР):

расчетные значения $\chi^2_{0,95} = 9,8$ (что существенно превышает критическое значение 3,84), позволяют уверенно сказать, что для указанной вероятности (95%) положительные результаты разработанного теста и клинические признаки поражения респираторного тракта - взаимосвязанные события;

расчетные значения показателей абсолютного риска проявления клинических признаков поражения респираторного тракта среди инфицированных (Re) и неинфицированных (Rne) *Chl. pecorum* животных (65,43% и 45,95%, соответственно) свидетельствовало о том, что отношение шансов (OR) выявления *Chl. pecorum* в группе заболевших животных в 2,2 раза выше, чем в группе здоровых животных. При этом атрибутивный риск (AR) указывающий на долю заболевших животных в положительно реагирующей группе, где заболевание было обусловлено именно воздействием *Chl. pecorum*, составил 19,5% (19,5 случаев на 100 голов).

Выводы

Разработана тест – система на основе метода ПЦР для выявления *Chl. pecorum*. Было показано, что популяция *Chl. pecorum*, циркулирующая на территории РФ, характеризуется высокой генетической гетерогенностью, а превалентность данного микроорганизма среди стад ЦФО составила 92,3%. Некоторые изоляты, выявленные

в процессе проведения данного исследования, демонстрировали 100% уровень генетического родства (по изученному фрагменту гена *ompA*) с изолятами, выявленными на территории таких государств, как Германия, Великобритания, Франция и США в 1989 – 1993 гг. Эпизоотически значимым является факт одновременного присутствия нескольких различных генетических форм *Chl. pecorum* внутри одного стада КРС. Высказано предположение о возможном отсутствии межвидового барьера и специфичности для хозяина, а также отсутствии строгого тканевого тропизма у изучаемого ми-

кроорганизма.

Выявленная статистически значимая связь ассоциации результатов разработанного диагностического теста и клинических признаков поражения респираторного тракта у телят демонстрирует, что инфицированные *Chl. pecorum* телята будут иметь риски развития соответствующих клинических признаков в 2,2 раза выше по сравнению с неинфицированными вышеуказанным микроорганизмом животными.

Авторы выражают благодарность за оказанную консультативную помощь в.н.с. ФГУ «ВНИИЗЖ» к.б.н. Колосову С.Н.

SUMMARY

New method for *Chlamydomphila pecorum* genome detection based on the polymerase chain reaction (PCR) was developed. It was demonstrated that *Chl. pecorum* population circulating in the territory of the Russian Federation is characterized by high genetic heterogeneity. The examination of 390 samples (nasal swabs of 0.5 – 7 – month – old calves) from 13 premises of 7 oblasts of the Central Federal Okrug showed that the herd *Chl. pecorum* prevalence in calves was 92,3% and the individual prevalence was 22,7%. Statistically significant association between the results of the developed diagnostic test and clinical signs of the respiratory tract damage in calves was detected.

Литература

1. Дудников, С.А. Количественная эпизоотология: основы прикладной эпидемиологии и биостатистики / С.А. Дудников. - Владимир: Демиур, 2004. - 460 с.
2. Инфекционная патология животных: в 2-х т. Т.2. / под ред. А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьева, Е.А. Непоклонова, Е.С. Воронина. - М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. - 807 с.
3. Обухов, И.Л. Свойства и цикл развития хламидий. Взаимодействие с клеткой - хозяином. (обзор) / И.Л. Обухов // Сельскохозяйственная биология. - 1999. - № 4. - С. 12-27.
4. A clinically silent respiratory infection with *Chlamydomphila* spp. in calves is associated with airway obstruction and pulmonary inflammation / J. Jaegera, E. Liebler-Tenorio, N. Kirschvink, [et al.] // Vet. Res. - 2007. - Vol. 38. - P. 711-728.
5. An investigation into the role of *Chlamydomphila* spp. in bovine upper respiratory tract disease / D.F. Twomey, P.C. Griffiths, M.W. Horigan [et al.] // Vet. J. - 2006. - Vol. 171. - P. 574 – 576.
6. Antigenic and morphological differentiation of placental and intestinal isolates of *Chlamydia psittaci* of ovine origin / P.C. Griffiths, H.L. Philips, M. Dawson, M.J. Clarkson // Vet. Microbiol. - 1992. - Vol. 30, № 2-3. - P. 165-177.
7. Bush, R.M. Molecular evolution of the *Chlamydiae* / R.M. Bush, K.D.E. Everett // Inter. J. Syst. Bacterial. - 2001. - Vol. 51. - P. 203 – 220.
8. Clarkson, M.J. Isolation of faecal chlamydiae from sheep in Britain and their characterisation by cultural properties / M.J. Clarkson, H.L. Philips // Vet. J. - 1997. - Vol. 153(3). - P. 307-311.
9. Comparison of five tests for the detection of antibodies against chlamydial (enzootic) abortion of ewes / G.E. Jones, J.C. Low, J. Machell [et al.] // Vet. Rec. - 1997. - Vol. 141. - P. 164-168.
10. Everett, K.D.E. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms / K.D.E. Everett, R.M. Bush, A.A. Andersen // Inter. J. Syst. Bacterial. - 1999. - Vol. 49. - P. 415 – 440.
11. Everett, K.D.E. Identification of nine species of the *Chlamydiaceae* using PCR-RELP / K.D.E. Everett, A.A. Andersen // Inter. J. Syst. Bacterial. - 1999. - Vol. 49. - P. 803 – 813.
12. Impact of latent infections with *Chlamydomphila* species in young cattle / P. Reinhold, J. Jaeger, E. Liebler-Tenorio [et al.] // Vet. J. - 2008. - Vol. 175. - P. 202 – 211.
13. High Prevalence of Natural *Chlamydomphila* Species Infection in Calves / JunBae Jee, Fred J. Degraeves, TeaYoun Kim [et al.] // J. Clin. Microbiol. - 2004. - Vol. 42, N. 12. - P. 5664 – 5672.
14. Levingstone, M. What is the prevalence and economic of chlamydial infections in cattle? The need to validate and harmonise existing methods of detection / M. Levingstone, D. Longbottom // Vet. J. - 2006. - Vol. 172. - P. 3 – 5.
15. Longbottom D. Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications / D. Longbottom, L. J. Coulter // J. Comp. Path. - 2003. Vol. 128. - P. 217-244.
16. *OmpA* and antigenic diversity of bovine *Chlamydomphila pecorum* strains / B. Kaltenboeck, E. Heinen, R. Schneider [et al.] // Vet. Microbiol. - 2008.
17. PCR Detection and Molecular Identification of *Chlamydiaceae* Species / J.C. Hartley, S. Kaye, S. Stevenson [et al.] // J. Clin. Microbiol. - 2001. - Vol. 39, N.9. - P. 3072 – 3079.
18. Philips, H. L. Spontaneous Change from Overt to Covert Infection of *Chlamydia pecorum* in Cycloheximide-Treated Mouse McCoy Cells / H. L. Philips, M. J. Clarkson // Infection and immunity. - 1995. Vol. 63, N 9. - P. 3729–3730.
19. Species Identification of *Chlamydia* Isolates by Analyzing Restriction Fragment Length Polymorphism of the 16S-23S rRNA Spacer Region / A. Meijer, G. J. Kwakkel, A. De Vries, [et al.] // J. Clin. Microbiol. - 1997. - Vol. 35, N. 5. - P. 1179 – 1183.
20. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). - Режим доступа: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
21. National Center for Biotechnology Information. - Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
22. Официальный сайт федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору. - Режим доступа: <http://fsvps.ru>
23. *Chlamydia* professional. Comprehensive. Evidence based. Authoritative. The comprehensive reference and education site to *Chlamydia* and the *chlamydiae*. - Режим доступа: <http://www.chlamydiae.com>