

ГЛАВА 3.7.6

ЭНЗООТИЧЕСКИЙ АБОРТ ОВЕЦ (ХЛАМИДИОЗ ОВЕЦ) (ИНФИЦИРОВАНИЕ *CHLAMYDOPHILA ABORTUS*)

РЕЗЮМЕ

Возбудителем хламидиоза овец, известного также как энзоотический аборт овец (ЭАО), является бактерия *Chlamydomphila abortus*. Хламидийный аборт случается, как правило, в течение последних 2-3 недель беременности, и характеризуется мертворождением и воспалением плаценты. Кроме того, результатом инфицирования может быть появление на свет полностью развитых мертворожденных ягнят или слабых живых ягнят, которые не живут дольше 48 часов. От инфицированных самок могут рождаться и здоровые ягнята, и часто можно наблюдать одновременное появление одного мертвого и одного живого слабого/здорового ягненка. Признаки, позволяющие прогнозировать наступление аборта, наблюдаются редко, хотя в последние 48 часов перед абортом могут отмечаться изменения в поведении и влагалищные выделения.

Постановка диагноза «энзоотический аборт» зависит от изоляции и идентификации возбудителя заболевания или обнаружения возбудителя или его нуклеиновой кислоты в продуктах аборта или вагинальных выделениях только что абортировавших самок. После аборта может наблюдаться гуморальный ответ в виде образования антител. Заболеванию подвержены козы, овцы и, в меньшей степени, крупный рогатый скот, свиньи, лошади и олени. Хламидиоз мелкого рогатого скота это зооноз, и при обращении с возбудителем необходимо соблюдать меры по обеспечению биобезопасности. Особому риску подвергаются беременные женщины.

Идентификация возбудителя: Основанием для положительного диагноза на наличие инфекции, вызываемой *C. Abortus*, служат: присутствие в анамнезе абортов у овец или коз (часто на поздней стадии беременности), некротическое воспаление плаценты и высокие концентрации возбудителя в окрашенных мазках из материала пораженной плаценты. Исследование влажной шерсти плода или вагинальных мазков только что абортировавшей самки также может оказаться полезным. Следует дифференцировать хламидиоз овец с котиледонными повреждениями, вызываемыми *Toxoplasma gondii*, а при изучении окрашенных мазков необходимо помнить о морфологическом сходстве между *C. abortus* и *Coxiella burnetii*, возбудителем риккетсиоза Бернета.

Хламидийный антиген обнаруживают методом иммуноферментного анализа, путем иммуногистохимического исследования или реакции иммунофлуоресценции. ДНК хламидий определяют методом полимеразной цепной реакции или микроматричного анализа. Существуют коммерческие версии некоторых перечисленных методов в виде специальных наборов.

Изоляция *Chlamydomphila abortus* возможна только в живых клетках; следовательно, необходимы помещения и оборудование для культивирования возбудителя в куриных эмбрионах или клеточных культурах с обеспечением надлежащего уровня биологической защиты.

Серологические исследования: после аборта или мертворождения часто отмечают рост титра антител к *C. abortus*, обнаруживаемый реакцией связывания комплемента (РСК), но он наблюдается не в каждом случае. *Chlamydomphila abortus* имеет общие антигены с *C. pecorum* и некоторыми грамотрицательными бактериями, поэтому РСК не обладает полной специфичностью. Кроме того, РСК не позволяет отличить ответную реакцию на вакцинацию от инфицирования. Низкие титры, полученные методом РСК, следует интерпретировать с осторожностью, в особенности, если они наблюдаются у отдельных животных или в стаде, где ранее не регистрировались аборты.

Разработаны альтернативные методы серологических исследований, для некоторых существуют коммерческие версии, но ни один метод не прошел аттестацию для использования в полевых условиях. У инфицированных овец может быть вызвана отсроченная гиперчувствительная реакция на хламидийный антиген, но данная процедура не пригодна для рутинной практики.

Требования к вакцинам: существуют инактивированные и живые вакцины, которые, согласно отчетам, предотвращают аборты и снижают выделение возбудителя в окружающую среду. Они способствуют контролю заболевания, но не его искоренению. Серологический скрининг в течение определенного периода после родов позволяет выявить инфицированные стада, в отношении которых затем могут быть приняты меры по контролю заболевания.

А. ВВЕДЕНИЕ

1. Описание и последствия болезни

Возбудителем хламидиоза овец, известного также как энзоотический аборт овец (ЭАО), является бактерия *Chlamydophila abortus*. Хламидийный аборт на поздних сроках беременности является причиной высокого уровня смертности плодов и новорожденных ягнят во многих овцеводческих регионах мира, особенно в случае высокой скученности отар в период окота (Aitken & Longbottom, 2007; Longbottom & Coulter, 2003). Аборт случается, как правило, в течение последних 2-3 недель беременности, и характеризуется мертворождением и обширным воспалением плаценты. Кроме того, результатом инфицирования может быть появление на свет полностью развитых мертворожденных ягнят или слабых живых ягнят, которые не живут дольше 48 часов. Также при многоплодных родах у инфицированных самок нередко можно наблюдать появление одного мертвого и одного или нескольких слабых или же нормальных, здоровых ягнят. Как правило, инфекция попадает в «чистое» стадо с инфицированными ремонтными животными и в первый год приводит к небольшому числу абортов, после чего на второй год следует «шквал» абортов, когда болезнь поражает до 30% самок.

У инфицированных животных не наблюдается клинических признаков заболевания до наступления аборта, хотя в последние 48 часов перед абортом могут отмечаться изменения в поведении и влагалищные выделения. Начало болезни приходится примерно на 90 день беременности, совпадая с фазой быстрого роста плода, когда проникновение хламидий в плаценту вызывает прогрессирующую диффузную воспалительную реакцию, тромботический васкулит и некроз тканей. Менее серьезные изменения происходят в печени и легких плода и, в случаях тяжелого поражения плаценты, могут присутствовать признаки гипоксии головного мозга (Buxton *et al.*, 2002). Причиной аборта становится, вероятно, комбинация факторов: снижение поступления питательных веществ от матери к плоду и ухудшение газообмена, нарушение гормональной регуляции беременности и индуцированная цитокиновая агрессия (Entrican, 2002).

Хламидийный аборт встречается также у коз и может, хотя и менее часто, поражать крупный рогатый скот, свиней, лошадей и оленей. У овец ключевым диагностическим индикатором является аборт на поздней стадии беременности с отделением некротических плодных оболочек, при этом необходимо со всей тщательностью дифференцировать диффузную картину некроза с изменениями, вызываемыми *Toxoplasma gondii* (только котиледоны). Дифференциация с другими инфекциями, могущими служить причиной аборта, например, бруцеллезом (см. главу 2.1.4), кокциеллезом (см. главу 2.1.16) или другими бактериальными патогенами (*Campylobacter* [см. главу 2.9.3], *Listeria* [см. главу 2.9.6], *Salmonella* [см. главу 2.9.8]) может проводиться посредством исследования под микроскопом или культивирования.

2. Природа и классификация патогена

С таксономической точки зрения семейство Chlamydiaceae подразделяется на два рода и девять видов на основании данных секвенирования генов 16s и 23s рРНК (Everett *et al.*, 1999). Род *Chlamydia* включает *C. trachomatis* (человек), *C. suis* (свины) и *C. muridarum* (мыши и хомяки). Род *Chlamydophila* включает *C. psittaci* (птицы), *C. felis* (кошки), *C. abortus* (овцы, козы и крупный рогатый скот), *C. caviae* (морские свинки), а также виды *C. pecorum* (овцы и крупный рогатый скот) и *C. pneumoniae* (человек), которые носят теперь новое название. Выдвинуто предложение объединить все виды в один род (*Chlamydia*), но для целей настоящей главы оно не принимается. Понятия «хламидиоз» и «хламидия» («хламидии») используется для обозначения организмов, входящих в род *Chlamydia*, в целом. Однако для обозначения конкретных видов хламидий применяется двусоставное название, состоящее из родового и специфического имен. Инфицированные самки выделяют большое количество инфекционного *C. abortus* в момент аборта или родов (главным образом, с плацентой и мочой) и при последующем ягнении (Papp *et al.*, 1994), становясь, таким образом, источником распространения инфекции в отаре. У овец, абортировавших в результате инфицирования *C. abortus*, повторных абортов, вызванных действием инфекции, как правило, не наблюдается. Недавно проведенные исследования позволяют предположить, что доля инфицированных самок в следующий репродуктивный сезон снижается, а в периовуляторный период и при ягнении фиксируются только низкие концентрации хламидийной ДНК, что не оказывает существенного влияния на эпидемиологическую ситуацию (Gutierrez *et al.*, 2011; Livingstone *et al.*, 2009).

3. Зоонотический риск и требования к обеспечению биобезопасности

Передача инфекции человеку может происходить через инфицированные продукты аборта или родов или при неосторожном обращении с лабораторными культурами возбудителя. Наблюдаемые при этом эффекты варьируют от субклинической формы заболевания до острой инфекции, похожей на грипп. Необходимо принимать надлежащие меры предосторожности, а при обращении с культурами и потенциально инфицированными тканями рекомендуется соблюдать меры защиты 2 уровня (см. главу 1.1.4 «Биобезопасность и биозащита: стандарт контроля биологической опасности в ветеринарной лаборатории и вивариях»). Достоверно установленные случаи плацентита и аборта у женщин, вызванного овечьим *C. Abortus*, показывают, что беременные женщины находятся в особой группе риска и не должны подвергаться воздействию источников инфекции (Longbottom & Coulter, 2003; Sillis & Longbottom, 2011).

В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

1. Идентификация возбудителя

1.1. Мазки

Если история болезни стада и характер повреждений плаценты у абортировавших овец позволяет предположить наличие энзоотического аборта, постановка диагноза осуществляется путем микроскопического исследования мазков, изготовленных с использованием материала пораженных хориальных ворсин или прилегающего хориона. Могут применяться несколько методов окрашивания мазка, например, модифицированные процедуры окрашивания по Макиавелли, Гимзе, дифференциального окрашивания бруцелл, или модифицированная процедура окрашивания по Цию - Нильсену (Stamp *et al.*, 1950). При положительном результате, в мазке, окрашенном по Цию - Нильсену и исследованном под микроскопом с большим увеличением, видно большое количество небольших (300 нм) кокковидных элементарных телец, располагающихся отдельно или образующих скопления, окрашенные в красный цвет на голубом фоне клеточного дегриза. При микроскопии в темном поле данные элементарные тельца имеют бледно-зеленый цвет. Если материал плаценты недоступен, можно использовать влажные мазки самок, абортировавших не позднее 24 часов до взятия мазка, или мазки, взятые с влажной шерсти только что абортировавших или мертворожденных ягнят, которых еще не вылизывала мать, или мазки содержимого сычуга абортировавших или мертворожденных ягнят. Как правило, подобные препараты содержат меньшие концентрации микроорганизма, чем плацентарные мазки.

По морфологии и характеристикам окрашивания *C. abortus* схожа с риккетсией *Coxiella burnetii*, которая, при определенных обстоятельствах, может провоцировать аборт и которая является возбудителем ку-лихорадки человека. Следует тщательно дифференцировать этих возбудителей в случаях, когда отсутствует достоверная история болезни или свидетельства патологии плаценты, вызванной хламидийной инфекцией. Антигенные различия между *C. abortus* и *Coxiella burnetii* могут быть установлены серологически. Для идентификации *C. abortus* в мазках применяется реакция иммунофлуоресценции (РИФ) с использованием специфической антисыворотки или моноклональных антител.

1.2. Обнаружение антигенов

Существуют коммерческие версии нескольких тестов для определения родových антигенов хламидий. Сравнительная оценка некоторых подобных тестов на материале, взятом не от овец, показала, что тесты, основанные на методе иммуноферментного анализа (ИФА), являются более чувствительными, чем наборы, использующие РИФ (Wood & Timms, 1992). При соблюдении условий проведения теста, наиболее чувствительной из систем экстренной диагностики на основе ИФА, участвовавших в исследовании, оказался набор для определения хламидийного липополисахарида (ЛПС). Несмотря на наличие случайных ложноположительных результатов, в особенности, в отношении образцов птичьих фекалий, данный тест-набор показал удовлетворительные результаты для образцов из материала овечьей плаценты (Wilsmore & Davidson, 1991). Хотя следует отметить, что рассматриваемый набор не позволяет дифференцировать *C. abortus* и другие виды хламидий, которые могут заражать образцы. В гистопатологических срезах определение антигена осуществляется с использованием имеющихся в продаже антител к ЛПС или ГБНМ (главный белок наружной мембраны) бактерий *Chlamydia* (Borel *et al.*, 2006).

1.3. ДНК

Аmplификация хламидийной ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ПЦР в реальном времени является альтернативным подходом, позволяющим проверить наличие хламидий в биологических образцах, не прибегая к культивированию. Для данных целей ПЦР является высокочувствительным методом, но имеется риск перекрестного загрязнения между образцами или экзогенного загрязнения образцов в полевых условиях. Чтобы избежать этого, следует принять надлежащие меры (см. Главу 3.2 «Биотехнология в диагностике инфекционных заболеваний»). Другая потенциальная проблема это получение ложноотрицательных результатов в случае присутствия в образцах веществ – ингибиторов ПЦР. Описаны методы различения амплифицированных последовательностей ДНК *C. abortus* и *C. pecorum* (DeGraves *et al.*, 2003; Everett & Andersen, 1999; Jee *et al.*, 2004; Laroucau *et al.*, 2001; Thiele *et al.*, 1992). В последние несколько лет предпочтительным методом лабораторной диагностики стал метод ПЦР в реальном времени, благодаря высокой скорости и производительности, а также легкости стандартизации (Sachse *et al.*, 2009). Недавно разработана технология гибридизации на ДНК-микрочипах **DNA microarray hybridisation assay** с использованием платформы ArrayTube™, которая является весьма многообещающей в отношении прямого обнаружения и идентификации микроорганизмов, содержащихся в клинических образцах (Borel *et al.*, 2008; Sachse *et al.*, 2005). Разработана методика использования ПЦР в сочетании с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов с перспективой различения животных, инфицированных естественным путем, и вакцинированных особей (DIVA) (Laroucau *et al.*, 2010; Wheelhouse *et al.*, 2010).

1.4. Срезы тканей

Внутриклеточные хламидийные включения могут быть обнаружены путем окрашивания по Гимзе тонких (≤ 4 мкм) срезов тканей-мишеней, которые предварительно надлежащим образом фиксируют, например, в жидкости Буэна или жидкости Карнуа. Более четкие результаты могут быть получены путем иммуноокрашивания. Высокой скоростью и простотой отличается прямой иммунопероксидазный метод (Finlayson *et al.*, 1985); стрептавидин-биотиновая реакция является более сложным методом (Szeredi & Bacsadi, 2002). Кроме того, для дифференциации хламидий с *Coxiella burnetii* может применяться электронная микроскопия с негативным контрастом.

1.5. Изоляция возбудителя

Изоляция *Chlamydophila abortus* осуществляется в оплодотворенных куриных яйцах или в клеточной культуре, причем последнее является приоритетным методом для изоляции новых штаммов. Возбудитель хламидиоза имеет зоонозную природу и, следовательно, процедуры изоляции и идентификации должны проводиться в условиях мер по обеспечению биобезопасности 2 уровня.

Образцы тканей, например, котиледоны и оболочки плаценты больного животного, печень и легкие плода, или вагинальные мазки, изоляция возбудителя из которых по каким-либо причинам может проводиться с отсрочкой, в период между отбором образца и началом процедуры изоляции следует хранить в подходящей транспортной среде. Для оптимального восстановления подобные образцы следует хранить в замороженном виде, предпочтительно при -80°C , или же при -20°C . Наиболее подходящей средой служит среда, состоящая из сахарозы, фосфата и глутаминовой кислоты (SPG) (сахароза [74,6 г/л], KH_2PO_4 [0,512 г/л], K_2HPO_4 [1,237 г/л], L-глутаминовая кислота [0,721 г/л]) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, антибиотика (стрептомицин или гентамицин, но не пенициллин), и противогрибкового препарата (ингибитора) (Spencer & Johnson, 1983). Соотношение материала и среды обычно составляет 1:10. В качестве альтернативного варианта, примерно 1 г ткани растирают со стерильным песком в 8 мл транспортной среды.

Куриные эмбрионы: готовят препараты исследуемых образцов в виде 10% суспензии в питательном бульоне, содержащем стрептомицин (но не пенициллин) (200 мкг/мл); 0,2 мл суспензии вводят в желточный мешок 6–8-дневных эмбрионов, которые затем инкубируют при 37°C . Инфицированные эмбрионы погибают через 4–13 дней после инокуляции. В мазках, приготовленных из васкуляризованных оболочек желточных мешков, обнаруживаются высокие концентрации элементарных тел.

Клеточные культуры: *Chlamydophila abortus* овечьего происхождения может быть изолирована в различных типах клеток, но чаще всего используются культуры клеток McCoу, зеленой мартышки буффало (BGM), или почек детенышей хомяка (ВНК). Для подтверждения диагноза монослои культивированных клеток суспендируют в среде для выращивания клеток в концентрации 2×10^5 клеток/мл. Аликвоты 2 мл суспензии распределяют по плоскодонным стеклянным коническим склянкам с завинчивающейся крышкой, в каждую из которых помещено 16-миллиметровое покровное стекло. После инкубирования в течение 24 часов при 37°C получают сплошной монослой культуры на покровном стекле. Среду для выращивания клеток удаляют и заменяют исследуемым инокулятом, затем центрифугируют при 2500 *g* в течение 30 минут для содействия инфицированию. После инкубирования в течение 2–3 дней монослои клеток на покровном стекле фиксируют в метаноле и окрашивают по Гимзе или по методу Гименеса (Arens & Weingarten, 1981; Gimenez, 1964). После фиксации метанолом инфицированные культуры содержат базофильные (Гимзе) или эозинофильные (Гименес) интрацитоплазматические включения. Аналогичный протокол используется для культивирования *C. abortus* с целью приготовления препаратов антигенов. Можно также использовать методики РИФ, которые имеют аналогичную эффективность.

Активность хламидий можно повысить путем химической обработки культивированных клеток до или во время инфицирования с целью содействия росту хламидий. Для введения в инфекционный инокулят, действию которого подвергают монослои клеток, полученные на покровном стекле, используют различные вещества, в том числе: циклогексимид (0,5 мкг/мл) в поддерживающей среде, эметин (1 мкг/мл) в течение 5 минут перед инфицированием, и 5-йод-2-дезоксисуридин (80 мкг/мл) в течение 3 дней перед инфицированием. Последняя процедура требует увеличенного времени для успешной изоляции возбудителя в случае, когда не доступны предварительно обработанные клетки.

2. Серологические исследования

2.1. Реакция связывания комплемента

Реакция связывания комплемента (РСК) это наиболее широко используемая процедура для обнаружения рассматриваемой инфекции (овец и коз обычно проверяют в течение 3 месяцев после аборта или родов). Данный тест позволяет обнаруживать также последствия вакцинации. Инфекция обнаруживается, главным образом, во время активной стадии инфицирования плаценты в последний месяц беременности, и после бактериемии, которая часто сопровождается аборт. Следовательно, в парных образцах сыворотки, собранных во время аборта и затем, как минимум, через три недели, может быть выявлено увеличение титра комплементсвязывающих антител, что дает основания для постановки ретроспективного диагноза. Число

ложноположительных результатов для реакции связывания комплемента невелико, но антигенная перекрестная реактивность между *C. abortus* и *C. pecorum*, а также некоторыми грамотрицательными бактериями (например, *Acinetobacter*), может увеличивать этот показатель. Таким образом, титры ниже 1/32, выявленные у отдельных особей, следует рассматривать как неспецифические в отношении *C. abortus*, хотя причиной их появления может быть, в том числе, и вялотекущая инфекция, вызванная *C. abortus*. Образцы, для которых получены сомнительные результаты, могут быть подвергнуты дальнейшему исследованию методом вестерн-блоттинга с использованием очищенных элементарных тел (Jones *et al.*, 1997).

Препарат антигена готовят из оболочек желточных мешков куриных эмбрионов, содержащих высокие концентрации возбудителя, инокуляция которого осуществлялась таким же образом, как при изоляции возбудителя из полевого материала. Приготовление препарата антигена проводится в боксе микробиологической безопасности с соблюдением надлежащих мер предосторожности для предотвращения инфицирования людей (см. главу 1.1.4). Измельченные и растертые оболочки суспендируют в фосфатном буфере, pH 7,6, из расчета 2 мл на 1 грамм оболочек. После удаления крупного дебриса надосадочную жидкость центрифугируют при 10 000 **g** в течение 1 часа при 4°C, осадок ресуспенсируют в небольшом количестве солевого раствора, готовят мазок и исследуют для подтверждения высокого содержания хламидий. Суспензию помещают на 20 минут на водяную баню в кипящую воду или в автоклав, и добавляют азид натрия (0,3%) в качестве консерванта. Приготовить препарат антигена можно также из клеточных культур, инфицированных *C. abortus*. Инфицированные монослои суспендируют в фосфатном буфере, pH 7,6, и клетки разрушают гомогенизацией или обработкой ультразвуком. Удаляют крупный дебрис. Последующие процедуры аналогичны протоколу приготовления антигена из инфицированных желточных мешков. В обоих случаях в реакции связывания комплемента с использованием стандартизованного комплемента и антисывороток будет установлено оптимальное рабочее разведение для каждой партии антигена.

2.2. Другие тесты

Анализ серологических реакций на *C. abortus* и *C. pecorum* может осуществляться посредством не прямой реакции микроиммунофлуоресценции, но данная процедура требует много времени, а потому непригодна для целей рутинной диагностики. Методики ИФА, разработанные независимо несколькими группами исследователей, не адаптированы для общей диагностической работы, отчасти вследствие трудностей, связанных с использованием конкретных антигенов. Однако существует инновационная методика ИФА, включающая стабильный, солюбилизованный антиген, которая применялась для анализа экспериментальных и полевых образцов и показала результаты, которые, несмотря на низкую видоспецифичность, говорят о более высокой, чем у РСК, чувствительности метода (Anderson *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1997). Разработаны другие тесты, использующие моноклональные антитела в конкурентном ИФА (Salti-Montesanto *et al.*, 1997) и рекомбинантные антигены в не прямом ИФА (Longbottom *et al.*, 2002), которые показали более высокую по сравнению с РСК чувствительность и специфичность в дифференциации животных, инфицированных *C. abortus* и *C. pecorum*. Но указанные тесты в настоящее время применяются, главным образом, в качестве инструментов научного исследования, и коммерческие версии этих методик пока отсутствуют. Оценка и сравнение ряда коммерческих версий серологических анализов с упомянутыми «лабораторными» тестами не дали однозначных результатов (Jones *et al.*, 1997; Vretou *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2009). Ни один из доступных методов серологического исследования не может отличать титры, получаемые в результате вакцинации, от титров, являющихся следствием инфицирования естественным путем (Borel *et al.*, 2005).

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Общие сведения

1.1. Обоснование и предполагаемое использование продукта

В настоящее время доступно два типа коммерческих вакцин (инактивированная вакцина и аттенуированная живая вакцина), которые вводятся внутримышечно или подкожно не менее чем за 4 недели до случки в целях содействия предотвращению аборта. Многокомпонентная рекомбинантная вакцина против *C. abortus* остается целью будущих исследований, посвященных созданию вакцины против хламидий (Longbottom & Livingstone, 2006).

Инактивированные вакцины производятся из инфицированных желточных мешков или клеточных культур (Jones *et al.*, 1995) и включают целые клетки возбудителя или их фрагменты (Tan *et al.*, 1990). Необходимо соблюдение соответствующих мер по обеспечению биобезопасности, чтобы предотвратить инфицирование людей (см. главу 1.1.4). Сотрудники, допущенные к обращению с коммерческими инактивированными вакцинами, в состав которых входят адъюванты на основе минерального масла, должны соблюдать меры предосторожности, поскольку самоинъекции может привести к тяжелому местному воспалению и некрозу тканей. Коммерческие живые аттенуированные вакцины представляют собой химически индуцированный, термочувствительный мутантный штамм бактерии – возбудителя, который развивается при 35°C, но не при температуре тела овцы (39,5°C) (Rodolakis, 1986). Данная вакцина поставляется лиофилизованной и подлежит восстановлению в растворителе непосредственно перед введением. При обращении с живой вакциной и при ее введении необходимо соблюдать меры предосторожности, что в особенности касается лиц с ослабленным иммунитетом и беременных женщин. Важно отметить, что живую вакцину нельзя вводить животным, получающим лечение антибиотиками, в частности, тетрациклинами. Инактивированные вакцины безопасны для введения в период беременности, тогда как живые вакцины запрещены для введения беременным особям.

Оба типа вакцин играют определенную роль в контроле ЭАО, но ни одна из них не предоставляет абсолютную защиту от заболевания и не приводит к полному прекращению выделения возбудителя в окружающую среду. Однако у вакцинированных особей, подвергшихся воздействию инфекции, наблюдается гораздо более низкая частота абортос и пониженное выделение хламидий в течение, по крайней мере, двух-трех окотов после вакцинации. Утверждается, что живая вакцина может содействовать искоренению заболевания (Nietfeld, 2001). Стоит упомянуть, что живой вакцинный штамм 1В был обнаружен в плацентах вакцинированных животных, абортировавших в результате поражения хламидиозом, что позволило выдвинуть предположение о способности данной вакцины вызывать указанное заболевание (Wheelhouse *et al.*, 2010). Но, за исключением упомянутого факта, применение живой вакцины остается наиболее эффективным методом защиты от ЭАО (Stuen & Longbottom, 2011).

Вакцина, хранящаяся при низких температурах ($5\pm 3^{\circ}\text{C}$), должна сохранять стабильность в течение, как минимум 1 года. Достоверные данные отсутствуют, но рекомендуется проводить ревакцинацию каждые 1–3 года, в соответствии со степенью риска возникновения заболевания.

2. Общая информация по производству вакцин и минимальные требования к вакцинам

2.1. Характеристики посевного материала

2.1.1. Биологические характеристики

Подходящими являются один или более изолятов, полученных из абортированного овечьего материала, которые последовательно демонстрируют интенсивный рост на выбранном субстрате и позволяют получить ранний пассаж посевного материала. В качестве альтернативы может использоваться изолят, адаптированный к культивированию в куриных эмбрионах путем многократного пассирования (>100). Это позволяет увеличить использование эмбрионов в производстве вакцины. Хотя адаптация к росту в эмбрионах может снизить вирулентность изолята для овец, отсутствуют свидетельства того, что подобные изменения снижают его профилактическую эффективность в составе инактивированной вакцины.

2.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, отсутствие посторонних веществ)

Перед инокуляцией микроорганизма в большое количество эмбрионов или клеточных культур необходимо убедиться в жизнеспособности и чистоте посевного материала. Возможно, удобнее выращивать посевной материал отдельными партиями. В таком случае отдельно устанавливается титр инфекционности для аликвоты каждой партии, чтобы обеспечить ее соответствие установленным требованиям (см ниже). Хранить в условиях низких температур.

2.2. Метод производства

2.2.1. Процедура

Для массового производства изолятов с малым числом пассажей надлежащим образом адаптированы и дополнены процедуры, используемые для приготовления препарата антигена в РСК. Из суспензии, полученной из последнего сбора, отбирают аликвоту для титрования инфекционности. Партию обрабатывают формалином до получения конечной концентрации, равной 0,4%, и хранят, пока тесты на стерильность не подтвердят полную инактивацию.

2.2.2. Требования к субстратам и средам

Инактивированный сбор центрифугируют и ресуспендируют в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,2% формалина, до объема, соответствующего титру инфекционности перед инактивацией, равному примерно 10^8 инфекционных единиц/мл. Как правило, водную суспензию смешивают с масляным адъювантом, напрямую или после осаждения алюмокалиевыми квасцами ($\text{AlK}[\text{SO}_4]_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$). Также может быть добавлен консервант, например, 0,01% тиомерсал.

2.2.3. Технологический контроль

Главными требованиями являются обеспечение адекватного роста *C. Abortus*; недопущение инфицирования субстрата, используемого для культивирования, посторонними микроорганизмами; полнота инактивации и информирование работников о правилах обращения с биологически опасными веществами.

2.2.4. Анализ партии готового продукта

Каждая отдельная партия готовой вакцины должна проходить пробы на стерильность, безвредность и специфическую активность.

i) Стерильность и чистота

Тесты, применяемые для проверки биологических материалов на стерильность и отсутствие загрязняющих веществ, изложены в главе 1.1.9.

ii) Безвредность

Подкожное введение дозы готовой вакцины, вдвое превышающей стандартную (обычно 1,0 мл), двум или более серонегативным овцам не должно вызывать системных реакций. Однако вакцины, содержащие масляные адъюванты, могут вызывать неопасную припухлость в месте введения.

iii) Активность партии

В настоящее время активность определяется наличием серологической реакции у ранее невакцинированных овец, которым вводят 1 мл вакцины подкожно. Сравнивают образцы крови, взятые до и через 28 дней после вакцинации. По существу, активность следует оценивать в сравнении с результатами контрольного заражения или эффективности в полевых условиях, но на данный момент не установлена корреляция профилактической эффективности *in-vitro*.

2.3. Требования для получения разрешения

2.3.1. Требования в отношении безвредности

См. главу 1.1.8 «Принципы производства ветеринарных вакцин».

2.3.2. Требования к эффективности

См. главу 1.1.8.

2.3.3. Стабильность

См. главу 1.1.8.

3. Вакцины на основе биотехнологий

3.1. Существующие вакцины и их преимущества

В отношении рассматриваемого заболевания в настоящее время не применяются вакцины, производимые на основе биотехнологий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

AITKEN I.D. & LONGBOTTOM D. (2007). Chlamydial abortion. *In: Diseases of Sheep Fourth Edition*, Aitken I.D., ed. Blackwell Scientific Ltd., Oxford, UK, 105-112.

ANDERSON I.E., HERRING A.J., JONES G.E., LOW J.C. & GREIG A. (1995). Development and evaluation of an indirect ELISA to detect antibodies to abortion strains of *Chlamydia psittaci* in sheep sera. *Vet. Microbiol.*, **43**, 1–12.

ARENS M. & WEINGARTEN M. (1981). Vergleichende Untersuchungen an Buffalo Green monkey (BGM) Zellen und Mäusen zur Isolierung von *Chlamydia psittaci* aus Kot und Organproben von Vögeln. *Zentralbl. Veterinarmed [B]*, **28**, 301–309.

BOREL N., KEMPF E., HOTZEL H., SCHUBERT E., TORGERSON P., SLICKERS P., EHRLICH R., TASARA T., POSPISCHIL A. & SACHSE K. (2008). Direct identification of chlamydiae from clinical samples using a DNA microarray assay – a validation study. *Mol. Cell. Probes*, **22**, 55–64

BOREL N., SACHSE K., RASSBACH A., BRUCKNER L., VRETOU E., PSARROU E. & POSPISCHIL A. (2005). Ovine enzootic abortion (OEA): antibody response in vaccinated sheep compared to naturally infected sheep. *Vet. Res. Commun.*, Suppl 1, 151–156.

BOREL N., THOMA R., SPAENI P., WEILENMANN R., TEANKUM K., BRUGNERA E., ZIMMERMANN D.R., VAUGHAN L. & POSPISCHIL A. (2006). *Chlamydia*-related abortions in cattle from Graubünden, Switzerland. *Vet. Pathol.*, **43**, 702–708.

Глава 2.7.6. – Энзоотический аборт овец (хламидиоз овец) (инфицирование *Chlamydomphila abortus*)

BUXTON D., ANDERSON I.E., LONGBOTTOM D., LIVINGSTONE M., WATTEGADERA S. & ENTRICAN G. (2002). Ovine chlamydial abortion: characterization of the inflammatory immune response in placental tissues. *J. Comp. Pathol.*, **127**, 133–141.

DEGRAVES F.J., GAO D., HEHNEN H.-R., SCHLAPP T. & KALTENBOECK B. (2003). Quantitative detection of *Chlamydia psittaci* and *C. Pecorum* by high-sensitivity real-time PCR reveals high prevalence of vaginal infection in cattle. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 1726–1729.

ENTRICAN G. (2002). Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *J. Comp. Pathol.*, **126**, 79–94.

EVERETT K.D. & ANDERSEN A.A. (1999). Identification of nine species of the Chlamydiaceae using PCR RFLP. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 803–813.

EVERETT K.D.E., BUSH R.M. & ANDERSEN A.A. (1999). Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. System. Bact.*, **49**, 415–440.

FINLAYSON J., BUXTON D., ANDERSON I.E. & DONALD K.M. (1985). Direct immunoperoxidase method for demonstrating *Chlamydia psittaci* in tissue sections. *J. Clin. Pathol.*, **38**, 712–714.

GIMENEZ D.F. (1964). Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. *Stain Technol.*, **39**, 135–140.

GUTIERREZ J., WILLIAMS E.J., O'DONOVAN J., BRADY C., PROCTOR A.F., MARQUES P.X., WORRALL S., NALLY J.E., MCELROY M., BASSETT H.F., SAMMIN D.J. & MARKEY B.K. (2011). Monitoring clinical outcomes, pathological changes and shedding of *Chlamydomphila abortus* following experimental challenge of periparturient ewes utilizing the natural route of infection. *Vet. Microbiol.*, **147** (1–2), 119–126.

JEE J., DEGRAVES F.J., KIM T. & KALTENBOECK B. (2004). High prevalence of natural *Chlamydomphila* species infection in calves. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 5664–5672.

JONES G.E., JONES K.A., MACHELL J., BREBNER J., ANDERSON I.E. & HOW S. (1995). Efficacy trials with tissue-culture grown, inactivated vaccines against chlamydial abortion in sheep. *Vaccine*, **13**, 715–723.

JONES G.E., LOW J.C., MACHELL J. & ARMSTRONG K. (1997). Comparison of five tests for the detection of antibodies against chlamydial (enzootic) abortion of ewes. *Vet. Rec.*, **141**, 164–168.

LAROUCAU K., SOURIAU A. & RODOLAKIS A. (2001). Improved sensitivity of PCR for *Chlamydomphila* using *pmp* genes. *Vet. Microbiol.*, **82** 155–164.

LAROUCAU K., VORIMORE F., SACHSE K., VRETOU E., SIARKOU V.I., WILLEMS H., MAGNINO S., RODOLAKIS A. & BAVOIL P.M. (2010). Differential identification of *Chlamydomphila abortus* live vaccine strain 1B and *C. abortus* field isolates by PCR-RFLP. *Vaccine*, **28**, 5653–5656.

LIVINGSTONE M., WHEELHOUSE N., MALEY S.W. & LONGBOTTOM D. (2009). Molecular detection of *Chlamydomphila abortus* in post-abortion sheep at oestrus and subsequent lambing. *Vet. Microbiol.*, **135** (1–2), 134–141.

LONGBOTTOM D. & COULTER L.J. (2003). Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J. Comp. Pathol.*, **128**, 217–244.

LONGBOTTOM D., FAIRLEY S., CHAPMAN S., PSARROU E., VRETOU E. & LIVINGSTONE M. (2002). Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by enzyme-linked immunosorbent assay with a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP90 of *Chlamydomphila abortus*. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4235–4243.

LONGBOTTOM D. & LIVINGSTONE M. (2006). Vaccination against chlamydial infections of man and animals. *Vet. J.*, **171**, 263–275.

NIETFELD J.C. (2001). Chlamydial infections in small ruminants. *Update on Small Ruminant Medicine*, **17**, 2.

PAPP J.R., SHEWEN P.E. & GARTLEY (1994). Abortion and subsequent excretion of chlamydiae from the reproductive tract of sheep. *Infect. Immun.*, **62**, 3786–3792.

RODOLAKIS A. (1986). Use of a live temperature-sensitive vaccine in experimental and natural infections. *In: Chlamydial Diseases of Ruminants*, Aitken I.D., ed. Commission of the European Communities, Luxembourg, 71–77.

SACHSE K., HOTZEL H., SLICKERS P., ELLINGER T. & EHRLICH R. (2005). DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydomphila* spp. *Mol. Cell Probes*, **19**, 41–50.

SACHSE K., VRETOU E., LIVINGSTONE M., BOREL N., POSPISCHIL A. & LONGBOTTOM D. (2009). Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections (Review). *Vet. Microbiol.*, **135**, 2–21.

SALTI-MONTESANTO V., TSOLI E., PAPAVALASSIOU P., PSARROU E., MARKEY B.M., JONES G.E. & VRETOU E. (1997). Diagnosis of ovine enzootic abortion, using a competitive ELISA based on monoclonal antibodies against variable segments 1 and 2 of the major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* serotype 1. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 228–235.

SILLIS M. & LONGBOTTOM D. (2011). Chlamydiosis. *In: Oxford Textbook of Zoonoses, Biology, Clinical Practice and Public Health Control*, Palmer S.R., Lord Soulsby, Torgerson P.R. & Brown D.W.G., eds. Oxford University Press, Oxford, UK, 146–157.

SPENCER W.N. & JOHNSON F.W.A. (1983). Simple transport medium for the isolation of *Chlamydia psittaci* from clinical material. *Vet. Rec.*, **113**, 535–536.

STAMP J.T., MCEWEN A.D., WATT J.A.A. & NISBET D.I. (1950). Enzootic abortion in ewes. I. Transmission of the disease. *Vet. Rec.*, **62**, 251–254.

STUEN S. & LONGBOTTOM D. (2011). Treatment and control of *Chlamydial* and *Rickettsial* infections in sheep and goats. *Vet. Clin. Food Anim.*, **27**, 213–233.

SZEREDI L. & BACSADI A. (2002). Detection of *Chlamydomphila* (*Chlamydia*) *abortus* and *Toxoplasma gondii* in smears from cases of ovine and caprine abortion by the streptavidin-biotin method. *J. Comp. Pathol.*, **127**, 257–263.

TAN T.W., HERRING A.J., ANDERSON I.E. & JONES G.E. (1990). Protection of sheep against *Chlamydia psittaci* infection with a subcellular vaccine containing the major outer membrane protein. *Infect. Immun.*, **58**, 3101–3108.

THIELE D., WITTENBRINK M.M., FISCHER D. & KRAUSS H. (1992). Evaluation of the polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Chlamydia psittaci* in abortion material from ewes. *Zentralbl. Bakteriol.*, **277**, 446–453.

VRETOU E., RADOUANI F., PSARROU E., KRITIKOS I., XYLOURI E. & MANGANA O. (2007). Evaluation of two commercial assays for the detection of *Chlamydomphila abortus* antibodies. *Vet. Microbiol.*, **123**, 153–161.

WHEELHOUSE N., AITCHISON K., LAROUCAU K., THOMSON J. & LONGBOTTOM D. (2010). Evidence of *Chlamydomphila abortus* vaccine strain 1B as a possible cause of ovine enzootic abortion. *Vaccine*, **28** (35), 5657–5663.

WILSMORE A.J. & DAVIDSON I. (1991). 'Clearview' rapid test compared with other methods to diagnose chlamydial infection. *Vet. Rec.*, **128**, 503–504.

WILSON K., LIVINGSTONE M. & LONGBOTTOM D. (2009). Comparative evaluation of eight serological assays for diagnosing *Chlamydomphila abortus* infection in sheep. *Vet. Microbiol.* **135**, 38-45.

WOOD M.M. & TIMMS P. (1992). Comparison of nine antigen detection kits for diagnosis of urogenital infections due to *Chlamydia psittaci* in koalas. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 3200–3205.

*

* *

Примечание: Действуют референтные лаборатории МЭБ по энзоотическому аборту овец (см. Таблицу в части 4 настоящего *Руководства по заболеваниям наземных животных* или веб-сайт МЭБ, где размещена обновленная версия списка: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения дальнейшей информации в отношении методов диагностики, реагентов и вакцин против энзоотического аборта овец обращайтесь в справочные лаборатории МЭБ.

