

На правах рукописи

Вологодская Ольга Владимировна

**АССОЦИАТИВНЫЙ УРОГЕНИТАЛЬНЫЙ МИКОПЛАЗМОЗ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
(ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ)**

16.00.03. – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук**

Омск – 2006

Работа выполнена в институте ветеринарной медицины Федерального государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Омский государственный аграрный университет»

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор
Красиков Александр Пантелеевич

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Плешакова Валентина Ивановна

доктор ветеринарных наук
Бажин Михаил Аристоклевиич

Ведущее учреждение: Институт экспериментальной ветеринарии
Сибири и Дальнего Востока (ИЭВС и ДВ)

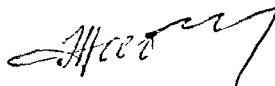
Защита состоится 20 декабря 2006 г. в 12³⁰ часов на заседании диссертационного совета Д. 220.050.03 при ФГОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет» в институте ветеринарной медицины по адресу: 644122, г. Омск-122, ул. Октябрьская, 92, тел.: 24-15-35, тел./факс.: 23-30-31 (для Н.П. Жабина).

E-mail : ivm_omgau@omsknet.ru
www/omgau.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Института ветеринарной медицины ОмГАУ.

Автореферат разослан « 18 » ноября 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, доцент



Н.П. Жабин

1. Общая характеристика работы

Актуальность темы.

В последние годы возросло значение в возникновении заболеваний условнопатогенных микроорганизмов, в том числе микоплазм. Микоплазма является типичной хронической инфекцией с присущей ей длительной персистенцией возбудителя в организме. При этом микоплазмы способны сохранять жизнеспособность в фагоцитах и оказывать повреждающие действие на макрофаги, что приводит к нарушению их функции и снижению резистентности организма. Вступая в синергические отношения с вирусной, бактериальной и условнопатогенной микрофлорой, микоплазмы создают условия для ее активного роста и развития, что усиливает тяжесть течения данного заболевания. (С.В. Прозоровский и др., 1997) Все это приводит к снижению продуктивности, бесплодию и яловости коров. Данная инфекционная болезнь наносит хозяйствам значительный экономический ущерб. Поэтому, следует проводить своевременную диагностику микоплазмоза в ассоциации с сопутствующими микроорганизмами с использованием экспресс-методов, что позволит выявлять больных животных, а также микробоносителей и своевременно лечить их.

Для лечения больных микоплазмозом людей животных и птиц применяют различные антибиотики. Однако бессистемное применение их без определения чувствительности возбудителей к лекарственным препаратам не позволяет добиться желаемых результатов. В настоящее время не разработаны эффективные и рациональные схемы лечения крупного рогатого скота при урогенитальном микоплазмозе и ассоциативных формах его проявления.

В связи с этим весьма актуальным является: выяснить распространение урогенитального микоплазмоза крупного рогатого скота с помощью экспресс-методов диагностики, а также разработать эффективные и рациональные схемы лечения крупного рогатого скота при ассоциативном урогенитальном микоплазмозе с учетом всех сочленов ассоциаций микроорганизмов, участвующих в инфекционном процессе. Все это предопределило тему данных исследований.

Цель работы. Разработка методов диагностики и лечения при ассоциативном урогенитальном микоплазмозе крупного рогатого скота.

Задачи исследований.

- Выяснить эпизоотическую ситуацию по урогенитальному микоплазмозу крупного рогатого скота и ассоциативным формам его проявления в хозяйствах Омской области.
- Изучить культуральные, морфологические, биохимические и патогенные свойства выделенных микоплазм.
- Изыскать экспресс-методы диагностики урогенитального микоплазмоза и испытать их в производственных условиях
- Разработать эффективные и рациональные схемы лечения коров при урогенитальном микоплазмозе и его ассоциации с другими инфекциями.



Научная новизна. Установлено широкое распространение уrogenитального микоплазмоза крупного рогатого скота, проявляющегося чаще в ассоциативных формах, в хозяйствах Омской области. Доказана чувствительность элективных питательных сред для индикации глюкозо- и аргинин ферментирующих микоплазм и уреоплазм крупного рогатого скота. Определены виды и основные свойства выделенных микоплазм. Получены антигены из полевых штаммов микоплазм и диагностические сыворотки для РНИФ. Предложены методы и способы индикации и идентификации возбудителей, основанные на комплексном подходе к изучению всех сочленов микробных ассоциаций. Они легко выполнимы в лабораторных условиях, могут быть использованы для определения видовых характеристик выделяемых культур микроорганизмов. Изучена чувствительность к антибиотикам полевых культур микоплазм, на основании чего разработаны эффективные и рациональные схемы лечения.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Материалы диссертации вносят определенный вклад в развитие науки микоплазмологии и в изучение микропаразитоценозов уrogenитального тракта крупного рогатого скота. Разработанные методы индикации и идентификации микоплазм на питательных средах, методики получения микоплазмозных антигенов и антисывороток для РНИФ и эритроцитарного диагностикума позволят внедрить данные рациональные экспресс-методы диагностики микоплазмоза крупного рогатого скота в условиях промышленного животноводства.

На основании проведенных исследований разработаны для внедрения в практику методические рекомендации «Комплексная система мер борьбы и профилактики с ассоциативными инфекционными болезнями животных» и «Диагностика и лечение при ассоциативном уrogenитальном микоплазмозе крупного рогатого скота», которые позволят ветеринарным специалистам своевременно диагностировать уrogenитальный микоплазмоз крупного рогатого скота и его ассоциативные формы. Применение испытанных при ассоциативном микоплазмозе крупного рогатого скота схем лечения позволит наиболее эффективно бороться с данной инфекцией.

Апробация работы. Материалы исследований доложены и обсуждены на научных конференциях профессорско-преподавательского состава и аспирантов ИВМ ФГОУВПО ОмГАУ 2004, 2005, 2006 гг. «Проблемы ветеринарного образования и научных исследований в агропромышленном комплексе» (Омск, 2004, 2005, 2006); Межрегиональной научно-практической конференции «Эпизоотология, патология и ветеринарно-санитарные мероприятия при инфекционных болезнях животных» (Омск, 2004, СО РАСХН ВНИИБТЖ); Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины» (Омск, 2005, 2006, СО РАСХН ВНИИБТЖ); Международной научно-практической конференции «Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных» (Ульяновск, 2006г); Международной научно-практической конференции посвященной 60-ти летию Краснодарского НИВИ (Краснодар, 2006).

Публикации результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 122 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических предложений и приложения. Список использованной литературы включает 145 наименований, в том числе 50 иностранных авторов. Работа иллюстрирована 33 таблицами и 6 рисунками.

Внедрение результатов исследований. Результаты научных исследований использованы при подготовке методических рекомендаций: «Комплексная система мер борьбы и профилактики при ассоциативных инфекционных болезнях животных» (Утверждены Ученым советом ИВМ ФГОУ ВПО ОмГАУ, протокол № 1 от 29.09.2004 г. и секцией животноводства Центра научного обеспечения АПК Министерства сельского хозяйства и продовольствия Омской области от 08.10.2004 г., протокол № 5) и «Диагностика и лечение при ассоциативном урогенитальном микоплазмозе крупного рогатого скота» (Утверждены Ученым советом ИВМ ФГОУ ВПО ОмГАУ, протокол № 7 от 28.06.2006 г. и секцией животноводства Центра научного обеспечения АПК Министерства сельского хозяйства и продовольствия Омской области от 12.09.2006 г., протокол № 5)

Материалы диссертации используются в учебном процессе кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней ИВМ ОмГАУ, кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ОмГМА и Тюменского института переподготовки кадров агробизнеса.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Эпизоотическая ситуация по ассоциативному урогенитальному микоплазмозу крупного рогатого скота в хозяйствах Омской области.
2. Испытание усовершенствованных бактериологического и серологического методов диагностики ассоциативного урогенитального микоплазмоза крупного рогатого скота.
3. Чувствительность полевых культур микоплазм к антибактериальным препаратам *in vitro*.
4. Схемы лечения при ассоциативном урогенитальном микоплазмозе крупного рогатого скота.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы

Тема диссертационной работы является самостоятельным разделом комплексной государственной программы «Профилактика (диагностика) и меры борьбы с ассоциативными инфекционными и инвазионными болезнями животных и птиц» (№ гос. регистрации 01.2.001100602).

Научно-исследовательская работа проводилась в лаборатории микстинфекций кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней ИВМ ОмГАУ и хозяйствах Омской области.

Объектом исследований являлись коровы родильно - профилактического периода с выраженными клиническими признаками абортос, эндометритов и маститов, а также быки-производители.

Материалом для исследований служили сыворотка крови, молоко (молозиво), цервико-вагинальная слизь от 790 коров и нетелей из 34 хозяйств Омской области с различной эпизоотической ситуацией по инфекционным болезням, рождаемостью и гибелью телят, а также сперма и препуциальные смывы от быков и патологический материал от абортированных плодов.

Индикацию и идентификацию возбудителей осуществляли микроскопическими методами, включающими и электронную микроскопию, а так же бактериологическими и серологическими методами.

Мазки окрашивали по Граму и Романовскому-Гимзе.

Электронно-микроскопическое исследование взвеси микоплазмозных культур осуществляли путем просмотра ультратонких срезов в электронном микроскопе ЭМ – 125.

Для бактериологического исследования использовали стандартные (МПА, МПБ) и, разработанные совместно с ФГУ Омского НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора, жидкие и твердые питательные среды для индикации и идентификации микоплазм. Специфичность и чувствительность которых была изучена ранее в лаборатории микст-инфекций кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней ИВМ ОмГАУ и лаборатории зоонозных инфекций Омского НИИ природно-очаговых инфекций при микоплазмозе плотоядных Новиковой Н.Н. (2002) и респираторном микоплазмозе птиц Сунцовой О.А. (2004). При этом морфологические, тинкториальные, культуральные и биохимические свойства выделенных микроорганизмов изучали согласно общепринятым в бактериологической практике методикам. Микроскопирование проводили при помощи светового микроскопа «Ломо» (x 900). Для видовой индикации микоплазм использовали ключ Gourlay and Howard (1979).

Применяли стандартные и дополнительные, разработанные нами методы серологической диагностики непрямо́й иммунофлюоресценции (РНИФ) для прижизненного выявления антигенов и антител, и посмертного антигенов, а также реакцию непрямо́й гемагглютинации (РНГА) для обнаружения антител в сыворотке крови животных. Фиксацию мазков проводили по методу Моды с соавт. (1958), а постановку РНИФ по методике, предложенной Уэллером и Кунсом (1945). В качестве антигенов применяли: полученные нами микоплазмозные антигены, антигены вакцинных штаммов и стандартные антигены, используемые

для постановки РА и РСК, а в качестве антител – гомологичные антигенам кроличьи и бычьи антисыворотки, антивидовые для РНИФ и специфические сальмонеллезные, риккетсиозные, листериозные для РПИФ люминесцентные сыворотки меченные ФИТЦ (ИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи), а также полученные нами кроличьи сыворотки против возбудителей микоплазмоза, хламидиоза, ИРТ-ПВ, диплококкоза, стафилококкоза, стрептококкоза. Видоспецифические сыворотки к полевым штаммам микоплазм получали путем гипериммунизации кроликов по схеме D.Schimmel в модификации Красикова А.П. и Новиковой Н.Н. (2000). Пробы, обработанные люминесцентными сыворотками, просматривали под микроскопом ЛЮМ Р-8 при увеличении в 900 раз. Степень флуоресценции антител оценивали по 4-х крестной системе (Вайтекер и др., 1958).

В качестве клеточной основы для приготовления диагностикума для РНГА были выбраны эритроциты барана, а для стабилизации 20% формальдегид. Фиксацию эритроцитов проводили по методу Фили в модификации Красикова А.П.(1996).

Исследования проводили с целью выявления антигенов возбудителей и вырабатываемых гомологичных специфических антител в сыворотке крови, вымени и половой системе, а также в патологическом материале на 11 инфекционных болезней: микоплазмоз, инфекционный ринотрахеит – пустулезный вульвовагинит (ИРТ-ПВ), сальмонеллез, пастереллез, хламидиоз, ку-лихорадка, лептоспироз, листериоз, диплококкоз, стрептококкоз и стафилококкоз.

Экономическую эффективность рассчитывали по методике определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий, утвержденной Департаментом ветеринарии РФ 21.02.1997.

Статистическую обработку полученных данных проводили на ПК с помощью программы Microsoft Excel 2000.

2.2. Изучение эпизоотической ситуации по урогенитальному микоплазмозу крупного рогатого скота и ассоциативным формам его проявления в хозяйствах Омской области

Для изучения эпизоотической ситуации по урогенитальному микоплазмозу крупного рогатого скота и возможности его ассоциативных форм проявления были проведены комплексные обследования хозяйств с применением эпизоотологического, клинического, бактериологического и серологических методов. Для лабораторных исследований брали цервико-вагинальную слизь, молоко и сыворотку крови коров родильно-профилактического периода; препуциальные смывы, сперму и сыворотку крови быков-производителей; патологический материал от абортированных плодов.

На основании полученных результатов установлено, что урогенитальный микоплазмоз крупного рогатого скота широко распространен в Омской области (табл. 1)

Из 34 обследованных хозяйств микоплазмоз отсутствовал только в трех, при этом в виде моноинфекции данная болезнь проявлялась лишь в 16% хозяйств, а остальных инфекционный процесс носил ассоциативный характер.

Таблица 1.

Ассоциации микроорганизмов при урогенитальном микоплазмозе у коров в хозяйствах Омской области.

№ п.п	Хозяйства	К-во гол	Инфицировано, %										
			сал	пас	хл	пв	ку-лих	леп	лис	дип	стр	ста	мик
1.	Россия	75	60	10	24	13	63	32	37	4	10	12	100
2.	им. Розы Люксембург	20	30	-	60	40	25	40	25	15	5	5	75
3.	Боевое	180	10	-	30	10	5	5	-	10	8	7	10
4.	Лесное	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40
5.	Украинский	10	-	-	60	30	50	50	50	-	-	-	40
6.	Заря свободы	10	10	20	70	50	20	10	20	10	10	-	20
7.	Искра	10	20	-	40	10	-	-	-	10	10	80	-
8.	Русский хлеб	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
9.	им. Карбышева	20	-	-	60	-	10	-	-	-	-	-	20
10.	Ермолаевское	15	20	-	20	-	30	-	10	-	-	-	46
11.	Алексеевское	12	70	30	20	45	30	-	-	10	-	20	60
12.	Знамя	12	-	-	17	8	-	-	-	-	-	17	100
13.	Ачанский-1	10	10	-	30	10	10	10	-	10	-	10	80
14.	Сосновское	10	90	-	-	-	20	-	10	10	-	-	80
15.	Агрофирма Кормиловская	21	38	-	24	-	14	10	5	5	-	5	90
16.	Молзавод Кормиловский	10	70	-	40	-	-	40	30	-	-	20	100
17.	Колос	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40
18.	Нива	10	10	20	60	-	-	10	20	30	40	-	30
19.	Большевик	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
20.	Новороссийское	20	10	-	20	10	10	20	20	-	-	-	100
21.	Цветочное	10	-	-	90	50	20	20	-	-	10	-	10
22.	Береговое	20	-	-	80	-	-	-	-	-	-	-	100
23.	Новозавское	20	-	-	5	5	5	-	-	5	-	-	25
24.	Новорождественское	20	-	30	5	20	5	20	-	15	10	15	10
25.	Дружба	10	-	-	40	10	-	-	-	-	-	-	60
26.	Евгачинское	10	-	-	10	10	-	-	-	20	-	-	30
27.	Добровольское	12	-	-	67	-	-	-	-	-	-	-	-
28.	Руспол	6	-	-	60	-	-	-	-	-	-	-	100
29.	Чистовское	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
30.	Рагозинское	96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31
31.	Любимовское	30	-	-	33	-	-	-	-	-	-	-	33
32.	Екатеринославское	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33.	Кам-Курское	24	8	-	40	4	-	-	-	4	-	-	30
34.	им. Кирова	3	-	-	33	-	-	33	-	-	-	-	100

Примечание: са – сальмонеллы, пас- пастереллы, хл – хламидии, пвв – вирус пустулезного вульвовагинита, ку – ли – риккетсия ку-лихорадки, ле- лептоспиры, ли-листерии, ди-диплококки, стр-стрептококки, ста-стафилококки, ми-микоплазмы.

2.3. Бактериологические методы диагностики урогенитального микоплазмоза

2.3.1. Индикация и идентификация микоплазм на питательных средах

Для выделения микоплазм, использовали элективные жидкие и твердые питательные среды для индикации и идентификации микоплазм.

Посевы на жидких средах инкубировали в течение трех суток, учет роста проводили визуально по изменению цвета среды. Микоплазмы в процессе жизнедеятельности ферментируют глюкозу, аргинин или гидролизуют мочевины, в результате изменяется рН среды, о чем свидетельствует изменение цвета входящего в него индикатора. Среда также содержит ингибиторы, которые губительно действуют на сопутствующую микрофлору.

С целью более глубокого изучения культуральных свойств микоплазм, выросшие на селективных индикаторных средах (изменившие их цвет) культуры пересевали на аналогичные плотные диагностические среды с содержанием 1,3% агара Дифко. Микоплазмы на плотной среде росли в виде круглых, не сливающихся друг с другом колоний с растущим в агар центром и нежной поверхностной периферией. Также отмечали мелкие зернистые колонии без особо выраженной центральной зоны. У старых колоний центр уплотняется, становится более темным, зернистость усиливается. При обнаружении типичных колоний их вместе с агаровым блоком отсеивали на жидкие элективные питательные среды с соответствующей ферментативной активностью. Если рост отсутствовал, то проводили 3-5 последовательных «слепых» пассажей, если в течение этого периода индикаторная среда не изменяла цвет, фиксировали гибель микоплазм при пересевах.

2.3.2. Основные биологические свойства микоплазм

2.3.2.1. Морфологические свойства

Для изучения тинкториальных и морфологических свойств микоплазм, из 72-х часовой бульонной культуры микоплазм готовили мазки, высушивали на воздухе, фиксировали метиловым спиртом или ацетоном в течение 5 мин и окрашивали по Романовскому-Гимзе в течение часа при температуре 37°C. Мазок промывали и просматривали под иммерсионной системой микроскопа – микроорганизмы были преимущественно кокко-овоидно-перстневидной формы размером 0,3-0,5 мкм фиолетового оттенка. Также встречались и фиолетовые шары размером 3-6 мкм, образования синего цвета величиной 2-6 мкм, единичные палочки, скопления зернистой и гомогенной массы с синеватым оттенком, в которые заключены микроструктурные элементы.

2.3.2.2. Биохимические свойства

При выделении микоплазм на жидких элективных диагностических питательных средах, производят дифференциацию по главным биохимическим

признакам разложению глюкозы, аргинина, мочевины. Поэтому, для видовой индикации микоплазм по ключу Gourlay and Howard, 1979, изучали протеолитическую активность, редукцию тетразола, потребность в холестерине, дигитонин-чувствительность и рост при температуре 22⁰ С.

По основным свойствам выделенные микоплазмы от крупного рогатого скота в хозяйствах Омской области были отнесены к трем видам *M. bovoculi*, *M. arginini* и *Ureaplasma sp.* (табл. 2)

Таблица 2

Основные свойства микоплазм, выделенных у крупного рогатого скота.

Род и вид	Г	А	У	Пленка и пятна	Редукция тетразола	Потребность в холестерине	Дигитонин чувствительность	Протеолитическая активность	Рост при 22 ⁰ С
<i>M. bovoculi</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>M. arginini</i>	-	+	-	-	-	+	+	+	-
<i>Ureaplasma sp.</i>	-	-	+	-	-	+	+	+	-

Примечание: Г – ферментация глюкозы, А – гидролиз аргинина, У - уреазная активность.

2.3.2.3. Ультраструктурные свойства

Для электронно-микроскопического исследования использовали взвеси микоплазмозных культур, фиксированных в смеси глутарового и параформальдегидного растворов. После промывки их в фосфатном буфере и дополнительной фиксации в 1% растворе четырех окиси осмия, обезвоживали в спиртах восходящей крепости и ацетоне. Приготовленный материал заключали в аралдит. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме УМТП – 4. После контрастирования срезы исследовали в электронном микроскопе ЭМ – 125. При просмотре срезов обращали внимание на форму микоплазм, которая обычно была округлая, овальная, вытянутая, иногда в виде ракетки.

Оболочка не имеет клеточной стенки, представляет собой трехслойную цитоплазматическую мембрану, два слоя осмиофильных и один между ними осмиофобный. Внутренняя структура представлена сильно контрастированным нуклеотидом и зернистыми тяжами, микрофибриллами, рибосомными, полисомными структурами.

2.3.2.4. Патогенные свойства

В опыте для изучения патогенности микоплазм использовали полевые штаммы *M. bovoculi*, *M. arginini*, *Ureaplasma sp.* выделенные от крупного рогатого скота в Омской области.

Для проведения опыта взяли 20 белых мышей массой по 20 грамм, кото-

рых разделили на 4 группы, три опытных и одна контрольная - интактная, по пять голов в каждой группе.

На 2-й день после заражения наступила гибель 4-х мышей зараженных *M. bovoculi*, 5-я мышь погибла на 4-й день. Две мыши зараженные *M. arginini* погибли на 4-й день, три на 7-й. Одна из зараженных уреоплазмами мышей погибла на 7-й день, оставшиеся же в живых четыре мыши были девитализированы на 10-е сутки, как и мыши контрольной группы.

По результатам проведенного опыта видно, что микоплазмы обладают высокой патогенностью. При этом инфицированность органов при заражении *M. bovoculi* и *Ureaplasma sp.* составляла 100%, а *M.arginini* 75-100%. У контрольной группы, микоплазмы не были выделены. Летальность для белых мышей составляет: *M. bovoculi* и *M.arginini* 100%, а *Ureaplasma sp.* – 20%.

2.4. Серологические методы диагностики урогенитального микоплазмоза

2.4.1. Получение микоплазмозных антигенов и диагностических кроличьих сывороток для РНИФ

Целью нашего исследования являлось получение антигенов и активных гипериммунных кроличьих сывороток против полевых штаммов микоплазм, выделенных от крупного рогатого скота, для реакции непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ).

Антигены для РНИФ готовили из трехсуточных убитых культур *M. bovoculi*, *M. arginini* *Ureaplasma sp.*, которые отмывали от питательной среды путем центрифугирования при 6000 г 30 мин, осадок после трехкратного ресуспензирования и последующего центрифугирования разводили до концентрации 1,7 млрд. микробных клеток в 1 мл по бактериальному стандарту мутности (ГИСК им. Л.А. Тарасевича).

Гипериммунизацию кроликов проводили путем дробного внутривенного введения живых концентрированных культур микоплазм каждые три дня с применением иммуностимулятора левамизола подкожно. Для этого использовали 6 кроликов (по 2 головы на каждый штамм) весом 2,5 - 3 кг.

Динамику синтеза антител изучали на 7, 14, 21 и 30 сутки после гипериммунизации в реакции непрямой иммунофлюоресценции, которую ставили на предметных стеклах по стандартной методике, учет реакции проводили в крестах, свечение менее чем на два креста считали отрицательным (рис1.)

Установлено, что на 7-й день после иммунизации антитела в РНИФ выявлялись в низких титрах 1:10 – 1:20. На 14-й день положительная реакция была при более высоких разведениях в пределах с 1:80 до 1:160 на все вводимые антигены, а на 21-30 сутки титр люминесцирующих антител достиг максимального уровня 1:320 – 1:640.

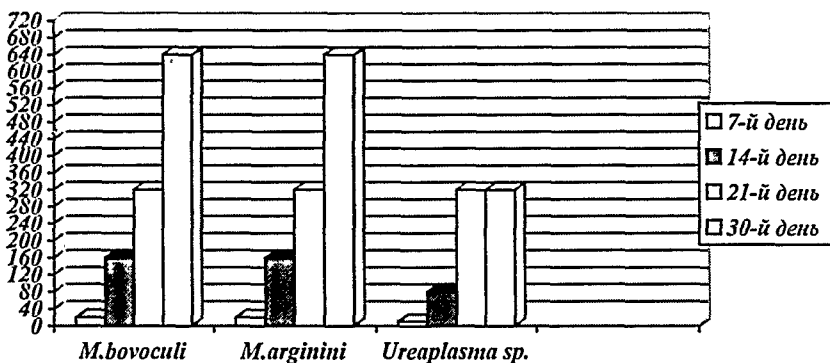


Рис. 1. Динамика синтеза антител у кроликов гипериммунизированных культурами микоплазм.

2.4.2. Изучение специфичности и активности сывороток и антигенов в РНИФ

Для изучения видовой специфичности и активности применяли кроличьи антимиоплазмозные сыворотки и антигены, полученные выше описанным способом и убитые путем нагревания $T 70^{\circ}C$ 30мин. Для изучения специфичности микоплазмозных антигенов в РНИФ использовали антимиоплазмозные сыворотки в разведении 1:10, а также сыворотки против бруцеллеза, лептоспироза, пустулезного вульвовагинита (ПВ), сальмонеллеза и риккетсиоза.

Определяя видовую специфичность и активность полученных микоплазмозных кроличьих сывороток в РНИФ установили, что полученные сыворотки реагируют только с аналогичными антигенами, при этом активность сывороток достигала титра от 1:320 до 1:640. При определении специфичности микоплазмозных антигенов с сыворотками против бруцеллеза, лептоспироза, листериоза, ПВ и риккетсиоза РНИФ была отрицательная. Положительная же реакция отмечалась только с аналогичными кроличьими антисыворотками

2.4.3. Определение диагностической ценности бактериологического и серологического (РНИФ) методов диагностики в производственных условиях

Для сравнения чувствительности РНИФ и бактериологического метода исследовали цервик-вагинальную слизь и сыворотку крови от коров, и патологический материал от абортированных плодов (табл. 3, 4, 5).

Таблица 3.

Чувствительность РНИФ в сравнении с бактериологическим методом исследования патологического материала от абортированных плодов.

Хозяйства	Кол-во проб	На средах			В РНИФ		
		Г	А	У	Г	А	У
ЗАО им.Кирова	18	33 %	88 %	0	88 %	77 %	77 %
СПК «Новороссийское»	12	33 %	83 %	0	83 %	67 %	50 %
ЗАО им. «Розы Люксембург»	24	15 %	90 %	100 %	35 %	90 %	100 %

Примечание: антигены Г-глюкозоферментирующих *M.bovoculi*, А- аргининферментирующих *M.arginini* , У-*Ureaplasma* sp.

Таблица 4.

Чувствительность РНИФ и бактериологического метода исследования цервико-вагинальной слизи коров.

Хозяйства	Кол-во Голов	На питательных средах			РНИФ		
		Г	А	У	Г	А	У
ОПХ «Боевое»	160	23%	5%	50%	53%	26%	51%
ЗАО им. Кирова	48	19%	31%	88%	50%	56%	63%
СПК «Новороссийское»	40	35%	55%	30%	70%	82,5%	12,5%

Таблица 5.

Определение чувствительности микоплазмозных антигенов в РНИФ с сывороткой крови в сравнении с бактериологическим методом.

Хозяйства	Кол-во голов	На питательных средах			РНИФ		
		Г	А	У	Г	А	У
С-з «Россия»	20	20%	20%	80%	20%	20%	60%
ОПХ «Боевое»	26	61,5%	38%	15%	58%	73%	69%

Для выявления «местных» антител в секрете вымени провели исследование в РНИФ молока от 26 коров, принадлежащих ОПХ «Боевое» с микоплазмозными антигенами и сыворотками. Антигены *M.bovoculi* в молоке выявляли 50% животных, антитела присутствовали у большего количества коров – 61%; антигены *M.arginini* у 65%, а аналогичные антитела у 61%; уреаплазмозные антигены у 54% животных, антитела были выявлены у 69% животных.

Таким образом, результаты исследований подтверждают, что полученные нами микоплазмозные антигены и коровичи антимиоплазмозные сыворотки активны и специфичны в РНИФ, а данная реакция не уступает по чувствительности бактериологическому методу исследования, а в некоторых случаях даже превосходит его.

2.4.4. Получение эритроцитарного диагностикума для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА)

Формализированные эритроциты барана сенсibilизировали инактивированным микоплазмозным антигеном из смешанных в равных объемах *M. bovoculi*, *M. arginini* и *Ureaplasma sp.* соотношении 2:1 (2V антигена : 1V эритроцитов).

Для контроля пригодности полученного эритроцитарного диагностикума проводили постановку РНГА. Реакцию ставили макрометодом в объеме 0,5 мл в полистироловых пластинках, с микоплазмозными Г, А, У и смешанной (Г + А + У) микоплазмозными сыворотками в разведениях 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320.

С микоплазмозными сыворотками по отдельности полученный диагностикум реагировал на три креста до разведения 1:40, на два креста до разведения 1:80, а со смешанной сывороткой против трех видов микоплазм реагировал на три креста до разведения 1:80 и на два креста 1:160. С отрицательной сывороткой сомнительная реакция на два креста отмечалась в первом разведении. В контроле с буферным раствором отрицательная реакция наблюдалась во всех разведениях.

При изучении специфичности трех серий полученных микоплазмозных эритроцитарных диагностикумов (МЭД) установлено, что только в титре 1:10 МЭД в РНГА вызывал перекрестные реакции с бруцеллезной, лептоспирозной, сальмонеллезной, и хламидиозной сыворотками, тогда как в последующих разведениях РНГА была отрицательной при четко выраженных положительных реакциях с гомологичными микоплазмозными сыворотками.

2.5. Изыскание средств и методов лечения животных репродуктивного стада при ассоциативном урогенитальном микоплазмозе

2.5.1 Определение чувствительности полевых культур микоплазм к антибактериальным препаратам *in vitro*

Для подбора наиболее эффективных препаратов для лечения животных при урогенитальном микоплазмозе определяли чувствительность полевых культур микоплазм к антибактериальным препаратам методом серийных разведений. Для определения чувствительности к препаратам использовали культуры микоплазм выделенные в хозяйствах Омской области. (табл 6.).

На основании результатов проведенных исследований показано, что наибольшей активностью *in vitro* в отношении культур, выделенных из урогенитального тракта крупного рогатого скота, обладает тетрациклин и препараты фторхинолонового ряда (ципрофлоксацин, норфлоксацин).

Таблица 6.

Чувствительность культур микоплазм к антибактериальным препаратам.

препараты	чувствительность, %		
	M. bovocoli (n=30)	M. arginini (n=30)	Ureaplasma sp. (n=30)
тетрациклин	97	90	83
ципрофлоксацин	97	63	67
норфлоксацин	90	53	40
левомицетин	67	37	16
эритромицин	40	10	10
сульфадимезин	33	50	0
тилозина-тартрат	0	20	63
триметоприм	40	16	0
тетра-триметосул	16	10	10
тиланик	0	27	0
бензилпенициллин	0	0	0
контроль	-	-	-

2.5.2. Изучение различных схем лечения и лабораторных методов контроля их эффективности.

Действие различных схем лечения изучали на 75 коровах родильно-профилактического периода с клиническими признаками эндометритов и положительными результатами лабораторных исследований на микоплазмоз и другие инфекции (к-з «Россия»). Животные были разделены 14 групп по 5 голов в каждой, которых лечили по разным схемам и двух контрольных - больных не леченных и здоровых.

До и после лечения исследовали сыворотку крови, молоко (молозиво), маточно-влагалищный секрет лабораторными методами: серологическими - реакция прямой (РПИФ) и непрямой (РНИФ) иммунофлюоресценции (в качестве антигенов и антисывороток использовали стандартные диагностикумы для РА и РСК, инактивированные вакцинные штаммы, стандартные люминисцентные антивидовые кроличьи, бычьи сыворотки для РНИФ и люминисцентные сальмонеллезные типы А, В Д, листериозную, риккетсиозную люминисцентные сыворотки для РПИФ, а также полученные нами кроличьи сыворотки против микоплазмоза, хламидиоза, диплококкоза, стафилококкоза, и стрептококкоза, бактериологическими - с применением жидких и плотных микоплазмозных питательных сред.

Для лечения коров с урогенитальным микоплазмозом наилучшей оказалась 12 схема, а, при урогенитальном микоплазмозе в ассоциации с двумя и более инфекциями наиболее эффективными были 4-я, 5-я и 7-я схемы. Данные схемы включают комплексные препараты, действующие не только на микоплазмы, но и на всю ассоциацию микроорганизмов: (тетрациклин ПВП; левотетрасульфин ПЭГ; левоэритроциклин ПЭГ) (табл. 7.).

Эффективность других схем с применением в различных сочетаниях тетрасульфина, бициллина-3, ихтиоглюковита, глюкокитиола-ПЭГ, окситоцина, пункции по Логвинову и фуразолидоновых палочек составляла от 0 до 90%.

Таблица 7.

Эффективные и рациональные схемы лечения при урогенитальных инфекциях крупного рогатого скота.

Группы животных	Характеристика групп	Применяемые препараты	Продолжительность лечения (дней)	Эффективность, %
3	Сальм. + микопл.	Тетрациклин ПВП (однократно)	10	100%
4	Лепт. + лист. + сальм. + Ку-лих. + микопл.	Окситоцин + бициллин-3 + ихтиоглюковит + тетрациклин ПВП	40	100%
5	Лист. + сальм. + Ку-лих. + микопл.	Левотетрасульфид ПЭГ (4х-кратно)	26	100%
7	Лист. + сальм. + Ку-лих. + микопл.	Окситоцин + бициллин-3 + пункция по Логвинову + левозритроциклин ПЭГ	33	100%
12	Микопл.	Окситоцин + ихтиоглюковит + тетрациклин ПВП	20	100%
15	Хлам. + лепт. + лист. + сальм. + Ку-лих. + микопл.	Контрольная не леченная группа	-	0
16		Контрольная интактная группа	-	-

Эффективность комплексных препаратов (тетрациклина ПВП и левозритроциклина ПЭГ) была подтверждена в двух других производственных опытах на глубокостельных коровах с носительством микоплазм, сальмонелл, хламидий, риккетсий и вируса ПВ (СПК «Новороссийское», СПК «Большевик»).

Применение разработанных схем лечения в хозяйстве позволило предотвратить экономический ущерб на сумму 574461 руб, при этом экономический эффект от проведенных мероприятий составил 550056 руб, а экономический эффект на один рубль затрат был – 22, 53 руб.

ВЫВОДЫ

1. Урогенитальный микоплазмоз крупного рогатого скота широко распространен в хозяйствах Омской области, при этом в виде моноинфекции данная болезнь проявляется лишь в 16% хозяйств, а в остальных (84%) инфекционный процесс носит ассоциативный характер.

2. Жидкие и плотные питательные среды НИИПОИ Роспотребнадзора г.Омска чувствительны к микоплазмам уrogenитального тракта крупного рогатого скота, и позволяют не только выделять их, но и дифференцировать по основным биохимическим показателям (аргинин, глюкоза, мочеви́на).

3. Микоплазмы выделенные от крупного рогатого скота в Омской области по биохимическим свойствам отнесены к трем видам *M. bovoculi*, *M. arginini* и *Ureaplasma sp.*.

4. Полученные из полевых штаммов микоплазм антигены и аналогичные кроличьи антими́коплазменные сыворотки активны и специфичны в РНИФ, а данная реакция не уступает по чувствительности бактериологическому методу.

5. Сконструирован стойкий, специфичный и активный эритроцитарный диагностикум из трех видов микоплазм, циркулирующих в стадах крупного рогатого скота, для постановки РНГА, позволяющий проводить массовые исследования сыворотки крови животных на микоплазмоз.

6. Выделенные полевые культуры микоплазм и уреоплазм наиболее чувствительны к препаратам фторхинолонового ряда норфлоксацину и ципрофлоксацину, а также к тетрациклину и левомицетину.

7. При ассоциативном уrogenитальном микоплазмозе наиболее эффективными и рациональными являются следующие схемы лечения: окситоцин+бициллин-3+ихглюковит+тетраци́лин ПВП; левотетрасульфид ПЭГ; окситоцин + бициллин-3 + пункция по Логвинову + левозэритроци́клин ПЭГ. Экономический эффект от их применения в хозяйстве составил 550056 руб.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Ветеринарной практике предложены эффективные и рациональные схемы диагностики и лечения крупного рогатого скота при ассоциативном уrogenитальном микоплазмозе, которые подробно изложены в методических рекомендациях: «Комплексная система мер борьбы и профилактики при ассоциативных инфекционных болезнях животных» (Утверждены Ученым советом ИВМ ФГОУ ВПО ОмГАУ, протокол № 1 от 29.09.2004 г. и секцией животноводства Центра научного обеспечения АПК Министерства сельского хозяйства и продовольствия Омской области от 08.10.2004 г., протокол № 5) и «Диагностика и лечение при ассоциативном уrogenитальном микоплазмозе крупного рогатого скота» (Утверждены Ученым советом ИВМ ФГОУ ВПО ОмГАУ, протокол № 7 от 28.06.2006 г. и секцией животноводства Центра научного обеспечения АПК Министерства сельского хозяйства и продовольствия Омской области от 12.09.2006 г., протокол № 5).

Результаты исследований по диагностике и лечению используются в учебном процессе на кафедре эпизоотологии и инфекционных болезней ИВМ ОмГАУ, на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии ОмГМА и в Тюменском институте подготовки кадров агробизнеса.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Ассоциативный микоплазмоз у коров родильно-профилактического периода / А.П. Красиков, О.В. Вологодская // Проблемы ветеринарного образования и научных исследований в агропромышленном комплексе: сб. науч. тр. ИВМ ОмГАУ – Омск, 2004. – С. 182-187.
2. Диагностика ассоциативных инфекционных болезней крупного рогатого скота / А.П. Красиков, В.Э. Малошевич, Н.В. Лобанова, О.В. Вологодская // Проблемы ветеринарного образования и научных исследований в агропромышленном комплексе: сб. науч. тр. ИВМ ОмГАУ – Омск, 2004. – С. 187-193.
3. Урогенитальный микоплазмоз крупного рогатого скота и ассоциативные формы его проявления / А.П. Красиков, О.В. Вологодская, Н.Н. Новикова // Эпизоотология, патология и ветеринарно-санитарные мероприятия при инфекционных болезнях животных: сб. науч. тр. ВНИИ БТЖ СО РАСХН – Омск, 2004. – С.149-155
4. Ассоциативные формы проявления инфекционного процесса у телят и коров родильно-профилактического периода / В.Э. Малошевич, А.П. Красиков, О.В. Вологодская // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: сб. науч. тр. ВНИИ БТЖ СО РАСХН – Омск, 2005. – С. 136-146.
5. Диагностика и схемы лечения ассоциативного микоплазмоза и других урогенитальных инфекций крупного рогатого скота / О.В. Вологодская, А.П. Красиков // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: сб. науч. тр. ВНИИ БТЖ СО РАСХН – Омск, 2005. – С. 84-91.
6. Диагностика ассоциативного микоплазмоза телят при помощи бактериологического и серологического методов / А.П. Красиков, А.Н. Свиридова, О.В. Вологодская, А.Е. Жонголович // Актуальные проблемы ветеринарной медицины продуктивных и непродуктивных животных: сб. науч. тр. ВНИИ БТЖ СО РАСХН – Омск, 2006. – С. 107-111.
7. Изучение активности и специфичности антигенов и антисывороток в РНИФ при ассоциативном урогенитальном микоплазмозе крупного рогатого скота / А.П. Красиков, О.В. Вологодская // Актуальные проблемы ветеринарной медицины продуктивных и непродуктивных животных: сб. науч. тр. ВНИИ БТЖ СО РАСХН – Омск, 2006. – С. 102-107.
8. Изучение специфичности, активности и чувствительности кроличьих сывороток в РНИФ при урогенитальном микоплазмозе коров / А.П. Красиков, О.В. Вологодская // Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных: сб. науч. тр. Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии – Ульяновск, 2006. – С. 240-243.
9. Получение сывороток для диагностики урогенитального микоплазмоза крупного рогатого скота в РНИФ / А.П. Красиков, О.В. Вологодская // Актуальные проблемы ветеринарии в современных условиях: сб. науч. тр. Краснодарского НИВИ – Краснодар, 2006. – С. 168-169.
10. Профилактика носительства ассоциаций патогенных микроорганизмов у беременных коров и нетелей / А.П. Красиков, О.В. Вологодская, И.Г. Алексева, Н.И. Водопьянова // Ветеринарная патология - 2006 - №3 - С.144-147

Вологодская Ольга Владимировна

**АССОЦИАТИВНЫЙ УРОГЕНИТАЛЬНЫЙ МИКОПЛАЗМОЗ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
(ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ)**

16.00.03. – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Омск – 2006

Сдано в набор 17.11.06 Подписано печать 17.11.06
Формат 60x84/16. Гарнитура Times New Roman.
Усл.печл. 1,25. Печать-оперативная. Тираж 100 экз.
Лицензия ЛТ № 020074

Отпечатано с оригинал-макета. В типографии ООО «Вариант-Омск»
644043, г.Омск, ул. Коммунистическая, 45. Тел./факс: 25-14-34

20061

24994

№ 24994