

Сунцова Ольга Александровна



УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
АССОЦИАТИВНОГО РЕСПИРАТОРНОГО
МИКОПЛАЗМОЗА ПТИЦ

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

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Работа выполнена в институте ветеринарной медицины ФГОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет», ГУ Омском НИИ природно-очаговых инфекций и ГНУ «Сибирский НИИ птицеводства» РАСХН.

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук,
профессор А.Л. Красиков

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор Г.Н. Сидоров

доктор ветеринарных наук
М.А. Бажин

Ведущее учреждение: ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства (ВНИВИП)

Защита состоится 10 декабря 2004 г. в 12³⁰ часов на заседании диссертационного совета Д. 220.050.03 при ФГОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет» в институте ветеринарной медицины ОмГАУ по адресу: 644122, г. Омск-122, ул. Октябрьская, 92, тел/факс 24-15-35; 25-05-49.

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

Автореферат разослан 10 ноября 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, доцент



Н.П. Жабин

2005-4
22452

028821

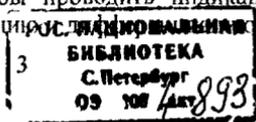
1. Общая характеристика работы

Актуальность темы. Промышленное птицеводство наших дней характеризуется высокой концентрацией поголовья на ограниченных площадях и поточной системой содержания, что обуславливает постоянное пассажирирование через организм птиц условно-патогенной микрофлоры и повышение ее вирулентности. Кроме того, искусственный микроклимат, нарушения технологии содержания и кормления, влияние стрессовых факторов приводят к снижению общей резистентности организма птицы. В результате возросла этиологическая роль широко распространенных условно-патогенных микроорганизмов, в том числе и микоплазм.

Примером тому может служить *M. gallisepticum*. возбудитель респираторного микоплазмоза кур и инфекционного синовита индеек, история распространения которого тесно связана с историей развития птицеводства. При этом заболевании смертность взрослой птицы достигает 6%, молодняка 20-80%, эмбрионов - до 15%. Яйценоскость снижается на 30%, и привесы молодняка - на 13-16%; происходит задержка роста и развития молодняка, снижается качество мяса и яйца, увеличиваются затраты на проведение ветеринарно-санитарных мероприятий (Серебряков А.С., Грошева Г.А., Шубин В.А., 1970; Яровой П.Ф., Ларин С.А., 1995; Бессарабов Б.Ф., Мельникова И.И., 2001; Косоруков В., 2004). Кроме того, респираторный микоплазмоз не всегда сопровождается внешними клиническими признаками, либо протекает в ассоциации с другими бактериальными или вирусными болезнями (колибактериоз, сальмонеллез, гемофилез, инфекционный ларинготрахеит, бронхит кур, ньюкалская болезнь). Поэтому своевременно и оперативно поставить диагноз можно только лабораторными методами.

В настоящее время основными методами типизации микоплазм остаются серологические методы - реакция агглютинации (РА) с цельной кровью и с сывороткой, реакция гемагглютинации (РГА) и замедленная гемагглютинация (РЗГА), иммуноферментный анализ (ИФА), а также реакция агрегат-гемагглютинации (РАГА); реакция пассивной гемагглютинации (РИГА); прямая (РПИФ) и непрямая (РНИФ) реакции иммунофлюоресценции; моноклональные антитела (МАТ), поликлональные антитела (ПАТ); радиоиммунологический анализ (РИА); хемилюминисцентный анализ (ХЛИА); ДНК-гибридизация, полимеразная цепная реакция (ПЦР) (Серебряков А.С., Грошева Г.А., Шубин В.А., 1970; Митрофанов П. М. и др., 1982; Куликова И. Л., Феоктистова Т. А., 1989; Александрова Н. О., с соавт., 1995 и др.).

Многие авторы считают, что ведущим методом в лабораторных исследованиях при респираторном микоплазмозе является выделение культуры *M. gallisepticum*. Однако, несмотря на значительное количество прописей состава питательных сред, рекомендованных для выделения и культивирования микоплазм, еще не создано стандартных, универсальных питательных сред, выпускаемых биотехнологической промышленностью, с помощью которых можно было бы проводить индикацию всех видов микоплазм, а так же их идентификацию.



Исходя из этого, возникла необходимость изыскать высокочувствительные специфичные, доступные для широкого практического применения экспресс-методы бактериологической и серологической диагностики микоплазменной инфекции и разработать рациональную схему их применения, что и послужило основанием для проведения данных исследований.

Цель исследований. Усовершенствование бактериологического и серологического методов диагностики ассоциативного микоплазмоза птиц.

Задачи исследований.

1. Изучить эпизоотическую обстановку по респираторному микоплазмозу и другим инфекционным болезням птиц на птицефабриках Омской области и Алтайского края.
2. Разработать питательные среды для бактериологической экспресс-диагностики микоплазмоза.
3. Получить кроличьи антимикоплазменные сыворотки для диагностики респираторного микоплазмоза в РНИФ.
4. Испытать усовершенствованные бактериологические и серологические методы диагностики ассоциативного микоплазмоза птиц в экспериментальных и производственных условиях.

Научная новизна.

1. Установлена широкая распространенность респираторного микоплазмоза птиц и ассоциированные формы его проявления с эшерихиозом, стафилококкозом, сальмонеллезом на птицефабриках Омской области и Алтайского края.
2. Разработаны стандартные питательные среды для индикации глюкозо- и аргинин ферментирующих микоплазм и урсаплазм у птиц.
3. Получены кроличьи сыворотки против референтного и полевого штаммов *M. gallisepticum* для РНИФ.
4. Определены вид и основные свойства микоплазм, выделенных на птицефабриках Омской области.

Теоретическая и практическая значимость работы.

- Материалы диссертации дополняют концепцию о паразито-хозяйственных отношениях, вносят вклад в развитие науки паразитологии об ассоциативных инфекционных процессах.
- Усовершенствован культуральный метод индикации микоплазм из биоматериала. Использование новых питательных сред не требует специального оборудования, позволяет проводить как индикацию, так и идентификацию возбудителей, определять их концентрацию в колонии образующих единицах (КОЕ) на плотной среде и в цветообразующих единицах (ЦОЕ) на жидких, оценивать эффективность проводимых лечебно-профилактических мероприятий.
- Предложенная схема индикации и идентификации возбудителей из биоматериала основана на комплексном подходе к изучению всех сочленов микробных ассоциаций. Она легко выполнима в производственных и лабораторных условиях, может быть использована для определения видовых характеристик выделяемых культур с

дальнейшим их использованием в качестве антигенов для серологических реакций.

- На основании результатов проведенных исследований разработаны методические рекомендации «Методы диагностики ассоциативного респираторного микоплазмоза птиц». Применение приведенной в них схемы диагностики позволит контролировать эпизоотическую ситуацию по данной инфекции и своевременно проводить лечебно-профилактические мероприятия.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены на: научной конференции преподавателей и аспирантов Института ветеринарной медицины ОмГАУ (Омск, 2001–2003); научно-практической конференции «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов» (ВНИТИБП, Шелково, 2003); Региональной научной конференции молодых ученых аграрных вузов Сибирского федерального округа «Аграрная наука России в новом тысячелетии» (2003); IV международной научно-практической конференции с международным участием, посвященной 60-летию кафедры эпидемиологии и 80-летию кафедры микробиологии ОмГМА (2003); Ученом совете ГНУ СибНИИП РАСХН (2002–2003); Ветеринарном конгрессе по птицеводству (г. Новосибирск, 2004).

Публикации результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 6 статей, в которых изложены основные положения и выводы по теме диссертации.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 119 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических предложений и приложения. Список использованной литературы включает 187 наименований, в том числе 43 иностранных авторов. Работа иллюстрирована 18 таблицами и 7 рисунками.

Внедрение результатов исследований. Результаты исследований вошли в методические рекомендации «Методы диагностики ассоциативного микоплазмоза птиц», рассмотренные и одобренные на заседании ученого совета ИВМ ОмГАУ от 30.04.2003 года протокол № 3 и на заседании Центра научного обеспечения АПК Омской области при Министерстве сельского хозяйства Омской области от 8.10.2004, протокол № 5.

Материалы диссертации используются в учебном процессе кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней сельскохозяйственных животных ИВМ ОмГАУ, Института повышения квалификации руководителей и специалистов АПК ОмГАУ, а также в курсе лекций Тюменского института переподготовки кадров агробизнеса.

Тема диссертационной работы самостоятельным разделом входит в комплексную государственную программу «Профилактика (диагностика) и меры борьбы с ассоциативными инфекционными и инвазионными болезнями животных и птиц» и имеет номер государственной регистрации 01. 2. 00100602 и является частью тематического плана НИР отдела ветеринарии ГНУ СибНИИП (№ 07.05А.02).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Эпизоотическая ситуация по респираторному микоплазмозу и другим инфекционным болезням птиц на птицефабриках Омской области и Алтайского края.
2. Разработка питательных сред для бактериологической экспресс-диагностики микоплазмоза.
3. Испытание усовершенствованных бактериологического и серологического методов диагностики ассоциативного микоплазмоза птиц в экспериментальных и производственных условиях.

2. Собственные исследования

2.1. Материалы и методы

Объектом исследования служили куры разных половозрастных групп и породных линий, подозреваемые в заражении микоплазмозом. В опытах было использовано: 6 кроликов породы шиншилла массой 2,5-3,0 кг, 200 девятисуточных эмбрионов и 140 цыплят-бройлеров кросса «Сибиряк» в возрасте 21 дня.

Материалом для прижизненного исследования служили сыворотка крови и соскобы со слизистой оболочки гортани; от вынужденно убитой и павшей птицы - суспензия с пораженных органов; от эмбрионов - хориоалантоисная жидкость и желток.

Соскобы со слизистых оболочек брали стерильным хирургическим полым зондом на транспортную среду, представляющую собой питательную среду для микоплазм без ингибиторов и субстрата ферментативной активности.

Посевы с пораженных органов делали по общепринятой в микробиологии методике на МПБ, МПА и специальные среды (на бульон Хоттингера, обогащенный 1% глюкозы и 20% нормальной лошадиной сыворотки и три испытуемые жидкие среды - с глюкозой, аргинином и мочевиной). Посевы инкубировали в аэробных условиях при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 1-5 суток. В процессе выделения и культивирования микроорганизмов на питательных средах изучали их культуральные свойства общепринятым способом.

Морфологию бактериальных клеток изучали в мазках, окрашенных по Граму и Романовскому-Гимзе.

Биохимические свойства выделенных культур микроорганизмов изучали при помощи набора ММТ Е1 тест согласно инструкции. Идентификацию проводили по прилагаемому ключу.

Патогенность выделенных культур микоплазм изучали постановкой биопробы на 9-суточных куриных эмбрионах. Заражение проводили в хориоалантоиальную полость бульонной культурой в дозе $2,0 \times 10^8$ микробных тел. Наблюдение вели до конца инкубации, ежедневно просматривая эмбрионы на овоскопе И11-А. По окончании срока наблюдения вылупившихся цыплят девитализировали и проводили патологоанатомическое и бактериологическое исследования.

Для изучения ультраструктурного строения микоплазменных клеток взвеси исследуемых культур фиксировали в смеси глутарового и параформальдегидного растворов. После промывки фосфатным буфером и дополнительной фиксации в 1%-ном растворе четырех окиси осмия обезживали в спиртах восходящей концентрации и ацетоне. Приготовленный материал заключали в аралдит. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме УМТП-4. После контрастирования срезы исследовали под электронным микроскопом ЭМ - 125.

Контроль качества питательных сред для индикации микоплазм и уреоплазм осуществляли согласно методическим рекомендациям «Контроль качества питательных сред по биологическим показателям». М., 1980.

В опыте использовали разработанные нами совместно с Омским НИИ природно-очаговых инфекций испытуемые питательные среды в сравнении с питательными средами по прописи НИИ ЭМ им. Н.Ф. Гамалеи и обогащенным бульоном Хоттингера.

Чувствительность сред определяли методом десятикратных разведений референтных тест-штаммов *M. gallisepticum*, *M. fermentans* и *U. urealyticum*, полученных из НИИ ЭМ им. Н.Ф. Гамалеи.

Селективность (специфичность) определяли методом последовательных десятикратных разведений референтных тест-штаммов *Staphylococcus aureus* WHO-2, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* 9001, полученных из ГИСК им. Л.А. Тарасевича.

Стабильности биологических свойств сред определяли по показателям чувствительности и специфичности в разные сроки хранения в условиях холодильника.

Для серологической диагностики применяли РНИФ, ИФА, РА. При этом в качестве антигенов использовали стандартный цветной антиген *M. gallisepticum* (производства ВНИИЗЖ), референтный штамм *M. gallisepticum*, предоставленный нам НИИ ЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, и полевой штамм микоплазм, выделенный из биоматериала кур, который по культурально-морфологическим, биохимическим и ультраструктурным признакам был отнесен к виду *M. gallisepticum*.

Видоспецифические сыворотки к полевым и референтному штаммам микоплазм получали путем гипериммунизации кроликов по схеме D. Schimmel в модификации Красикова А.П. и Новиковой Н.Н. (2002).

Для постановки РНИФ использовали ослиный антикроличий глобулин, меченый ФИТЦ (флюоресцин изотиоционат натрия), изготовленный НИИ ЭМ им. Н.Ф. Гамалеи.

В экспериментальных условиях и производственных опытах для бактериологических исследований на микоплазмоз использовали жидкие и плотные испытуемые среды, а также для выделения сопутствующей микрофлоры (МПА, МПБ), элективные среды (Эндо, ВСА и др.). Параллельно с культуральными методами проводили исследования в РНИФ на наличие антигенов *M. gallisepticum*, а также других микроорганизмов (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*).

Цифровые данные экспериментов обработаны методами математической статистики, принятыми в биологии и медицине с использованием программы Microsoft Excel 97. Достоверность полученных результатов определяли с помощью критерия Стьюдента.

Раздел по изучению чувствительности и специфичности питательных сред для индикации и идентификации микоплазм был выполнен совместно с доктором медицинских наук, заведующим лабораторией зоонозных инфекций НИИ природно-очаговых инфекций Рудаковым Н.В.; отдельные исследования выполнены на кафедре микробиологии и вирусологии ИВМ ОмГАУ совместно с д.в.н. Беспаловой Т.А., за что выражаем им глубокую признательность и благодарность.

2.2. Результаты собственных исследований

2.2.1. Изучение эпизоотической ситуации по респираторному микоплазмозу и другим инфекционным болезням на птицефабриках Омской области и Алтайского края

Исследования проводились с применением эпизоотологического, клинического, бактериологического и серологического методов совместно с научными сотрудниками отдела ветеринарии Н.Ф. Хатько и С.Б. Лыско.

При изучении эпизоотической ситуации на птицефабриках Омской области установлено, что в структуре гибели кур от инфекционных болезней большая доля в 1999 году приходилась на колибактериоз (92%), на лейкоз - 4%, на б. Марека - 3% и на стафилококкоз - 1%.

От общего числа погибших от колибактериоза кур 98% составил молодняк в возрасте 1-60 дней. При этом основными этиологическими факторами были различные сероварианты *E. coli* (01, 02, 078, 0103). Наиболее часто выявляли их ассоциации с сальмонеллами и стафилококками.

В 2000 г в структуре гибели кур от инфекционных болезней также преобладал колибактериоз, на его долю приходилось 88%, а из числа погибших кур 90%, как и в предыдущем году, составил молодняк до 60 дневного возраста. При этом к ассоциации колибактериоз + сальмонеллез + стафилококкоз присоединился еще и микоплазмоз. От стафилококкоза, б. Марека, лейкоза и пастереллеза погибло 6,8, 5,4, 0,2 и 0,02% птицы соответственно.

Аналогичные показатели были получены и в 2001 году. Колибактериоз снова господствовал над другими инфекциями (85%), Причем молодняка в возрасте до 60 суток пало 70,5%, 61-180 дней - 28%. На долю падежа от б. Марека и лейкоза пришлось 12 и 3% соответственно.

Респираторный микоплазмоз птиц в Омской области впервые зарегистрирован на Сибирской птицефабрике в 1997 г. серологическим методом у 70% обследованной птицы. К 2001 г. этот показатель снизился до 21% (почти в 3,5 раза) благодаря внедрению комплексной схемы профилактики и лечения птицы.

В 2000 г. респираторный микоплазмоз также был выявлен на Любинской птицефабрике и в ЭПХ СиБииИП. В этих же хозяйствах одновременно регистрировали эшерихиоз (колибактериоз), стафилококкоз и сальмонеллез, т.е. инфекционный процесс носил ассоциативный характер.

Анализ результатов проведенных бактериологических, серологических и гистологических исследований в Алтайском крае в 1999 г. показал, что 60% птицы от числа исследованной за год были заражены ССЯ-76, 17% - сальмонеллезом, 14% - эшерихиозом, 4,7% - ластереллезом, 1-2% псевдомонозом.

В 2000 г. было выявлено 85% больных сальмонеллезом, 15% эшерихиозом. Микоплазмоз регистрировали на 9 птицефабриках из 19. При этом из числа выделенных микоплазм в 57% случаев изолировали *M. synoviae*, в 33% - ассоциацию *M. synoviae* + *M. gallisepticum*, в 5% - *M. synoviae* + возбудитель реовирусного теносиновита и в 5% - *M. synoviae* + *M. gallisepticum* - возбудитель реовирусного синовита.

В 2001 г. из восьми исследованных птицефабрик на двух регистрировали сальмонеллез, на восьми - реовирусный теносиновит, причем на одной из них в ассоциации с б. Марека.

В течение 2002 года нами были проведены исследования 1208 проб сыворотки от птицы разных половозрастных групп и направления продуктивности, принадлежащей ОНО ЭПХ СиБииИП. Результаты исследований показали, что птица яичного и мясного кроссов реагировала на микоплазмоз не одинаково. Среди молодняка яичной птицы процент серопозитивных не превышал 3% от числа исследованных. Увеличение числа положительно реагирующих отмечалось начиная со 170 дневного возраста (10%) и достигало максимума к 260 дням (70%), до 420 дней изменялось незначительно (60%), а затем резко снижалось (до 10% в 450 дней). Иную картину наблюдали среди птицы мясного направления продуктивности. У суточного молодняка материнские антитела выявлялись до 45,5% случаев, к 40 дням число положительно реагирующих сокращается и сходит к 0% в возрасте 110-125 дней. У взрослой птицы серопозитивные особи начинают выявляться с 200-230 дневного возраста (29%), их число увеличивается и достигает 100% к 300-320 дням жизни и сохраняется до конца срока эксплуатации.

2.2.2. Иискание питательных сред для индикации и идентификации микоплазм

(Исследования, описанные в данном разделе, проводились совместно с Новиковой Н.Н. (2002).

Нами совместно с НИИПИ были разработаны оригинальные технологии производства жидких и сухих питательных сред для диагностики микоплазмозов, успешно прошедшие апробацию для индикации микоплазм у плотоядных животных (Новикова Н.Н., 2002) и у птиц:

1. Среда жидкая диагностическая для индикации глюкозоферментирующих микоплазм;
2. Среда жидкая диагностическая для индикации аргинин ферментирующих микоплазм;
3. Среда жидкая диагностическая для индикации уреазплазм;
4. Среда сухая диагностическая для выявления глюкозоферментирующих микоплазм;
5. Среда сухая диагностическая для выявления аргинин ферментирующих микоплазм;
6. Среда сухая диагностическая для выявления уреазплазм.

Применительно к жидким средам для индикации микоплазм был осуществлен подбор оптимального состава для всех трех сред (для индикации аргинин- и глюкозоферментирующих микоплазм и уреазплазм) из стандартных ингредиентов: питательной основы, индикатора, оптимального набора и концентрации антибиотиков, оптимальных значений pH на разных стадиях технологического процесса. Отработана технология их получения, которая включает приготовление основы с добавлением в нее питательных компонентов и соответствующих субстратов ферментативной активности (глюкоза, аргинин, мочевины), сыворотки и селективных антибиотиков, а также стерилизующую фильтрацию и заключительную пастеризацию.

Использование трех диагностических сред позволяло осуществлять индикацию и дифференциацию наиболее распространенных видов микоплазм, а также посредством титрации оценивать степень их накопления в цветообразующих единицах (ЦОЕ) на жидких средах, а также в соответствующих им колониеобразующих единицах (КОЕ) на плотных средах.

Разработана технология получения сухих питательных сред, служащих основой для приготовления плотных сред, что дает возможность идентифицировать выделенные культуры микоплазм и титровать их на специальных агаровых средах.

Таким образом, культуральный метод прост в постановке, не требует специального оборудования, позволит проводить как индикацию, так и идентификацию возбудителей, определять их титры и оценивать эффективность проведенного лечения.

2.3.3. Изучение чувствительности и специфичности жидких питательных сред

Для определения основных показателей качества испытуемых жидких питательных сред была проведена серия опытов по определению селективности и чувствительности сред и влияния антибиотиков, входящих в состав испытуемых сред, на микоплазмы и уреазплазмы.

Установлено, что испытуемые жидкие диагностические среды для индикации и идентификации глюкозо- и аргинин ферментирующих микоплазм и уреазплазм по всем показателям отвечают требованиям, предъявляемым к питательным средам. Они обладают высокой чувствительностью по отношению к микроорганизмам класса Mollicutes, т.е. обеспечивают рост тест-штаммов не ниже, чем в разведении 10^3 при этом скорость роста тест-штаммов микоплазм была в три раза выше, а уреазплазм - сутки. Селективные свойства испытуемых сред характеризовались ингибцией роста на них тест-штаммов *Staphylococcus aureus* WHO-2.

Proteus mirabilis, *Escherichia coli* 9001 и отсутствием таковой в отношении молликут. Стабильность биологических свойств позволяет хранить среды в условиях бытового холодильника до 6 месяцев.

2.2.4. Изучение чувствительности и специфичности полужидких и плотных питательных сред

При изучении чувствительности и специфичности сухих диагностических сред для индикации и идентификации глюкозо- и аргинин ферментирующих микоплазм и уреаплазм было установлено, что они также соответствуют предъявляемым к ним требованиям. Приготавливаемые из них плотные и полужидкие среды обладают высокой чувствительностью к представителям класса Mollicutes, обеспечивая их рост из разведения не ниже 10^5 . При этом скорость роста тест-штаммов *M. gallisepticum* на плотной среде пять и на полужидкой трое суток, *M. fermentans* пять и четверо суток и *U. urealyticum* в течение четырех и трех суток соответственно. Селективная способность выражена в ингибции данными питательными средами роста тест-штаммов *Staphylococcus aureus* WHO-2, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* 9001 и отсутствии таковой на микоплазмы и уреаплазмы. Биологические свойства среды в условиях холодильника сохраняются до года.

Обобщенные материалы опытов по изучению жидких, полужидких и плотных питательных сред для индикации микоплазм показали, что они действительно соответствуют всем предъявляемым требованиям (табл. 1).

Таблица 1

Основные показатели качества питательных сред для индикации и идентификации микоплазм.

Среды	Чувствительность (рост min кол-ва м. т.)	Скорость роста тест-штаммов (сутки)			Специфичность (селективные свойства)	Сроки хранения (месяцы)
		<i>M. gallisepticum</i> M ± m	<i>M. fermentans</i> M ± m	<i>U. urealyticum</i> M ± m		
жидкие	10^5	$3,12 \pm 0,11^*$	$3,28 \pm 0,01^*$	$1,33 \pm 0,11^*$	100%	6
полужидкие	10^5	$3,57 \pm 0,11^*$	$4,42 \pm 0,01^{**}$	$2,83 \pm 0,11^{**}$	100%	6
плотные	10^5	$5,12 \pm 0,11^*$	$5,27 \pm 0,01^*$	$4,22 \pm 0,04^*$	100%	12

Примечание: * $P \leq 0,05$; ** $P > 0,05$.

2.2.5. Получение кроличьих гипериммунных антимиоплазменных сывороток

Гипериммунизация кроликов проводилась по методу D. Schimmet в модификации Красикова АЛ. и Новиковой Н.Н. (2002), суть которой состоит в дробном внутривенном введении антигена кроликам каждые три дня с применением иммуностимулятора левачизола подкожно при первом введении.

Для гипериммунизации использовали трехсуточные бульонные культуры референтного и полевого штаммов *M. gallisepticum*.

Культуральную жидкогь центрифужировали при 6000 g в течение часа. Полученный осадок трижды отмывали стерильным физиологическим раствором, центрифугируя в том же режиме, и доводили до концентрации $1,7 \times 10^8$ микробных тел в 1 мл по ОСМ ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Гипериммунизацию проводили на 6 кроликах (по 3 головы на каждый штамм) породы шиншилла весом 2,5-3 кг по следующей схеме (табл. 2):

Таблица 2

Схема гипериммунизации кроликов культурами микоплазм.

Время введения, сут.	1	4	7	10	13	16	20	24
Доза антигена, млрд м.т.	0.85	1,7	1,7	1,7	3,4	3.4	3.4	3,4
Левамизол, мл	1	-	-	-	-	-	-	-

Титры антител учитывали на 7, 14, 21 и 30 сутки после введения антигена в реакции непрямой иммунофлюоресценции.

С этой целью готовили антигены из референтного и полевого штаммов микоплазмы галлисептикум, использованных для гипериммунизации кроликов по описанной выше методике и инактивировали на водяной бане при температуре 70°C в течение 30 мин.

Из полученных гипериммунных сывороток готовили ряд последовательных двукратных разведений на физиологическом растворе, начиная с 1:10. Разведения делали микродозатором в пластиковых планшетах.

Параллельно ставили контроли: 1. Антиген + сыворотка положительная + сыворотка люминесцентная; 2. Антиген + сыворотка отрицательная + сыворотка люминесцентная; 3. Антиген + физиологический раствор + сыворотка люминесцентная.

Интенсивность свечения оценивали в крестах.

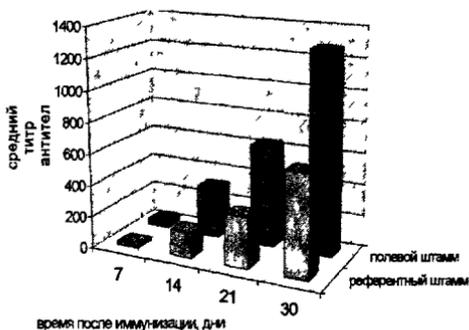


Рис. 1. Динамика синтеза антител у кроликов, иммунизированных культурами микоплазм.

Иммунизация кроликов данным методом позволила получить активные антимикоплазменные сыворотки для РНИФ (средний титр 1070 + 213,33), причем полевой штамм *M. gallisepticum* оказался более иммуногенным (рис. 1).

2.2.6. Изучение чувствительности и специфичности предлагаемых средств бактериологического и серологического экспресс-методов при экспериментальном микоплазмозе кур

В опыте для моделирования микоплазменной инфекции использовали полевые патогенные штаммы *M. gallisepticum* и *E. coli* серотип 020, выделенные от больных кур.

Мазки из патологического материала окрашивали по Граму и Романовскому-Гимзе.

Для бактериологического исследования использовали три специальные диагностические жидкие и плотные питательные среды для индикации глюкозо- и аргининферментирующих микоплазм и уреазплазм. Для выделения сопутствующей микрофлоры применяли простые и элективные питательные среды: МПА, МПБ, Эндо, висмут-сульфит-агар, Клиглера, агар Симмонса. Биохимические свойства изучали при помощи набора ММТ Е1.

Для выделения микоплазм в реакции непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) использовали полученные нами кроличьи антимикоплазменные сыворотки. Серотипы кишечной палочки определяли с помощью стандартного набора сывороток. Динамика иммунного ответа изучалась в СКРЛ с цветным микоплазменным антигеном ВНИИЗЖ и ИФА наборами BioChes (чтение реакции проводили на рндере ELx800).

Опыт проводился в виварии отдела ветеринарии ГНУ СибНИИП.

Для проведения опыта было сформировано 4 группы 21 дневных цыплят-бройлеров кросса «Сибиряк» по 20 голов в каждой. Заражение проводили по схеме (табл. 3). Одновременно с заражением птицу вакцинировали интраназально десятикратной дозой вакцины против ньюкааской болезни птиц из штамма «Ja-Cora» для ослабления иммунитета.

Таблица 3

Схема заражения цыплят

Группа	Кол-во голов	Вакцинация	Доза заражения, м. т.	
			<i>E. coli</i>	<i>M. gallisepticum</i>
1 контрольная (интактная)	20	+	-	-
2 контрольная (зараженная <i>E.c.</i>)	20	+	$1,0 \times 10^9$	-
3 контрольная (зараженная <i>M.g.</i>)	20	+	-	$3,0 \times 10^0$
4 опытная	20	+	$1,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^0$

Примечание: м. т. - микробных тел;
M.g. - *M. gallisepticum*;
E.c. - *E. coli*.

При исследовании сыворотки крови в СКРА на 8 день четкая положительная реакция отмечалась у птицы в 3 и 4 группах, тогда как в 1 и 2 положительных реагирующих не было на протяжении всего опыта. Полученные данные также были подтверждены методом иммуноферментного анализа. При этом титры антител повышались с 140 на 28 до 1421 на 42 день в третьей и с 89 до 1248 в четвертой группах. На 42 день всю птицу девитализировали.

При бактериологическом исследовании цыплят первой (интактной) группы в двух случаях (10%) были выделены культуры диплококков и в одном случае (5%) - кишечной палочки.

Во второй группе культуры кишечной палочки были выделены от 18 голов (90%), от одной головы в ассоциации со стрептококком и от одной головы была изолирована культура *Proteus mirabilis*.

В третьей группе от 16 голов (80%) были изолированы культуры микоплазм, при этом в четырех случаях в ассоциации с диплококком.

При бактериологическом исследовании цыплят, зараженных ассоциацией «микоплазма + кишечная палочка», исходные культуры были изолированы от 17 голов (85%).

Результаты исследования мазков-отпечатков в РНИФ во всех случаях соответствовали результатам бактериологического метода.

Таким образом специальные испытуемые диагностические питательные среды для индикации и идентификации микоплазм и уреоплазм обладали высокой чувствительностью в отношении данных микроорганизмов, и специфичностью, которая выражена в ингибции роста других микробов, выделяемых в ассоциации с микоплазмами. При этом результаты исследования в РНИФ совпадали с показателями бактериологического исследования, подтверждались серологическими методами СКРА, ИФА и являются дополнительным высокочувствительным и специфичным методом диагностики микоплазменной инфекции.

2.2.7. Испытание на чувствительность и специфичность усовершенствованных бактериологического и серологического экспресс-методов диагностики ассоциативного микоплазмоза птиц в производственных условиях

Испытание предлагаемых методов диагностики проводили в ОНО ЭГХ СибНИИП на птице мясных пород разных половозрастных групп. Материалом для бактериологического исследования служили соскобы со слизистой оболочки гортани, а от петухов дополнительно исследовали

сперму. Сыворотку исследовали методом СКРА, применяемым в производстве для контроля эпизоотической ситуации по респираторному микоплазмозу птиц.

Исследование проводили по следующей схеме (рис. 2):



Рис. 2. Схема индикации и идентификации микоплазм из биоматериала.

По результатам исследований установлено, что предложенные методы достаточно эффективны и информативны в отношении микоплазменной инфекции. Так, на специальных питательных средах для выделения микоплазм и уреаплазм рост сопутствующей микрофлоры ингибировался без отрицательного влияния на рост микоплазм. При этом индикация на жидких средах была параллельно подтверждена результатами роста на плотных средах. С помощью РНИФ удалось дополнительно выявить 23 петуха микоплазмозоносителя, при этом микоплазмы были выделены не только из слизистой гортани, но и из спермы, что определяет роль инфицированных петухов в распространении микоплазмоза внутри стада. Также были определены основные ассоциации микроорганизмов: *M. gallisepticum* + *E. coli*, *M. gallisepticum* + *P. mirabilis*, *M. gallisepticum* + *Diplococcus*, *M. gallisepticum* + *E. coli* + *Diplococcus*, при этом чаще выделяли ассоциацию микоплазм с кишечной палочкой (45%).

Таблица 4.

Изучение диагностической ценности бактериологического и серологического методов диагностики ассоциативного микоплазмоза птиц в производственных условиях

Возбудитель		M. gallisepticum	E. coli	S. albus	P. mirabilis	Diplococcus	
Цыплята	Выделено культур. %	Г	42,5	-	-	-	-
		А	-	-	-	-	-
		У	0,5	-	-	-	-
	Выделено серологическ. %	СКРА	30,2	н/и	н/и	н/и	н/и
		РНИФ	42,5	42,9	-	10,6	9,0
Куры	Выделено культур. %	Г	45,0	-	-	-	-
		А	0,2	-	-	-	-
		У	-	-	-	-	-
	Выделено серологическ. %	СКРА	85,7	н/и	н/и	н/и	н/и
		РНИФ	54,8	37,9	7,9	13,5	-
Петухи	Выделено культур. %	Г	49,0	-	-	-	-
		А	-	-	-	-	-
		У	-	-	-	-	-
	Выделено серологическ. %	СКРА	23,2	н/и	н/и	н/и	н/и
		РНИФ	69,6	55,4	-	-	23,0

При исследовании цыплят и петухов число зараженных микоплазмами, выявленных РНИФ, было на 12,346,4% больше, чем в СКРА, тогда как при исследовании кур картина была обратной. Повидимому, это объясняется слабой иммуногенностью микроорганизмов и пониженной иммунореактивностью макроорганизма, стадийностью антителогенеза и индивидуальными особенностями организма птицы. При сравнении бактериологического и серологического методов, установлено, что чувствительность РНИФ соответствовала результатам бактериологических исследований или была выше.

Таким образом, предлагаемые серологический и бактериологический методы дополняют друг друга и повышают достоверность диагностики ассоциативного микоплазмоза птиц

Выводы

1. По результатам ретроспективного анализа микоплазмоз был выявлен на 12 птицефабриках Омской области и Алтайского края, что составило 39% от числа обследованных. При этом микоплазмоз протекал в ассоциации с эшерихиозом, стафилококкозом, реже с пастереллезом и реовирусным теносиновитом.
2. Испытуемые питательные среды превосходят контрольные (бульон Хоттингера, среды по прописи НИИ ЭМ им. Н.Ф. Гамалеи) по скорости

- роста на них тест-штаммов микоплазм и уреаплазм (на сутки - жидкие и 2 суток - плотные среды) и ингибирующей способности антибиотиков, задерживающих рост тест-штаммов *Staphylococcus aureus* WHO - 2, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* 9001 до концентрации 10^9 . Кроме того разработана технология промышленного производства комплексного набора сред, которая позволит не только выделять микоплазмы, но и дифференцировать их по основным биохимическим свойствам (ферментация глюкозы, аргинина, мочевины). Удобная фасовка улучшит транспортировку, а стабильность биологических свойств позволит сохранять их в условиях холодильника в течение 6 месяцев жидкие и 12 месяцев сухие.
3. Получена активная, специфичная кроличья сыворотка против *M. gallisepticum* для РНИФ с титром 1:1280 для диагностики ассоциативного респираторного микоплазмоза птиц.
 4. В экспериментальных и производственных условиях определена диагностическая ценность усовершенствованных методов диагностики ассоциативного микоплазмоза птиц. В разных половозрастных группах бактериологическим методом было выявлено 42,5-49,0% инфицированной птицы, методом РНИФ - 42,5-69,6%.
 5. Применение предложенной нами схемы диагностики ассоциативного респираторного микоплазмоза птиц позволило сократить сроки постановки диагноза до 60 мин в РНИФ и бактериологическим методом с использованием стандартных сред для энтеробактерий и кокков и опытных питательных сред для индикации микоплазм и уреаплазм до 3-5 суток.

Практические предложения

Рекомендуем применять рациональную схему диагностики ассоциативного респираторного микоплазмоза птиц для выяснения эпизоотической ситуации, вызванной ассоциативной инфекцией, и для контроля эффективности лечебно-профилактических мероприятий. Указанная схема подробно изложена в методических рекомендациях «Методы диагностики ассоциативного респираторного микоплазмоза птиц», рассмотренных и одобренных на заседании ученого совета ИВМ ОмГАУ от 30.04.2003г., протокол № 3 и утвержденных на заседании Центра научного обеспечения АПК Омской области при Министерстве сельского хозяйства и продовольствия Омской области от 8.10.2004 г., протокол № 5.

Результаты исследований по ассоциативному микоплазмозу птиц используются в учебном процессе на кафедре эпизоотологии и инфекционных болезней сельскохозяйственных животных ИВМ ОмГАУ, в Институте повышения квалификации ветеринарных специалистов ОмГАУ и Тюменского института переподготовки кадров агробизнеса.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Ассоциативный респираторный микоплазмоз птиц / О.А. Сунцова, А.П. Красиков, Н.В. Рудаков и др. // Актуальные проблемы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения : материалы IV международной научно-практической конференции с международным участием, посвященной 60-летию кафедры эпидемиологии и 80-летию кафедры микробиологии Омской государственной медицинской академии (13-14 ноября 2003 года). Т. 1. - Омск, 2003. - С. 260-264.
2. Красиков, А.П. Эпизоотическая ситуация по инфекционным болезням, в том числе и респираторному микоплазмозу на птицефабрике «Сибирская» / А.П. Красиков, В.Г. Крышин, О.А. Сунцова // Проблемы и перспективы развития науки в Институте ветеринарной медицины ОмГАУ : сб. науч. тр. - Омск, 2002. - С. 128-133.
3. Культурально-биохимические и ультраструктурные свойства микоплазм, выделенных на территории Западной Сибири / А.П. Красиков, О.А. Сунцова, Н.В. Рудаков и др. // Роль ветеринарного образования в подготовке специалистов агропромышленного комплекса : сб. науч. тр. - Омск, 2003.-С. 157-160.
4. Мониторинг эпизоотической обстановки по инфекционным болезням птиц в Западно-Сибирском регионе и Алтайском крае / А.П. Красиков, Н.В. Рудаков, О.А. Сунцова и др. // Роль ветеринарного образования в подготовке специалистов агропромышленного комплекса : сб. науч. тр. - Омск, 2003. -С. 163-171.
5. Производственные испытания питательных сред для диагностики микоплазмоза животных и птиц / О.А. Сунцова, А.П. Красиков, Н.В. Рудаков и др. // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов : материалы международной научно-практической конференции (24-25 апреля 2003 г.). - Шелково, 2003. - С. 92-95
6. Эпизоотологические и лабораторно-диагностические аспекты респираторного микоплазмоза птиц / А.П. Красиков, Н.В. Рудаков, О.А. Сунцова и др. // Роль ветеринарного образования в подготовке специалистов агропромышленного комплекса: сб. науч. тр. - Омск, 2003. -С. 160-163.

Сунцова Ольга Александровна

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
АССОЦИАТИВНОГО РЕСПИРАТОРНОГО МИКОПЛАЗМОЗА ПТИЦ**

Автореферат

Сдано в набор 28.10.2004
Подписано к печати 30.10.2004
Формат бумаги 60x84 1/16.
Печать оперативная. Гарнитура Times New Roman
Усл. печ. л. 1,25. Тираж 100 экз.

Институт ветеринарной медицины ОмГАУ

Отпечатано с оригинал-макета
в типографии ООО «Вариант-Омск»
644122, г. Омск, ул. Яковлева, 5. Тел./факс: 250-354

№22 3 16

РНБ Русский фонд

2005-4

22452