

Веткорм. - 2013. - № 3. - с. 36-38.

АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ РЕСПИРАТОРНОГО И АССОЦИАТИВНОГО МИКОПЛАЗМОЗА ПТИЦ

□ □ □ **А.П. КРАСИКОВ**, доктор ветеринарных наук, профессор. Омский государственный аграрный университет имени П. А. Столыпина krasikovl950@mail.ru

□ □ □ **И.Г. ТРОФИМОВ**, доктор ветеринарных наук, профессор Омский государственный аграрный университет имени П. А. Столыпина

□ □ □ **Н.Ф. ХАТЫЮ**, кандидат ветеринарных наук, зав. отделом молекулярной биологии Государственного учреждения Омская областная лаборатория.

□ □ □ **С.Б. ЛЫСКО**, кандидат ветеринарных наук, зав. отделом ветеринарии Сибирского НИИ Птицеводства РАСХН

□ □ □ **О.А. СУНЦОВА**, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник отдела ветеринарии НИИ Птицеводства РАСХН

□ □ □ **РЕЗЮМЕ/SUMMARY.** Разработаны, экспериментально обоснованы и предложены ветеринарной практике экспресс-методы бактериологической и серологической диагностики респираторного микоплазмоза птиц и ассоциированных форм его проявления.

Developed and experimentally substantiated and offered veterinary practice available Express-methods of bacteriological and serological diagnostics of respiratory mycoplasmosis are considered birds and associated forms of its manifestation

□ □ □ **Ключевые слова:** микоплазмоз птиц, эпизоотологические, клинические, патологоанатомические, иммунологические, методы диагностики.

□ □ □ **Keywords:** mycoplasmosis of birds, epizootologicheskyy, clinical, pathoanatomical, immunological, diagnostics methods.

□ □ □ **Введение.** Анализ данных отечественной и зарубежной литературы в отношении различных методик индикации и идентификации возбудителя из первичного материала показывает, что в основном современная диагностика микоплазмоза основывается на иммунологических и бактериологических подходах [1-4]. Полученные первичные культуры на специальных питательных средах для роста микоплазм подвергаются дальнейшим исследованиям с помощью экспресс-методов: реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ), иммуноферментного анализа (ИФА), с использованием моноклональных антител МАТ или поликлональных антител ПАТ; радиоиммунологического анализа (РИА), хемилюминесцентного анализа (ХЛИА); ДНК-диагностики: ДНК-гибридизации; полимеразной цепной реакции (ПЦР). Последняя является не только более быстрой, но и наиболее точной, выявляя минимальное количество микоплазменной ДНК. Эти методы нашли отражение в работах зарубежных авторов при видовой типизации возбудителей различных инфекционных болезней. По данным отечественной литературы такие исследования проводят большей частью с научной целью и в медицинской практике; массовость диагностических исследований в производственных условиях на базе районных, городских лабораторий ограничена высокой стоимостью исследований и необходимостью специального дорогостоящего оборудования.

□ □ □ **Цель исследований.** Изучить эпизоотическую обстановку по респираторному микоплазмозу птиц и ассоциативным формам его проявления в Сибирском регионе и усовершенствовать лабораторные методы его диагностики.

□ □ □ **Материалы и методы.** Для изучения эпизоотической ситуации по респираторному микоплазмозу птиц и его ассоциациям применяли эпизоотологический, клинический, патологоанатомический, иммунологический, бактериологический и гистологический

методы диагностики. Материалом для прижизненного исследования служили пробы: крови и ее сыворотка, спермы, соскобов со слизистой оболочки гортани. Для посмертного - кусочки легкого и стенки воздухоносных мешков, головной мозг, семенники, пораженные паренхиматозные органы. У эмбрионов исследовали хориоа-лантоисную жидкость и желток.

Материалом для гистологических исследований служили тимус, фабрициева бурса, селезенка и печень. Посевы из пораженных органов проводили по общепринятым в микробиологии методике на простые (МБА, МПА), элективные (Эндо, ВСА, Клиге-ра и др.) и специальные жидкие и плотные среды для выделения глюкозоферментирующих микоплазм, разработанных нами совместно с Омским НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора. Морфологию бактериальных клеток изучали в мазках, окрашенных по Граму и Романовскому-Гимза, биохимические свойства культур микроорганизмов - при помощи тест системы ММТ

ЕI

. Для иммунологических исследований применяли РНИФ с референтным М.

Gallisepticum

(НИИЭМ им.Н.Ф. Гамалеи) и полевым штаммами микоплазм и специфическими сыворотками полученными нами путем гипериммунизации ими кроликов по схеме

D

.
Schimmel

в нашей модификации (А.П. Красиков, Н.Н. Новикова, 2002), СКРА с цветным стандартным антигеном производства ВНИИЗЖ, ИФА с использованием наборов фирмы BioChec

(Голландия) с учетом результатов на спектрофотометре

ELx

800 и компьютерной обработкой данных. Количество иммунокомпетентных клеток в периферической крови цыплят-бройлеров кросса "Сибиряк" определяли в реакциях розеткообразования с помощью эритроцитарных маркеров (Г.Ф. Коромыслов с соавт., 1980). Реакция розеткообразования была адаптирована к работе с клетками крови цыплят. Результаты исследования и обсуждение

Респираторный микоплазмоз зарегистрирован на четырех (33,3%) птицефабриках Омской области, на одной - Новосибирской области (9%) и на 9-ти (47%) Алтайского края. Чаще всего микоплазмоз протекает в ассоциации с эшерихиозом, стафилококкозом, реже с пастереллезом и реовирусным теносиновитом. Причем из всех ассоциаций эшерихиоз встречается наиболее часто. Так, на одной из исследуемых птицефабрик Омской области микоплазмоз в ассоциации с эшерихиозом выявлен в 72% случаях. Наиболее часто встречаются серотипы кишечной палочки: 01, 03, 020, 078, 0103, 0111, 0119. В пределах одного хозяйства выделяли два, реже - три серотипа.

Анализируя результаты бактериологических и серологических исследований, нужно отметить, что, несмотря на отсутствие выраженной клинической картины респираторного микоплазмоза, возбудитель присутствует в ряде птицеводческих хозяйств Омской области и Алтайского края. При этом источником инфекции являются не только куры, но и петухи, выделяя микоплазмы со спермой, способствуя тем самым дальнейшему распространению возбудителя. Установлено, что наиболее чувствительны к заражению респираторным ассоциативным микоплазмозом, с развитием комплекса клинических признаков, цыплята в возрасте 1-50 дней. При этом в структуре гибели молодняка доля инфекционных болезней составляла 67,3%, из них 100% приходилось на микоплазмоз в ассоциации с колибактериозом (эшерихиозом). Переболевший молодняк отставал в росте и развитии. Куры-несушки и петухи, не имеющие видимых клинических признаков болезни, являются скрытыми носителями возбудителя респираторного микоплазмоза и источником инфекции для потомства. Так, по результатам бактериологических исследований, наибольшее количество кур микоплазмозоносителей (60%) выявлено в пик яичной продуктивности (220 дней), при этом средний титр антител в ИФА составлял 7387 ± 1253 . Количество же петухов микоплазмозоносителей увеличивалось с возрастом и к 372 дням достигало 70%, а число реагирующих в ИФА - до 82% со средним титром 5165 ± 137 .

Индикация микоплазм у 43% эмбрионов, а также наличие антител у суточных цыплят (64,8%) и выделение от них *M. gallisepticum* (55%) свидетельствует о передаче инфекции трансвариальным путем, который является основным. Кроме того, значительное количество культур *M. gallisepticum* было выделено из спермы петухов, что свидетельствует об ее интенсивной обсемененности и заражении ею кур, особенно при их искусственном осеменении полиспермой.

По нашим наблюдениям в спонтанных условиях птица восприимчива к эшерихиозу с суточного, а к респираторному микоплазмозу - с 20-дневного возраста. Распространению респираторного микоплазмоза и эшерихиоза на птицефабриках Омской области способствуют предрасполагающие факторы: нарушение температурного режима, недостаточный воздухообмен, переуплотнение птицы, применение живых вакцин против вирусных инфекций. При этом мясная птица более восприимчива к микоплазмозу, чем птица яичных пород: число положительно реагирующих кур достигает к 300-дневному возрасту 100% и удерживается на этом уровне до конца жизни. Ассоциативные формы течения респираторного микоплазмоза осложняют эпизоотическую ситуацию, затрудняют диагностику, профилактику и меры борьбы с ним.

При экспериментальном воспроизведении ассоциированного течения респираторного микоплазмоза с эшерихиозом у цыплят нами установлено, что инкубационный период

составляет 6-18 часов. Клиническое проявление болезни в начальный период характеризуется общим угнетением, отказом от корма, тяжелым дыханием, взъерошенным оперением, скучиванием птицы небольшими группами. В дальнейшем угнетение усиливается, птица не реагирует на раздражитель, у нее наблюдается расстройство пищеварения, дыхания. При спонтанном заражении у цыплят наблюдали сходные, но менее выраженные клинические признаки. В проведенном эксперименте гибель птицы наблюдали через 8 часов после заражения, которая длилась до 8 дней. На 3-4-й день после заражения отмечали одно- или двусторонний ринит, одышку, трахе-альные хрипы, а на 9-й день общее состояние несколько улучшалось, хрипы ослабли. Через 12 дней после заражения состояние птицы было удовлетворительным, хрипы отсутствовали.

Основные патологоанатомические изменения при респираторном микоплазмозе, ассоциированном с эшерихиозом, локализовались в сердце, легких, воздухоносных мешках, печени, селезенке, кишечнике в виде серозного, серозно-фибринозного и фибринозного воспаления. Участие *E. coli* в ассоциативном инфекционном процессе проявляется развитием фибринозного воспаления перикарда, капсулы печени, воздухоносных мешков и брюшины.

Методы оценки Т- и В-систем позволили раскрыть механизмы функционирования иммунной системы и выявить нарушения в системе иммунного гомеостаза у инфицированных цыплят. В результате проведенного исследования установлено увеличение абсолютного и относительного количества лейкоцитов и нейтрофилов, особенно в первую неделю после заражения, что является ответной иммунологической реакцией на возбудителей *M. gallisepticum* и *E. coli*. Псевдоэозинофилы, как наиболее подвижные клетки, появляются первыми в месте вторжения чужеродного агента и стимулируют функциональную активность моноцитов, эозинофилов и лимфоцитов, выполняя защитную функцию в ходе воспалительных процессов.

Снижение абсолютного количества лимфоцитов через 14—21 день после заражения указывает на угнетение развития лимфоидной системы, торможение лимфопоэза, что негативно сказывается на функции иммунитета и сопровождается снижением абсолютного количества Т- и В-лимфоцитов у инфицированных цыплят на 14—21-й день. Это подтверждается гистологическими исследованиями: делимфоцизацией лимфоидных фолликул фабрициевой бурсы, уменьшением количества лимфоцитов и исчезновением коркового слоя в дольках тимуса. Инволюция бурсы, в свою очередь, сопряжена с угнетением в ней синтеза иммуноглобулинов. В связи с атрофией центральных органов иммунной системы (тимуса и фабрициевой бурсы), их функции в определенной степени реализуются вторичными лимфоидными органами (селезенкой и печенью), что подтверждается иммунологическими и морфо-функциональными

изменениями в этих органах при гистологических исследованиях.

Рост количества В-лимфоцитов (через 7, 14 и 21 день после инфицирования) объясняется усилением иммунологической реакции селезенки, которая проявляется формированием множества лимфоидных фолликулов, состоящих из больших и малых лимфоцитов, молодых плазматических клеток. Это согласуется с утверждениями N.L. Payne (1971) о поглощении антигенов и образовании антител лимфоидными клетками красной и белой пульпы селезенки. Периоды роста В-лимфоцитов совпадают с периодами образования антител к возбудителю *M. gallisepticum*.

M. gallisepticum

, что подтверждается данными серологических исследований. Так, через 7 дней после заражения в СКРА выявили 15% положительно реагирующих цыплят, а к 14 и 21-му дням исследования - 100%. С помощью ИФА была прослежена динамика накопления антител. Через 7 дней после инфицирования средний титр по группе составил $89,0 \pm 0,9$, к 14-му дню - $874,0 \pm 16,1$ и на 21-й день - $1319 \pm 76,98$, при этом оставаясь на уровне, незначительно превышающем диагностический титр (1:800). Нарастание уровня антител у цыплят опытной группы указывает на состояние их инфицированности *M. gallisepticum*.

M. gallisepticum

При бактериологическом исследовании цыплят опытной группы во всех возрастных периодах были изолированы исходные культуры *E. coli* и *M. gallisepticum*, в контрольной интактной группе патогенной микрофлоры на всем протяжении опыта не обнаружено.

Таким образом, заражение цыплят *M. gallisepticum* и *E. coli* вызывает значительные изменения в Т- и В-системах иммунитета и картине крови. Иммунодефицитное состояние в данном случае - это приобретенный дефект иммунной системы, выражающийся в неспособности организма в полной мере осуществлять реакции клеточного и гуморального иммунитета. Причиной иммунологической недостаточности явилась ранняя инволюция центральных органов иммунной системы (тимуса и бursы), которая выражается делимфотизацией и кистозным перерождением лимфоидных фолликулов и разрастанием межфолликулярной ткани бursы, а также исчезновением коркового вещества, перемещением лимфоцитов в мозговую зону, образование кистозных полостей, уменьшением долек тимуса и окружением их жировой тканью.

В настоящее время начинают появляться новые разработки специальных питательных сред для выделения микоплазм и уреоплазм. Вместе с тем, до сих пор не созданы универсальные промышленные серийно выпускаемые среды с отработанной технологической основой производства, которые бы обеспечивали рост всех микоплазм,

включая и уреоплазмы. Имеющиеся прописи составов питательных сред для диагностики микоплазмозов и уреоплазмоза не являются стандартными, и поэтому могут быть незначительные отличия в процессе их приготовления, зависящие от качества мяса, используемого для приготовления питательной основы. Они требуют автокла-вирования, стерилизации и имеют минимальные сроки хранения.

Предлагаемые нами среды отвечают предъявляемым к ним требованиям. Оригинальный состав ингредиентов представлен основой с унифицированным набором стандартных питательных компонентов и внесенными необходимыми обогащающими добавками, определенным количеством индикатора, оптимальным набором и концентрацией антибиотиков, сывороткой крови, оптимальным значений pH на разных стадиях технологического процесса. Отработанная стандартная технология получения жидких диагностических сред для индикации микоплазм респираторного тракта, включает получение основы с добавлением в нее питательных компонентов и соответствующих субстратов ферментативной активности (глюкоза, аргинин, мочевины), сыворотки и антибиотиков, а также стерилизующую фильтрацию и заключительную пастеризацию. Также технологически обоснован процесс получения сухих основ плотных сред, что дает возможность идентифицировать выделенные культуры по характеру роста колоний. Использование диагностических сред позволяет осуществлять индикацию и групповую дифференциацию микоплазм, а также посредством титрации оценивать степень их накопления в цветообразующих единицах (ЦОЕ) или колонии образующих единицах (КОЕ).

Качественные характеристики предлагаемых нами сред были изучены в соответствующих опытах по определению чувствительности и специфичности жидких, полужидких и плотных питательных сред для индикации аргинин-глюкозоферментирующих микоплазм, уреоплазм.

Анализ результатов проведенных опытов показал, что питательные среды, разработанные нами совместно с НИИПОИ Роспотребнадзора, соответствуют по всем показателям, предъявляемым к ним требованиям. А именно, обладают высокой чувствительностью к микроорганизмам, относящимся к классу Mollicutes; скоростью роста тест-штаммов *M. gallisepticum* и *M. fermentans* - в течение трех суток и *U. urealyticum* - в течение суток; селективной способностью, которая выражается в ингибции данными питательными средами тест-штаммов *Staphylococcus aureus* WHO-2, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* 9001, которая не влияет на скорость роста микоплазм и уреоплазм, а присущая им стабильность биологических свойств позволяет сохранять жидкие среды в условиях холодильника до 6-ти месяцев.

Сухие диагностические среды для индикации глюкозо- и аргининферментирующих микоплазм и уреоплазм также отвечают предъявляемым к ним требованиям. Данные среды экономичны, удобны в применении. Их можно использовать в качестве основ для приготовления плотных и полужидких сред, что повышает их диагностическую ценность, сроки хранения и упрощает транспортировку.

Высокая чувствительность сред обеспечивает рост на плотной и полужидкой среде не менее чем $1,0 \times 10^5$ КОЕ. Скорость роста тест-штаммов *M. gallisepticum* на плотной среде пять - и на полужидкой - трое суток, *M. fermentans* - пять и четверо суток и *U. urealyticum* - четверо и трое суток. Селективная способность выражена в ингибции данными питательными средами роста тест-штаммов *Staphylococcus aureus* WHO-2, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* 9001 и отсутствие таковой, на микоплазмы и уреоплазмы. Биологические свойства среды в условиях холодильника сохраняются до года. Предлагаемый нами культуральный метод прост в постановке, не требует специального оборудования и позволяет проводить как индикацию, так и дифференциацию возбудителей, определять их титры.

В качестве дополнительного теста для диагностики микоплазмозной инфекции рекомендуем реакцию непрямой иммунофлуоресценции с помощью которой можно проводить индикацию и идентификацию различных видов микоплазм, изучать их антигенные свойства и родство.

Рекомендуемые методы бактериологической и серологической диагностики были изучены в экспериментальных условиях на цыплятах-бройлерах. В результате проведенного опыта было показано, что специальные диагностические питательные среды для индикации микоплазм и уреоплазм активны и чувствительны в отношении данных микроорганизмов, в то же время стабильно ингибируют рост других микробов, находящихся в ассоциации с микоплазмами. Серологическое исследование подтверждает данные бактериологического исследования, а РНИФ является дополнительным высокочувствительным и специфичным методом диагностики микоплазмозной инфекции. При исследовании в РНИФ патологического материала от цыплят со специфическими кроличьими микоплазмозными сыворотками на наличие антигена показана высокая специфичность теста: во всех случаях перекрестных реакций между сопутствующей микрофлорой и микоплазмами не было обнаружено.

Производственное испытание предложенной схемы диагностики ассоциативного микоплазмоза на птице разных половозрастных групп подтверждает данные экспериментальных исследований, а именно: предложенные методы эффективны и

информативны в отношении микоплазмозной инфекции. Так, на специальных питательных средах для выделения микоплазм и уреоплазм ингибируется рост сопутствующей микрофлоры, без отрицательного влияния на рост микоплазм, при этом индикация на жидких средах была параллельно подтверждена результатами роста на плотных средах. У серологического теста (РНИФ) наблюдали высокую чувствительность. С помощью данного метода был выявлен микоплазмозный антиген в сперме петухов, тем самым была определена роль последних в распространении микоплазмоза в родительском стаде. При сравнении бактериологического и серологического методов установлено, что результаты данных исследований, как правило, соответствуют друг другу, что способствует уточнению и повышению достоверности диагностики.

Литература.

1. Гасанова, Т.А. Лабораторная диагностика инфекций, передающихся половым путем при хронических воспалительных заболеваниях репродуктивной системы / Т.А. Гасанова // ЖМЭИ. - 2001. - № 3. - С. 60-65.
2. Коромыслов Г.Ф. Методические рекомендации по биохимическим и иммунологическим методам исследования клеток, их компонентов и других биологических субстратов / Г.Ф. Коромыслов, Н.М. Климов, Д.Д. Полоз // ВИЭВ. -ВАСХНИЛ. - М: [б. и.], 1980. - 39с.
3. Payne, N.L. The lymphoid system. - In Physiology and biochemistry of the domestic fowl / N.L. Payne. - London, New-York: Acad. Press, 1971. - № 2. - p. 985-1037.
4. Митрофанов, П.М. Иммунопатология при микоплазмозе животных / П.М. Митрофанов, Х.З. Гаффаров, Р.В. Боровик // Ветеринария. -1984. - № 5. - С. 35-37.