

Как видно из приведенных данных, у цыплят после иммунизации живой вакциной против ИЭП отмечали незначительный прирост титров антител к вирусу ИЭП, начиная с 7 суток после вакцинации, которые оставались на уровне отрицательных значений ($T_{cp}=1449\pm 87$). К 14 суткам уровень антител к вирусу ИЭП у 23% цыплят опытной группы достигал положительного значения, однако средние показатели в группе находились ниже минимального положительного значения ($T_{cp}=2930\pm 122$). На 21 день после вакцинации титр достигал позитивных диагностических значений у 100% цыплят опытной группы, что свидетельствовало о достаточной иммуногенности используемой в опыте вакцины. В дальнейшем отмечали продолжение нарастания уровня антител к вирусу ИЭП с

РЕЗЮМЕ

В статье представлены материалы по определению и изучению поствакцинального иммунитета у цыплят, иммунизированных живой вакциной против инфекционного энцефаломиелимита птиц (ИЭП) производства ФГУ «ВНИИЗЖ». Наличие специфических антител определяли в непрямом варианте иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческого диагностического набора фирмы Synbiotics (США), сертифицированного на территории России.

ABSTRACT

The paper demonstrates data on postvaccinal immunity in chickens immunized with the live vaccine against avian infectious encephalomyelitis produced in FGI "ARRIAH". Presence of specific antibodies was detected by indirect ELISA using a commercial diagnostic kit Synbiotics (USA), certified in Russia.

Литература

1. Под ред. Д. Кэйти. Антитела. Методы. М.: Мир, 1991. 382 с.
2. В.М. Апатенко. Энцефаломиелит птиц // Ветеринария. 1972. № 2. С. 38–40.
3. А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991. С. 77–100.
4. Р.Н. Корвин, В.П. Зеленский, Г.А. Грошева. Лабораторная диагностика болезней птиц. Справочник. М.: Агропромиздат, 1989. С. 133–136.
5. В.Д. Сергеев, Н.В. Никитина, А.Р. Мухамедшина. Иммуноферментный метод в диагностике болезней птиц // Основы профилактики болезней с.-х. птицы. Л., 1989. С. 75–82.
6. В.Н. Сюрин, А.Я. Самуilenко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. Энцефаломиелит птиц // Вирусные болезни животных. М.: ВНИТИБП, 1998. С. 514–519.
7. Avian Encephalomyelitis Antibody Test Kit., Cat. № 50-86-01, KPL ProFLOK, September, 1996.
8. A. Brion, J.C. Guillon, G.P. Willemart. L'encephalomyelite infectueuse aviaire. Paris, 1972. 165 p.
9. R.A. Nicholas, D.H. Thorton. A standard vassine for the virus content test of live avian encephalomyelitis virus vassines // Biologicals. 1990. V. 18, № 2. P. 131–133.

УДК 619:616.98:579.887.111:616-078

М.С. Волков, А.Н. Колотилов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ПАТОГЕННОСТИ ПОЛЕВЫХ ИЗОЛЯТОВ МИКОПЛАЗМ (*MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* И *MYCOPLASMA SYNOVIAE*) НА КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ

Введение

Болезни микоплазменной этиологии наносят значительный ущерб промышленному птицеводству в результате повышенной выбраковки больных птиц, снижения приростов живой массы, падения яичной

продуктивности, снижения оплодотворяемости и выводимости цыплят, а также огромными затратами на ликвидацию данных болезней. Несмотря на то, что микоплазмы недостаточно устойчивы во внешней среде и чувствительны к обычным

дезинфектантам и некоторым группам антибактериальных препаратов, на практике освободиться от микоплазмозов только при помощи лекарственных средств невозможно [1, 2, 3]. В настоящее время созданы и применяются в птицеводческих хозяйствах инактивированные и живые вакцины, которые защищают организм привитых птиц от проявления клинических признаков болезни, от трансвариальной передачи возбудителя, но необходимо быть готовым к созданию новых профилактических препаратов с высокой иммунногенной активностью [5, 7, 8]. Для этого необходимо вести работу по выделению чистых культур полевых изолятов микоплазм, по изучению их биологических свойств с целью определения агента с более выраженными антигенными свойствами.

Патогенность микоплазм, как правило, связана с их свойствами продуцировать гемолизины, эндотоксины и другие продукты метаболизма. К их патогенному потенциалу следует отнести и способность длительно персистировать и размножаться в тканях макроорганизма, способность изменять метаболизм инфицированных клеток, нарушать нормальные регуляторные механизмы стволовых, иммунокомпетентных клеток [4].

Как правило, для определения патогенности выделенной культуры ставят биопробу [5]. Ввиду того, что при заражении СПФ-птицы в лабораторных условиях трудно оценивать патогенность той или иной микоплазмы, так как зачастую в хозяйствах микоплазмоз протекает ассоциативно с другими болезнями и только в данном случае можно говорить о явных клинических признаках и патологоанатомических изменениях, патогенность определяют на универсальной модели — куриных эмбрионах (КЭ). Патогенные виды микоплазм вызывают гибель куриных эмбрионов на разных стадиях развития зародыша и определенные патологоанатомические изменения, поэтому использование куриных эмбрионов для определения патогенности является более перспективным и научно обоснованным методом оценки патогенного действия возбудителя. Для заражения используют куриные или индюшьи эмбрионы 6-7-дневного возраста при введении патогена в желточный мешок и 9–10-дневного возраста при инокуляции материала в аллантоисную полость. При заражении патогенными микоплазмами, при вскрытии эмбрионов, погибших через 48 ч и позднее, обнаруживают диспропорцию и

отставание в развитии зародыша, кровоизлияния в подкожной клетчатке головы, на теле и конечностях, застойные изменения в легких, отек и кровоизлияния в околоплодных оболочках. У зародышей, павших в последние дни инкубации, устанавливаются утолщение и помутнение стенок грудных или брюшных воздухоносных мешков, полнокровие легких или пневмонию. Биопробу считают положительной при гибели не менее 50% зараженных эмбрионов и выживании контрольных.

Цель наших исследований заключалась в определении степени патогенности полевых изолятов микоплазм (*Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae*) посредством заражения СПФ-куриных эмбрионов в желточный мешок и в аллантоисную полость.

Материалы и методы

Оборудование. В работе использовали шприцы одноразовые — 2 мл, пинцеты анатомические, ножницы, колбы, пенициллиновые флаконы, эппендорфы разных объемов, рН-метр «рН-121», термостат лабораторный «ММ», инкубатор «ИЛБ 0,5», автоклав, установка для фильтрации, высокоскоростную центрифугу «Eppendorf», шуттель «Eppendorf», холодильник бытовой «Бирюса», морозильную камеру «Revco», пипетки автоматические Gilson (Eppendorf), весы электронные «Acculab V-200», компьютер.

Растворы и реактивы. Физиологический раствор (ФР) NaCl 0,9% рН=7,0, этиловый спирт, йодированный спирт, PPLO-бульон («Difco» США), дрожжевой экстракт, глюкоза, сыворотка крови свиней, PPLO-агар, дистиллированная вода, бензил-пенициллина натриевая соль, феноловый красный, никотинамидадениндинуклеотид, цистеина гидрохлорид.

Подопытные животные. В работе использовали СПФ-куриные эмбрионы фирмы «Lohman Tierzucht» (ФРГ).

Инфекционный материал. Для заражения КЭ использовали полевые изоляты микоплазм, выделенные от больных птиц, поступивших с птицефабрик РФ:

- изолят *Mycoplasma synoviae* — ОАО Калужский филиал «Ого-Заря», Калужская область;

- изолят *Mycoplasma gallisepticum* — п/ф «Ульяновская» Ульяновская область (дата поступления 10.01.06);

- изолят *Mycoplasma gallisepticum* — п/ф «Ульяновская» Ульяновская область (дата поступления 15.09.05.);

- изолят *Mycoplasma gallisepticum* — п/

ф «Тагайская» Ульяновская область;
 - изолят *Mycoplasma gallisepticum* — п/ф «Краснобор» Тульская область;
 - изолят *Mycoplasma synoviae* — п/ф «Волжская» республика Марий Эл.

Методика заражения. Каждым изолятом заражали КЭ по следующей схеме:

1. Культурой полевого изолята, выращенного в жидкой питательной среде.

2. Культурой полевого изолята, отмытого от жидкой питательной среды с помощью центрифугирования (10000 об/мин., в течение 10 мин.) и суспендированного физиологическим раствором в первоначальном объеме.

3. Трехкратным концентратом клеток культуры полевого изолята, суспендированных в физиологическом растворе.

Для изучения влияния на КЭ компонентов, входящих в состав жидкой питательной среды, часть КЭ, предназначенных для контроля, инокулировали жидкой питательной средой, а другую часть — физиологическим раствором.

Куриные эмбрионы доставляли в бокс из инкубатория, не допуская их охлаждения. Предварительно проводили овоскопирование, графитным карандашом отмечали границу воздушной камеры. Перед инокуляцией материала скорлупу обрабатывали йодированным спиртом. Заражение проводили двумя методами: 7-дневным куриным эмбрионам материал вводили в желточный мешок, а 9-дневным КЭ — в аллантоисную полость по 0,2 мл суспензии на каждый эмбрион по общеприня-

той методике. После инъекции отверстие в скорлупе закрывали каплей расплавленного стерильного парафина. КЭ инкубировали при температуре 37° С и влажности 60–70%. Овоскопирование проводили ежедневно. Обнаружив погибшие эмбрионы, их переносили в холодильник с температурой 4°С. Гибель ранее 48 ч считали неспецифичной. Учитывали патологические изменения, определяли массу тела каждого КЭ. От всех погибших КЭ позже 48 часов производили отбор патологического материала для подтверждения специфичности гибели от микоплазм в ПЦР.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования представлены в табл.1.

Как видно из представленных данных, процент гибели куриных эмбрионов при инокуляции полевых изолятов микоплазм в желточный мешок в 7-суточном возрасте составляет для Mg п/ф «Ульяновская» (от 10.01.06.) — 100%; Mg п/ф «Краснобор» — 93,75%; Mg п/ф «Тагайская» — 100%; Mg п/ф «Ульяновская» (от 15.09.05.) — 81,25%; Ms п/ф «Волжская» — 75%; Ms п/ф ОАО Калужский филиал «Ого-Заря» — 81,25%.

При заражении 9-суточных куриных эмбрионов в аллантоисную полость данными изолятами микоплазм процент гибели эмбрионов составил: Mg п/ф «Ульяновская» (от 10.01. 06) — 75%; Mg п/ф «Краснобор» — 31,25%; Mg п/ф «Тагайская» — 31,25%; Mg п/ф «Ульяновская» (от 15.09.05.) — 100%; Ms п/ф «Волжская» — 25%; Ms п/ф ОАО Калужский филиал

Таблица 1

Оценка степени патогенности полевых изолятов микоплазм на куриных эмбрионах

Изолят	Кол-во погибших КЭ* / общее кол-во КЭ		Выведено цыплят	Результат в ПЦР
	Метод заражения			
	в желточный мешок	в аллантоисную полость		
Mg** п/ф «Ульяновская» (от 10.01.06)	16/16	12/16	4	Mg+ Ms-
Mg п/ф «Краснобор»	15/16	5/16	12	Mg+ Ms-
Mg п/ф «Тагайская»	16/16	5/16	11	Mg+ Ms-
Mg п/ф «Ульяновская» (от 15.09.05.)	13/16	16/16	3	Mg+ Ms-
Ms*** п/ф «Волжская»	12/16	4/16	16	Mg- Ms+
Ms п/ф ОАО Калужский филиал «Ого-Заря»	13/16	1/16	18	Mg- Ms+
Контроль	0/8	0/8	16	Mg- Ms-

Примечания: КЭ* — куриные эмбрионы; Mg** — *Mycoplasma gallisepticum*; Ms*** — *Mycoplasma synoviae*

Таблица 2

Оценка степени патогенности полевых изолятов микоплазм на куриных эмбрионах

Изолят	Кол-во погибших КЭ* / общее кол-во КЭ		Выведено цыплят	Результат в ПЦР
	Метод заражения			
	в желточный мешок	в аллантоисную полость		
Mg** п/ф «Ульянов- ская» (от 10.01. 06)	6/7	4/7	4	Mg+ Ms-
Mg п/ф «Краснобор»	6/7	1/7	7	Mg+ Ms-
Mg п/ф «Тагайская»	6/7	2/7	6	Mg+ Ms-
Mg п/ф «Ульяновс- кая» (от 15.09.05.)	7/7	7/7	0	Mg+ Ms-
Ms*** п/ф «Волжская»	4/7	1/7	11	Mg- Ms+
Ms п/ф ОАО Калуж- ский филиал «Ого-Заря»	5/7	2/7	11	Mg- Ms+
Mg штамм «S6»	4/7	0/7	10	Mg+ Ms-
Mg п/ф «Горномарийская»	5/7	2/7	7	Mg+ Ms-
Контроль	0/8	0/8	16	Mg- Ms-

Примечания: КЭ* — куриные эмбрионы; Mg** — *Mycoplasma gallisepticum*; Ms*** — *Mycoplasma synoviae*

«Ого-Заря» — 6,25%.

При исследовании патологического материала от погибших эмбрионов в ПЦР были обнаружены геномы микоплазм, соответствующие их виду в инокулируемом материале, что подтверждает специфичность гибели КЭ.

При сравнении групп КЭ, зараженных культурами полевых изолятов, выращенных на жидкой среде с группами КЭ, инъецированных культурами изолятов, суспендированных с физиологическим раствором в первоначальном объеме и трехкратной концентрации, существенной разницы в гибели КЭ не установлено.

В группах контрольных КЭ, инокулированных разными методами, гибели не установлено, что указывает на отсутствие влияния компонентов питательной среды на нормальный рост и развитие эмбриона.

Для подтверждения достоверности результатов был проведен опыт № 2, в который были включены дополнительно изолят **Mg** п/ф «Горномарийская», Республика Марий Эл и референтный вакцинный штамм **Mg** «S6». Заражение проводили аналогично первому опыту, но в качестве инфекционного материала использовали только культуры изолятов микоплазм в ростовой среде. Результаты представлены

в табл. 2.

Как видно из представленных данных, процент гибели куриных эмбрионов при заражении полевыми изолятами микоплазм в желточный мешок в 7-суточном возрасте составляет для **Mg** п/ф «Ульяновская» (от 10.01.06.) — 85,7%; **Mg** п/ф «Краснобор» — 85,7%; **Mg** п/ф «Тагайская» — 85,7%; **Mg** п/ф «Ульяновская» (от 15.09.05.) — 100%; **Ms** п/ф «Волжская» — 57,14%; **Ms** п/ф ОАО Калужский филиал «Ого-Заря» — 71,42%, **Mg** «Горномарийская» — 71,42%, штамм «S6» — 57,14%.

При введении инфекционного материала 9-суточным куриным эмбрионам в аллантоисную полость процент гибели составил: **Mg** п/ф «Ульяновская» (от 10.01.06.) — 57,14%; **Mg** п/ф «Краснобор» — 14,28%; **Mg** п/ф «Тагайская» — 28,57%; **Mg** п/ф «Ульяновская» (от 15.09.05.) — 100%; **Ms** п/ф «Волжская» — 14,28%; **Ms** п/ф ОАО Калужский филиал «Ого-Заря» — 28,57%, **Mg** «Горномарийская» — 28,57%, штамм «S6» — 0%.

При сравнении результатов гибели КЭ, представленных в табл.1 и 2, установлено, что процент гибели эмбрионов был значительно выше при инокуляции полевых изолятов микоплазм в желточный мешок, в отличие от заражения в аллантоисную полость.

При визуальном осмотре погибших куриных эмбрионов у 85% наблюдались следующие изменения: кровоизлияния в подложной клетчатке головы, гиперемия за тылочной областью, отеки верхней части шеи, общее недоразвитие зародыша, диспропорции частей тела, крючковатость и амиотрофия конечностей.

В течение 30-дневного периода наблюдения за выведенными цыплятами регистрировали отдельные случаи проявления нервных (угнетение, нарушение координации движения, тремор мышц, повышенный тонус разгибателей ног, парезы и параличи конечностей, коматозное состояние) и респираторных (дисфония, хрипы, кашель, чихание, истечения из носовых ходов, затрудненное дыхание, конъюнктивиты) симптомов заболевания, анемию гребешков и неоперенных кожных покровов, в 80% случаев заканчивающихся летальным исходом.

Погибших цыплят вскрывали и оценивали патологоанатомические изменения: у цыплят зараженных изолятом «Краснобор» Mg наблюдали ринит, синусит, фибринозный аэросаккулит, отек легких, пневмонию, катарально-фибринозный ларинготрахеит. У цыплят, зараженных изолятом «Тагайская» Mg, отмечали серозно-фибринозный аэросаккулит, катарально-фибринозный ларинготрахеит, отек легких, синусит, конъюнктивит. При вскрытии цыплят, зараженных изолятами Ms «Волжская» и Калужский филиал ОАО «Ого-Заря», регистрировали катаральный ларинготрахеит, пневмонию, гепатоз, нефроз, гиперемии оболочек и размягчение структуры головного мозга, характерные для энцефаломалиции. Причиной гибели заболевших цыплят стали асфиксия и ис-

тошение.

Таким образом, клиническая картина и патологоанатомические изменения у заболевших после вывода цыплят характерна для инфекции микоплазменной этиологии.

При исследовании патологического материала от погибших цыплят в ПЦР были обнаружены геномы микоплазм, соответствующие их виду в инокулируемом материале. С целью дифференциальной диагностики с помощью ПЦР было исключено наличие в патматериале возбудителей инфекционного ларинготрахеита и инфекционного бронхита кур, что подтверждает специфичность гибели цыплят.

Выводы

1. При заражении в желточный мешок наибольшей патогенностью для куриных эмбрионов (гибель более 50 %) обладали полевые изоляты Mg п/ф «Ульяновская» (от 10.01.06.) и (от 15.09.05.); Mg п/ф «Краснобор»; Mg п/ф «Тагайская».

2. При инокуляции инфекционного материала в аллантоисную полость наибольшей патогенностью для КЭ обладали полевые изоляты Mg п/ф «Ульяновская» (от 10.01.06.); Mg п/ф «Ульяновская» (от 15.09.05.).

3. Введение культур полевых изолятов в желточный мешок вызывает более высокий процент гибели КЭ, чем инъецирование в аллантоисную полость.

4. Компоненты жидкой питательной среды не оказывают влияния на нормальный рост и развитие эмбрионов.

5. Специфичность гибели куриных эмбрионов подтверждается результатами ПЦР и характерными патологоанатомическими изменениями, а также характерными клиническими и патологоанатомическими признаками у выведенных цыплят.

Работа выполнена в рамках проекта № 3017

РЕЗЮМЕ

Была определена патогенность полевых изолятов микоплазм на куриных эмбрионах посредством заражения в аллантоисную полость и в желточный мешок.

ABSTRACT

Pathogenicity of field mycoplasma isolates was determined in chicken-embryonated eggs by inoculation into allantoic and yolk sacs.

Литература

1. С.Н. Борхсениус, О.А. Чернова. Микоплазмы. Л.: Наука, 1989. С. 12–56.
2. А.В. Жаров, И.В. Иванов, А.П. Стрельников. Вскрытие и патоморфологическая диагностика болезней животных. М.: Колос, 2000. С. 308–309.
3. Я.Р. Коваленко. Микоплазмозы животных. М.: Колос, 1976. С. 225–256.
4. Р.Н. Коровин, В.П. Зеленский, Г.А. Грошева. Лабораторная диагностика болезней птиц. М.: Агропромиздат, 1989. С. 172–174.
5. С.В. Прозоровский, И.В. Раковская, Ю.В. Вульфвич. Медицинская микоплазмология. М.: Медицина, 1995. С. 56–78.
6. Э.А. Шегедевич. Методы выделения и идентификации микоплазм и L-форм бактерий // Тр. ВИАВ. 1977. Т. 46. С. 35.
7. D. Bencina, T. Tadina, D. Dorrer. Natural infections of ducks with *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma* egg transmission // Avian Pathol. 1988. V. 17. P. 441–449.
8. W.A. Clyde, L.B. Senterfit. Laboratory diagnosis of mycoplasma infections // The Mycoplasmas. 1985. V. 4. P. 391–400.