

ГЛАВА 3.3.5.

МИКОПЛАЗМОЗ ПТИЦ

(*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*)

РЕЗЮМЕ

Определение болезни: Микоплазмоз птиц вызывается несколькими патогенными микроорганизмами, среди которых *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS) являются наиболее значимыми; они единственные включены в список МЭБ.

Описание болезни: MG вызывает хроническое респираторное заболевание домашней птицы, особенно при наличии стресса при содержании и/или других респираторных патогенов. Для болезни характерен острый насморк, конъюнктивит, чихание и синусит, особенно у индеек и дичи. Она может привести к снижению продуктивности у птицы мясного направления, а также к снижению яйценоскости. MS может вызывать респираторное заболевание, синовит или может вызывать скрытую инфекцию. Штаммы MG и MS различаются по инфекционности и вирулентности, и иногда инфекция может быть бессимптомной.

Идентификация возбудителя: MG и MS можно идентифицировать иммунологическими методами после выделения из среды для выделения микоплазм или посредством выявления их ДНК в полевых пробах или культурах.

Пробы для выделения могут представлять собой мазки органов или тканей, выделения, разведенные гомогенаты ткани, аспираты из инфраорбитальных пазух или суставных полостей, или материалы из яичного желтка или эмбрионов. Клинические признаки и поражения обуславливают выбор пробы. Для выделения используется бульон и агар, но обычно перед тем как предпринять попытку идентификации, необходимо получить колонии микоплазм на агаре. Основные биохимические тесты могут помочь провести предварительную классификацию изолятов, но финальная идентификация проводится посредством иммунологических тестов, наиболее подходящий из которых – реакция флуоресцирующих антител и иммунопероксидазный метод.

Методы выявления ДНК на основе полимеразной цепной реакции используются в специализированных лабораториях. Если они валидированы, то их можно использовать для исследования мазков или культур.

Серологические тесты: Некоторые серологические тесты используются для выявления антител к MG и MS, но вследствие различий специфичности и чувствительности, они рекомендуются для проведения скрининга стад, а не для тестирования отдельных особей.

Наиболее часто используется экспресс-реакция сывороточной агглютинации (РСА), твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) и реакция торможения гемагглютинации. При РСА сыворотки смешивают с серийными окрашенными антигенами, и сыворотки, которые вступают в реакцию через 2 минуты, нагревают при температуре 56°C в течение 30 минут и повторно тестируют. Сыворотки, которые все еще реагируют, особенно в разведении, считаются положительными, и для подтверждения их тестируют либо посредством ИФА, либо в РТГА. В продаже имеются несколько коммерческих ИФА наборов для выявления антител к MG и MS.

Требования к вакцинам и диагностическим биологическим препаратам: Несмотря на то, что предпочтительным методом контроля является сохранение стад, свободных от *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae*, для цыплят используется как живая, так и инактивированная вакцина. Вакцинацию следует рассматривать только в местах содержания разновозрастных кур, где заражение неизбежно. Обычно вакцины используются для профилактики снижения яйценоскости у коммерческих несушек, хотя вакцины можно также использовать для снижения передачи с яйцами среди племенной птицы или в качестве вспомогательного средства для искоренения *Mycoplasma gallisepticum* в местах содержания разновозрастной птицы. Важно провести вакцинацию до заражения в полевых условиях.

Имеющиеся вакцины против *Mycoplasma gallisepticum* производятся из штамма F и, в последнее время, из штаммов ts-11 и 6/85, которые являются апатогенными штаммами с улучшенными характеристиками безопасности. Введение штамма F интраназально или посредством закапывания в глаза предпочтительно, но возможно также аэрозольное введение или введение с питьевой водой. Метод закапывания в глаза рекомендуется в случае ts-11, а тонкое распыление для 6/85. Молодок обычно вакцинируют в возрасте от 12 до 16 недель. Одной дозы достаточно, и вакцинированные птицы остаются постоянными переносчиками. Длительное использование штамма F в местах содержания разновозрастной птицы приводит к вытеснению полевых штаммов. Штамм ts-11 успешно используется для искоренения штамма F у коммерческих несушек различного возраста. Живая вакцина против *Mycoplasma gallisepticum* производится из штамма MS-H, и ее следует вводить посредством закапывания в глаза.

Бактериальные вакцины состоят из концентрированной суспензии организмов *Mycoplasma gallisepticum* в масляной эмульсии. Их вводят молодкам парентерально в возрасте 12-16 недель, обычно подкожно в область шеи. Желательно вводить две дозы. Бактериальные вакцины эффективны для профилактики снижения яйценоскости и респираторной болезни, но они не предотвращают инфицирование *Mycoplasma gallisepticum* дикого типа. Похожая бактериальная вакцина против *Mycoplasma gallisepticum* лицензирована в Соединенных Штатах Америки, но ее широко не используют.

А. ВВЕДЕНИЕ

Mycoplasma gallisepticum (MG) и *M. Synoviae* (MS) принадлежат к классу Mollicutes, отряд Mycoplamatales, семейство Mycoplamataceae. Однако следует отметить, что *M. meleagridis* и

M. iowae могут также вызывать болезнь домашней птицы, но MG и MS считаются наиболее значимыми из патогенных микоплазм, и обе возникают повсеместно в мире.

Инфекция MG наиболее значима у кур и индеек, будучи причиной респираторной болезни и снижения мясной массы и яйценоскости (Bradbury, 2001; Ley, 2003). Она может также вызывать болезнь верхних дыхательных путей у дичи. В последнее время MG регистрируется в Северной Америке у мексиканской чечевицы в качестве причины конъюнктивита (Luttrel *et al.*, 1996). У домашней птицы инфекция распространяется вертикально через инфицированные яйца и горизонтально через прямой контакт; нуклеиновая кислота MG идентифицирована в образцах окружающей среды (Marios *et al.*, 2002). Другие способы распространения описаны намного меньше.

Клинические признаки MG у инфицированной домашней птицы могут варьироваться от явных респираторных признаков, включая острый ринит, конъюнктивит, кашель и чихание. Могут наблюдаться выделения из носа, хрипы и дыхание через приоткрытый клюв. Односторонний или двусторонний синусит также может быть характерным признаком, особенно у индеек и дичи, а подглазные пазухи могут быть настолько воспалены, что глаза закрываются. Конъюнктивит с пенистыми выделениями из глаз также является распространенным признаком у индеек и дичи, а иногда и у кур. У индеек часто наблюдаются загрязнения перьев крыльев в результате попыток удалить выделения из глаз. У инфицированных чечевиц в дополнение к конъюнктивиту могут наблюдаться выделения из глаз и носа, воспаленные веки.

Mycoplasma gallisepticum может быть ассоциирована с острой респираторной болезнью кур и индеек, особенно молодых птиц, причем индейки более восприимчивы. Тяжесть болезни в большой степени зависит от степени вторичной инфекции такими вирусами как вирус болезни Ньюкасла и вирус инфекционного бронхита и/или бактериями, такими как *Escherichia coli*. У индеек наблюдается синергия с инфекцией пневмовирусом птиц. Может проявиться более хроническая форма болезни, которая может привести к снижению яйценоскости у племенной птицы и несущек.

Поражения респираторного тракта изначально принимают форму чрезмерного выделения слизи с последующими катаральными и творожистыми выделениями, которые могут образовывать бесформенные массы в воздушных мешках. У индеек и дичи воспаленные подглазные пазухи содержат от слизеподобных до творожистых экссудатов.

У кур заражение MG и MS может на первый взгляд напоминать респираторную болезнь, вызванную другими патогенами, такими как низкопатогенные штаммы вируса болезни Ньюкасла (Глава 2.3.14) и вируса инфекционного бронхита (Глава 2.3.2). Они могут присутствовать в составе смешанных инфекций MG и MS. Также следует исключить заражение *Haemophilus paragallinarum* (сейчас *Avibacterium paragallinarum*) и *Pasteurella multocoda*. У индеек MG можно спутать с инфекцией пневмовирусом птиц, а наличие синусита может также предполагать инфекцию *Pasteurella multocoda*, *Clamidia* (Глава 2.3.1) или MS. Инфекционный синовит, вызванный MG следует дифференцировать от инфицирования *Staphylococcus aureus* и от инфекционного теносиновита, вызванного реовирусом.

У кур с инфекционным синовитом могут наблюдаться бледные гребешки, хромота и задержка роста. Могут опухать суставы. Обычно наблюдаются экскременты зеленоватого цвета с большим содержанием уратов. В суставах и вдоль сухожильных влагалищ может содержаться вязкий экссудат от кремового до серого цвета, а также гепатоспленомегалия и крапчатые, воспаленные почки (Kleven, 2003). Признаки респираторного заболевания и поражения схожи с признаками, наблюдаемыми при заражении MG, за исключением того, что обычно они более слабые и, как и в случае MG, наблюдается синергическое действие с другими респираторными возбудителями (Kleven *et al.*, 1972). Штаммы MG обладают значительным разнообразием применительно к вирулентности и тканевому тропизму (Kleven *et al.*, 1973; Landman & Feberwee, 2004; Lockaby *et al.*, 1999).

В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Присутствие MG и MS может быть подтверждено посредством выделения организма в бесклеточной среде или посредством выявления его ДНК непосредственно в пробах инфицированных тканей или смывов. Серологические тесты также широко используются для диагностики. При сомнительных результатах обычно от птиц отбирают повторные пробы, хотя куриным эмбрионам или курам может быть введен подозрительный материал.

1. Идентификация возбудителя

1.1. Культура

Пробы отбираются от живой птицы, свежих тушек или тушек птицы, замороженной в свежем состоянии. У живой птицы пробы можно отбирать из хоанальной щели, ротоглотки, пищевода, трахеи, глаз, клоаки или фаллоса. В случае мертвой птицы пробы можно отбирать из носовой полости, инфраорбитальных пазух, трахеи или воздушных мешков. Экссудаты можно аспирировать из инфраорбитальных пазух или суставных полостей.

Пробы можно также отбирать от замерших эмбрионов или от цыплят или птенцов, которые пробили скорлупу, но не вылупились. Пробы также можно отбирать с внутренней стороны желточной оболочки, а также из ротоглотки и воздушных мешков эмбриона.

Все пробы необходимо исследовать сразу после отбора. Если необходима транспортировка, небольшие кусочки ткани следует поместить в бульон для микоплазм, или тампоны следует энергично перемешать в 1-2 мл бульона для микоплазм, а затем утилизировать. В качестве альтернативы можно смачивать тампоны бульоном для микоплазм перед отбором проб (Zian & Bradbury, 1996), а затем для транспортировки помещать в держатели для тампонов. Следует использовать пакет со льдом или другие средства охлаждения, т.к. MG и MS быстро погибают при комнатной температуре. Серийные разведения проб в бульоне для микоплазм может быть полезным, т.к. присутствие специфичных антител или антибиотиков, или ингибирующих веществ в тканях, может тормозить рост микоплазмы, если они не разведены.

Составлены несколько подходящих культуральных сред (Freundt, 1983), и эти среды, подходящие для выделения микоплазм птиц можно приобрести в Mycoplasma Experience, Reigate, Surrey, United Kingdom. Среда для выращивания микоплазм обычно содержат белковый гидролизат и мясной экстракт, дополненные сывороткой или сывороточной фракцией, дрожжевыми факторами, глюкозными или бактериальными ингибиторами. Важно чтобы каждая новая партия среды исследовалась с помощью свежесделанных культур MG низкого пассажа *in vitro*, т.к. некоторые компоненты, особенно дрожжевой экстракт и сыворотка, могут отличаться своими способностями поддерживать рост.

Среда, разработанная Frey *et al.* широко используется в Соединенных Штатах Америки (США) и других странах для выделения MG и MS (Frey *et al.*, 1968; USDA, 2014). Никотинамидадениндинуклеотид (НАД) обязателен для роста при первичном выделении MS, но он не обязателен для среды для культивирования MG.

Следующие бульонная и агаровая среды также подходят:

- i) Часть А: Среда на основе плевропневмониеподобных организмов без кристаллического фиолетового (Difco) (14,7 г); дистиллированная или деионизированная вода (700 мл).
- ii) Часть В: Сыворотка крови свиней (нагретая при температуре 56°C в течение 1 часа) (150 мл); 25% (вес/объем) свежего дрожжевого экстракта (100 мл); 10% (вес/объем) раствора глюкозы (10 мл); 5% (вес/объем) ацетата талия (10 мл); 200 000 международных единиц (МЕ)/мл пенициллина G (5 мл); и 0,1% (вес/объем) раствора фенолового красного (20 мл). Ацетат талия может быть токсичным для людей, и при его использовании следует соблюдать меры предосторожности. рН доводится до 7,8. Сыворотка крови свиней можно заменить сывороткой крови лошадей, но важно убедиться, что она поддерживает рост MG.

Часть А автоклавируют при температуре 121°C при атмосферном давлении 1 в течение 15 минут и после охлаждения добавляют к Части В, предварительно стерилизованной фильтрацией.

Для получения соответствующей твердой среды 10 г очищенного агара, поддерживающего рост MG, добавляют к части А выше. Смесь автоклавируют как и прежде и выдерживают на водяной бане при температуре 56°C. Составляющие части В, за исключением фенолового красного, смешивают отдельно и затем инкубируют при температуре 56°C. Части А и В аккуратно смешивают, избегая образования пузырьков воздуха, и помещают на 50 мм планшеты по 7-9 мл/планшет. Избыточную поверхностную влагу можно удалить посредством кратковременного инкубирования при температуре 37°C. Планшеты хранят в герметичном контейнере при температуре около 4°C в течение 2 недель.

Свежий дрожжевой экстракт имеется в продаже, хотя предпочтительно приготавливать его «на месте» посредством разведения активных сухих пекарских дрожжей (250 г) в дистиллированной воде (1 литр). Смесь нагревают до кипения, охлаждают и затем центрифугируют в течение 20 минут при 3000 *g*. Надосадочную жидкость отфильтровывают и доводят рН до уровня 8,0 посредством 0,1 М NaOH. Смесь очищают посредством центрифугирования или фильтрации, а затем стерилизуют посредством фильтрации. Экстракт хранят при температуре -20°C. Химически чистую глюкозу (10 г)

растворяют в дистиллированной или деионизированной воде (100 мл) и доводят уровень рН до 7,8-8,0, добавляя 1М NaOH. Стерилизуют посредством фильтрации и хранят при температуре 4°C. Химически чистый ацетат таллия (5 г) растворяют в дистиллированной или деионизированной воде (100 мл), стерилизуют через фильтр и хранят при температуре -20°C. Раствор пенициллина (10⁶ МЕ бензилпенициллина в 5 мл дистиллированной воды) хранят при температуре 4°C в течение 1 недели. Для выделения из очень контаминированных проб концентрацию пенициллина можно увеличить до 2000 ед/мл или вместо пенициллина можно использовать 0,5-1,0 мг/мл амипициллина. Феноловый красный (0,1 г) измельчают в 0,1 М NaOH (2,8 мл), а затем доводят до 100 мл дистиллированной водой и автоклавируют при температуре 115°C при 1 атмосфере в течение 30 минут. Хранят при температуре 4°C (Примечание: Ацетат таллия высоко токсичен, и при подготовке базового раствора следует соблюдать осторожность).

Образцы инокулируют на агар с микоплазмой и в бульон. При выявлении медленно растущих колоний микоплазм, которые могут зарости сапрофитами в бульоне, может содействовать твердая среда. Для успешного выделения может возникнуть необходимость провести серийные разведения до 10⁻³. Инокулированные планшеты инкубируют при температуре 37°C в герметичных контейнерах. Сообщается, что повышенная влажность и давление CO₂ в атмосфере усиливают рост; этих условий можно достигнуть при помещении влажной бумаги или ваты, а также посредством обработки контейнера 5–10% CO₂ в азоте, посредством помещения зажженной свечи в контейнер или при использовании CO₂ инкубатора или подходящей газогенерирующей системы.

Крышки контейнеров с жидкой средой необходимо герметично закрыть перед инкубированием при температуре 37°C во избежание нетипичных изменений уровня рН. В течение первых нескольких дней планшеты ежедневно исследуют через стереоскопический микроскоп на предмет роста колоний; затем их исследуют не так часто. Культуры из полевого материала не следует считать отрицательными ранее, чем через 20 дней.

Бульонную среду следует ежедневно исследовать на кислотность, на которую указывает смена цвета индикатора с красного на оранжевый или желтый. При любом наблюдаемом росте незамедлительно производят субкультивирование на твердую среду. Даже если не возникает изменения цвета, субкультивирование на твердую среду следует провести через 7-10 дней или раньше, т.к. присутствие аргинин-гидролизующих (продуцирующих щелочи) видов микоплазмы может маскировать изменение цвета, связанное с изменением кислотности, продуцируемым MG.

Колонии микоплазмы на твердой среде обычно можно распознать, хотя они и не имеют типичного вида «жареного яйца». Бактериальные колонии могут появиться при первом пассаже, но они зачастую более пигментированные и не подлежат пассированию на средах с микоплазмами.

Биохимические реакции (например, ферментация глюкозы и неспособность гидролизировать аргинин) могут способствовать идентификации, но они неспецифичны для MG или MS и требуют очистки культуры клонированием.

Для идентификации изолятов микоплазм можно использовать иммунологические методы и методы выявления ДНК. Они включают непрямой метод флуоресцирующих антител (НМФА) и иммунопероксидазные методы (ИП), которые являются простыми, чувствительными, специфичными и легкими в постановке; реакцию подавления роста (РПР); и реакцию подавления метаболизма (РПМ). Для проведения РПР и РПМ, но не для НМФА и ИП, требуются очищенные (клонированные) культуры. НМФА и ИП могут выявлять наличие более одного вида микоплазм, т.к. колонии, специфичные для антисыворотки, будут вступать в реакцию, в то время как другие не будут. Однако *M. imitans*, вид микоплазмы, серологически родственной MG и демонстрирующей те же биохимические свойства, в некоторых странах выделяют у уток, гусей и иногда у некоторых видов домашних птиц. Ее можно распознать от MG при использовании ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция/ полиморфизм длины фрагментов рестрикции), что описал Kempf (1998). В качестве альтернативы колонии изолята можно исследовать посредством иммунофлуоресценции, параллельно используя серийные разведения антисыворотки MG и *M. imitans*. Гомологичные антисыворотки должны иметь значительно более высокий титр.

Ниже описаны методы выявления ДНК, обычно основанные на ПЦР, для идентификации MG или MS непосредственно в тканях или для идентификации лабораторных изолятов.

В некоторых условиях, когда результаты вышеуказанных методов неубедительны, может быть целесообразной инокуляция куриных эмбрионов или биопробы. Однако эти методы трудоемки и дорогостоящи, и их все больше замещают методы ПЦР, хотя они и остаются полезным научно-исследовательским инструментом. Образцы, необходимые для инокуляции куриных эмбрионов, – те же, что и используемые для искусственных сред. Их готовят в бульоне без ацетата таллия, инкубируют в течение 30-60 минут при температуре 37°C, и затем аликвоты 0,05–0,1 мл инокулируют в желточный мешок нескольких 6-8-дневных куриных эмбрионов, полученных из свободных от микоплазм стад. Яйца ежедневно овоскопируют и отбраковывают эмбрионы, погибших в течение 24 часов после инокуляции. Всех погибших впоследствии эмбрионов хранят в холодильнике до культивирования, а выживших по истечении 5 дней помещают на 4 часа в температурные условия 4°C для умерщвления и снижения геморрагий при вскрытии яиц. Желток субкультивируют в бульон или на агар. Липиды желтка стремятся затемнить колонии, поэтому важно наносить желток тонкими штрихами, или предпочтительно сначала развести его в бульоне для культивирования микоплазм. Биопробы можно провести посредством введения гомогената материала от случаев подозрения не менее чем 8-16-недельным восприимчивым и свободным от микоплазм цыплятам. Диагноз подтверждается посредством выделения микоплазм от этих птиц, демонстрацией ее ДНК и/или демонстрацией специфичных антител (Mallinson *et al.*, 1981).

1.2 Иммунологические методы

Обычно диагностические процедуры иммунофлуоресценции и иммунопероксидазной реакции применяют на лабораторных изолятах с подозрением, а не на инфицированных эксудатах или тканях. Причина состоит в том, что данные организмы слишком малы, чтобы их достоверно распознать под световым микроскопом, а также вследствие того, что

соответствующие отрицательные и положительные контрольные эксудаты/ ткани редко присутствуют под рукой.

Рекомендуемый метод проведения непрямой иммунофлуоресценции (НИФ) (Rosendal & Black, 1972) требует наличия культуры неизвестного изолята на агаре, состоящей из многочисленных очаговых колоний, известной культуры MG или MS в качестве положительного контроля или культуры другой микоплазмы, например, *M. gallinaceum* или *M. Gallinarum*, в качестве отрицательного контроля. Также необходима поликлональная кроличья антисыворотка против MG или MS, нормальная кроличья сыворотка и флуорохром-конъюгированная сыворотка с антикроличьим иммуноглобулином. Сыворотки можно готовить на других животных помимо кроликов, но не следует использовать моноклональные антитела (МАт), т.к. MG или MS демонстрирует разнообразный уровень экспрессии поверхностных эпитопов, и МАт могут не распознать организм. Подходящие рабочие разведения в стерильном фосфатно-буферном растворе (ФБР; 0.01 M, pH 7.2) сыворотки антител к MG или MS и конъюгата впервые определяют посредством перекрестного титрования, и их выбирают для использования при двухкратном-четырёхкратном разведении, меньшем чем фактические конечные точки. Данные процедуры применяют в отношении колоний подлежащих определению микоплазм, предварительно выращенных в чашках с агаром, как указано ниже.

- i) Содержимое чашек с агаром и колониями нарезают блоками размером около $1,0 \times 0,5$ см и помещают на маркированные предметные стекла колониями кверху.
- ii) Для обеспечения последующей ориентации нижний правый угол блоков срезают. Один блок с неизвестным изолятом, блок с известной культурой MG, блок с известной культурой MS и блок с отличной, но известной культурой микоплазмы помещают на одно предметное стекло. Блок с неизвестным изолятом помещают на другое предметное стекло.
- iii) На поверхность каждого блока на первом предметном стекле добавляют каплю подходящего разведения антисыворотки MG (или MS), на блок на втором предметном стекле добавляют нормальную кроличью антисыворотку.
- iv) Все блоки инкубируют во влажной атмосфере при комнатной температуре в течение 30 минут.
- v) Каждый блок помещают в маркированную пробирку с ФБР, pH 7,2, и в течение 10 минут промывают в ротационном смесителе, затем аналогичным образом снова промывают и в итоге возвращают блоки на первоначальные предметные стекла микроскопа.
- vi) Промокаивают излишнюю влагу с боков блоков. Добавляют одну каплю конъюгата на каждый блок и инкубируют и промывают как раньше.
- vii) Блоки возвращают на первоначальные предметные стекла и исследуют колонии под падающим светом с использованием флуоресцентной микроскопии.

Интерпретация результатов субъективна и требует наличия некоторого опыта; сравнение колоний обязательно, и оно должно предоставить правильные реакции.

Некоторые лаборатории применяют флуоресцеин-конъюгированные антисыворотки в ходе использования прямой реакции иммунофлуоресценции (ПИФ). Метод, широко используемый при ПИФ, включает последовательное применение реактивов в цилиндрах из нержавеющей стали, которые помещают в чашки с агаром с оригинальными микоплазмами (Talkington & Kleven, 1983). Несмотря на то, что данный метод быстр и прост в применении, полученные результаты менее специфичны, чем при использовании непрямого метода, который, вследствие этого, более предпочтителен.

1.2.2. Непрямой иммунопероксидазный метод

Данный метод задействует принцип, аналогичный НИФ, за исключением того факта, что связывание специфических антител с колониями *in situ* определяют посредством добавления антикроличьего иммуноглобулина, конъюгированного пероксидазой. Затем положительную реакцию развивают посредством добавления соответствующего субстрата, который при окислении производит цветные колонии. Можно также использовать процедуру иммунного связывания, в ходе которой исследуемые колонии блоттируются на нитроцеллюлозе (Kotani & McGarrity, 1985), а затем реагируют аналогичным образом. Как и в ходе НИФ при использовании иммунопероксидазного метода для серотипирования изолятов следует применять поликлональные сыворотки. Преимущество иммунопероксидазного метода перед иммунофлуоресценцией заключается в том, что иммунопероксидазный метод не требует использования дорогого флуоресцентного микроскопа.

1.2.3. Реакция подавления роста

В ходе применения реакции подавления роста рост микоплазм подавляется посредством специфических антисывороток, которые позволяют идентифицировать вид. Данный метод относительно нечувствителен, и сыворотки должны иметь высокий титр, и они должны быть моноспецифические и полученные на хозяевах-млекопитающих, например, сыворотки домашней птицы не всегда эффективно подавляют рост микоплазмы. Исследуемый организм должен быть чистой культурой (клон) и следует исследовать несколько разведений; оптимальна концентрация 10⁴ колониеобразующие единицы (КОЕ/мл). Скорость роста организма может оказывать влияние на подавление роста, и рекомендуется изначально замедлить рост посредством инкубирования при температуре 27°C в течение 24 часов с последующим инкубированием при температуре 37°C. Подробное описание теста и интерпретации его результатов опубликованы в другом источнике (Clyde, 1983).

2. Методы выявления нуклеиновых кислот

Альтернативой традиционным методам культивирования и идентификации являются методы выявления специфической ДНК. MG или MS можно выявлять посредством гибридизации с ДНК-зондами, но сейчас наиболее часто используют ПЦР для амплификации специфических участков ДНК в тестовом материале. Как минимум при использовании одного коммерческого тест-набора для определения ДНК MG применяется ПЦР непосредственно на материале, экстрагированном из смывов. Одна коммерческая компания производит набор для выявления полевых штаммов, и одна компания производит набор для идентификации вакцинного штамма F. Несколько «внутрилабораторных» основанных на ПЦР тестов также описаны для MG, включая мультиплексную ПЦР, которая разработана для выявления всех четырех

микоплазм птиц (Wang *et al.*, 1997), но она не валидирована на клинических образцах. Несколько методов цитируются Kempf (1998) и, кроме того, в руководстве, опубликованном Lauerman (1998), содержится описание валидированной ПЦР для выявления MG, MS и других микоплазм птиц на основании уникальных последовательностей, содержащихся в гене 16S rRNA. Данный метод для выявления MG представлен ниже. В США все более широко используется ПЦР на основе гена *mgc2* MG (García *et al.*, 2005) или гена *vlhA* MS (Hong *et al.*, 2004), т.к. предварительная идентификация штамма может быть проведена посредством секвенирования продукта ПЦР; следует помнить, что неродственные штаммы могут иногда иметь одинаковую последовательность.

2.1. Выделение ДНК

ДНК экстрагируют из смывов (можно объединить три-пять смывов), суспендированных в 1 мл ФБР для ПЦР в 1,5 мл пробирке Эппендорфа с защелкивающейся крышкой. Суспензию центрифугируют в течение 30 минут при 14 000 *g* при температуре 4°C. Супернатант аккуратно удаляют пастеровской пипеткой, а осадок суспендируют в 25 мкл воды для ПЦР. Пробирку с содержимым кипятят в течение 10 минут, затем помещают на лед на 10 минут до центрифугирования при 14 000 *g* в течение 5 минут. ДНК – супернатант.

2.2. Праймеры

MG праймеры состоят из следующих последовательностей.

MG-14F: 5'-GAG-СТА-АТС-TGT-AAA-GTT-GGT-C-3'

MG-13R: 5'-GCT-TCC-TTG-CGG-TТА-GCA-AC-3'

Для MS используют следующие праймеры:

MS-F: 5'-GAG-AAG-CAA-AAT-AGT-GAT-ATC-A-3'

MS-R: 5'-CAG-TCG-TCT-CCG-AAG-TТА-ACA-A-3'

2.3. Полимеразная цепная реакция

Реакционную смесь следует готовить в отдельной чистой зоне с использованием набора специальных пипеток. Ингредиенты для одной порции реакционной ПЦР смеси следующие:

H ₂ O высокой очистки	35,75 мкл
10 × ПЦР буфер	5,00 мкл
dNTP(10 mM)	1,00 мкл
F праймер (20 пмоль/мкл)	0,50 мкл
R праймер (20 пмоль/мкл)	0,50 мкл
Taq (5 Е/мкл)	0,25 мкл
MgCl ₂ (50 mM)	2,00 мкл

По 45 мкл реакционной смеси распределяют в каждую ПЦР пробирку. Реакционную смесь накрывают несколькими каплями легкого минерального масла, если термоциклер не оборудован нагревательной крышкой. Затем пробирки переносят в другую чистую зону, где в каждую пробирку добавляют соответствующий ДНК образец (5 мкл). В ходе каждого цикла следует использовать положительные и отрицательные контроли.

Затем пробирки помещают в термоциклер для проведения следующих циклов: 40 циклов: 94°C в течение 30 секунд, 55°C в течение 30 секунд, 72°C в течение 60 секунд, 1 цикл (конечная элонгация): 72°C в течение 5 минут и замачивание при температуре 4°C.

2.4. Электрофорез

Продукты ПЦР выявляют посредством традиционного электрофореза в 2% агарозном геле, включающего маркеры соответствующего размера, с последующим исследованием в УФ-излучении. Продукт ПЦР для MG составляет 185 п.о. Визуализацию ПЦР-продуктов следует проводить в отдельном помещении лаборатории, надлежащим образом отделенной от других этапов процедуры ПЦР.

Все еще существует тенденция проводить ПЦР в специальных лабораториях, и ее следует рассматривать в качестве полезного дополнения к существующим методам диагностики, если их валидность надлежащим образом установлена. Следует соблюдать предельную осторожность, чтобы избежать контаминации образцов ДНК MG или MS из сопредельных помещений для проведения аутопсии, лабораторий для выращивания культур или от положительных амплификантов, полученных в ходе предыдущих циклов ПЦР (соответствующие меры предосторожности см. в Главе 1.1.6 *Принципы и методы валидации диагностических анализов для диагностики инфекционных болезней*). Однако один коммерческий набор, указанный выше, в настоящее время лицензирован Министерством сельского хозяйства США (USDA) в качестве диагностического метода и утвержден для использования в ходе выполнения Национального плана усовершенствования птицеводства (NPIP). Следует отметить, что ПЦР не валидирована для исследования суточных цыплят для точного выявления инфекции.

Для дифференциации штаммов MG и MS также используются молекулярные методы (Kempf, 1998), но в настоящее время их применение ограничивается специализированными лабораториями. Быстрый и точный метод фингерпринтов ДНК задействует ПЦР с произвольными праймерами или с произвольно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD). Данная техника использует короткие, произвольные ПЦР-праймеры, которые вырабатывают воспроизводимые паттерны в агарозных гелях (Fan *et al.*, 1995). Данный метод быстр и прост, он также подтвердил свою пригодность для быстрой идентификации штаммов MG в ходе эпизоотологических исследований. Однако могут возникать проблемы с воспроизводимостью, поэтому подлежащие сравнению штаммы следует исследовать в одном и том же геле. Также может быть осложнена интерпретация картин исчерченности, которые могут быть аналогичными.

Ген-ориентированное секвенирование (GTS) с использованием ПЦР-праймеров для генов *mgc2*, *gapA*, *rvpA* и MGA_0309 MG может быть использовано для получения точного и воспроизводимого метода типирования штаммов, который позволит проводить быстрые глобальные межлабораторные сравнения (Ferguson *et al.*, 2005). Предварительная идентификация с диагностическими ПЦР-праймерами для гена *mgc2* MG или гена *vlhA* MS посредством секвенирования ПЦР-продукта позволяет проводить предварительную идентификацию штаммов без предварительного выделения организма (Hong *et al.*, 2004; 2005). Однако неродственные штаммы иногда имеют идентичные последовательности при

использовании этих праймеров и, следовательно, может быть необходимо дальнейшее описание.

3. Серологические методы

Серологические методы в обычном использовании могут иметь недостаточную специфичность и/или чувствительность; они настоятельно рекомендованы для мониторинга стад, но не исследования отдельных птиц. Диагностам, желающим использовать такие тесты, рекомендуется установить чувствительность и специфичность теста (Глава 1.1.6) в имеющихся лабораторных условиях. Следует также отметить, что эти тесты невалидированы для использования на сыворотках, полученных от суточных цыплят или дичи (Bradbury, 2005).

Наиболее часто используемые тесты включают РСА, ИФА и РТГА, хотя описаны и некоторые другие, такие как радиоиммунный анализ, микроиммунофлуоресценция и иммунопероксидазная реакция. Количество сывороток для исследования стада зависит от требуемого уровня выявления и доверительных пределов. Минимальные требования могут быть предусмотрены в целях международной торговли, а также может быть предусмотрена частота тестирования, как, например, в Директиве Совета Европейского Сообщества 90/539/ЕЕС. Минимальные требования и утвержденные тесты также установлены для членов NPIP США.

Птицеводческие компании, использующие методы ИФА для скрининга большого количества сывороток на наличие вирусных антител, могут рассматривать данный тип анализа также как приемлемый для исследований на микоплазмы. Методы ИФА не будут детально описаны здесь, т.к. в продаже имеются несколько наборов для выявления MG. Вместо этого представлено подробное описание РТГА, т.к. реактивы, необходимые для проведения данного теста нешироко представлены в продаже.

3.1. Быстрая реакция сывороточной агглютинации

Сыворотки отбирают от стада и, если они незамедлительно не исследуются, их хранят при температуре 4°C, не замораживая. Анализ следует проводить при комнатной температуре (20–25°C) в течение 72 часов после отбора сывороток, реактивы также должны быть комнатной температуры. Предварительное центрифугирование снизит возможность неспецифических реакций. Антигены для РСА имеются в продаже, но они могут отличаться специфичностью и чувствительностью в зависимости от производителя и от партии. Их необходимо хранить в соответствии с инструкциями производителя. Соответствующие РСА-окрашенные антигены можно также подготовить на месте, используя методы культивирования, описанные в Разделе В.1; затем их окрашивают кристаллическим фиолетовым. Стандарты контроля качества антигенов микоплазм для серологических тестов описаны ниже.

3.1.1. Процедура тестирования (Allan & Gough, 1974)

- i) Один объем сыворотки (около 0,02 мл) наносят каплей на чистую белую плитку или стеклянный планшет, затем наносят один объем антигена MG или MS. Не позволяйте сыворотке высохнуть до нанесения антигена. Во время использования важно тщательно

и интенсивно встряхивать флакон с антигеном, чтобы сохранить в суспензии правильное количество антигена.

- ii) Для распределения смеси на окружности около 1,5 см в диаметре используют палочку для перемешивания. Плитку или планшет встряхивают в течение 2 минут. На наличие агглютинации указывает появление флоккуации антигена в течение 2 минут.
- iii) В исследование включают известные положительные и отрицательные контроли.
- iv) Проводят повторное тестирование серийных разведений всех сывороток, которые агглютинируют после нагревания при температуре 56°C в течение 30 минут. Если они продолжают интенсивно реагировать, они считаются положительными при разведении (1/4 или выше).

В США положительные по MG и MS сыворотки можно получить в лабораториях национальных ветеринарных служб USDA (NVSL), а в Европе – в AFSSA Ploufragan¹, Франция. MG и MS, а также контрольные сыворотки получают на курах и индейках, их можно приобрести в различных титрах. Наборы антисывороток можно также приобрести в Отделении ветеринарии птиц Университета Джорджии, если они есть в наличии.

Отсутствуют международные стандарты для интерпретации результатов этих тестов, но большой процент положительных сывороток в стаде (10% или более) указывает на инфекцию MG, особенно если результат подтвержден посредством РТГА или ИФА. Для дальнейшего подтверждения стадо необходимо повторно исследовать в течение месяца. Неубедительные результаты могут вызвать необходимость попытаться выделить организм или продемонстрировать наличие его ДНК. Сомнительные результаты тестирования на MG или MS следует исследовать с использованием тестов с антигеном MS (и *наоборот*), т.к. инфицирование данными организмами иногда вызывает перекрестные реакции.

Тесты можно проводить на желтке, а также на сыворотках, хотя желток необходимо сначала развести или экстрагировать.

3.2. Реакция торможения гемагглютинации

MG и MS могут гемагглютинировать красные кровяные тельца (ККТ), а специфические антитела вызывают ингибирование. Следует выбирать штамм, который хорошо растет и гарантированно гемагглютинирует. Для проведения РТГА требуется удовлетворительно гемагглютинирующий антиген MG и MS, отмытые свежие ККТ кур или индеек, в зависимости от ситуации, а также тестовые сыворотки. В качестве антигена может выступать как свежая культура в бульоне, так и концентрированная отмытая суспензия клеток микоплазмы в ФБР. Может быть сложно поддерживать поставку вискозитированного антигена бульонной культуры; однако применение концентрированного антигена (содержащего обычно 25-50% глицерина и хранящегося при температуре -70°C) повышает вероятность неспецифических реакций. В США гемагглютинирующий (ГА) антиген MG и MS можно приобрести в NVSL.

При проведении РТГА следуют хорошо известным процедурам (Allan & Gough, 1974). ГА титр антигена впервые определяют в двукратных разведениях, единицу ГА определяют как

¹ Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) Ploufragan, Mycoplasma Bacteriology Unit, 22440 Ploufragan, France

наименьшее количество антигена, дающее полную гемагглютинацию при использовании тест-системы. РТГА следует проводить с использованием 4 ГА единиц согласно следующему методу или методу, обеспечивающему эквивалентную чувствительность, которая определяется в ходе тестов с известными положительными сыворотками.

Все титрования ГА и РТГА лучше всего проводить на многолуночных пластиковых планшетах с лунками в форме V, используя постоянные объемы 50 мкл. В каждый тест включают положительную и отрицательную контрольную сыворотку. Для исследования каждой сыворотки необходимо использовать один ряд из восьми лунок.

3.2.1. Процедура тестирования

- i) В первую лунку каждого ряда добавляют 50 мкл ФБР.
- ii) В каждую вторую лунку каждого ряда добавляют 8 ГА единиц антигена в объеме 50 мкл, и в каждую лунку с 3 по 8 в каждом ряду добавляют 4 ГА единицы антигена в объеме 50 мкл.
- iii) 50 мкл 1/5 разведения исследуемой сыворотки добавляют в первую лунку, перемешивают и переносят 50 мкл во вторую лунку и так далее, 50 мкл удаляют из последней лунки. Первая лунка – лунка с сывороточным контролем.
- iv) Для контроля антигена необходимо шесть лунок. В лунки со 2 по 6 добавляют по 50 мкл ФБР, и 50 мкл с 8 ГА единицами антигена добавляют в лунки 1 и 2. Содержимое лунки 2 перемешивают и переносят 50 мкл в лунку 3, перемешивают, повторяют для лунки и удаляют 50 мкл.
- v) Для контроля ККТ необходимо две лунки. В каждую из них добавляют 50 мкл ФБР.
- vi) Во всем лунки добавляют 0,5% суспензии ККТ (куриные тельца для куриной сыворотки и индюшьи для сыворотки от индеек).
- vii) Планшет слегка встряхивают для обеспечения тщательного перемешивания содержимого лунок, результаты считывают после выдерживания в течение около 50 минут при комнатной температуре, или когда титрация антигена достигает 4 ГА единиц. Для считывания планшет следует наклонить, и только те лунки, в которых ККТ «стекают» одновременно с ККТ в контрольных лунках, считаются ингибированными. Сывороточный контроль должен демонстрировать четкий сгусток ККТ, а положительные и отрицательные контроли должны реагировать, как ожидалось. Титр РТГА – наибольшее разведение сыворотки, демонстрирующее полное ингибирование ГА.

Сыворотки, демонстрирующие неспецифическую гемагглютинацию, следует адсорбировать для удаления неспецифических гемагглютининов, чтобы получить четкий сгусток в контрольной лунке без гемагглютинирующего антигена. Адсорбцию проводят посредством инкубирования 1 мл разведения сыворотки с 6-8 каплями упакованных ККТ кур или индеек. Клетки удаляют после инкубирования при температуре 37°C в течение 10 минут, а супернатант тестируют на гемагглютинирующую активность.

Отсутствует официальное определение положительных и отрицательных результатов в целях международной торговли, но NPIP США констатирует, что титры 1/80 и выше считаются положительными, а титры 1/40 означают высокую степень подозрения.

3.3. Твердофазный иммуноферментный анализ

В продаже имеются несколько коммерческих тест-наборов ИФА для выявления MG и MS. В некоторой степени чувствительность определяется рекомендациями производителя относительно пороговых уровней положительных и сомнительных реакций. Иногда чувствительность может быть «затушена» во избежание хорошо известной перекрестной реакции между MG и MS. Один ИФА использует МАт, которое распознает эпитоп на полипептиде MG молекулярной массой 56 кДа (Czifra *et al.*, 1993). В данной ИФА-системе планшеты сенсibiliзируют цельноклеточным антигеном MG, а исследуемые сыворотки добавляют как в традиционном ИФА, но реакцию определяют по масштабу блокирования, который возникает, когда добавляют конъюгированное МАт. Аналогичный ИФА-набор продается и для MS. Одно из преимуществ заключается в том, что систему можно использовать для сывороток от любых видов птиц без дополнительной адаптации.

3.3.1. Контроль качества антигенов *Mycoplasma gallisepticum* и *M. synoviae*

i) Антигены *Mycoplasma gallisepticum*

Антигены обычно готовят из штамма S6 или из штамма A5969 MG. При необходимости можно также использовать антигены, приготовленные из других штаммов.

Антиген MG для РСА: Описанные ниже методы контроля качества применяются только для суспензий MG, окрашенных соответствующим красителем и содержащих консервант, а также предназначенных для использования в быстрой реакции агглютинации с сывороткой. Такие антигены имеются в продаже.

При микроскопическом исследовании антиген должен выглядеть как гомогенная суспензия без хлопьев или преципитатов, а в суспендирующей жидкости должны отсутствовать остатки красителя. В нем должны отсутствовать контаминация бактериями и грибами. Уровень pH должен быть в диапазоне от 6,5 до 7. Антиген следует хранить при температуре $5 \pm 3^\circ\text{C}$ и перед использованием нагревать до комнатной температуры.

Чувствительность и специфичность антигена определяют по его реакции с известными положительными сыворотками высокого и низкого титра. Положительную реакцию распознают по образованию окрашенных хлопьев и просветлению суспендирующей среды. Критерии, описанные выше, применимы до истечения срока годности, указанного производителем.

Антиген MG для РТГА: Тест предпочтительно проводить на живых, фактически растущих культурах. Антиген должен быть свободен от контаминации бактериями и грибами.

Антиген MG для ИФА: Может быть сложно подготовить удовлетворительный антиген для использования в непрямом ИФА без значительных предварительных экспериментов и подтверждения чувствительности и специфичности. Использование надежного

коммерческого тест-набора, вероятно, является наилучшим вариантом для диагностических лабораторий. В настоящее время некоторые тест-наборы лицензированы USDA и утверждены для использования в ходе выполнения NPIP в США.

ii) Антигены *Mycoplasma synoviae*

Следует использовать антигены, полученные из штамма WVU 1853 или других подходящих штаммов.

Антиген Mycoplasma synoviae для РСА: применяются спецификации для антигена MG для РСА.

Антиген Mycoplasma synoviae для РТГА: применяются спецификации для антигена MG для РТГА.

iii) Дополнительные комментарии

Сыворотки, проявляющие неспецифическую реакцию в РСА, обычно демонстрируют положительную реакцию в РТГА с использованием живого ГА антигена. Положительные реакции РСА можно подтвердить посредством РТГА с сыворотками, отобранными через 2-3 недели после инфицирования (время, необходимое для выработки антител для РТГА). Однако РТГА обычно штамм-специфична (Kleven *et al.*, 1988) и, следовательно, может быть недостаточно чувствительной. Полезной альтернативой может быть ИФА.

Перед применением в РСА образцы сыворотки не следует замораживать. Во избежание неспецифических реакций у них должен отсутствовать гемолиз и контаминация. Применение инактивированных вакцин против других болезней может привести к появлению неспецифических реакций. Образцы следует исследовать как можно скорее (в течение 72 часов), т.к. при хранении качество антител к микоплазмам снижается. Сыворотки могут быть инактивированы посредством нагревания на водяной бане в течение 30 минут при температуре 56°C.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ И ДИАГНОСТИЧЕСКИМ БИОЛОГИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ

Предпочтительный метод борьбы – сохранение стад свободными от MG и MS. Вакцинацию следует рассматривать только в тех ситуациях, когда контакт в полевых условиях неизбежен, например, в условиях содержания птиц разного возраста. Следует также учитывать потенциальный контакт с соседними стадами домашней птицы.

Для борьбы с MG имеется два типа вакцин. Это авирулентные либо слабовирулентные штаммы MG, используемые в качестве живых вакцин, или инактивированные бактерины в масляной эмульсии. Тема вакцинации против MG рассмотрена Whithear (1996). Несмотря на антигенное разнообразие штаммов MG, считается, что вакцинации одним штаммом достаточно.

Руководства по производству ветеринарных вакцин приведены в Главе 1.1.8 *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Руководства, приведенные здесь и в Главе 1.1.8,

являются общими по сути и могут быть дополнены национальными и региональными требованиями.

С1. Живые вакцины: методы применения

Применение живых вакцин эквивалентно «контролируемому контакту». Цель – инфицировать стадо слабым, иммуногенным штаммом MG в том возрасте, когда поражение может быть незначительными или может отсутствовать. Такое воздействие приводит к сопротивляемости к контрольному заражению позже, например, в местах содержания разновозрастной птицы. Успешно вакцинированная птица резистентна к респираторному заболеванию, аэросаккулиту и снижению яйценоскости, вызываемым MG. Вакцинация также имеет результатом снижение уровня передачи патогена с яйцами у племенной птицы.

Штамм F MG наиболее часто используемый вакцинный штамм (Carpenter *et al.*, 1981). Это естественным образом появляющийся штамм слабой или умеренной вирулентности для кур, но вирулентный для индейки. Обычно он медленно распространяется от птицы к птице. При введении здоровым курам через верхние дыхательные пути наблюдается незначительная респираторная реакция, или она отсутствует вообще. Однако введение посредством аэрозоля или в присутствии других возбудителей респираторных болезней, таких как вирус болезни Ньюкасла или инфекционного бронхита, может привести к появлению респираторных признаков или аэросаккулита. Вакцинированные куры являются постоянными носителями, поэтому одной дозы достаточно. Применение вакцины на основе штамма F в каждом ремонтном стаде в месте содержания разновозрастной птицы постепенно приведет к замещению полевого штамма вакцинным. Штаммы ts-11 и 6/85 авирулентны, и распространения на невакцинированную птицу не происходит, или оно происходит в очень небольшом масштабе, если птицы находятся в очень тесном контакте (Ley *et al.*, 1997).

Коммерческих молодок обычно вакцинируют в возрасте от 12 до 16 недель, но допустима вакцинация более молодой или взрослой птицы. Важно, чтобы вакцинация проводилась до естественного заражения стада. В случае возможного более раннего заражения можно проводить вакцинацию птицы в возрасте 2-4 недель. В случае штамма F предпочтительно введение интраназально или посредством закапывания в глаза. Введение с питьевой водой, если процедура проводится неправильно, может привести к пропуску некоторых птиц. Введение с аэрозолем также должно проводиться аккуратно, чтобы была обработана вся птица. При использовании аэрозольной вакцинации респираторную реакцию следует ожидать через 5-7 дней после вакцинации. Вакцинированные стада следует исследовать посредством реакции агглютинации через 3-4 недели после вакцинации с тем, чтобы убедиться, что вся птица вакцинирована. Желательно проводить вакцинацию птицы в том возрасте, когда отсутствует реакция на другие вакцины против респираторных болезней. Штамм ts-11 следует вводить посредством закапывания в глаза, а штамм 6/85 вводят посредством мелкодисперсного распыления. Вакцинация штаммом ts-11 обеспечивает низкий, но различимый серологический ответ в реакции агглютинации на пластинке, в РТГА и ИФА, а вакцинация штаммом 6/85 обычно не приводит к серологическому ответу. Отсутствие поствакцинальной реакции следует наблюдать при вакцинации штаммом 6/85 или ts-11. Стада, вакцинированные штаммом F или штаммом ts-11 положительны в культуре в течений всей жизни птицы, но штамм 6/85 может быть сложно выявить по истечению 4-6 недель после вакцинации.

Коммерческие живые вакцины следует использовать в течение 1-2 часов после восстановления. Лиофилизированные вакцины следует хранить при температуре 4°C. Некоторые производители поставляют вакцину в замороженном виде. Такую вакцину следует хранить в жидком азоте, на сухом льду или при температуре –70°C или ниже. Живые вакцины против MG не сохраняют устойчивость в течение длительного времени при обычных температурах замораживания. Следует избегать хранения при температуре выше –20°C в течение более нескольких дней.

Штаммы 6/85 и ts-11 по определению безопаснее, чем штамм F, хотя уровень защиты может быть несколько ниже, и они могут быть полезными в качестве первичного вакцинного штамма в местах содержания разновозрастной птицы или в качестве «вакцины второго поколения» в местах, где ранее применялась вакцина на основе штамма F. Они могут быть также предпочтительны, если вызывает беспокойство неизбежный контакт с соседними стадами домашней птицы. Штамм F замещает MG дикого типа более эффективно, чем штамм ts-11 или 6/85, но штамм ts-11 используют для искоренения штамма F MG в местах содержания разновозрастной птицы яичного направления (Turner & Kleven, 1998). В местах содержания разновозрастной птицы, где постоянно используется штамм 6/85, птица зачастую отрицательна по MG, что позволяет предположить, что он замещает штамм дикого типа.

В некоторых странах живые вакцины применяют для молодок в стадах племенных бройлеров. В Австралии живая вакцина на основе штамма ts-11 интенсивно используется для молодок племенных бройлеров, а также для товарных несушек. В течение нескольких лет в некоторых странах Латинской Америки вакцина на основе штамма F используется для выращиваемых в стадах разновозрастной птицы молодок племенных бройлеров; в последнее время применение штаммов ts-11 и 6/85 ограничено. Ограничено применение штамма 6/85 в качестве вакцины для товарных индеек и в США, но достоверные данные о его эффективности отсутствуют. Как правило, вакцинация индеек живыми вакцинами не рекомендуется, а вакцинация бройлеров, как живыми, так и инактивированными вакцинами не имеет успеха. Ни одна из вакцин не валидирована для использования для дичи.

В нескольких странах имеется живая вакцина против MS для применения для племенных бройлеров и кур-несушек. Она производится из чувствительного к температуре мутанта MS-N (Markham *et al.*, 1998). Ее характеристики и метод применения аналогичны характеристикам и методу применения основанной на штамме ts-11 вакцины против MG.

С2. Инактивированные вакцины: метод применения

MG бактерины готовят из концентрированной суспензии цельных клеток, эмульгированной в масляном адьюванте. Высокое содержание антигена обязательно.

Бактерины обычно применяют для товарных молодок для обеспечения защиты от снижения яйценоскости, которое происходит после воздействия MG в местах содержания разновозрастной птицы (Hildebrand *et al.*, 1983). Их также можно использовать для снижения уровня передачи с яйцами у племенных молодок. Использование бактеринов для бройлеров ограничивается тем фактом, что птицы, вакцинированные в возрасте до 1-2 недель незащищены. Несмотря на то, что бактерины могут обеспечивать защиту от респираторных признаков, вакцинированные стада легко инфицируются. Длительность иммунитета

неизвестна, но большинство стад подвергаются воздействию в течение 1-2 месяцев после вакцинации.

Введение производят внутримышечно или подкожно, обычно в дозе 0,5 мл на птицу. Существует риск, что персистентная реакция в месте вакцинации потребует дополнительной обрезки тушки отработанной птицы, вакцинированной внутримышечно, поэтому введение подкожно – наиболее часто используемый путь вакцинации. Предпочтительно введение двух доз, но факторы стоимости и трудозатрат могут диктовать использование одной дозы, обычно в возрасте товарных молодок – 16-18 недель. Можно использовать многодозовый шприц. Все оборудование следует чистить и стерилизовать после вакцинации каждого стада, а группы сотрудников, проводящих вакцинацию, должны соблюдать соответствующие правила биобезопасности при перемещении между стадами. Вакцину следует хранить при температуре 2–8°C до момента использования. Вакцину запрещено замораживать или подвергать воздействию источников яркого света.

В США также лицензирован аналогичный бактериин против MS, но он не получил широкого распространения.

1. Контроль посевного материала

1.1. Описание посевного материала

1.1.1. Живая вакцина

Вакцинный штамм должен быть иммуногенным, он должен быстро колонизироваться в респираторном тракте и вызвать минимальные поражения дыхательной системы. Сильный гуморальный иммунный ответ необязательно взаимосвязан с иммунитетом.

Посевная культура должна быть свободна от посторонних возбудителей. Культуру следует клонировать для обеспечения чистоты. В целях обеспечения идентичности и чистоты штамма при желании можно исследовать на агарозном геле характер расщепления ДНК микоплазм с рестриктазами.

Посевная культура должна быть устойчивой и не должна проявлять тенденции к возвращению вирулентности. Данный факт может быть подтвержден посредством десяти обратных пассажей на восприимчивых цыплятах. Контактных цыплят можно вводить с недельными интервалами. При необходимости у инфицированных цыплят можно отбирать трахеальные смывы и вводить их в трахею контактных цыплят. Передачу организма следует подтверждать. Затем полученный изолят можно использовать для контрольного заражения восприимчивых цыплят.

1.1.2. Убитая вакцина

В случае убитой вакцины наиболее важными характеристиками являются высокий выход и хорошая антигенность. Считается, но не доказано, что вирулентные штаммы предпочтительнее. Посевная культура должна быть свободной от посторонних возбудителей.

1.2. Метод культивирования

Посевную культуру можно размножить в среде, аналогичной описанной выше (Раздел В.1) для живых вакцин, но бульонную культуру лиофилизируют или замораживают при температуре -70°C или ниже. В случае бактеринов перед приготовлением эмульсии культуры необходимо концентрировать и ресуспендировать в небольшом объеме солевого раствора или ФБР.

1.3. Валидация вакцины

Данные об эффективности следует получать до начала производства основного объема вакцины. Вакцину цыплятам следует водить тем же способом, что и полевых условиях. Вакцинированных цыплят следует подвергать контрольному заражению, и защиту следует определять по респираторным признакам, выделениям из носа и/или аэросаккулиту. Желательно провести оценку защиты от снижения яйценоскости, но данные исследования с использованием контрольного заражения дорогостоящи и трудоемки.

Исследования эффективности: В группах из 20 двухнедельных свободных от специфических патогенов (СПФ) цыплят или, как минимум, свободных от микоплазм цыплят проводят вакцинацию одной полевой дозой живой вакцины посредством закапывания в глаза или другим способом, или подкожно или внутримышечно вводят одну дозу (обычно 0,5 мл) бакетрина. Аналогичную группу невакцинированных цыплят содержат отдельно в качестве контролей. Все цыплята должны подвергаться контрольному заражению вирулентным штаммом MG через 2–3 недели после вакцинации. Простой способ контрольного заражения – введение 0,1 мл культуры для контрольного заражения в задний грудной воздухоносный мешок. Всех птиц вскрывают через 7–10 дней после контрольного заражения и определяют поражения воздухоносного мешка. Альтернативные методы включают контрольное заражение посредством введения 0,1 мл в инфраорбитальный синус и исследование птиц на предмет выделений из носа в период с 7 по 14 день после контрольного заражения, или контрольное заражение посредством аэрозольного распыления или измерение толщины слизистой оболочки в трахее на гистологических срезах в 4-6 предварительно определенных точках (Whithear, 1996).

2. Метод производства

Вакцина должна изготавливаться в подходящей чистой и безопасной среде, хорошо отделенной от диагностических лабораторий или коммерческой домашней птицы. Особое внимание должно уделяться предотвращению контаминации MG от других продуктов, изготавливаемых на том же производственном объекте.

Производство вакцины должно быть основано на системе посевных материалов с использованием подходящего штамма MG установленного происхождения, истории пассажей и чистоты. Питательная среда аналогична описанной выше. Сыворотку, используемую в питательной среде, следует инактивировать при температуре 56°C в течение 1 часа в целях предотвращения контаминации микоплазмами, которые могут присутствовать, и их следует стерилизовать посредством фильтрации. Желательно использовать источник СПФ сыворотки.

Бульонную среду с быстро растущим инокулятом вводят в объеме около 5% (объем/объем). Инкубирование проводят при температуре 37°C. Вакцину можно производить партиями с использованием больших сосудов или в ферментере. В серийных культурах урожай собирают приблизительно через 24 часа после инокуляции. Живые вакцины консервируют посредством сублимирования или замораживания при температуре –70°C, в жидком азоте или на сухом льду.

В случае производства бактериного антигена следует концентрировать, обычно посредством центрифугирования, обработки ультрафиолетом или другим подходящим методом. Бактерины готовят в эмульсии вода-масло, обычно состоящей из 80% минерального масла, 20% воды и подходящих эмульгаторов.

3. Производственный контроль

3.1. Содержание антигена

При сборе урожая титр должен составлять от 10⁸ до 10⁹ КОЕ/мл. Концентрацию антигена в бактерином препарате сложно стандартизировать, но она может быть основана на объеме клеточного осадка, который обычно составляет 1% (объем/объем) клеточного осадка в готовом продукте.

3.2. Инактивация убитой вакцины

Инактивацию зачастую проводят посредством бета-пропиолактона или формальдегида. В условиях производства вакцины необходимо подтвердить, что инактивирующий агент и процедура инактивации обеспечивают инактивацию вакцинного организма и потенциальных контаминантов.

Перед инактивацией следует убедиться, что гомогенная суспензия свободна от частиц, в которые не может проникнуть инактивирующий агент. Исследование инактивации следует проводить посредством культивирования на культуре для выращивания микоплазм для каждой партии как основанного объема после инактивации, так и готового продукта. Признаков роста микоплазм наблюдаться не должно.

3.3. Стерильность убитой вакцины

Масло, используемое в вакцине, должно стерилизоваться при температуре 160°C в течение 1 часа или посредством фильтрации, и необходимо подтвердить эффективность данной процедуры. Испытания масляных эмульсионных вакцин следует проводить для каждой партии готовой вакцины, как описано, например, в Британской Фармакопее (Ветеринария) 1985.

4. Контроль партий

4.1. Стерильность

Описание исследований биологических материалов на стерильность и отсутствие контаминации описаны в Главе 1.1.9.

4.2. Безопасность

4.2.1. Испытание живой вакцины на безопасность

Птиц, вакцинированных в ходе испытания эффективности, описанного выше, можно использовать для оценки безопасности вакцины.

4.2.2. Испытание убитой вакцины на безопасность

Птиц, вакцинированных в ходе испытания эффективности, описанного выше, можно наблюдать на предмет местных или системных нежелательных явлений.

4.3. Иммуногенность

Испытания иммуногенности как живой, так и убитой вакцины можно проводить с использованием процедур, описанных выше для испытания эффективности. Титр живых вакцин должен быть достаточным для обеспечения заражения при рекомендованном способе введения; живой вакцины на основе штамма F в объеме 105 КОЕ/доза достаточно при введении посредством закапывания в глаза. Рекомендуемая доза ts-11 составляет $\geq 107,7$ цветоизменяющих единиц (ЦИЕ)/доза, а в случае 6/85 доза 107–108 КОЕ была эффективной при испытаниях посредством контрольного заражения. В случае MS-H эффективность проявили дозы $\geq 4,8 \times 10^5$.

4.4. Длительность иммунитета (убитая вакцина)

Так как обычно стада подвергаются воздействию в течение 1–2 месяцев после вакцинации, длительность иммунитета имеет первоочередное значение. После заражения полевым штаммом резистентность считается постоянной.

4.5. Стабильность

Доказательства следует получать при исследовании трех партий вакцины, демонстрирующих, что вакцина выдерживает испытания на иммуногенность через 3 месяца по истечении срока хранения.

4.6. Консерванты

Консервант обычно необходим для вакцины в многодозовых контейнерах. Необходимо контролировать концентрацию консерванта в готовой вакцине и его устойчивость в течение всего срока хранения.

Следует использовать подходящий консервант, уже утвержденный для данных целей. Микоплазмы восприимчивы ко многим антибактериальным веществам, кроме пенициллинов; данные антибиотики не следует использовать в качестве консервантов.

4.7. Меры предосторожности (опасности)

Масляные эмульсионные вакцины вызывают серьезные поражения у лиц, проводящих вакцинацию при случайном введении вакцины в руку или в другие ткани. В данном случае необходимо незамедлительно обратиться к врачу, взяв с собой упаковку вакцины. На каждом флаконе с вакциной и на ее упаковке должна быть четкая маркировка с указанием серьезности последствий при случайном введении вакцины. Обработку таких ран должен проводить доктор отделения интенсивной терапии согласно процедурам для лечения травм от смазочного шприца.

Лица, проводящие вакцинацию птиц посредством аэрозольного распыления, должны использовать защитную одежду и маски.

5. Испытания готового продукта

5.1. Безопасность

См. Раздел С.4.2.

5.2. Иммуногенность

См. Раздел С.4.3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ALLAN W.H. & GOUGH R.E. (1974). A standard haemagglutination test for Newcastle disease. 1. A comparison of macro and micro methods. *Vet. Rec.*, 95, 120–123.

BRADBURY J.M. (2001). Avian mycoplasmas. In: *Poultry Diseases, Fifth Edition*, Jordan F., Pattison M., Alexander D. & Faragher T., eds. W.B. Saunders, London, UK, 178–193.

BRADBURY J.M. (2005). Workshop of European Mycoplasma Specialists. *World Poult. Sci. J.*, 61, 355–357.

CARPENTER T.E., MALLINSON E.T., MILLER K.F., GENTRY R.F. & SCHWARTZ L.D. (1981). Vaccination with F-strain *Mycoplasma gallisepticum* to reduce production losses in layer chickens. *Avian Dis.*, 25, 404–409.

CLYDE W.A., JR. (1983). Growth inhibition tests. In: *Methods in Mycoplasmaology*, Vol. 1, Razin S. & Tully J.G., eds. Academic Press, New York, USA, and London, UK, 405–410.

CZIFRA G., SUNDQUIST B., TUBOLY T. & STIPKOVITS L. (1993). Evaluation of a monoclonal blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Mycoplasma gallisepticum*-specific antibodies. *Avian Dis.*, 37, 680–688.

FAN H.H., KLEVEN S.H. & JACKWOOD M.W. (1995). Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.*, 39, 729–735.

FERGUSON N.M., HEPP D., SUN S., IKUTA N., LEVISOHN S., KLEVEN S.H. & GARCÍA M. (2005). Use of molecular diversity of *Mycoplasma gallisepticum* by gene-targeted sequencing (GTS) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for epidemiological studies *Microbiol.*, 151, 1883–1893.

FREUNDT E.A. (1983). Culture media for classic mycoplasmas. In: *The Mycoplasmas*, Vol. 1, Razin S. & Tully J.G., eds. Academic Press, New York, USA and London, UK, 127–135.

FREY M.L., HANSON R.P. & ANDERSON D.P. (1968). A medium for the isolation of avian Mycoplasmas. *Am. J. Vet. Res.*, 29, 2163–2171.

- GARCÍA M., IKUTA N., LEVISOHN S. & KLEVEN S.H. (2005). Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Avian Dis.*, 49, 125–132.
- HILDEBRAND D.G., PAGE D.E. & BERG J.R. (1983). *Mycoplasma gallisepticum* (MG) – laboratory and field studies evaluating the safety and efficacy of an inactivated MG bacterin. *Avian Dis.*, 27, 792–802.
- HONG Y., GARCÍA M., LEITING L., BENCINA D., DUFOUR-ZAVALA L., ZAVALA G. & KLEVEN S.H. (2004). Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene *vlhA*. *Avian Dis.*, 48, 606–616.
- HONG Y., GARCIA M., LEVISOHN S., SAVELKOUL P., LEITING V., LYSNYANSKY I., LEY D.H. & KLEVEN S.H. (2005). Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* strains using amplified fragment length polymorphism and other DNAbased typing methods. *Avian Dis.*, 49, 43–49.
- KEMPF I. (1998). DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. *Avian Pathol.*, 27, 7–14.
- KLEVEN S.H. (2003). *Mycoplasma synoviae* infection. In: *Diseases of Poultry*, Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R. & Swayne D.E., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 756–766.
- KLEVEN S.H., FLETCHER O.J. & DAVIS R.B. (1973). Variation of pathogenicity of isolates of *Mycoplasma synoviae* with respect to development of airsacculitis and synovitis in broilers. *Am. J. Vet. Res.*, 163, 1196–1196.
- KLEVEN S.H., KING D.D. & ANDERSON D.P. (1972). *Airsacculitis* in broilers from *Mycoplasma synoviae*: effect on airsac lesions of vaccinating with infectious bronchitis and Newcastle virus. *Avian Dis.*, 16, 915–924.
- KLEVEN S.H., MORROW C.J. & WHITHEAR K.G. (1988). Comparison of *Mycoplasma gallisepticum* strains by hemagglutination-inhibition and restriction endonuclease analysis. *Avian Dis.*, 32, 731–741.
- KOTANI H. & MCGARRITY G.J. (1985). Rapid and simple identification of *Mycoplasmas* by immunobinding. *J. Immunol. Methods*, 85, 257–267.
- LANDMAN W.J.M. & FEBERWEE A. (2004). Aerosol-induced *Mycoplasma synoviae* arthritis: the synergistic effect of infectious bronchitis virus infection. *Avian Pathol.*, 33, 591–598.
- LAUERMAN L.H. (1998). *Mycoplasma* PCR Assays. In: *Nucleic Amplification Assays for Diagnosis of Animal Diseases*, Lauerman L.H., ed. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Auburn, AL, USA, 41–52.
- LEY D.H. (2003). *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: *Diseases of Poultry*, Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R. & Swayne D.E., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 722–744.

- LEY D.H., MCLAREN J.M., MILES A.M., BARNES H.J., MILLER S.H. & FRANZ G. (1997). Transmissibility of live *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strains ts-11 and 6/85 from vaccinated layer pullets to sentinel poultry. *Avian Dis.*, 41, 187–194.
- LOCKABY S.B., HOERR F.J., LAUERMAN L.H., SMITH B.F., SAMOYLOV A.M., TOIVIO-KINNUCAN M.A. & KLEVEN S.H. (1999). Factors associated with virulence of *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.*, 43, 251–261.
- LUTTRELL M.P., FISCHER J.R., STALLKNECHT D.E. & KLEVEN S.H. (1996). Field investigation of *Mycoplasma gallisepticum* infections in house finches (*Carpodacus mexicanus*) from Maryland and Georgia. *Avian Dis.*, 40, 335–341.
- MALLINSON E.T., ECKROADE R.J. & KLEVEN S.H. (1981). In vivo bioassay and supplemental serologic techniques for the detection of *Mycoplasma* in suspect breeding chickens. *Avian Dis.*, 25, 1077–1082.
- MARKHAM J.F., MORROW C.J. & WHITHEAR K.G. (1998). Efficacy of a temperature-sensitive *Mycoplasma synoviae* live vaccine. *Avian Dis.*, 42, 671–676.
- MAROIS C., DUFOUR-GESBERT F. & KEMPF I. (2002). Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in environmental samples. *Avian Pathol.*, 31, 163–168.
- ROSENDAL S. & BLACK F.T. (1972). Direct and indirect immunofluorescence of unfixed and fixed mycoplasma colonies. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B]*, 80, 615–622.
- TALKINGTON F.D. & KLEVEN S.H. (1983). A classification of laboratory strains of avian *Mycoplasma* serotypes by direct immunofluorescence. *Avian Dis.*, 27, 422–429.
- TURNER K.S. & KLEVEN S.H. (1998). Eradication of live F strain *Mycoplasma gallisepticum* vaccine using live ts-11 on a multiage commercial layer farm. *Avian Dis.*, 42, 404–407.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (2004). Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), National Poultry Improvement Plan and Auxiliary Provisions. APHIS Publication 91-55-063. APHIS, USDA, Riverdale, Maryland, USA, 97–100.
- WANG H., FADL A.A. & KHAN M.I. (1997). Multiplex PCR for avian pathogenic mycoplasmas. *Molec. Cell. Probes*, 11, 211–216.
- WHITHEAR K.G. (1996). Control of avian mycoplasmoses by vaccination. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 15, 1527–1553.
- ZAIN M.Z. & BRADBURY J.M. (1996). Optimising the conditions for isolation of *Mycoplasma gallisepticum* collected on applicator swabs. *Vet. Microbiol.*, 49, 45–57

*

* *

NB: Создана справочная лаборатория МЭБ по микоплазмозу птиц (*Mycoplasma gallisepticum* и *M. synoviae*) (см. Таблицу в Части 4 данного *Руководства по наземным животным* или обратитесь на сайт МЭБ для получения наиболее актуального списка: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>)

Дополнительную информацию о диагностических тестах, реактивах и вакцинах против микоплазмоза птиц (*Mycoplasma gallisepticum* и *M. synoviae*) можно получить в Референтных лабораториях МЭБ