

ГЛАВА 3.7.4

КОНТАГИОЗНАЯ АГАЛАКТИЯ

РЕЗЮМЕ

Контагиозная агалактия представляет собой серьезное заболевание овец и коз, характеризующееся маститом, артритом, кератоконъюнктивитом и, в отдельных случаях, абортми. Основным возбудителем заболевания у овец и коз является *Mycoplasma agalactiae* (Ma), но *M. Capricolum* подвид *capricolum* (Mcc), *M. mycoides* подвид *capri* (Mmc), и *M. putrefaciens* вызывают (чаще всего у коз) заболевание с клинически сходной симптоматикой, которое может сопровождаться пневмонией. Ma и Mcc были выделены из образцов материала, взятого у мелких диких жвачных животных, таких, как альпийский козел и тур. Антитела к Mmc и Mcc обнаружены у южноамериканских верблюдовых (альпака, лама и викунья), но микоплазма до настоящего момента не выделена.

Идентификация возбудителя: Для постановки окончательного диагноза требуется выделить из материала, полученного от больных животных, микоплазму, вызвавшую заболевание, и идентифицировать ее при помощи биохимических, серологических или все чаще применяемых молекулярных методов, например, метода полимеразной цепной реакции. Отбираемые образцы, на которых следует остановить выбор, включают молоко, конъюнктивальные и ушные мазки и синовиальную жидкость. Взятие образцов из молочной цистерны является удобным способом мониторинга целого стада/ отары на предмет наличия болезнетворной микоплазмы. Все четыре вышеперечисленных возбудителя демонстрируют сравнительно хороший рост в большинстве сред, предназначенных для выращивания микоплазмы, хотя *M. agalactiae* предпочитает в качестве субстрата органические кислоты, например, пируват.

Серологические исследования: Определение антител в сыворотке методом иммуноферментного анализа (ИФА) позволяет быстро диагностировать заболевание, но данный метод не отличается достаточной чувствительностью для обнаружения хронической формы заболевания, распространенной в стаде или отаре. Непрямые виды ИФА использовались для рутинного анализа в ходе программ по контролю заболевания, предусматривавших скрининг отар на наличие Ma. В районах, считающихся свободными от контактной агалактии, как правило, необходимо подтверждение наличия инфекции путем изоляции и идентификации возбудителя или его определения методом полимеразной цепной реакции. Серологические исследования на наличие *M. putrefaciens* не являются широкодоступными.

Требования к вакцинам: В Южной Европе широко используют коммерческие вакцины против Ma, инактивированные формалином, но они не считаются высокоэффективными. В экспериментальных условиях вакцины против Ma, инактивированные сапонином, продемонстрировали более высокую степень предоставляемой защиты, чем препараты, содержащие формалин. Живые вакцины против Ma применяют в Турции, где, согласно отчетам, они более успешно защищают от заболевания, чем инактивированные вакцины. В продаже имеется вакцина, содержащая Ma, Mmc и Mcc. Полагают, что в некоторых странах применяются аутологичные вакцины против Mmc и, в отдельных случаях, против Mcc. Не существует вакцин против *M. putrefaciens*, поскольку заболевание, которое вызывает данный возбудитель, не рассматривается в качестве достаточно серьезного или широко распространенного.

А. ВВЕДЕНИЕ

Контагиозная агалактия это болезнь овец и коз, известная на протяжении почти 200 лет. Она характеризуется маститом, артритом и кератоконъюнктивитом. Заболевание регистрируется в Европе, Азии и Соединенных Штатах Америки (США), а также в Северной Африке. Возбудителем болезни в большинстве случаев является *Mycoplasma agalactiae* (Ma) (подтверждено Bergonier *et al.*, 1997). Быстрое распространение контагиозной агалактии, вызванной Ma, наблюдалось недавно в Испании и Франции, при этом сообщалось о возрастающем числе случаев в Пиренеях и прилегающих областях, а также о новых вспышках заболевания на Корсике (Chazel *et al.*, 2010). Частые и крупные вспышки имели место в Иране и Монголии (Nicholas *et al.*, 2008). В последние годы во многих странах, включая страны Южной Америки (Nascimento *et al.*, 1986) и Австралии (Cottew 1971), из материала овец и коз, пораженных маститом и артритом, были выделены также *M. capricolum* подвид *capricolum* (Mcc) и *M. mycoides* подвид *capri* (ранее *M. mycoides* подвид *mycoides* LC [LC = крупные колонии]).

Клинические признаки инфекционных заболеваний, вызываемых Mcc, Mmc и Mp, имеют достаточную степень сходства, чтобы считать их неотличимыми от контагиозной агалактии, вызываемой Ma. Кроме того, у коз возбудителем артрита и мастита, очень схожих по признакам с теми, которые вызываются Ma, Mmc и Mcc, является *M. putrefaciens* (Mp) (Rodríguez *et al.*, 1994).

Рабочая группа по контагиозной агалактии, действовавшая в рамках Мероприятия 826 ЕС COST¹, посвященного микоплазмозам жвачных животных, по результатам встречи в Тулузе (Франция), состоявшейся в 1999 году, пришла к выводу, что все четыре упомянутых вида микоплазмы следует рассматривать в качестве возбудителей контагиозной агалактии. Во Франции на долю *Mmc*, *Mcc* и *Mr* приходится свыше 80% случаев выделения микоплазмы из материала коз, в то время как *Ma* обнаруживается менее чем в 2% случаев. *Ma* и *Mcc* были выделены из материала мелких диких жвачных животных, таких, как альпийский козел и тур, обитающих в Пиренеях и Альпах (Chazel *et al.*, 2010; Verbsick *et al.*, 2008). Есть единичные сообщения об обнаружении *Ma* у клинически здорового домашнего скота (Chazel *et al.*, 2010).

С клинической точки зрения, признаками заболевания, вызываемого *Ma*, являются повышенная температура, отсутствие аппетита и нестабильное продуцирование молока у лактирующих овец с уменьшением и последующим прекращением выработки молока (часто в течение 2–3 дней) в результате развития интерстициального мастита (Bergonier *et al.*, 1997). Хромата и кератоконъюнктивит поражают примерно 5–10% инфицированных животных. Для острой формы заболевания характерна лихорадка, которая может сопровождаться признаками поражения нервной системы, но указанные признаки редко наблюдаются при более распространенных подострой и хронической формах заболевания. У беременных животных возможен аборт. *Ma* иногда обнаруживают в поражениях легочных тканей (Logia *et al.*, 1999), но пневмония развивается не всегда. Обычно наблюдается бактериемия (в частности, в случаях, когда возбудителем заболевания является *Mmc* или *Mcc*), которая может быть причиной обнаружения возбудителя в тканях, где он присутствует лишь временно.

Мастит, артрит, плеврит, пневмония и кератоконъюнктивит могут развиваться в результате воздействия *Mmc* – одного из видов микоплазмы жвачных животных, имеющих наиболее широкое географическое распространение: *Mmc* есть на всех континентах, где содержат мелких жвачных животных и где когда-либо наблюдались случаи контагиозной агалактии и плевропневмонии коз (DaMassa *et al.*, 1983; Nicholas, 2002). Однако отсутствие во многих странах средств диагностики заболеваний, вызываемых микоплазмой, означает, что показатели, вероятно, занижены. *Mmc* поражает, главным образом, коз, но может в единичных случаях обнаруживаться у овец с заболеваниями репродуктивной системы и у крупного рогатого скота, пораженного артритом или респираторными заболеваниями. Случаи, как правило, возникают спорадически, однако заболевание может персистировать и медленно распространяться среди стада. После родов вероятность распространения инфекции у молочных животных возрастает, и заражаются козлята, получающие инфицированное молозиво и молоко. Возникающая в результате септицемия, сопровождающаяся артритом и пневмонией, является причиной высокой смертности среди козлят (Bergonier *et al.*, 1997; DaMassa *et al.*, 1983).

Mcc – широко распространенный и высокопатогенный микроорганизм. Это справедливо, в частности, в отношении Северной Африки. Но частота обнаружения низкая (Bergonier *et al.*, 1997). Козы поражаются чаще, чем овцы, и после появления клинических признаков: лихорадки, септицемии, мастита и тяжелого артрита может быстро наступить гибель животного (Bergonier *et al.*, 1997; Bolske *et al.*, 1988). При вскрытии может обнаружиться пневмония. Тяжелые поражения суставов, наблюдаемые при экспериментальном заражении рассматриваемым микроорганизмом, сопровождаются сильным подкожным околоуставным отеком, охватывающим ткани на некотором расстоянии от сустава (Bolske *et al.*, 1988).

Mr часто встречается на западе Франции в стадах молочных коз, где данный микроорганизм можно выделить из материала животных, как имеющих, так и не имеющих клинических признаков болезни (Mercier *et al.*, 2001). С этим возбудителем связывают также зарегистрированную в Калифорнии (США) масштабную вспышку мастита и агалактии, приведшую к развитию у коз тяжелой формы артрита, сопровождающейся абортами и гибелью животных без предварительного развития лихорадки (Bergonier *et al.*, 1997). В ходе вспышки полиартрита среди козлят в Испании у заболевших животных выявляли, преимущественно, *Mr* (Rodriguez *et al.*, 1994).

Антитела к *Mmc* и *Mcc* (но не к *Ma*) были найдены у южноамериканских верблюдовых, включая лам, альпак и викуний, но соответствующие микоплазмы до настоящего времени изолированы не были (Nicholas, 1998). Указанные верблюдовые подвержены ряду заболеваний, имеющих признаки, сходные с поражением микоплазмой, включая полиартрит и пневмонию, поэтому существует высокая вероятность обнаружения в будущем микроорганизмов рода микоплазма, включая *Mmc* и *Mcc*, в материале, взятом у данных животных.

В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Таблица 1: Существующие методы диагностики контактной агалактии и их назначение

Метод	Назначение					
	Отсутствие вируса в популяции	Отсутствие вируса у отдельного животного	Эффективность программ по борьбе с заболеванием	Подтверждение клинических случаев	Распространенность инфекции (эпиднадзор)	Иммунный статус отдельного животного или популяции (после вакцинации)
Идентификация возбудителя²						

1 Европейское сотрудничество в сфере научных и технических исследований.

2 Рекомендуется применение комбинации различных методов идентификации возбудителя для исследования одной и той же клинической пробы.

Культивирование и идентификация возбудителя	++	+++	+++	+++	-	-
ПЦР	++	+++	-	+++	++	-
Выявление иммунного ответа						
РСК	+++*	+	+++	+++*	+++*	+++*
ИФА	+++**	+	+++	+++**	+++**	+++**
Иммуноблоттинг	+	++	+	++	+	++

Условные обозначения: +++ = рекомендуемый метод; ++ = пригодный метод; + = возможно использование в некоторых случаях, но затраты, надежность или иные факторы существенно ограничивают его применение; – = неприменим для данной цели. Несмотря на то, что не все методы, перечисленные в категориях +++ и ++, прошли официальную валидацию, установившаяся практика их использования, а также тот факт, что они широко применяются, не давая при этом сомнительных результатов, определяют их приемлемость.

*только для *Msc* и *Mmc*; **только для *Ma*.

РСК = реакция связывания комплемента; ИФА = иммуноферментный анализ; ПЦР = полимеразная цепная реакция.

1. Идентификация возбудителя

1.1. Выбор образцов

Рекомендуемые образцы материала, взятого у живых животных, включают: мазки из носа и назальный секрет; молоко самок, страдающих маститом или клинически здоровых самок в случае высокого уровня смертности/ заболеваемости среди детенышей; синовиальная жидкость в случаях артрита; конъюнктивальные мазки в случаях поражения глаз; а также образцы крови пораженных и здоровых животных для исследования на наличие антител (Nicholas & Baker, 1998). Взятие образцов из молочных цистерн является удобным способом мониторинга стад и отар на наличие болезнетворной микоплазмы. Специфический гнилостный запах, исходящий от молока, часто служит первым признаком присутствия в стаде *Mr*. Ушные каналы также являются источником патогенной микоплазмы, хотя на практике непатогенная микоплазма, также присутствующая в ушных каналах, может затруднить подтверждение диагноза (Nicholas & Baker, 1998). Микоплазмы могут быть выделены из крови в период острой стадии заболевания, когда развивается микоплазмия. Образцы материала, взятого у погибших животных, должны включать: вымя и связанные с ним лимфатические узлы, синовиальную жидкость, легочную ткань (на границе между здоровой и пораженной тканью) и плевральную/ перикардиальную жидкость. Образцы необходимо быстро доставить в диагностическую лабораторию во влажном и охлажденном состоянии. Все четыре вида микоплазмы, вызывающие заболевание, сравнительно легко поддаются изоляции из внутренних органов, суставов и молока и хорошо растут на большинстве сред, предназначенных для выращивания микоплазмы, формируя колонии от среднего до крупного размера в течении 3-4-дней.

1.2. Изоляция микоплазмы

Обычные методы, используемые для изоляции микоплазмы, применимы ко всем четырем возбудителям заболевания (Nicholas & Baker, 1998). Согласно имеющимся данным, патогенные микоплазмы растут на многих средах. Повышенные темпы роста *Ma* наблюдались в случае сред, содержащих органические кислоты, например, пируваты и изопропанол (Khan *et al.*, 2004). Состав и способ приготовления среды PRM (Khan *et al.*, 2004):

Термоинактивированная свиная сыворотка (100 мл/л), специальный пептон (20 г/л), экстракт дрожжей (5 г/л), глицерин (5 г/л), хлорид натрия (5 г/л), HEPES (9 г/л), экстракт свежих дрожжей (100 мл/л), пируват натрия (5 г/л), 12, 5 мл 0,2%-го фенолового красного, и ампициллин (200 000 МЕ/мл). Доводят до 1 литра дистиллированной водой и стерилизуют фильтрацией. Доводят pH бульонной среды до 7,6. Готовят твердую среду путем добавления 10 г агара LabM № 1 (компания Lab M, г. Бери, Великобритания) или агара аналогичного качества, и помещают в стерильные чашки Петри.

Необходимым компонентом транспортной среды, позволяющим снизить уровень загрязнения клинических образцов, может быть ацетат таллия (250 мг/л), который обладает токсическим и ингибирующим действием в отношении некоторых видов микоплазмы, но не тех, которые вызывают контагиозную агалактию. Однако его не используют для культивирования микоплазмы *in vitro*. Приемлемой альтернативой ацетату таллия может служить сульфат колистина (37,5 мг/л).

1.2.1. Протокол исследования

- Готовят десятикратные разведения (10^1 – 10^6) жидких образцов (молоко, синовиальная жидкость, конъюнктивальный или ушной секрет) или гомогената ткани в соответствующей бульонной питательной среде.

- ii) Наносят несколько капель каждого образца на среду с агаром и помещают 10%-й (объем/объем) инокулят в бульонную среду.
- iii) Наносят мазки непосредственно на среду с агаром.
- iv) Инкубируют бульонную среду с инокулятом (оптимально – при легком встряхивании) и среду с агаром при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% углекислого газа.
- v) Ежедневно проверяют емкости с бульонной средой на наличие признаков роста микоплазмы (легкое помутнение или опалесценция) или признаков изменения значения pH (изменение цвета), и проверяют среду с агаром под микроскопом при 35-кратном увеличении на предмет наличия типичных колоний микоплазмы, имеющих вид яичницы-глазуньи.
- vi) Если после 7 дней рост микоплазмы не зафиксирован, 10%-й (объем/объем) инокулят в бульонной среде переносят в свежую бульонную среду и наносят около 50 мкл полученного препарата на среду с агаром.
- vii) Повторяют этапы до v. Если после 21-дневного инкубирования признаки наличия микоплазмы отсутствуют, результат считается отрицательным.
- viii) Если появляются признаки бактериального загрязнения (имеющие вид избыточной мутности), проводят стерилизацию фильтрованием, пропуская 1 мл загрязненного препарата, содержащего бульонную среду, через фильтр с ячейками размером 0,45 мкм в свежую бульонную среду.

Клинические образцы часто содержат более чем один вид микоплазмы, поэтому перед тем, как приступить к биохимической и серологической идентификации, в частности, с помощью реакции подавления роста и реакции ингибирования пленкообразования (GIT и FIT, соответственно), необходимой процедурой часто считается очистка колоний клонированием. Однако клонирование это длительный процесс, занимающий, как минимум, 2 недели. Реакция иммунофлуоресценции (Bradbury, 1998), дот-блоттинг (Poumarat, 1998) и, в последнее время, полимеразная цепная реакция (ПЦР) (см. Раздел В.1.5) не требуют клонирования, поскольку указанные методы позволяют распознавать патогенные микоплазмы в смешанных культурах, экономя существенное количество времени.

1.3. Биохимические исследования

Первый тест, которому подвергают клонированные изоляты, это определение чувствительности к дигитонину, позволяющее отделить микоплазмы от ахолоплазм. Последние являются повсеместно распространенными загрязнителями, способными заглушить рост исследуемой микоплазмы. Тестами, наиболее часто используемыми для дифференциации четырех видов микоплазмы, являются культивирование в жидкой среде, содержащей глюкозу (1%), аргинин (0.2%) и дифосфат фенолфталеина (0.01%), или на твердой среде, содержащей лошадиную сыворотку или яичный желток, с целью демонстрации пленки или пятен, а также на казеиновом агаре или коагулированной сыворотке для пробы на протеолиз (Poveda, 1998). Однако все чаще отмечается изменчивость этих биохимических характеристик в отношении конкретных видов микоплазмы и их низкая диагностическая значимость. Наиболее существенной биохимической характеристикой, позволяющей дифференцировать *Mp* и другие виды микоплазмы, является гнилостный запах культур в бульонной среде, который она вызывает. Другие признаки, которые могут быть полезны, включают образование пленки и пятен на поверхности бульонной и твердой сред, вызываемое *Ma* и, в меньшей степени, *Mp*; и протеолитическую активность *Msc* и *MmmLC* в отношении казеина и коагулированной сыворотки.

Сообщается о занимающем небольшое количество времени и удобном для проведения биохимическом тесте, основанном на С8-эстеразной активности *Ma* (Khan *et al.*, 2001). Микоплазма формирует колонии красного цвета на агаровой среде в течение 1 часа после добавления хромогенного субстрата, SLPA-октаноата (недавно синтезированного сложного эфира, состоящего из жирной кислоты с длиной цепи из 8 атомов углерода (C8) и фенольного хромофора). Аналогичную активность демонстрирует также *M. bovis*, хотя данный вид микоплазмы редко встречается у мелких жвачных. При необходимости, чтобы быстро дифференцировать *Ma* и *M. Bovis*, можно использовать метод ПЦР (см. Раздел В.1.5).

1.4. Серологическая идентификация

Идентификация изолятов с использованием специфической антисыворотки обычно производится при помощи GIT, FIT (Poveda & Nicholas, 1998) или реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) (Bradbury, 1998). Дот-блоттинг, проводимый с использованием микротитрационных планшетов, имеет ряд преимуществ перед другими серологическими методами, в том числе, скорость и более высокую производительность (Poumarat, 1998), но данный метод требует вынесения субъективного суждения в отношении интенсивности окрашивания. В случае *Ma* более надежный результат часто дает ингибирование пленкообразования, поскольку подавление роста наблюдается не у всех изолятов; указанный метод может использоваться также для целей серологической диагностики. Формирование пленки микоплазмой может быть усилено путем введения 10% суспензии яичного желтка в твердую среду.

1.4.1. Протокол исследования

- i) Наносят как минимум два разведения 48-часовых клонированных культур в бульонной среде (10^{-1} и 10^{-2}) на предварительно высушенную агаровую среду методом «стекающей капли» (вводят 50 мкл культур, давая жидкости стечь по наклонной пластинке (Poveda & Nicholas, 1998)). Удаляют избыток жидкости пипеткой.

- ii) Дают пластинкам высохнуть. Возможно нанесение на каждую пластинку диаметром 90 мм двух или трех капель на достаточном расстоянии друг от друга.
- iii) На культуру накладывают предварительно высушенные диски из фильтровальной бумаги, содержащие 30 мкл специфической антисыворотки; диски должны находиться на расстоянии не менее 30 мм друг от друга.
- iv) Инкубируют пластинки так же, как в случае культивирования микоплазмы, и ежедневно проверяют невооруженным глазом на светлом фоне.

1.4.2. Интерпретация результатов

Зона ингибирования величиной более 2 мм, измеренная от бумажного диска до границы роста микоплазмы, считается значимой. В случае слабой антисыворотки или смешанных культур может наблюдаться частичное ингибирование. Более сильная реакция может быть получена при добавлении примерно 60 мкл антисыворотки в лунки диаметром 6 мм, сделанные в агаре сверлом для пробок или сходным приспособлением (Poveda & Nicholas, 1998).

В ходе исследования методом РНИФ специфическая антисыворотка наносится на колонии, выращенные на твердой среде. После промывания гомологичная антисыворотка остается на месте, и ее наличие подтверждается путем добавления антиглобулина, конъюгированного с флуоресцеином, последующего промывания и изучения колоний под эпифлуоресцентным микроскопом (Bradbury, 1998). Контроль включает известные положительные и известные отрицательные микроорганизмы и отрицательную контрольную сыворотку. Однако, как и в случае иммуноблоттинга, требуется вынесение субъективного суждения для оценки интенсивности окрашивания.

Антисыворотки для рассматриваемых серологических методов исследования традиционно готовят с учетом типовых штаммов различных видов *Mycoplasma*. При помощи таких антисывороток было без труда определено большинство полевых изолятов. Однако некоторые другие штаммы продемонстрировали слабую реакцию с указанными антисыворотками, но при этом хорошо реагировали с антисыворотками к другим репрезентативным штаммам видов *Mycoplasma*. В отношении *Mp* о внутривидовой изменчивости антигенного состава не сообщалось, но в случае штаммов *Ma* и *Msc* упомянутая изменчивость в некоторой степени имеет место. Следовательно, для идентификации всех штаммов видов *Mycoplasma* диагностическим лабораториям может понадобиться несколько антисывороток.

1.5. Методы распознавания нуклеиновых кислот

1.5.1. Методы на основе полимеразной цепной реакции

Анализ на основе ПЦР используется в рутинной практике многих лабораторий и является высокочувствительным методом. Тестирование клинических образцов с использованием ПЦР представляет собой систему быстрого раннего обнаружения: при получении положительных результатов методом ПЦР иницируется дальнейшее всестороннее исследование. Однако отрицательный результат не следует считать окончательным. Разработано несколько методик анализа при помощи ПЦР, предназначенных специально для определения *Ma*. Они демонстрируют сходные уровни чувствительности, хотя основаны на определении различных нуклеотидных последовательностей генов (Dedieu *et al.*, 1995; Subrahmaniam *et al.*, 1998; Tola *et al.*, 1997a). Данные методики могут применяться для прямого анализа назальных и конъюнктивальных мазков, образцов синовиальной жидкости и тканей. Они использовались для тестирования образцов молока и, согласно отчетам, имеют более высокую чувствительность, чем культивирование (Tola *et al.*, 1997a), хотя иногда на результаты теста могут влиять неустановленные ингибиторы. Кроме того, ПЦР может быть использована (с получением более надежных результатов) для анализа культивируемой микоплазмы. 24-часовое обогащение микоплазмы в соответствующей среде в значительной степени содействует выявлению целевых нуклеиновых кислот методом ПЦР даже при наличии бактериального загрязнения (Nicholas, 2002). Недавно описанная разновидность метода ПЦР, получившая название «электрофорез в градиенте денатурирующего геля» (DGGE), использующая праймеры, специфические к микоплазмам, позволяет идентифицировать большинство видов микоплазмы, поражающих мелких жвачных животных, включая всех возбудителей контагиозной агалактии, по характеру их миграции (McAuliffe *et al.*, 2005). Положительный результат анализа методом ПЦР, в особенности на территории, ранее считавшейся свободной от контагиозной агалактии, должен быть подтвержден посредством выделения и идентификации микоплазмы с применением стандартного протокола.

Сообщается об отдельных методиках на основе ПЦР для определения *Mmc* (Bashiruddin, 1998), *Mcc* (Monnerat *et al.*, 1999) и *Mp* (Peugaud *et al.*, 2003; Nicholas *et al.*, 2008), соответственно. Кроме того, описан мультиплексный тест, который позволяет одновременно распознать *Ma*, *Msc* и *Mmc* (Greco *et al.*, 2001).

1.5.2. ПЦР в реальном времени

Сообщается о нескольких экспресс-тестах на основе ПЦР в реальном времени, предназначенных для выявления *Ma*, преимуществом которых является скорость, высокая чувствительность и особенности обработки тестируемых образцов (Lorusso *et al.*, 2007). Недавно был описан мультиплексный тест на основе ПЦР в реальном времени, способный одновременно распознавать все четыре вида микоплазмы (Becker *et al.*, 2012).

1.5.3. Микроматричный анализ

Для обнаружения микоплазмы применяется также микроматричный анализ. Используя зонды, полученные из генов 23S rPHK и целевых участков гена *tuf*, Шни с соавторами (Schnee *et al.* (2012)) описали идентификацию 37 видов микоплазмы, включая все четыре патогена, вызывающих контагиозную агалактию. На момент публикации наблюдалось определенное перекрестное реагирование между *Ma* и близкородственным патогеном крупного рогатого скота *M. bovis*. Преимуществами данного метода в сравнении с ПЦР включают простоту осуществления теста, его высокую информативность и экономичность.

1.5.4. Протокол исследования

Следующие праймеры, полученные на основании гена *uvrC*, продемонстрировали специфичность к *Ma* (Subrahmaniam *et al.*, 1998). Методы на основе ПЦР подлежат оптимизации в каждой лаборатории. В каждом тесте должен присутствовать положительный и отрицательный контроль.

MAGAUVRC1-L СТС-AAA-AAT-ACA-TCA-ACA-AGC

MAGAUVRC1-R СТТ-CAA-CTG-ATG-CAT-CAT-AA

- i) Получают образцы ДНК из изолятов *Mycoplasma* или клинического материала, используя надлежащий метод (Bolske *et al.*, 1988).
- ii) Проводят исследование методом ПЦР в 50 мкл реакционных смесей, содержащих: 1 мкл исследуемой ДНК; 20 пмоль каждого праймера (см. выше); 1 мМ каждого дНТФ; 10 мМ Tris/HCl с pH = 8,3; 1,5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl и 1,25 мМ U *Taq* ДНК-полимеразы.
- iii) Подвергают смесь 35 циклам амплификации в термоциклере со следующими параметрами: 30 секунд при 94°C, 30 секунд при 50°C (температура отжига) и 1 минута при 72°C.
- iv) Анализируют продукты ПЦР методом электрофореза в 0,7% агарозном геле при 110 V в течение 2 часов и визуализируют результаты окрашиванием бромидом этидия. Фрагмент длиной 1,7 тыс.п.о. указывает на присутствие *Ma*.

2. Серологические исследования

2.1. Иммуноферментный анализ

Согласно сообщениям, для целей определения антител к *M. Agalactiae*, разновидности ИФА, использующие антигены, подвергнутые воздействию ультразвука или обработанные Tween-20, обладают большей чувствительностью, чем реакция связывания комплемента (Bergonier *et al.*, 1997). Проблемы неспецифичности были решены путем использования в ИФА конъюгатов моноклональных антител и протеина (Lambert *et al.*, 1998). Применение указанных конъюгатов позволяет тестировать сыворотки широкого спектра видов млекопитающих, включая верблюдовых.

В коммерческой продаже представлено два набора ИФА для определения *Ma*: в одном используется гибридный белок, в другом – целые клетки в качестве антигена-мишени. Чувствительность и специфичность двух указанных тестов, согласно оценкам, составляют 54% и 100% для гибридного белка и 84% и 96% (у овец) или 99% (у коз) для цельноклеточного антигена (Poumarat *et al.*, 2012). Кроме того, по всей видимости, существует разница в способности указанных тестов одинаковым образом определять ответные реакции на различные штаммы. Выбор теста зависит от целей и задач планируемого исследования, то есть, тест с меньшей чувствительностью будет достаточным для исследования распространенности заболевания, которое носит эндемический характер, тогда как для выявления заболевания в регионе, считающемся свободным от него, потребуется более высокочувствительный тест.

Для трех других возбудителей контагиозной агалактии ИФА не является широкодоступным методом.

2.2. Реакция фиксации комплемента

Стандартная реакция фиксации комплемента (РСК), используемая для обнаружения *M. Agalactiae*, была применена также в отношении других видов микоплазмы, вызывающих контагиозную агалактию (Bergonier *et al.*, 1997). Антигены готовят из отмытых микроорганизмов, стандартизованных по степени прозрачности и лизированных либо при помощи ультразвука, либо посредством обработки лаурилсульфатом натрия с последующим диализом. Сыворотки инактивируют при 60°C в течение 1 часа; тест проводят в микротитрационных планшетах с фиксацией на протяжении ночи в холоде или при 37°C в течение 3 часов. Добавляют гемолитическую систему и считывают результаты теста после того, как антигенный контроль покажет полное завершение лизиса. Положительным результатом считается полная фиксация при разведении сыворотки 1/40 или выше для следующих видов микоплазмы: *M. agalactiae*, *Mcc*, и *Mmc*. РСК рассматривается в качестве теста для исследования стада, и из каждого стада исследуют не менее десяти образцов сыворотки, взятых, предпочтительно, от животных с острой формой заболевания и выздоравливающих животных.

Некоторые образцы сыворотки, взятые от животных из здоровых стад или отар, демонстрируют наличие реакции в ходе теста на основе РСК, использующего антигена *M. Agalactiae*, при разведениях сыворотки до 1/20, но редко дают реакцию с двумя другими антигенами. Однако если стадо или отара инфицированы *M. agalactiae*, сыворотки, дающие гомологичную реакцию при разведении 1/80, могут демонстрировать перекрестную реакцию при разведениях вплоть до 1/40 (положительное пороговое значение) с двумя другими антигенами. При низком качестве тест-сывороток осуществление РСК часто представляется затруднительным; по возможности, предпочтение следует отдавать методу иммуноферментного анализа (ИФА).

2.3. Иммуноблот-анализ

Описано применение иммуноблот-анализа для определения *Ma*. Данный метод рассматривался в качестве подтверждающего исследования во время вспышек заболевания в Италии (Nicholas, 1998; Tola *et al.*, 1997b). При исследовании сывороток, содержащих антитела к *Ma*, наблюдались четкие и яркие полосы, соответствующие молекулярной массе примерно в 80 и 55 кДа, в то время как образцы сыворотки, взятые от животных из здорового стада, не давали никаких полос или демонстрировали различные полосы очень слабой интенсивности. Разведение сыворотки в соотношении 1/50 облегчает дифференциацию положительных и отрицательных сывороток (Nicholas, 1998). С другой стороны, Roumatat и другие авторы (2012), использовавшие разведение сыворотки 1/5, считали сыворотку, взятую у животных из стада/ отары во Франции, положительной в отношении *Ma*, если при ее анализе получали 4 полосы, соответствующие 80, 48, 40 и 30 кДа, что позволяет предположить существование определенных географических различий в гуморальном ответе.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

Вакцины для предотвращения контагиозной агалактии, вызываемой *M. agalactiae*, широко применяются в странах Средиземноморского региона Европы и в Западной Азии. Единая вакцина, принятая повсеместно, отсутствует, равно как и стандартные методы изготовления и тестирования вакцин.

1. Вакцины против *Mycoplasma agalactiae*

1.1. Инактивированные вакцины против *Mycoplasma agalactiae*

В Европе, где не применяются живые вакцины против *M. agalactiae*, основное внимание сосредоточено на использовании убитых микроорганизмов, в большинстве случаев с использованием формалина и адьюванта, например, гидроксида алюминия в масляной эмульсии. Титры препарата, получаемого из лабораторных штаммов, до инаktivации очень высоки (10^8 – 10^{10} колониеобразующих единиц на миллилитр). Некоторые продукты имеются в коммерческой продаже, включая трехвалентную вакцину, содержащую *M. agalactiae*, *Mcc* и *Mms*, но данные об их эффективности немногочисленны. Вакцина, инактивированная формалином в масляной эмульсии, продемонстрировала иммуногенные и защитные свойства в ходе небольшого исследования с участием лактирующих овец, и способствовала предотвращению передачи *M. agalactiae* между подопытными овцами (Gresco *et al.*, 2002).

Возможно, что в некоторых случаях очевидная недостаточность защиты, предоставляемой вакцинами, может являться результатом заражения животных другим видом микоплазмы, способным вызывать контагиозную агалактию (Gil *et al.*, 1999). По результатам предварительных исследований практическую значимость показала поливалентная вакцина, инактивированная формалином и содержащая сапонин и гидроксид алюминия в качестве адьювантов. Данная вакцина включает все четыре патогенных вида микоплазмы (Ramirez *et al.*, 2001).

Согласно последним данным, вакцины, инактивированные фенолом или сапонином, обеспечивали более высокую степень защиты от инфекции в ходе экспериментального заражения по сравнению с вакцинами, инактивированными при помощи нагревания или обработки формалином или гипохлоритом натрия (Tola *et al.*, 1999).

1.2. Живые аттенуированные вакцины против *Mycoplasma agalactiae*

Живые аттенуированные вакцины против *M. agalactiae* в течение многих лет применяются в Турции и, согласно сообщениям, обеспечивают более высокую степень защиты овец и ягнят, чем инактивированные вакцины (Nicholas, 2002). Однако они могут являться источником транзитной инфекции, сопровождающейся выделением микоплазмы. Живые вакцины нельзя применять для вакцинирования лактирующих животных, и вакцинирование живыми вакцинами должно являться частью регионального плана, в рамках которого все отары, имеющие высокую вероятность контакта друг с другом, вакцинируются в одно и то же время.

2. Вакцины против *Mycoplasma mycoides*, подвид *capri*

Существует ограниченный объем недавно опубликованных данных, касающихся доступности вакцин против *Mms*, хотя полагают, что инактивированные вакцины широко применяются во многих средиземноморских государствах

и в Азии, что позволяет говорить об их локализованном производстве и использовании (Bergonier *et al.*, 1997). Сообщается о применении в Индии вакцин, содержащих сапонин, которые вызывают сильную ответную реакцию в виде образования антител и обеспечивают определенную степень защиты (Sunder *et al.*, 2002).

3. *Mycoplasma capricolum*, подвид *capricolum*, и *M. putrefaciens*

Хотя инфицирование *Mcc* и *M. putrefaciens* может приводить к тяжелым последствиям, распространенность этих инфекций сравнительно невелика и, как можно ожидать, работа по получению вакцин для профилактики заболеваний, вызываемых указанными возбудителями, носила крайне ограниченный характер или не проводилась вообще.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- BASHIRUDDIN J. (1998). PCR and RFLP methods for the specific detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. In: *Mycoplasma Protocols*, Miles R.J. & Nicholas R.A.J., eds. Humana Press, Totowa, USA, pp 167–178.
- BECKER C.A.M., RAMOS F., SELLAL E., MOINE S., POUMARAT F. & TARDY F. (2012). Development of a multiplex real-time PCR for contagious agalactia diagnosis in small ruminants. *J. Microbiol. Methods*, doi: 10.1016/j.mimet.2012.04.020
- BERGONIER D., BERTHOLET X. & POUMARAT F. (1997). Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **16**, 848–873.
- BOLSKE G., MSAMI H., HUMLESLO N.E., ERNO H. & JOHNSON L. (1988). *Mycoplasma capricolum* in an outbreak of polyarthritis and pneumonia in goats. *Acta Vet. Scand.*, **29**, 331–338.
- BRADBURY J.M. (1998). Identification of mycoplasmas by immunofluorescence. In: *Mycoplasma Protocols*, Miles R.J. & Nicholas R.A.J., eds. Humana Press, Totowa, USA, 119–125.
- BUNOVOGLIA D., GRECO G., CORRENTE M., GRECO M.F., D'ABRAMO M., LATRONICA F., FASANELLA A & DECARO N. (2010). Long-term immunogenicity and protection against *Mycoplasma agalactiae* induced by an oil adjuvant vaccine in sheep. *Res. Vet. Sci.*, **88**, 16–19.
- CHAZEL M., TARDY F., LE GRAND D., CALAVAS D. & POUMARAT F. (2010). Mycoplasmoses of ruminants in France: recent data from the national surveillance network. *BMC Vet. Res.*, **6**, 32.
- COTTEW, G. S. (1971). Characterisation of mycoplasmas isolated from sheep with pneumonia. *Aust. Vet. J.* **47**, 591-596.
- DAMASSA A.J., BROOKS D.L. & ADLER H.E. (1983). Caprine mycoplasmosis: widespread infection in goats with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large-colony type). *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 322–325.
- DEDIEU L., MADY V. & LEFEVRE P. C. (1995). Development of two PCRs for the identification of mycoplasmas causing contagious agalactia. *FEMS Microbiol. Lett.*, **129**, 243–250.
- GRECO G., CORRENTE M., BUNOVOGLIA D., ALIBERTI A. & FASANELLA A. (2002). Inactivated vaccine induces protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. *Microbiologica*, **25**, 17–20.
- GRECO G., CORRENTE M., MARTELLA V., PRATELLI A. & BUNOVOGLIA D. (2001). A multiplex PCR for the diagnosis of contagious agalactia of sheep and goats. *Mol. Cell. Probes*, **15**, 21–25.
- GIL M.C., HERMOSA DE MENDOZA M., REY J., ALONSO J.M. POVEDA J.B. & HERMOSA DE MENDOZA J. (1999). Aetiology of caprine contagious agalactia syndrome in Extremadura, Spain. *Vet. Rec.*, **144**, 24–25.
- KHAN L., LORIA G., ABU-AMERO K., NICHOLAS R.A.J., HALABLAB M. & MILES R.J. (2001). Distinctive biochemical characteristics of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*. In: *Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*, Vol. 5, Poveda J.B., Fernandez A., Frey J. & Johansson K.- E., eds. European Commission, Brussels, Belgium, 60–63.
- KHAN L.A., LORIA G.R., RAMIREZ A.S., NICHOLAS R.A.J., MILES R.J. & FIELDER M.D. (2004). Biochemical characterisation of some non-fermenting, non-arginine hydrolysing mycoplasmas of ruminants. *Vet. Microbiol.*, **109**, 129–134.
- LORIA G.R., SAMMARTINO C., NICHOLAS R.A.J. & AYLING R.D. (1999). *In vitro* susceptibility of field isolates of *Mycoplasma agalactiae* to oxytetracycline, tylosin, enrofloxacin, spiramycin and lincomycin-spectinomycin. *Res. Vet. Sci.*, **75**, 3–7.
- LORUSSO A., DECARO N., GRECO G., FASANELLA A. & BUNOVOGLIA D. (2007). A real-time PCR assay for detection and quantification of *Mycoplasma agalactiae*. *J. Appl. Microbiol.*, **103**, 918–923.

- MERCIER P., LENFANT D., POUMARAT F. & PERRIN G. (2001). Prevalence of mycoplasma infection within French milking caprine herds. *In: Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*, Vol. 5, Poveda J.B., Fernandez A., Frey J. & Johansson K.-E., eds. European Commission, Brussels, Belgium, 130–133.
- McAULIFFE L., ELLIS R., LAWES J., AYLING R.D. & NICHOLAS R.A.J (2005). 16S rDNA and DGGE: a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *J. Med. Microbiol.*, **54**, 1–9.
- MONNERAT M.P., THIAUCOURT F., POVEDA J.B., DE LA FE C., NICOLET J. & FREY J. (1999). Genetic and serological analysis of lipoprotein lppA in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **6**, 224–230.
- NASCIMENTO E.R., NASCIMENTO M.G.F., FREUNDT E.A. & ANDERSEN H. (1986). Isolation of *Mycoplasma mycoides* from outbreaks of caprine mycoplasmosis in Brazil. *Brit. Vet. J.*, **142**, 246–257
- NICHOLAS R.A.J. (1998). Surveillance for contagious agalactia in Great Britain. *In: Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*, Vol. 2, Leori G., Santini F., Scanziani E. & Frey J., eds. European Commission, Brussels, Belgium, 95–97.
- NICHOLAS R.A.J. (2002). Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. *Small Rumin. Res.*, **45**, 145–149.
- NICHOLAS R., AYLING R. & McAULIFFE L. (2008). Contagious agalactia. *In: Mycoplasma Diseases of Ruminants*. CABI, Wallingford, UK, pp 98–113
- NICHOLAS R.A.J. & BAKER S.E. (1998). Recovery of mycoplasmas from animals. *In: Mycoplasma Protocols*, Miles R.J. & Nicholas R.A.J. eds. Humana Press, Totowa, USA, 37–44.
- PATEL H., MACKINTOSH D., AYLING R.D., NICHOLAS R.A.J. & FIELDER M.D. (2008). A novel growth médium devoid of ruminant peptone for high yield growth of *Mycoplasma ovipneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, **127**, 309–314.
- PEYRAUD A., WOUBIT S., POVEDA J.B., DE LA FE C., MERCIER P. & THIAUCOURT F. (2003). A specific PCR for the detection of *Mycoplasma putrefaciens*, one of the agents of the contagious agalactia syndrome of goats. *Mol. Cell. Probes*, **17**, 289–294.
- POUMARAT F. (1998). Identification of mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF Dot). *In: Mycoplasma Protocols*, Miles R.J. & Nicholas R.A.J., eds. Humana Press, Totowa, USA, 113–118.
- POUMARAT F., LE GRAND D., GAURIVAUD P., GAY E., CHAZEL M. & BERGONIER F. (2012). Comparative assessment of two commonly used commercial ELISAs for the serological diagnosis of contagious agalactia of small ruminants caused by *Mycoplasma agalactiae*. *BMC Vet. Res.*, **8**, 109.
- POVEDA J.B. (1998). Biochemical characteristics in mycoplasma identification. *In: Mycoplasma Protocols*, Miles R.J. & Nicholas R.A.J., eds. Humana Press, Totowa, USA, 69–78.
- POVEDA J.B. & NICHOLAS R.A.J. (1998). Serological identification of mycoplasmas by growth and metabolic inhibition tests. *In: Mycoplasma Protocols*, Miles R.J. & Nicholas R.A.J., eds. Humana Press, Totowa, USA, 105–111.
- RAMIREZ A S., DE LA FE C., ASSUNCAO P., GONZALEZ M. & POVEDA J.B. (2001). Preparation and evaluation of an inactivated polyvalent vaccine against *Mycoplasma* spp on infected goats. *In: Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*, Vol. 5, Poveda J.B., Fernandez A., Frey J. & Johansson K.-E., eds. European Commission, Brussels, Belgium, 154–157.
- RODRIGUEZ J.L., POVEDA J.B., GUTIERREZ C., ACOSTA B. & FERNANDEZ A. (1994). Polyarthritis in kids associated with *Mycoplasma putrefaciens*. *Vet. Rec.*, **135**, 406–407.
- SCHNEE C., SCHULSE S., HOTZEL H., AYLING R.D., NICHOLAS R.A.J., SCHUBERT E, HELLER M., ERICHT R. & SACHSE K. (2012). A novel rapid DNA microarray assay enables identification of 37 mycoplasma species and highlights multiple mycoplasma infections. *PLoS ONE* **7**, e33237 doi: 10.1371/journal.pone.0033237
- SUBRAHAMANIAM S., BERGONIER D., POUMARAT F., CAPUAL S., SCHLATTER Y., NICOLET J. & FREY J. (1998). Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the uvrC gene by PCR. *Mol. Cell. Probes*, **12**, 161–169.

SUNDER J., SRIVASTAVA N.C. & SINGH V.P. (2002) Preliminary trials on development of vaccine against *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* type LC infection in goats. *J. Appl. Anim. Res.*, **21**, 75–80.

TOLA S., ANGIOI A., ROCCHIGIANI A.M., IDINI G., MANUNTA D., GALLERI G. & LEORI G. (1997a). Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, **54**, 17–22.

TOLA S., MANUNTA D., COCCO M., TURRININ F., ROCCHIGIANI A.M., IDINI G., ANGIOI A. & LEORI G. (1997b). Characterisation of membrane surface proteins of *Mycoplasma agalactiae* during natural infection. *FEMS Microbiol. Lett.*, **154**, 355–362.

VERBSICK G., GONZALEZ M., GALIAN J., CUBERO M.J., MARTIN P. & LEON-VIZCAINO L. (2008). Epidemiology of *Mycoplasma agalactiae* infection in free-ranging Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) in Andalusia, southern Spain. *J. Wildlife Dis.*, **44**, 369–380.

*

* *

Примечание: Действует референтная лаборатория МЭБ по контагиозной агалактии (см. Таблицу в части 4 настоящего *Руководства по заболеваниям наземных животных* или веб-сайт МЭБ, где размещена обновленная версия списка: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения дальнейшей информации в отношении методов диагностики, реагентов и вакцин против контагиозной агалактии обращайтесь в справочные лаборатории МЭБ.

