УДК 619:579.887.111:636.5:616-076

О.В. ОБУХОВСЬКА, канд. вет. наук
Б.Т. СТЕГНІЙ, докт. вет. наук, професор, академік НААН
Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків

ДІАГНОСТИКА РЕСПІРАТОРНОГО МІКОПЛАЗМОЗУ ПТИЦІ

Проаналізовано та узагальнено інформацію щодо необхідних діагностичних заходів з виявлення такого небезпечного захворювання, як респіраторний мікоплазмоз птиці.

Контроль епізоотичної ситуації щодо респіраторного мікоплазмозу птиці є важливою проблемою ветеринарного супроводу птахівництва в усіх країнах світу [2, 4, 8, 9]. Складність ефективної профілактики цієї хвороби зумовлена особливостями її перебігу, бо їй притаманна субклінічна форма, або ж вона набуває вигляду асоційованої інфекції (разом із ешерихіозом, сальмонельозом, інфекційним бронхітом) [6, 10, 11]. Останнє й ускладнює проведення діагностичних досліджень.

Найбільш ефективною є схема, що передбачає проведення серологічного скринінгу й аналіз отриманих даних, на основі яких вирішується питання щодо подальших бактеріологічних досліджень. За результатами проведених діагностичних заходів роблять висновки стосовно епізоотичного статусу даної групи птиці, епізоотологічний прогноз розвитку хвороби і, за необхідності, визначається схема лікування або профілактики [5, 7, 13].

Мета роботи – узагальнення інформації з діагностичних заходів, вимог МЕБ і діючого ветеринарного законодавства України щодо респіраторного мікоплазмозу (РМ) птиці.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Діагноз РМ встановлюють на основі аналізу епізоотичних, клінічних, патолого-анатомічних, серологічних та бактеріологічних досліджень (із застосуванням, за необхідності, біопроби).

На РМ хворіють кури, індички, фазани, перепели, куріпки, голуби та павичі. Найсприйнятливішим є молодняк 1,5–2-місячного віку і доросла птиця на початку несучості. Інтенсивному розвитку хвороби сприяє порушення зоотехнічних та санітарно-ветеринарних норм утримання птиці, неповноцінна годівля, імунізація проти респіраторних інфекцій живими вакцинами.

Джерелом інфекції є хвора птиця, птиця-мікоплазмоносій та інкубаційне яйце. Основні шляхи передачі мікоплазм – трансоваріальний (через інфіковане яйце) й аерогенний.

Збудник захворювання *Mycoplasma gallisepticum* належить до класу *Mollicutes* порядку *Mycoplasmatales* родини *Mycoplasmataceae*. Це факультативно-анаеробний мікроорганізм розміром 200–800 нм, що фільтрується крізь бактеріальні фільтри, стійкий до пеніцилінів та ацетату талію; клітину обмежує тришарова цитоплазматична мембрана.

Інкубаційний період при РМ становить 4–20 діб. У хворої птиці спостерігають зниження апетиту, пригнічення, катаральний риніт і кон'юнктивіт. У подальшому з'являються трахеальні хрипи, задишка, кашель. Катаральний риніт переходить у серозно-фібринозний, в окремих особин виявляють синусит; набряки підочних синусів та міжщелепного простору (рис. 1, 2); ознаки запалення суглобів (набряки, кульгавість). Знижуються приріст маси у молодняку і несучість у дорослої птиці.

Рис. 1. Набряки підочних синусів у курки за гострого перебігу респіраторного мікоплазмозу

Рис. 2. Набряки підочних синусів у фазана за гострого перебігу респіраторного мікоплазмозу

© О.В. Обуховська, Б.Т. Стегній, 2012

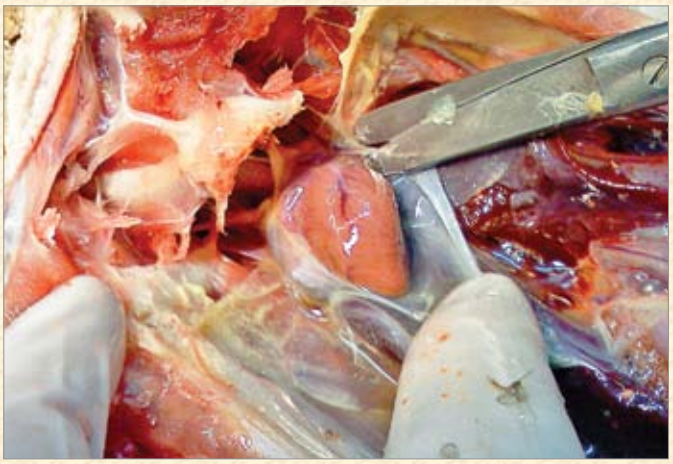


Рис. 3. Серозний перикардит та аеросакуліт у курчати за гострого перебігу респіраторного мікоплазмозу

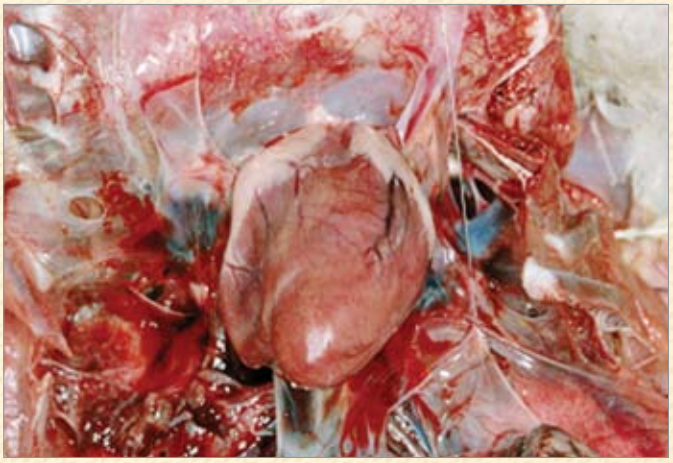


Рис. 4. Геморагічний перикардит та аеросакуліт у курки за гострого перебігу респіраторного мікоплазмозу

В індичок типовою ознакою хвороби є запалення підочних синусів. Крім того, реєструють трахеальні хрипи, задишку та вологий кашель.

РМ зазвичай має перебіг у вигляді змішаної інфекції з колібактеріозом, інфекційним бронхітом або ларинготрахеїтом. Летальність у молодняку становить 20–30 %, у дорослої птиці – 5–10 %. У разі інкубації інфікованого яйця реєструють загибель 20–30 % зародків.

Трупи загиблої птиці, завмерлі курячі ембріони та примусово забиту птицю піддають патолого-анатомічному розтину, який виконують не пізніше як за 2–3 год з моменту загибелі. Особливу увагу приділяють вивченню патолого-анатомічних змін органів респіраторної системи.

Для РМ характерні такі патолого-анатомічні зміни: заповнення порожнин носових та підочних синусів (залежно від стадії хвороби) слизово-серозним, гнійно-фібринозним або казеозним ексудатом, катаральний риніт, синусит та трахеїт. Крім того, реєструють серозне або геморагічне запалення передніх торакальних повітроносних міхурів і перикарда (рис. 3, 4).

У разі ускладнення респіраторного мікоплазмозу колібактеріозом виявляють фібринозне запалення задніх торакальних та очеревинних повітроносних міхурів, фібринозний перикардит, перигепатит, рідко – перитоніт.

При розтині завмерлих курячих ембріонів реєструють петехії, набряки шкірних покривів і хоріон-алантоїсної оболонки, фібринозний артрит, запалення повітроносних міхурів, гепатит. Характерною ознакою є наявність «дзьоба папуги» – деформація дзьоба ембріона, коли його кінчик загинається донизу.

Для бактеріологічного дослідження в лабораторію направляють трупи або хвору птицю (до початку курсу антибіотикотерапії) та ембріони, які загинули на 18–21-шу добу інкубації.

На серологічне дослідження – сироватку крові птиці, відібрану не менш як у 0,25 % досліджуваного поголів'я.

З метою ізоляції *Mycoplasma gallisepticum* роблять посіви з головного мозку, легенів, зскрібків зі слизової трахеї, стінок повітроносних міхурів, при дослідженні курячих ембріонів – з жовткового міхура. У живої птиці – зскрібки/змиви зі слизової хоан, глотки, клоаки.

З патологічного матеріалу виготовляють суспензію 1:10, до якої додають пеніцилін (5 000 ОД/см^3) або ампіцилін (0,5–1,0 мг/см^3) та ацетат талію (до кінцевої концентрації 1:2000). З обробленої суспензії роблять посіви на спеціалізовані живильні середовища (Едварда, Frey, середовище на основі PPLO-бульйону, Bradbury, середовище ННЦ«ІЕКВМ»).

Посіви роблять на рідкі та тверді живильні середовища. З метою виключення супресійної дії супутньої бактеріальної мікрофлори рекомендують також серійні розведення первинних суспензій до 10^{-3} з подальшими висівами з кожного розведення. Посіви інкубують за температури 37,5±0,5 °С упродовж 5–7 діб. Росту мікоплазм сприяють підвищена вологість і наявність CO_2.

Ріст *Mycoplasma gallisepticum* на рідких живильних середовищах характеризується легкою опалесценцією, формуванням незначного осаду та зміною забарвлення середовища з червоного на жовтий. На твердих живильних середовищах збудник формує дрібні росинчасті колонії. За умов застосування лупи або незначного збільшення на

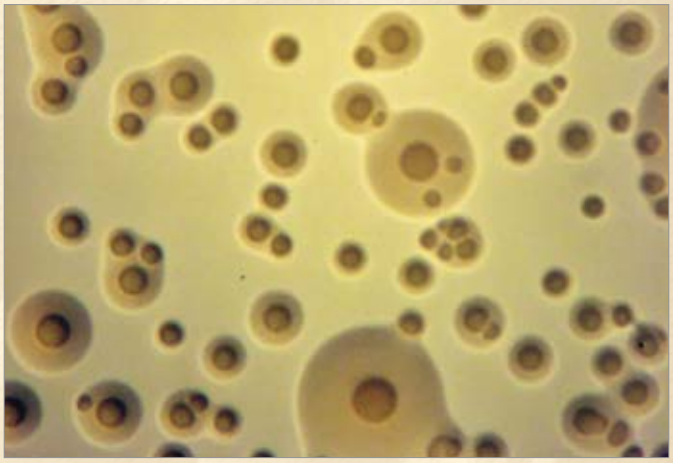


Рис. 5. Типові колонії *Mycoplasma gallisepticum* на твердому живильному середовищі

УВАГА! ТРИВАЄ ПЕРЕДПЛАТА НА ЖУРНАЛ НА 2012 РІК!

мікроскопі добре видно сосочкоподібний центр і ніжні краї колонії (рис. 5).

За відсутності росту в першому пасажі здійснюють не менше п'яти «сліпих» пасажів на рідких живильних середовищах з паралельними посівами на тверді середовища.

В разі виявлення росту на живильних середовищах здійснюють мікроскопію мазків (фарбування за Романовським–Гімзою), де виявляють поліморфні кокоподібні (0,2–0,5 нм) тільця рожево-фіолетового кольору.

Ідентифікують і диференціюють *Mycoplasma gallisepticum* на підставі вивчення морфології клітин у мазках, за наявності характерного росту на живильних середовищах, здатності адсорбувати еритроцити курей, за біохімічними властивостями, а також імунологічними методами із застосуванням гіперімунних комерційних сироваток (РІФ, ІФА) або за допомогою молекулярно-генетичних досліджень із застосуванням ПЛР [1, 3, 12, 14].

Культури *Mycoplasma gallisepticum* аглютинують еритроцити курей. Для постановки реакції аглютинації (РГА) застосовують 3–5-добову культуру мікоплазм і 1% завись курячих еритроцитів. Культуру *Mycoplasma gallisepticum* розводять від 1:2 до 1:64.

Для ідентифікації колоній *Mycoplasma gallisepticum* вдаються до методу гемадсорбції. На поверхню твердого середовища в чашці Петрі з наявним ростом мікоплазм нашаровують 1% завись еритроцитів, інкубують за температури 37,5±0,5°С 60 хв; потім завись зливають, поверхню середовища промивають фізіологічним розчином та вивчають під мікроскопом, визначаючи наявність гемадсорбції.

Вивчення біохімічних властивостей передбачає обов'язкове попереднє клонування культури мікоплазм. Крім того, на основі визначення можливості ферментації глюкози і за відсутності аргініндегідрогенази неможливо виключити інші види мікоплазм.

Тому для остаточної ідентифікації ізолятів мікоплазм доцільно застосовувати імунологічні методи – непряму реакцію імунофлюоресценції (РІФ), імунопероксидазний тест (ІПТ), а також тести інгібіції росту (ІР) та інгібіції метаболізму (ІМ). Для проведення тестів ІР та ІМ необхідні клоновані культури мікоплазм. За допомогою РІФ та ІПТ вірогідно виявити різні види мікоплазм у змішаній культурі. Однак ці методи не дозволяють диференціювати *Mycoplasma imitans*, яка серологічно споріднена з *Mycoplasma gallisepticum* і має схожі біохімічні властивості. У цьому випадку необхідно застосовувати молекулярну діагностику.

Методи виявлення ДНК для індикації *Mycoplasma gallisepticum* безпосередньо в пробах біологічного матеріалу або ідентифікації лабораторних ізолятів, як правило, базуються на ПЛР [14].

Під час проведення досліджень за описаними методами користуються діючою настановою для конкретної тест-системи.

Якщо всі наведені методи дали сумнівний результат, застосовують біопробу на курчатах або курячих ембріонах (КЕ). 6–8-добові КЕ заражають у жовтковий міхур суспензією біологічного матеріалу, виготовленою як для посіву на живильні середовища або досліджувані ізоляти, у дозі 0,05–0,10 см^3. Усі КЕ, що загинули на 2–5-ту добу після зараження, розтинають та роблять посіви на живильні середовища. Ізоляцію та ідентифікацію виконують, як наведено вище.

Біопробу роблять на 4 або 5 курчатах або індиченятах 20–30-добового віку. Перед зараженням сироватку крові птиці перевіряють в СКРА із мікоплазмозним антигеном (реакція має бути негативною). Птицю заражають матеріалом у кількості 0,2 см^3 інтраназально, внутрішньотрахеально й у повітроносні міхури.

Клінічні ознаки виявляють на 7–10-ту добу. Через 35 діб після зараження птицю примусово забивають і досліджують. Для підтвердження діагнозу необхідно реізолювати від зараженої птиці збудника, або виявити ДНК *Mycoplasma gallisepticum* в ПЛР. Позитивним результатом також вважають наявність специфічних антитіл

у сироватці крові в СКРА в титрі 1:4 і вище.

З урахуванням того, що для ізоляції та ідентифікації *Mycoplasma gallisepticum* необхідні тривалий час (близько 30 діб) і певні навички, попередній діагноз, за наявності типових клінічних та патолого-анатомічних змін, може бути поставлений на основі результатів серологічних досліджень (СКРА, РЗГА, РТГА, ІФА). У підозрілих на РМ стадах обстежують не менше як 0,5 % птиці у віці від 40 діб (у бройлерних господарствах – від 20 діб), але не менше як 25 голів із групи. В стаціонарно неблагополучних стадах досліджують не менше 0,25 % поголів'я кожної вікової групи. Для виявлення специфічних антитіл в яйці досліджують жовток, розведений (1:2–1:4) фізіологічним розчином.

Результати серологічного скринінгу дозволяють встановити попередній діагноз на РМ, що є підставою для подальшого вивчення, а також визначити ступінь поширення інфекції у стаді. Наявність у стаді не більше 20 % серопозитивної птиці, за умов відсутності клінічних ознак, свідчить лише про циркуляцію збудника мікоплазмозу серед сприйнятливого птахопоголів'я і вказує на необхідність проведення повторних досліджень через 2–4 тижні. Якщо кількість серопозитивної птиці збільшиться до 40 %, потрібно провести лабораторні дослідження. Якщо кількість позитивно реагуючих особин зростає до 60 % і більше – це явний показник розвитку інфекційного процесу.

Треба зазначити, що підставою для встановлення остаточного діагнозу на респіраторний мікоплазмоз птиці за вимогами чинного законодавства й відповідно до рекомендацій МЕБ є ізоляція та ідентифікація *Mycoplasma gallisepticum* з проб біологічного матеріалу від досліджуваної групи птиці.

ВИСНОВОК

Діагностика респіраторного мікоплазмозу птиці вимагає проведення широкого спектра досліджень. Окрім аналізу результатів епізоотологічного обстеження певної групи птиці, необхідно проводити клінічні та патолого-анатомічні дослідження, а також серологічний скринінг. На завершення здійснюють ізоляцію збудника на рідких і твердих живильних середовищах та остаточну ідентифікацію щодо виду на основі біохімічних, імунологічних та/або молекулярно-генетичних досліджень.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Болезни** птиц: учебное пособие [текст] / Б.Ф. Бессарабов [и др.] // СПб.: Лань. – 2007. – 448 с.
2. **Епанова Е.Л.** Респираторный микоплазмоз в хозяйствах мясного птицеводства АР Крым [текст] / Е.Л. Епанова // Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2009. – Вып. 92. – С. 183–186.
3. **Определитель** бактерий Берджи [Текст]: пер. с англ. / под ред. Дж. Хулта, Н. Крига, П. Снита [и др.]. – М.: Мир, 1997.– 432 с.
4. **Рождественская Т.Н.** Микоплазмозы птицы: особенности эпизоотологии, диагностики и профилактики [текст] / Т.Н. Рождественская, А.Н. Борисенкова, С.В. Панкратов // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2006. – №3. – С. 38–40.
5. **Семенихин А.Л.** Микоплазмозы группы Mycoides: вопросы этиологии, диагностики и профилактики [текст] / А.Л. Семенихин, А.Н. Панин // Состояние, пробл. и перспективы развития вет. науки России. – М. – 1999. – Т. 1. – С. 203–207.
6. **Anon N.** Mycoplasma today [Text] // Poultry Tribune. – 1989. – Т. 95. – №2. – P. 34–36.
7. **Bradbury J.** New approaches to old myciplasma problems [Text] // Poultry intern. – 1987. – Т. 26. – №12. – P. 46–47.
8. **Characterization** of the mycoplasma conjunctivitis epizootic in a house finch population in the Southeastern USA [text] / S. Roberts [et all] // J. Wildlife Dis. – 2001. – 37:1. – P. 82–88.
9. **Current** respiratory disease problem and the probes in chicken [text] / S. Hasan [et all] // Pakistan Veterinary Journal. – 2002. – 22:1. – P. 17–20.
10. **Damages** caused on broiler chickens by the induced action of Mycoplasma gallisepticum and Escherichia coli [text] / O.D. Rodrigues [et all] // Revista Brasileira de Medicina Veterinaria. – 2001.– 23:6. – P. 240–243.
11. **Diagnosis** and treatment of conjunctivitis in house finches associated with mycoplasmosis in Minnesota [text] / J.F.X. Wellehan [et all] // J. Wildlife Dis. – 2001.– 37:2.– P. 245–251.
12. **Diseases** of Poultry. Tenth edition [Text] / Edited by B.W. Calnek with H. John Barnes, Charles W. Beard, Larry R. McDougald, Y.M. Saif. – Iowa State University Press, Amrs, Iowa, USA,1997. – 364 p.
13. **Glisson J.R.** Mycoplasmosis in laying hens [text] // Poultry Dis. – 1988. – Т. 47. – №560. – P. 493–495.
14. **Manual** of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 5th edition, Chapter 2.7.3 Avian Mycoplasmosis. OIE Terrestrial Manual. – 2004. – P. 623–638.

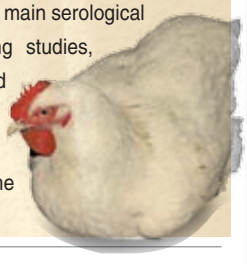
Одержано 25.05.2011

Диагностика респираторного микоплазмоза птиц. *О.В. Обуховская, Б.Т. Стегний*

В статье обобщены данные о проведении диагностических мероприятий по выявлению респираторного микоплазмоза птицы с учетом рекомендаций МЭБ и требований действующего ветеринарного законодательства Украины. Приведены особенности эпизоотологического процесса, основные клинические симптомы и патолого-анатомические изменения. Описаны основные серологические реакции, применяемые для проведения скрининговых исследований, и детально расписаны этапы бактериологических исследований для изоляции и идентификации возбудителя заболевания.

The Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*-infection) diagnostics. *O.V. Obukhovskaya, B.T. Stegnij*

The data to conduct diagnostic measures to detect Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*-infection) with the recommendations of the OIE and the requirements of the current veterinary legislation of Ukraine was analyzed. The features of the epizootic, the main clinical symptoms and pathological changes were presented. Describes the main serological tests used for screening studies, and detailed itemized stages of bacteriological research for the isolation and identification of the causative agent. ○



УВАГА! ТРИВАЄ ПЕРЕДПЛАТА НА ЖУРНАЛ НА 2012 РІК!