ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Институт ветеринарной медицины и биотехнологии ФГБОУ ВПО «Омский
государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина»
Министерства сельского хозяйства Российской Федерации

А. П. Красиков, Н. В. Рудаков

МИКОПЛАЗМОЗЫ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ И ИХ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ И ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

ООО «Издательский центр “Омский научный вестник”»
Омск 2015

УДК 619:616
ББК 55.1
К78

Рекомендуется к изданию ученым советом ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (протокол № 7 от 14.09.2015 г.)

Рецензенты:
А.Н. Евстропов – доктор медицинских наук, профессор
М.А. Бажин – доктор ветеринарных наук, профессор

К78 **Красиков, А. П.**
Микоплазмозы человека и животных и их эпидемиологическое и эпизоотологическое значение: монография [Текст] / А.П. Красиков, Н.В. Рудаков. – Омск: ООО ИЦ «Омский научный вестник», 2015. – С. 717.

ISBN 978-5-91306-078-5

В монографии представлены материалы по этиологии, диагностике, эпидемиологических, эпизоотологических, иммунологических, иммуноморфологических особенностях проявления микоплазмоза у людей и животных: крупного рогатого скота, свиней, плотоядных животных (собак, кошек, серебристо-черных лисиц) и птиц – в том числе ассоциированного с возбудителями других инфекций. Описаны методы индикации и идентификации микоплазм, предложены меры борьбы и профилактики.

Монография рассчитана на специалистов Роспотребнадзора, научных сотрудников, преподавателей вузов и средних специальных учебных учреждений гуманитарной и ветеринарной медицины, аспирантов, студентов медицинских и ветеринарных вузов, специалистов, руководителей хозяйств.

УДК 619:616
ББК 55.1

ISBN 978-5-91306-078-5
© А.П. Красиков, Н.В. Рудаков, 2015

ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Институт ветеринарной медицины и биотехнологии
ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет имени
П.А. Столыпина» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации

A.P. Krasikov, N.V. Rudakov

MYCOPLASMOSES OF HUMAN AND ANIMALS AND THEIR EPIDEMIOLOGICAL AND EPIZOOTICAL SIGNIFICANCE

Publishing Center “Omsk Scientific herald”
Omsk 2015

UDC 619:616
LBC 55.1
K78

Recommended for publication by Scientific Counsil of "Omsk Research Institute of Natural Focal Infections" of Russian Federal Consumer Rights Service …. August 2015, protocol № 7 14.09.2015)

Reviewers:
A.N. Evstropov – Dr. Med. Sci., professor
M.A. Bazhin – Dr. Vet. Sci, professor

K78 **Krasikov, A.P.**
Mycoplasmoses of human and animals and their epidemiological and epizootical significance: monograph [Text] / A.P. Krasikov, N.V. Rudakov. – Omsk: Publishing Center "Omsk Scientific herald", 2015. – 665 p.

ISBN 978-5-91306-078-5

Materials about the etiology, diagnosis, epidemiological, epizootic, immunological, immunomorphological features displays mycoplasma in humans and animals: cattle, pigs, carnivores (dogs, cats, silver fox) and birds, including the pathogens associated with other infections, the methods of indication and identification of mycoplasmas, measures for control and prevention are presented in the monograph.

The book is intended for specialists of Rospotrebnadzor, researchers, academics and specialized secondary educational institutions, humanitarian and veterinary medicine and graduate students, medical and veterinary students of universities, medical and veterinary professionals, managers of farms.

UDC 619:616
LBC 55.1

ISBN 978-5-91306-078-5 © A.P. Krasikov, N.V. Rudakov, 2015

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ..... 12
ВВЕДЕНИЕ..... 16

ОБЩАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ МИКОПЛАЗМАТОЛОГИЯ **21**

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКОПЛАЗМ И МИКОПЛАЗМОЗОВ **21**
1.1.Краткая история изучения микоплазмозов..... **15**
1.2. Таксономия *Mollicutes* **16**
1.3. Общая характеристика класса *Mollicutes* **21**
1.4.Этиология микоплазмозов, в том числе ассоциативных..... **29**
1.5. Методы лабораторной диагностики микоплазмозов..... 46
1.5.1. Индикация, идентификация и культивирование микоплазм на питательных средах 46
1.5.2. Серологические, иммунологические и молекулярно-биологические методы диагностики микоплазмозов..... 68
1.5.3. Молекулярно-биологические методы..... 76
1.5.4. Чувствительность микоплазм к антибиотикам и антимикробная терапия микоплазмозов..... 86
1.5.5. Чувствительность микоплазм к химиопрепаратам in vitro при разработке селективных питательных сред ..... .93
1.5.6. Способы и методы лечения животных при микоплазмозе и ассоциативных формах его проявления 94

2. РОЛЬ МИКОПЛАЗМ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА *(д.м.н. Е.В. Наумкин)* 99
2.1.Микробная экология влагалища в норме и при дисбиозах **102**
2.1.1. Урогенитальная микоплазменная инфекция..... 108
2.2.Общая популяционная характеристика и методы их лабораторного исследования..... **117**
2.2.1. Методы изучения биологических свойств лактобактерий .....
2.2.2. Методика культурального исследования.....
2.2.3. Молекулярно-генетические методы .....
2.2.4. Методы изучения факторов местного иммунитета.....
2.2.5. Методы лабораторных исследований .....
2.2.6. Микроскопия .....
2.2.7. Статистические методы.....

2.3. Эпидемиология вагинальных дисбиозов .....
2.3.1. Заболеваемость ИППП в Омской области .....
2.4. Выявляемость и этиологическая структура ИППП, вызванных условно-патогенными возбудителями по результатам комплексного микробиологического обследования .....
2.4.1. Микробиоценозы влагалища при инфекционно-воспалительных заболеваниях половой сферы в различных возрастных группах .....
2.4.2. Структура вагинальных дисбиозов при различных формах генитальной патологии .....
2.4.3. Сезонность выявления условно-патогенных возбудителей урогенитальных инфекций .....
2.5. Микробиологическая характеристика вагинальных дисбиозов.....
2.5.1. Условно-патогенные микроорганизмы – участники микробных ассоциаций при инфекциях, вызванных облигатными патогенами .....
2.5.2. Микробиологическая характеристика бактериального вагиноза.....
2.5.3. Вирусы и вирусно-бактериальные ассоциации в этиологии инфекций влагалища.....
Заключение.....

***ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКОПЛАЗМАТОЛОГИЯ*.....**

3. МИКОПЛАЗМОЗЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И СВИНЕЙ .196
3.1. Эпизоотическая ситуации по урогенитальному микоплазмозу крупного рогатого скота и ассоциативным формам его проявления в хозяйствах Омской области 196
3.2. Микробиологические методы диагностики урогенитального микоплазмоза 211
3.2.1. Индикация и идентификация микоплазм на питательных средах 211
3.2.2. Основные биологические свойства микоплазм..... 213
3.3. Серологические методы диагностики урогенитального микоплазмоза 219
3.3.1. Получение микоплазмозных антигенов и диагностических кроличьих сывороток для РНИФ 219

3.3.2. Специфичность и активность сывороток
и антигенов в РНИФ 221
3.3.3. Диагностическая ценность бактериологического
и серологического (РНИФ) методов диагностики
в производственных условиях 222
3.3.4. Получение эритроцитарного диагностикума для реакции
непрямой гемаглютинации (РНГА) 225
3.4. Средства и методы лечения животных репродуктивного стада при ассоциативном урогенитальном микоплазмозе 228
3.4.1. Чувствительность полевых культур микоплазм
к антибактериальным препаратам in vitro 228
3.4.2. Схемы лечения и лабораторные методы контроля
их эффективности 230
3.4.3. Экономическое обоснование схем лечения 239
3.5. Микоплазмоз-ассоциированная инфекция телят 241
3.5.1. Эпизоотическая ситуации по микоплазмозу телят
и ассоциативным формам его проявления
в хозяйствах Омской области… 241
3.5.2. Микробиологические методы диагностики
микоплазмоза телят 245
3.5.3. Морфологические и биохимические свойства микоплазм .....
3.5.4.Серологические методы диагностики
микоплазмоза..... 252
3.5.5. Специфичность и активность сывороток
и антигенов в РНИФ .....
3.5.6. Получение эритроцитарного диагностикума для реакции
непрямой гемагглютинации (РНГА).....
3.5.7. Сравнительная оценка диагностической ценности микробиологического и серологических (РНИФ, РНГА) методов диагностики микоплазмоза телят в производственных условиях 258
3.5.8. Средства и методы лечения телят при
микоплазмоз-ассоциированной инфекции 263
3.5.9. Схемы лечения телят и лабораторные методы контроля
их эффективности .....
3.5.10. Экономическое обоснование схем лечения телят при
микоплазмоз-ассоциированной инфекции 277
3.6. Эпизоотическая ситуация по микоплазмозу свиней и ассоциативным формам его проявления в хозяйствах Омской и Тюменской областей..... 280

3.7. Микробиологические методы диагностики микоплазмоза свиней 286
3.7.1. Индикация и идентификация микоплазм на питательных средах .....
3.7.2. Основные биологические свойства микоплазм .....
3.8. Серологические методы диагностики микоплазмоза 295
3.8.1. Получение микоплазменных антигенов и диагностических сывороток для РНИФ, их специфичность и активность 295
3.8.2. Изучение специфичности и активности микоплазмозных антигенов и гипериммунных сывороток в РНИФ
3.8.3. Изготовление микоплазменного эритроцитарного диагностикума (МЭД) для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) 300
3.8.4. Изучение специфичности и активности МЭД в РНГА
3.8.5. Сравнительная оценка диагностической ценности микробиологического и серологических (РНИФ, РНГА) методов диагностики микоплазмоза свиней в производственных условиях 304
3.8.6. Сравнительное изучение чувствительности микробиологического, серологического (РНИФ) и ПЦР методов диагностики .....
3.9. Изыскание средств и методов лечения свиней при микоплазмозе, в том числе ассоциированном с возбудителями других инфекционных болезней 316
Определение чувствительности выделенных от свиней культур микоплазм к антибактериальным препаратам in vitro. ..... .316
Изучение различных схем лечения свиней при микоплазмозе и ассоциативных формах его проявления 318
Экономическое обоснование схем лечения 319

4. ДИАГНОСТИКА, ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ПТИЦ ПРИ РЕСПИРАТОРНОМ И АССОЦИИРОВАННОМ С ДРУГИМИ ИНФЕКЦИЯМИ МИКОПЛАЗМОЗЕ 322
4.1.Этиологические и эпизоотологические аспекты респираторного микоплазмоза птиц 322
4.2.Лабораторные методы диагностики респираторного микоплазмоза птиц 337
Методы индикации и идентификации микоплазм 338

Питательные среды для культивирования микоплазм.....340
Серологические и иммунологические методы диагностики344
4.3.Эпизоотология, патогенез и течение респираторного микоплазмоза птиц. 347
Патологоанатомическая картина при ассоциированном течении респираторного микоплазмоза с колибактериозом (эшерихиозом) 352
Патологогистологические изменения при ассоциированном течении респираторного микоплазмоза с колибактериозом.355
4.4. Меры борьбы и профилактики респираторного микоплазмоза птиц 360
Общие меры борьбы и профилактики 360
Вакцинопрофилактика.....361
Неспецифические средства и методы борьбы и профилактики ..363
Чувствительность микоплазм к химиотерапевтическим препаратам 364

5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ПО РЕСПИРАТОРНОМУ МИКОПЛАЗМОЗУ ПТИЦ 375
5.1.Эпизоотическая ситуация по респираторному микоплазмозу и другим инфекционным болезням на птицефабриках Западно-Сибирского региона 381
Эпизоотическая ситуация в Омской области.....381
Эпизоотическая ситуация в Алтайском крае 392
Эпизоотическая ситуация в Томской области 393
5.2. Изыскание питательных сред для индикации и идентификации микоплазм 394
Чувствительность и специфичность жидких питательных сред..395
Селективные свойства жидких питательных сред для выделения аргинин- и глюкозоферментирующих микоплазм и уреаплазм 398
Определение влияния ингибиторов, входящих в состав жидких питательных сред на скорость роста микоплазм.....399
Определение сроков хранения жидких диагностических сред для индикации микоплазм на показатели стабильности их биологических свойств 400
Чувствительность и специфичность экспериментальных полужидких и плотных питательных сред 401
Определение влияния ингибиторов, входящих в состав плот-

ных и полужидких питательных сред на скорость роста микоплазм 406
5.3. Получение кроличьих гипериммунных микоплазмозных диагностических сывороток для РНИФ 411
5.4. Изучение чувствительности и специфичности предлагаемых средств бактериологического и серологического экспресс-методов при экспериментальном респираторном микоплазмозе кур 415
Чувствительность и специфичность экспресс-методов диагностики респираторного микоплазмоза птиц в производственных условиях 420
5.5. Экспериментальный респираторный микоплазмоз птиц, ассоциированный с эшерихиозом 431
Клинические признаки и патологоанатомические изменения..... 431
Динамика морфометрических показателей органов иммунной системы 437
Патолого-гистологические изменения органов иммунной системы 441
Гематологические показатели 459
Иммунологические показатели крови 463
Серологические показатели 467
Бактериологические показатели 468
5.6. Профилактика и лечение при респираторном и ассоциативном микоплазмозе птиц 469
5.6.1.Определение чувствительности полевых культур микоплазм и эшерихий к антибактериальным препаратам *in vitro* ..... .469
5.6.2. Схемы профилактики и лечения и лабораторные методы контроля их эффективности в экспериментальных условиях 472
5.6.3.Схемы профилактики и лечения при ассоциативном респираторном микоплазмозе цыплят-бройлеров 475
5.6.4. Схемы лечения кур-несушек и петухов родительского стада при спонтанном респираторном микоплазмозе ..... .485
5.6.5. Испытание эффективных схем профилактики и лечения при респираторном и ассоциативном микоплазмозе птиц и методов лабораторного контроля их эффективности в производственном контролируемом опыте 491
Испытание разработанных схем профилактики и лечения при респираторном ассоциативном микоплазмозе цыплят-

бройлеров.....492
Испытание схем профилактики респираторного микоплазмоза на птице
родительского стада 498
Экономическое обоснование эффективных схем профилактики и лечения при респираторном и ассоциативном микоплазмозе птиц.....503

6.МИКОПЛАЗМОЗЫ СОБАК, КОШЕК И СЕРЕБРИСТО-ЧЕРНЫХ ЛИСИЦ.....510

6.1.Экспериментальные данные по микоплазмозу собак, кошек и серебристо-черных лисиц 513

Питательные среды для культивирования микоплазм.....515
Серологические методы изучения микоплазмоза. Схемы получения микоплазменных диагностических сывороток 516
Динамика ммунного ответа у кроликов в РНИФ после заражения их культурами микоплазм.....518
Получение диагностических микоплазменных сывороток на собаках 522
Чувствительность и специфичность микробиологического и серологического экспресс-методов при экспериментальном микоплазмозе морских свинок 525

6.2.Чувствительность и специфичность усовершенствованных микробиологического и серологических экспресс-методов диагностики урогенитального микоплазмоза в контролируемом производственном опыте на собаках.....529

Рациональная схема диагностики ассоциативного микоплазмоза плотоядных.....534

6.3. Экспресс-методы индикации и идентификации микоплазм, как основные элементы схемы диагностики.....538

Микробиологическая диагностика микоплазмоза.....538
Биохимические свойства микоплазм 543
Серологическая идентификация микоплазм.....544

6.4. Внедрение разработанной схемы диагностики для оценки эпизоотической ситуации по ассоциативному урогенитальному микоплазмозу плотоядных 546

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 551
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК .....

К главам 1-3 592
К главам 4-5 ..... .622
К главам 6..... 641

ПРЕДИСЛОВИЕ

На основании данных научной литературы, результатов собственных исследований и работ своих учеников авторы монографии показали актуальность проблемы микоплазмозов человека, крупного рогатого скота, свиней, птиц, плотоядных животных на примере Омской, Тюменской и других областей. Разработаны и внедрены методы бактериологической диагностики и определения чувствительности выделенных культур молликут при урогенитальных уреа- и микоплазмозах у людей, а также методы диагностики, профилактики и лечения коров, телят, свиней, поросят и птиц при микоплазмозах, в том числе ассоциированных с возбудителями других инфекционных болезней, позволившие получить противоэпизоотический и экономический эффект.

Большое внимание уделено диагностике урогенитального микоплазмоза плотоядных, особенно мелких домашних животных – собак и кошек. Поскольку эти животные находятся в более тесном контакте с человеком, существует реальная угроза передачи возбудителя от животных человеку. У больных животных ухудшается функция воспроизводства, что сказывается на их породистых и племенных качествах, что касается и пушных зверей.

Микоплазмозы крупного рогатого скота и свиней имеют широкое распространение в Западно-Сибирском регионе, чаще всего проявляются в ассоциативной форме течения инфекционного процесса. Вопросы диагностики, профилактики и лечения таких форм не изучены, или слабо отражены в издаваемой литературе для вузов. Зачастую студенты, аспиранты, ветеринарные врачи на практике, в лабораториях сталкиваясь с данной проблемой, не знают, как ее решать. Научное и методическое обеспечение дисциплин по этой патологии в рамках специализации имеется не в достаточном объеме или носит разрозненный характер, публикуется в отдельных монографиях и статьях, которые не направлены на подготовку обучающихся по эпидемиологии, эпи-

зоотологии и лабораторной диагностике. В связи с этим научная база, представленная в монографии и подкрепленная практическими данными, будет являться хорошим фундаментом для будущих ветеринарных и медицинских врачей.

В общей части (главы 1, 2) представлены основные этиологические аспекты микоплазмозов человека, млекопитающих и птицы, в том числе ассоциированных с возбудителями других инфекционных болезней. Материалы раздела знакомят с историей изучения микоплазм и микоплазмозов, таксономией *Mollicutes*, этиологией микоплазмозов человека и животных, методами их диагностики и лечения. Делается акцент на то, что любую инфекционную болезнь необходимо рассматривать с позиции учения Е.Н. Павловского о паразитоценозах, т. е. полиэтиологичной природы развития инфекционного процесса, что необходимо учитывать при выборе комплексных средств лечения, направленных на всех членов ассоциации микроорганизмов, участвующих в развитии инфекционной болезни.

В книге представлена роль отдельных представителей *Mollicutes* в патологии человека, крупного рогатого скота, свиней птиц, собак, кошек и серебристо-черных лисиц. Проведен сравнительный анализ классических и современных методов лабораторной диагностики микоплазмозов: микробиологических, серологических, иммунологических, молекулярно-биологических, применяющихся как в нашей стране, так и за рубежом. Приведены сравнения различных схем и методик выделения микоплазм из патологического материала. Отражены различные составы и способы изготовления отечественных и импортных питательных сред, используемых для индикации и идентификации различных видов микоплазм. Показано, что в настоящее время продолжается поиск и испытание новых питательных сред для индикации и идентификации микоплазм. Сделан акцент на питательных средах, разработанных в Омском НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора (Н.В. Рудаков, И.Е. Самойленко, Г.В. Бе-

резкина, Т.А. Решетникова). Указанные среды прошли широкую апробацию на кафедре эпизоотологии и инфекционных болезней ИВМ ОмГАУ для диагностики:

– микоплазмозов у собак, кошек, серебристо-черных лисиц – Н.Н. Новикова (2000);

– микоплазмоза птиц – О.А. Сунцова (2004), С.Б. Лыско, Н.Ф. Хатько (2005);

– урогенитального микоплазмоза крупного рогатого скота – О.В. Вологодская (2006);

– ассоциативного микоплазмоза телят – А.Н. Свиридова (2007), свиней – А.Е. Жонголович (2008).

Указанные среды прошли широкую апробацию для лабораторной диагностики урогенитальных микоплазмозов в различных медицинских учреждениях России, использованы сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Омского государственного медицинского университета Н.В. Темниковой (2007) и Е.В. Наумкиной (2009) при выполнении диссертационных работ. Данные среды более экономичны и перспективны, они позволяют проводить не только индикацию микоплазм, но и их дифференциацию и могут быть использованы ветеринарными и медицинскими специалистами в различных регионах РФ.

Материалы позволят практикующим ветеринарным врачам правильно подбирать для лечения химиотерапевтические препараты, обладающие наибольшей чувствительностью к микоплазмам, с учетом механизма их действия, а также использовать различные схемы лечения животных при микоплазмозах, ассоциированных с другими инфекциями.

В экспериментальных разделах, представленных в различных главах монографии, охарактеризованы материалы, объекты и методы исследований, а также эпизоотическая ситуация по урогенитальному микоплазмозу коров, микоплазмозам телят, свиней, птиц, собак, кошек, серебристо-черных лисиц и ассоциа-

тивным формам их проявления на примере конкретных хозяйств Омской, Тюменской, Томской областей и Алтайского края. Ветеринарные врачи лабораторий могут использовать предложенные авторами методики постановки РПИФ, РНИФ, РНГА, а также микробиологические методы исследования в научных и практических целях при миколазмоз-ассоциированных инфекционных болезнях животных. Комплексные микробиологические и серологические исследования позволят своевременно выявлять как больных, так и микоплазмоносителей и проводить лечебно-профилактические мероприятия при данной инфекционной болезни. Разработанные схемы лечения коров, телят, свиноматок, поросят, птицы и лабораторные методы контроля их терапевтической эффективности могут применяться в хозяйствах ветеринарными специалистами при микоплазмозах и микоплазмоз-ассоциированных инфекциях. Математические же расчеты обоснования лечения животных позволят выбирать из них экономически эффективные.

Материалы исследований иллюстрированы 186 таблицами и 134 рисунками, которые могут быть использованы в качестве наглядных пособий для учебного процесса, при подготовке методических пособий и руководств к практическим занятиям, а также студентами при подготовке презентаций докладов к научно-практическим конференциям. Для более глубокого изучения микоплазмозов можно воспользоваться первоисточниками, указанными в библиографическом списке.

ВВЕДЕНИЕ

Человек является естественным хозяином более 10 видов микоплазм. Отделение «человеческих» видов от остальных в определенной степени условно, поскольку известны случаи выделения от человека микоплазм «животных». *Mycoplasma pneumoniae* является возбудителем респираторного микоплазмоза, ряд видов (*Ureaplasma urealyticum, U. parvum, Mycoplasma hominis, M. genitalium, M. fermentans* и др.) являются возбудителями урогенитальных мико- и уреаплазмозов (С.В. Прозоровский, И.В. Раковская, Ю.В. Вульфович, 1995).

Микоплазмозы характеризуются: у коров и свиней развитием маститов, эндометритов, вульвовагинитов, сальпингитов, абортами, рождением слаборазвитых, зачастую недоношенных, нежизнеспособных телят и поросят, бесплодием; у быков проявляются в виде орхитов и эпидидимитов; у телят сопровождаются кератоконъюнктивитами, ринитами, пневмониями и артритами.
Респираторные болезни телят в последние годы по заключению многих отечественных и зарубежных учёных, стали одним из главных препятствий на пути развития промышленного скотоводства. В их респираторных органах обнаруживают значительное количество микоплазм, различных по видовому составу, а также многокомпонентные системы (вирусы, бактерии), конечный эффект взаимодействия организма животного с которыми ещё не раскрыт. Проблема взаимодействия микоплазм, бактерий, вирусов и клеток макрооганизма представляет не только теоретический, но и большой практический интерес как для гуманитарной (С.А. Вульфович, Л.Г. Гончарова, В.В. Горина и др., 1997, 1998), так и ветеринарной медицины (П.М. Митрофанов, Х.З. Гаффаров, 1978; В.Г. Ощепков, М.Н. Шадрина, Н.Н. Шкиль, 2000, 2001;А.П. Красиков, Н.В. Рудаков, Н.Н. Николаева, О.В. Вологодская, И.Г. Алексеева, Н.И. Водопьянова, 2001; Н.Н. Новикова, 2002; А.П. Красиков, Н.В. Рудаков, 2003; О.А. Сунцова, 2004; В.Э. Малошевич, С.Б. Лыско, Н.Ф. Хатько, 2005; О.В. Вологодская, 2006).

Развитие свиноводства на промышленной основе заострило в числе многих других проблему сохранения репродуктивных способностей маточного стада. Экономический ущерб от микоплазмоза в этой отрасли обусловлен снижением массы тела животных, потерей племенных качеств, замедлением роста и развития, низкой оплатой корма, появлением «заморышей», гибелью поросят и значительными затратами на лечение и оздоровительные мероприятия.

Широко дискутируется вопрос о первостепенной роли микоплазм в патогенезе заболеваний со смешанной этиологией, их сочетанном действии с другими бактериями и вирусами. Общего ответа быть не может, но микоплазмы, являясь самостоятельной группой, в синергизме с другими микроорганизмами усиливают свое патогенное действие (Г.Г. Миллер, И.В. Раковская, В.Э. Березин, 1991; А.Я. Пустовар, 1995; П.П. Фукс, 1995; C. Liu, R.J. Baier, X.J. Qu, 1997). Особое значение это явление приобрело в последние годы, так как в условиях хозяйств, особенно крупных, все чаще одновременно обнаруживаются несколько инфекций. Микоплазмоз повышает восприимчивость свиней к вторичным инфекциям, что делает его течение более тяжелым, зачастую приводя к гибели.

Развитие техники и методов микоплазмологии лишь недавно позволило начать исследования по определению роли микоплазм в патологии органов воспроизводства свиней. Одновременно у свиней обнаружены уреаплазмы, значение которых в патологии данного вида животных недостаточно изучено.

Птицеводство первым из всех отраслей животноводства переведено на индустриальную основу. За последние годы запущены и строятся птицефабрики с полной механизацией производственных процессов. Выведены и используются высокопродуктивные кроссы кур яичного и мясного направлений. Вместе с тем специализация и концентрация производства привели и к некоторым отрицательным моментам. Так, концентрация большого количества птицы на ограниченных площадях и поточная система выращивания обусловили постоянное пассажирование через их организм условно-патогенной микрофлоры и повышение её вирулентности. Кроме того, искусственный микроклимат выра-

щивания, нарушение технологии содержания и кормления, а также влияние других стресс-факторов привело к снижению общей резистентности организма птицы, именно на этом фоне широкое распространение получили такие болезни, как респираторный микоплазмоз, а также болезни, вызываемые условно-патогенной микрофлорой – эшерихиоз, стафилококкоз, стрептококкоз и др.

В настоящее время проблема респираторного микоплазмоза остается актуальной для птицеводческих хозяйств. В результате ретроспективных исследований, проведенных во ВНИИЗЖ за последние 5 лет, установлено, что в 221 из 250 птицефабрик России и стран СНГ птица была инфицирована *M. gallisepticum*, что составило 88 % (Гирин М.В., 2004). По данным А.С. Серебрякова с соавт. (1970), S.L. Branton, J.W. Deaton (1984), Г.Ф. Коромыслова (1987), Б.Ф. Бессарабова, И.И. Мельникова (2001), D.N. Ley, H.W. Yoder (2003), экономический ущерб от респираторного микоплазмоза складывается из летальности цыплят (20–80 %), взрослых птиц (4–6 %), гибели эмбрионов (8–30 %), снижения яйценоскости (10–50 %), привесов молодняка (13–16 %), задержки роста и выбраковки цыплят (50–75 %).

В большинстве случаев микоплазмоз протекает в ассоциации с другими инфекциями, что создает сложную эпизоотическую ситуацию на птицефабриках, при этом болезнь протекает в более тяжелой форме, увеличивается летальность птицы (J.R. Glisson, 1988; K. Nakamura, 1994; В.С. Гусев с соавт., 2003; Н.В. Садовников, 2003; Т.А. Мандрусова, 2003; Н.Л. Андреева, 2004 и др.). Кроме того, ассоциативное течение инфекции затрудняет диагностику болезни и снижает эффективность лечебно-профилактических мероприятий. У птицы, переболевшей микоплазмозом, после применения различных вакцин не вырабатывается напряженный поствакцинальный иммунитет к бактериальным и вирусным инфекциям (Е. Йовчев, Л. Лозанов, 1973).

Для лечения больных микоплазмозом людей, животных и птиц применяют различные антибиотики. Однако бессистемное их применение без определения чувствительности возбу-

дителей инфекционных болезней к лекарственным препаратам не позволяет добиться желаемых результатов при ассоциативном микоплазмозе. В настоящее время не разработаны эффективные и рациональные схемы лечения крупного рогатого скота при урогенитальном микоплазмозе и ассоциативных формах его проявления.

Весьма актуальным является и изучение урогенитального микоплазмоза плотоядных, особенностей его ассоциативных форм и проявлений и масштабы распространения на территории Российской Федерации.

Клиническая картина при микоплазмозной инфекции характеризуется абортами, рождением мертвого или нежизнеспособного молодняка, эндометритами, вагинитами, уретритами, простатитами (З.П. Наумец, с соавт., 1977; П.М. Митрофанов, 1982; Н.Н. Шкиль, 1999).

Установлено, что сходные поражения мочеполового тракта отмечаются и у человека, при этом специфическим возбудителем является микоплазма или уреаплазма (С.В. Прозоровский, с соавт., 1995; Е.Э. Плотко, 1996; В.Н. Прилепская, И.Ю. Абуд, 1998; Е.Г. Румпель, В.А. Шаманин, 2000). В этой проблеме еще много нерешенных вопросов. В перспективе предстоит большая работа по изучению биологии и вирулентности разных видов микоплазм, участвующих в развитии патологических процессов в органах урогенитального тракта.

Микоплазмы некоторых видов (*M. bovigenitalium, M. dispar, M. hominis*), выявляемые при данной патологии, играют в ней основную роль, однако их можно выделить и при других болезнях в виде сопутствующей или ассоциативной микрофлоры. Наиболее часто встречаются ассоциации с хламидиями, пастереллами, трихомонадами и кокковой микрофлорой (П.М. Митрофанов, с соавт., 1978; А.Я. Пустовар, 1995; З.Х. Ахмедшин, с соавт., 1996; Л.И. Мальцева, с соавт., 1996; Л.А. Газовская, 1997; Н.Н. Шкиль, 2000).

Несмотря на значительное количество прописей состава питательных сред, рекомендованных для выделения и культивирования микоплазм, до настоящего времени не создано стандартных, универсальных, выпускаемых биологической промышлен-

ностью питательных сред, с помощью которых можно было бы проводить индикацию всех видов микоплазм, а также их идентификацию и дифференциацию.

Серологические методы остаются классическими методами типирования микоплазм. В.Д. Тимаков и Г.Я. Каган (1973) указывают, что при разработке вопросов, касающихся серологической и антигенной характеристики микоплазм, необходимо использовать несколько серологических методов, данные которых должны дополнять друг друга.

Для постановки различных серологических реакций необходимо иметь набор специфических сывороток и антигенов. Предложены различные схемы приготовления гипериммунных сывороток и антигенов для диагностики микоплазмоза у сельскохозяйственных животных, которые не вышли за рамки научных исследований (Я.Р. Коваленко с соавт. (1971), И.Я. Яблонская (1977), В.А. Поликарпов (1977), П.В. Митрофанов (1982), Н.Н. Шкиль (2000)). Вместе с тем такие исследования относительно урогенитального микоплазмоза плотоядных животных не проводятся.

Исходя их этого возникла необходимость изыскать высокочувствительные, специфичные, доступные для широкого практического применения экспресс-методы бактериологической и серологической диагностики микоплазмозной инфекции и разработать рациональную схему их применения, что и вошло в число задач данных исследований.

Авторы монографии на основе данных научной литературы и результатов собственных исследований показали актуальность проблемы микоплазмозов крупного рогатого скота и свиней на примере хозяйств Омской и Тюменской областей. Разработаны и внедрены с противоэпизоотическим и экономическим эффектом в ряде хозяйств методы диагностики, профилактики и лечения коров, телят, свиней при микоплазмозах, в том числе и ассоциированных с возбудителями других инфекционных болезней.

ОБЩАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ МИКОПЛАЗМАТОЛОГИЯ

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКОПЛАЗМ И МИКОПЛАЗМОЗОВ

1.1. Краткая история изучения микоплазмозов

Микоплазмология – учение о микроорганизмах класса *Mollicutes* (микоплазмах, ахолеплазмах, уреаплазмах, спироплазмах, анаэроплазмах) – является относительно новой и интенсивно изучаемой областью современной микробиологии.

Первые представители класса *Mollicutes* (микоплазмы) были описаны в 1896 году E. Nocard и E. Roux в качестве возбудителя атипичной плевропневмонии у крупного рогатого скота, но детальное исследование этих микроорганизмов началось только с начала 60-х годов прошлого века, когда L. Hayflick и R.M. Chanock (1965) предложили первые искусственные питательные среды для культивирования микоплазм. В начале изучения было не ясно, к грибам, вирусам или бактериям их относить.

Долгое время оставался открытым вопрос о принадлежности разных видов микоплазм к тому или иному таксону бактерий. Сначала все члены класса *Mollicutes*, как правило, называли микоплазмами или плевропневмониеподобными организмами (PPLOs). В 1956 г. D.G. Edward, E.A. Freundt представили первую заявку для классификации и наименовании PPLOs. Однако они оставили не решенным вопрос о том, принадлежат ли эти микроорганизмы к бактериям (прокариоты; в 1956 году назывались Schizomycetes) или к эукариотам. Как типовому виду (дающему название видам PPLOs/микоплазм) D.G. Edward и E.A. Freundt предложили *Mycoplasma mycoides* – возбудителя «плевропневмонии крупного рогатого скота». В этой публикации описано 15 видов рода.

Кроме того, сходство микоплазм с L-формами классических бактерий вводило в заблуждение. До начала 60-х годов было принято считать, что микоплазмы являются L-формами бактерий. Эта точка зрения не допускала возможности рассматривать микоплазмы как самостоятельную таксономическую группу в классификации микроорганизмов.

Введение метода ДНК-ДНК гибридизации в микробиологическую практику в начале 70-х годов позволило показать, что микоплазмы являются самостоятельной группой. В 1967 году класс *Mollicutes*, включающий порядок *Mycoplasmatales*, был заявлен D.G. Edward и E.A. Freundt на Подкомитете по таксономии *Mycoplasmata*.

У человека первой выделенной микоплазмой оказалась *M. hominis* (Dienes L, Edsall G., 1937). В дальнейшем описаны *Mycoplasma fermentans* (1952), *Mycoplasma salivarium* (1953), *Ureaplasma urealyticum* (1954), *Mycoplasma pneumoniae* (1962), *Mycoplasma orale* (1964), *Mycoplasma genitalium* (1981), *Mycoplasma spermatophilum* (1991), *Mycoplasma penetrans* (1991), при этом мнения различных авторов о степени их патогенности, частоте выявления в различных гендерных и возрастных группах и роли в патологии существенно отличаются (Савичева А.М. и др., 2008).

1.2. Таксономия *Mollicutes*

Традиционно таксономия бактерий была основана на сходстве и различиях в морфологии (таксономии Линнея). В 1962 году R.G.E. Murray предложил разделить царство *Bacteria* на три отдела (=Phyla) на основе типов клеточной стенки: 1) грамотрицательных "*Gracilicutes*", с тонкой клеточной стенкой и небольшим слоем пептидогликана; 2) грамположительных "*Firmacutes*", с более толстой клеточной стенкой и большим количеством пептидогликана; 3) "*Mollicutes*", без клеточной стенки.

Классификация *Mollicutes* всегда была сложной задачей, поскольку это очень мелкие паразитические микроорганизмы, требующие для культивирования специальных питательных сред. До сих пор многие виды не могут быть выделены на питательных средах вообще.

Класс *Mollicutes* относится к царству *Bacteria*, отделу *Firmicutes* (или *Tenericutes*) (Garrity G.M. et al., 2004, 2007; W. Ludwig et al., 2009) и включает порядки *Acholeplasmatales, Anaeroplasmatales, Entomoplasmatales* и *Mycoplasmatales*. Отличительной таксономической особенностью этого класса бактерий является полное отсутствие клеточной стенки.

Современная систематика *Mollicutes* основана на молекулярном анализе, особенно гена 16S рРНК; серологии (реакции на антисыворотки) и фенотипе (морфология, требования к росту). Для классификации и номенклатуры видов существуют специальные правила, которые поддерживаются Международным комитетом по систематике прокариот (ICSP), Подкомитетом по таксономии Mollicutes (ранее Международным комитетом по систематической бактериологии (ICSB), Подкомитетом по систематике *Mycoplasmatales*.

Организмы можно классифицировать на основе морфологии (таксономии Линнея) или в соответствии с родословной/генетическим происхождением (кладистикой). В таксономии бактерии предпочтительно классифицируют в соответствии с их происхождением.

Хотя *Mollicutes* фенотипически (отсутствие клеточной стенки и, следовательно, резистентность к таким антибиотикам, как пенициллин, отсутствие положительной окраски по Граму) явно отличается от грамположительных бактерий с клеточной стенкой, их морфология ничего не говорит об их позиции на филогенетическом дереве. Некоторые эволюционные события, такие как потеря клеточной стенки, могут возникнуть (и исчезнуть) несколько раз, даже в пределах одной линии. Так, не связанные с ними представители *Thermoplasma* также не имеют клеточной

стенки. По этой причине отсутствие клеточной стенки не может быть допустимым критерием для определения *Mollicutes* как филогенетически цельной группы или определять более раннее или позднее происхождение видов с позиции их эволюции.

В какой отдел должны быть помещены представители класса *Mollicutes,* является спорным вопросом. Некоторые систематики предлагают разместить их в *Firmicutes*, другие – в *Tenericutes*. В действительности, однако, отнесение класса *Mollicutes* к определенному отделу филогенетически незначительная проблема, так как это не влияет на филогенетические деревьяв пределах *Mollicutes*.

Результаты молекулярной филогенетики молликут не имеют однозначной интерпретации. Помимо ограниченности количества имеющихся данных есть также внутренние ограничения применяемых методов, которые создают неопределенность в отношении оценки эволюционного развития. Результаты частично зависят от выбранного молекулярного маркера, например рРНК, фактора элонгации или других белков. Кроме того, кладистические методы часто основаны на предположениях, которые скрыты в используемых вычислительных алгоритмах, в частности, с использованием таких методов, как методы максимальной схожести и вероятности. Такие элементы действительно имеют несколько произвольный характер.

Это может быть проиллюстрировано тем фактом, что в раннем издании определителя Берджи (Bergey' Manual of Systematic Bacteriology) *Mollicutes* представлены как класс в отделе *Firmicutes*, тогда как в 2-м издании, томе 3, они вынесены в отдельный отдел *Tenericutes* (LudwigW. et al., 2009).

Woese et al. (1980) предположили, что *Mollicutes*, возможно, происходят из различных ветвей бактерий. Они пришли к выводу, что *Mollicutes* – нефилогенетически когерентная группа и, следовательно, не образует отчетливо таксон более высокого уровня. Вместо этого, они группируются с грамположительными бактериями отдела *Firmicutes* (RazinS. et al., 1998). Филогенети-

ческие деревья, построенные на основе аминокислотных сиквенсов фосфоглицераткиназы *(Pgk),* показывают монофилетическое происхождение *Mollicutes* внутри *Firmicutes* (Wolf M. et al., 2004). В *Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea* (TOBARelease 7.7), март 2007 г., *Mollicutes* – класс отдела *Firmicutes* (Garrity G.M. et al., 2007).

Медицинское и ветеринарное значение микроорганизмов рода *Mycoplasma* и связанных родов обусловило активную каталогизацию многих из них с помощью культуральных и серологических методов, секвенированием гена малой субъединицы рРНК и полногеномного секвенирования. Акцент исследований на вопросах молекулярной филогенетики позволил уточнить многие аспекты организации класса *Mollicutes* (Johansson K.-E., Pettersson B., 2002).

Первоначально тривиальное название «микоплазмы» относили ко всем представителям класса, название которого происходит от латинского *mollis* (мягкий) и *cutis* (кожа), поскольку у всех этих бактерий отсутствует клеточная стенка и генетическая способность синтезировать пептидогликан.

Несмотря на отсутствие клеточной стенки, систематики на основе анализа генов 16S рРНК отнесли микоплазмы и родственные им микроорганизмы к типу *Firmicutes*, включающему грамположительные бактерии с низким G+C %, такие как *Clostridium*, *Lactobacillus* и *Streptococcus*. Порядок *Mycoplasmatales* содержит одно семейство, *Mycoplasmataceae*, включающее два рода: *Mycoplasma* и *Ureaplasma,* а также Candidatus *Hepatoplasma* (NCBITaxonomy, www.gbif.org/species/ 106136190).

Исторически сложилось так, что описания бактерии, лишенной клеточной стенки, было достаточно, чтобы причислить её к роду *Mycoplasma*. Ограничивающим критерием для включения в род *Mycoplasma* являлось то, есть ли у микроорганизма позвоночный хозяин. Вместе с тем типичный вид *M. mycoides* наряду с другими значимыми видами микоплазм, такими как *M. capricolum*, эволюционно более тесно связан с родом

Spiroplasma в порядке *Entomoplasmatales*, чем с другими членами рода *Mycoplasma*. Это и другие несоответствия, скорее всего, свидетельствуют о необходимости совершенствовать критерии оценки микоплазм и других представителей класса *Mollicutes*.

Остальные виды рода *Mycoplasma* можно разделить на три группы: «hominis», «pneumoniae» и «fermentans» на основе последовательностей гена 16SrRNA. Группа «hominis» содержит среди других филогенетические кластеры *M. bovis, M. pulmonis, M. hominis. M. hyopneumoniae* и является основным бактериальным агентом комплекса респираторных заболеваний свиней. Группа «pneumoniae» содержит кластеры *M. muris, M. fastidiosum, U. urealyticum*, в настоящее время некультивируемые гематрофные молликуты, неофициально именуемые гемоплазмы (haemoplasmas, недавно перенесенные из родов *Haemobartonella* и *Eperythrozoon*), и кластер *M. pneumoniae*.

Этот кластер содержит виды с различными (основными или вероятными) хозяевами: *M. alvi* (крупный рогатый скот), *M. amphoriforme* (человек), *M. gallisepticum* (птицы), *M. genitalium* (человек), *M. imitans* (птицы), *M. pirum* (вероятно, человек), *M. testudinis* (черепахи) и *M. pneumoniae* (человек).

Изучение 143 генов 15 видов *Mycoplasma* показало, что род может быть сгруппирован в четыре клайда: *M. hyopneumoniae* группа, *M. mycoides* группа, *M. pneumoniae* группа и *Bacillus-Phytoplasma* группа (K. Oshima, H. Nishida, 2007). *M. hyopneumoniae* группа ближе к *M. pneumoniae* группе, чем *M. mycoides* группа.

1.3. Общая характеристика класса *Mollicutes*

Представители класса *Mollicutes* – паразиты различных животных и растений, живущие на клетках (или внутри клеток) хозяина. Они имеют очень маленькие размеры (порядка 0.2–0.3 μm в диаметре) и крайне маленький геном. Они различаются по

форме, хотя большинство из них содержат стерины, которые делают клеточную мембрану несколько жестче. Многие способны передвигаться путем скольжения, но члены рода *Spiroplasma* – спиралевидные и могут двигаться путем скручивания. Наиболее известным родом класса *Mollicutes* является род *Mycoplasma* семейства *Mycoplasmatacea.*

Современная систематика относит представителей семейства *Mycoplasmatacea* к классу *Mollicutes* (молликут – «мягкокожих»), объединяющему *микоплазмы, уреаплазмы, ахолеплазмы* (эти три рода встречаются у человека, среди них выделяют патогенные и сапрофитические виды), *спироплазмы* и *анаэроплазмы.*

Основные характеристики молликут – отсутствие истинной клеточной стенки, мелкая кокковидная форма, паразитизм на мембранах эукариотических клеток, рост на плотных средах в виде мелких врастающих в агар колоний с приподнятым центром («яичница-глазунья»), абсолютная резистентность к пенициллинам и другим действующим на синтез клеточной стенки антибиотикам. Характеризуются малым размером генома, низким содержанием Г+Ц в ДНК. Имеют от 104 до 113 нуклеотидов в 5S рРНК.

Микоплазмы – самые мелкие прокариотические микроорганизмы, *не имеющие клеточной стенки* (это придает им сходство с L-формами бактерий) и способные *к паразитированию на мембранах эукариотических клеток.* Способность *персистировать* на мембранах клеток связана с наличием сходства структуры и состава цитоплазматической мембраны микоплазм с мембранами клеток эукариот и использовании микоплазмами их компонентов (прежде всего холестерина и фосфолипидов) для построения собственных структур. Микоплазмы имеют трехслойную цитоплазматическую мембрану, обеспечивающую целостность микробных клеток и частично замещающую в функциональном отношении отсутствующую клеточную стенку.

Представители рода микоплазм – паразиты и возбудители заболеваний (микоплазмозов) широкого круга млекопитающих,

птиц, человека. Многие *Mollicutes* могут вызывать заболевания у человека, поражая клетки дыхательных или мочеполовых путей, особенно микоплазмы и уреаплазмы. Представители некоторых родов являются фитопатогенами, связанными с насекомыми (*Phytoplasma, Spiroplasma*).

Если раньше тривиальным названием «микоплазмы» обозначали любого члена из класса *Mollicutes*, то в настоящее время это относится исключительно к членам рода *Mycoplasma*. Известно более 100 видов микоплазм, число новых видов продолжает увеличиваться. 12 видов встречаются у человека, из них наибольшее значение имеют *M. pneumoniae* (вызывают в основном пневмонии и ОРЗ), *M. hominis*, *M. genitalum, M. fermentans* (при вызываемых ими инфекциях преобладают урогенитальные поражения).

В составе *рода Ureaplasma* выделено пять видов. Штаммы, выделенные от людей, составляют вид *U. urealyticum*, от КРС – *U. diversum*, от птиц – *U. gallorale*, от кошек – *U. cati* и *U. felinum*.

Морфология. Наиболее типичны мелкие кокковидные формы, выражен полиморфизм. При росте колоний образуются гифоподобные структуры, схожие внешне с гифами грибов.

Культуральные и биохимические свойства. Микоплазмы прихотливы к условиям культивирования. В составе сред необходимы холестерин и стерины, нативные сыворотки, витамины, соли. Основным источником энергии являются углеводы (особенно глюкоза) или аминокислоты (аргинин). Для усиления восстановительных свойств сред добавляют L-цистеин.

Используют различные варианты жидких, полужидких и плотных питательных сред, включающих гидролизаты мяса, казеина, ферментативный пептон, аутолизат пекарских дрожжей, сыворотку крови лошадей (больше всего холестерина), *основной субстрат* – глюкозу (для глюкозоферментирующих микоплазм), аргинин (для аргинин-утилизирующих микоплазм), мочевину (для уреаплазм), селективные антибиотики (пенициллин и его синтетические аналоги, амфотеррицин, нистатин или низорал,

для уреаплазм – линкомицин), индикатор pH (бромтимоловый синий или феноловый красный).

Оптимум температуры для культивирования от +35 до +37 ^{o}C. Оптимум pH для уреаплазм и аргинин-утилизирующих микоплазм – 6,0–6,5. При росте уреаплазм, обладающих ферментом *уреазой*, происходит расщепление мочевины до аммиака с повышением pH (сдвиг в щелочную сторону) и с изменением цвета среды с бромтимоловым синим из желто-лимонного до зеленого без образования значительного осадка и без помутнения среды. Аналогично происходит изменение цвета сред при росте аргинин-утилизующих микоплазм на средах с добавлением аргинина.

Оптимум pH для глюкозоферментирующих микоплазм (*M. genitalium, M. fermentans*, *M. pneumoniae*) – около 8,0. Эти микоплазмы ферментируют глюкозу до углекислого газа со сдвигом pH в кислую сторону и изменением цвета среды с зеленого на желто-лимонный.

Колонии уреаплазм (ранее называли Т-микоплазмами от *tiny* – «маленький») значительно меньше колоний классических микоплазм, на средах с добавлением сульфата марганца их колонии окрашиваются в золотисто-коричневый цвет, в отличие от микоплазм уреаплазмы малочувствительны к небольшим дозам линкомицина (15 мкг/ мл).

Антигенная структура. Микоплазмы характеризуются выраженной гетерогенностью и изменчивостью антигенной структуры (антигенный полиморфизм). Известно 16 серотипов *U. urealyticum*, разделенных на серогруппы А и В. Степень гомологии серотипов существенно отличается. Часто выделяют от больных смешанные культуры различных серотипов. Выделяют биовары уреаплазм (Parvo, T-960), отличающиеся по вирулентности и строению гена основного фермента – уреазы. В настоящее время их выделяют в отдельные геномовиды – *Ureaplasma parvum* и *Ureaplasma urealyticum.* Аналогичная динамичность и гетерогенность антигенной структуры и наличие различных сероваров характерны и для различных видов класси-

ческих микоплазм. По биохимическим и в определенной мере антигенным свойствам среди микоплазм имеются виды-«двойники» (например, *M. pneumoniae* и *M. genitalium*). Среди антигенов выделяют белки-адгезины, фосфо- и гликолипиды, полисахаридные компоненты.

Факторы патогенности. 1) адгезины (обеспечивают взаимодействие с клетками хозяина); 2) эндотоксины (не тождественны ЛПС грамотрицательных бактерий); 3) гемолизины (особенно у *M. pneumoniae*); 4) экзотоксины (плохо изучены и известны у немногих видов); 5) ферменты – фосфолипаза А, аминопептидазы, протеазы, нейраминидаза.

Патогенез поражений. Микоплазмы – мембранные паразиты, способные адсорбироваться на различных эукариотических клетках. Это обусловлено подвижностью патогенных микоплазм, связанной с хемотаксисом и наличием микроворсинок. Микоплазмы способны тесно связываться с мембранами эукариотической клетки, вступать в межмембранное взаимодействие, обмениваться мембранными компонентами (в том числе использовать холестерин и стенолы для построения собственных клеток), оказывать разнообразное влияние на клетки. Коротко остановимся на основных *эффектах действия микоплазм на различные клетки*.

1. Взаимодействие с фагоцитирующими клетками вызывает цитопатический или цитотоксический эффект и гибель фагоцитов или приводит к длительной персистенции микоплазм в фагосомах фагоцитов.

2. Воздействие микоплазм на макрофаги приводит к нарушению их функций.

3. Персистенция микоплазм на мембранах лимфоидных клеток оказывает существенное влияние на их функции, в том числе непосредственное деструктивное воздействие на иммунокомпетентные клетки (*M. fermentans* оказывает СПИДоподобное действие на иммунную систему).

4. Микоплазмы действуют на эритропоэз, т. е. на гомеостаз организма.

5. Обмен антигенными компонентами мембран с клетками хозяина обеспечивает антигенную мимикрию и развитие аутоиммунных реакций.

6. Отсутствие клеточной стенки и частая локализация микоплазм в инвагинатах мембран клеток объясняет их слабую иммуногенность и защиту от действия антител. Этому способствует и высокая антигенная изменчивость молликут.

7. Микоплазмы способны воздействовать на хромосомный аппарат клеток хозяина (на соматические и половые клетки), вызывая хромосомные абберации.

8. Ряд продуктов метаболизма оказывает токсическое воздействие на инфицированные клетки. Так, глюкозоферментирующие микоплазмы резко снижают pH и оказывают этим деструктивное действие на эпителиальные клетки.

Лабораторная диагностика. Наиболее оптимальна *культуральная (бактериологическая) диагностика* с использованием жидких и плотных питательных сред, особенно в сочетании с антибиотикограммой и определением титра микоплазм (уреаплазм) в нативных образцах. Преимущества этого подхода: быстрота (для уреаплазм 1–2 суток, для микоплазм – до 3 суток), простота (цветной пробирочный тест), достоверность (селективность сред, учет биохимизма возбудителей), возможность определения концентрации (титр 10 000 цветообразующих единиц – ЦОЭ – имеет диагностическое значение) и чувствительности к различным препаратам на основе антибиотикограммы (повышает эффективность лечения), возможность достоверного контроля эффективности лечения (растут только жизнеспособные микоплазмы).

Наиболее чувствительна *ПЦР-диагностика*. Однако: возможны ложно-положительные и ложно-отрицательные результаты, длительность выявления положительных результатов контроля излеченности, невозможность определения титра микоплазм (не разработаны количественные методики) и чувствительности к препаратам.

Люминесцентная диагностика дает неудовлетворительные результаты чаще, чем при выявлении хламидий. Это связано с малыми линейными размерами возбудителей, серологической гетерогенностью и антигенной изменчивостью, возможностью перекрестных реакций между различными видами, наличием диагностических препаратов только для выявления уреаплазм и *M. hominis*.

Серологические методы многочисленны, однако коммерческие препараты отсутствуют, существуют проблемы в интерпретации результатов.

Лечение должно быть основано на подборе чувствительных антибиотиков (чаще применяют макролиды, тетрациклины – доксициклин) и бактериологическом контроле эффективности лечения. Имеются устойчивые к тетрациклинам, макролидам и другим антибиотикам штаммы (это связано с наличием плазмид устойчивости). У микоплазм имеются специфические вирусы, в том числе бактериофаги. В лечебных и диагностических целях они до настоящего времени не используются.

Специфическая профилактика не разработана. Иммунитет нестойкий, серовар-специфический.

1.4. Этиология микоплазмозов, в том числе ассоциативных

Микоплазмы – это мельчайшие прокариоты, не имеющие клеточной стенки, ограниченные снаружи только трехслойной цитоплазматической мембраной. Они относятся к классу *Mollicutes*, включающему три основные семейства: *Mycoplasmatoceae, Acholeplasmataceae,* играющих роль в патологии человека, млекопитающих и птиц, а также *Spiroplasmatoceae*, имеющие значение в патологии растений и насекомых. Микоплазмы широко распространены в природе и представляют собой большую группу патогенных и сапрофити-

ческих микроорганизмов, имеющих общие морфологические и физиологические признаки. Они обнаружены у человека, животных, рыб, моллюсков, насекомых и растений (Г.Ф. Коромыслов и др., 1987; Л.В. Романова и др., 1993; А.Р. Рысков и др., 1988; M. Iwameti et al., 1984).

Микоплазмы отнесены к классу *Mollicutes*, который включает в себя 4 порядка, 5 семейств, 8 родов и более 120 видов микроорганизмов (П.П. Фукс и др., 1995; M. Garcia et al., 1995). В соответствии с «NCBITaxonomy, www.gbif.org/species/106136190» к началу 2015 года в составе класса *Mollicutes* описано четыре порядка *(Acholeplasmatales, Mycoplasmatales, Entomoplasmatales, Anaeroplasmatales),* шесть семейств, 12 родов и около 2300 видов и кандидатов в новые виды. Порядок *Mycoplasmatales* включает одно семейство *Mycoplasmataceae,*с родами *Mycoplasma* (379 видов), *Ureaplasma* (23 вида) и Candidatus *Hepatoplasma.*

Со времени выделения в 1898 г. первого представителя патогенных микоплазм животных *M. mycoides* в течение почти трех десятилетий были известны лишь возбудители заболеваний крупного рогатого скота. Затем были изолированы: возбудитель хронической респираторной болезни кур (1936), обозначаемый теперь как *M. gallisepticum*, позднее (1953) *M. hyorhinis* – один из возбудителей микоплазмоза свиней (Switzer, 1955). С течением времени были дифференцированы следующие специфичные для свиней виды микоплазм: *A. granularum* (1965), *M. hyopneumoniae – M. suipneumoniae* (1965), *M. hyosynoviae* (1970), *M. flocculare* (1972), *M. sualvi* (1976).

Этиологическое значение микоплазм в патологии животных было установлено впервые при контагиозной плевропневмонии крупного рогатого скота в 1898 г. Нокаром и Ру. Они изолировали из плеврального экссудата больных животных фильтрующийся агент и разработали способ его выращивания на Мартеновском бульоне с сывороткой крови. Это открытие дало толчок для дальнейших исследований, которые увенчались успехом. К 40-м

годам прошлого века были выделены новые виды микоплазм животных и человека, требующие дальнейшего изучения.

Микоплазмы животных представляют собой распространенные этиологические агенты, вызывающие воспаления легких, суставов и урогенитального тракта.

В 1947 году Edward выделил микоплазмы из полового тракта коров и быков при воспалительных процессах. С помощью этих штаммов ему удалось воспроизвести искусственный вагинит у коров (D.G. Edward, 1954).

M. hyogenitalium, выделенная из матки и молочной железы на четвертый день после опороса у свиньи, описанная Switzer (1969), является тичным представителем семейства *Mycoplasmatoceae* и при экспериментальном инфицировании свиней вызывает маститы и метриты.

Taulor-Robinson (1969) выделял из уретры мочевого пузыря, реже из влагалища Т-штаммы (уреаплазмы) от 33 % обследованных дойных коров. Особенно часто он выделял их из семенной жидкости быков. Эти штаммы серологически отличались от Т-штаммов человека.

Возбудители микоплазмозной инфекции разных видов животных были изучены в 70–80 годах рядом исследователей: Я.Р. Коваленко, Э.А. Шегидевич, И.А. Яблонской, М.А. Сидоровым (1972, 1976, 1977, 1980), в том числе крупного рогатого скота – П.М. Митрофановым, К.М. Хакимовой, Х.З. Гаффаровым (1977, 1978, 1982, 1984), свиней – В.П. Бердник, В.Д. Настенко (1985, 1986). В 90-х годах микоплазмология шагнула далеко вперед, она стала широко изучаемой наукой в ветеринарии: В.Г. Ощепков, М.Н. Шадрина, Н.Н. Шкиль (2000, 2001); А.П. Красиков, Н.Н. Новикова, Н.В. Рудаков, (2002, 2003); А.П. Красиков, О.А. Сунцова, (2004); А.П., Красиков, С.Б. Лыско, Н.Ф. Хатько, (2005); А.П. Красиков, О.В. Вологодская, А.Н. Свиридова (2006, 2007). В медицине над данной проблемой работали сотрудники института имени Н.Ф. Гамалеи: С.В. Прозоровский, И.В. Раковская, Ю.В. Вульфович и др. (1995, 1997).

Так, над разработкой питательных сред для индикации микоплазм трудились Э.М. Ахмедова, М.М. Меджидов, П.М. Муртузалиева (1998), Н.В. Рудаков, И.Е. Самойленко, О.Б. Калмин, Т.А. Решетникова, Г.В. Березкина из Омского НИИПИ (1998). В.М. Чернов и О.А. Чернова изучали патогенетические основы микоплазмозной инфекции (1996, 1997), а Е.В. Белоусова (1999), В.В. Мананков, В.П. Смелянский, Т.П. Пашнина, Р.А. Рыбкина (1998), А.А. Астапова, Э.А. Мельникова, А.А. Зборовская (2000), Д.Н. Балабанов, И.В. Раковская и др. (2006) разрабатывали методы диагностики микоплазмозов.

В медицинской и ветеринарной практике чаще всего встречаются смешанные инфекции, поскольку имеют место многосторонние взаимодействия макроорганизмов с ассоциациями микроорганизмов. То, что микоплазмоз чаще проявляется в ассоциативной форме, отмечали многие ученые (Д.Б. Алымбаева, Г.Г. Миллер и др., 1985; П.М. Митрофанов, К.М. Хакимова, Х.З. Гаффаров, 1978; А.Я. Пустовар, 1995; З.Х. Ахмедшин и др., 1996; Л.И. Мальцева, 1996; Л.А. Газовская, 1997; Н.Н. Шкиль, 1999, 2000).

Наиболее хорошо изученным примером взаимоотношений «микоплазма – вирус – макроорганизм» являются взаимоотношения *M. arthritidis, A. laidlawii* и вируса Раушера в организме мыши, выявленные в сериях работ сотрудниками Института эпидемиологии и микробиологии АМН СССР (В.Д. Тимаков, Г.Я. Каган, 1973). В этих работах показано, что заражение мышей определенной линии, устойчивой к вирусу Раушера, не приводит к развитию лейкоза, но при одновременной инфекции этих мышей микоплазмами и вирусом Раушера у животных наблюдаются спленомегалия, инфильтрация селезенки незрелыми бластоидными клетками и другие проявления, которые у 20–40 % зараженных мышей переходят в классический лейкоз. Авторы цитируемых работ связывают этот эффект с особой ролью мембранных белков микоплазм и возможным изменением проницаемости мембран клеток мыши (С.В. Прозоровский, И.В. Раковская, Ю.В. Вульфович,1995).

Другими авторами (П.М. Митрофанов, 1978; К.Б. Теохаров, 1998; Н.Н. Шкиль, 2000; L.J. Kusiluka, B. Ojeniyi, N.F. Friis, 2000), при проведении исследований на микоплазмоз было обнаружено, что микоплазмы в большинстве случаев выделяются в ассоциативной форме с бактериальными агентами.

Большой интерес для практической ветеринарии представляет изучение микоплазма-вирусных и микоплазма-бактериальных ассоциаций. Особого внимания заслуживают смешанные микоплазма-вирусные бактериальные инфекции, изучением которых занимались многие исследователи (Г.Г. Миллер, И.В. Раковская, В.Э. Березин, 1991; А.Я Пустовар, 1995; П.П. Фукс, Н.В. Калашник, Г.Б. Герус, 1995; Е.Э. Плотко, 1996; Е.И. Васильева и др., 1997; C. Liu, R.J. Baier, X.J. Qu, 1997).

В 1961 году В.Д. Тимаков и Г.Я. Каган предложили новый принцип классификации – этиологический, основанный на тропизме микоплазм к одинаковым органам и тканям разных хозяев, который был дополнен в 1968 году Г.Я. Каган и И.В. Раковской. Согласно их классификации микоплазмы подразделяются в зависимости от локализации патологического процесса. Микоплазмы в организме как человека, так и животных могут вызывать воспаления легких, суставов и урогенитального тракта. При этом наиболее часто микоплазмы выделяют из верхних дыхательных путей, легких, половых органов и реже из конъюнктивы (D. Edward, 1954; Taulor-Robinson, 1969).

Значение микоплазм в решении проблемы бесплодия крупного рогатого скота начали изучать с начала 50-х годов после того, как в 1947 году D. Edward выделил из вагинальной слизи коров и спермы быков микоплазмы. С помощью этих штаммов ему удалось воспроизвести искусственный вагинит у коров (D. Edward, 1954).

Очень часто в урогенитальном тракте коров и телок обнаруживается *M. bovigenitalium* (D. Edward, 1950; B.E. Albertsen, 1955). E. Bloom, H. Ern (1967, 1970) обнаружили *M. bovigenitalium* в сперме, в пузырьковых железах и других отделах полового

аппарата быков. Они пришли к заключению, что микоплазмы у быков могут быть одной из причин воспаления семенных пузырьков, тестикул и их придатков, но микоплазмы из спермы выделяются нерегулярно. Кроме того, данные авторы утверждают, что за счет наличия микоплазм в половых органах в организме образуются антитела, которые можно выявить, применяя соответствующий антиген. У экспериментально зараженных животных в семенной плазме присутствуют иммуноглобулины классов M, A, G-1 и G-2.

N. Olson (1960), J. Speck (1962) выделяли микоплазмы из вагинальной слизи коров, из спермы и препуциальной слизи быков. M.Hoare, D. Haig (1969), описывая частоту выделения микоплазм из урогенитального тракта коров, указывают, что эти микроорганизмы чаще всего выделяются из яйцеводов. L.A. Page et al. (1972) выделяли микоплазмы из сычуга абортированного плода, а также из плаценты коров. Из полового тракта коров с маститами D. Jasper (1967), J. Kehoe et al. (1967) выделяли *M. agalactiae var. bovis*. При изучении патогенности этого вида микоплазм было установлено, что при введении микоплазм в матку коровам удается вызвать эндометрит и сальпингит. При искусственном осеменении телок спермой, экспериментально контаминированной *M. agalactiae var. bovis*, животные длительное время оставались бесплодными, в некоторых случаях у них наблюдали эндометриты, сальпингиты и спайки яичников.

R. Leach (1970) сообщает о выделении *M. arginini* из спермы клинически здоровых быков и быков больных клиническим везикулитом. D. Edward (1950), M. Hoare (1969) при исследовании материала от бесплодных коров выявляли *A. laidlawii*.

По данным D. Taylor-Robinson (1969), уреаплазмы выделяли из уретры мочевого пузыря, реже из влагалища от 33 % обследованных дойных коров. Особенно часто выделяли их из семенной жидкости быков. Эти штаммы серологически отличались от Т-штаммов уреаплазм человека.

П.М. Митрофанов и И.А. Курбанов (1972) проводили патоморфологические исследования различных органов спонтанно больных и экспериментально зараженных микоплазмами коров и телок. Авторами было установлено, что штаммы микоплазм, выделенные из половых органов, являются слабовирулентными и при введении в половые пути вызывают катаральное воспаление слизистой оболочки. Воспаление сопровождается снижением количества гликогена в эпителиальных клетках, дистрофическими изменениями, а также сдвигом pH влагалищного содержимого в щелочную сторону. При этом активизируется сапрофитная микрофлора, содержащаяся во влагалище, микоплазмы и другие микроорганизмы проникают восходящим путем в полость матки и другие участки полового аппарата, вызывая развитие эндометритов и сальпингитов. У естественно больных животных преимущественно отмечается хроническое воспаление. На это указывали также А.С. Серебряков, В.С. Осколков (1966). По данным авторов, микоплазмы длительно, до 19 месяцев, персистируют в организме хозяина и обладают механизмами, направленными на ускользание от защитных систем (прочное прикрепление к стенке клетки; сходство структуры и биохимического состава мембран с мембранами эукариотических клеток; присутствие в их мембране антигенов, перекрестно реагирующих с антигенами клетки хозяина; наличие структур и субстанций, препятствующих фагоцитозу или подавляющих его).

К активному разрушающему воздействию микоплазм относят способность сохранять жизнеспособность в фагоцитах и оказывать повреждающее действие на макрофаги, что приводит к нарушению их функции и снижению резистентности организма (С.В. Прозоровский и др.,1997). При этом в процессе репликации они используют из клеток макроорганизма аминокислоты, жирные кислоты – предшественники макромалекул, в том числе и ДНК. Образующиеся продукты обмена (аммоний, кислые продукты, пероксидаза, блокирующие метаболиты) нарушают нормальную функцию клеток макроорганизма. Кроме того, мико-

плазмы, преодолевая тканевый барьер, проникают в кровяное русло, в результате чего блокируют систему мононуклеарных фагоцитов.

В последние годы установлено, что в этиологии респираторных болезней телят, наряду с микоплазмами, важную роль играют вирусы (ПГ-3, ИРТ) и хламидии. При этом микоплазмоз, осложнённый хламидийными и вирусными инфекциями, протекает в более тяжёлой форме (А.П. Красиков, В.Э. Малошевич, 2003).

По данным А.Г. Глотова с соавт. (2004), ежегодно по причине респиратоных заболеваний, вызванных несколькими возбудителями вирусной природы в различных сочетаниях, а также с участием микоплазм, пастерелл, сальмонелл, диплококков и других микроорганизмов, гибнет до 30 % телят в возрасте от 1 до 6 месяцев.

Проблема взаимодействия микоплазм, вирусов и бактерий представляет не только теоретический, но и большой практический интерес для медицины и ветеринарии. В течение последнего десятилетия от крупного рогатого скота, выделено около 20 новых видов и сероваров микоплазм и ахолеплазм.

Микоплазмы так же, как и вирусы ИРТ и ПГ-3, относятся к возбудителям, которые оказывают прямое воздействие на респираторный тракт крупного рогатого скота. При попадании в носовую полость или другие участки дыхательного тракта эти микроорганизмы проникают в эпителий, где быстро размножаются и вызывают их гибель. После этого значительная их часть выделяется на поверхность слизистых оболочек, разрушая тем самым этот важный защитный барьер. Эти факторы создают благоприятные условия для активации и усиленного размножения секундарной микрофлоры. Движение воздуха и слизи способствует дальнейшему распространению частиц микроорганизмов по респираторному тракту. В результате нарушения созревания клеток, они замещаются незрелыми, имеющими низкий уровень фибропектина на своей

поверхности. Снижении выработки протеаз клеточной стенкой также приводит к деградации этого белка и созданию условий для адгезии бактерий. Описанные изменения создают благоприятные условия для прикрепления и более быстрого размножения бактерий на поверхности слизистой оболочки клеток верхних дыхательных путей. В результате быстрого размножения они заселяют нижние отделы дыхательных путей. Фагоцитоз этих бактерий затруднён, и часто они устойчивы к воздействию антибиотиков и антител.

Респираторные болезни молодняка крупного рогатого скота являются следствием взаимодествия коплекса факторов: внутренней среды организма, наличия патогенного агента, условий внешней среды, содержания, кормления и генентики животных (А.Г. Глотов и др., 2004).

У крупного рогатого скота, кроме *Mycoplasma mycoides*, вызывающей тяжелые эпизоотии перипневмонии, и *M. verecundum*, вызывающей кератоконъюнктивит, обнаружен еще ряд микоплазм, участвующих в патогенезе массовых легочных заболеваний преимущественно молодняка: выделенную Д. Хэрборн с сотр. (1965) и обозначенную Р. Лич (1967), как *M. bovirhinis*, вызывающую воспаление респираторных органов, *M. dispar* – хроническую пневмонию, *M. canadens* – полиартрит, *M. Bovoculi* – кератоконъюнктивит, осложнённый в некоторых случаях абсцедированием роговицы, её перфорацией, воспалением радужки или хрусталика, гнойным офтальмитом.

Также часто выявляют и уреаплазмы (Р. Гоурлей, 1968-1970; Д. Новаковский, 1971; Л. Томас и Г. Смит, 1972, и др.), *A. laidlawii* (Д. Аль Абауди и Д. Фабрикант, 1971; Д. Хэрборн и соавт., 1965; Д. Шиммель, 1967, 1970, и др.), реже *M. arginini* (А. Трапп, 1966; К. Юрманова, Д. Крейчи, 1971; М.А. Сидоров и соавт., 1972, и др.), *M. bovigenetalium* (В. Волинтир и соавт., 1971; Д. Деллингер и соавт., 1977, и др.), *M. agalactiaevar. bovis* (Д. Аль Абауди и Д. Фабрикант, 1971; А. Ринальди с соавт., 1969, и др.), а также *M. dispar* (Е. Озе и О. Муенстер, 1975; Е. Аллан и соавт., 1976).

Имеются также сообщения о выделении *A. modicum* (Д. Бокори с соавт., 1971) и *M. alcalescens* (Д. Ходсон, Д. Этеридж, 1963; Д. Деллингер с соавт., 1977).

Исследования микоплазм, по данным некоторых авторов (Х. Пири и Е. Аллан, 1975), неообходимо проводить с использованием нескольких элективных питательных сред. С помощью которых ими были обнаружены микоплазмы у 20 телят 6-месячного возраста, переболевших респираторными заболеваниями в 1–3-месячном возрасте. При этом у 8 телят выделили Т-микоплазмы (уреаплазмы), у 6 – *M. dispar*, у 4 – *M. bovirhinis* и у 14 – *A. laidlawii*.

В стационарно неблагополучных хозяйствах Т. Шимицу с сотр. (1975) выделили Т-микоплазмы и обнаружили антитела к ним из легких у 15 из 22 и из трахеи у 9 из 21 больного пневмонией теленка. Тогда как из органов 43 здоровых телят и коров эти возбудители не были выделены. По мнению авторов, среди ряда возбудителей пневмоний телят Т-микоплазмы имеют важное этиологическое значение.

По данным П.М. Митрофанова и Х.З. Гаффарова (1974, 1976), респираторные болезни телят, вызванные *M. bovirhinis*, наблюдаются энзоотически и стационарно в ряде областей Среднего Поволжья, подтверждены в опытах на 47 телятах. П.М. Митрофанов (1977) также описал и патоморфологические изменения у больного скота.

Я.Р. Коваленко и др. (1976) провели исследования материала от телят из четырех откормочных хозяйств, неблагополучных по респираторным болезням. Выделенные ими из легких и лимфоузлов культуры микоплазм в 33% случаев серологически отличались от *M. mycoides, M. arginini, M. bovigenitalium* и ахолеплазм и представляли собой однородную серологическую группу. У подопытных телят, зараженных патологическим материалом или бульонными и бульон-агаровыми культурами микоплазм, в отдельных случаях наблюдалась клиническая реакция (в основном на введение патологического материала), однако при

убое через 29 и 100 дней после заражения изменений в их легких и других органах не обнаружили, а результаты серологических исследований были отрицательными.

Имеющиеся данные позволяют считать, что наибольшее значение при распираторных болезнях телят имеют Т-микоплазмы (уреаплазмы), а также микоплазмы: *M. arginini, M.dispar, M. bovirhinis*.

Несмотря на огромный научный и практический интерес, вопросы сочетания вирус + микоплазма – инфекции в медицине и ветеринарии пока изучены мало. Значительный интерес представляют данные, полученные в УНИИЭВ П.П. Фукс (1973–1977) по моно- и смешанной вирус-микоплазма-инфекциям у телят в спецхозах. При экспериментальном заражении телят местными штаммами вируса инфекционного ринотрахеита и микоплазмами наблюдалось более тяжелое течение болезни. Установлено, что титр антител против вируса ИРТ коррелирует с тяжестью заболевания, в то же время вирус оказывает ингибирующее влияние на выработку противомикоплазмозных антител, вплоть до полного их подавления.

Я.Р. Коваленко, Э.А. Шегидевич, И.А. Яблонская, М.А. Сидоров, В.Н. Афонасьев (1972, 1976, 1977, 1980, 1983) изучили возбудителей микоплазмозной инфекции разных видов животных, а П.М. Митрофанов, К.М. Хакимова, Х.З. Гаффаров целенаправленно – микоплазмоз крупного рогатого скота (1977, 1978, 1980, 1981, 1982, 1984).

Наиболее хорошо изученным примером паразитарной системы «микоплазма – вирус – макроорганизм» являются взаимоотношения *M. arthitidis* и (или) *A. laidlawii* и вируса Раушера в организме мыши, выявленных в сериях работ сотрудниками НИИЭМ имени Н.Ф. Гамалеи АМН СССР под руководством Г.А. Каган и И.В. Раковской (В.Д. Тимаков, Г.Я. Каган, 1973). В этих работах показано, что заражение мышей определенной линии, устойчивой к вирусу Раушера, не приводит к развитию лейкоза, но при одновременной инфекции этих мышей мико-

плазмами и вирусом Раушера у животных наблюдаются спленомегалия, инфильтрация селезенки незрелыми бластоидными клетками и другие проявления, которые у 20–40 % зараженных мышей переходят в классический лейкоз. Авторы цитируемых работ связывают этот эффект с особой ролью мембранных белков микоплазм и возможным изменением проницаемости мембран клеток мыши (С.В. Прозоровский, И.В. Раковская, Ю.В. Вульфович, 1995).

Другими авторами (П.М. Митрофанов, 1978; Н.Н. Шкиль, 2000; L.J. Kusiluka, B. Ojeniyi, N.F. Friis, 2000; А.П. Красиков, Н.В. Рудаков, Н.Н. Николаева, О.В. Вологодская, И.Г. Алексеева, Н.И. Водопьянова, 2001) установлено, что микоплазмы в большинстве случаев выделяются в ассоциативной форме с бактериальными агентами.

Этиологическая роль микоплазм в заболевании свиней считается достоверно установленной с 1965 г., когда Р. Гудвин с соавторами в Англии и С. Маре и У. Свитцер в США воспроизвели пневмонию у поросят, заразив их микоплазмами, которые теперь обозначаются как *M. hyopneumoniae*. Зарегистрированное учеными в Англии и США заболевание в настоящее время широко распространено во всех странах мира с развитым свиноводством, нанося при этом значительный экономический ущерб.В нашей стране микоплазмоз свиней изучали П.Н. Андреев (1928, 1937, 1948); А.И. Носков (1948); В.В. Судаченков (1960); А.Я. Пустовар (1965); Х. Яансон (1965); Д.Ф. Осидзе, В.В. Зуев, Т.П. Малахова (1967); Р.В. Душук (1970); М.П. Демченко (1971); Т.Г. Кольцова с соавт. (1972) и др.

Патогенными видами микоплазм для свиней являются *M. hyopneumoniae, M. hyorhinis, M. hyosynoviae*. Помимо вышеназванных видов микоплазм выделены штаммы, которые не идентифицированы.

Установлено, что *M. flocculare, M. axanthum* и некоторые штаммы ахолеплазм вызывают лимфоцитарную инфильтрацию в слизистой оболочке носовой полости, а также вокруг кровеносных сосудов и бронхиол легких (M. Strasser et al., 1992; Shimmel, Pustovar, 1971; L. Stipkovits et al., 1973, 1974, 1995).

Возбудителя энзоотической пневмонии свиней – *M. suipneumoniae* выделили английские ученые Р. Гудвин, А. Померой и П. Вайтльстон в 1965 г. Вместе с тем независимо от этого С. Маре и В. Свитцер (1965, 1966) выделили этого возбудителя и в США, обозначив его как *M. hyopneumoniae*. Согласно современным данным, в легких больных свиней, помимо *M. Suipneumoniae*, обнаруживаются *M. hyorhinis, M. flocculare, A. laidlawii* и др. Высокий уровень циркуляции *M. hyopneumoniae* был отмечен на свиноводческих фермах и комплексах Германии (E.L. Thacker et al., 1999), Канады (L.D. VanTil et al., 1991), Индии (M. Sitjar et al., 1996), Норвегии (K. Levonen et al., 1994).

M. hyorhinis ранее был изолирован от свиней еще в 1953 г. Switzer. Нередко микоплазмы этого вида обнаруживали в носовой полости данных животных и считали его этиологическим агентом не только полисерозита и полиартрита поросят, но также пневмонии. В 40 % случаев он может быть изолирован из носовой полости и легких при наличии или отсутствии патологоанатомических изменений, а также из других органов и тканей. Несмотря на частое выделение *M. hyorhinis*, клинические признаки серозита и артрита встречают только у 2–5 % зараженных свиней (A.D. Levy et al., 1982).

R.F. Ross и J.B. Duncan (1970) выделили из пораженных суставов поросят *M. hyosynoviae*, который является возбудителем артрита поросят. Вместе с тем его обнаруживают в носовой полости, гортани, других участках дыхательных путей, в конъюнктиве, влагалище, препуции и почках. В зараженном стаде возбудителя можно выявить у 50 % свиноматок.

Одновременно у свиней обнаружены уреаплазмы. Предполагают, что в связи с контаминацией спермы хряков и абортированных эмбрионов, они обладают патогенными свойствами. При искусственном осеменении свиноматок подобной спермой отмечают низкую оплодотворяемость и значительное количество мертворожденных поросят. Возбудитель уреаплазмоза – микроорганизмы рода *Ureaplasma*. Их изолируют из спермы, аборти-

рованных плодов, плодных оболочек, матки свиней. По культуральным, биохимическим и антигенным свойствам уреаплазмы свиней не отличаются от уреаплазм других видов животных и человека, но имеют серологические различия. Установлено, что штаммы, изолированные от свиней, представляют 1 серовар (Stipcovits e tal.,1978).

Таким образом, микоплазмоз свиней также широко распространен во многих странах мира. По данным C.R. Morris et al. от 30 до 80 % поголовья свиней в мире заражено микоплазмами. Часто совместно с микоплазмами выделяются такие возбудители, как *Escherichia coli, Staphylococcus spp., Bordetella bronchiseptica, Streptococcus spp., Proteus spp., Pasteurella multocida, Actinobacillus pleuropneumoniae* (I.M.Smith et al., 1973).

Основным фактором, обусловливающим патогенность микоплазм, является их способность прикрепляться к клеткам респираторного эпителия и оказывать на них деструктивное действие, а также выделять токсические продукты метаболизма, конкурировать с клетками хозяина за отдельные субстраты энергетического и белкового обмена и нарушать иммунологическое состояние тканей (C. Morris, 1995). Установлена способность микоплазм адсорбироваться на поверхности эпителиальных клеток, эритроцитов, лимфоцитов, сперматозоидов и т.д. (Г.Я. Каган, 1982; G. Christiansen, H. Erno, 1982; M. Garcia et al., 1996). Внедрение микоплазм в клетку может приводить к изменению ее антигенной структуры, превращению её в иммунологически чужеродную, что способствует развитию аутоиммунного процесса (А.П. Рысков и др., 1988; M. Iwami et al., 1984). Несомненно, что подобная маскировка «чужеродности» антигенов микоплазм приводит к снижению влияния иммунных факторов организма, увеличению сроков инфекционного процесса, вплоть до персистирующего его течения (С.Н. Борхсениус, О.А. Чернова, 1989; Л.В. Романова и др., 1993; J.C. Chima, O.A. Onoviran, 1982).

Особое место в разрешении вопроса о патогенности микоплазм занимает сочетанное действие их с другими бактериями и

вирусами. Сейчас широко дискутируется вопрос о первостепенности важности микоплазм в патогенезе заболеваний со смешанной этиологией. По-видимому, общего ответа быть не может, но микоплазмы, являясь самостоятельной группой, в содружестве с другими бактериями или вирусами усиливают свое патогенное действие (Г.Г. Миллер, И.В. Раковская, В.Э. Березин, 1991; А.Я. Пустовар, 1995; П.П. Фукс, Н.В. Калашник, Г.Б. Герус, 1995; C.Liu, R.J.Baier, X.J. Qu, 1997). Особенно большое значение этот синергизм приобрел в последние 5–10 лет, поскольку в условиях хозяйств, особенно крупных, все чаще одновременно обнаруживаются 2–3 или больше инфекций.

Большинство микоплазмозов не имеют острой формы течения, но длительное нахождение их возбудителей, создающих пусть мелкие, но множественные очаги поражений, обусловливает реальную опасность проникновения в кровяное и лимфатическое русла, а также непосредственно в органы и ткани других различных микробов и вирусов (П.М. Митрофанов, 1978; Н.Н. Шкиль, 2000; L.J. Kusiluka, B. Ojeniyi, N.F. Friis, 2000). В частности, микоплазмы, паразитирующие в дыхательных органах животных, постоянно разрушают мерцательный эпителий, лишая макроорганизм мощного оборонительного барьера. Они обладают механизмами, направленными на ускользание от защитных систем макроорганизма (прочно прикрепляются к стенке клетки; сходны со структурой и биохимическим составом мембран с мембранами эукариотических клеток; в их мембране присутствуют антигены, перекрестно реагирующие с антигенами клетки хозяина; имеют структуры и субстанции, препятствующие фагоцитозу или подавляющие его).

Микоплазмы также обладают активным разрушающим воздействием на защитные системы макроорганизма (сохраняют жизнеспособность в фагоцитах, оказывают повреждающее действие на макрофаги, что приводит к нарушению их функции и снижению резистентности организма). Кроме того, микоплазмы преодолевают тканевый барьер, проникают в кровяное русло, в

результате чего блокируют систему мононуклеарных фагоцитов. Вступают в синергетические отношения с вирусной, бактериальной, патогенной и условно патогенной микрофлорой, создают условия для ее активного роста и развития.

Таким образом, приведенные данные показывают, что микоплазмоз широко распространен в природе и является важным этиологическим аспектом при различных патологических состояниях (бронхиты, бронхопневмонии, полисерозиты, полиартриты, конъюнктивиты, эндометриты).

1.5. Методы лабораторной диагностики микоплазмозов

Широкое распространение микоплазмозов среди животных, птиц и человека является основной предпосылкой для разработки более чувствительных и специфичных средств и методов диагностики этих заболеваний. Быстрое и своевременное распознавание микоплазмозов является решающим моментом в проведении комплекса эпизоотологических, ветеринарно-санитарных и профилактических мероприятий, направленных на локализацию и предупреждение дальнейшего распространения болезни. Непосредственное выделение микоплазм от больных животных при естественных и экспериментальных инфекциях удается осуществить с большим трудом и, в основном, в остром периоде болезни.

Однако используемые для выделения микоплазм методы, обладая рядом определенных преимуществ (специфичность, воспроизводимость), не лишены и существенных недостатков (низкая чувствительность, трудоемкость и продолжительность исследования). Поэтому совершенствование средств и методов диагностики микоплазмозов остается актуальной проблемой.

Биоматериал для исследования на микоплазмоз берут extempore. При необходимости транспортировки его помещают в термос со льдом, хранят в течение нескольких часов при температуре 4 ˚С, для более длительного хранения материал помещают в холодильник при минус 20 ˚С. Материал из носовой полости,

гортани, трахеи, наружных половых органов берут ватным тампоном. Из внутренних органов и тканей делают гомогенизат в фосфатном буфере или жидкой питательной среде. Чрезмерно измельчать ткани нежелательно, так как при этом освобождаются лизолейцин, лектин и другие энзимы, ингибирующие рост микоплазм (Kaklamanisetal., 1969;Rashid, Jordan, 1978).

Э.А. Шегидевич (1976) предложил схему исследования патологического материала на наличие микоплазм без применения ингибиторов – пенициллина и уксуснокислого таллия. Для очистки исследуемых объектов от бактериальных контаминантов целесообразно использовать физические методы – фильтрацию и центрифугирование, которые в прошлом с успехом применяли исследователи, изучавшие перипневмонию крупного рогатого скота, плевропневмонию коз, агалактию овец и коз и т. д. При выделении микоплазм необходимо проводить полный бактериологический анализ исследуемого объекта, используя для этого набор питательных сред различных прописей. Эту методику приняли за основу многие ученые, занимавшиеся изучением микоплазмоза сельскохозяйственных животных.

Для обнаружения микоплазм в мазках-отпечатках, а также в мазках, приготовленных из культур, их окрашивают по Романовскому-Гимзе. Возбудитель при световой микроскопии выглядит в виде кокков, биполярных, перстневидных и сферических образований, а также может иметь звездчатую, нитевидную форму (А.Я. Пустовар и др., 1978; А.А. Атамась, 1986; Г.Ф. Коромыслов и др., 1987).

Для подавления бактериальной флоры при первичном посеве биоматериала П.М. Митрофанов (1982) рекомендует добавлять к питательным средам пенициллин в дозе 1000 ЕД/мл и ацетат таллия (в конечной концентрации 1:2000), а для исключения роста L-форм бактерий проводить 3–5 последовательных пассажей выделенных культур с 5-дневными интервалами на сывороточных питательных средах без ингибиторов для восстановления исходных форм бактерий.R. Yamamoto et al. (1971) для подавления роста посторонней микрофлоры использовали канамицина

сульфат (2 мкг/мл), а Н. Фриис (1971) с этой целью применял среду с добавлением бацитрацина и метициллина в концентрации 0,15 мг/мл. Позже Фриис (1975) предложил более простую и эффективную среду из модифицированного солевого раствора Хэнкса, PPLO-бульона и сердечно-мозгового настоя Дифко, дрожжевого экстракта, бацитрацина и сыворотки крови поросят.

В.А. Атамась (1986) для диагностики микоплазмоза свиней рекомендует применять выделение культуры возбудителя на специальных питательных средах, после чего проводить идентификацию в реакции ингибиции роста типоспецифическими антисыворотками в РА или РСК.

С.Н. Борхениус, О.А. Чернова (1989) предлагают следующие методы для обнаружения и идентификации микоплазм: посев на специальные среды, электронную микроскопию, люминесцентную микроскопию в сочетании с окраской ДНК, обычную световую микроскопию с авторадиографией, введение Б-метилпуриндезоксирибозида (БМПДР) непосредственно в культуральную среду, иммунологические с использованием нефракционированных антисывороток, поли- и моноклональных антител, гибридизационные с использованием РНК- и ДНК-зондов.

C. Gil-Juarez, B.A. Calderon, J. Montero, A. Yanez, L. Cedillo (1996) индикацию микоплазм осуществляли культуральным методом, а видовую идентификацию проводили с помощью полимеразной цепной реакции. T. Schaeverbeke, H. Renaudin (1997) также производили систематическое детектирование микоплазм с помощью культурального метода и ПЦР, при этом в каждой исследуемой пробе проводили также и титрацию возбудителя в патологическом материале.

Необходимость комплексной диагностики обусловлена недостаточной эффективностью отдельных методов исследования при первичном установлении этой болезни, трудностью выделения и культивирования возбудителя (Х.З. Гаффаров, 1970; К.А. Дорофеев, 1963; Э.А. Шегидевич с соавт., 1972; Treszczynsky, Piloszec, 1976).

Данные зарубежной и отечественной литературы по методикам индикации и идентификации возбудителя микоплазмоза из первичного материала указывают, что современная диагностика основывается в первую очередь на микробиологических и иммунологических методах. Для этого проводят культивирование биоматериала на специальных питательных средах для индикации микоплазм, и затем подвергают исследованиям с помощью экспресс-методов: ИФА, РИФ, РА, с использованием моно- и поликлональных антител и ДНК-зондов, ПЦР и некоторых других методов.

Методы индикации и идентификации микоплазм

Микоплазмы – очень лабильные, прихотливые к питательным средам и pH микроорганизмы, поэтому, несмотря на их широкое распространение, имеется ряд трудностей в методике их выделения, идентификации и дифференциации от L-форм бактерий.

Различия между методами индикации и идентификации микоплазм состоят в их применении в медицине или в ветеринарии, в видовой характеристике животных (крупный рогатый скот, мелкий рогатый скот, свиньи), а также от формы проявления болезни (конъюнктивальная, суставная, легочная, урогенитальная). В зависимости от этого следуют принципиальные отличия во взятии биоматериала и первичной его обработке с целью выделения микоплазм, а также сопутствующей микрофлоры, являющейся ассоциирующей в течение всего инфекционного процесса.

К классическим подходам лабораторной диагностики относится бактериологический метод выявления и культивирования микоплазм с использованием жидких, полужидких и плотных питательных сред, с последующей идентификацией на основе морфологических, культуральных, биохимических и антигенных свойств, использования молекулярно-генетических методов (ПЦР – диагностика).

В мазках из пораженных тканей, а также из бульонных и

агаровых культур клетки микоплазм не окрашиваются, по Граму, но хорошо красятся, по Романовскому-Гимза и Динсу. Это отличает микоплазмы от бактерий. В мазках микоплазмы имеют форму округлых, овальных и кольцевидных образований, иногда могут быть нитевидные мицелиальные формы (E.Kieneberger-Nobel, 1966; Я.Р. Коваленко и др., 1967, 1977).

Электронно-микроскопическими исследованиями и путем фильтрования культур через мембранные фильтры с известным диаметром пор было показано, что в одной и той же культуре имеются различные по форме и величине образования, способные к репродукции, величина этих элементарных частиц колеблется от 125 до 600 нм (Я.Р. Коваленко и др., 1976). Вместо клеточной стенки микоплазмы имеют трехслойную мембрану, содержат цитоплазму и ядерный материал в виде ДНК, рибосом и рибосомальных структур с гранулированным материалом и вакуолями. Мембрана клетки состоит из полярных липидов и протеинов. Ультраструктура микоплазм варьирует в зависимости от вида, условий культивирования, методов обработки препарата, а также от возраста культуры и фазы роста.

Поскольку микоплазмы не имеют клеточной стенки, они трудно адаптируются на питательных средах и очень требовательны к различным биологическим компонентам среды. В жидких питательных средах микоплазмы вызывают незначительную опалесценцию, реже – заметное помутнение среды. Отдельные виды микоплазм образуют на поверхности среды легко разбивающуюся маслянистую пленочку. В полужидких питательных средах микоплазмы растут или по уколу, или же образуют крошковатые колонии различной конфигурации, равномерно взвешенные в среде (Я.Р. Коваленко с соавт., 1971; Г.Ф. Коромыслов и др., 1987).

На плотных питательных средах микоплазмы формируют характерные колонии, напоминающие по форме яичницу-глазунью. Отдельные виды формируют одновременно выпуклые колонии без четко выделяемого центра. Колонии разных видов

микоплазм имеют морфологическое сходство, и по культурально-морфологическим свойствам невозможно отличить микоплазмы, выделенные от животных и птиц при различных заболеваниях. Размер и форма колоний зависят не от видовой принадлежности микоплазм, а от качества питательных сред, условий и длительности культивирования и других факторов внешней среды (E.Freundt, 1960; Я.Р. Коваленко с соавт., 1972).

Э.А. Шегидевич с совторами (1972) предложили схему исследования патологического материала на наличие микоплазм, суть которой заключается в том, что, во-первых, при выделении необходимо отказаться от употребления ингибиторов – пенициллина и уксуснокислого таллия. Для очистки исследуемых объектов от бактериальных контаминантов целесообразно использовать физические методы – фильтрацию и центрифугирование, которые в прошлом с успехом применяли исследователи, изучавшие перепневмонию крупного рогатого скота, плевропневмонию коз, агалактию овец и коз и т.д.; во-вторых, при выделении микоплазм необходимо проводить полный бактериологический анализ исследуемого объекта, используя для этого набор питательных сред различных прописей.Данная методика была принята за основу многими исследователями, занимавшимися изучением микоплазмоза сельскохозяйственных животных.

Вместе с тем П.М. Митрофанов (1982) рекомендует добавлять к питательным средам пенициллин в дозе 1000 ЕД/мл и ацетат таллия (в конечной концентрации 1:2000) для подавления бактериальной флоры при первичном посеве биоматериала, а для исключения роста L-форм бактерий проводить 3–5 последовательных пассажей выделенных культур с 5-дневными интервалами на сывороточных питательных средах без ингибиторов для восстановления исходных форм бактерий.

С.Н. Борхениус, О.А. Чернова (1989) предлагают методы для обнаружения и идентификации микоплазм с использованием клеточных культур в последовательности: посев на специальные среды, электронная микроскопия, люминесцентная микроскопия

в сочетании с окраской ДНК, обычная световая микроскопия с авторадиографией, введение Б-метилпуриндезоксирибозида (БМПДР) непосредственно в культуральную среду, иммунологические с использованием нефракционированных антисывороток, поли- и моноклональных антител, гибридизационные с использованием РНК и ДНК-зондов.

Ю.В. Вульфович и др. (1995) для сравнительной оценки различных методов лабораторной диагностики урогенитальных микоплазмозов и уреаплазмозов использовали различные методы диагностики. Микробиологический, то есть посев на питательные среды, пригодные для культивирования микоплазм и уреаплазм; серологические методы обнаружения антигенов возбудителей и антител к ним, а также метод обнаружения специфических антигенов в мазках-отпечатках исследуемых тканей с помощью реакции иммунофлуоресценции (РИФ). С помощью непрямой РИФ выявляли антигены возбудителей в мазках отпечатках приготовленных из отделяемого уретры, влагалища и цервикального канала. Для серологического выделения микоплазмозных антител возбудителей использовали реакцию агрегат-гемагглютинации (РАГА), а для определения титров специфических антител – реакцию пассивной гемагглютинации (РПГА). Данный комплекс используемых лабораторных методов, по мнению авторов, достаточно эффективен для диагностики урогенитальных микоплазмозов и уреаплазмозов. Вместе с тем при исследовании материала в каждом случае целесообразен дифференцированный подход в зависимости от клинического диагноза у данного больного.

C. Gil-Juarez, B.A. Calderon, J. Montero, A. Yanez, L. Cedillo (1996) индикацию микоплазм осуществляли культуральным методом, а видовую идентификацию проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).T. Schaeverbeke, H. Renaudin (1997) также производили систематическое детектирование микоплазм с помощью культурального метода и ПЦР, при этом в каждой исследуемой пробе проводили также и титрацию возбу-

дителя в патологическом материале.

Т.А. Гасанова (2001) подтверждает их данные и считает, что хронические воспалительные заболевания, обусловленные многокомпонентными паразитоценозами, включающими представителей разных таксономических групп (бактерии, вирусы, грибы, простейшие), нужно диагностировать не только с помощью качественных и количественных характеристик микроорганизмов, но также наряду с ними необходимо применение других критериев – функциональных для описания микроэкологического статуса репродуктивной системы. Следовательно, если микроорганизм и его антигены определяются с помощью иммунофлуоресценции (ИФ), иммуноферментного анализа (ИФА), полимеразной цепной реакции (ПЦР), ДНК-гибридизации, но не изолируются в культуре клеток или изолируются в персистентной форме, то он вряд ли может быть этиологически значимым компонентом. У микроорганизма – «лидера» должен быть высокий уровень метаболизма и вирулентности.

Поэтому для диагностики паразитоценоза урогенитального тракта при хронических воспалительных процессах необходимо использовать лабораторные тесты двух уровней: тесты 1 уровня (скринигирующие) для качественной характеристики паразитоценозов и тесты 2 уровня (культуральные) для их количественной и функциональной характеристики. К тестам 1 уровня относятся: микроскопия мазков с окраской, по Граму, и Романовскому-Гимзе для общего представления о паразитоценозе; индикация возбудителей методами прямой (РПИФ) и непрямой (РНИФ) иммунофлуоресценции, иммуноферментного анализа (ИФА) или полимеразной цепной реакции (ПЦР), ДНК-зондов; серологическое исследование методом имуноферментного анализа (ИФА). Тестами 2 уровня, позволяющими определить уровень метаболизма патогенов, являются классические культуральные либо быстрые культуральные методы с типированием возбудителя с помощью моноклональных антител (МАТ) или поликлональных антител (ПАТ). Последние являются не только более быстрыми,

но и более точными, специфичными и чувствительными методами определения микоплазм в биологическом материале. Такая двухуровневая диагностика позволяет получить исчерпывающую информацию о качественной, количественной и метаболической характеристике паразитоценозов урогенитального тракта.

Изучая чувствительность различных методов диагностики микоплазмозной инфекции урогенитального тракта у людей, Д.Н. Балабанов с соавторами (2006) сравнивал культуральный метод, ПЦР, реакцию гемагглютинации (РГА), реакцию пассивной гемагглютинации (РПГА), реакцию агрегат-гемагглютинации (РАГА), РИФ и ИФА. Было отмечено, что культуральным методом микоплазмы выявляются реже; сложность постановки РПГА и РАГА определяется отсутствием стабильных диагностикумов.

Gil-Juarez C., Calderon B. A., Montero J., Yanez A., Cedillo L. (1996) индикацию микоплазм и уреаплазм осуществляли культуральным методом, а видовую идентификацию –в ПЦР.

Во Франции (Schaeverbeke T., Renaudin H., 1997) систематическое детектирование микоплазм производили с помощью культурального метода и ПЦР, диагностику методом посевов подтверждали результатами в ПЦР и РИФ. При этом в каждой исследуемой пробе проводили титрацию возбудителя в клиническом материале.

Анализ данных зарубежной и отечественной литературы по методикам индикации и идентификации возбудителя микоплазмоза из первичного материала свидетельствует о том, что современная диагностика основывается в первую очередь на микробиологических и молекулярно-генетических методах. С этой целью исходный материал культивируют на специальных питательных средах для роста микоплазм и затем подвергают исследованиям с помощью экспресс-методов, которыми в первую очередь является ПЦР, так как это не только быстрый, но и наиболее точный метод выявления минимального количества микоплазменной ДНК, а также ИФА, РИФ, с помощью моно- и

поликлональных антител и ДНК-зондов.

1.5.1. Индикация, идентификация и культивирование микоплазм на питательных средах

Трудности выделения микоплазм и ахолеплазм из различных объектов постоянно вынуждали исследователей вести поиски наиболее оптимальных питательных сред для выделения и поддержания этих микроорганизмов, поскольку они не имеют клеточной стенки, трудно адаптируются на питательных средах, растут медленно и очень требовательны к различным биологически активным компонентам. Т. е., по мнению С.Н. Борхсениуса и О.А. Черновой (1989), ограниченные метаболические возможности микоплазм естественно определяют сильную зависимость этих микроорганизмов от ростовой среды от присутствия в ней многих специфических, в том числе богатых энергией соединений. В настоящее время для культивирования микоплазм предложено значительное количество питательных сред. Подавляющее большинство их состоит из трех основных компонентов (питательная основа, дрожжевой экстракт, сыворотка или асцитическая жидкость), а отличаются они друг от друга типом и методом приготовления.

Длительное время исследователи использовали для выделения этих возбудителей бульон Мартена и лошадиную сыворотку, с течением времени среды постепенно обогащались питательными добавками (витаминами, аминокислотами, минеральными солями), необходимыми для роста микоплазм.

Питательная основа составляет большую часть среды, которую получают с помощью различных технологий и животноводческих продуктов. Для этих целей используют: ферментативное переваривание животных тканей (H. Schoetensack, 1934; A. Turner 1960; T. Barber, J. Fabricant, 1962), настой сердечной мышцы крупного рогатого скота с добавлением 1 % пептона (D. Edward ,W. Fitzgerald, 1951); обезвоженную вытяжку бычьего сердца и бакто-пептон (W. Morton, 1949), в дальнейшем получая

обезвоженную питательную среду в виде бакто-PPLO бульона или агара (Difco). Также применяют триптический перевар конины или триптический перевар сердца крупного рогатого скота (E. Klieneberger-Nobel, 1959; R. Lemcke, 1965; В.Д. Тимаков, Г.Я. Каган , 1973; П.М. Митрофанов, 1982).

Добавление дрожжевого экстракта обогащает питательную среду и повышает скорость роста микоплазм, наиболее требовательных к составу питательных сред (T. Barber , J. Fabricant , 1962; R. Chanock , L. Hayflick, M. Barile, 1962). Определенное значение имеет также технология приготовления дрожжевого экстракта. R. Lemcke (1965). Ссылаясь на неопубликованные данные Hers, указывает, что автором были внесены ценные изменения в рецепт приготовления дрожжевого экстракта, которые в значительной степени улучшали качество среды Хейфлика. Он отмечает, что вместо кипячения Hers предложил экстрагировать суспензию дрожжей при температуре 80 ^{0}C и pH 4,5, а затем фильтровать ее через стерилизующие пластинки фильтра Зейтца. Поскольку готовый дрожжевой экстракт имел кислую реакцию, для восстановления pH питательной среды до значения 7,8–8,0 автор рекомендовал добавлять к питательной среде K_2HPO_4, что обеспечивало рост типичных колоний с четко выраженным врастающим в агар центром и окружающей его периферической зоной.

Сыворотка крови является самым важным компонентом, входящим в состав питательных сред, в то же время количественные и качественные характеристики ее различны. B. Tang с соавторами (1936) испытали влияние сывороток различных видов животных на развитие возбудителя перипневмонии крупного рогатого скота и установили, что сыворотки лошадей овец и кроликов благоприятно влияли на развитие этих микроорганизмов. В то же время сыворотки морских свинок, крупного рогатого скота были мало пригодны для этих целей. Аналогичные выводы сделал D. Edward (1950) в отношении сыворотки крупного рогатого скота при изучении 17 штаммов микоплазм различного происхождения. По данным Я. Р. Коваленко (1976), свиная и лоша-

диная сыворотка в 20%-ной концентрации благоприятно влияют на размножениемикоплазм шести исследованных видов, в то время как сыворотка крупного рогатого скота в концентрации 10% и более оказывала ингибирующее действие на некоторые виды этих микроорганизмов. Оценивая качество сывороточной фракции PPLO (Difco) установлено, что эта фракция не заменяет цельной сыворотки и часто не обеспечивает удовлетворительного развития некоторых видов микоплазм.

В качестве дополнительных факторов роста микоплазм отдельные исследователи рекомендовали следующее: E. Klieneberger-Nobel (1959) – вносить в питательные среды 5 %-ную суспензию эритроцитов, а также некоторые аминокислоты, сахара, витаминые и минеральные добавки; D. Edward, W. Fitzgerald (1951) – включать ДНК тимуса и муцин свиных желудков; Э.М. Ахмедова, М.М. Меджидов (1998) предложили витаминный препарат «ЭКД». Все перечисленные выше компоненты являются основными и определяющими качество питательной среды в отношении её ростовых свойств. Второе главное свойство среды – это её селективность, т. е. избирательность в отношении посторонней микрофлоры, поэтому для подавления бактериальных контаминантов добавляют пенициллин, уксуснокислый таллий, сульфадимезин, полимиксин В, ампициллин и другие антибактериальные препараты, к которым микоплазмы и ахолеплазмы не чувствительны.

Несмотря на многочисленность питательных сред, рекомендованных для выделения и культивирования микоплазм, до настоящего времени не создано универсальной питательной среды, которая могла бы обеспечить удовлетворительное развитие всех известных видов этих микроорганизмов. Это объясняется их биохимизмом и различным pH, так как одним видам микоплазм требуется сдвиг в щелочную сторону, а другим – в кислую. Микоплазмы и уреаплазмы являются стеролозависимыми, а ахолеплазмы нет, поэтому следует учитывать концентрацию и видовую специфичность используемой сыворотки в питательной среде, а также действие ингибирующих факторов (антибиотики,

сульфаниламиды и т. д.).

Следовательно, культуральный метод диагностики микоплазмозов является наиболее достоверным с позиций доказательной медицины, так как выделение микоплазм на питательных средах однозначно свидетельствует о присутствии их в организме.

Среда НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи для выделения микоплазм успешно применялась не только в медицинской, но и в ветеринарной практике, о чем свидетельствуют работы Я.Р. Коваленко (1977); П.М. Митрофанова (1982); Н.Н. Шкиля (2000). Также часто используется среда ВИЭВ и УНИИЭВ, это отражено в работах П.И. Притулина и др. (1972); Я.П. Пустовара (1977); В.П. Бердника (1986).

Российские ученые для выделения микоплазм используют прописи отечественных сред, однако имеется также импортные стандартные среды. В 1995 г. F. Vazquez, F. Carreno, A.F. Perez, M.M. Cuesta, M.L. Ordonez, V. Palacio было проведено сравнение двух коммерческих методов индикации *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* с использованием агаровой А7 (BioMerieux, France) и двух жидких питательных сред Mycoplasma IST (BioMerieux, France) и Myco Fast ALL-IN (Unipath, U.K.). В результате проведенного опыта был сделан вывод, что среда Mycoplasma IST чувствительней, чем Myco Fast ALL-IN при изоляции из биоматериала *Mycoplasma hominis*, но в то же время оба метода имеют ограничения при выделении *Ureaplasma urealyticum*, которые компенсируются при добавлении агаровой среды А7.

Ведущим методом в диагностике инфекционных болезней, в том числе и микоплазмозов, остается выделение возбудителя на питательных средах.

Микоплазмы, будучи факультативными мембранными паразитами, очень требовательны к условиям культивирования. Поэтому питательные среды для выделения микоплазм должны содержать всю совокупность ингридиентов, необходимых для их жизнедеятельности. Питательная среда должна обеспечить микоплазмам источник энер-

гии. Это обеспечивается экстрактами, полученными при отваре сердечной мышцы, печени, желудка и других органов, а также добавлением в среду определенных субстратов: глюкозы (для глюкозоферментирующих микоплазм), аргинина (для аргининзависимых), мочевины (для уреаплазм). При разложении последних образуются продукты (кислоты, аммоний, углекислый газ), которые резко изменяют pH среды, поэтому питательная среда должна иметь определенные буферные свойства. Добавление дрожжевого экстракта в среду повышает скорость роста микоплазм, наиболее требовательных к составу питательных сред (Barber T., Fabricant J., 1962; Chanock R., Hayflick L., Barile M., 1962).

Содержание стерола в питательной среде необходимо для всех видов микоплазм и уреаплазм. Для этого в среду вводят сыворотку крови животных, чаще лошадей, свиней, индеек. Она также может быть заменена сывороточной фракцией PPLO (Дифко), содержащей гликопротеины и липопротеины или комбинации альбумина, холестерола и жирных кислот. Некоторые виды микоплазм нуждаются в холестерине. Они получают холестерин и липиды извне, без затраты энергетических ресурсов (S. Rottem, 1982). Холестерин имеет большое значение для обеспечения транспорта ионов калия через мембрану (И.Г. Скрипаль, 1984).

Питательная среда должна включать ингибиторы, задерживающие рост посторонней бактериальной и грибковой микрофлоры, но не влияющие на размножение микоплазм. Для этой цели чаще используют ацетат таллия, задерживающий рост грамотрицательных бактерий, а также пенициллин, который ингибирует развитие грамположительных бактерий (Edward, 1947). Для задержки роста грибов используют амфотерицин Б до 2,5 мкг/мл (Г.Ф. Коромыслов, 1987).

Некоторые исследователи для стимуляции роста микоплазм рекомендуют добавлять в питательные среды 5 %-ную суспензию эритроцитов, выборочно аминокислоты, сахара, витаминные и минеральные добавки (D. Edward, W. Fitzgerald, 1951; E. Klieneberger-Nobel, 1962; Э.М. Ахмедова, М.М. Мед-

жидов, 1998).

Подавляющее большинство известных видов микоплазм хорошо растет на питательной среде, предложенной D.G. Edward еще в 1947 г. и модифицированной L. Hyflick в 1965 г. Основу среды составляет перевар сердечной мышцы крупного рогатого скота, пептон, дрожжевой экстракт и сыворотка крови лошади. В дальнейшем для более быстрого и лучшего роста микоплазм стали вносить в них добавки – питательные компоненты: витамины, аминокислоты, минеральные соли и т.д.

Многими учеными, изучавшими микоплазмы, были предложены прописи питательных сред для их культивирования (A.Turner, 1935; Fitzgerland W. 1951; Tourtellotte et al., 1964; Goodwin et al., 1965; Shepard, Lunceford, 1970; В.В. Киприч, 1974; Friis, 1975 и др.), которые состоят из основных компонентов, необходимых для роста микоплазм (питательная основа, сыворотка, дрожжевой экстракт).

Культивирование микоплазм свиней в жидкой бесклеточной среде впервые провели Р. Гудвин и П. Вайтльстон (1964). Их усовершенствованная среда А-26 Кембридж содержала хартлей-бульон, солевой раствор Хэнкса, лактальбумина гидролизат, свиную сыворотку и другие компоненты и обеспечивала накопление бактериальной массы до 10^8 –10^9 цветообразующих единиц (ЦОЕ) в 1 мл.

Американские исследователи использовали среду на основе буферного раствора по Дюльбеко с добавлением индюшиной или свиной сыворотки (С. Маре и В. Свитцер, 1966; Лам и Свитцер, 1971). Бульонная среда А, разработанная в Канаде (К. Лекюэ, 1969), содержит муцин желудка.

Н. Фриис (1969, 1971), изучая этиологию микоплазмозной пневмонии в Дании, с успехом использовал среду FF-1, являющуюся модификацией среды А-26. В состав среды входят сердечно-мозговой настой и PPLO-бульон фирмы Дифко.

Существуют коммерческие сухие среды, выпускаемые фирмой Дифко, использование которых гарантирует стандарти-

зацию работ. В НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи АМН СССР была разработана технология приготовления питательных сред на основе триптического перевара сердечной мышцы крупного рогатого скота (В.Д. Тимаков, Г.Я. Каган, 1973). Она успешно применяется в ветеринарной практике для диагностики микоплазмоза, о чем свидетельствуют работы Я.Р. Коваленко (1977), П.М. Митрофанова (1982), Н.Н. Шкиля (2000).

Среды ВИЭВ (в её основе пептон Мартена и мясная вода в равных количествах) и УНИИЭВ (триптический гидролизат, разведенный дистиллированной водой до концентрации аминного азота – 200 мг%) использовал в своих исследованиях для выделения микоплазм от свиней В.П. Бердник (1986).

В настоящее время продолжается поиск и испытание ряда других питательных сред. Так, в НПО «Питательные среды» совместно с НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи АМН СССР разработана среда на основе рыбного гидролизата. Эта основа может быть использована для приготовления питательных сред, пригодных для выделения и культивирования микоплазм и уреаплазм.

Некоторые виды микоплазм требуют добавления в среду ДНК или ее предшественников. Труднокультивируемые штаммы лучше растут в присутствии L-цистеина, NADH (никотинамид динуклеотида) и некоторых витаминов (E.A.Freundt, 1983).

Отдельные виды микоплазм и ахолеплазм можно культивировать на полусинтетических питательных средах, что очень важно как для изучения их метаболизма, так и для проведения генетических исследований; полусинтетические многокомпонентные комплексные среды, обозначаемые как среды С (SF–CS). Вариант такой среды (С4) пригоден также для культивирования некоторых штаммов *M. mycoidesvar. mycoides*.Эта среда содержит азотистые основания (тимин, урацин, гуанин), аминокислоты, альбумин бычьей сыворотки, глюкозу и глутамин, холестерин, пальмитиновую и олеиновую кислоты, рибофлавин и кофермент А. Для интенсификации роста рекомендуется добавлять в эту среду гидролизат казеина

(A.W. Rodwell, 1983).

Уреаплазмы требуют присутствия в среде мочевины. Для выделения уреаплазм из клинического материала можно использовать несколько прописей сред. Их основой является триптиказосоевый бульон и дрожжевой экстракт. В качестве добавок используют сыворотку крови лошади, мочевину, L-цистеин, пенициллин и индикатор – феноловый красный (M.C. Shepard, 1983). Можно использовать также среду Робертсона (J.A. Robertson, 1978) или дифференциальную агаровую среду А8. Среда Робертсона содержит PPLO бульон, дрожжевой экстракт, в качестве индикатора – бромтимоловый голубой, а также сыворотку крови лошади, мочевину, антибактериальные препараты.

В последние годы появились зарубежные тест-системы, пользуясь которыми можно определять на жидкой питательной среде не только наличие того или иного микоплазмозного возбудителя, но и его концентрацию в исследуемом биологическом материале: «Mycoplasma DUO» производства французской фирмы «Sanofi Pasteur»; «Mycoplasma 1ST» производства «BioMeriex» (В.П. Адаскевич, 2006).

В России используются прописи отечественных сред. В Омском НИИПИ профессором В.Н. Рудаковым (2000) были разработаны питательные среды (для глюкозоферментирущих, аргининзависимых микоплазм и разлагающих мочевину уреаплазм), которые с положительным результатом применялись в исследованиях при микоплазмозе собак, кошек и серебристо-черных лисиц Н.Н. Новиковой (2000), при микоплазмозе птиц О.А. Сунцовой (2004), С.Б. Лыско, Н.Ф. Хатько (2005), при урогенитальном микоплазмозе крупного рогатого скота О.В. Вологодской (2006) и ассоциативном микоплазмозе телят А.Н. Свиридовой (2007). Данные среды более экономичны и адаптированы к «местным» штаммам микоплазм, циркулирующих в животноводческих хозяйствах Омской области, которые могут быть апробированы и усовершенствованы для других регионов Рос-

сии. Данные среды позволяют проводить не только индикацию микоплазм, но и их дифференциацию в зависимости от их ферментативной активности.

Таким образом, все представители класса Mollicutes нуждаются в многокомпонентных питательных средах, содержащих стеролы, предшественники нуклеиновых кислот, аминокислоты, витамины и др. В то же время представители различных таксономических групп требуют для их роста специальных сред или добавок к ним.

На жидких питательных средах рост микоплазм характеризуется опалесценцией или незначительным помутнением, а также изменением цвета среды, содержащей индикатор. Отдельные виды микоплазм образуют незначительный осадок или тонкую пленку на поверхности среды (А.Я. Пустовар, В.В. Киприч, И.К. Авдосьева, 1978).

При культивировании микоплазм в полужидкой среде можно видеть отдельные мелкие колонии, состоящие из полиморфных клеток: глобул (0,3–0,8 мкм), зерен, нитей, клеток грушевидной кокковидной или гантелевидной формы (Д. Глобер, 1988; А.Я. Пустовар и др., 1978).

На плотных питательных средах микоплазмы образуют колонии с плотным врастающим в агар центром и нежной поверхностной периферией, похожие на яичницу-глазунью. Размеры колоний варьируют от 50 до 500 мкм. В структурной организации колоний наблюдается определенная закономерность: ее поверхностную часть составляют более крупные, иногда вакуолизированные клетки, а центральную, глубинную часть – мелкие оптически плотные клетки, что хорошо видно при фазово-контрастной микроскопии (M. Falguera et al., 1996). При отсутствии роста на плотных средах в течение 5 суток проводят не менее 5 слепых последовательных пассажей, после чего делают заключение о результате исследования (Г.Ф. Коромыслов, Я. Месарош, Л. Штипкович, 1987).

Для исключения ложноположительных результатов, напри-

мер, проявлений уреазной или аргининазной активности некоторыми микрооганизмами, а также дифференцирования уреплазм и микоплазм, производят одновременный посев патологического материала или пересев выделенной культуры с жидкой питательной среды на плотную с целью последующей идентификации выросших микроколоний возбудителей, которые имеют характерную для каждого вида морфологию. При прямом посеве патологического материала на плотные питательные среды производят подсчет выросших микроколоний для определения этиологически значимой концентрации микоплазм в колониеобразующих единицах.

Микробиологический метод диагностики микоплазмоза (цветная реакция) основан на расщеплении мочевины, необходимой для роста уреаплазм, ферментации глюкозы или аргинина, изменении pH и, как следствие, изменении цвета среды, в которую добавлен индикатор. Наиболее оптимальной и часто практикуемой основой для роста микоплазм признана среда, в состав которой входят гидролизат (триптический перевар) сердца крупного рогатого скота, лошадиная сыворотка и дрожжевой экстракт. Для оптимизации роста в среды вносятся обогащающие добавки, прежде всего аминокислоты L-цистеин и L-аргинин. Поскольку состав микоплазмозных сред вполне подходит и для развития истинных бактерий, для подавления последних в среды добавляют пенициллин в большой концентрации (от 1000 до 2500 ЕД/мл), иногда другие антибиотики, к которым микоплазмы резистентны. Микоплазмы респираторного тракта могут культивироваться как на жидких, так и на плотных питательных средах. При микробиологической диагностике применяют, как правило, и первый, и второй варианты.

Посев биологического материала на жидкие питательные среды используется как предварительный тест на ферменты уреазу (для уреаплазм), аргиназу (для аргинин-утилизующих микоплазм), глюкозу (для глюкозо-ферментрующих микоплазм). Под влиянием уреазы происходит расщепление мочевины с образо-

ванием аммиака, что приводит к защелачиванию жидкой питательной среды и изменению цвета индикатора в течение 18–24 часов. Фермент аргиназа, продуцируемый аргинин-утилизующими микоплазмами, разлагает аминокислоту аргинин, что также сопровождается повышением pH среды. Последнее, правда, происходит медленнее, чем при разложении мочевины уреазой, и изменение цвета индикатора наблюдается в среднем через 48 часов.

Так как микоплазмы не имеют клеточной стенки, то они трудно адаптируются на питательных средах, растут медленно и очень требовательны к различным биологически активным компонентам, всё это вынуждало исследователей вести поиски наиболее оптимальных питательных сред для выделения и поддержания микоплазм и ахолеплазм из различного первичного биоматериала.

1.5.2. Серологические, иммунологические и молекулярно-биологические методы диагностики микоплазмозов

Микоплазмы, выделенные от животных, трудно отличить друг от друга, хотя существует некоторая разница в скорости роста, морфологии колоний, клеточных элементах и биохимических свойствах. Нелегко их дифференцировать и по патогенным свойствам, так как они непостоянны и воспроизвести болезнь не всегда удается. Даже заведомо патогенные культуры микоплазм (*M. mycoides var. mycoides*) при длительном культивировании на бесклеточных питательных средах утрачивают свою вирулентность.

Антигенная структура микоплазм является весьма сложной (G. Christiansen, H. Erno, 1982). Мембрана микоплазм включает в себя белковые компоненты, которые погружены в липиды и расположены в основном, на внешней, а также и на внутреннейее поверхности. Поверхностные антигены, многие из которых имеют белковую природу, высокоиммуногенны (О.С. Маркина,

1995; G. Christiansen, H. Erno, 1990). Эти антигены определяют специфику иммунологического ответа и обусловливают в наибольшей степени серологическую внутри- и межвидовую гетерогенность микоплазм, свидетельствующую о том, что эти микроорганизмы активно эволюционируют.

Несмотря на то, что было предложено большое количество различных методов идентификации микоплазм, серологические остаются основными методами типизации микоплазм. Наибольшее признание среди них в 70–80 годах получили реакция агглютинации, связывания комплемента, ингибиции роста, гемагглютинации, задержки гемагглютинации, торможения, наведенной (косвенной) гемагглютинации, ингибиции метаболизма, а также реакция агглютинации, которую ставят с латексом.

При современной серологической, а также иммунологической диагностике микоплазмозов первостепенное значение имеют следующие методы: реакция непрямой гемагглютинации; реакция агрегат-гемагглютинации (РАГА); реакция пассивной гемагглютинации (РПГА), реакция иммунофлуоресценции (РИФ) – прямая (РПИФ) и непрямая (РНИФ); моноклональные антитела (МАТ), поликлональные антитела (ПАТ); твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА); радиоиммунологический анализ (РИА); хемилюминесцентный анализ (ХЛИА). Основными для видовой дифференциации возбудителей являются методы ДНК-диагностики: ДНК-гибридизация; полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Для массовой же серологической диагностики в настоящее время применяют реакцию агглютинации (РА) с цельной кровью и с сывороткой (З.П. Федорова, О.В. Виноходов, И.А. Собчак, 1972; Ю.М. Паутов, 1988; Г.П. Шаповалова, 1989), реакцию гемагглютинации (РГА) и замедленной гемагглютинации (РЗГА) (В.В. Киприч, 1971, 1973; В.А. Оганесян, 1986); реакцию связывания комплемента – РСК (В.В. Петросова, И.В. Раковская, 1969; З.П. Федорова, О.В. Виноходов, И.А. Собчак, 1972; Ю.М. Паутов, 1988; Ю.Х. Дададжанов, 1988); иммуноэлектрофорез ИЭФ

(Комелединова Н.Н., 1972) и иммуноферментный анализ (ИФА) (И.Л. Куликова, Т.А. Феоклистова, 1989).

П.М. Митрофанов (1982) рекомендует применять для выявления антимикоплазменных антител у крупного рогатого скота, инфицированного *M. bovigenitalium* и *M. bovis* реакцию непрямой гемагглютинации, так как она чувствительна, специфична и может служить простым и быстрым методом. Данный метод использовал Н.Н. Шкиль из ИЭВСиДВ СО РАСХН (2000) для контроля эффективности терапии микоплазмозов телят.

Для идентификации микоплазм, выделяемых от крупного рогатого скота, наибольшее признание получила реакция связывания коплемента, ингибиции роста и диффузной преципитации в агаровом геле. В этих исследованиях решающее значение имеет качество приготовляемых антигенов и антисывороток: они должны иметь высокую активность и специфичность. С этой целью разработан и рекомендован качественно новый способ изготовления единого микоплазмозного антигена для РСК и РДП и предложен метод повышения специфической активности микоплазмозных антисывороток (Х.З. Гаффаров, Р.В. Боровик, 1977).

Для подтверждения клинического диагноза рекомендуется использовать серологические реакции: РСК, РПГА, ИФА, с набором стандартных коммерческих диагностикумов (Е.А. Козлова, И.В. Пухмер, 2004).

С целью серологической диагностики микоплазмозной пневмонии свиней рядом ученых испытаны с положительным результатом реакции: непрямой гемагглютинации (Turner et al., 1963; Lam, Switzer, 1972; Taylor, 1979; Chima et al., 1982; Н.Н. Андросик, 1986); агглютинации (Priestley, 1951–1955; Н.Н. Андросик, 1977; Slavick, Switzer, 1979); задержки роста (Gois et al., 1970) ;связывания комплемента в различных модификациях (С.Н. Вышелесский с соавт., 1936; Я.Е. Коляков, 1956; Huddart, 1963;Goodwin, 1969; Slavick, Switzer, 1981; В.П. Бердник, 1986); иммуноферментный метод (S. Bruggman, H. Keller, 1977; J. Nicolet et al., 1980; Freeman, W.R. Bommeli, 1983; V. Sorensen, K. Barfod, 1992; П.И. Барышников, 1995; А.Н. Гречухин,

А.П. Шафиев, 2002; K. Hoelzle, M. Ritzmann, M. Wittenbrink, 2006), и др. К. Лекюэ с соавт. (1968-1970); Д. Робертс с соавт. (1968-1970); Р. Гудвин с соавт. (1969) и другие при исследовании естественно больных и экспериментально зараженных микоплазмами свиней установили принципиальную возможность использования РСК. Чувствительность реакции, по данным разных авторов, иногда заметно различалась. С помощью РСК было показано антигенное родство штаммов возбудителя пневмонии свиней из США, Англии и Канады (Д. Робертс, К. Литл, 1970), а также из Японии (Такатори и др. 1968).

Реакция агглютинации с положительным результатом была использована в диагностической и исследовательской работе Д. Шиммелем и Т. Хубригом (1965-1968), Д. Шиммелем и А. Пустоваром (1971, 1973), Т.Г. Кольцовой (1976) и др. Реакция привлекает своей практичностью, так как ее можно использовать непосредственно в хозяйстве. Shifrine, Gourlay (1967), исследуя сыворотки крови от животных с острыми формами болезни в РА на стекле, в комбинации с РДП в агаровом геле, выявляли болезнь в 100 % случаев.

Р. Гудвин и Н. Ходсон (1969, 1970), а также Н. Гоич (1972) для диагностики микоплазмозной пневмонии свиней использовали реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА). Однако Р. Ходжес (1969), Лам и В. Свитцер (1971, 1972) считают РНГА малопригодной для практики, в частности из-за трудности стандартизации компонентов. По данным D.H. Roberts (1974), РНГА имеет недостаточную чувствительность при индивидуальном исследовании животных с патологоанатомическими изменениями. Вместе с тем с увеличением титра антител в этой реакции увеличивается число клинически больных животных. При титре 1:64 до 50 % исследованных животных имеют изменения в легких, свойственные пневмонии микоплазменной этиологии (W. Zimmermanm et al., 1989). Perreou et al. (1964) показали, что РНГА более чувствительна, чем РСК, с сыворотками крови, взятой в острой фазе болезни, и менее чувствительна с сыворотками крови, взятой от хронически больных животных.

Реакцию диффузной преципитации (РДП) в агаровом геле

апробировали Р. Гудвин с соавт. (1967) и др. Но реакция обладает низкой чувствительностью и более подходит для изучения антигенных свойств микоплазм, чем для диагностических целей (А.Я. Пустовар, 1971; Д. Шиммель, 1971 и др.).

Для лабораторной идентификации различных микоплазм используют тест ингибиции метаболизма (ТИМ), предложенный Д. Тейлор-Робинсон (1966). Подавления обмена веществ *M. suipneumoniae* при внесении в питательный бульон специфической антисыворотки достигли Р. Гудвин с соавт. (1967, 1968), Н. Фриис (1969, 1971) и др. Однако, отрицательные результаты обнаружения в ТИМ антител у экспериментально зараженных поросят получили И. Такатори и В. Свитцер (1970).

По своей природе к ТИМ близок тест ингибиции роста (ТИР), который был впервые предложен D. Edward и W. Fitzgerald в 1954г., модифицирован W. Clyde (1964), а также E. Stanbrige и L. Hyflick (1967). Вокруг дисков, пропитанных специфической антисывороткой, в культуре микоплазм на агаре создается зона задержки роста. Г. Виндзор и Дж. Тригвел (1976) сообщили, что концентрированная лимфогелем сыворотка обладает в 2–5 раз более выраженной активностью, и диски, хранящиеся при 4˚С, можно успешно использовать в течение года.

М. Гоич и Ф. Кукса (1975) предложили пробу рост-преципитации, когда между луночкой с растущей культурой микоплазм и диском, пропитанным гомологичной типоспецифической сывороткой, образуется линия преципитации.

Метод иммунофлуоресценции впервые был предложен H. Liu в 1957 г., а для обнаружения микоплазм свиней с положительным результатом его апробировали К. Лекюэ, (1970), А. Майлинг (1971, 1972), С. Ливингстон и др. (1971). Доказана высокая чувствительность и специфичность реакции иммунофлуоресценции (О.В. Виноходов, 1965; П.М. Митрофанов и др., 1982; И.Л. Куликова, Т.А. Феоктистова, 1989; Н.О. Александрова, В.Н. Чеботкевич, Э.А. Панова, В.Д. Сизонов, 1995; Ю.В. Вульфович, И.В. Раковская, Н.А. Гамова, С.А. Гончарова, Л.Г. Горина, С.В. Прозоровский, 1995; Л.А. Газов-

ская, 1997; Ф.Ш. Гамзаев, А.М. Ли, 1997; А.В. Михайлов, Г.А. Самсыгина, Д.Б. Лаврова, 1997; Г.А. Дмитриев, Н.С. Гладкова, Б.О. Дрижарова, 1997; Е.В. Белоусова, 1999; Т.А. Гасанова, 2001; D.H. Ley, H.W. Yoder, 2003), которая позволяет быстро обнаруживать антигены микоплазм практически в любом материале (в мазках из носоглотки, мокроты, плевральной жидкости, в мазках из уретры, влагалища и других органах), четко дифференцировать инфекционные агенты, а также количественно оценить массивность инвазии возбудителя.

РИФ является серологическим методом, при котором в реакцию с антигеном вступают антитела, меченые флуоресцирующим красителем. При ультрафиолетовом облучении они обеспечивают сильное свечение, даже если содержатся в препарате в ничтожных количествах в виде следов. Именно это их свойство, а также способность вступать в связь с антителом без ущерба для присущей ему специфичности в связывании антигена дают преимущество данному методу диагностики.

В основе РИФ лежат такие серологические реакции, как агглютинация и преципитация, которые совершаются в две фазы. В первой фазе происходит связывание активных центров антител с антигенными детерминантами, в следующей фазе, зависящей от физико-химических свойств среды, совершается объединение комплексов антиген – антитело в более крупные агрегаты. Данная реакция позволяет обнаруживать реакцию между антигеном и антителом в смеси микроорганизмов даже при очень большом преобладании гетерологичных микробов. Она дает возможность определять локализацию антигена в различных секретах, экскретах, органических жидкостях и тканевых препаратах. Существует четыре метода иммунофлуоресцентного окрашивания: прямой, непрямой, тушения (блокирования) и окрашивания комплемента. В практике широкое применение нашли первые два. Д.Н. Балабанов, И.В. Раковская с соавт. (2006) отмечают, что с помощью РИФ микоплазмоз выявляется чаще, чем культуральным методом, но к недостатку

РИФ относится некоторая субъективность результата в зависимости от качества взятого материала.

C.H. Armstrong et al. (1983) для выявления возбудителя использовали иммунофлуоресцентный анализ на основе поликлональных антител. Но наличие общих антигенов у *M. hyopneumoniae, M. hyorhinis, M. flocculare* часто затрудняет дифференциацию возбудителя.

W. Brugman с соавторами (1977) разработали метод количественного определения антител к *M. suipneumoniae* путем иммуноферментного сорбентного анализа (ELISA). Несмотря на высокие показатели, применение этого метода в диагностической работе из-за сложности ограничено. A.R. Doster, B.C. Lin (1988) разработали непрямой иммунопероксидазный метод обнаружения *M. suipneumoniae* в мазках и срезах легких и бронхов, обработанных формалином. В последние годы для повышения специфичности ИФА используют различные методы очистки микоплазмозного антигена (S.Kazama et al., 1989).

При изучении сравнительной эффективности РСК, РНГА и ИФА было показано, что титр антител, выявляемый с помощью ИФА, был выше, чем в остальных реакциях. Наиболее результативной проявила себя РНГА. Лишь 22 % проб сывороток, позитивных в РНГА, были положительными в ИФА и РСК (M.F. Freeman et al., 1984; R.F. Sheldrake, L.F. Romalis, 1992) свидетельствуют о том, что специфичность РНГА ниже, чем ИФА.

Ю. В. Вульфович с соавторами (1995) считают, что эффективность различных методов лабораторной диагностики микоплазмоза и уреаплазмоза различна в зависимости от клинической формы инфекции. В то же время при всех исследованных нозологических формах отмечена высокая информативность серологических методов диагностики, которые позволяют в ряде случаев не только констатировать наличие генерализованного инфекционного процесса, например, при положительных результатах реакции агрегат-гемагглютинации (РАГА)

либо РАГА и РПГА (реакция пассивной гемагглютинации), но, по мнению исследователей, возникает необходимость использования данных методов и при воспалительных процессах нижних отделов гениталий и особенно при хронических неспецифических уретритах.

В последнее время с целью повышения специфичности реакций в качестве ее компонентов применяют моноклональные антитела (МАТ) и поликлональные антитела (ПАТ). Так, Т.А. Гасанова (2001) в своих работах использовала «Микогомо Флюро Скрин», «Уреагени Флюро Скрин» для иммунодетекции антигена возбудителей методом прямой и непрямой иммунофлуоресценции урогенитального микоплазмоза и уреаплазмоза в медицинской практике.

Работы бельгийских ученых A. Naessens, X. Cheng, S. Lauwers, J.A. Robertson, A. Naessens, X. Cheng, S. Lauwers, J.A. Robertson (1998) позволили разработать методику получения моноклональных антител к *Ureaplasma urealyticum* и успешно применить для иммуноферментного анализа.

Метод точечного твердофазного иммуноферментного анализа (ТТИФА) для диагностики микоплазмоза, по мнению В.В. Мананкова с соавт. (1998), довольно прост в постановке, информативен, не требует дорогостоящих ингредиентов, высокопроизводителен и может успешно применяться не только в стационарных лабораториях, но и полевых условиях. По их данным ТТИФА позволяет выявить антигены микоплазм в 64,8–72,2 % случаев при урогенитальной и экстрагенитальной патологии, а также антитела к возбудителю в 37,2–63,5 % случаев. Эти данные подтверждает P. Tyagi (1999) при определении микоплазмозных антител с помощью данного метода. При этом микоплазмозные антитела были выделены в 70 % случаев, а уреаплазмозные – в 76,47 % случаев из числа исследованных больных с урогенитальной патологией – бесплодием.

Радиоиммунологичесий (РИА) и хемилюминесцентный (ХЛИА) методы лабораторной диагностики микоплазмозов

(В.В. Мананков и др.,1998) также являются высокочувствительными методами. ХЛИА позволяет выявить большое количество серопозитивных находок среди больных экстрагенитальными формами микоплазмозной инфекции (95 %) и значительно меньший процент – в группе с урогенитальными формами (54,5 %). Процент обнаружения микоплазм методом РИА довольно высок как при урогенитальном, так и при экстрагенитальных формах и составляет 97,2 %, выявленные антитела в РИА представлены в титре более 1:200 в 73,6 % проб.

Авторы считают, что полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что радиоиммунологический анализ является высокочувствительным методом, но требует дорогостоящего оборудования и диагностикумов. Работа должна осуществляться в специально оборудованном помещении, квалифицированными специалистами. Поэтому его целесообразно применять в научных целях, а также для обнаружения персистирующих форм микоплазм. Применение ХЛИА ограничено в связи с тем, что методика постановки сложна, требует специального оборудования. При исследовании загрязненного материала, особенно от больных с урогенитальной патологией, чувствительность его значительно ниже, чем у метода флуоресцирующих антител (МФА). ХЛИА авторы рекомендуют использовать для исследования чистого материала от больных с патологией органов зрения, дыхания и ЛОР-органов.

Для изучения особенностей антигенной структуры микоплазм используют реакции агглютинации, связывания комплемента, преципитации в агаровом геле, иммуноэлектрофореза, иммунофлуоресценции и ингибиции роста. Показатели этих реакций не всегда коррелируют друг с другом и выявляют общие антигенные компоненты у разных, иногда очень отдалённых видов микоплазм. Это обстоятельство осложняет серологическую идентификацию микоплазм и изучение их антигенных взаимосвязей. Поэтому при проведении исследований необходимо использовать несколько серологических методов, данные которых

должны дополнять друг друга (В.Д. Тимаков, Г.Я. Каган, 1973; N.F. Friis et al., 1994).

Для постановки различных серологических реакций необходимо иметь активные специфические антисыворотки и антигены. Предложено большое количество способов их приготовления. Диагностические сыворотки получают путем гипериммунизации кроликов, морских свинок, птиц, баранов. Рекомендованы различные схемы для иммунизации животных: метод Е. Клиенебергер-Нобель (1962); D. Taylor-Robinson et al. (1963); З.Т. Федоровой с соавт.(1969); R. Lemke (1964); E. Stanebring, L. Hayflick (1967); C. Dinter et al. (1965); In Jen Pan, M. Ogata (1969); J.Al. Aubaidi, J. Fabricant (1971); L. Potgieter (1972). Выбор схемы получения специфических сывороток и способа приготовления антигена определяется биологической характеристикой штамма микоплазм, наличием компонентов питательных сред и используемой серологической реакцией.

Я.Р. Коваленко с соавт. (1971) для получения специфических гипериммунных сывороток использовал различные схемы гипериммунизации кроликов: по Клинебергер-Нобель, D. Shimmel, Th. Hubrig, Петросовой с соавт. и J. Al-Aubadi, J. Fabricant. Наиболее активные сыворотки были получены при применении схемы J. Al-Aubadi, J. Fabricant с введением еще одного дополнительного цикла. Объясняется это тем, что малые дозы антигена в сравнении с массивными вызывают более быструю и интенсивную пролиферацию клеток памяти, которые при повторной встрече с гомологичным антигеном обусловливают длительный и напряженный иммунный ответ организма. При этом перед введением супердозы необходимо делать определенный интервал (в несколько недель) с целью максимального накопления популяции клеток этого типа. Данной схемой пользовались И.Я. Яблонская (1977), В.А. Поликарпов (1977), В.Н. Афонасьев (1980), П.В. Митрофанов (1982), Н.Н. Шкиль (2000).

Не менее известен также метод (D. Shimmel, Th. Hubrig, 1968) внутривенного введения антигена кроликам, достоинство

которого состоит в том, что за короткий промежуток времени можно получить противомикоплазмозные сыворотки с высокими диагностическими титрами. При этом сконцентрированный в 100 раз антиген вводят кроликам внутривенно: в первый день – 0,5 мл, во второй, третий и четвертый – по 1 мл, на пятый, шестой, седьмой и четырнадцатый день – по 2 мл. Через 3 недели проводят пробное кровопускание. При недостаточном титре антител цикл инъекций повторяют.

1.5.3. Молекулярно-биологические методы

Одним из современным методов диагностики, получивших широкое распространение в мире, является использование различных модификаций метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Разработана методика идентификации хламидий, микоплазм и уреаплазм с помощью ПЦР. Были использованы 4 праймера, комплементарные фрагментам гена 16S РНК, один из которых универсален для трех микроорганизмов, а три специфичны для каждого из них (М.Ю. Бродский, В.М. Говорун, Э.М. Халилов и др., 1995). Данная система праймеров позволяет определять хламидии, микоплазмы и уреаплазмы в ходе одной постановки.

В настоящее время для анализа штаммов возбудителей различных микоплазмозных инфекций широко используются методы анализа хромосомной ДНК: рестрикционный анализ, плазмидный анализ, геномная дактилоскопия, зондирование бактериального генома с помощью специфических ДНК-зондов, секвенирование и полимеразная цепная реакция (ПЦР) (А.Г. Бадашкеева, Д.Н. Кноре, 1991; А.Л. Гинцбург, И.А. Шагинян, 1991; О.С. Маркина, 1995; А.Л. Семенихин, 1983; П.П. Фукс и др., 1995; D. Adegboye, 1978; A. Kirchhoff et al., 1982).

Вариант рестрикционного анализа хромосомной ДНК микоплазм, часто именуемый как анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ), получил широкое распространение для специфической дифференциации штаммов мико-

плазм (E.A. Freundf, F. Rasin, 1984; D. Adegboye, 1978; H. Hotzel, H. Goossens, 1996). Данный метод был использован при изучении гетерогенности микоплазм, которые могут изменяться вследствие культивирования и пассирования в клетках животных (W. Kundtson, 1986; L. Dedieu et al., 1992; D.H. Leu et al., 1993).

G.W. Stemkeetal (1989) предложили метод обнаружения патогенных микоплазм в клинических образцах с помощью специфических ДНК-зондов. Чувствительность этого метода составляет 5–10 клеток микоплазм (А.Л. Семенихин, 1983; И.А. Бакулов, 1984; K. Dybvigetal., 1987; Д. Глобер, 1988; W. Jast et al., 1988; А.Л. Гинцбург, И.А. Шагинян, 1991; S. Zhao, R. Yamamoto, 1993; F. Rodriguez et al., 1996). Разработаны различные наборы для диагностики микоплазм на основе молекулярной гибридизации. Для выявления микоплазм используются наборы зондов, видоспецифичные для каждой из взятых микоплазм (И.А. Шагинян и др., 1990; С.В. Прозоровский и др., 1995; J.E. Dohms et al., 1993; E.A.M. Abu-Groun et al., 1994). В качестве ДНК-зондов применяют различные фрагменты генома микоплазм: фрагменты рРНК, гены различных белков (J. Al-Aybaidi et al., 1972; M. Sawada et al., 1981; G. Rawadi, B. Lemercier, 1995; T.K. Tayloretal., 1992).

Применяются также различные варианты метода молекулярной гибридизации для выявления нуклеиновых кислот, такие как точечная гибридизация, блот-гибридизация, сэндвич-гибридизация, гибридизация в растворе и гибридизация *in situ* (Махи Эльтейб Юсиф Эль, 1980; Д. Глобер, 1988; Ф.Н. Золотарев и др., 1989; Д.Н. Кноре, 1991; О.С. Маркина, 1995; H. Hotzel, 1996).

Среди достаточно широкого набора применяемых молекулярно-биологических методов большое внимание привлекает полимеразная цепная реакция (ПЦР), в основе которой лежит многократное реплицирование специфического участка нуклеотидной последовательности, катализируемое термостабильной ДНК-полимеразой (S.S. Stone, 1968; H. Kobayashi et al., 1991; S. Artiushin et al., 1993; B. Blanchard et al., 1994; R.J. Nicolas et al., 1996).

Метод ПЦР был открыт в 1984 г. американским учёным Кэри Мюллисом. Последние десять лет ПЦР все чаще используется в ветеринарии. Высокая чувствительность – главное достоинство метода – обусловлена тем, что в результате многократного копирования специфической олигонуклеотидной последовательности, его концентрация в реакционной пробе возрастает в 1 млн раз (W.N. Masiga, S.S. Stone, 1968; S. Zhao, R. Yamamoto, 1989). К числу достоинств ПЦР следует отнести также специфичность и быстроту получения конечного результата. В связи с этим данный метод имеет наибольшие перспективы в создании высокоэффективных методов диагностики различных инфекционных заболеваний (S.J. Gearyetal., 1994; L.H. Lauerman et al., 1995; H.L. Watson, 1996).

S. Tola et al. (1996) разработана тест-система на основе ПЦР для идентификации *M. agalactiae* в пробах молока овец. G. Bolske et al. (1996) разработали метод ПЦР для индикации и дифференциации контагиозной плевропневмонии коз, вызываемой *M. capricolum*. L. Dedieu et al. (1994) разработали ПЦР для детекции *M. mycoides subsp. mycoides*. S.H. Kleven et al. (1988) использовал метод ПЦР для детекции и идентификации 4 патогенных видов (*M. gallisepticum, M. iowae, M. meleagridis, M. synoviae*) и 10 непатогенных микоплазм птиц. Праймеры, комплементарные гену 16SpРНК, были использованы S. Nagai et al. (1995) для детекции патогенной *M. hyopneumoniae*, вызывающей микоплазмозную пневмонию свиней. J. Caron et al. (2000) для выявления и дифференциации микоплазм свиней *M. hyopneumoniae* и *M. hyorhinis* методом ПЦР применял праймеры, комплементарные генам, кодирующим белки p36 и p46.

В настоящее время единственным методическим подходом выявления в образцах длительно культивируемых форм микоплазм является ПЦР, поэтому разработка тест-систем на основе ПЦР для обнаружения возбудителей таких инфекций остается актуальной (A. Kirchoff, 1982; I. Kempf et al., 1994).

Над усовершенствованием методики ПЦР работают многие зарубежные ученые в медицинской –M. Jurstrand, J.S. Jensen et al. (2005) ; J. Hardvick, J. Giles, A. Hardik et al. (2006); T. Yamazaki, M. Nartita et al. (2006) и в ветеринарной практике – J.B. Bashiruddin, J. Frey et al. (2005); M. Garsia, N. Ikuta, S. Levisohn, S.H. Keleven (2005); A.S. Ramires, C.L. Naylolor, P.P. Hammond, J.M. Bradbury (2006); H.Y. Cai, P. Bell-Rogers et al. (2006).

Группа исследователей из Германии в 1996 году: M. Abele-Horn, C. Wolff, P. Dressel, A. Zimmermann, W. Vahlensieck, F. Pfaff, G. Ruckdeschel – провела сравнительный анализ двух методов диагностики микоплазмозной и уреаплазмозной инфекции, при этом эффективность ПЦР была 90,5 % для обоих видов микроорганизмов, а культурального метода – 91 % для *Ureaplasma urealyticum* и 84 % – для *Mycoplasma hominis*. Кроме того, ПЦР-метод быстрее, чем культуральный, и тем самым позволяет сократить время постановки диагноза от 2–5 суток до 24 часов.

J.B. Mahony, D. Jang, S. Chong, K. Luinstra, J. Sellors, M. Tyndall, M. Chernesky (1997) были выделены и идентифицированы методом мультикомплексной ПЦР возбудители *Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma genitalium* из проб мочи, не реагирующей на данные инфекционные агенты в других тестах.

Некоторые исследователи (С.В. Прозоровский, И.В. Раковская, Л.Г. Горина и др., 1997; В.Г. Бочкарев, 1997; Е.В. Белоусова, 1999; К.Т. Момыналиев, 2000) использовали ПЦР в медицинской практике для выявления латентного носительства микоплазм.

С.В. Соловьевой (1997) разработаны амплификационные тест-системы для выявления возбудителей урогенитальных микоплазмозов. С.В. Соловьева, Е.Г. Цой, Н.А. Зигангирова, Н.А. Гамова, И.В. Раковская, А.И. Гинцбург (1998) использовали ПЦР для выявления тетрациклин- и эритромицин-устойчивых штаммов урогенитальных микоплазм с помощью видоспецифичных тест-систем и определяли наличие tet M, tet O и erm-генов.

Ученые из Токио H. Kobayashi, K. Hirose, A. Worarach, P. Paugtes, N. Ito, T. Morozumi, K. Yamamoto в 1998 году разработали ПЦР для выделения трех бычьих микоплазм *Mycoplasma bovirhinis, Mycoplasma alkalescens* и *Mycoplasma bovigenitalium.*

Л.Н. Новиковой, М.А. Башмаковой и А.Е. Тараскиной (1998) был успешно применен молекулярно-биологический метод, основанный на обнаружении специфической последовательности нуклеотидов в ДНК микроорганизмов с помощью ПЦР. По мнению авторов, практика использования данного метода показала хорошее его совпадение с результатами культуральных исследований. Однако недостатком ПЦР является то, что он улавливает даже самые малые дозы этого микроорганизма в исследуемой пробе, в то время как этиологическое значение микоплазмы имеют в том случае, если они выявляются в количестве более чем 10 КОЕ/мл, меньшая величина – это здоровое носительство (Д.Н. Балабанов и др., 2006).

Е.Г. Румпель, В.А. Шаманин (2000) провели оценку диагностической ценности ПЦР-теста «Полимикс» (НПФ «Литех», Москва) и ПЦР-теста Новосибирского института биоорганической химии (НИБХ). Результаты ПЦР-тестов «Полимикс» и НИБХ совпадали в 97,8 %, что позволяет надежно определять возбудителей микоплазмозов. Полученные данные совпадают с результатами исследований ученых других стран.

Из анализа данных научной литературы видно, что бактериологические, серологические, иммунологические и молекулярно-биологические методы исследований используются в комплексной лабораторной диагностике микоплазмозов. Эффективность различных методов лабораторной диагностики микоплазмозов различна в зависимости от клинической формы инфекции.

В то же время при всех изученных нозологических формах отмечена высокая информативность серологических методов диагностики, которые позволяют в ряде случаев констатировать наличие генерализованного инфекционного процесса. Способность микоплазм к длительному персистированию в

инфицированном организме при хроническом течении инфекции, никак не проявляя своего присутствия в нем, требует высоко чувствительных и специфичных методов для своевременной постановки диагноза.

Современные методы исследования позволяют наиболее точно и в короткие сроки выделить возбудителя и дифференцировать его от других видов микроорганизмов, используя видоспецифичные сыворотки в реакциях агглютинации, реакциях иммунофлуоресценции (прямой и непрямой методы), твердофазный иммуноферментном анализе с использованием поли-клональных и моноклональных антител. При проведении иммунологических исследований необходимо использовать несколько серологических методов, данные которых должны дополнять друг друга.

Молекулярно-биологические методы (ДНК-гибридизация, рестрикционный анализ, секвенирование, ПЦР) нашли свое широкое применение для скрининга и видовой идентификации возбудителей микоплазмозов. Такие исследования проводят в основном для массовых диагностических исследований в комплексе с другими методами в медицинской и ветеринарной практике.

1.5.4. Чувствительность микоплазм к антибиотикам и антимикробная терапия микоплазмозов

Антибиотики для лечения и профилактики микоплазмозов млекопитающих и птиц стали применять с начала 50-х годов. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в области антибиотикотерапии, поиск новых препаратов продолжает оставаться актуальной проблемой (P. Liberman, P. Smith, H. Morton 1950, 1952; A. Newnhman, H. Chu, 1965; Я.Р. Коваленко, М.А. Сидоров, И.А. Яблонская, 1971).

Анализ многочисленных данных специальной литературы свидетельствует о том, что чувствительность микоплазм и уреаплазм к антибиотикам, за редким исключением, не имеет резко выраженных видовых различий и зависит от механизма

действия определенных групп антибиотиков.

Отношение микоплазм к антибиотикам определяется отсутствием у них клеточной стенки; они устойчивы ко всем препаратам, действие которых связано с биосинтетическими процессами белков клеточной стенки, например, к дегидрострептомицину, олеандомицину, пенициллину, сульфаниламидным препаратам и чувствительны к ингибиторам синтеза мембранных и внутрицитоплазматических белков, таким как антибиотики тетрациклинового ряда – линкозамины и стрептограмины, а также к аминогликозидам и хлорамфениколу (И.А. Шагинян и др., 1990; C. Bernet et al., 1989; M.M. Binns, 1993; I. Kempf et al., 1994).

Подобно пенициллину, циклосерин, бацитрацин и некоторые другие полипептидные антибиотики не ингибируют развитие микоплазм в обычно применяемых бактериостатических дозах. Полиеновые антибиотики ингибируют развитие микоплазм в различной концентрации: филипин, амфотерин – лучше проникают в мембрану микоплазм и ингибируют их развитие в низкой концентрации (от 0,5 до 10,0 мкг/мл); нистатин, кандидин – в очень высоких концентрациях (50 мкг/мл и более) (Г.Ф. Коромыслов, Я. Мессарош, Л. Штипкович, 1987).

С середины 60-х годов большое значение при микоплазмозах птиц (О. Олесюк с соавт., 1964–1967; Е. Озе с соавт., 1964; Х. Йодер и М. Хофстад, 1995, и др.), а также свиней (Х. Эйкмайер и Х. Майер, 1967; В. Крютцфельд, 1966; В. Свитцер, 1964–1967 и др.) приобрел тилан (тилозин тартрат). Минимальная ингибирующая доза его для подавляющего большинства известных видов микоплазм составляет 0,004–1 мкг/мл. Т. Хубриг (1966), и В. Стоянов (1969–1971) получили хороший лечебный эффект от применения хлорамфеникола, галимицина и тилана. Д. Шиммель (1967), Д. Кингстон (1970) и др. подчеркивали высокие лечебно-профилактические свойства тилана.

Хлорамфеникол, тетрациклин, линкомицин, спиромицин угнетают развитие микоплазм в несколько больших концентрациях (0,1–10 мкг/мл). Чувствительность микоплазм к эритроми-

цину и некоторым другим макролидам непостоянна. Уреаплазмы, в отличие от многих видов микоплазм, высокочувствительны к эритромицину.

Л. Грумблес, В. Боней (1951), С. Вонг, Л. Джеймс (1953), Д. Фагей, Д. Кроули (1954, 1955), Х. Адлер с соавт. (1956), и Д. Блейк (1961) при респираторном микоплазмозе птиц; А. Беттс, В. Беверидж (1953), Л. Бернфорс, К. Ланнек (1955), Д. Джолли (1965), Д. Шиммель (1967), В. Свитцер (1964), Х. Ян (1969) при микоплазмозах рогатого скота показали определенную эффективность стрептомицина, тетрациклиновых препаратов, неомицина, спирамицина и прочих антибиотиков. Т. Витт (1925), Г. Кюрассон (1932, 1935), С.Н. Вышелесский с соавт. (1932), В.И. Бурцев (1933) и др. отмечали лечебный эффект от применения новосальварсана и новарсенола.

А.Я. Пустовар, В.В. Киприч совместно с Т.Ю. Трусковой (1976) в лабораторных исследованиях установили чувствительность девяти штаммов микоплазм, выделенных от свиней, к 29 химиопрепаратам. Наиболее выраженным действием обладали канамицин, рондомицин, фурагин, тетрациклин и окситетрациклина гидрохлорид, олеморфоциклин, тетраолеан, гентамицин, тилозин и тебемицин.

Некоторыми исследователями (P. Liberman, P. Smith, H. Morton, 1950) было отмечено, что микоплазмы обладают высокой резистентностью к антибиотикам, механизм действия которых характеризуется ингибицией синтеза клеточной оболочки, которая отсутствует у микоплазм. К этой группе относится пенициллин и некоторые полипептидные антибиотики, обладающие аналогичным механизмом действия.

Механизм действия полиеновых антибиотиков также характеризуется нарушением синтеза цитоплазматической мембраны и нарушением проницаемости клеток. Изучая чувствительность микоплазм к антибиотикам этой группы, P. Liberman с соавторами (1950) установил, что микоплазмы ингибируются

филипином в концентрации 0,5 мкг/мл, амфотерицином В в концентрации 10 мкг/мл. Нистатин и кандидин оказывают ингибирующее действие на микоплазмы в более высоких концентрациях (100 и 50 мкг/мл соответственно). Эти данные позволили предположить, что ингибирующее действие полиеновых антибиотиков на микоплазмы зависит от размера молекул этих препаратов. Препараты, имеющие меньший размер молекул, филипин, амфотерицин В и фунгихромин, лучше проникают в мембрану и ингибируют развитие микоплазм в низкой концентрации (от 0,5 до 10,0 мкг/мл), тогда как полиеновые антибиотики с большим размером молекул оказывают ингибирующее действие на микоплазмы в очень больших концентрациях (50 мкг/мл и более).

Тироцидины также действуют на цитоплазматические мембраны клеток и ингибируют развитие микоплазм (P.Smith, 1952). Полимиксины не ингибируют развитие микоплазм в обычных бактериостатических концентрациях, они действуют только в очень высоких концентрациях (100 мкг/мл и более).

По данным A. Newnhman, H. Chu (1965); Я.Р. Коваленко, М.А. Сидорова, И.А. Яблонской (1971); В.И. Ежовой (1972), Я.Р. Коваленко, Э.А. Шегедевич, И.А. Яблонской (1973), наиболее выраженным ингибирующим действием на микоплазмы обладает тилозин, минимальная ингибирующая концентрация его составляет 0,004–1 мкг/мл. В несколько больших концентрациях угнетают микоплазмы хлорамфеникол, тетрациклин, линкомицин и спиромицин. Механизм действия данных антибиотиков связан с нарушением обменных процессов и подавлением синтеза внутриклеточного белка.

Высокой активностью против микоплазм обладает антибиотик из группы плеуромутилина тиамулин. Механизм действия его связан с подавлением синтеза внутриклеточного белка. Минимальная ингибирующая концентрация его составляет 0,007–1 мкг/мл.

Ингибирующая концентрация эритромицина, по данным

литературы, различна для различных видов микоплазм. Так, *M. mycoides* и *M. gallisepticum* ингибируются эритромицином в концентрации 0,02–4,0 мкг/мл, *M. pulmonis* – 40 мкг/мл, а *M. iners* ингибируется эритромицином только в концентрации 100 мкг/мл.

Характеризуя чувствительность микоплазм к нитрофуранам A. Newnhman, H. Chu (1965) указывают, что микоплазмы, выделенные от млекопитающих и птиц, ингибируются фурацилином в концентрации от 2 до 200 мкг/мл, а фурозолидоном в концентрации от 0,5 до 40 мкг/мл.

В отношении стрептомицина, по данным Я.Р. Коваленко с соавт. (1973), многие штаммы микоплазм различных видов ингибируются этим антибиотиком только в концентрациях 50–100 мкг/мл.

В последние годы ученые обратили внимание на группу синтетических химиотерапевтических средств в ряду 6-фтор-4-хинолон-3-карболовой кислоты, получивших название фторхинолоны. Молекулы этих препаратов обладают высокой активностью как к микоплазмам, так и к другим микроорганизмам (А.А. Климов, 2003; С.Ж. Гюрджи-Оглы, И.М. Самородов, М.И. Рабинович, 2004). Мишенью их действия является ДНК-геназа, ключевой фрагмент бактериальной клетки, ответственный за нормальный процесс биосинтеза ДНК и соответственно за нормальный рост и деление клетки. Кроме подавления синтеза ДНК фторхинолоны ингибируют также биосинтез РНК и белка в клетке. В мировой ветеринарной практике используют различные фторхинолоновые препараты: энрофлоксацин, дифлоксацин, сарафлоксацин, данофлоксацин, марбофлоксацин, норфлоксацин и ципрофлоксацин. Резистентность микроорганизмов к данным препаратам также может возникнуть, но частота спонтанных мутаций для этой группы очень низка.

По данным С.Б. Лыско (2005), микоплазмы, выделенные от птиц, в опыте invitro наиболее чувствительны к тиамулину, фармазину, ципрофлоксацину, тилозину, энроксилу и энрофлоксацину (чувствительность от 76 до 90 %) и нечувствительны к

амоксициллину, нетилмицину и гентамицину.

И.И. Грачев и А.Н. Евдокимов (1965) для лечения больных микоплазмозной пневмонией поросят применяли окситетрациклин в течение 14 дней. Тетрациклин и окситетрациклин в дозе 20–25 мг/кг массы животного предохраняли поросят от заболевания (Н. Ланнек и С. Бернфорс, 1956; А. Беттс и Р. Кемпбелл, 1956, и др.). Лечение больных свиней наиболее эффективно на ранних стадиях заболевания. При этом лучшие результаты дает применение тилана, линкомицина и окситетрациклина (К. Дирнхофер, 1956; Д. Шиммель, 1967; Р. Росс и Д. Данкен, 1970, и др.). К.Н. Шерстобоев (1949) сообщил, что двукратное внутривенное применение новарсенола позволяет вылечить до 90 % больных поросят. А.Н. Гречухин (2006) для лечения микоплазмоза свиней рекомендует применять доксициклин в дозе 10–12 мг/кг живого веса.

А.Я. Пустовар, В.В. Киприч, И.К. Авдосьева (1973–1974) для лечения и профилактики микоплазмозной пневмонии у поросят разработали противопневмонийный препарат (ПП), в состав которого входят: окситетрациклина гидрохлорид – 3 %, левомицетин – 2,5, олеморфоциклин – 1,5, сульфапиридазин – 12, норсульфазол – 2, сухой экстракт травы термопсиса – 8, соевая мука – 71 %. Его задают с кормом 2 раза в день в течение 8–10 дней подряд.

Другой комплексный препарат – леномицин – для лечения микоплазмозной пневмонии свиней рекомендуют В.Н. Скворцов, А.А. Прасолов, Н.Т. Климов (1995). В своем составе он содержит левомицетин, окситетрациклин и метронидазол. При лечении этим препаратом выздоровело 87,3 % больных поросят.

Г.Ф. Коромыслов, Я. Мессарош, Л. Штипкович (1987) рекомендуют применять тилан в дозе 1 г/кг корма, фосфат тилозина 0,5 г/л питьевой воды, тартрат тилозина в течение 3 дней, линкомицин 3 г/т корма в течение 3 недель. Тиамутин в дозе 200 мг/кг корма при назначении в течение 10 дней снижает число заболевших свиней и способствует увеличению прироста их массы (Л. Штипкович, 1978).

В последние годы достаточно перспективными считают фторхинолоны – это синтетические вещества, обладают выраженными антибактериальными и антимикоплазменными свойствами. Наибольшую популярность завоевал энрофлоксацин (Д.Ф. Осидзе, 1975; G.E. Kenny, 1987; S.Ruedinger, 1991; Г.Г. Полянская и др., 1993; В.Т. Ночевный и др., 2002; А.А. Климов, 2003; И.М. Самородов, 2004; и др.).

При определении чувствительности уреаплазм, выделенных от людей, к антибиотикам Н.В. Рудаков, Е.В. Наумкина, Н.В. Темникова и др. (2006) отметили их высокую чувствительность к мидекамицену (макропену), пефлоксацину, и несколько меньше – к доксициллину, гентамицину и тетрациклину.

Изыскивая средства для лечения микоплазмозов, рядом зарубежных авторов испытывались следующие антибиотики: эритромицин и азитромицин – K.K. Ogasawara, T.M. Goodwin; эритромицин – R.J. Baier, J. Loggins, T.E. Kruger (2003); C.G. Mabanta, G.S. Pryhuber, G.A. Weinberg, D.L. Phelps (2003); азитромицин и доксицилин – V. Skerk, B. Barsic, V. Car (2000); V. Skerk, I. Marekovic, J. Begovac et al. (2006).

В настоящее время ветеринарные и медицинские специалисты все чаще вынуждены констатировать полную или частичную устойчивость микоплазм и уреаплазм к антибиотикам. Такое положение возникло вследствие целого ряда причин, в том числе использования антибиотиков без соблюдения правил по их применению. Трудности возникают при лечении болезней, вызванных ассоциацией микроорганизмов. Поэтому весьма актуальной остается проблема изыскания лекарственных препаратов и эффективных схем лечения при микоплазмозе, в том числе ассоциативных его формах.

1.5.5. Чувствительность микоплазм к химиопрепаратам *in vitro* при разработке селективных питательных сред

Установление чувствительности микоплазм к химиотерапевтическим препаратам, в том числе антибиотикам, позволяет изыскивать не только средства лечения и профилактики заболе-

ваний животных, но и разрабатывать специальные питательные среды, необходимые для диагностики микоплазма-инфекций, а также определять ряд других показателей, характеризующих класс Mollicutes.

Устойчивость микоплазм к сульфаниламидам была установлена М. Броун и Г. Хейс (1942), к пенициллину – В. Беверидж, А. Кемпбелл, П. Линд (1946). М. Батлер и Б. Найт (1960) отмечают, что большинство штаммов микоплазм устойчивы также и к теллуриту калия, кристаллвиолету, основному фуксину и тионину.

Д. Эдвард (1947) при разработке селективной среды для микоплазм установил, что ППО не чувствительны к действию теллурита натрия, бриллиантгрюна и генцианвиолета, а также ацетата таллия. Пенициллин, как известно, задерживает рост в основном грамположительной неспоровой микрофлоры, а ацетат таллия — высокоактивный бактериостатик для грамотрицательных и аэробных спорообразующих бактерий. Данные Д. Эдварда были подтверждены Д. Смитом с сотрудниками (1950), а также Х. Мортоном и И. Лисе (1953), и в настоящее время обработка патматериала пенициллином и ацетатом таллия является общепринятым лабораторным методом.

1.5.6. Способы и методы лечения животных и птиц при микоплазмозе и ассоциативных формах его проявления

В начале прошлого века, когда методы лечения больных микоплазмозом животных не были разработаны, больные и микоплазмоносители подлежали убою. В 20–30-е годы прошлого века при разработке методов лечения животных, больных микоплазмозом, Т. Витт (1925), Г. Кюрассон (1932, 1935), С.Н. Вышелесский с соавт. (1932), В.И. Бурцев (1933) и др. отмечали лечебный эффект от применения новосальварсана и новарсенола.

Различные препараты для лечебных целей оказывают при микоплазмозных инфекциях неодинаковый эффект, что связано, прежде всего, с видом возбудителя. Обобщая имеющиеся данные, можно

констатировать, что терапевтическим действием обладают препараты мышьяка, золота и антибиотики широкого спектра действия. О высокой эффективности мышьяковистых препаратов при лечении перипневмонии крупного рогатого скота сообщали С. Витт (1925), О. Кюрассон (1929): при агалактии овец – Д. Бридре с сотрудниками (1928), Л. Пигари (1938) и др.; новосальварсан при повальном воспалении легких с успехом применяли С.Н. Вышелесский с сотрудниками (1933), В.И. Бурцев (1933) и др.

Антибиотики для лечения и профилактики микоплазмозов млекопитающих и птиц стали применять с начала 50-х годов. По мере появления новых препаратов поиски эффективных методов снижения экономического ущерба и оздоровления поголовья расширяются.

В работах Л. Грумблеса, В. Бонея (1951), С. Вонга, Л. Джеймса (1953), Д. Фагея, Д. Кроули (1954, 1955), Х. Адлера с соавт. (1956) и Д. Блейка (1961) при респираторном микоплазмозе птиц; А. Беттса, В. Бевериджа (1953), Л. Бернфорса, К. Ланнека (1955), Д. Джолли (1965), Д. Шиммеля (1967), В. Свитцера (1964), Х. Яна (1969) при микоплазмозах рогатого скота показана определенная эффективность стрептомицина, тетрациклиновых препаратов, неомицина, спирамицина и прочих антибиотиков. Б. Лотт (1960), В. Гросс (1963), Н. Олсон (1967), А.Д. Фомина с соавт. (1967), А.Б. Байдевлятов (1970) и др. сообщили об эффективности применения при микоплазмозах птиц нитрофуранов. Ряд зарубежных авторов, изыскивая средства для лечения больных микоплазмозом, использовали с положительным результатом следующие антибиотики: азитромицин и доксицилин (V. Skerk, B. Barsic, V. Car, 2000), эритромицин и азитромицин (K.K. Ogasava, T.M. Goodwin (1999); R.J. Baier, J. Loggins, T.E. Kruger (2003); V. Skerk, I. Marekovic, J. Begovac et al. (2006).

В 60-х годах большое значение при микоплазмозах птиц и свиней приобрел тилан (тилозин тартрат), который можно было вводить внутримышечно с питьевой водой и кормом (О. Олесюк с соавт., 1964, 1967; Е. Озе с соавт., 1964; Х. Йодер и М. Хофстад, 1965; В. Свитцер, 1964, 1967; В. Крютцфельд, 1966;

Х Эйкмайер и Х. Майер, 1967 и др.).

Многочисленные данные литературы по обсуждаемому вопросу противоречивы, так как диагноз на микоплазмоз не всегда был достоверно подтвержден. С другой стороны, антибиотикотерапия, естественно, оказывала влияние на синергидно действующую патогенную микрофлору.

Учитывая разные данные литературы, появление новых перспективных препаратов, а также возможность изменения устойчивости микоплазм, некоторыми учёными (В.В. Киприч, А.Я. Пустовар, Т.Ю. Трускова, 1976) было проведено изучение чувствительности 17 штаммов микоплазм, выделенных от птиц, и 9 штаммов – от свиней, к 29 антибиотикам и другим химиопрепаратам. Выраженное действие оказали тетрациклиновые препараты, тетраолеан, олеморфоциклин, тилозин, гентамицин и др. Интересно, что в отношении около половины штаммов микоплазм проявилось ингибирующее действие отечественного пролонгированного сульфаниламида — сульфапиридазина. Микоплазмы, выделенные от больных свиней, оказались более чувствительными к испытанным препаратам, чем микоплазмы от птиц, что, возможно, обусловлено более длительным и широким использованием антибиотиков в птицеводстве.

По мнению В.А. Атамась, Е.В. Андреева, Н.П. Чечёткиной (1986) и др., лечебный эффект при микоплазмозе телят дает применение антибиотиков группы макролидов и тетрациклинового ряда (тилозин, эритромицин, спирамицин, окситетрациклин).

Г.Ф. Коромыслов, Я. Месарош, Л. Штипкович (1987) рекомендуют для лечения телят применять линкомицин, спектомицин и тилозин, отмечая при этом, что пенициллиновые, стрептомициновые и эритромициновые препараты не дают желаемого результата.

Для лечения урогенитального микоплазмоза крупного рогатого скота отечественными учеными были предложены схемы, включающие антибиотики тетрациклинового ряда (З.П. Наумец, Е.В. Андреев, Г.А. Красников, 1977).

В последние годы изучались различные схемы лечения плото-

ядных и коров при микоплазмозе, ассоциированном с другими инфекциями. При этом наиболее эффективными из них оказались схемы, в которых применялись комплексные препараты: тетрасульфин ПЭГ и тетрациклин ПВП в сочетании с другими антибактериальными препаратами (А.П. Красиков, Н.Н. Новикова, О.В. Вологодская, 2005). Также были разработаны и с высоким профилактическим и терапевтическим эффектом испытаны в производственных условиях при ассоциативных бактериальных инфекциях телят: экологический комплексный антибактериальный препарат (КАП) и пробиотик Ветом 1.1 в сочетании с антибиотикотерапией (В.И. Афанасенко, 2001; А.П. Красиков, В.Э. Малошевич, 2003).

При респираторном микоплазмозе птиц, ассоциированном с эшерихиозом, была отмечена высокая активность антибиотиков из группы макролидов (тилозин тартрат, фармазин), из группы плеуромутилина (тиамулин гидроген фумарат) и препаратов из группы фторхинолонов (ципрофлоксацин, энрофлоксацин), применяемых совместно с пробиотиком «Астра-2» и иммуномодулятором «Вестин» (С.К. Лыско, 2005).

Исследованиями последних десятилетий в области биологически активных веществ выявлена чрезвычайно важная роль нуклеиновых кислот в регуляции резистентности организма животных, повышения неспецифической устойчивости организма к неблагоприятным воздействиям, коррекции иммунных состояний. Препараты на основе рибонуклеиновых кислот способны выступать в качестве противовирусных средств, стимуляторов неспецифической резистентности, развития гемопоэза, иммуномодуляторов, иммуноадъювантов при вакцинации, антимутагенов и эффективных радиопротекторов. Поэтому ветеринарная наука и практика изыскивают новые средства лечения и профилактики микоплазмоза телят.

В связи с этим Н.А. Шкиль, С.Н. Магер, Н.Н. Шкиль (2004) рекомендуют для лечения телят, больных микоплазмозом, применять вестин совместно с альнорином и левотетрасульфином. При применении данной схемы срок выздоровления сокращался

в 1,5–2 раза и при этом было отмечено положительное влияние на гемопоэтическую реакцию кроветворных органов.

2. РОЛЬ МИКОПЛАЗМ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Человек является естественным хозяином более 10 видов микоплазм. Отделение «человеческих» видов от остальных в определенной степени условно, поскольку известны случаи выделения от человека микоплазм «животных». *Mycoplasma pneumoniae* является возбудителем респираторного микоплазмоза, ряд видов (*Ureaplasma urealyticum, U. parvum, Mycoplasma homonis, M. genitalium, M. fermentans* и др.) являются возбудителями урогенитальных мико- и уреаплазмозов (С.В. Прозоровский, И.В. Раковская, Ю.В. Вульфович, 1995).

У человека первой выделенной микоплазмой оказалась *M. hominis* (L. Dienes, G. Edsall, 1937). В дальнейшем описаны *Mycoplasma fermentans* (1952), *Mycoplasma salivarium* (1953), *Ureaplasma urealyticum* (1954), *Mycoplasma pneumoniae* (1962), *Mycoplasma orale* (1964), *Mycoplasma genitalium* (1981), *Mycoplasma spermatophilum* (1991), *Mycoplasma penetrans* (1991), при этом мнения различных авторов о степени их патогенности, частоте выявления в различных гентерных и возрастных группах и роли в патологии существенно отличаются (А.М. Савичева и др., 2008).

В 1961 году В.Д. Тимаков и Г. Я. Каган предложили принцип классификации микоплазмозов, основанный на тропизме микоплазм к определенным органам и тканям, который был дополнен в 1968 году Г.Я. Каган и И.В. Раковской. Согласно их классификации микоплазмы подразделяются в зависимости от локализации патологического процесса. Микоплазмы в организме как человека, так и животных могут вызывать воспалительные процессы респираторного тракта, суставов и урогенитального тракта. При этом наиболее часто микоплазмы выделяют из верхних дыхательных путей, легких, половых органов и реже из конъюнктивы (D. Edward, 1954; Taulor-Robinson, 1969).

В дальнейшем была более твердо установлена патогенность *Ureaplasma urealiticum*, часто в сочетании с хламидийной инфек-

цией (Ю.В. Вульфович, 1995; К.Б. Теохаров и др., 1998; В.И. Кисина, 2000) и реже в виде моноинфекций, прежде всего как возбудителя негонококковых уретритов. Это же заболевание вызывает и *M. genitalium*, патогенность которой была подтверждена в опытах на обезьянах. К патогенным относят некоторые из штаммов *M. hominis*, часто выделяемой при инфекционном процессе (Freund, 1985).

Многочисленные штаммы *Ureaplasma urealiticum* выделяются от больных с воспалительными процессами урогенитальных путей и нарушением репродуктивной функции, а иногда и от практически здоровых людей (A. Bihari, 1997; M. Abele-Horn, C. Wolff, P. Dressel, F. Pfaff, A. Zimmermann, 1997; M., Luo L. Zhang, Y. Xiao, 1998; L. Cedillo-Ramirez, C. Gil, I. Zago, A. Yanez, S. Giono, 2000).

Выделение уреаплазм и микоплазм от здоровых людей рассматривается как микоплазмоносительство, которое представляет значительную потенциальную опасность, так как *Ureaplasma urealiticum* – признанный этиологический агент негонококковых уретритов. Это заболевание было воспроизведено в экспериментальных условиях на обезьянах при интрауретральном заражении их уреаплазмами, выделенными от больных людей. Установлено, что *Ureaplasma urealiticum* вызывает образование конкрементов в почках и мочевом пузыре. *M. hominis* также может быть причиной уретритов, простатитов, пиелонефритов, играть некую роль в генезе патологии беременности, плода и новорожденных (З.П. Наумец, Е.В. Андреев, В.М. Журавлев, Г.А. Красиников, 1977; Митрофанов П.М., 1982; Ахмедшин З.Х., Ахмедшин Р.З., Коновалов С.А., Коновалова Л.В., Гоман Д.Н., Башмакова, 1996; Мальцева Е. С., 1996; Плотко Е.Э., 1996; Васильева Е.И., Фесячко Л.В., Марченкова А.В., Бурлаку Л.Н., 1997; Д.Г. Дерябин, 2000).

Среди урогенитальных молликут на первом месте уреаплазмы, на втором – *M. hominis*, они по частоте встречаемости уступают только хламидиям. Большинство микоплазм – воз-

будители оппортунистических инфекций, наиболее часто их выявляют у категорий риска (больные с воспалительными процессами гениталий, часто меняющие сексуальных партнеров и др.), у беременных. Наибольший патогенный потенциал признают за *M. pneumoniae, M. fermentans, U. urealyticum, M. hominis*. *M. pneumoniae* – один из распространенных возбудителей, вызывающих пневмонии и другие инфекционные заболевания дыхательных путей человека. Большинство выделяемых от животных микоплазм не имеет медицинского значения или их значение в патологии человека требует дополнительного изучения.

Медицинские аспекты микоплазмозов отражены в ряде отечественных монографий: В.Д. Тимакова и Г.Я. Каган «L-формы бактерий и семейство Mycoplasmataceae в патологии» (1973), Н.А. Пискаревой «Микоплазменная инфекция в детском возрасте» (1973), Д.Н. Злыдникова, А.П. Казанцева, М.Г. Шамановой «Микоплазмоз человека» (1975), С.В. Прозоровского, В.И. Покровского, В.И. Васильевой «Микоплазма пневмонии инфекция (1978), С.В. Прозоровского, И.В. Раковской, Ю.В. Вульфович «Медицинская микоплазмология» (1995) и др., а также ряде сборников и обзоров работ. Поэтому мы остановимся только на некоторых новых материалах в отношении урогенитальных микоплазмозов, в том числе полученных в докторской диссертации Е.В. Наумкиной «Мониторинг микробиоценозов влагалища в системе эпидемиологического надзора при инфекционно-воспалительных заболеваниях половой сферы» (2009).

2.1. Микробная экология влагалища в норме и при дисбиозах

В настоящее время изучению микробной экологии влагалища уделяется большое внимание ввиду огромного значения этой проблемы как для гинекологии, так и для неонатологии (Л.И. Кафарская и др., 2002). Детальное и систематическое исследование микробного биоценоза женской половой системы

было начато в 60–70-е гг. прошлого столетия (S.M. Finegold, 1996). Микробиоценозы различных органов и полостей человека являются весьма чувствительной индикаторной системой, которая способна реагировать качественными и количественными изменениями на любые физиологические и патологические сдвиги в состоянии макроорганизма и препятствовать инвазии патогенных микрорганизмов.

По современным представлениям влагалище с присущей ему микрофлорой образует единую экосистему, в которой вагинальная среда контролирует микрофлору, а микрофлора, в свою очередь, оказывает воздействие на вагинальную среду (Ленцер А.А., Ленцер Х.П., 1988; Савичева А.М., Башмакова М.А., 1996; Larsen B., 1930). Изменение численности того или иного вида микроорганизмов в соответствующем биотопе или появление не свойственных данному месту обитания бактерий служит сигналом для адаптивных или необратимых изменений в соответствующем звене микроэкологической системы (Петровская В.Г., Марко О.П., 1976; Шендеров Б.А., 1988; Barlett J.G., Polk B.F., 1984).

В соответствии с концепцией экологической ниши половые пути женщины можно представить как совокупность участков нескольких типов, включающих плоский эпителий влагалища, цилиндрический эпителий шейки матки и уникальную среду цервикальных желез. Эти участки характеризуются определенными биохимическими и физическими свойствами, в связи с чем каждому из них присуща несколько отличная от других популяция микроорганизмов (Ларсен Б., 1988; Кира Е.Ф., 2001).

Наибольшей стабильностью характеризуется микрофлора верхней трети влагалища, однако и она строго индивидуальна и может даже в состоянии нормы подвергаться изменениям в зависимости от фазы менструального цикла, возрастных, этнических групп и даже географических зон. В связи с этим возможны варианты нормального микробиоценоза (нормоценоза) влагалища

(Кафарская Л.И. и др., 2002; Barlett J.G., Polk B.F., 1984; Galadk R.P. et al., 1976; Overmann B.A., 1993).

Гормональные изменения на протяжении менструального цикла и жизни женщины (пубертат, менопауза, беременность) определяют интенсивность ферментативных процессов во влагалище и оказывают влияние на состояние его микрофлоры.

В пубертатный период, с момента активации овариальной функции, в организме у девушек появляются эндогенные эстрогены, под влиянием которых в клетках вагинального эпителия накапливается гликоген и происходит формирование так называемого «эстроген-стимулированного эпителия». На поверхности вагинальных эпителиоцитов повышается число рецепторных участков для адгезии лактобактерий, увеличивается толщина эпителиального слоя. С этого момента лактобактерии вновь становятся доминирующими микроорганизмами во влагалище и в последующем сохраняют это положение на протяжении всего репродуктивного периода у женщин. Метаболизм лактобактерий способствует стабильному сдвигу pH вагинальной среды в кислую сторону до 3,8–4,5 (Анкирская А.Е., 1995; Mehta A. et al., 1995). В вагинальной среде повышается окислительно-восстановительный потенциал, и это все создает неблагоприятные условия для роста и размножения строго анаэробных микроорганизмов.

У здоровых женщин репродуктивного возраста эстрогены воздействуют на вагинальный эпителий в фолликулярную, или пролиферативную, фазу менструального цикла, а прогестерон в лютеиновую, или секреторную фазу. В связи с этим частота высеваемости и количество строго анаэробных и большинства аэробных представителей нормальной микрофлоры меняются на протяжении менструального цикла. Наименьшее количество микроорганизмов во влагалище определяется в период менструации (Sobel J.D. et al., 1981; Overmann B.A., 1993). По данным A. Ohashi (1980) наибольшую информацию о количественном и качественном составе вагинальной микрофлоры можно получить

на 2–14 дни менструального цикла. Уровень лактофлоры при этом остается постоянным.

Морфофункциональные, физиологические и биохимические изменения в генитальном тракте во время беременности приводят к увеличению однородности вагинальной микрофлоры. Повышение концентрации гликогена во влагалище создает благоприятные условия для жизнедеятельности лактобактерий, количество которых во влагалище беременных значительно выше, чем у небеременных женщин (Bartlett J.G. et al., 1987; Oleen-Burkey M.A., 1995; Акопян Т.Э., 1996).

Микрофлора влагалища здоровых женщин репродуктивного возраста включает широкий спектр микроаэрофилов, факультативных и облигатных анаэробов (табл. 2.1[1]).

Для нормоценоза некоторые авторы допускают присутствие генитальных микоплазм – *M. hominis* и *U. urealyticum*, которые, по современным представлениям, рассматриваются как комменсалы, способные проявлять патогенные свойства при определенных условиях (Раковская И.В., 2005), однако нам отнесение урогенитальных микоплазм к «нормальной микрофлоре» представляется достаточно спорным.

Данные об инфицированности мико- и уреаплазмами здоровых женщин варьируют у разных авторов. Так, исследования Н.А. Гамовой (1993) показали, что выделение микоплазм у женщин репродуктивного возраста вне беременности не превышает 13,3 %, увеличиваясь при различных патологических состояниях. R. Iles et al. (1996) сообщают о выделении *U. urealyticum* лишь у 4 % клинически здоровых женщин, тогда как по другим данным этот показатель достигает 45,8 % (Povlsen K., 2001).

Под дисбактериозом понимают стойкие качественные и количественные нарушения нормофлоры в сторону увеличения числа микроорганизмов – симбионтов, встречающихся в норме в незначительных количествах (Красноголовец В.Н., 1989). Считается, что для возникновения дисбактериоза необходимо наличие

[1] Кудрявцева Л.В. и др., 2001.

конкурентного роста одного или нескольких условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) (Цвелев Ю.В. и др., 1995).

Таблица 2.1

Состав вагинальной микрофлоры

Микроорганизмы	Частота выделения, %	Количество, КОЕ/мл
Микроаэрофильные микроорганизмы		
Lactobacillus spp.	71–100	10^7 - 10^9
G. vaginalis	6–60	10^4 - 10^6
Облигатно-анаэробные грамположительные микроорганизмы		
Lactobacillus spp.	5–30	10^7 - 10^9
Bifidobacterium spp.	12	10^3 - 10^7
Clostridium spp.	10–25	менее 10^4
Propionibacterium spp.	5–25	менее 10^4
Mobiluncus spp.	30–90	менее 10^4
Peptostreptococcus spp.	32–88	10^3 - 10^4
Облигатно-анаэробные грамотрицательные микроорганизмы		
Bacteroides spp.	9–13	10^3 - 10^4
Prevotella spp.	60	менее 10^4
Porphyromonas spp.	31	менее 10^4
Fusobacterium spp.	14–40	менее 10^4
Veilonella spp.	11–14	менее 10^4
Факультативно-анаэробные микроорганизмы		
Corynebacterium spp.	8–40	10^4 - 10^5
Staphylococcus spp.	62	10^3 - 10^4
Streptococcus spp.	10–40	10^4 - 10^5
Enterobacteriaceae	5–30	10^3 - 10^4
Candida spp.	15–20	10^4
M. hominis	2–15	10^3
U. urealyticum	6–7	10^3
M. fermentans	2–5	менее 10^3

При нарушении колонизационной резистентности уменьшается доза бактерий, которые в норме преобладают в соответствующей экологической нише, в данном случае лактобацилл, увеличиваются число и спектр потенциально патогенных микроорганизмов, их транслокация во внутренние органы. При дисбактериозах общее количество микроорганизмов может возрастать более чем в 1000 раз, составляя 10^8–10^{13} КОЕ на 1 мл влагалищного секрета с преобладанием факультативных и облигатных анаэробов.

Существует ряд факторов, способствующих нарушению микробиоценоза влагалища, которые условно можно разделить на эндогенные и экзогенные (Кисина В.И. и др., 2003). К первым относятся функциональные нарушения яичников, щитовидной железы, фоновые заболевания шейки матки, перенесенные или сопутствующие воспалительные заболевания мочеполовых органов. Существенная роль отводится и снижению иммунологической реактивности (Soepr S.S. et al., 2005).

Провоцирующими экзогенными факторами являются экологические, санитарно-гигиенические, климато-географические. Патологические сдвиги в вагинальном микробиоценозе могут происходить при длительном нерациональном применении антибиотиков, лечении гормонами, цитостатиками, рентгенотерапии, особенно на фоне эндокринопатий, анемии, врожденных пороках развития половых органов, использовании внутриматочной и гормональной контрацепции (Шендеров Б.А., 1998). О.Д. Константиновой с соавт. (2000) при изучении видового состава и факторов персистенции вагинальной и цервикальной микрофлоры репродуктивной сферы при внутриматочных вмешательствах выявлено, что у женщин с воспалительными осложнениями при внутриматочных вмешательствах увеличивается соответствие видового состава вагинальной и цервикальной микрофлоры, а также отмечается увеличение значений факторов персистенции вагинальной микрофлоры при внутриматочной контрацепции, и снижение персистентного потенциала вагинальной микрофлоры после прерывания беременности.

Исследование связи между применением гормональной контрацепции и риском возникновения урогенитальных инфекций показало, что применение оральных контрацептивов коррелирует с повышенным риском возникновения хламидиоза и вагинального кандидоза и снижало риск возникновения бактериального вагиноза. Применение депо-контрацептивов также значительно повышало риск хламидийной инфекции и снижало риск бактериального вагиноза, трихомониаза и воспалительных заболеваний органов малого таза (Richter S.S. et al., 2005).

Известно несколько вариантов проявления влагалищного дисбактериоза: бактериальный вагиноз (БВ), урогенитальный кандидоз (УК), урогенитальная микоплазменная инфекция, неспецифический вагинит (Назарова Е.К. и др., 2003).

2.1.1. Урогенитальная микоплазменная инфекция

Микоплазмы являются мембранными паразитами, с чем во многом связан патогенез вызываемых ими инфекций (Прозоровский С.В. и др., 1995).

К факторам патогенности микоплазм относят способность к адсорбции и взаимодействию с рецепторами клетки-хозяина, экзо- и эндотоксины, гемолизины, ферменты патогенности. Цитотоксическое действие оказывают продукты метаболизма микоплазм – аммиак и кислые метаболиты. Микоплазменные липопротеины оказывают цитотоксическое и цитопатическое действие на макрофаги, подавляя их фагоцитарную активность, результатом чего является нарушение клеточной кооперации в индукции иммунного ответа (Раковская И.В., 2005 а, б).

Человек является естественным хозяином по крайней мере 16 видов микоплазм, являющихся условно-патогенными микроорганизмами и обитающих на слизистых оболочках урогенитального и респираторного тракта. Из 7 видов микоплазм, встречающихся в урогенитальном тракте человека, патогенным потенциалом обладают *M. hominis, M. genitalium* и *U. urealyticum* (Раковская И.В., 2005 а, б).

Колонизация мочеполовой системы человека генитальными микоплазмами коррелирует с разнообразными патологическими состояниями у взрослых обоего пола, у беременных и новорожденных (Фофанова И.Ю., 2000; Furr P.M., Tailor-Robinson D., 1993; Waites K.B. et al., 2005), хотя вопрос о роли урогенитальных микоплазм в этиологии инфекций, передаваемых половым путем, продолжает оставаться дискутабельным (Tailor-Robinson D., 1998).

Считается, что *U. urealyticum* способна вызывать различные синдромы поражения мочеполовой системы: острый и хронический негонококковый уретрит у мужчин (Tailor-Robinson D., 1996; Zurovac-Jovanovic G., Nadazdin M., 1989), в том числе в ассоциации с *M. hominis* (Tailor-Robinson D., Furr P.M., 1997) и вирусом простого герпеса (Charini F. et al., 1998); острый уретральный синдром (Stamm W.E. et al., 1983) и интерстициальный цистит у женщин (Potts J.M., 2000), хотя существует иная точка зрения на этиологию дизурических расстройств (Кан Д.В. и др., 1998). Показана роль уреаплазм в развитии эндометритов после кесарева сечения (Patai K. et al., 1998), цервицитов (Карамова А.Э. и др., 2004), а также достоверная связь между развитием трубной беременности и частотой обнаружения *U.urealyticum* в половых путях (Qi H. et al., 1997).

S. Pisani et al. (1999) показано, что генитальные микоплазмы обнаруживаются в половых путях женщин, как правило, в ассоциации с другими возбудителями, при этом наличие или отсутствие инфекционного агента не коррелирует с данными кольпоскопии.

С бактериальным вагинозом значимо ассоциируется присутствие в половых путях лишь *M. hominis* (Keane F. Et al., 2000).

M. genitalium выявляется значительно реже, не принимает участия в развитии бактериального вагиноза, однако ассоциируется с развитием цервицита и эндометрита, а также, возможно, сальпингита и трубного бесплодия (Tailor-Robinson D., 2002).

Противоречивые данные получены и при экспериментальном моделировании микоплазменной инфекции (Кисина В.И. и др., 2002). Так, при введении микроорганизмов в задний свод влагалища зеленых мартышек признаков инфекции не наблюдалось, тогда как введение *M. hominis* и *M. fermentans* в верхние отделы половых путей вызывало развитие параметрита и сальпингита (Moller B.R., Freundt E.A., 1983).

При попытках выделить факторы, влияющие на колонизацию урогенитального тракта микоплазмами, показано влияние

половых гормонов (Tailor-Robinson D., Furr P.M., 1993), генетической предрасположенности (Jeremias J. et al., 1999), а также наличия соответствующей микробной «окружающей среды» на распространенность возбудителей (Giraldo P. et al., 1999).

Ранее считали, что существует 14 серотипов *U. urealyticum*, которые объединяли в 2 биовара: Parvo и T-960. На основании выявленных существенных генетических различий было предложено разделить вид *U. urealyticum* на 2 вида – *U. urealyticum* (ранее T-960) и *U. parvum* (ранее биовар Parvo) (Kong F. et al., 1999).

Клинические различия заболеваний в зависимости от вида уреаплазм отмечаются рядом авторов (Кисина В.И. и др., 2003 а, б). Так, выявлено преобладание T-960 у пациенток с воспалительными заболеваниями органов малого таза при общей более частой встречаемости вида *U. parvum*. Кроме того, у штаммов T-960 отмечены более высокая степень устойчивости к тетрациклину и более выраженное неблагоприятное влияние на течение и исход беременности (Abele-Horn M. et al., 1997). Kataoka S. et al. (2006) выявлено, что колонизация половых путей *U. parvum*, а не *U. urealyticum* коррелирует с увеличением частоты преждевременных родов. В целом отмечается более частое выявление вида *U. parvum*, при этом *U. urealyticum* чаще коррелирует с бактериальным вагинозом и трихомониазом (Рюмин Д.В., 2000), хотя другие авторы указывают на одинаковую частоту выявляемости *U. parvum* и *U. urealyticum* при бактериальном вагинозе (Евстигнеева Н.П. и др., 2000).

В России ситуация по инфекциям, передаваемым половым путем (ИППП), продолжает оставаться неблагоприятной (Аковбян В.А. и др., 1998). Вагинальные дисбиозы, не являясь «классическими» венерическими болезнями, входят в группу так называемых болезней «нового поколения» (Брико Н.И. и др., 2004), для которых половой путь передачи не исключается, но дискутируется и не является основным и единственным. Бактериальный вагиноз (БВ), урогенитальный кандидоз, мико-

уреаплазмозы, уступая трихомониазу и сифилису, имеют значительный удельный вес в структуре урогенитальной патологии, и заболеваемость этими инфекциями имеет тенденцию к увеличению. Согласно действующим нормативным документам данные инфекции подлежат суммарному количественному учету в учреждениях санэпидслужбы (Брико Н.И. и др., 2004).

Е.Ф. Кира (1995), В.В. Муравьева (1997) приводят сходные данные о встречаемости БВ среди пациенток гинекологической клиники – 19,2–24 % в общей популяции и 62,4–86,8 % при патологических белях. При этом констатируется, что БВ в России занимает первое место среди инфекций влагалища.

Л.Е. Брагина и Л.И. Васильева (1996) выявили различные нарушения микробного пейзажа у 79,8 % пациенток, правда, не разграничивая понятий неспецифического вагинита и истинных дисбиотических нарушений.

В пользу полового пути передачи заболевания свидетельствуют одновременное выделение *G.vaginalis* из половых путей женщин, страдающих БВ, и от их сексуальных партнеров; высокая частота реинфекций у излеченных женщин, половые партнеры которых не лечились одновременно; достоверные случаи заболевания БВ женщин после половых контактов с мужчинами, у которых обнаружены *G. vaginalis* (Chapin-Roberson R.K., 1993; Amsel R. et al., 1983; Schwebke J.R., Desmond R., 2005).

Данные о распространенности урогенитальных микоплазм также широко варьируют. Так, целый ряд авторов констатирует наличие урогенитальных микоплазм в пределах 44–48 % пациентов дерматовенерологических клиник (Bihari A., 1997; DeMoreno N.O. et al., 1993; Madjar S. et al., 1996). При этом отмечается преобладание *U. urealyticum* в сравнении с *M. hominis* (Боневский А.А. и др., 2002; Швацкова Т.А., Цыганко Е.В., 2004), а также более частое выделение *U. urealyticum* из влагалища женщин в сравнении с образцами из уретры у мужчин (Koch A. et al., 1997). В то же время I.L. Barberis et al.(1998) сообщают о выделении урогенитальных микоплазм лишь у 6,5 % больных.

И.О. Малова (1999) сообщает о выявлении уреаплазменной инфекции у девочек до 12 лет, не живущих половой жизнью, причем в 75,5 % – в составе смешанных полимикробных ассоциаций.

Частота встречаемости микоуреаплазменной инфекции у беременных составляет 56,7 %, причем в 88,2 % возбудитель обнаруживается в дыхательных путях новорожденных (Chua K.B. et al., 1998).

C.J. Priestley et al (1997) констатировали непостоянное выделение уреаплазм у 40 % женщин с бактериальным вагинозом и у 50 % женщин с нормальной микрофлорой на протяжении 8 недель.

При изучении возрастной структуры больных микоуреаплазмозами отмечается пик инфицированности в возрастной группе 14–20 лет (Ивашков Е.А., Ивашкова О.В., 2004).

Изучение особенностей сексуального поведения лиц, инфицированных мико- и уреаплазмами показывает определенную зависимость распространения этой инфекции от поведенческих факторов, что не позволяет игнорировать роль полового пути передачи (Сергевнин В.И. и др., 2003; Юцковская Я.А., Юцковский А.Д., 2003).

Целый ряд авторов указывают на смешанную, в большинстве случаев, этиологию урогенитальных инфекций. Доля микст-инфекций в структуре данной патологии по данным разных авторов варьирует от 51,9 % (Якубович А.И. и др., 2003) до 82 % и выше (Рюмин Д.В., Радзинский В.Е., 2000; Мосин Л.М. и др., 2000; Чеботаревич В.Н. и др., 2004).

Отмечается наличие устойчивых ассоциаций возбудителей. Так, по данным В.Н. Чеботкевич с соавт. (2004) при микоуреаплазмозе у женщин наиболее частыми ассоциантами являются *G. vaginalis* (до 66,7 %), *Ch. trachomatis* (12,5–20 %), *T. vaginalis* (до 26,7 %), CMV (9,3 %), HSV (до 20 %). Л.М. Мосин с соавт. (2000) отмечают снижение количества лактобацилл с появлением облигатных анаэробов в высоких титрах у большин-

ства больных урогенитальным хламидиозом, появление у части больных условно-патогенных микроорганизмов, частое сочетание хламидий с гарднереллами (35 %), микоплазмами (19,2 %) дрожжеподобными грибами (15 %). S. Demirezen et al. (2005) отмечают статистически значимую корреляционную зависимость между трихомониазом и микроорганизмами, ассоциированными с бактериальным вагинозом.

Ряд авторов указывает на существование устойчивых бактериально-вирусных ассоциаций. Так, отмечена более высокая частота встречаемости бактериального вагиноза у больных ВИЧ-инфекцией (D.J. Jamieson et al., 2005), бактериального вагиноза и хламидиоза у женщин с папилломавирусной инфекцией гениталий (C.S. DaSilva et al., 2004), а также нарушения микробного пейзажа вагинальной микрофлоры с появлением условно-патогенных микроорганизмов у этой категории больных (Н.П. Евстигнеева и др., 2002). S.A. Ross et al. (2005) выявили достоверную ассоциативную связь между цитомегаловирусной инфекцией урогенитального тракта и бактериальным вагинозом.

Анализ значительного количества исследований, посвященных инфекционно-воспалительным процессам половой сферы, вызванным условно-патогенной микрофлорой, выявляет ряд вопросов, определяющих высокую актуальность дальнейшего изучения микробиологии и эпидемиологии этой группы заболеваний.

Констатируемая многими авторами полимикробная природа воспалительных заболеваний мочеполового тракта, наличие в большинстве случаев ассоциаций возбудителей, способных кардинально изменять форму и структуру инфекционного процесса, приводить к его манифестации или, наоборот, к персистентному или латентному состоянию и в конечном итоге изменять типичную клиническую картину, характерную для одного возбудителя, требует специфического подхода к диагностике, лечению и эпидемиологическому надзору за этими инфекциями (И.Н. Хан и др., 2002; Г.Г. Миллер, 2002).

Вопросы диагностики являются наиболее проблематичными в изучении микст-инфекций (Г.Г. Миллер, 2002). Несмотря на значительный прогресс в области диагностики урогенитальных инфекций в последние годы, появление новых методологий и целых комплексов детекции возбудителей, высокоэффективных тест-систем (ИФА, РИФ), питательных сред, распространение и совершенствование ПЦР-диагностики, остается целый ряд нерешенных проблем в этой области. По-прежнему не исключены лабораторные ошибки, расхождения результатов, полученных разными методами, обусловленные применением нерегламентированных методологий, тест-систем, «человеческим фактором», а также объективными трудностями выявления персистирующих и труднокультивируемых возбудителей (Г.А. Дмитриев, 2004) и количественной оценки обсемененности (Е.А. Ивашков и др., 2004).

Среди различных лабораторных методов, применяемых для диагностики урогенитальной микоплазменной инфекции большинство авторов отдают предпочтение ПЦР и культуральному методу, подчеркивая высокую чувствительность и специфичность данных лабораторных технологий, возможность определения антибиотикорезистентности, а также дифференциации биоваров. Серологический метод уступает по чувствительности, специфичности и прогностической значимости для этих возбудителей (В.И. Кисина и др., 2002, 2004; С.А. Костюк и др., 2004; М.И. Кудрина, И.В. Колмогорова, 2004). Вместе с тем И.В. Раковская (2005) указывает на нецелесообразность применения ПЦР для выявления урогенитальных микоплазм, так как они легко культивируются и выявляются в реакции иммунофлюоресценции, за исключением *M. genitalium*.

Развернутое микробиологическое исследование незаменимо при диагностике неспецифических вагинитов (M. Karaca et al., 2005), прежде всего диагностическая ценность определяется возможностью определения антибиотикочувствительности возбудителей, которая у условно-патогенных факультативно-анаэробных

микроорганизмов может широко варьировать (А.С. Анкирская, В.В. Муравьева, 2001).

Говоря об эпидемиологии микст-инфекций, надо признать, что их учет в России не предусмотрен официальной медицинской статистикой. Эти сведения не содержатся в отчетах по инфекционной заболеваемости населения, поэтому получение информации ограничивается данными научной литературы (Г.Г. Миллер, 2002). Однако различные авторы применяют существенно отличающиеся диагностические подходы, что делает полученные результаты малосопоставимыми. Подавляющее большинство исследований, посвященных изучению микробиологии и эпидемиологии ИППП, базируются на применении какой-либо одной лабораторной технологии, направленной, как правило, на выявление ограниченного круга возбудителей без учета симбионтных представителей нормальной микрофлоры. Это приводит к существенным различиям в информации о составах полимикробных ассоциаций при данной патологии.

Игнорирование в значительном числе исследований микробиологических методов ввиду их трудоемкости, длительности и высокой стоимости приводит к недооценке участия условно-патогенных факультативно-анаэробных возбудителей в развитии инфекционного процесса, что отражается на эффективности лечебных мероприятий и ведет к практически полному выпадению этой группы возбудителей из зоны внимания эпидемиологов. Между тем ряд авторов указывает на актуальность и перспективность изучения этиопатогенетического значения симбионтной микрофлоры в патогенезе урогенитальных инфекций (Д.В., Рюмин 2001; В.И. Кисина и др., 2002).

Таким образом, совершенствование диагностических подходов, разработка оптимальных алгоритмов обследования, позволяющих выявлять широкий спектр возбудителей с наименьшими затратами, является одной из актуальных задач, направленных на оптимизацию микробиологического мониторинга урогенитальных инфекций, повышение достоверности информа-

ции, используемой при эпидемиологическом анализе на уровне функционирования информационно-аналитической и диагностической подсистем эпиднадзора.

2.2. Общая популяционная характеристика обследованных и методы их лабораторного исследования

Для изучения эпидемиологических особенностей заболеваемости урогенитальными инфекциями, вызванными условно-патогенными возбудителями, был проведен анализ данных официальной статистики по заболеваемости инфекциями, передаваемыми половым путем на территории Омска и Омской области в период с 1999 по 2005 гг., а также результатов собственных исследований.

В период с 2000 по 2005 гг. на базе кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ОмГМУ было обследовано 4708 больных, из них 3560 женщин и 1148 мужчин. Результаты обследования легли в основу анализа эпидемиологических закономерностей урогенитальной патологии – высеваемости отдельных возбудителей, структуры микст-инфекций, сезонных колебаний по отдельным нозологическим формам.

Для анализа факторов риска возникновения различных вариантов вагинальных дисбиозов, а также микробиологических особенностей изучаемой патологии были проанализированы результаты комплексного микробиологического обследования 1256 женщин. Возраст обследованных колебался от 13 до 65 лет и в среднем составил 27,8±7,9 лет, большинство пациенток (96,1 %) были репродуктивного возраста.

251 женщина наблюдалась в клинике Омской медицинской академии; 498 были пациентками частных клиник г. Омска; 331 – обратились за гинекологической помощью в женские консультации; 83 больные находились на стационарном лечении в гинекологических отделениях; 63 – наблюдались в перинатальном центре Омской областной клинической больницы и 30 беременных с

доношенной беременностью поступили в областной родильный дом для планового родоразрешения.

Обязательным условием включения в группу исследования являлось отсутствие применения антибиотиков, а также местно действующих препаратов в течение 2 недель перед обследованием. Материал у небеременных женщин забирали в пролиферативную фазу менструального цикла. Распределение пациенток в зависимости от клинического диагноза, послужившего поводом к обследованию, приведено в табл. 2.2.

Таблица 2.2

Распределение пациенток в зависимости от клинического диагноза

Диагноз	Количество больных	
	Абс.	%
Острый и хронический вульвовагинит	457	43,1
Сальпингоофорит	125	11,8
Эрозия шейки матки	131	12,4
Беременность	36	3,4
Первичное и вторичное бесплодие	23	2,1
Антенатальная гибель плода	49	4,6
Папилломавирусная инфекция шейки матки	27	2,5
Острый и хронический цистит	16	1,5
Эндометриоз	4	0,4
Киста яичника	4	0,4
Миома матки	4	0,4
Хронический эндометрит	4	0,4
послеродовый метрит	1	0,9
Контроль излеченности	75	7,1
Обследование (больные, не предъявляющие жалоб)	103	9,7

Применительно к целям и задачам исследования были сформированы группы сравнения в зависимости от возраста, диагноза, наличия или отсутствия факторов риска, микробиологической картины.

При обращении больных за гинекологической помощью проводилось анкетирование по специально разработанной анкете, содержащей ряд вопросов, позволяющих судить о наличии тех или иных факторов риска, данных анамнеза, субъективных жалобах. Полученные сведения заносились в базу данных для последующей математической обработки.

2.2.1. Методы изучения биологических свойств лактобактерий

Были изучены биологические свойства 90 штаммов лактобактерий, выделенных из вагинального отделяемого.

Антилизоцимную активность (АЛА) определяли по методике О.В. Бухарина (1989), в основу которой положен принцип «отсроченного антагонизма». Готовили ряд чашек Петри со средой МРС-4, содержащей лизоцим в различных концентрациях от 0 до 10 мкг/мл. На поверхность питательной среды бляшками засевали исследуемые культуры лактобактерий. После инкубации выросшие колонии убивали парами хлороформа и сверху наслаивали 3–4 мл полужидкого агара, смешанного с 0,1 мл взвеси, соответствующей 10 ед. оптического стандарта мутности (ГИСК им. Л.А. Тарасевича), индикаторной культуры *Micrococcus luteus* АТСС 15307. Через сутки инкубации при 37 ^{0}С проводили учет результатов опыта по наличию роста микрококка на поверхности и вокруг колоний исследуемых культур, инактивировавших известную концентрацию лизоцима, внесенного в питательную среду. За уровень антилизоцимной активности исследуемых культур принимали максимальное значение концентрации лизоцима в среде в мкг, при которой еще наблюдается рост микрококка.

Антилактоферриновую активность (АЛФА) определяли по методике И.В. Валышевой с соавт. (2003).

Из 2-суточных культур исследуемых штаммов лактобактерий готовили взвесь 10 ед. по оптическому стандарту мутности ГИСК имени Л.А. Тарасевича в жидкой среде МРС. Готовили раствор лактоферрина в концентрации 100 нг/мл (в качестве источника использовали пул нормальных сывороток крови от здоровых лиц) на забуференном физрастворе. 50 мкл взвеси исследуемых микроорганизмов смешивали с 50 мкл приготовленного раствора лактоферрина. В качестве контроля раствор лактоферрина смешивали с 50 мкл стерильной жидкой питательной среды. Пробы инкубировали при 37 ^{0}С 24 часа. После инкубации проводили центрифугирование при 8000 об/мин в течение 20 минут, отбирали 50 мкл супернатанта и рабочим раствором буфера

опытные и контрольные пробы разводили в 5 раз. Далее проводили определение концентрации лактоферрина в опытных и контрольной пробах твердофазным иммуноферментным методом с использованием набора реагентов «Лактоферрин-стрип» (Вектор-Бест, Новосибирск). Полученные значения концентрации лактоферрина умножали на 5 и получали концентрацию в нг/мл. За антилактоферриновую активность принималь разницу концентраций лактоферрина в контроле и опыте, выраженную в абсолютных величинах (нг/мл).

Адгезивные свойства изучали по методике В.И. Брилис с соавт. (1986). Нами был использован развернутый метод, рекомендованный авторами для изучения влияния различных факторов на процесс адгезии. В качестве клеточного субстрата использовали нативные эритроциты человека 0 (1) группы Rh+, дважды отмытые 0,1 М раствором фосфата натрия, приготовленным на изотоническом растворе хлорида натрия (pH7,2–7,3). Из эритроцитов готовили взвесь концентрацией 100 млн/мл.

В пробирки вносили по 0,5 мл взвеси микроорганизмов 10^9 мк/мл и равный объем эритроцитов. Смесь инкубировали при 37 ^{0}С в течение 30 минут, периодически встряхивая. Затем готовили мазки на тщательно обезжиренных предметных стеклах, высушивали, фиксировали метанолом в течение 10 минут, окрашивали по Граму. Приготовленные мазки изучали под микроскопом, подсчитывая показатели *СПА*, *К*, *ИАМ*.

СПА – средний показатель адгезивности – среднее количество микроорганизмов, прикрепленных к одному эритроциту (при подсчете на 50 эритроцитах).

К – коэффициент участия эритроцитов в адгезивном процессе – процент эритроцитов, имеющих на своей поверхности адгезированные микробы.

ИАМ – индекс адгезивности микроорганизмов – среднее количество микробных клеток на одном участвующем в адгезивном процессе эритроците. *ИАМ* вычисляется по формуле

$$ИАМ = \frac{СПА \cdot 100}{К}.$$

Микроорганизмы считаются неадгезивными при *ИАМ*<1,75; низкоадгезивными – от 1,76 до 2,5; среднеадгезивными – от 2,51 до 4,0 и высокоадгезивными при *ИАМ* выше 4,0.

2.2.2. Методика культурального исследования

Из исходного материала в транспортной среде готовили разведения на агаризованном тиогликолевом буфере и из полученных разведений проводили посевы по 0,1 мл на сектора плотных питательных сред. Для выявления:

– энтеробактерий и некоторых неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов (НФГОМ) – на среду Эндо;

– стафилококков – на желточно-солевой агар (ЖСА);

– дрожжеподобных грибов рода Candida – на среду Сабуро;

– микоплазм и уреаплазм по 0,1 мл засевали на жидкие среды для индикации микоплазм и уреаплаз[1];

– лактобактерий – на среду МРС-4;

– гарднерелл и некоторых другимх условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) – по 0,1 мл на сектора модифицированного КА (ГРМ-агар с добавлением 2 % эритроцитарной массы человека и 5 % лошадиной сыворотки или сыворотки КРС).

Чашки с посевами для выявления лактобактерий и гарднерелл инкубировали в течение 48–72 часов в условиях повышенного содержания CO_2.

Для выделения некоторых облигатно-анаэробных бактерий делали посев из полученных разведений по 0,1 мл в 10 мл предварительно прогретой обогащенной тиогликолевой среды (Ю.В. Цвелев и др., 1995).

Выделение чистых культур микроорганизмов и их идентификацию проводили общепринятыми методами.

[1] ООО НПФ «Диагност-мед», Омск.

Рост *Gardnerella vaginalis* регистрировали на модифицированном КА (очень мелкие точечные колоний, гладкие, округлые, с ровными краями, окруженные зоной β-гемолиза). Дальнейшую идентификацию проводили по морфологии (грамотрицательные или грамвариабельные мелкие полиморфные палочки), отсутствию оксидазной и каталазной активности, а также в реакции непрямой иммунофлюоресценции.

Рост лактобактерий учитывали на среде МРС-4 (мелкие или средних размеров шероховатые округлые колонии), их ориентировочную идентификацию проводили по морфологии (относительно крупные, грамположительные правильной формы равномерно окрашенные палочки, располагающиеся одиночно или цепочками), отсутствию подвижности и каталазной активности.

Регистрацию роста и количественный учет микоплазм и уреаплазм проводили по изменению цвета засеянных жидких индикационных питательных сред. В сомнительных случаях делали высев из пробирок, изменивших цвет, по 0,1 мл капельно на плотные питательные среды для мико-и уреаплазм.

У 104 выделенных культур мико- и уреаплазм была определена чувствительность к антибактериальным препаратам различных групп: тетрациклинам (тетрациклин и доксициклин), макролидам (мидекамицин и эритромицин), хинолонам (пефлоксацин), аминогликозидам (гентамицин), линкозамидам (клиндамицин). Использовались наборы жидких сред для определения чувствительности молликут к антибиотикам[1].

С роста в обогащенной тиогликолевой среде готовили препараты-мазки, изучали морфологию выросших микроорганизмов, делали высев на кровяной агар с инкубацией в аэробных условиях для решения вопроса о принадлежности к облигатным анаэробам и ориентировочного установления их родовой принадлежности. Далее проводили анализ полученных результатов, сопоставление данных культурального исследования с результа-

[1] ООО НПФ «Диагност – мед», Омск.

тами микроскопии вагинального мазка и делали заключение о состоянии микробиоценоза влагалища.

В случаях обнаружения в мазках при микроскопии нативного материала узнаваемых морфотипов строгих анаэробов (грамотрицательные полиморфные палочки и коккобациллы, расположенные скоплениями – *Bacteroides-Prevotella*; грамотрицательные тонкие палочки и нити с заостренными концами – *Fusobacterium*; грамотрицательные нежные изогнутые палочки в виде полумесяца – *Mobiluncus*; грамположительные палочки, неравномерно окрашенные, более интенсивно окрашенные на концах, одиночные, в парах, палисадом – анаэробные коринеформные бактерии) в большом количестве и отсутствии роста морфологически сходных микроорганизмов на засеянных средах делали вывод о наличии строгих анаэробов соответствующих групп в количестве свыше 10^5 КОЕ/мл. Оценку полученных результатов проводили по нижеизложенным критериям:

О дисбиозе половых путей свидетельствовали:

- ✓ дефицит лактобактерий менее 10^4 колониеобразующих единиц /мл;
- ✓ увеличение содержания условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) аэробной, факультативно-анаэробной и облигатно-анаэробной групп более 10^4 КОЕ/мл;
- ✓ наличие УПМ в ассоциациях более чем из двух видов;
- ✓ наличие гемолизирующих микроорганизмов, в том числе гемолизирующих свойств у лактобактерий.

Часть исследований (материал от 206 больных) была проведена с использованием строгой анаэробной техники. Посев материала из разведений проводили дополнительно на сектора анаэробного гемагара, инкубировали в анаэробных условиях с использованием Genboxanaer (BioMereiux) до 5 суток при 37 ^{o}C. Ориентировочную идентификацию облигатных анаэробов проводили по морфологии, культуральным свойствам на плотной питательной среде, каталазному тесту, тесту на аэротолерант-

ность. У 27 больных также проводили микробиологическое исследование перитонеальной жидкости, полученной при лапароскопии или путем пункции через задний свод влагалища с использованием аэробной и анаэробной техники.

Кроме того, проводилось исследование соскобов из уретры и цервикального канала на наличие хламидий методом прямой реакции иммунофлюоресценции (РИФ) с использованием «Хламоноскрин» (НИАРМЕДИК, Москва).

2.2.3. Молекулярно-генетические методы

С помощью ПЦР с накопленного материала в жидкой питательной среде для индикации уреаплазм (115 образцов) проводили типирование биоваров Parvo и T-960 тест-системами «Полимик Б» НПФ «Литех» (г. Москва).

Культуру уреаплазсм центрифугировали в микропробирках типа «Eppendorf» на высокоскоростной центрифуге «MiniSpin» при 12 000 об/мин, в течение 5 минут и из полученного осадка выделяли ДНК сорбентным способом с использованием набора для выделения ДНК из биопроб НПФ «Литех» (г. Москва).

Кроме того, в вагинальном отделяемом от 108 больных методом ПЦР определяли наличие вирусов CMV, HSVI и HSVII тест-системами «Герпол 1+2» и «Цитопол» НПФ «Литех» (Москва). Синтез ДНК осуществляли на программируемом амплификаторе «Терцик» (ДНК Технология, Москва, Россия) тест-системами «Полимик Б» «Герпол 1+2» и «Цитопол» НПФ «Литех» (г. Москва).

Анализ продуктов ПЦР осуществляли разделением электрофорезом в 2 %-ном агарозном геле с добавлением 1 %-ного раствора бромистого этидия, с последующей регистрацией на УФ-трансиллюминаторе и документированием видеосистемой. На присутствие возбудителя указывало наличие полосы, соответствующей по электрофоретической подвижности положительному контролю для биоваров Parvo или T-960.

2.2.4. Методы изучения факторов местного иммунитета

Изучение факторов местного иммунитета влагалища было проведено у 79 больных. В качестве контроля обследовали 10 здоровых женщин репродуктивного возраста, не предъявляющих жалоб, у которых при микроскопии вагинальных мазков и при микробиологическом исследовании был определен нормоценоз.

Для этого использовали вагинальные смывы, полученные путем введения в задний свод влагалища 5 мл стерильного физраствора. Полученную смывную жидкость центрифугировали, в осадке подсчитывали число лейкоцитов в камере Горяева, а также для оценки клеточного звена иммунитета ставили реакцию фагоцитоза с культурой стафилококка с вычислением показателей фагоцитарной активности (ФА), фагоцитарного числа через 30 и 120 минут (ФЧ30 и ФЧ120) и индекса завершенности фагоцитоза (ИЗФ).

В надосадочной жидкости определяли иммуноферментным методом содержание лактоферрина с использованием набора реагентов «Лактоферрин-стрип» (Вектор-Бест, Новосибирск), секреторного иммуноглобулина А с использованием тест-систем «sIgA – ИФА-Бест», лизоцима по действию на тест-культуру *Micrococcusluteus* ATCC 15307 (О.В. Бухарин, Н.В. Васильев, 1974).

2.2.5. Методы лабораторных исследований

Взятие материала. Материал забирался акушером-гинекологом после введения зеркала из заднего свода влагалища стерильным ватным тампоном. Для лучшего сохранения анаэробов использовались ватные тампоны с лизированной кровью (Ю.В. Цвелев и др., 1995). После забора тампон помещали в 4,5 мл транспортной среды (0,4 %-ный агаризованный тиогликолевый буфер или среда «для контроля стерильности») и в течение 2 часов доставляли в лабораторию. В ряде случаев параллельно забирали материал из цервикального канала для подтверждения этиологической роли выделенных возбудителей, уточнения локализации патологического процесса и т. д. Параллельно

готовили мазок на стекле из влагалища, уретры и цервикального канала по общепринятой методике.

2.2.6. Микроскопия

Микроскопию вагинальных мазков, окрашенных по Граму, проводили для выявления некоторых облигатно-патогенных возбудителей (гонококки, трихомонады), а также оценки состояния вагинального эпителия (соотношение клеток базального, промежуточного и поверхностного эпителиальных слоев, наличие «ключевых клеток»), наличия и степени выраженности лейкоцитарной реакции, количественного и качественного состава микрофлоры.

Оценку общей микробной обсемененности вагинального отделяемого проводили по 4-балльной системе – по числу микробных клеток, обнаруживаемых в одном поле зрения при микроскопии с иммерсией (А.С. Анкирская, В.В. Муравьева, 2001):

- ✓ + до 10 микробных клеток в поле зрения, незначительное их количество;
- ✓ ++ (2+) от 11 до 100 микробных клеток в поле зрения, умеренное их количество;
- ✓ +++ (3+) от 100 до 1000 микробных клеток в поле зрения, большое их количество;
- ✓ ++++ (4+) более 1000 микробных клеток в поле зрения, массивное их количество.

Качественная оценка микрофлоры включала обнаружение возбудителей ИППП (трихомонады, гонококки), а также дифференциацию различных морфотипов по их тинкториальным и морфологическим признакам. Различали морфотипы лактобацилл, коринеформных бактерий, фузобактерий, бактероидов, мобилункусов, лептотрихий, гарднереллы, вейллонеллы, а также грамположительных кокков, колиформных палочек, дрожжеподобных грибов.

2.2.7. Статистические методы

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 6,0. Для оценки достоверно-

сти полученных результатов использовались параметрические (дисперсионный анализ, критерий Стъюдента) и непараметрические (критерий χ^2, корреляционный анализ, критерий Манна-Уитни) методы анализа (С. Гланц, 1999; О.Ю. Реброва, 2003).

2.3. Эпидемиология вагинальных дисбиозов

2.3.1. Заболеваемость ИППП в Омской области

Для изучения эпидемиологических особенностей заболеваемости урогенитальными инфекциями, вызванными условно-патогенными возбудителями, нами были проанализированы данные официальной статистики, касающиеся данной патологии, по г. Омску и районам Омской области.

Рис. 2.1 демонстрирует динамику заболеваемости ИППП в Омске и области за 1999–2005 гг. Для построения взяты суммарные показатели города и области. На рисунке отчетливо прослеживаются различные тенденции изменения показателей заболеваемости для ИППП, вызванных облигатно-патогенными возбудителями «классических» венерических болезней и группы инфекций, вызванных условно-патогенными микроорганизмами (рис. 2.1, а). Так, за анализируемый период отмечено снижение заболеваемости сифилисом с 199,1 до 83,1 на 100 тыс. жителей; гонореей с 108,8 до 90,8; особенно явно – хламидиозом: с 234,5 до 103,9. Уровень заболеваемости трихомониазом колебался, но в целом снизился с 226,5 в 1999 г. до 187,1 в 2005 г.

Диаметрально противоположные тенденции отмечаются для второй группы инфекций (рис. 2.1, б). Уровень заболеваемости кандидозом возрос более чем в 5 раз за анализируемый период с 100,8 на 100 тыс. до 508,6; такая же значительная тенденция роста отмечается для бактериального вагиноза с 120,6 до 360,3; несколько менее выраженный, но отчетливый рост зарегистрирован и для урогенитальных микоуреаплазмозов с 119,2 до 251,5.

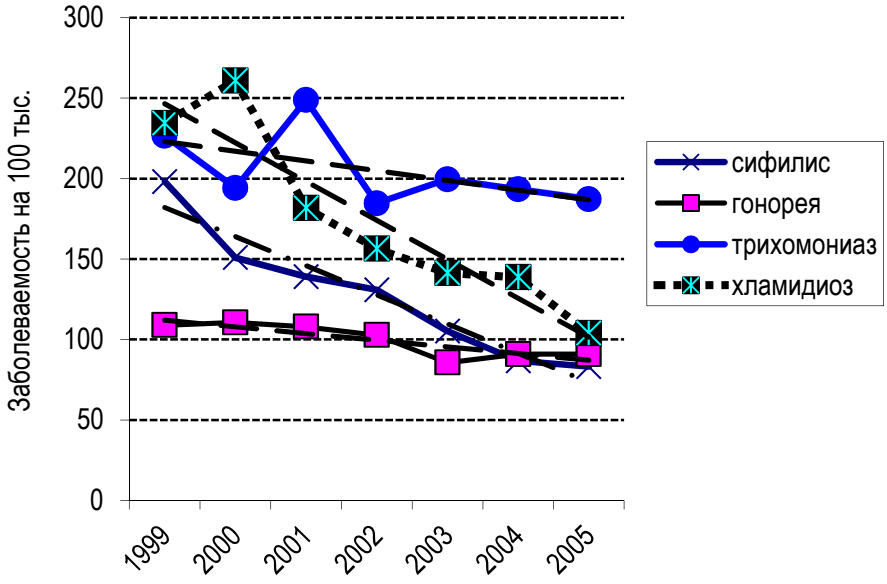


Рис. 2.1, а. Динамика заболеваемости «классическими» ИППП в г. Омске и Омской области за 1999–2005 гг. (суммарные показатели на 100 тыс. населения)

С учетом возможности влияния экологических, социально-культурных условий жизни, а также немаловажное значение влияния адекватных лечебно-диагностических возможностей на статистически регистрируемые значения показателей заболеваемости нами проанализированы средние показатели заболеваемости ИППП по городу в сравнении с районами области.

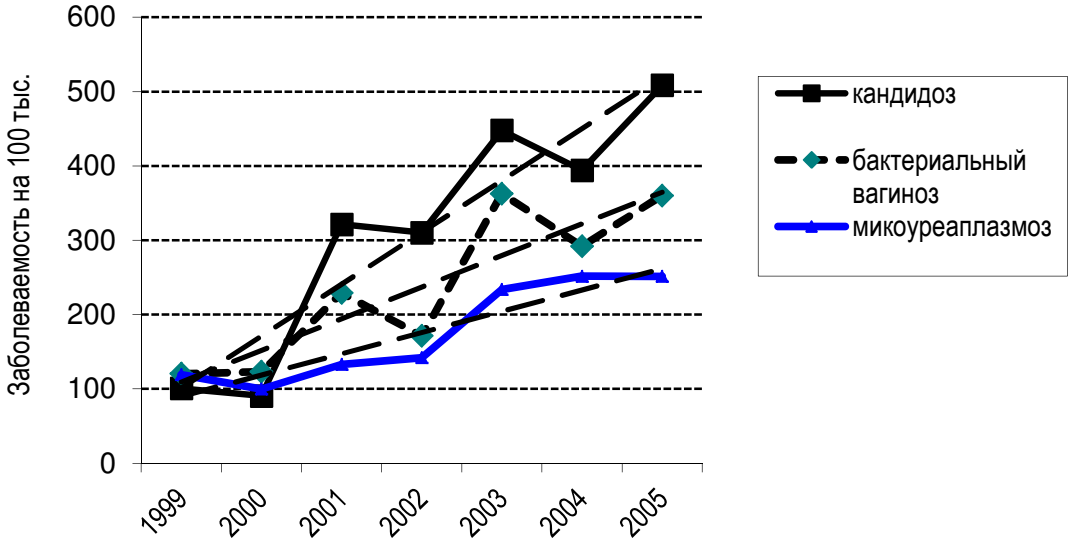


Рис. 2.1, б. Динамика заболеваемости ИППП, вызванных «условно-патогенными возбудителями» в г. Омске и Омской области за 1999–2005 гг. (суммарные показатели на 100 тыс. населения)

Средние показатели заболеваемости по городу и области за 4 года приведены в табл. 2.3 и проиллюстрированы рис. 2.2.

Таблица 2.3

Средние показатели заболеваемости ИППП за 1999–2005 гг по г. Омску и районам области на 100 тыс. населения

Наименование	Омск, M±m	Районы области, M±m
Сифилис	136,25±49,03	109,97±31,58
Гонорея**	130,08±18,28	58,67±4,42
Трихомониаз	209,82±46,97	181,97±17,36
Хламидиоз**	302,37±101,81	15,81±2,54
Герпес**	44,95±14,73	4,34±2,01
Кандидоз*	513,78±266,93	67,65±36,04
Бак. вагиноз**	391,42±181,46	50,93±15,16
Микоуреаплазмоз (данные за 4 года)*	394,62±88,90	9,22±2,85

Примечания: *p<0.05.
**p<0,01.

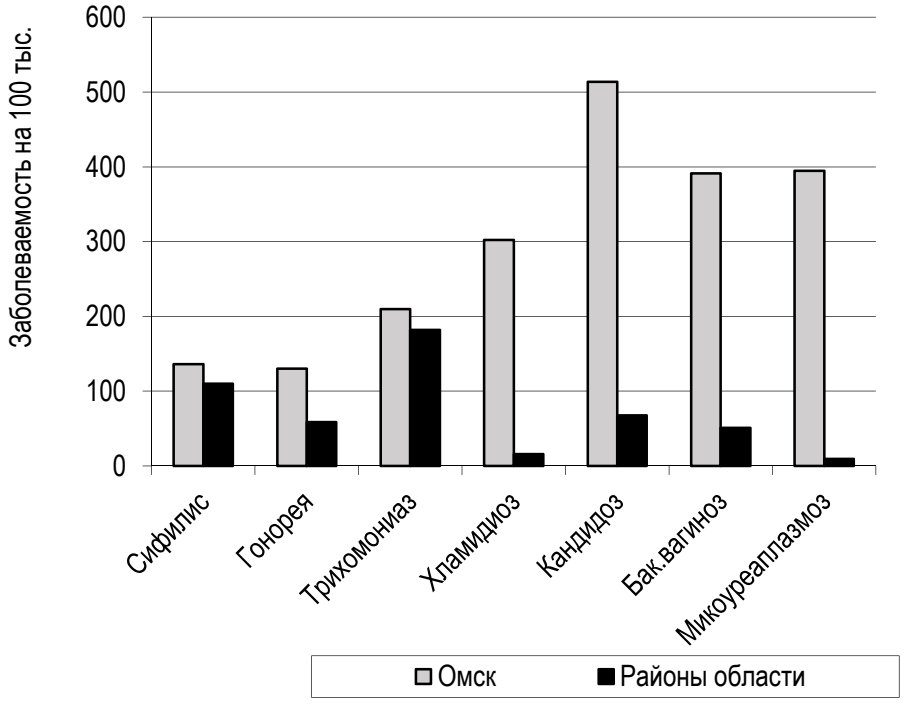


Рис. 2.2. Заболеваемость ИППП за 1999–2005 гг. по г. Омску

Видно, что цифры заболеваемости сифилисом и трихомониазом по районам области, хотя и ниже городских показателей, статистически это не подтверждается. Достоверно ниже оказалась заболеваемость гонореей. Показатели же заболеваемости ИППП второго поколения по районам области ниже соответствующих городских показателей в несколько (и даже в десятки) раз. Вероятно, причины столь существенных различий обусловлены не только объективно существующим более низким уровнем заболеваемости ИППП, но и существенно меньшими возможностями лабораторной верификации диагноза в сельских районах.

Так, диагностика классических венерических болезней (сифилис, гонорея, трихомониаз), несмотря на появление в последние годы современных лабораторных технологий, по-прежнему базируется на рутинных методах, хорошо освоенных в любых клинико-диагностических лабораториях, и выявленную разницу в показателях заболеваемости этими инфекциями можно, таким образом, считать объективно существующей. В диагностике же, например, хламидиоза, микоуреаплазмоза ведущую роль в последние годы играют иммунолюминесцентные и молекулярно-генетические методы, внедрение и развитие которых в сельских районах, возможно, связано с определенными проблемами, что отражается на регистрируемой заболеваемости.

Что касается бактериального вагиноза и урогенитального кандидоза, диагностика которых в большинстве случаев также базируется на данных световой микроскопии в сочетании с рядом клинико-лабораторных критериев, не претерпевших изменений в последние годы, значительно более низкие показатели заболеваемости в сельских районах могут быть объяснены недостаточным вниманием врачей к диагностике данной патологии и неинформированностью пациентов ввиду частой малосимптомности и стертости клинических проявлений.

Сравнительный анализ рис. 2.3 и 2.4, демонстрирующих динамику изменения показателей заболеваемости ИППП раздельно по г. Омску и районам области, позволяет увидеть, что тенденции, выявленные при анализе суммарных показателей, существуют преимущественно в городе.

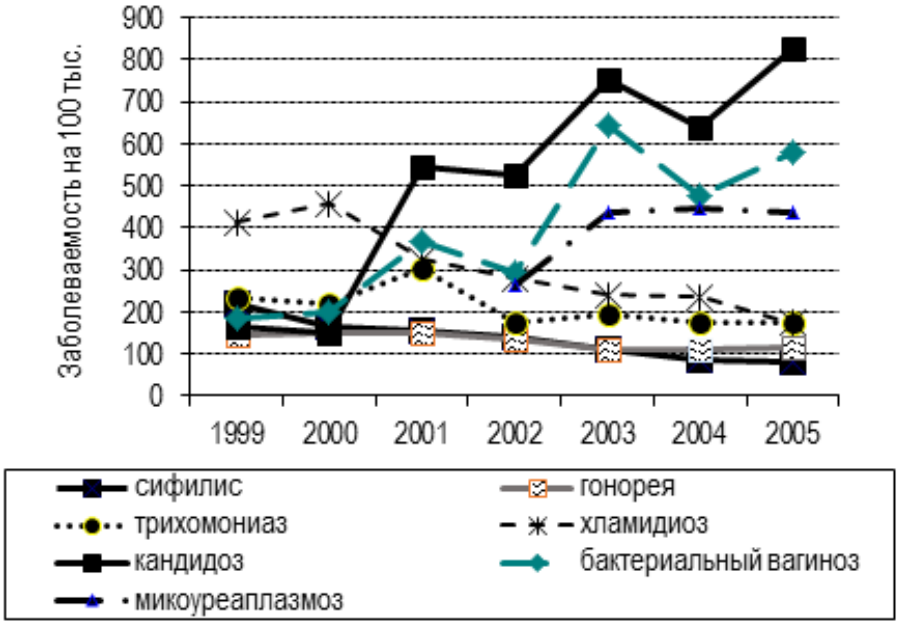


Рис. 2.3. Динамика заболеваемости ИППП по г. Омску за 1999–2005 гг.

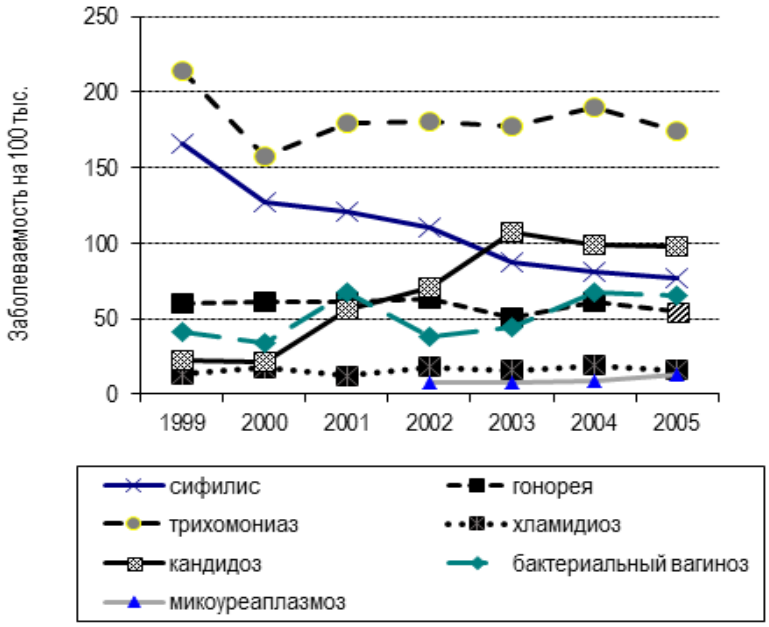


Рис. 2.4. Динамика заболеваемости ИППП по районам Омской области за 1999–2005 гг.

Изолированно для сельских районов сохраняется тенденция к снижению заболеваемости сифилисом, и регистрируется рост заболеваемости урогенитальным кандидозом, хотя и менее выраженный, чем для города. Кривые показателей по остальным нозологическим формам остаются практически на одном уровне.

2.4. Выявляемость и этиологическая структура ИППП, вызванных условно-патогенными возбудителями по результатам комплексного микробиологического обследования

Анализ официально зарегистрированных показателей позволяет оценить динамику заболеваемости различными ИППП суммарно, однако не отражает долю микст-инфекций и их структуру, а также не учитывает роль неспецифических возбудителей в качестве этиологического фактора урогенитальных инфекций изолированно и в составе ассоциаций.

В связи с этим на следующем этапе нами были проанализированы результаты собственных исследований, проводимых в течение 5 лет на базе кафедры микробиологии ОмГМУ.

График демонстрирует динамику выявляемости бактериального вагиноза, урогенитального кандидоза, микоуреаплазмоза, а также неспецифических инфекций, вызванных факультативно-анаэробными условно-патогенными микроорганизмами суммарно для моно- и микст-инфекций при комплексном микробиологическом обследовании в течение 5 лет на 100 обследованных (рис. 2.5).

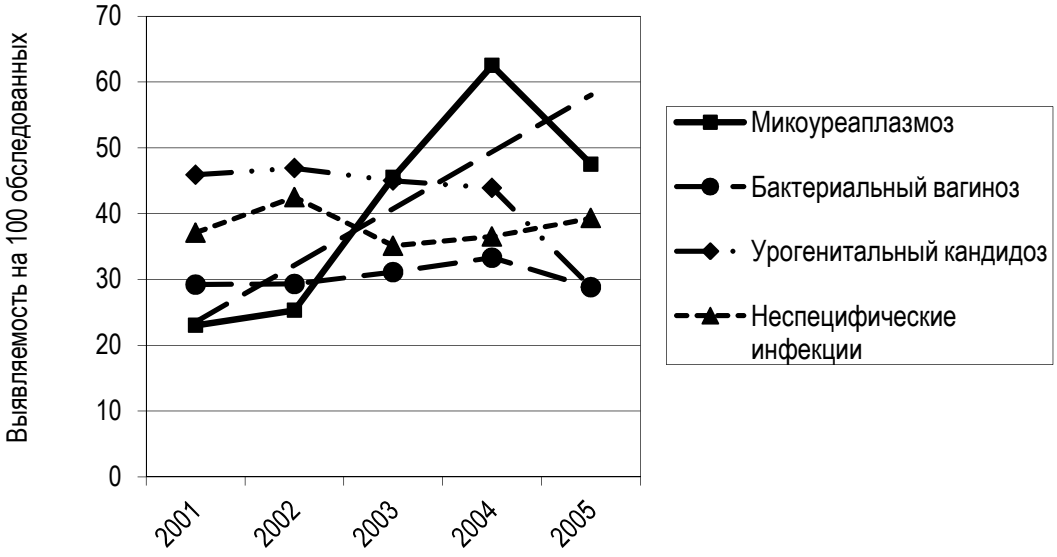


Рис. 2.5. Динамика выявляемости ИППП, вызванных условно-патогенными возбудителями, в 2001–2005 гг.

Как видно, встречаемость бактериального вагиноза, урогенитального кандидоза, а также неспецифических возбудителей в течение изучаемого периода существенно не изменилась, тогда как для микоуреаплазмоза отмечается выраженная тенденция к росту от 23 % в 2001 г. до 62,5 % в 2004 г. и с некоторым снижением до 47,5 % в 2005 г.

В то же время углубленный анализ этих же показателей, но с разделением на моно- и микст-инфекции выявляет несколько иные тенденции.

В табл. 2.4 детально показана частота встречаемости моноинфекций и различных вариантов микробных ассоциаций в % к общему числу положительных результатов. Как видно, наиболее часто встречаются следующие виды микробных ассоциаций: комбинации микоуреаплазмоза с бактериальным вагинозом (12,6±4,39), с неспецифическими возбудителями (10,0±3,4), а также полимикробные ассоциации из 3 и более компонентов (13,2±4,49), в то время как моноинфекции регистрируются значительно реже. Так, средние показатели выявляемости микоуреаплазмоза, бактериального вагиноза, урогенитального кандидоза в виде моноинфекций составили 9,18±3,51; 11,8±5,98 и 5,46±1,31 соответственно. Обращают на себя внимание высокие показатели выявляемости неспецифических возбудителей (23,2±7,74) как в качестве единственного этиологического фактора, так и в составе ассоциаций, превышающие показатели остальных инфекций.

Таблица 2.4

Структура полимикробных ассоциаций с участием условно-патогенных возбудителей ИППП (на 100 положительных результатов)

Наименование	2001	2002	2003	2004	2005
Микоуреаплазмоз	4,7	7,1	11,7	13,5	8,9
Бактериальный вагиноз	20,9	14,7	9,3	5,9	8,5
Кандидоз	6,9	6,7	5,3	4,0	4,4
Неспецифические инфекции	32,6	29,8	19,8	13,8	20,4
Микоуреаплазмоз+ бактериальный вагиноз	10,4	6,4	15,4	17,7	13,1
Микоуреаплазмоз+ кандидоз	3,4	2,3	3,9	5,8	4,5
Микоуреаплазмоз+ неспецифические УПМ	5,8	8,2	9,3	12,2	14,5
Бактериальный вагиноз+ кандидоз	1,2	4,4	2,3	1,7	2,0
Бактериальный вагиноз+ неспецифические УПМ	2,3	8,3	5,4	3,8	4,7
Кандидоз+ неспецифические УПМ	5,8	4,1	3,0	3,4	2,2
Ассоциации более чем из 3 компонентов	9,3	7,8	14,6	17,9	16,7

На рис. 2.6 показана динамика изменения структуры урогенитальных моно- и микст-инфекций за 5 лет. Отчетливо видна тенденция к увеличению удельного веса многокомпонентных микробных ассоциаций с 38,2 % в 2001 году до 57,7 % – в 2005 при выраженном снижении доли моноинфекций – бактериального вагиноза – с 20, 9 до 8,5 %; кандидоза – с 6,9 до 4,4 % и неспецифических инфекций, вызванных факультативно-анаэробными УПМ – с 32,6 до 20,4 %. Лишь для микоуреаплазмоза как моноинфекции наблюдается некоторый рост с 4,7 до 8,9 %.

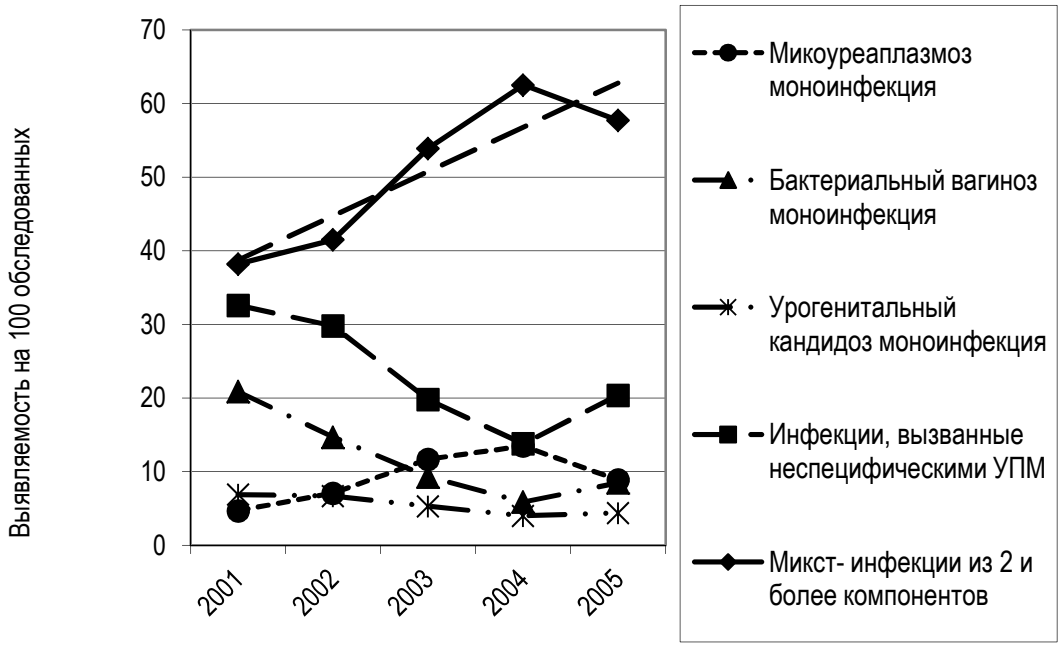


Рис. 2.6. Динамика изменения этиологической структуры урогенитальных моно- и микст-инфекций, вызванных условно-патогенными возбудителями

Структура урогенитального микоуреаплазмоза, бактериального вагиноза, урогенитального кандидоза как микст-инфекций показана на рис. 2.7–2.9.

В чистом виде данные инфекции встречаются менее, чем в 20 % случаев (микоуреаплазмоз – 20,4 %). Оставшаяся доля приходится на различные варианты микст-инфекций. Так, микоуреаплазмоз встречается в сочетании с бактериальным вагинозом

в 26,5 % случаев; с урогенитальным кандидозом – в 8,7 % и с неспецифическими возбудителями – в 18,2 %.

Урогенитальный кандидоз ассоциируется с микоуреаплазмозом в 27,9 % случаев; с неспецифическими возбудителями – в 16,2 % и с бактериальным вагинозом – в 8,3 %.

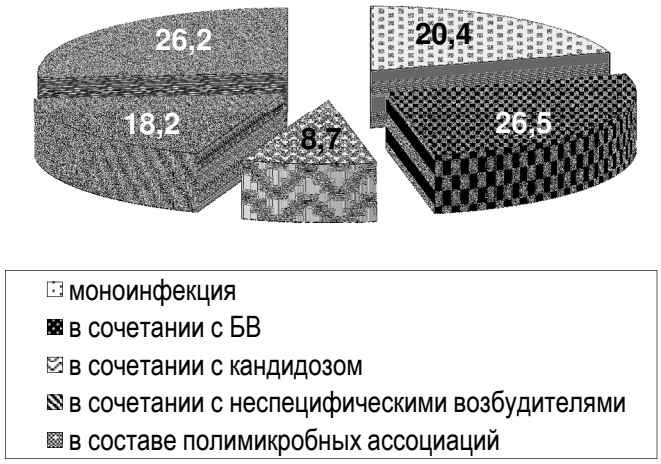


Рис. 2.7. Структура урогенитальных микст-инфекций, ассоциированных с микоуреаплазмозом

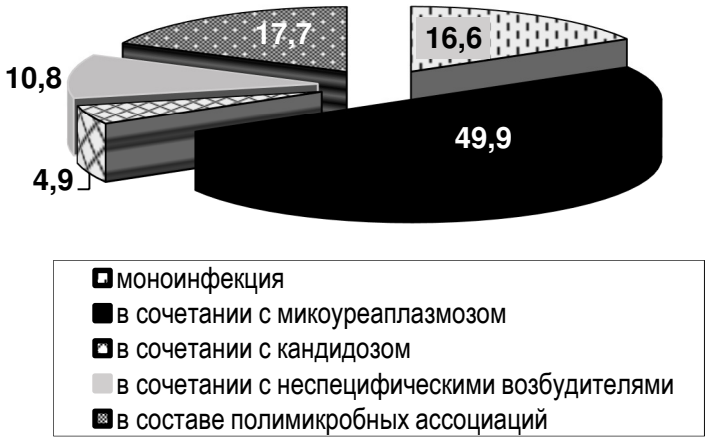


Рис. 2.8. Структура урогенитальных микст-инфекций, ассоциированных с бактериальным вагинозом

В структуре микст-инфекций, ассоциированных с бактериальным вагинозом обращает на себя внимание сочетание с микоуреаплазмозом практически в половине случаев; относительно невысокая доля встречаемости сочетаний с неспецифическими

возбудителями (10,8 %) и урогенитальным кандидозом (4,9 %). Во всех случаях высока доля полимикробных ассоциаций из 3 и более компонентов – 26,2, 17,7 и 27,9 % для микоуреаплазмоза, бактериального вагиноза и кандидоза соответственно.

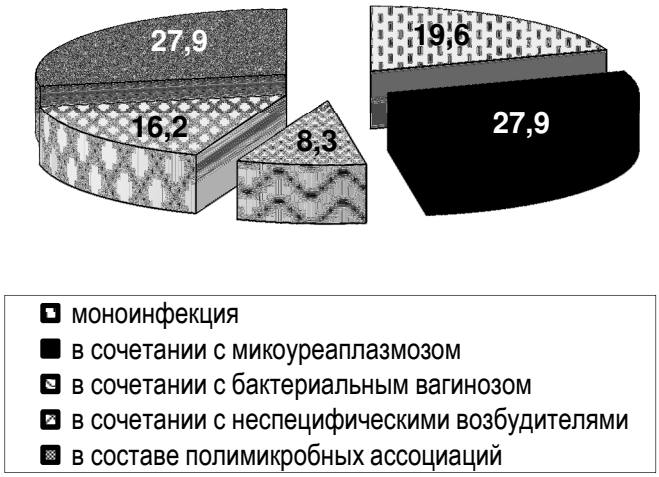


Рис. 2.9. Структура урогенитальных микст-инфекций, ассоциированных с кандидозом

2.4.1. Микробиоценозы влагалища при инфекционно-воспалительных заболеваниях половой сферы в различных возрастных группах

С целью анализа факторов риска развития вагинальных дисбиозов из общего числа обследованных больных были сформированы группы сравнения. Среди обследованных 42 (3,59 %) относились к возрастной группе 13–18 лет; 740 (63,35 %) – к группе 19–29 лет; 342 больных (29,28 %) – к группе 30–45 лет, и 44 женщины (3,76 %) были старше 45 лет. Результаты изучения состояния вагинального микробиоценоза в выделенных возрастных группах представлены в табл. 2.5 и на рис. 2.10.

На графике видна тенденция к выраженному снижению частоты встречаемости урогенитального кандидоза, микоуреаплазмоза и сочетанных вариантов инфекций из двух и более компонентов в старшей возрастной группе.

Встречаемость бактериального вагиноза наиболее высока в

подростковом периоде, затем несколько снижается и вновь увеличивается в постменопаузе. Доля неспецифических инфекций, напротив, у подростков несколько ниже, увеличивается в группе 19–29 лет и далее остается на одном уровне.

В структуре микст-инфекций у подростков преобладают ассоциации из двух компонентов, затем в возрастных группах 19–29 лет и особенно 30–45 лет наблюдается нарастание доли микст-инфекций из трех и более компонентов, и в период менопаузы доля многокомпонентных ассоциаций вновь снижается.

Таблица 2.5

Возрастные изменения этиологической структуры инфекционной патологии половых путей (на 100 обследованных)

Наименование	13–18 лет, n = 42	19–29 лет, n = 740	30–45 лет, n = 342	Старше 45 лет, n = 44
Нормоценоз	6 (14,2 %)	87 (11,7 %)	55 (16,1 %)	5 (11,3 %)
Бактериальный вагиноз	20 (47,6 %)	299(40,4 %)	151(44,2 %)	21(47,7 %)
Неспецифический вагинит	13 (30,9 %)	294 (39,7 %)	131 (38,3 %)	17 (38,6 %)
Кандидоз	9 (21,4 %)	160 (21,6 %)	64 (18,7 %)	6 (13,6 %)
Микоуреаплазмоз	25 (59,5 %)	439 (59,3 %)	175 (51,2 %)	11 (25 %)**
Микст-инфекции из 2 компонентов	30 (74,4 %)	507 (68,5 %)	204 (59,6 %)	17 (38,6 %)**
Микст-инфекции из 3 и более компонентов	5 (11,9 %)	125 (16,8 %)	67 (19,5 %)	3 (6,8 %)*

* $p<0,05$.
** $p < 0,01$.

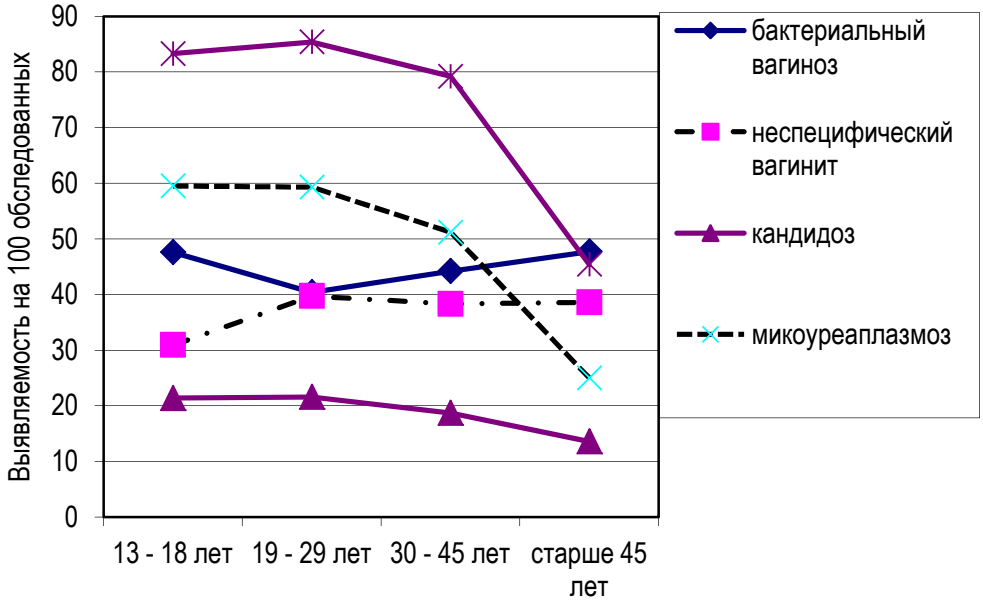


Рис. 2.10. Возрастные изменения этиологической структуры инфекционной патологии половых путей (положительные результаты на 100 обследованных)

Влияние факторов риска, связанных с половым поведением, на состояние микробиоценоза влагалища

Поскольку для изучаемой группы инфекций актуальным в той или иной степени считается половой путь передачи, было проанализировано влияние факторов риска, связанных с особенностями полового поведения больных, на состояние вагинальной микрофлоры. Из этой части исследования были исключены больные в возрасте старше 45 лет в связи с выявленными достоверными различиями по частоте встречаемости ряда инфекций в сравнении с другими возрастными группами (см. выше).

С целью анализа влияния возраста начала половой жизни на состояние вагинальной микрофлоры из обследованных больных были выделены три группы сравнения: начавшие половую жизнь ранее 18 лет; с 18 лет и позднее и не живущие половой жизнью. Результаты анализа представлены в табл. 2.6.

Таблица 2.6

Этиологическая структура урогенитальных инфекций в зависимости от возраста начала половой жизни

Наименование	Ранее 18 лет, n = 315		С 18 лет и позднее, n = 611		Не живут половой жизнью, n = 18	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Нормоценоз	40	12,6	82	13,4	7	38,8*
Неспецифический вагинит	117	37,1	230	37,6	4	22,2
Кандидоз	63	20	120	19,6	2	11,1
Бактериальный вагиноз	131	41,6	264	43,2	5	27,7
Микоуреаплазмоз	188	59,6**	310	50,7**	4	22,2**
Микст-инфекции из двух и более компонентов	264	83,8*	471	77,1*	7	38,8**

*p<0,05.
**p<0,01.

Обращает на себя внимание достоверно более высокая (p< 0,5) частота встречаемости нормоценоза в группе не живущих половой жизнью, а также явно более низкие цифры выявляемости по всем изучаемым инфекциям, причем частота выявления микоплазм и уреаплазм, а также микст-инфекций из двух и более компонентов в этой группе отличается от других групп с высокой степенью достоверности (p< 0,01). Это, несомненно, свидетельствует о негативном влиянии этого фактора на состояние вагинального микробиоценоза. С другой стороны, все изучаемые инфекции регистрировались и в этой группе, что говорит о том, что половой путь передачи, являясь актуальным, не является единственным.

Показатели выявляемости бактериального вагиноза, урогенитального кандидоза и неспецифических возбудителей практически не зависят от возраста начала половой жизни, тогда как встречаемость микоуреаплазмоза и ассоциированных инфекций в группе больных, начавших половую жизнь ранее 18 лет, достоверно выше. Следовательно, раннее начало половой жизни не приводит к увеличению риска возникновения вагинальных дисбиозов, за исключением микоуреаплазмоза; однако увеличивает вероятность более грубых нарушений состава микрофлоры,

проявляющихся в появлении многокомпонентных ассоциаций возбудителей, что не может не отражаться на тяжести течения заболевания и сроках выздоровления.

Для анализа зависимости изучаемых показателей от количества половых партнеров в течение жизни взяты результаты обследования незамужних женщин репродуктивного возраста, живущих половой жизнью. Первую группу составили 315 больных, сообщивших в анкете о наличии менее 5 половых партнеров, вторую – 88 женщин с 5 и более половыми партнерами в течение жизни (табл. 2.7).

Таблица 2.7

Этиологическая структура урогенитальных инфекций в зависимости от количества половых партнеров в течение жизни

Наименование	Менее 5, n = 315		5 и более, n = 88	
	Абс.	%	Абс.	%
Нормоценоз*	44	13,9	4	4,5
Неспецифический вагинит	117	37,1	26	29,5
Кандидоз*	81	25,7	12	13,6
Бактериальный вагиноз*	138	43,8	52	59,1
Микоуреаплазмоз**	175	55,6	60	68,2
Микст-инфекции из двух и более компонентов	270	85,7	72	81,8

* $p<0,05$.

** $p<0,01$.

Обращает на себя внимание достоверно более низкая частота нормоценоза во второй группе, что само по себе говорит о том, что частая смена партнеров является фактором, негативно сказывающемся на состоянии вагинальной микрофлоры. При этом присутствие данного фактора риска достоверно чаще приводит к возникновению бактериального вагиноза ($p<0,05$) и инфекций, ассоциированных с урогенитальными микоплазмами ($p<0,01$). В то же время, частота высеваемости неспецифических возбудителей и особенно дрожжеподобных грибов рода Candida ($p<0,05$) во второй группе оказалась ниже.

Семейное положение также является фактором, в определенной степени определяющим характер полового поведения. Из

обследованных больных были выделены две группы в зависимости от семейного положения. Первую группу составили 510 замужних женщин репродуктивного возраста, во вторую группу вошли 395 женщин, не состоящих в браке. Сравнительные результаты их обследования представлены на рис. 2.11.

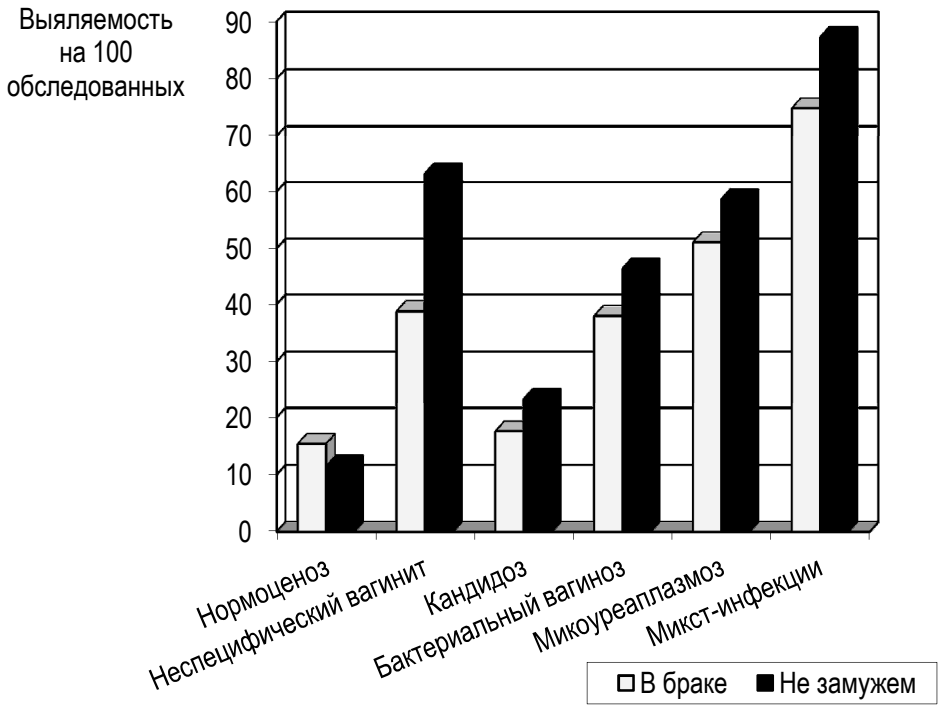


Рис. 2.11. Этиологическая структура урогенитальных инфекций в зависимости от семейного положения

Различия, представленные на диаграмме, при статистической обработке оказались достоверными по всем сравниваемым вариантам состояния вагинального микробиоценоза. Так, нормоценоз вагинальной микрофлоры регистрируется в группе замужних чаще, чем во второй группе (15,4 и 11,6 % соответственно, $p<0,05$) Напротив, значительно чаще во второй группе отмечаются инфекции, вызванные неспецифическими возбудителями (63,2 при 38,8 % в группе состоящих в браке, $p<0,01$); бактериальный вагиноз (46,5 и 38,0 %, $p<0,01$); микст-ифекции из двух и более компонентов (87,3 и 74,9 %, $p<0,01$); а также микоуреаплазмоз (58,7 и 51,1 %, $p<0,05$) и урогенитальный кандидоз (23,5 и 17,6 %, $p<0,05$).

Перенесенные ИППП в анамнезе достоверно не сказываются на состоянии вагинальной микрофлоры, хотя отмечается некоторое увеличение частоты урогенитального кандидоза в группе больных, указывающих на наличие в анамнезе ИППП (23,3 % против19,7 % в группе больных, отрицающих ИППП). Поскольку изучаемые инфекции, по сути, относятся к дисбиотическим состояниям, их возникновение, характер и степень тяжести нарушений вагинальной микрофлоры, особенности течения во многом зависят также от факторов, влияющих на общую иммунологическую резистентность организма, гормонального статуса, наличия сопутствующих заболеваний и предшествующей антибиотикотерапии. В связи с этим было изучено влияние группы факторов риска, имеющих отношение к этой стороне вопроса.

Существенное влияние на состояние репродуктивной сферы, а также иммунологический статус оказывают состояние беременности, роды, а также наличие и количество абортов в анамнезе.

Из обследованных женщин репродуктивного возраста, состоящих в браке, были выделены две группы: не рожавшие (123 человека) и имеющие 1–3 родов в анамнезе (110 человек). Результаты изучения состояния вагинального микробиоценоза и этиологической структуры урогенитальных инфекций в этих группах представлены на рис. 2.12.

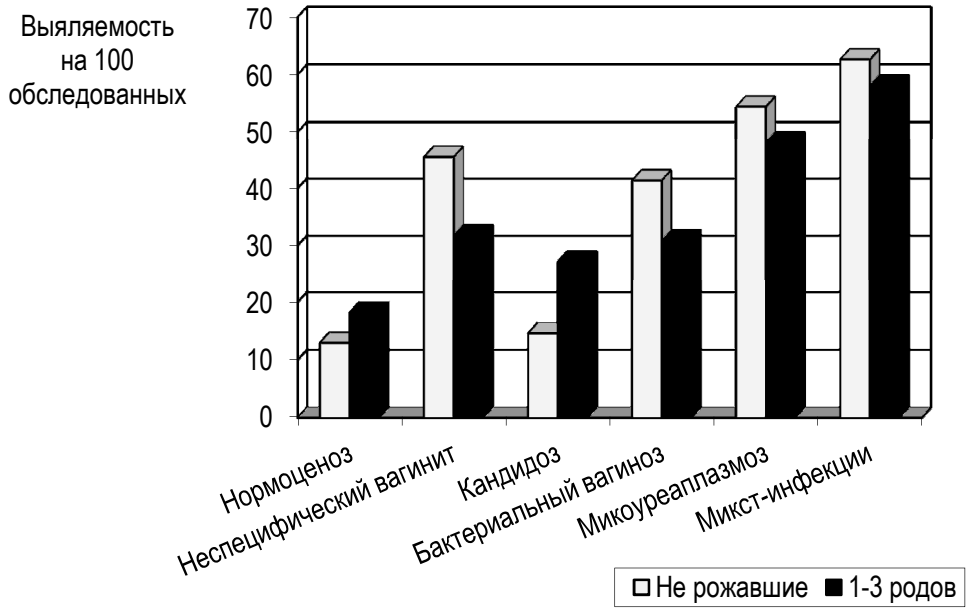


Рис. 2.12. Состояние вагинальной микрофлоры в зависимости от наличия в анамнезе беременностей и родов

Из диаграммы видно, что нормоценоз вагинальной микрофлоры чаще наблюдается во второй группе обследованных (18,2 % при 13,0 % в первой группе), в то же время частота встречаемости практически всех вариантов дисбиотических состояний в группе нерожавших женщин оказалась выше. Статистически достоверны различия в частоте выявления неспецифических возбудителей (45,5 % среди нерожавших женщин по сравнению с 31,8 % во второй группе; $p<0.05$). Противоположная тенденция отмечается лишь для урогенитального кандидоза – 27,2 % у рожавших по сравнению с 14,6 % в первой группе ($p<0.05$). Результаты изучения влияния наличия и количества абортов в анамнезе на состояние вагинальной микрофлоры представлены в табл. 2.8.

Таблица 2.8

Этиологическая структура урогенитальных инфекций в зависимости от наличия и количества абортов в анамнезе

Наименование	Не делавшие абортов, n=282		1–2 аборта, n=294		3 и более абортов, n=88	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Нормоценоз	50	17,7	44	14,9	11	12,5
Неспецифический вагинит	88	31,2	104	35,3	28	31,8
Кандидоз	76	26,9**	61	20,7	11	12,5**
Бактериальный вагиноз	96	34,0*	125	42,5*	42	47,7*
Микоуреаплазмоз	146	51,7	161	54,7	48	54,5
Микст-инфекции из двух и более компонентов	214	75,8	231	78,5	62	70,4

*$p<0,05$.
**$p<0,01$.

Различия в частоте встречаемости нормоценоза вагинальной микрофлоры в трех сравниваемых группах оказались статистически недостоверны, хотя прослеживается тенденция к снижению от 17,7 % в группе не делавших абортов к 12,5 % в группе перенесших 3 и более абортов в течение жизни. Примерно на одном уровне находятся также показатели выявляемости неспецифических возбудителей во всех сравниваемых группах. В отношении урогенитального кандидоза и бактериального вагиноза выявлены взаимно противоположные тенденции. Так, в группе

женщин, не делавших абортов, частота урогенитального кандидоза составила 26,9 %; далее во второй группе она снижается до 20,7 % и в третьей группе составляет всего 12,5 % ($p<0,01$). Напротив, встречаемость бактериального вагиноза, составившая 34,0 % в первой группе, увеличивается до 42,5 и 47,7 % во второй и третьей группе соответственно($p<0,05$).

Таким образом, беременность и роды в целом оказывают благоприятное влияние на состояние вагинальной микрофлоры, хотя и увеличивают риск возникновения урогенитального кандидоза; у нерожавших же достоверно выше риск возникновения неспецифических инфекций влагалища. Медицинские аборты, в особенности с увеличением их количества в течение жизни, приводят к повышенному риску нарушения состояния вагинальной микрофлоры по типу бактериального вагиноза, в то время как частота выявления урогенитального кандидоза достоверно снижается.

Анализ влияния приема оральных контрацептивов (ОК) на этиологическую структуру урогенитальных инфекций не выявил существенных различий, хотя отмечается некоторое снижение частоты неспецифических вагинитов в группе больных, постоянно принимающих ОК (24,3 % при частоте 32,4 % среди женщин, не пользующихся ОК).

Традиционно признано существенное влияние приема антибиотиков на состояние нормальной микрофлоры человека. Результаты изучения влияния этого фактора на вагинальную микрофлору представлены на рис. 2.13. Среди обследованных 642 женщины отрицали прием антибактериальных препаратов по каким-либо поводам в течение последних 3 месяцев перед обследованием; вторую группу составили 337 женщин, лечившихся антибиотиками, в том числе и по поводу урогенитальных инфекций, но завершившие курс лечения не позднее чем за 2 недели до обследования.

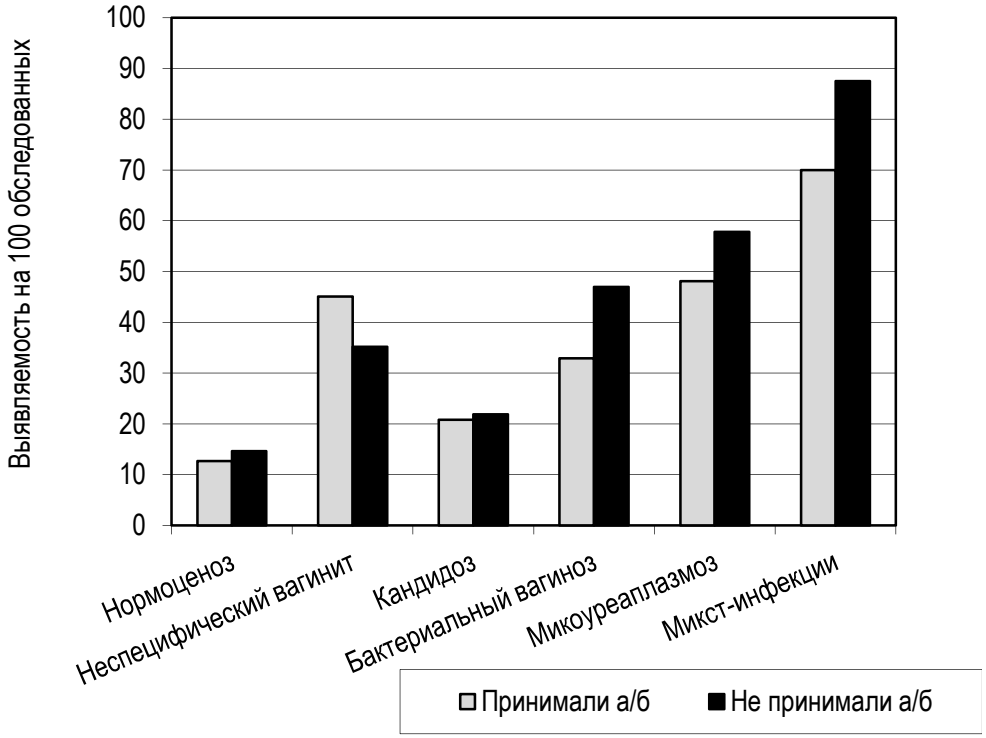


Рис. 2.13. Влияние приема антибактериальных препаратов на состояние вагинальной микрофлоры

После приема антибактериальных препаратов достоверно снижается частота встречаемости бактериального вагиноза (32,9 % против 47,0 % среди не лечившихся антибиотиками; $p<0,01$); микоуреаплазмоза (48,1 и 57,8 % соответственно; $p<0,05$); и микст-инфекций из двух и более компонентов (70,0 и 87,5 % в сравниваемых группах; $p<0,01$).

Учитывая, что часть больных лечились антибактериальными препаратами именно по поводу урогенитальных инфекций, такие результаты можно считать подтверждением определенной эффективности антибиотиков в отношении названных возбудителей. Вопреки устоявшемуся мнению, прием антибиотиков не привел к сколько-нибудь существенному увеличению частоты встречаемости урогенитального кандидоза среди изучаемого контингента больных, однако достоверно увеличилось выявление неспецифических возбудителей (45,1 % среди лечившихся а/б против 35,2 % в другой группе; $p<0,05$).

2.4.2. Структура вагинальных дисбиозов при различных формах генитальной патологии

Среди обследованных женщин абсолютное большинство обследовались с клиническим диагнозом вульвовагинита (483); 157 пациенток страдали эрозией шейки матки, 128 – хроническим сальпингоофоритом; у 46 женщин поводом к обследованию послужила беременность, у 29 – цистит; 21 пациентка обследовалась по поводу первичного и 9 – по поводу вторичного бесплодия; 46 больных обследовались после антенатальной гибели плода; у 27 была диагностирована папилломавирусная инфекция шейки матки и у 22 – хронический кольпит. Контрольную группу составили 85 клинически здоровых женщин, не предъявляющих жалоб со стороны репродуктивной сферы, обследованных при планировании беременности или проходивших профилактический осмотр.

Структура вагинальных дисбиозов среди данного контингента в зависимости от клинического диагноза представлена в табл. 2.9.

Таблица 2.9

Структура вагинальных дисбиозов при различных формах генитальной патологии

Диагноз	Всего	Нормоценоз		Неспецифический вагинит		Бактериальный вагиноз		Кандидоз		Микоуреаплазмоз		Микст-инфекции из 2 и более комп.	
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Вульвовагинит	483	35**	7,2	196	40,5	241**	49,8	102	21,1	307**	63,6	454**	94,0
Хронич.кольпит	22	2*	9,0	9	40,9	8	36,3	7*	31,8	12	54,5	20**	91,0
Хронический сальпингоофорит	128	18**	14,0	51	39,8	46	35,9	22	17,1	76*	59,3	103**	80,5
Эрозия шейки матки	157	24**	15,3	38	24,2	63*	40,1	16	10,1	75	47,7	99	63,0
Беременность	46	2*	4,3	16	34,7	20*	43,4	16**	34,8	24	52,1	44**	95,6
Первич. бесплодие	21	3	14,2	7	24,5	9	42,8	3	14,2	10	47,6	18**	85,7
Вторич. бесплодие	9	1	11,1	4	44,4	3	33,3	1	11,1	5	55,6	6	66,7
Цистит	29	4*	13,7	18**	62,0	7	24,1	1	3,4	20*	68,9	24**	82,7
Антенатальная гибель плода	46	9	19,5	11	23,9	13	28,2	12**	26,0	30*	65,2	32*	69,5
Папилломавирусная инфекция	27	10	37,0	3	11,1	14*	51,8	5	18,5	2**	7,4	7**	25,9
Контрольная группа	85	26	30,5	29	34,1	23	27,0	11	12,9	38	44,7	44	51,7

*$p<0,05$.
**$p<0,01$.

Обращает на себя внимание, что в контрольной группе, показатели которой принимали за базовые для сравнения, состояние нормоценоза вагинальной флоры встречалось лишь у 30,5% обследованных. В остальных случаях отмечались те или иные варианты нарушений вагинального микробиоценоза, причем в половине случаев (51,7 %) возбудителями выступали ассоциации микроорганизмов. Неспецифические возбудители в превышающих пороговые значения концентрациях встречались в контрольной группе в 34,1 % случаев; бактериальный вагиноз – в 27 %; урогенитальный кандидоз и микоуреаплазмоз – в 12,9 и 44,7 % соответственно. Частота встречаемости микст-инфекций почти во всех сравниваемых группах достоверно отличалась от контроля в сторону увеличения, за исключением пациенток с эрозией шейки матки и вторичным бесплодием (63,0 и 66,7 %, $p>0,05$).

При вульвовагинитах достоверно чаще, чем в контрольной группе, выявлялись бактериальный вагиноз (49,8 %, $p<0,01$) и микоуреаплазмоз (63,6 %, $p<0,01$); при хронических же кольпитах на первое место выступили грибы рода Candida (31,8 %, $p<0,05$). У женщин с хроническими сальпингоофоритами несколько чаще, чем в контрольной группе, регистрировались микоуреаплазмы (59,3 %, $p<0,05$); при эрозиях шейки матки – бактериальный вагиноз (40,1 %, $p<0,05$).

У женщин с хроническими сальпингоофоритами чаще, чем в контрольной группе, регистрировали мико- и уреаплазмы (59,3 %, $p<0,05$); при эрозиях шейки матки – бактериальный вагиноз (40,1 %, $p<0,05$).

Выраженные нарушения состава микрофлоры в сравнении с контрольной группой отмечены при беременности. Так, нормоценоз был выявлен лишь у 4,3 % пациенток ($p<0,01$); чаще регистрировались урогенитальный кандидоз (34,8 %, $p<0,01$) и бактериальный вагиноз (43,4 %, $p<0,05$). Неспецифические возбудители (62,0 %, $p<0,01$) и микоуреаплазмы (68,9 %, $p<0,05$) достоверно чаще выявлялись при циститах. У женщин, перенес-

ших антенатальную гибель плода, чаще регистрировались урогенитальный кандидоз (26,0 %, p<0,01) и микоуреаплазмоз (65,2 %, p<0,05). У женщин с папилломавирусной инфекцией шейки матки бактериальный вагиноз в этой группе регистрируется почти вдвое чаще, чем в контроле (51,8 %, p<0,05), однако урогенитальные микоплазмы, часто ассоциирующиеся с этой патологией, в этой группе выделялись достоверно реже, чем в контрольной, – всего 7,4 % (p<0,01). Вдвое реже также встречались ассоциации возбудителей (25,9 %, p<0,01).

2.4.3. Сезонность выявления условно-патогенных возбудителей урогенитальных инфекций

Проанализированы среднемесячные показатели выявляемости условно-патогенных возбудителей урогенитальных инфекций. Полученные результаты представлены в табл. 2.10.

Для бактериального вагиноза (рис. 2.14) отмечается увеличение выявляемости в сентябре-октябре и еще один пик в январе-феврале, то есть можно говорить об осенне-зимней сезонности. В летние месяцы, напротив, отмечается выраженное снижение анализируемых показателей. Для урогенитального кандидоза (рис. 2.15) регистрируется увеличение выявляемости в феврале с некоторым снижением по отношению к среднегодовому показателю в осенние месяцы.

Для инфекций, ассоциированных с микоплазмами и уреаплазмами, оказалось характерным некоторое повышение показателей выявляемости в июне и ноябре-декабре с последующим выраженным снижением в январе и сохранением низких показателей с февраля по май (рис. 2.16).

Для неспецифических инфекций, вызванных условно-патогенными факультативно-анаэробными микроорганизмами, отмечено явное увеличение показателей высеваемости в летний период с мая по сентябрь с последующим снижением в октябре и сохранением низкого уровня в зимние и весенние месяцы (рис. 2.17).

Таблица 2.10

Сезонность выявляемости вагинальных дисбиозов различной этиологии

Наименование	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Бактериальный вагиноз	30,57±3,80	26,65±3,13	23,7±8,3	21,75±1,15**	26,65±3,75	21,0±0,93**	14,53±6,48*	17,4±3,99*	27,47±7,28	29,42±2,45	24,27±5,47	23,3±1,99
Микоуреаплазмоз	37,6±0,49*	44,4±7,9	43,9±12,37	41,2±0,03*	42,3±0,07	54,4±2,61*	49,5±16,2	46,5±0,02	48,5±1,06	47,1±1,41	52,1±9,12	51,9±0,01
Кандидоз	12,78±1,55	17,26±2,34**	11,02±2,63	12,15±2,39	14,82±2,51	13,16±0,89	13,67±5,56	13,7±0,8	11,4±1,36	11,4±3,13	10,8±2,32	14,4±4,05
Неспецифический вагинит	36,4±5,27	30,7±6,16	34,1±14,1	31,5±6,22	43,1±3,97*	36,5±6,0	40,6±2,82*	40,8±20,27	46,5±3,7**	31,1±5,7	30,8±7,37	29,9±8,54

* Различия достоверны по сравнению со среднегодовым показателем $p < 0,05$.
** $p < 0,01$.

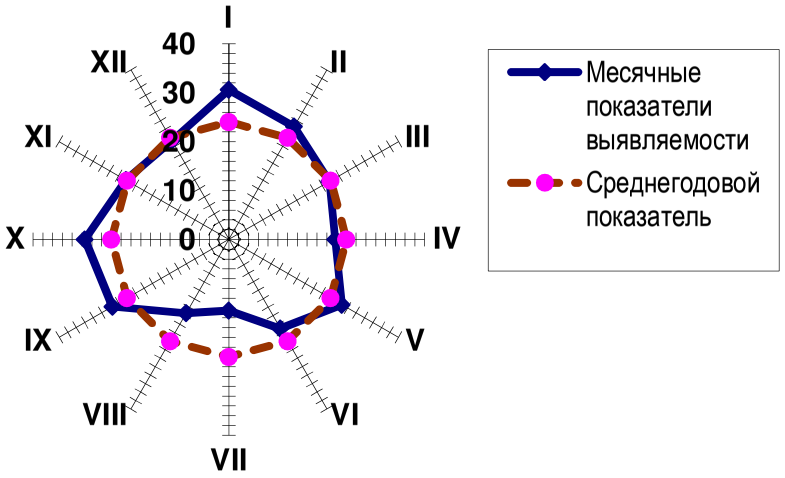


Рис. 2.14. Сезонные колебания выявляемости бактериального вагиноза

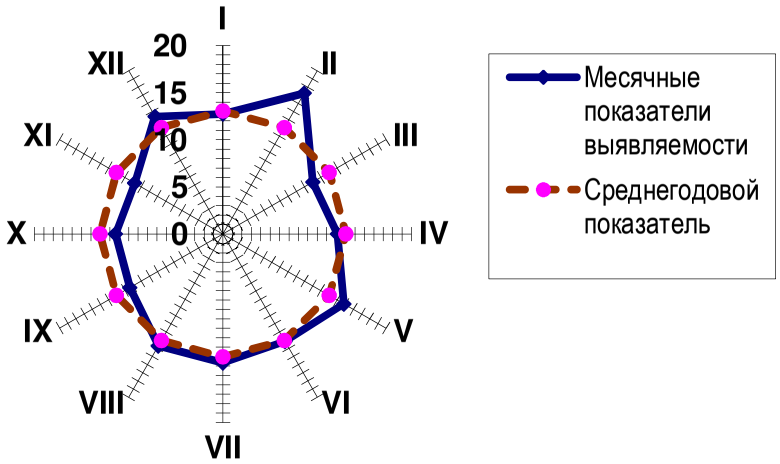


Рис. 2.15. Сезонные колебания выявляемости урогенитального кандидоза

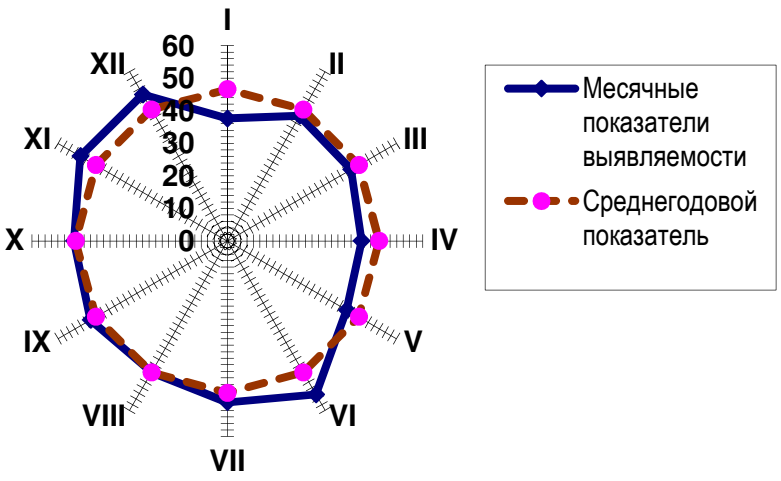


Рис. 2.16. Сезонные колебания выявляемости урогенитального микоуреаплазмоза

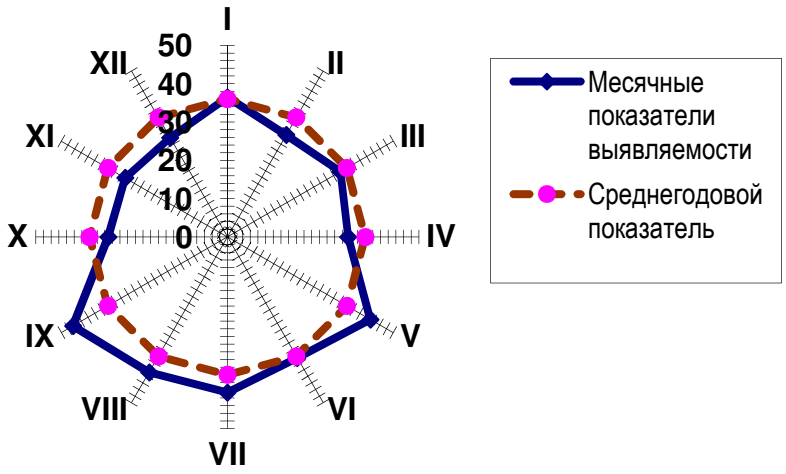


Рис. 2.17. Сезонные колебания выявляемости неспецифических вагинитов

Для неспецифических инфекций, вызванных условно-патогенными факультативно-анаэробными микроорганизмами, отмечено явное увеличение показателей высеваемости в летний период с мая по сентябрь с последующим снижением в октябре и сохранением низкого уровня в зимние и весенние месяцы (см. рис. 2.17).

2.5. Микробиологическая характеристика вагинальных дисбиозов

Целью изучения микробиологических особенностей вагинальных дисбиозов стало определение роли отдельных возбудителей и их ассоциаций, их вклада в течение патологического процесса и влияния на выраженность клинических проявлений заболевания.

Оценку выраженности клинических проявлений проводили по характеру микроскопической картины вагинальных мазков, в частности, обращалось внимание на количество лейкоцитов в поле зрения, отражающее степень местной воспалительной реакции.

Кроме того, учитывались жалобы больных, характер которых был в основном сходным: выделения различного характера и интенсивности из половых путей, ощущение дискомфорта, зуд, жжение, боли при мочеиспускании, боли в низу живота. Обследуемым предлагалось оценить степень субъективных симптомов по 5-балльной системе.

2.5.1. Условно-патогенные микроорганизмы – участники микробных ассоциаций при инфекциях, вызванных облигатными патогенами

Применяемый алгоритм микробиологического обследования больных предполагал прежде всего исключение инфекций, вызванных облигатными патогенами. У 44 больных при микроскопии вагинальных мазков были обнаружены влагалищные трихомонады. При этом микроскопическая картина вагинального мазка во всех случаях характеризовалась выраженной лейкоцитарной реакцией – среднее количество лейкоцитов в поле зрения составило 39,02±6,28, что наряду с обнаружением специфических возбудителей позволило охарактеризовать микроскопическую картину как специфический вагинит.

При этом выраженность субъективных симптомов оценивалась больными по-разному. Так, 3 больных (6,8 %) не предъявля-

ли жалоб; 23 пациентки (52,3 %) оценили выраженность субъективных симптомов в 1–2 балла, и 13 больных (29,6 %) дали оценку тяжести клинических проявлений в 3–4 балла.

При микробиологическом обследовании этой группы пациенток было выявлено следующее. У 5 больных (11,4 %) трихомониаз протекал на фоне нормоценоза вагинальной микрофлоры. В остальных случаях отмечались различные варианты микст-инфекций из двух и более сопутствующих возбудителей. При этом среднее число участников микробных ассоциаций составило 3,18±1,4. Роль различных УПМ – участников микробных ассоциаций при трихомониазе представлена на рис. 2.18.

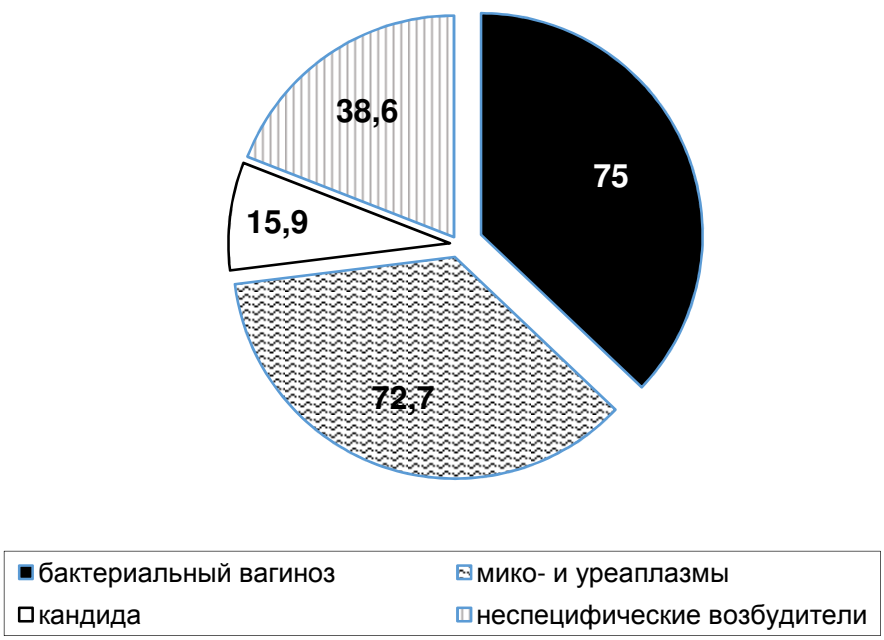


Рис. 2.18. Роль различных возбудителей – участников микробных ассоциаций при трихомониазе (показатели высеваемости на 100 больных)

Более чем в 70 % случаев трихомониаз сопровождался высевом урогенитальных мико-и уреаплазм, а также протекал на фоне дисбиотических сдвигов в составе микрофлоры по типу бактериального вагиноза (72,7 %).

Существенный вклад принадлежит неспецифическим возбудителям группы факультативно-анаэробных УПМ – 38,6 %, и несколько реже трихомониазу сопутствовал высев дрожжеподобных грибов рода Candida.

Частота встречаемости различных микроорганизмов в вагинальном отделяемом и средний их титр при трихомониазе представлен в табл. 2.11.

Таблица 2.11

Частота встречаемости различных микроорганизмов в микробиоценозе влагалища при трихомониазе

Микроорганизмы	Частота встречаемости, n = 44		Средний титр, lg/мл
	Абс.	%	
Лактобактерии	25	56.8	5.1 ± 2.7
Gardnerella vaginalis	31	70.4	8.54 ± 1.31
Peptostreptococcus spp.	18	40.9	6.44 ±1.19
Candida spp.	6	13.6	5.83± 0.7
E. coli	2	4.5	5.5± 0.7
Enterococcus spp.	6	13.6	6.5± 1.7
Streptococcus spp.	3	6.8	7.66± 2.5
Staphylococcus spp.	5	11.3	4.8± 0.44
Corynebacterium spp.	5	11.3	6.6± 1.34
Bacteroides spp.	31	70.4	7.87± 0.99
Mobiluncus spp.	8	18.2	9.01± 2.3
Fusobacterium spp.	4	9.0	6.0± 2.3
Leptothrichia	4	9.0	7.23± 1.02
M. hominis	17	38.6	-
U. urealyticum	25	65.9	-

Представители облигатной микрофлоры – лактобактерии – выявлялись в 56,8 % случаев, и их среднее количество в вагинальном отделяемом составило 5.1±2.7 lg/мл. Среди УПМ, сопутствующих трихомониазу, лидирующее место занимали *Gardnerella vaginalis* (70,4 % в титре 8.54±1.31 lg/мл), облигатные анаэробы родов *Bacteroides* (70,4 % в титре 7.87±0.99 lg/мл), *Peptostreptococcus* (40,9 % в титре 6.44±1.19 lg/мл), *Mobiluncus* (18,2 % в титре 9.01±2.3 lg/мл), а также урогенитальные микоплазмы (*M. hominis* – в 38,6 % случаев и *U. urealyticum* у 65,9 % больных). Дрожжеподобные грибы рода *Candida* высевались у 13,6 % больных в среднем титре 5.83±0.7 lg/мл. Среди факультативно-анаэробных УПМ лидирующее место занимает *Enterococcus spp.* – 13,6 % в количестве 6.5±1.7 lg/мл; далее следуют виды *Stahpylococcus* и *Corynebacterium*, реже встречались *E. coli* и *Streptococcus spp*.

Проведенный корреляционный анализ не выявил зависимости между степенью субъективных жалоб больных и какими-либо показателями вагинального микробиоценоза. Выраженность местной воспалительной реакции также не коррелировала с высевом какого-либо определенного вида сопутствующих возбудителей, числом участников микробных ассоциаций, но оказалась обратно пропорциональна титру гарднерелл в вагинальном отделяемом ($r = -0,3$; $p < 0,05$).

У 58 больных иммунолюминесцентным методом с использованием наборов «Хламоноскрин» (НИАРМЕДИК) был выявлен урогенитальный хламидиоз. При этом состояние вагинальной микрофлоры характеризовалось следующими показателями (рис. 2.19).

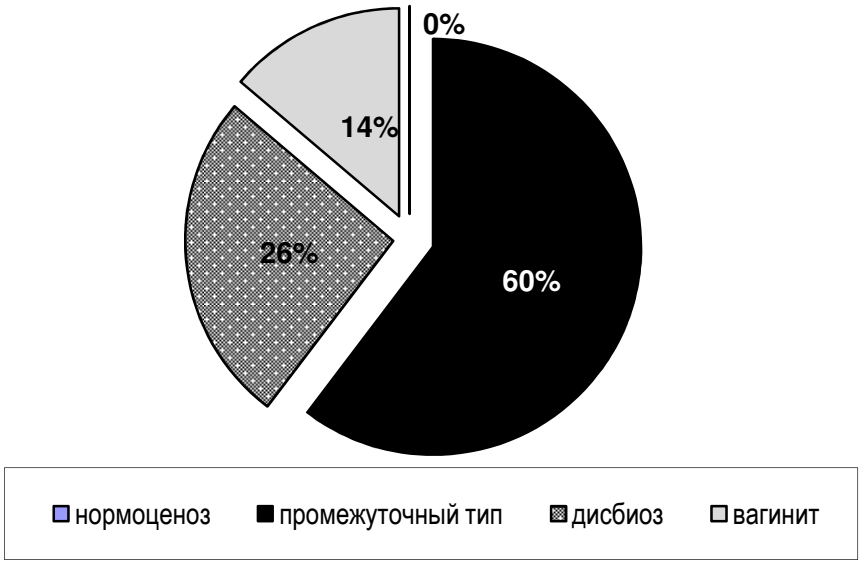


Рис. 2.19. Результаты микроскопии вагинальных мазков больных хламидиозом

Ни у одной больной при микроскопии не был определен нормоценоз. У большинства больных хламидиоз протекал на фоне промежуточного типа вагинального мазка (60 %); у 26 % был выявлен дисбиоз и в 14 % случаев наблюдалась картина вагинита.

Более подробную информацию позволило получить микробиологическое исследование вагинального отделяемого. Вопреки данным микроскопии у значительной части больных при микро-

биологическом обследовании выявлен нормоценоз (29,3 %). Вероятно, отнести эти случаи к норме при микроскопии помешало наличие умеренного количества лейкоцитов в поле зрения. Можно предположить, что местная воспалительная реакция в этих случаях вызвана именно основным возбудителем. В остальных случаях наблюдались те или иные варианты дисбиотических нарушений, причем доля микст-инфекций из двух и более компонентов составила 60,3 %. Детально результаты изучения вагинального микробиоценоза у больных хламидиозом представлены на рис. 2.20.

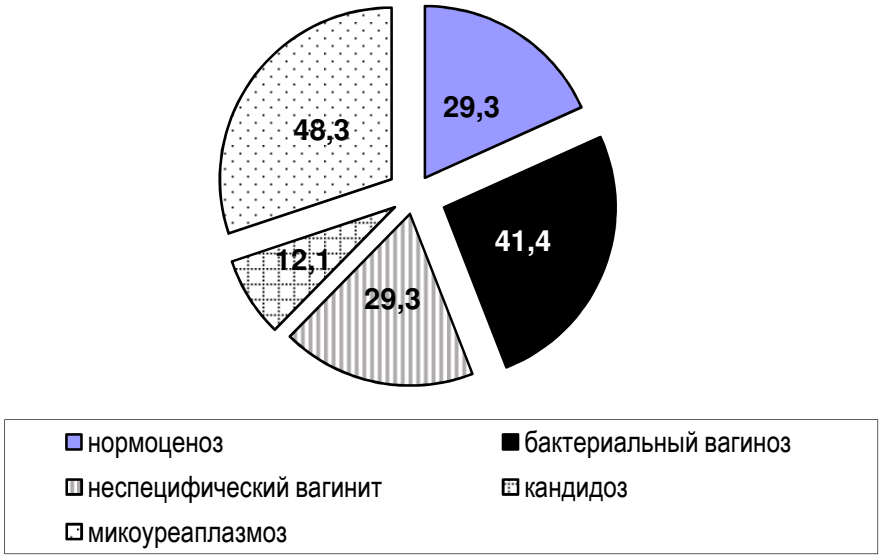


Рис. 2.20. Результаты изучения микробиоценоза влагалища у больных хламидиозом (показатели выявляемости различных групп возбудителей на 100 обследованных)

Урогенитальные мико- и уреаплазмы сопутствовали хламидиозу почти в половине случаев (48,3 %). Достаточно часто отмечались дисбиотические изменения по типу бактериального вагиноза (41,4 %), а также высев факультативно-анаэробных УПМ (29,3 %). Дрожжеподобные грибы рода *Candida* определялись в 12,1 % случаев.

Выраженность клинических проявлений характеризовалась следующими показателями. 13,7 % больных не предъявляли никаких жалоб. Более 60 % женщин (65,5 %) оценивали субъектив-

ные симптомы в 1–2 балла, и лишь 12 % больных оценили тяжесть клинических проявлений в 3–4 балла. При этом степень местной воспалительной реакции характеризовалась средним числом лейкоцитов в мазке 14,3±5,6, а среднее число участников микробных ассоциаций составило 1,96±1,21.

Частота встречаемости различных микроорганизмов в микробиоценозе влагалища при хламидиозе представлена в табл. 2.12.

Таблица 2.12

Частота встречаемости различных микроорганизмов в микробиоценозе влагалища при хламидиозе

Микроорганизмы	Частота встречаемости, n = 58		Средний титр, lg/мл
	Абс.	%	
Лактобактерии	57	98,2	5,28±3,09
Gardnerella vaginalis	25	43,1	7,96±1,83
Peptostreptococcus spp.	14	24,1	6,28±1,32
Candida spp.	7	12,0	5,71±1,25
E. coli	4	6,9	5,5±1,1
Enterococcus spp.	7	12,0	7,14±1,46
Streptococcus spp.	1	1,72	8,0
Staphylococcus spp.	5	8,62	5,0±0,8
Corynebacterium spp.	7	12,0	4,85±1,21
Bacteroides spp.	24	41,4	6,83±1,47
Mobiluncus spp.	8	13,8	8,5±0,7
M. hominis	5	8,6	-
U. urealyticum	28	48,3	-

У подавляющего большинства больных высевались представители облигатной микрофлоры – лактобактерии, и их средний титр составил 5,28±3,09 lg/мл. Высокая частота встречаемости бактериального вагиноза объясняет частый высев возбудителей, ассоциированных с этим синдромом: *Gardnerella vaginalis* (43,1 %), *Bacteroides* spp. (41,4 %), *Peptostreptococcus* spp. (24,1 %), *Mobiluncus spp*. (13,8 %). *U. urealyticum* выявлялась в 48,3 % случаев и значительно реже (8,6 %) была выявлена *M. hominis*. Из факультативно-анаэробных УПМ наиболее часто встречались *Enterococcus spp*. и *Corynebacterium spp*. (12,0 %), несколько реже высевались *E. coli* (6,9 %), *Staphylococcus spp*. (8,6%) и *Streptococcus spp*. (1,72%).

При этом выявлено, что выраженность местной воспалительной реакции не коррелирует с высевом какого-либо определенного вида сопутствующих возбудителей или числом участников микробных ассоциаций; не выявлено также зависимости между выраженностью субъективных жалоб больных и какими-либо показателями вагинального микробиоценоза.

2.5.2. Микробиологическая характеристика бактериального вагиноза

У значительной части больных (497 человек) при комплексном обследовании был выявлен бактериальный вагиноз. Микроскопическая картина вагинальных мазков выглядела следующим образом (рис. 2.21).

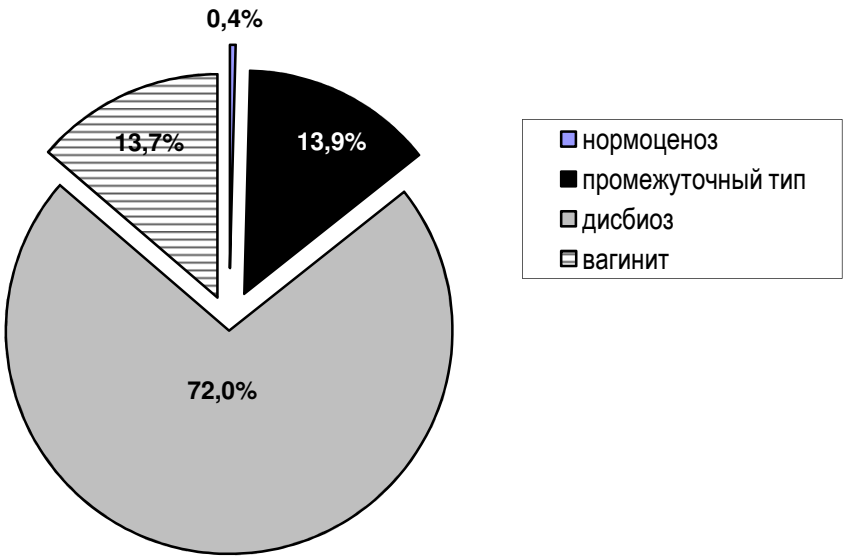


Рис. 2.21. Микроскопическая картина вагинальных мазков при БВ

В большинстве случаев (72,0 %) уже при микроскопии был определен дисбиоз, что с высокой степенью вероятности говорило о бактериальном вагинозе. В 13,9 % случаев был определен промежуточный тип мазка, и приблизительно в таком же проценте (13,7 %) микроскопическая картина характеризовалась как вагинит.

Микробиологическое обследование больных с БВ показало, что доля этого синдрома в чистом виде была относительно невелика – 19,9 % (99 больных). У остальных больных, вошедших в эту группу (398), БВ выявлялся в сочетании с другими возбудителями, в том числе у 165 женщин (33,2 %) – в составе полимикробных ассоциаций из 3 и более компонентов.

Структура полимикробных ассоциаций при бактериальном вагинозе показана на рис. 2.22.

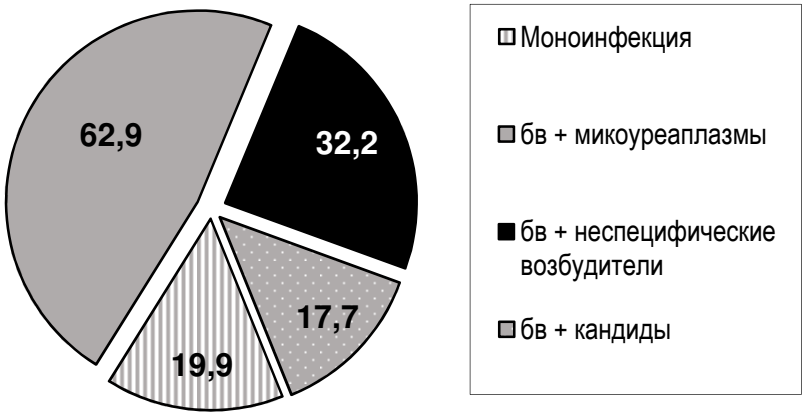


Рис. 2.22. Структура полимикробных ассоциаций при бактериальном вагинозе (показатели высеваемости возбудителей на 100 больных)

Более чем в 60 % случаев бактериальному вагинозу сопутствует высев урогенитальных микоплазм; неспецифические возбудители (факультативно-анаэробные УПМ) высевались в 32,2 %, и у 17,7 % больных бактериальный вагиноз сочетался с урогенитальным кандидозом.

Одним из определяющих признаков БВ является отсутствие или дефицит лактобактерий. В нашем исследовании у 16,5 % больных лактобактерии не определялись вовсе, в остальных случаях отмечался их выраженный дефицит – средний титр составил 3,98±1,87 lg/мл.

Выявлено, что состояние облигатной микрофлоры зависит от формы микст-инфекций, ассоциированных с БВ (табл. 2.13).

Таблица 2.13

Количество лактобактерий в вагинальном отделяемом при различных формах микст-инфекций, ассоциированных с бактериальным вагинозом

Форма инфекции	Титр лактобактерий, lg/мл
БВ - моноинфекция	4,09±1,2
БВ + микоуреаплазмы	3,16±1,9*
БВ + неспецифические возбудители	2,67±1,7*
БВ + кандида	3,4±1,3

*$p < 0,05$.

Относительно высокое среднее количество лактобактерий, хотя и ниже нормы, отмечалось у больных с БВ-моноинфекцией – 4,09±1,2 lg/мл. Сочетание БВ с урогенитальным кандидозом приводило к снижению среднего титра лактобактерий, но достоверность различий статистически не подтвердилась. Однако достоверно показано, что в случаях сочетания БВ с урогенитальными микоплазмами, и в особенности с неспецифическими возбудителями группы факультативно-анаэробных УПМ, среднее количество лактобактерий существенно ниже в сравнении со случаями моноинфекции (3,16±1,9 lg/мл и 2,67±1,7 lg/мл соответственно).

Местная воспалительная реакция со стороны слизистой влагалища при БВ характеризовалась следующими показателями. Чуть более, чем в половине случаев (55,9 %), в вагинальном мазке наблюдалось незначительное количество лейкоцитов, что классически считается характерным для бактериального вагиноза. У 27,7 % больных количество лейкоцитов было умеренным, и в 16,4 % случаев – значительным. Среднее число лейкоцитов в поле зрения составило 13,65±5,6.

Выявлено, что выраженность местной воспалительной реакции также связана в определенной степени с формой микст-инфекции (рис. 2.23).

Среднее число лейкоцитов в поле зрения при БВ-моноинфекции составило 11,96±2,29. При сочетании БВ с факультативно-анаэробными УПМ степень лейкоцитарной

реакции практически не отличалась – 12,15±3,1; однако присоединение урогенитальных микоплазм, и в особенности дрожжеподобных грибов рода Candida, приводило к значимому увеличению количества лейкоцитов (14,15±3,2 и 15,35±3,1 соответственно).

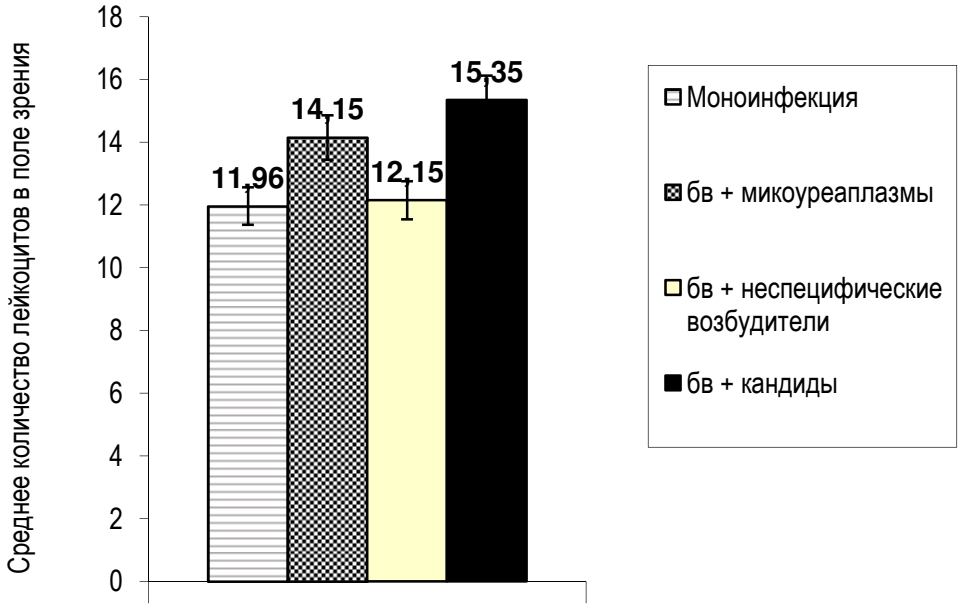


Рис. 2.23. Выраженность местной воспалительной реакции при различных формах микст-инфекций, ассоциированных с бактериальным вагинозом

Значительная часть больных не предъявляла жалоб (16,1 %) или оценивала выраженность субъективных симптомов в 1–2 балла (58,1 %). Лишь 13,5 % больных дали оценку тяжести своего состояния в 3–4 балла. Анализ распределения больных с различной тяжестью клинических проявлений в зависимости от формы микст-инфекции показал наличие взаимосвязи этих признаков (табл. 2.14).

Таблица 2.14

Выраженность субъективных клинических проявлений в зависимости от формы микст-инфекции

Форма микст-инфекции	Больные, не предъявляющие жалоб (0 баллов)		Больные с выраженными субъективными жалобами (3-4 балла)	
	Абс.	%	Абс.	%
БВ – моноинфекция (n =91)	69	75.8	8	8.8
БВ + микоуреаплазмы** (n = 270)	162	60.0	60	22.2
БВ + неспецифические возбудители* (n = 91)	54	59.3	91	16.4
БВ + кандида* (n = 64)	38	59.3	14	21.8
Ассоциации более чем из двух компонентов** (n = 136)	78	57.3	47	34.5

*$p<0.05$.
**$p < 0.01$.

При моноинфекции лишь 8,8 % больных предъявляли выраженные субъективные жалобы, тогда как 75,8 % вовсе ни на что не жаловались. Так, при сочетании БВ с неспецифическими возбудителями группы факультативно-анаэробных УПМ доля больных, предъявляющих выраженные субъективные жалобы, увеличивается до 16,4 % при соответствующем снижении случаев бессимптомного протекания болезни до 59,3 %.

Еще более значительное изменение соотношения наблюдается при сочетании БВ с урогенитальными микоплазмами (21,8 и 59,3 %) и дрожжеподобными грибами рода *Candida* (22,2 и 60,0 %).

При микст-инфекциях более чем из двух компонентов уже 34,5 % больных оценивают тяжесть клинических проявлений в 3–4 балла, тогда как доля случаев бессимптомного течения болезни снижается до 57,3 %.

Проведенный корреляционный анализ показал, что существует достоверная прямая умеренная корреляционная зависимость между выраженностью субъективных клинических проявлений и числом участников микробных ассоциаций при бактериальном вагинозе ($r = 0.28$; $p< 0.01$).

Выявлено также, что выраженность местной воспалительной реакции находится в обратной зависимости от титра лактобактерий ($r = -0,3$; $p< 0,01$) и гарднерелл ($r = - 0,25$; $p< 0,05$).

Количество лейкоцитов в вагинальном мазке прямо пропорционально титру дрожжеподобных грибов рода кандида ($r = 0.31$; $p < 0.01$).

Отсутствует корреляционная связь между содержанием факультативно-анаэробных УПМ различных родов и выраженностью клинических проявлений БВ.

Спектр выявляемых микрооганизмов и их среднее количество в 1 мл вагинального отделяемого представлено в табл. 2.15.

Таблица 2.15

Частота встречаемости различных микроорганизмов в микробиоценозе влагалища при бактериальном вагинозе

Микроорганизмы	Частота встречаемости, n = 497		Средний титр, lg/мл
	Абс.	%	
Lactobacillus	415	83.5	3.98± 1.87
Gardnerella vaginalis	497	100	8.28 ±2.07
Peptostreptococcus spp.	231	46.5	6.4± 0.95
Candida spp.	88	17.7	5.6± 1.46
E. coli	45	9.0	4.9 ±1.35
Klebsiella spp.	6	1.2	6.0± 1.26
Другие энтеробактерии	13	2,6	5,07± 1,32
Enterococcus spp.	44	8.8	6.4 ±1.51
Streptococcus spp.	48	9.7	6.0± 1.69
Staphylococcus epidermidis.	48	9.7	4.64 ±0.93
S. aureus	20	4.02	4.5± 1.67
Corynebacterium spp.	28	5.6	4.96± 1.02
Bacteroides spp.	497	100	7,57 ±1,21
Mobiluncus spp.	246	49,5	7,89± 2,16
Fusobacterium spp.	60	12.1	6.28± 2.97
Leptothrichia spp.	13	2.6	6.33 ±1.15
M. hominis	124	24.9	–
U. urealyticum	300	60.1	–

Представители облигатной микрофлоры – лактобактерии были определены в 83,5 % случаев, однако в количестве значительно ниже нормы. Средний титр их составил 3.98±1.87 lg/мл.

Среди остальных групп микроорганизмов закономерно доминируют облигатные анаэробы (*Bacteroides* spp., *Peptostrepto-*

coccus spp., *Mobiluncus* spp., *Fusobacterium* spp.) и *Gardnerella vaginalis*. Частота их встречаемости составляет от 12,1 до 100 %, а средний титр колеблется от 6.28±2.97 lg/мл для фузобактерий до 8.28±2.07 lg/мл для *Gardnerella vaginalis*.

В 17,7 % случаев были выделены дрожжеподобные грибы рода *Candida* в количестве 5.6±1.46 lg/мл.

Из факультативно-анаэробных УПМ доминировали представители кокковой флоры: *S. epidermidis* (9,7 %), *Streptococcus* spp. (9,7 %), *Enterococcus* spp. (8,8 %), а также *E. coli* (9,0 %); другие виды высевались значительно реже.

U. urealyticum сопутствовала бактериальному вагинозу в 60,1 % случаев; у 24,1 % больных была выделена *M. hominis*.

Урогенитальные микст-инфекции с участием мико- и уреаплазм

Инфекции, ассоциированные с урогенитальными мико- и уреаплазмами, зарегистрированы у 654 больных. Данные предварительной микроскопии вагинальных мазков этой группы пациенток представлены на рис. 2.24. У незначительного числа пациенток инфекция протекала при картине нормоценоза (1,6 %), более половины случаев – при промежуточном типе вагинального мазка (51,3 %); у 35,2 % больных отмечалась микроскопическая картина дисбиоза, и 11,9 % случаев были оценены как вагинит.

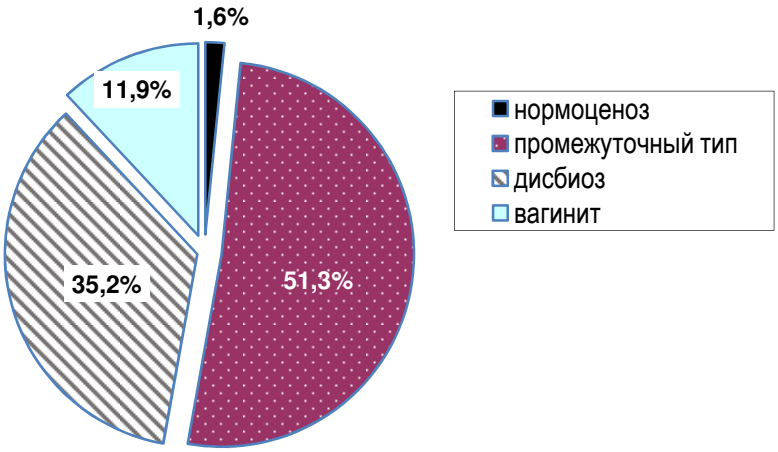


Рис. 2.24. Микроскопическая картина вагинальных мазков при микоуреаплазмозах

Видовой состав урогенитальных микоплазм, выделенных у обследованных пациенток, выглядел следующим образом (рис. 2.25).

В большинстве случаев (471 больная) высевались виды *Ureaplasma; Mycoplasma hominis* изолированно высевалась лишь у 29 пациенток, и в 154 случаях были выявлены мико-уреаплазменные ассоциации. При этом в клинически значимой концентрации более 10^4 ЦОЕ/мл *M. hominis* высевалась лишь в 34,4 % случаев; уреаплазмы – у 43,4 % больных.

При анализе результатов микробиологического исследования выявлено, что урогенитальные микоплазмы в качестве единственного возбудителя на фоне нормоценоза вагинальной флоры высевались у 136 больных, что составило 20,8 %. В остальных случаях (79,2 %) отмечались те или иные виды нарушений вагинального микробиоценоза, в значительной части случаев вызванные многокомпонентными ассоциациями возбудителей. Структура полимикробных ассоциаций при инфекциях, вызванных микоуреаплазмами, показана на рис. 2.26.

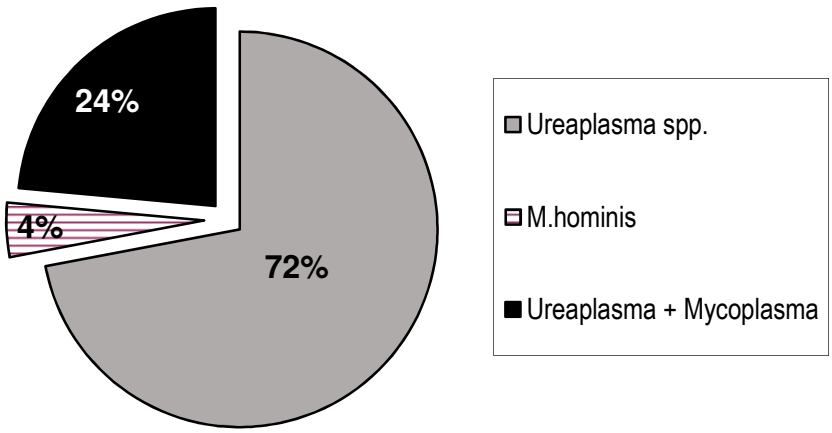


Рис. 2.25. Видовой состав выделенных штаммов урогенитальных микоплазм

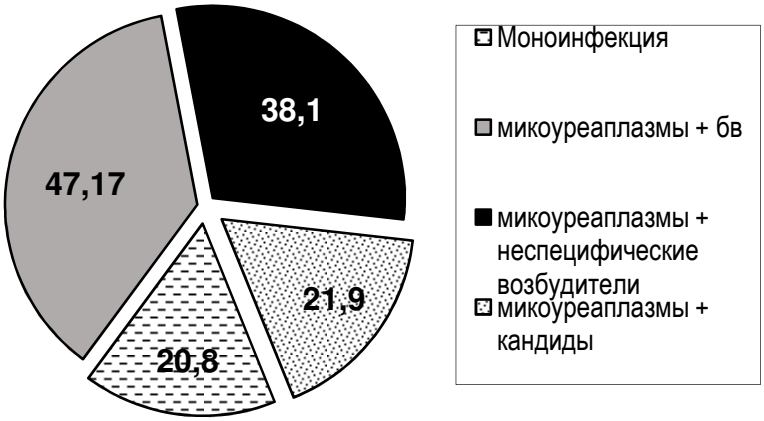


Рис. 2.26. Структура полимикробных ассоциаций при инфекциях, ассоциированных с микоуреаплазмами (показатели высеваемости возбудителей на 100 больных)

Как видно, наиболее часто урогенитальные микоплазмы высеваются на фоне бактериального вагиноза – 47,2 на 100 больных. Сочетание с неспецифическими возбудителями группы факультативно-анаэробных УПМ также отмечалось достаточно часто – 38,1 %; и в 21,9 % случаев наблюдалось сочетание с урогенитальным кандидозом.

Состояние облигатной микрофлоры характеризовалось следующим образом. Лактобактерии были выявлены у 582 больных, что составило 88,9 % в среднем титре 5,99±3,19 lg/мл. При этом содержание лактофлоры ниже нормы отмечалось у 258 пациенток (39,4 %). Отмечена зависимость сохранности облигатной микрофлоры от формы микст-инфекции (табл. 2.16).

Таблица 2.16

Среднее количество лактобактерий в вагинальном отделяемом при различных формах микст-инфекций, ассоциированных с микоуреаплазмами

Форма инфекции	Титр лактобактерий, lg/мл
Моноинфекция	8,34±1,97
Микоуреаплазмы + бв	3,15±1,9**
Микоуреаплазмы + неспецифические возбудители	5,9±1,3**
Микоуреаплазмы + кандида	7,68±2,38*

* $p<0.05$.

** $p < 0.01$.

Во всех случаях моноинфекции содержание лактобактерий было высоким, средний титр составил 8,34±1,97 lg/мл; присоединение дрожжеподобных грибов рода Candida приводило к небольшому снижению этого показателя (7,68±2,38 lg/мл; $p<0.05$). Существенно ниже был титр лактобактерий при сочетании микоуреаплазм с неспецифическими возбудителями (5,9±1,3 lg/мл; $p<0.01$) и особенно на фоне бактериального вагиноза (3,15±1,9 lg/мл; $p < 0.01$).

Местная воспалительная реакция незначительной степени выраженности отмечалась более чем у половины больных (55 %); у 30,8 % пациенток в вагинальном мазке отмечалось умеренное количество лейкоцитов, и в 13,5 % случаев наблюдалась выраженная воспалительная реакция. Среднее количество лейкоцитов в поле зрения составило 13,05±3,92.

Интенсивность местной воспалительной реакции в определенной степени зависела от состава ассоциаций возбудителей, что демонстрируется на рис. 2.27. Присоединение сопутствующих возбудителей во всех случаях приводит к увеличению среднего числа лейкоцитов в мазке. Так, бактериальный вагиноз в сочетании с микоуреаплазмами ведет к увеличению этого показателя до 14,17±3,11($p<0,01$) по сравнению с 10,62±2,82 при моноинфекции. При присоединении неспецифических возбудителей и дрожжеподобных грибов рода *Candida* среднее число лейкоцитов в мазке составило 13,39±3,24 ($p<0,05$) и 12,28±2,79 ($p>0,05$) соответственно.

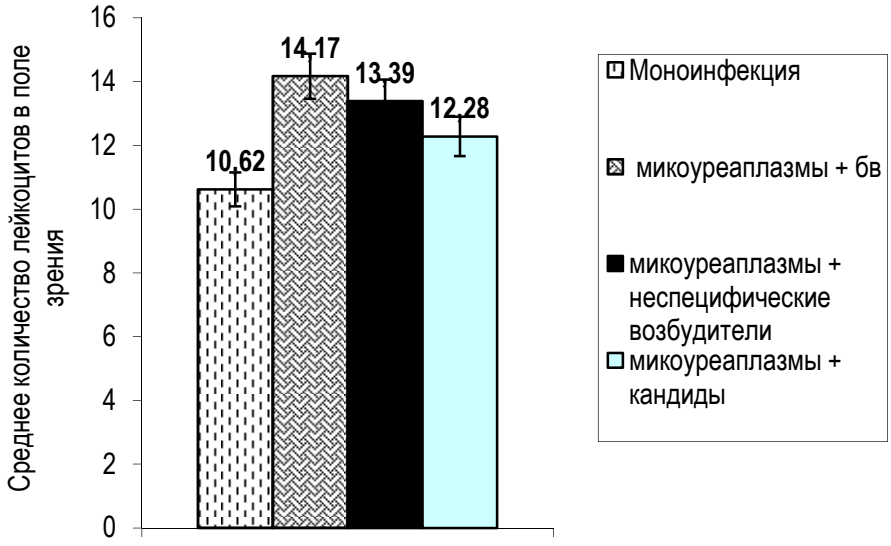


Рис. 2.27. Выраженность местной воспалительной реакции при различных формах микст-инфекций, ассоциированных с микоуреаплазмозом

Более 60 % больных не предъявляли жалоб, оценив субъективно тяжесть своего состояния в 0–1 балл. Жалобы умеренной степени (2-3 балла) предъявляли 35 % женщин; и наконец 2,7 % больных оценили свое состояние в 4–5 баллов. Выяснилось, что субъективная оценка больными своего состояния также зависит от формы микст-инфекции (табл. 2.17).

Таблица 2.17

Выраженность субъективных клинических проявлений в зависимости от формы микст-инфекции

Форма микст-инфекции	Больные, не предъявляющие жалоб (0-1 балл)		Больные с выраженными субъективными жалобами (3-5 балла)	
	Абс.	%	Абс.	%
Моноинфекция (n =116)	84	72.4	30	25.8
Микоуреаплазмы + бв (n = 269)	162	60.2*	65	24,1
Микоуреаплазмы + неспецифические возбудители (n = 95)	60	63,1	29	30,5
Микоуреаплазмы + кандида (n = 79)	43	54,4**	32	40,5*
Ассоциации более, чем из двух компонентов (n = 155)	86	55,4*	62	40,0*

* $p<0.05$.
** $p < 0.01$.

Так, в случаях моноинфекции доля больных с бессимптомным протеканием болезни составила 72,4 %, и лишь 25,8 % больных предъявляли выраженные субъективные жалобы. Любой вариант микст-инфекции приводил к изменению этого соотношения в сторону увеличения доли больных с выраженными клиническими проявлениями с различной степенью достоверности, что показано на рис. 2.28.

При сочетании микоуреаплазм с бактериальным вагинозом доля больных, оценивших свое состояние в 3–5 баллов, практически не изменилась, но несколько снизилось число случаев бессимптомного течения болезни.

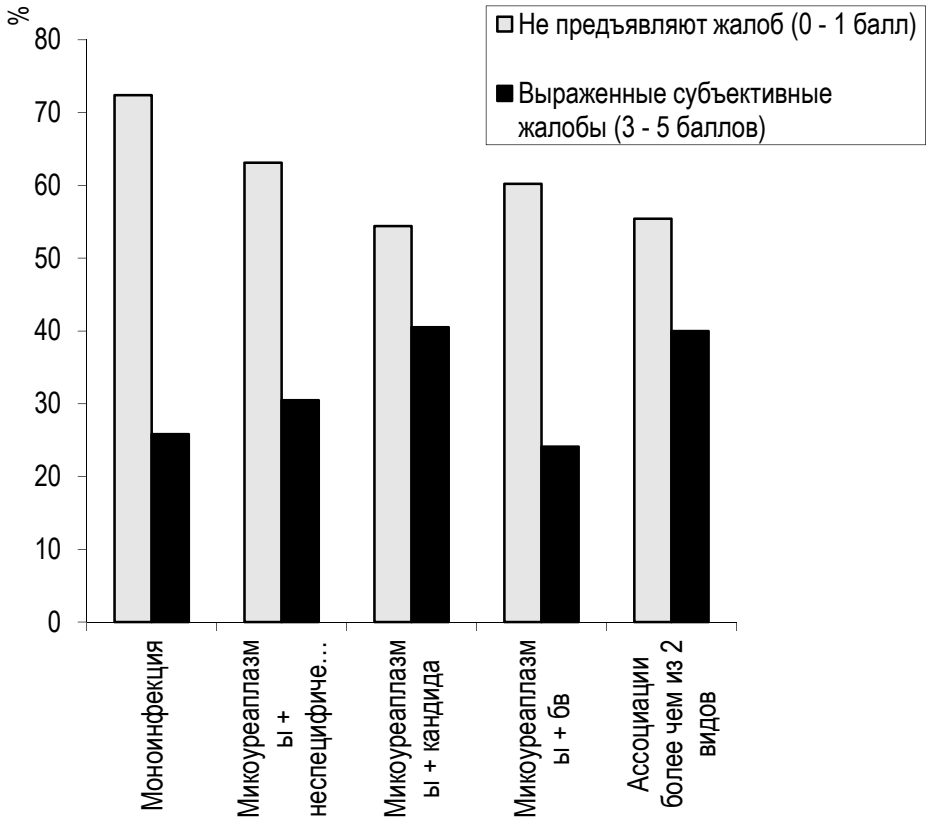


Рис. 2.28. Степень выраженности субъективных проявлений при различных формах микст-инфекций, асоциированных с микоуреаплазмами

Более значительно изменяется соотношение при высеве параллельно с микоуреаплазмами неспецифических возбудителей (30,5 % больных предъявляли выраженные субъективные жалобы), а также дрожжеподобных грибов рода кандида и при наличии ассоциаций более чем из двух компонентов (40,5 и 40 % соответственно).

Частота встречаемости и среднее количество сопутствующих возбудителей в вагинальном отделяемом при инфекциях, ассоциированных с микоуреаплазмами, представлены в табл. 2.18. Закономерно лидируют, учитывая высокую долю случаев сочетания микоуреаплазм с бактериальным вагинозом, *G.vaginalis* (47,2 % в среднем титре 8,63±1,58 lg/мл), а также облигатные анаэробы родов *Bacteroides* (41,3%; 7,39±1,18 lg/мл), *Peptostreptococcus* (26,2 %; 6,47±0,9 lg/мл) и *Mobiluncus* (18,3 %; 7,66±2,43 lg/мл).

Таблица 2.18

Частота встречаемости и количество микроорганизмов в микробиоценозе влагалища при инфекциях, ассоциированных с микоуреаплазмами

Микроорганизмы	Частота встречаемости n = 654		Средний титр, lg/мл
	Абс.	%	
Lactobacillus	582	88,9	5,99±3,19
Gardnerella vaginalis	309	47,2	8,63±1,58
Peptostreptococcus spp.	172	26,2	6,47±0,9
Candida spp.	142	21,7	5,89±1,45
E. coli	83	12,7	5,21±1,56
Klebsiella spp.	7	1,07	5,42±1,27
Другие энтеробактерии	17	2,6	5,0±0,93
Enterococcus spp.	97	14,8	6,81±1,62
Streptococcus spp.	58	8,9	6,6±1,78
Staphylococcus epidermidis.	68	10,4	5,0±0,96
S. aureus	29	4,4	4,58±1,37
Corynebacterium spp.	28	4,3	5,35±1,22
Bacteroides spp.	270	41,3	7,39±1,18
Mobiluncus spp.	120	18,3	7,66±2,43
Fusobacterium spp.	27	4,12	5,66±3,57
Leptothrichia spp.	24	3,7	5,12±3,31

Довольно высок показатель высеваемости дрожжеподобных грибов рода *Candida* (21,7 %; 5,89±1,45 lg/мл). Из факультативно-анаэробных УПМ лидируют *Enterococcus* spp. (14,8 %; 6,81±1,62 lg/мл), *E. coli* (12,7 %;5,21±1,56 lg/мл) и *S. epidermidis* (10,4 %; 5,0±0,96 lg/мл). Показатели высеваемости остальных видов значительно ниже.

Корреляционный анализ зависимости тяжести клиниче-

ских проявлений заболеваний от показателей вагинального микробиоценоза показал наличие слабой прямой корреляции между количеством дрожжеподобных грибов рода *Candida* (r=0,2; p<0.01), энтерококков (r=0,22; p<0.05), с одной стороны, и степенью тяжести субъективных клинических проявлений – с другой. Прямая зависимость средней степени выявлена также между числом видов сопутствующих возбудителей и выраженностью клинических проявлений (r=0,34; p<0.01). Степень местной воспалительной реакции оказалась обратно пропорциональна титру лактобактерий (r=-0,2; p<0.05). Выявлено, что уреаплазмы в клинически значимой концентрации чаще высевались в составе полимикробных ассоциаций: среднее количество участников составило 3,26±1,46, тогда как в случаях высева уреаплазм в низком титре этот показатель был равен 2,66±1,28 (p<0,01).

Для анализа зависимости клинической картины от титра основного возбудителя были взяты только случаи моноинфекции, вызванной уреаплазмами, для исключения влияния сопутствующих возбудителей. Выявлено, что высев уреаплазм в концентрации, считающейся клинически значимой (более 10^4 ЦОЕ/мл), приводит к достоверному увеличению среднего числа лейкоцитов в вагинальном мазке, а также к увеличению тяжести субъективных симптомов. Состояние облигатной микрофлоры в сравниваемых группах практически не отличалось, титр лактобактерий оставался на нормальном уровне (табл. 2.19).

Таблица 2.19

Выраженность клинических проявлений и состояние облигатной микрофлоры в зависимости от титра уреаплазм (случаи моноинфекции)

Клинические проявления	Титр уреаплазм, ЦОЕ/мл	
	Менее 10^4, n=77	Более 10^4, n=39
Среднее число лейкоцитов в мазке*	9,1±2,54	13,6±4,41
Субъективные жалобы (оценка в баллах)*	0.92±0.3	1.4±0.4
Титр лактобактерий	8,4±1,7	8,1±2,29

*p<0.05.

Сходная зависимость выявлена при анализе инфекций, ассоциированных с *M. hominis* (табл. 2.20).

Таблица 2.20

Выраженность клинических проявлений и состояние облигатной микрофлоры в зависимости от титра *M.hominis* (случаи моноинфекции)

Клинические проявления	Титр микоплазм, ЦОЕ/мл	
	Менее 10^4, n=19	Более 10^4, n=10
Среднее число лейкоцитов в мазке*	10.33±3.57	21.0±3.8
Субъективные жалобы (оценка в баллах)	0.95±0.3	1.3±0.4
Титр лактобактерий	7.1±3.48	9.6±0.57

* $p<0.05$. Здесь также высев основного возбудителя в высоком титре сопровождался достоверно более выраженной местной воспалительной реакцией.

Виды уреаплазм при воспалительных заболеваниях половой сферы

С помощью ПЦР с накопленного материала в жидкой питательной среде для индикации уреаплазм (115 образцов) проводили типирование геновидов (ранее биоваров) Parvo и T-960 тест-системами «Полимик Б» НПФ «Литех» (г.Москва). Геновид *U.parvum* (ранее биовар Parvo) был выявлен у 74 пациенток (64,3 %); *U. urealyticum* (ранее биовар T-960) – у 19 (16,5 %). В 22 случаях (19,1 %) отмечалось сочетание обоих видов.

В большинстве случаев, как уже указывалось выше, уреаплазмы входят в состав полимикробных ассоциаций. При этом среднее число участников микробных ассоциаций при высеве *U. urealyticum* составило 2,1±0,2; а при высеве *U. parvum* – 3,2±0,4 ($p<0.05$).

Для анализа патогенного потенциала различных видов были взяты только случаи моноинфекции, число которых оказалось небольшим (табл. 2.21). Несмотря на небольшое число наблюдений, среднее число лейкоцитов в вагинальных мазках при высеве *U. urealyticum* оказалось достоверно выше по сравнению с другим видом, что свидетельствует о большей степени патогенности этого возбудителя.

Таблица 2.21

Выраженность местной воспалительной реакции и состояние облигатной микрофлоры в зависимости от вида уреаплазм (случаи моноинфекции)

Клинические проявления	Виды уреаплазм	
	U. urealyticum, n=6	*U. parvum*, n=9
Среднее число лейкоцитов в мазке*	8.5±1.21	4.66±1.1
Титр лактобактерий	9.5±0.83	8,77±1.48

*p<0.05.

Структура микст-инфекций, ассоциированных с различными видами уреаплазм, представлена на рис. 2.29. *U. urealyticum* существенно чаще высевался на фоне нормоценоза вагинальной микрофлоры (31,6 %),чем *U. parvum* (12,2 %). Статистически достоверность различий в показателях высеваемости неспецифических возбудителей, дрожжеподобных грибов рода *Candida* в ассоциации с *U. urealyticum* или *U. parvum* не подтверждается (p>0,05). При этом сочетание *U. parvum* с бактериальным вагинозом регистрировалось значительно чаще, чем высев *U. urealyticum* при БВ (58,1 и 42,1 % соответственно).

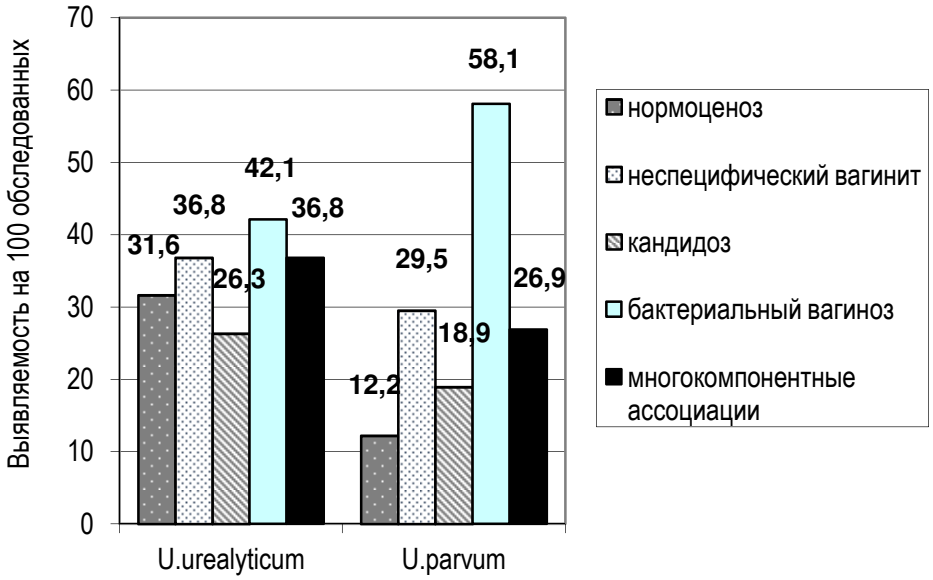


Рис. 2.29. Структура микст-инфекций, ассоциированных с различными видами уреаплазм

У 104 выделенных культур мико- и уреаплазм была определена чувствительность к антибактериальным препаратам различных групп: тетрациклинам (тетрациклин и доксициклин), макро-

лидам (мидекамицин и эритромицин), хинолонам (пефлоксацин), аминогликозидам (гентамицин), линкозамидам (клиндамицин). Результаты анализа полученных данных представлены на рис. 2.30.

Наибольшее количество исследованных культур были чувствительны к макропену (66,7 %) и пефлоксацину (63,7 %). К гентамицину оказались чувствительны 46 % штаммов; несколько ниже (39,4–42,7 %) чувствительность к эритромицину, тетрациклину и доксициклину; и лишь 32,8 % изученных культур были чувствительны к клиндамицину.

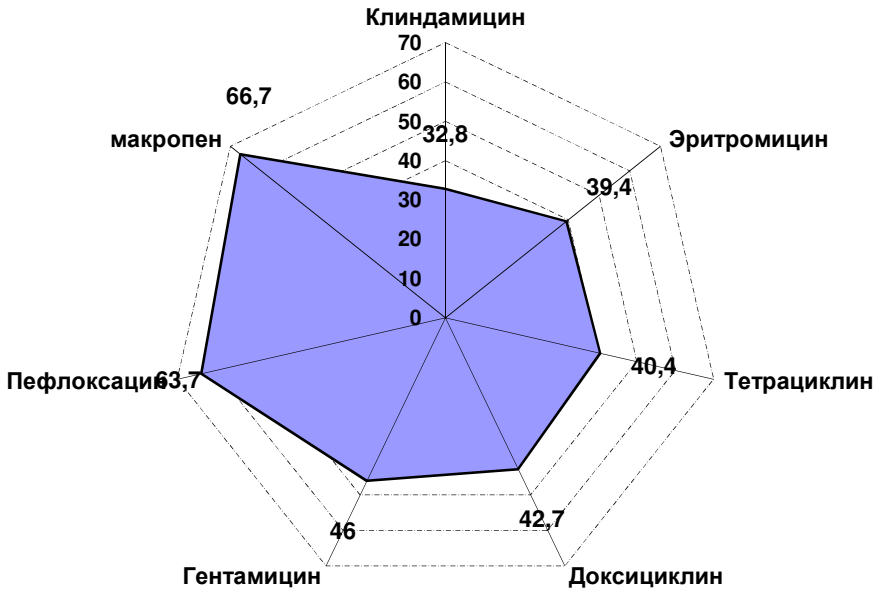


Рис. 2.30. Чувствительность штаммов уреаплазм к антибиотикам

Более детальный анализ антибиотикочувствительности по видам показал, что виды уреаплазм существенно отличаются по антибиотикочувствительности (рис. 2.31).

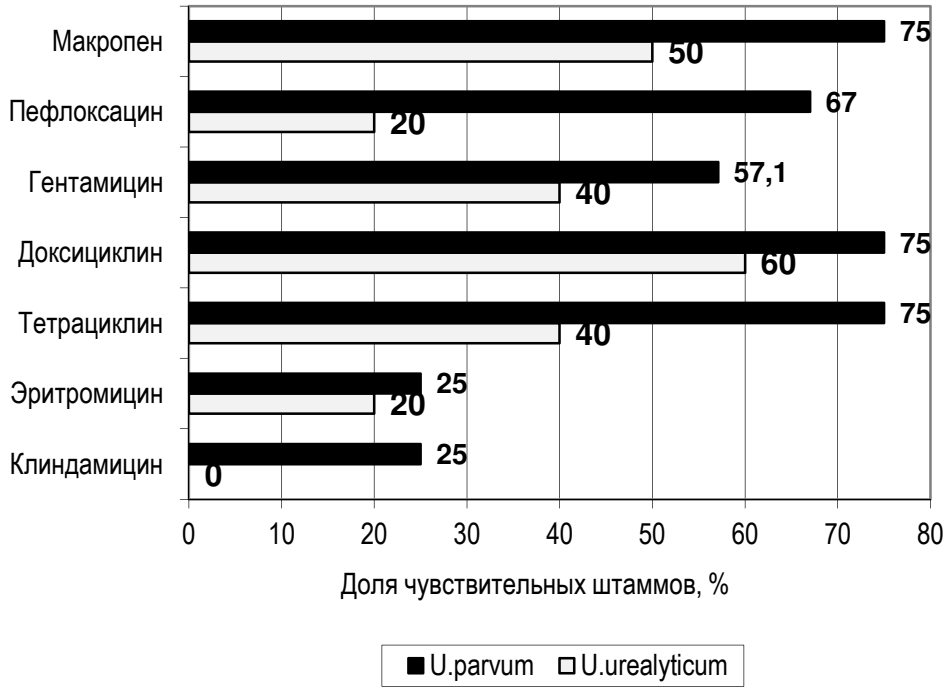


Рис. 2.31. Чувствительность видов уреаплазм к антибактериальным препаратам

Так, *U. urealyticum* значительно чаще была устойчива ко всем изученным антибиотикам, особенно существенная разница отмечена в чувствительности к пефлоксацину (67 % чувствительных штаммов *U. parvum* и 20 % *U. urealyticum*), тетрациклину (75 и 40 %) и макропену (75 и 50 % соответственно). Обращает на себя внимание, что ни один из изученных штаммов *U. urealyticum* не был чувствителен к клиндамицину.

2.5.3. Вирусы и вирусно-бактериальные ассоциации в этиологии инфекций влагалища

Возбудители урогенитальных инфекций вирусной природы занимают существенное место в структуре этой патологии. Персистирование вирусов в клетках слизистой оболочки приводит к нарушению целостности эпителиального слоя, открывая возможности для проявления патогенного потенциала условно-патогенных микроорганизмов, входящих в состав нормальной микрофлоры влагалища.

В связи с этим в рамках данного исследования мы не могли не коснуться вопроса о месте вирусов в структуре вагинальных

дисбиозов и роли вирусно-бактериальных ассоциаций в этой патологии.В образцах вагинального отделяемого от 108 больных методом полимеразной цепной реакции проводилось обнаружение цитомегаловируса (CMV), а также вирусов герпеса I и II типов (HSVI и HSVII).

Возбудители герпесвирусных инфекций были обнаружены более чем у половины обследованных больных (54,6 %). Этиологическая структура гепесвирусных инфекций урогенитального тракта представлена на рис. 2.32.

Наибольший удельный вес в структуре вирусных инфекций занимает цитомегаловирусная инфекция изолированно (45,7 %) или в сочетании с герпесвирусами I и II типов (22 % CMV + HSVI + HSVII; 3,4 % CMV + HSVII и 1,7 % CMV + HSVI). В 6,8 и 3,4 % выявлялись HSVI и HSVII соответственно и у 20,3 % больных герпесвирусы обоих типов были выявлены одновременно.

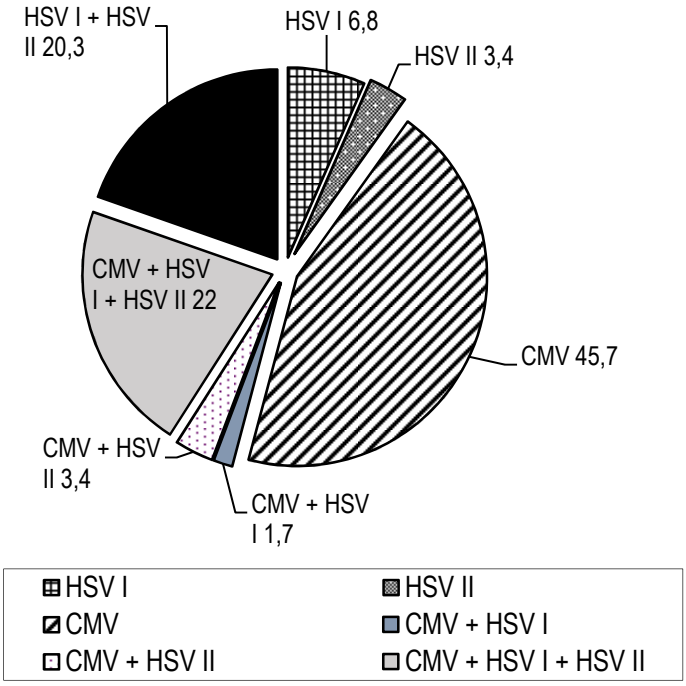


Рис. 2.32. Этиологическая структура герпесвирусных инфекций урогенитального тракта

Состояние вагинального микробиоценоза при вирусных инфекциях демонстрирует рис. 2.33.

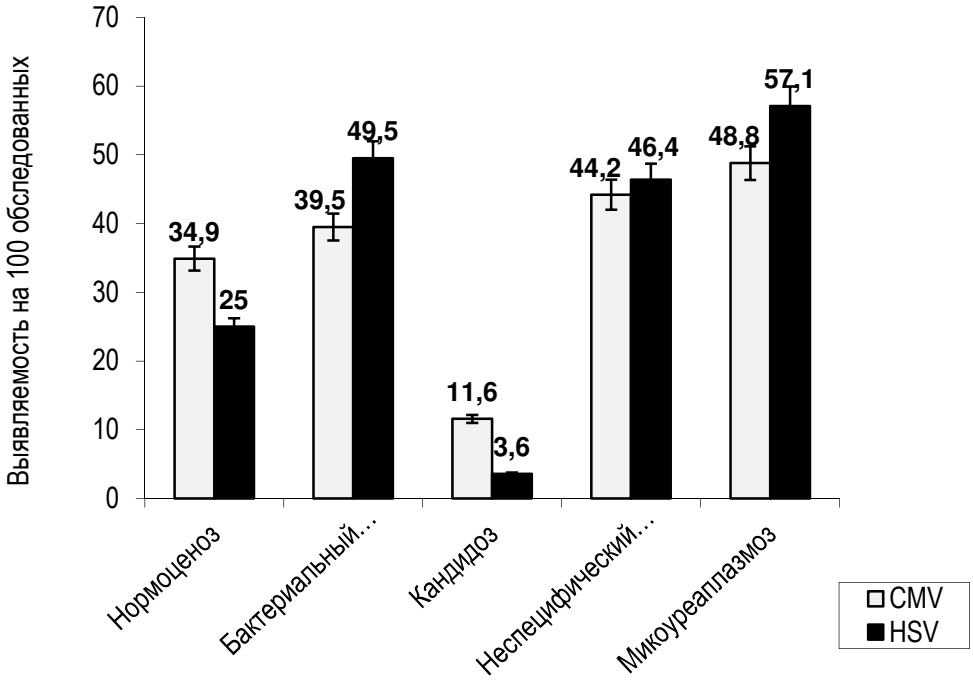


Рис. 2.33. Характеристика вагинального микробиоценоза на фоне вирусной инфекции

Цитомегаловирус достоверно чаще выявлялся изолированно на фоне нормоценоза вагинальной микрофлоры, а также в ассоциации с дрожжеподобными грибами рода *Candida.* В то же время герпесвирусы чаще ассоциировались с микоуреаплазмами и обнаруживались при бактериальном вагинозе. Сочетание с неспецифическими возбудителями регистрировалось достаточно часто для всех вирусов, и показатели были приблизительно на одном уровне.

Определенный интерес вызывает вопрос о влиянии присоединения вирусной инфекции на интенсивность воспалительного процесса и тяжесть клинических проявлений заболевания при дисбиотических процессах.

Выраженность местной воспалительной реакции в зависимости от этиологии вирусной инфекции и состава ассоциаций представлена на рис. 2.34.

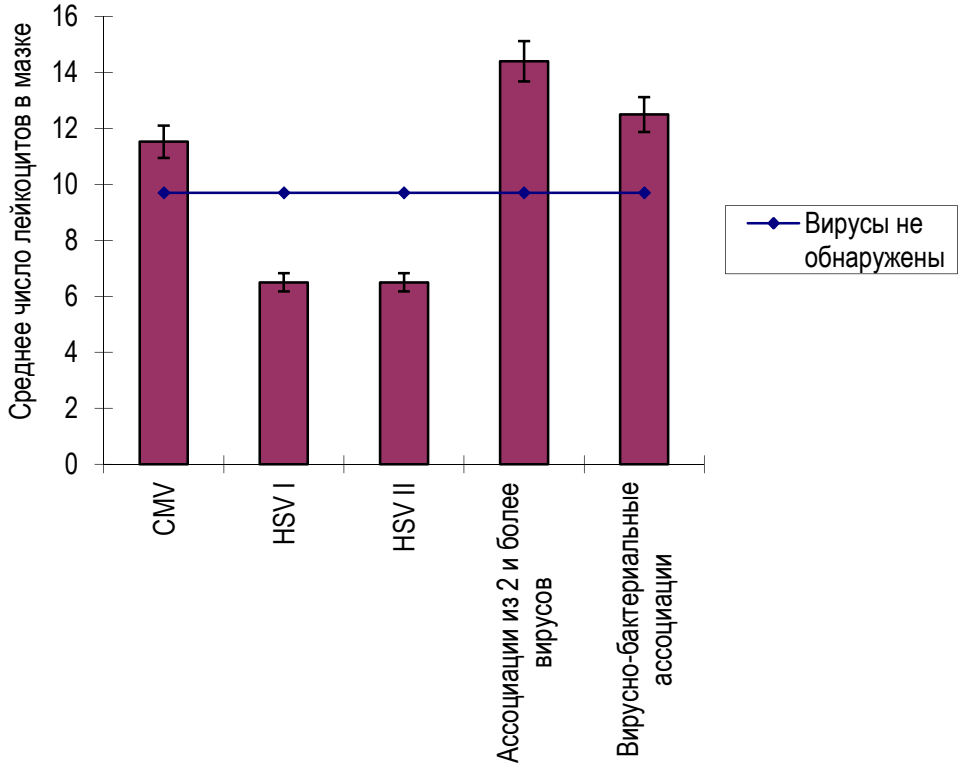


Рис. 2.34. Выраженность местной лейкоцитарной реакции в зависимости от этиологии вирусной инфекции

Горизонтальная линия на рисунке показывает среднее число лейкоцитов в вагинальном мазке у тех больных, у которых вирусы не были обнаружены. Этот показатель составил 9,57±3,71. В случаях присоединения герпесвирусной инфекции число лейкоцитов было ниже – 6,5±1,7. Вероятно, данный факт отчасти можно объяснить сочетанием герпесвирусов в высоком проценте случаев с бактериальным вагинозом, для которого характерен низкий лейкоцитоз ввиду ингибирующего влияния продуктов метаболизма гарднерелл и облигатных анаэробов на лейкоцитарную активность.

Зато в случаях выявления цитомегаловируса, в особенности в составе ассоциаций из двух и более вирусов или выявления вирусно-бактериальных ассоциаций выраженность местной воспалительной реакции существенно увеличивалась (11,53±3,04; 14,4±3,8 и 12,5±2,5 соответственно).

Заключение

Таким образом, при изучении эпидемиологических особенностей ИППП, вызванных условно-патогенными возбудителями, выявлено следующее.

В течение анализируемого периода отмечалось снижение заболеваемости классическими венерическими болезнями (сифилис, гонорея, трихомониаз, хламидиоз) по данным официальной статистики при выраженной тенденции к росту показателей заболеваемости бактериальным вагинозом, урогенитальными микоплазмозами, кандидозом. Данные тенденции динамики заболеваемости в большей степени выражены в городе, чем в сельских районах

Выявлены существенные различия при сравнении средних показателей заболеваемости ИППП по городу и районам области. Так, по районам области достоверно ниже оказалась заболеваемость практически всеми взятыми для изучения ИППП, в особенности второго поколения.

Выявленные для официальных показателей особенности не вполне подтверждаются при анализе результатов углубленного микробиологического обследования больных за этот же период. Отмечено, что встречаемость бактериального вагиноза, урогенитального кандидоза, а также неспецифических возбудителей в течение изучаемого периода существенно не изменилась, тогда как для микоуреаплазмоза отмечается выраженная тенденция к росту. В то же время углубленный анализ этих же показателей, но с разделением на моно- и микст-инфекции выявляет увеличение удельного веса многокомпонентных микробных ассоциаций при выраженном снижении доли моноинфекций, за исключением микоуреаплазмоза.

Изучение структуры бактериального вагиноза, микоуреаплазмоза, урогенитального кандидоза как микст-инфекций позволило сделать вывод, что в чистом виде данные нозологические формы встречаются менее чем в 20 % случаев, оставшаяся доля приходится на различные варианты микст-инфекций. При этом отмечены наиболее часто встречающиеся ассоциации.

Обращают на себя внимание высокие показатели выявляемости неспецифических возбудителей как в качестве единственного этиологического фактора, так и в составе ассоциаций, превышающие показатели остальных инфекций.

При анализе факторов риска возникновения тех или иных форм вагинальных дисбиозов выявлено следующее.

Вероятность и тип нарушения вагинального микробиоценоза находятся в зависимости от факторов риска, определяемых сексуальным поведением больных и влияющих на гормональный и иммунный статус.

Так, раннее начало половой жизни не приводит к увеличению риска возникновения вагинальных дисбиозов, за исключением микоуреаплазмоза; однако увеличивает вероятность более грубых нарушений состава микрофлоры, заключщихся в появлении многокомпонентных ассоциаций возбудителей.

Частая смена половых партнеров достоверно чаще приводит к возникновению бактериального вагиноза и инфекций, ассоциированных с урогенитальными микоплазмами. В то же время неспецифические возбудители и особенно дрожжеподобные грибы рода *Candida* встречаются реже.

Все виды нарушений вагинального микробиоценоза достоверно чаще регистрируются у женщин, не состоящих в браке.

Перенесенные ИППП в анамнезе достоверно не сказываются на состоянии вагинальной микрофлоры, хотя отмечается некоторое увеличение частоты урогенитального кандидоза в группе больных, указывающее на наличие в анамнезе ИППП.

Беременности и роды в целом оказывают благоприятное влияние на состояние вагинальной микрофлоры, хотя и увеличивают риск возникновения урогенитального кандидоза; у нерожавших же достоверно выше риск возникновения неспецифических инфекций влагалища. Медицинские аборты, в особенности с увеличением их количества в течение жизни, приводят к повышенному риску нарушения состояния вагинальной микрофлоры по типу бактериального вагиноза, в то

время как частота выявления урогенитального кандидоза достоверно снижается.

Прием антибиотиков не привел к сколько-нибудь существенному увеличению частоты встречаемости урогенитального кандидоза среди изучаемого контингента больных, однако достоверно увеличилось выявление неспецифических возбудителей.

При различных формах генитальной патологии доминируют те или иные варианты дисбиотических процессов, при этом во всех случаях высока доля микст-инфекций.

Высеваемость условно-патогенных возбудителей урогенитальных инфекций характеризуется сезонными колебаниями различной степени выраженности, отличными для изученных нозологических форм. Так, четко выраженная летняя сезонность отмечена для неспецифических возбудителей, в сентябре-октябре доминируют нарушения вагинальной микрофлоры по типу бактериального вагиноза; далее в ноябре-декабре увеличивается выявляемость урогенитальных микоплазм и некоторое увеличение выявляемости урогенитального кандидоза зарегистрировано в зимний период.

При анализе микробиологических особенностей вагинальных дисбиозов выявлено следующее. Условно-патогенные микроорганизмы различных групп достаточно часто являются участниками патологических микробиоценозов при урогенитальных инфекциях, вызванных облигатными патогенами. Так, трихомониаз лишь чуть более чем в 10 % случаев протекал как моноинфекция, в остальных случаях в составе вагинального микробиоценоза были зарегистрированы значительные сдвиги, причем в большинстве случаев число участников микробных ассоциаций составляло 3 и более вида возбудителей. Наиболее часто трихомониазу сопутствовал высев урогенитальных микоплазм на фоне бактериального вагиноза.

Урогенитальный хламидиоз в большинстве случаев протекал малосимптомно, нормоценоз вагинальной флоры при этом отмечался значительно чаще – примерно у 30 % больных, однако в остальных случаях также отмечалось присоединение различ-

ных условно-патогенных возбудителей, причем в 60 % случаев – в ассоциациях из двух и более видов. И вновь чуть менее чем в половине случаев были выявлены урогенитальные микоплазмы изолированно или на фоне бактериального вагиноза.

Обращает на себя внимание достаточно высокая частота выявления факультативно-анаэробных УПМ при инфекциях, вызванных облигатными патогенами, – на уровне 30–40 %. Учитывая быстроту развития лекарственной устойчивости у этой группы микроорганизмов, что также показано в нашем исследовании, с высокой степенью вероятности можно предсказать развитие дисбиотических сдвигов после антибактериального лечения основного заболевания.

Наиболее частыми спутниками бактериального вагиноза и урогенитального кандидоза являлись микоуреаплазмы и неспецифические возбудители группы факультативно-анаэробных УПМ, реже дрожжеподобные грибы высевались на фоне бактериального вагиноза.

Примечательно, что любой из вариантов микст-инфекции при вагинальных дисбиозах приводил к усугублению негативных сдвигов в составе облигатной микрофлоры (снижению титра лактобактерий), увеличению выраженности местной воспалительной реакции, что проявлялось увеличением среднего числа лейкоцитов в вагинальном мазке, и повышению тяжести субъективных клинических проявлений.

Наиболее выраженным влиянием на интенсивность воспалительного процесса при урогенитальном кандидозе и бактериальном вагинозе обладали неспецифические возбудители группы факультативно-анаэробных УПМ в случае их присоединения к основному возбудителю. Кроме того, тяжесть клинических проявлений заметно увеличивалась при регистрации ассоциаций более чем из двух компонентов.

При моноинфекции, вызванной урогенитальными микоплазмами, среднее число лейкоцитов в мазке также было достоверно ниже, чем при любом варианте ассоциаций, причем здесь

тоже выраженное влияние оказывали неспецифические возбудители и микроорганизмы, ассоциированные с бактериальным вагинозом. Степень тяжести субъективных клинических проявлений более всего была связана с присоединением дрожжеподобных грибов рода *Candida* и многокомпонентных ассоциаций возбудителей.

Тяжесть клинических проявлений, безусловно, зависит от титра мико- и уреаплазм, что убедительно доказывается зависимостью среднего числа лейкоцитов в мазке от концентрации возбудителя, причем для анализа взяты только случаи моноинфекции, что полностью позволяет исключить роль сопутствующих возбудителей. Это касается как видов *Ureaplasm*а, так и *M. hominis*.

Вид *U. urealyticum* с уверенностью можно считать обладающим более значительным патогенным потенциалом, нежели *U. parvum*. Это подтверждается достоверно большим числом лейкоцитов в вагинальном мазке при моноинфекции, вызванной этим видом, а также более частым выявлением этого возбудителя в качестве единственного патогена. *U. parvum* чаще входит в состав полимикробных ассоциаций при бактериальном вагинозе. Высев *U. urealyticum* можно считать прогностически более неблагоприятным также из-за более высокой антибиотикорезистентности в сравнении с *U. parvum*.

Хотя, как указывалось выше, факультативно-анаэробные УПМ во всех случаях присоединения в качестве сопутствующих возбудителей приводили к увеличению тяжести клинических проявлений, самостоятельно вызывают выраженный воспалительный процесс они достаточно редко – примерно у 10–14 % больных. В большинстве случаев их присутствие в вагинальном отделяемом даже в превышающих норму количествах сопровождается слабой или умеренной воспалительной реакцией и умеренно выраженными субъективными жалобами. Это позволяет трактовать эти случаи как дисбиозы с доминированием преимущественно аэробных возбудителей, в отличие от бактериального вагиноза, где на первый план выступают облигатные анаэробы.

Приблизительно в половине случаев дисбиотическим процессам влагалища сопутствует персистенция вирусов в клетках вагинального эпителия. В основном это цитомегаловирус изолированно или в ассоциации с герпесвирусами первого и второго типов. При этом повреждение эпителиального слоя вирусами способствует проявлению патогенного потенциала условно-патогенных микроорганизмов, входящих в состав нормальной микрофлоры влагалища.

Достоверное увеличение выраженности местной воспалительной реакции зарегистрировано в случаях наличия цитомегаловирусной инфекции, и в особенности при выявлении нескольких вирусов одновременно или вирусно-бактериальных ассоциаций.

Ни один из изученных условно-патогенных возбудителей изолированно не обладает достаточным патогенным потенциалом для инициации местного воспалительного процесса, однако в комплексе они способны вызывать клинически выраженные формы инфекции, потенциируя действие друг друга. Увеличение числа ассоциантов закономерно ведет к усугублению тяжести клинических проявлений. Степень компенсированности патологического процесса в значительной мере определяется сохранностью облигатной микрофлоры, при этом титр лактобактерий в вагинальном отделяемом обратно пропорционален количеству участников патологических микробиоценозов.

Воспалительные заболевания верхних отделов женского репродуктивного тракта оказывают существенное влияние на состав вагинальной микрофлоры, вызывая изменения в сторону снижения числа нормальных симбионтов и увеличения количества потенциальных патогенов, что в свою очередь оказывает неблагоприятное влияние на течение основного заболевания. Нарушения состава микрофлоры сопровождаются выраженной местной реакцией с участием гуморальных и клеточных факторов иммунитета. Так, отмечается значительное повышение содержания количества лейкоцитов в вагинальном секрете, уровней лизоцима, лактоферрина, секреторного IgA. При этом наблюдается угнетение клеточного

звена, выражающееся в снижении активности и интенсивности фагоцитоза, причем эти показатели изменяются обратно пропорционально увеличению количества условно-патогенных участников полимикробных ассоциаций. Степень выраженности и характер местной иммунной реакции зависит от вида нарушений вагинального микробиоценоза, наиболее значительные иммунологические сдвиги зафиксированы при сочетанных вариантах инфекционных процессов влагалища.

Воспалительные заболевания придатков матки имеют клинико-лабораторные различия у сексуально-активных подростков и у девочек, не имевших сексуального опыта в сравнении со взрослыми больными. Микроэкологические и иммунологические изменения у подростков, живущих половой жизнью, характеризуются существенно большей выраженностью, разнообразием видового состава возбудителей, что связано с особенностями сексуального поведения данной группы больных, а также с несовершенством систем регуляции и лабильностью вагинальной микроэкосистемы, что требует повышенного внимания к диагностике, лечению и реабилитации пациентов данной группы.

Различные варианты вагинальных дисбактериозов с участием условно-патогенных микроорганизмов различных групп, а также урогенитальных микоплазм широко распространены среди беременных группы высокого риска, что необходимо учитывать при выборе тактики обследования и лечения с целью профилактики послеродовых осложнений, а также инфекций различной локализации у новорожденного.

ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКОПЛАЗМАТОЛОГИЯ

3. МИКОПЛАЗМОЗЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И СВИНЕЙ

3.1. Эпизоотическая ситуация по урогенитальному микоплазмозу крупного рогатого скота и ассоциативным формам его проявления в хозяйствах Омской области

Для изучения эпизоотической ситуации по урогенитальному микоплазмозу крупного рогатого скота и его ассоциативным формам были проведены комплексные обследования хозяйств с применением эпизоотологического, клинического, бактериологического и серологических методов (РНИФ и РНГА).

На основании полученных результатов установлено, что урогенитальный микоплазмоз крупного рогатого скота широко распространен в Омской области (табл. 3.1). Из 34 обследованных на микоплазмоз хозяйств он отсутствовал только в трех, при этом в виде моноинфекции данная болезнь проявлялась лишь в 16 % хозяйств, а в остальных инфекционный процесс носил ассоциативный характер.

Так, наиболее насыщенный микробный пейзаж имел место в колхозе «Россия» Любинского района, там выделяли в тех или иных сочетаниях возбудителей микоплазмоза и 10 сопутствующих инфекций, притом что микоплазмы присутствовали у всех обследованных животных. В другом хозяйстве этого же района – ЗАО имени «Розы Люксембург» микоплазмы выделяли у 75 % коров и телок, при этом ассоциации микоплазм с возбудителями ИРТ-ПВ, хламидиоза, лихорадки Ку (ку-риккетсиоза) встречались в 20 % случаев, ИРТ-ПВ и хламидиоза – в 10 %; микоплазмоз в виде моноинфекции встречался только у 10 % животных.

Высокий процент пораженных микоплазмами животных отмечали в хозяйствах Кормиловского района. Так, в ЗАО «Зна-

мя» и ООО «Молзавод Кормиловский» микоплазмы выявляли у 100 % обследованных коров, в хозяйстве «Агрофирма Кормиловская» – у 90 %, в ООО «Сосновское» и «Ачаирский-1» – по 80 %. В других хозяйствах: ЗАО «Русский хлеб», колхозе имени Карбышева, СПК «Ермолаевское», ЗАО «Алексеевское» – поражено микоплазмами было меньшее количество животных – от 20 до 60 %. В виде моноинфекции микоплазмоз присутствовал только в одном хозяйстве – ЗАО «Русский хлеб», в остальных же хозяйствах наблюдались всевозможные ассоциации микоплазм с сальмонеллами, хламидиями, листериями, лептоспирами, коксиеллами, вирусом ИРТ-ПВ и кокками. Так, в колхозе имени Карбышева у животных обнаружены ассоциации микоплазм с хламидиями в 60 % и с коксиеллами в 10 % случаев.

В ОПХ «Боевое» Иссилькульского района наряду с микоплазмами выделяли у 30 % животных хламидии, у 10 % – вирус ИРТ-ПВ сальмонеллы и кокки, у 5 % – лептоспиры и коксиеллы. У обследованных животных ЗАО «Лесное» и СПК «Украинский» микоплазмы присутствовали в 40 % проб исследуемого материала, при этом в первом хозяйстве микоплазмоз проявлял себя в виде моноинфекции, а во втором носил ассоциативный характер.

Наиболее пестрый микробный пейзаж имел урогенитальный тракт у животных из хозяйств: 1) «Новороссийское», 2) «Заря свободы», 3) «Новорождественское», 4) «Нива», 5) «Цветочное». При этом в первом хозяйстве вместе с микоплазмами выделяли в 20 % случаев хламидии, лептоспиры и листерии, и в 10 % вирус ИРТ-ПВ, сальмонеллы и коксиеллы. Во втором хозяйстве у 10 % коров обнаружили ассоциативную форму проявления микоплазмоза с сальмонеллезом и хламидиозом одновременно, при этом присутствовали практически все исследуемые инфекции, а в третьем – наряду с микоплазмами, хламидиями, вирусом ИРТ-ПВ добавились в различных сочетаниях: коксиеллы, лептоспиры, пастереллы, диплококки, стрептококки и стафилококки. В четвертом хозяйстве вместе с микоплазмами у одних и тех же животных в 10 % случаев регистрировали хламидиоз, пастереллез, стрептококкоз. В пятом хозяйстве выделяли у 10 % живот-

ных из маточно-влагалищного секрета одновременно с микоплазмами следующие ассоциации микроорганизмов: вирус ИРТ-ПВ + лептоспиры + хламидии+ стрептококки. В хозяйстве «Новоазовское» в 20 % регистрировали микоплазмоз с ИРТ-ПВ и в 5 % случаев – в различных сочетаниях с ИРТ-ПВ, диплококкозом, лихорадкой Ку и хламидиозом. В ЗАО «Кам-Курское» у 30 % коров обнаружена хламидиозно-микоплазмозная инфекция, у 8 % – микоплазмо-хламидиозно-сальмонеллезная инфекция, у 4 % – микоплазмо-хламидиозно-диплококковая и микоплазмо-хламидиозно-сальмонеллезно-ИРТ-ПВ инфекции. В ЗАО «Дружба» в микропаразитоценозе урогенитального тракта также были обнаружены ассоциации микоплазм с хламидиями у 40 % и с вирусом ИРТ-ПВ – у 10 % коров и нетелей. В чистом виде микоплазмоз регистрировали в хозяйствах «Колос», «Чистовское», «Рогозинское», а в «Любимовское», «Руспол» и «Береговое» отмечали ассоциации только с хламидиозом (табл. 3.1).

Из проб патологического материала микоплазмы выделялись в ассоциации с другими возбудителями. В органах абортированных плодов из СПК «Новороссийское» микоплазмы обнаруживали в ассоциации с хламидиями, лептоспирами и листериями; в материале из ЗАО имени Кирова к данной бактериальной ассоциации добавились сальмонеллы. Из патологического материала абортированных плодов ЗАО имени Розы Люксембург микоплазмы выделяли в 100 % случаев в ассоциации с листериями, сальмонеллами, хламидиями, пастереллами и вирусом ИРТ-ПВ (табл. 3.2).

На примере результатов исследования материала от коров, принадлежащих СПК «Ачаирский-1», видно, что антигены и антитела к возбудителям инфекций выявляются в различных ассоциациях и сочетаниях в цервико-вагинальной слизи, сыворотке крови и молоке. В цервико-вагинальной слизи у половины обследованных животных микоплазмы выделялись в чистом виде, кроме того, отмечались ассоциации микоплазм с лептоспирами, хламидиями и диплококками, с хламидиями и стафилококками (табл. 3.3).

Таблица 3.1

Ассоциации микроорганизмов при урогенитальном микоплазмозе у коров в хозяйствах Омской области

№ п/п	Хозяйства	К-во гол.	Инфицировано, %										
			сал	пас	хл	пв	ку-лих	леп	лис	дип	стр	ста	мик
1	Россия	75	60	10	24	13	63	32	37	4	10	12	100
2	Им. Р. Люксембург	20	30	-	60	40	25	40	25	15	5	5	75
3	Боевое	180	10	-	30	10	5	5	-	10	8	7	10
4	Лесное	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40
5	Украинский	10	-	-	60	30	50	50	50	-	-	-	40
6	Заря свободы	10	10	20	70	50	20	10	20	10	10	-	20
7	Искра	10	20	-	40	10	-	-	-	10	10	80	-
8	Русский хлеб	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
9	Им. Карбышева	20	-	-	60	-	10	-	-	-	-	-	20
10	Ермолаевское	15	20	-	20	-	30	-	10	-	-	-	46
11	Алексеевское	12	70	30	20	45	30	-	-	10	-	20	60
12	Знамя	12	-	-	17	-	-	-	-	-	-	17	100
13	Ачаирский-1	10	10	-	30	10	10	10	-	10	-	10	80
14	Сосновское	10	90	-	-	-	20	-	10	10	-	-	80
15	Агрофирма Кормиловская	21	38	-	24	-	14	10	5	5	-	5	90
16	Молзавод Кормиловский	10	70	-	40	-	-	40	30	-	-	20	100
17	Колос	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40
18	Нива	10	10	20	60	-	-	10	20	30	40	-	30
19	Большевик	20	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
20	Новороссийское	20	10	-	20	10	10	20	20	-	-	-	100
21	Цветочное	10	-	-	90	50	20	20	-	-	10	-	10
22	Береговое	20	-	-	80	-	-	-	-	-	-	-	100
23	Новоазовское	20	-	-	5	5	5	-	-	5	-	-	25
24	Новорождественское	20	-	30	5	20	5	20	-	15	10	15	10
25.	Дружба	10	-	-	40	10	-	-	-	-	-	-	60
26	Евгащинское	10	-	-	10	10	-	-	-	20	-	-	30
27	Добровольское	12	-	-	67	-	-	-	-	-	-	-	-
28	Руспол	6	-	-	60	-	-	-	-	-	-	-	100
29	Чистовское	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
30	Рагозинское	96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31
31	Любимовское	30	-	-	33	-	-	-	-	-	-	-	33
32	Екатеринославское	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	Кам-Курское	24	8	-	40	4	-	-	-	4	-	-	30
34	Им. Кирова	3	-	-	33	-	-	33	-	-	-	-	100

Примечание: сал – сальмонеллы, пас – пастереллы, хл – хламидии, пв – вирус пустулезного вульвовагинита, ку-лих – коксиеллы, леп – лептоспиры, лис – листерии, дип – диплококки, стр – стрептококки, ста – стафилококки, мик – микоплазмы.

Таблица 3.2

Инфицированность патологического материала от абортированных плодов в РНИФ

№ п/п	Хозяйства	К-во проб	Инфицированно,%							
			сал	пас	хл	пв	ку-лих	леп	лис	мик
1.	Колос	6	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	Русский хлеб	6	-	-	-	-	-	-	-	-
3.	Новороссийское	12	-	-	26	-	-	40	6	83
4.	Им. Кирова	18	22	-	33	-	-	16	22	88
5.	Им. Розы Люксембург	24	55	15	40	50	-	-	75	100

Таблица 3.3

Наличие антигенов возбудителей в цервико-вагинальной слизи коров СПК «Ачаирский-1»

№ п/п	Инфицировано, %												
											Микоплазмы		
	Сальмонеллы	Пастереллы	Хламидии	Вирус-ПВ	Риккетсии (кок-сиеллы) (ку-лихорадка)	Лептоспиры	Листерии	Диплококки	Стрептококки	Стафилококки	M.bovoculi	M.arginini	Ureaplasmasp.
1	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
9	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+
10	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Всего, %:	10	0	30	10	10	10	0	10	0	10	30	50	50

По наличию антител и антигенов в молоке показано, что микоплазмоз проявляется в ассоциации с лихорадкой Ку (коксиеллезом) и сальмонеллезом в 20 % случаев, лептоспирозом и диплококкозом в 10 % (табл. 3.4, 3.5). У 30 % животных в молоке наряду с микоплазмозными выделялись и антитела к возбудителям хламидиоза и коксиеллеза у 20 % и вируса-ПВ и сальмонеллеза – у 10 %.

Таблица 3.4

Наличие антигенов возбудителей инфекционных болезней в молоке и молозиве коров СПК «Ачаирский-1»

№ п/п	Инфицировано, %												
											Микоплазмы		
	Сальмонеллы	Пастереллы	Хламидии	Вирус-ПВ	Коксиеллы (ку-лих.)	Лептоспиры	Листерии	Диплококки	Стрептококки	Стафилококки	M.bovoculi	M.arginini	Ureaplasmasp
1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
7	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Всего, %:	40	0	20	0	40	10	10	10	0	0	10	30	20

Таблица 3.5

Наличие антител против возбудителей инфекционных болезней в молоке и молозиве коров СПК «Ачаирский-1»

№ п/п	Антитела в РНИФ,%										
									Микоплазмоз		
	Сальмонеллез	Пастереллез	Хламидиоз	ПВ	Коксиеллы (ку-лих.)	Лептоспироз	Листериоз	Диплококкоз	M.bovoculi	M.arginini	Ureaplasma sp.
1	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
2	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
4	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+
9	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
10	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Всего, %:	30	0	50	20	20	20	0	0	10	40	40

В сыворотке крови в одном случае микоплазмозные антитела регистрировали в сочетании с хламидиозными, в двух случаях – в сочетании с антителами к возбудителям вульвовагинита и коксиеллеза (табл. 3.6). При этом в 10 % случаев регистрировались антитела к трем видам микоплазм, в 20 % – к двум видам – *M. arginini* и *Ureaplasma sp.* Антигены возбудителей *M. bovoculi* в цервико-вагинальной слизи выделяли у 30 % обследованных коров, а в молоке и молозиве только у 10 %; антитела в секрете вымени присутствовали также у 10 % животных, тогда как антитела в сыворотке крови – у 20 %.

Таблица 3.6

Наличие антител в сыворотке крови коров СПК «Ачаирский-1» против возбудителей инфекционных болезней

№ п/п	Антитела в РНИФ,%										
									микоплазмоз		
	Сальмонеллез	Пастереллез	Хламидиоз	ПВ	Коксиеллы (ку-лих.)	Лептоспироз	Листериоз	Диплококкоз	M.bovoculi	M.arginini	Ureaplasma sp.
1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
3	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
7	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Всего, %:	30	0	20	20	20	0	0	0	20	40	50

Наличие антигенов *M. arginini* в цервико-вагинальной слизи обнаружено в половине проб, в молоке – 30 %; антитела в молоке выявлены в 40 % проб, в сыворотке крови также в 40 % проб, но от других животных. Уреаплазмозные антигены выявляли в слизи и молоке в 50 и 20 % случаях соответственно, и антитела в молоке в 40 %,а в сыворотке крови в половине проб.

Из всех исследованных проб как антигены, так и антитела к микоплазмозу отсутствовали только у одного животного.

В ЗАО «Знамя» микоплазмоз по суммарной совокупности всех исследований выявляли в 100 % случаев. При этом в цервико-вагинальной слизи *M. bovoculi* выделяли у всех обследованных животных *M. arginini* у 50 %, а уреаплазмы – у 59 %. Все три вида микоплазм присутствовали у 33 % коров. Регистрировали ассоциации микоплазм со стафилококками и хламидиями в 17 % случаев (табл. 3.7).

Таблица 3.7

Наличие антигенов возбудителей инфекционных болезней в цервико-вагинальной слизи коров ЗАО «Знамя»

№ п/п	Инфицировано, %											
										Микоплазмоз		
	Сальмонеллы	Хламидии	Вирус- ПВ	Коксиеллы (ку-лих.)	Лептоспиры	Листерии	Диплококки	Стрептококки	Стафилококки	M.bovoculi	M.arginini	Ureaplasma sp.
1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
7	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
9	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Всего, %:	0	17	0	0	0	0	0	0	17	100	50	59

В молоке встречались ассоциации микоплазм с возбудителями хламидиоза в 33 % случаев, с возбудителями сальмонеллеза – в 17 %; в 10 % – микоплазмы, хламидии и стафилококки; в 10 % проб – микоплазмы, хламидии, стрептококки, и только хламидиозные антитела (табл. 3.8, 3.9).

Таблица 3.8

Наличие антигенов возбудителей инфекционных болезней в молоке и молозиве коров ЗАО «Знамя»

№ п/п	Инфицировано, %											
										Микоплазмоз		
	Сальмонеллы	Хламидии	Вирус- ПВ	Коксиеллы (ку-лих.)	Лептоспиры	Листерии	Диплококки	Стрептококки	Стафилококки	M.bovoculi	M.arginini	Ureaplasma sp.
1	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
5	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Всего, %:	17	33	0	0	0	0	0	8	8	50	33	17

В сыворотке крови микоплазмозные антитела присутствовали у 67 % животных, при этом у одного животного кроме микоплазмозных были выявлены сальмонеллезные, хламидиозные и ИРТ-ПВ антитела (табл. 3.10).

Таким образом, результаты исследований показывают, что у одних и тех же животных не всегда наличие антител в молоке и сыворотке крови соответствует присутствию антигенов возбудителей в цервико-вагинальной слизи и молоке, поэтому для более полной картины инфекционного процесса, изучению патогенеза и определения сроков возникновения заболеваний следует проводить комплексные обследования животных.

Таблица 3.9

Наличие антител против антигенов возбудителей инфекционных болезней в молоке и молозиве коров ЗАО «Знамя»

№ п/п	Антитела в РНИФ,%								
	Сальмонелллез	Хламидиоз	ПВ	Ку-лихорадка	Лептоспироз	Листериоз	Микоплазмоз		
							M.bovoculi	M.arginini	Ureaplasma
1	-	+	-	-	-	-	+	-	-
2	-	-	-	-	-	-	+	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	+	-	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	+	-	-
8	-	-	-	-	-	-	+	+	+
9	-	+	-	-	-	-	+	+	-
10	-	-	-	-	-	-	+	+	+
11	-	-	-	-	-	-	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Всего, %:	0	17	0	0	0	0	67	50	42

Таблица 3.10

Наличие антител против антигенов возбудителей инфекционных болезней в сыворотках крови коров ЗАО «Знамя»

№ п/п	Антитела в РНИФ,%								
	Сальмонеллез	Хламидиоз	ПВ	Коксиеллез (ку-лих.)	Лептоспироз	Листериоз	Микоплазмоз		
							M.bovoculi	M.arginini	Ureaplasma sp.
1	-	+	-	-	-	-	-	+	-
2	-	-	-	-	-	-	+	+	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	+	-	-
5	-	-	-	-	-	-	+	+	-
6	-	-	-	-	-	-	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	+	+	-
8	-	-	-	-	-	-	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-	+	+	-
10	-	-	-	-	-	-	+	+	+
11	+	+	+	-	-	-	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Всего, %:	8	8	8	0	0	0	67	67	42

3.2. Микробиологические методы диагностики урогенитального микоплазмоза

3.2.1. Индикация и идентификация микоплазм на питательных средах

Для выделения микоплазм бактериологическим методом на питательных средах исследовали цервико-вагинальные смывы и соскобы слизи от беременных и отелившихся коров родильно-профилакторного периода; сперму и препуциальные смывы быков; патологический материал от абортированных плодов. Использовали жидкие и плотные элективные питательные среды для индикации и идентификации микоплазм.

Посевы на жидких средах инкубировали в течение трех суток, учет роста проводили визуально по изменению цвета среды. Микоплазмы в процессе жизнедеятельности ферментируют глюкозу, аргинин или гидролизируют мочевину, в результате изменяется pH среды, о чем свидетельствует изменение цвета входящего в него индикатора. Среды также содержат ингибиторы, которые губительно действуют на сопутствующую микрофлору.

С целью более глубокого изучения культуральных свойств микоплазм выросшие на селективных индикаторных средах (изменившие их цвет) культуры пересевали на аналогичные плотные диагностические среды с содержанием 1,3 % агара Дифко. Для этого 0,1 мл бульонной культуры микоплазм вносили пастеровской пипеткой или стерильным одноразовым шприцем на поверхность агара без штриховки и подсушивали при комнатной температуре. Посевы инкубировали в термостате при Т 37–38 ^{0}С в течение 5 дней. Чашки просматривали под малым увеличением микроскопа (45–70 раз). Микоплазмы на плотной среде росли в виде круглых, не сливающихся друг с другом колоний с врастающим в агар центром и нежной поверхностной периферией (рис. 3.1). Также отмечали мелкие зернистые колонии без особо выраженной центральной зоны. У старых колоний центр уплотняется, становится более темным, зернистость усиливается. При

обнаружении типичных колоний их вместе с агаровым блоком отсевали на жидкие элективные питательные среды с соответствующей ферментативной активностью. Если рост отсутствовал, то проводили 3–5 последовательных «слепых» пассажей, если в течение этого периода индикаторная среда не изменяла цвет, фиксировали гибель микоплазм при пересевах.

При подозрении на L-формы бактерий проводили 3–5 последовательных пассажей выделенных культур, с трехсуточным интервалом для восстановления исходных форм бактерий.

Для пассирования культур микоплазм с жидкой среды на жидкую 0,1 мл бульонной культуры переносили в 2 мл свежей бульонной среды с соответствующим субстратом ферментативной активности. Пробирки с посевами инкубировали в термостате при Т 37 ^{0}С в течение трех суток или до изменения цвета среды. При пересеве с жидкой на плотную (1,3 % агара) 0,1 мл бульонной культуры микоплазм вносили пастеровской или химической пипеткой на агаровую среду. Посевы инкубировали в термостате при 37 ^{0}С в течение 5 дней.

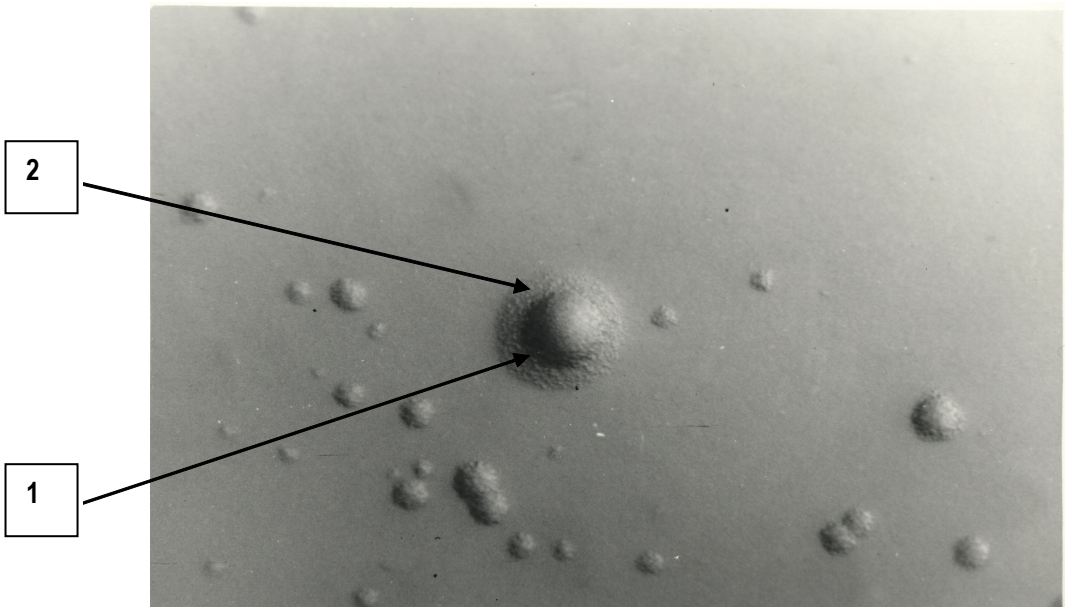


Рис. 3.1. Колонии микоплазм:
1 – вросший в агар центр колонии; 2 – периферийная зона роста, х100 раз

С агаровой среды на агаровую среду бактериологической петлей вырезали агаровый блок с колонией микоплазм и переносили его стороной с колониями на поверхность свежей агаровой среды. Не нарушая целостности среды, обрабатывали им всю поверхность свежего агара. Посевы инкубировали в термостате при 37 ^{0}С в течение 5 дней.

С агаровой среды на жидкую бактериологической петлей вырезали агаровый блок, содержащий микоплазмозные колонии и переносили его в жидкую среду.

На жидких средах учитывали изменение цвета, прозрачность, наличие небольшого мутного или хлопьевидного осадка.

На плотных средах учитывали скорость роста колоний, их форму. Быстрота роста и образования типичных колоний зависели от особенностей выделенной культуры, количества микробных клеток и от адаптированности к среде, на которую ее пересевали. Так, некоторые культуры лучше росли на жидких питательных средах, чем на плотных, и наоборот.

3.2.2. Основные биологические свойства микоплазм

Морфологические свойства. Для изучения тинкториальных и морфологических свойств микоплазм из капли 72-часовой бульонной культуры микоплазм готовили мазки, высушивали на воздухе, фиксировали метиловым спиртом или ацетоном в течение 5 мин и окрашивали неразведенной краской Романовского-Гимзе в течение часа при температуре 37 ^{0}С. Мазок промывали и просматривали под иммерсионной системой микроскопа – культуры преимущественно кокко-овоидно-перстневидной формы размером 0,3–0,5 мкм фиолетового оттенка. Также встречались и фиолетовые шары размером 3–6 мкм, образования синего цвета величиной 2–6 мкм, единичные палочки, скопления зернистой и гомогенной массы с синеватым оттенком, в которые заключены микроструктурные элементы.

Биохимические свойства. При выделении микоплазм на жидких элективных диагностических питательных средах произ-

водили дифференциацию по главным биохимическим признакам – разложению глюкозы, аргинина, мочевины. Для видовой индикации микоплазм по ключу Gourlay and Howard, 1979, брали по две культуры микоплазм из каждого обследованного хозяйства и определяли их протеолитическую активность, редукцию тетразоля, потребность в холестерине, дигитонинчувствительность и рост при температуре 22 ^{0}С.

Способность редуцировать 0,5 %-ный водный раствор 2, 3, 5-трифенилтетразолхлорида (тетразоль) определяли на жидких средах, добавляя его в трехсуточную культуру микоплазм. Результаты проб учитывали в течение 7–10 дней инкубации в термостате при 37 ^{0}С, окрашивание среды в красный цвет означает положительную реакцию.

По основным свойствам выделенные микоплазмы от крупного рогатого скота в хозяйствах Омской области были отнесены к трем видам *M. bovoculi*, *M. arginini* и *Ureaplasma sp.* (табл. 3.11)

Таблица 3.11

Основные свойства микоплазм, выделенных у крупного рогатого скота

Род и вид	Г	А	У	Пленка и пятна	Редукция тетразоля	Потребность в холестерине	Дигитонинчувствительность	Протеолитическая активность	Рост при 22 ^{0} С
M. bovoculi	+	-	-	-	+	+	+	+	-
M. arginini	-	+	-	-	-	+	+	+	-
Ureaplasma sp.	-	-	+	-	-	+	+	+	-

Примечание: Г – ферментация глюкозы, А – гидролиз аргинина, У – уреазная активность.

Ультраструктура микоплазм. Для электронно-микроскопического исследования использовали взвеси микоплазмозных культур, фиксированных в смеси глутарового и параформальдегидного растворов. После промывки их в фосфатном буфере и дополнительной фиксации в 1 %-ном растворе четырехокиси осмия, обезвоживали в спиртах восходящей крепости и ацетоне. Приготовленный материал заключали в аралдит. Уль-

тратонкие срезы готовили на ультратоме УМТП–4. После контрастирования срезы исследовали в электронном микроскопе ЭМ–125. При просмотре срезов обращали внимание на форму микоплазм, которая обычно была округлая, овальная, вытянутая, иногда в виде ракетки (рис. 3.2–3.5).

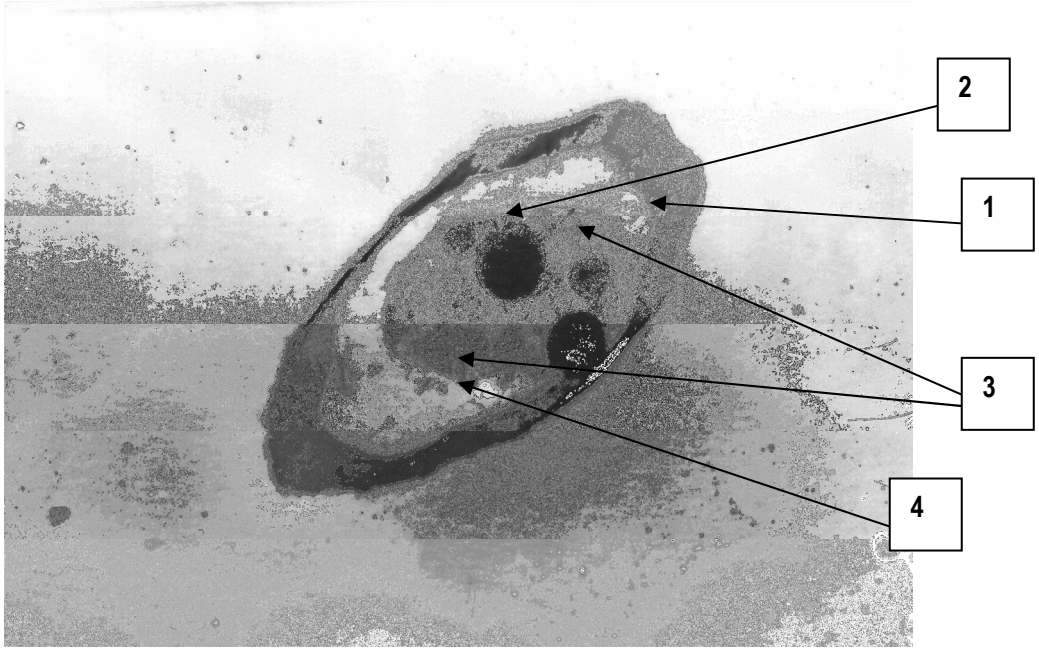


Рис. 3.2. Ультраструктурное строение микоплазмозной клетки. Ув. х 20 000 раз: 1 – трехслойная мембрана; 2 – нуклеоид; 3 – рибосомы и полисомы; 4 – вакуоль

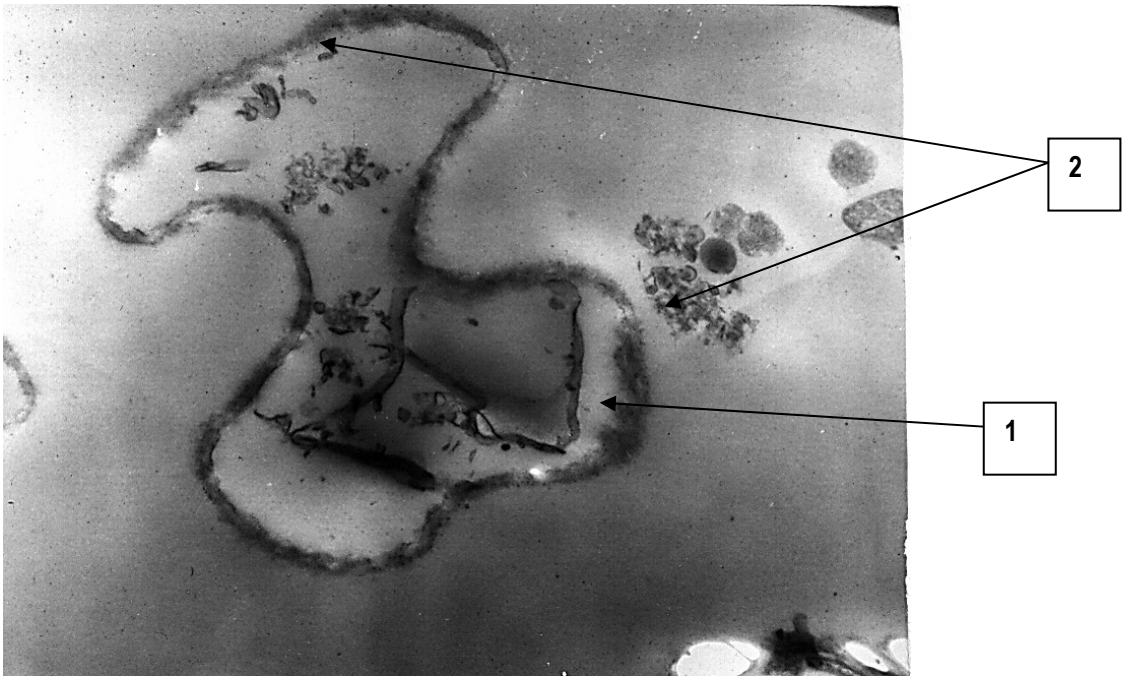


Рис. 3.3. Деление микоплазмозной клетки. Ув. х20000 раз: 1 – трехслойная мембрана; 2 – ядерный материал

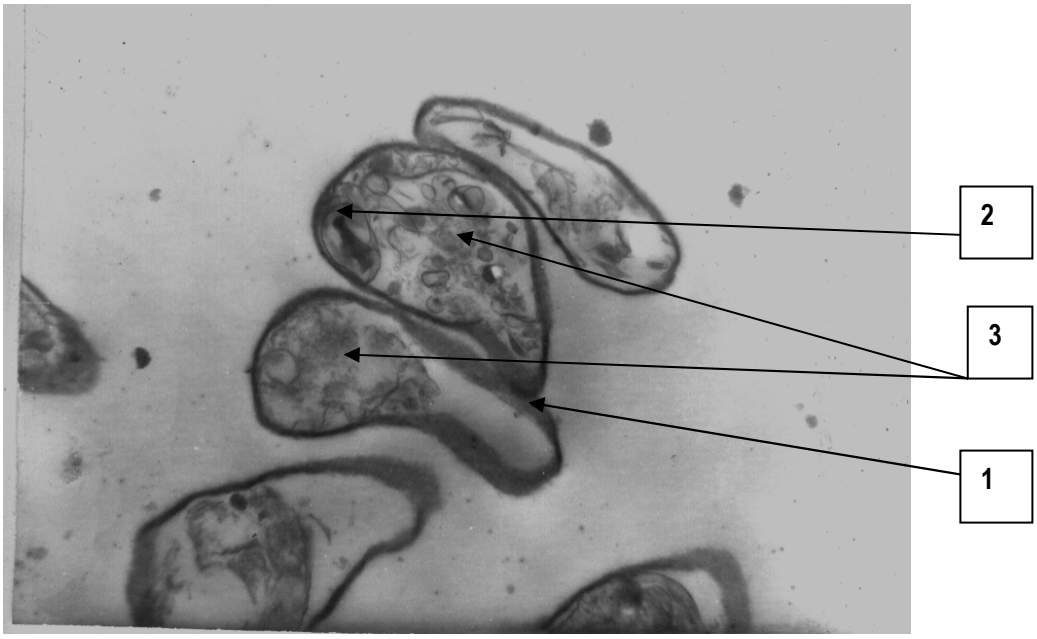


Рис. 3.4. Полиморфизм микоплазм. Ув. х 20000раз:
1 – трехслойная мембрана; 2 – нуклеоид; 3 – рибосомы и полисомы

Рис. 3.5. Ультраструктура уреаплазм. Ув. х20000 раз:
1 – трехслойная мембрана; 2 – нуклеоид; 3 – рибосомы и полисомы

Патогенные свойства. На лабораторных животных (белые мыши) изучали патогенность штаммов микоплазм, выделенных от крупного рогатого скота. В опыте для изучения патогенности микоплазм использовали полевые штаммы *M. bovoculi,*

M. arginini, Ureaplasma sp., выделенные от крупного рогатого скота в Омской области.

Микоплазмозный антиген готовили из трехсуточных культур, сконцентрированных в 100 раз, путем центрифугирования в рефрижераторе при 6000 q и трехкратного ресуспендирования в 0,85 %-ном растворе натрия хлорида. Мазки из патологического материала окрашивали по Граму и Романовскому-Гимзе. Для бактериологического исследования использовали три специальные диагностические жидкие и плотные питательные среды для индикации аргининглюкозоферментирующих микоплазм и уреаплазм.

Для проведения опыта использовали белых мышей массой по 20 грамм, которых разделили на 4 группы: три опытных и одна контрольная – интактная, по пять голов в каждой группе. Антиген в объеме 0,5 мл вводили внутрибрюшинно, однократно. Кожу нижней части живота протирали 70-градусным спиртом, иглу вводили не слишком глубоко и под углом не более 45^0, чтобы прокол кишечника был исключен.

На второй день после заражения наступила гибель четырех мышей, зараженных *M. bovoculi*, пятая мышь погибла на четвертый день. Две мыши, зараженные *M. arginini*, погибли на четвертый день и три – на седьмой. Одна из зараженных уреаплазмами мышей погибла на седьмой день, оставшиеся же в живых четыре мыши были девитализированы на десятые сутки, как и мыши контрольной группы. В результате лабораторных исследований было обнаружено присутствие микоплазм во всех органах (табл. 3.12). У контрольной группы микоплазмы не были выделены.

Таблица 3.12

Инфицированность органов при экспериментальном микоплазмозе мышей

№ п/п	Группы животных	Выделено микоплазм, %				
		Печ.	Поч.	Лег.	Сел.	Пол. органы
1	*M. bovoculi*	100	100	100	100	100
2	*M. arginini*	75	100	100	100	100
3	*Ureaplasma sp.*	100	100	100	100	100
4	контрольная	-	-	-	-	-

Примечание: печ. — печень; поч. – почки; лег.- легкие; сел. – селезенка; пол. органы – половые органы.

По результатам проведенного нами опыта видно, что микоплазмы обладают высокой патогенностью. При этом инфицированность органов, за исключением *M. arginini*, составила 100 %. Летальность при заражении *M. bovoculi* и *M. arginini* – 100 %, а *Ureaplasma sp.* – 20 %.

3.3. Серологические методы диагностики урогенитального микоплазмоза

3.3.1. Получение микоплазмозных антигенов и диагностических кроличьих сывороток для РНИФ

Целью исследования являлось получение активных гипериммунных кроличьих сывороток против полевых штаммов микоплазм, выделенных от крупного рогатого скота, и антигенов для реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ).

После изучения основных биологических свойств и определения видовой принадлежности микоплазм их использовали для изготовления антигенов для РНИФ. Антигены готовили из трехсуточных убитых культур, которые отмывали от питательной среды путем центрифугирования при 6000 g 30 мин, осадок после трехкратного ресуспензирования и последующего центрифугирования разводили до концентрации 1,7 млрд микробных клеток в 1мл по бактериальному стандарту мутности (ГИСК им. Л.А. Тарасевича). Гипериммунизацию проводили на 6 кроликах (по 2 головы на каждый штамм) весом 2,5–3 кг, живыми культурами микоплазм в суммарной дозе 19,55 млрд м.т. (табл. 3.13).

Таблица 3.13

Схема гипериммунизации кроликов культурами микоплазм

Время введения, сут.	1	4	7	10	13	16	20	24
Доза антигена, млрд м.т /мл	0,85	1,7	1,7	1,7	3,4	3,4	3,4	3,4
Левамизол, мл	1	1	-	-	-	-	-	-

При постановке РНИФ была использована следующая методика. На тщательно обезжиренные без царапин предметные стекла наносили пастеровской пипеткой параллельно друг другу несколько капель антигенов, в качестве которых применяли 1,7 млрд взвеси микоплазм, инактивированных на водяной бане при 70 ^{0}С в течение 30 минут. Антигены высушивали и фиксировали над пламенем спиртовки. Затем на каждую каплю антигена наносили такую же каплю микоплазмозной сыворотки, начиная с последнего разведения. Стекла выдерживали во влажной камере при 37–38 ^{0}С, в течение 50–60 минут для образования комплекса антиген – антитело. После чего их промывали от не связавшихся антител дистиллированной водой, подсушивали и наносили в красящем титре ослиный антикроличий глобулин, меченый ФИТЦ (флуоресцеина изотиоционатом натрия), изготовленный НИИЭМ имени Н. Ф. Гамалеи. Затем стекла помещали на 15–20 минут во влажную камеру при температуре 37–38 ^{0}С. По истечении этого времени мазки промывали дистиллированной водой, просушивали и просматривали в люминесцентном микроскопе с обязательными контролями:

1. Антиген + сыворотка положительная + сыворотка люминесцентная;
2. Антиген + сыворотка отрицательная + сыворотка люминесцентная;
3. Антиген + физиологический раствор + сыворотка люминесцентная.

Микроскопию проводили в падающем свете микроскопа ЛЮМАМ Р-8.

Для оценки интенсивности свечения использовали четырехкрестовую систему:

++++ – очень яркая люминесценция по периферии микробной клетки, четко контрастирующая с телом клетки;

+++ – яркая люминесцирующая периферия клетки;

++ или + – слабое свечение периферии клетки;

– (минус) люминесценция клеток отсутствует.

За положительный результат принимали яркое специфическое свечение контуров микробов в виде ободков с оценкой в 3 и 4 креста; сомнительные результаты оценивали в 2 креста при наличии слабого свечения контуров клеток. Динамику синтеза

антител изучали на 7, 14, 21 и 30-е сутки после гипериммунизации в реакции непрямой иммунофлюоресценции, которую ставили на предметных стеклах по стандартной методике, учет реакции проводили в крестах, свечение менее чем на два креста считали отрицательным (рис. 3.6).

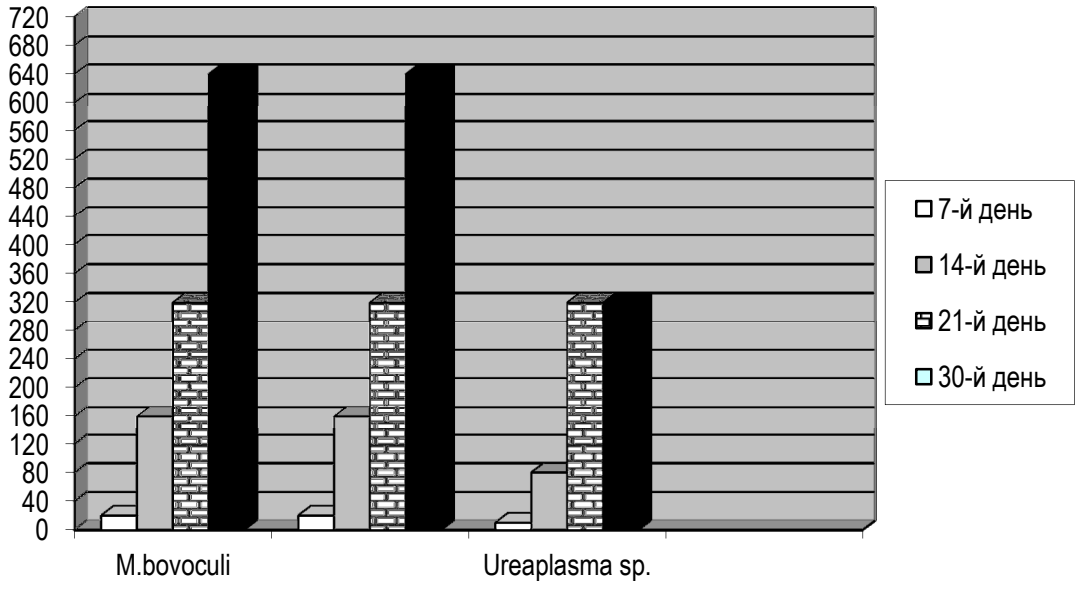


Рис. 3.6. Динамика синтеза антител у кроликов, гипериммунизированных культурами микоплазм

Установлено, что на седьмой день после иммунизации антитела в РНИФ выявлялись в низких титрах 1:10 – 1:20. На четырнадцатый день положительная реакция была при более высоких разведениях в пределах с 1:80 до 1:60 на все вводимые антигены, а на 21–30-е сутки синтез люминесцирующих антител достиг максимального уровня 1:320 – 1:640.

3.3.2. Специфичность и активность сывороток и антигенов в РНИФ

Для изучения видовой специфичности и активности применяли кроличьи антимикоплазменные сыворотки в разведениях 1:5, 1:10, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 и антигены, полученные вышеописанным способом. Для изучения специфичности микоплазменных антигенов в РНИФ использовали антимикоплазмен-

ные сыворотки в разведении 1:10, а также сыворотки против бруцеллеза, лептоспироза, пустулезного вульвовагинита (ПВ), сальмонеллеза и коксиеллеза. Определяя видовую специфичность и активность полученных микоплазмозменных кроличьих сывороток в РНИФ, установили, что полученные сыворотки реагируют только с гомологичными антигенами (табл. 3.14).

Таблица 3.14

Видовая специфичность и активность полученных микоплазмозных кроличьих сывороток в РНИФ

Антигены	Сыворотки																	
	Г						А						У					
	1/5	1/10	1/40	1/160	1/320	1/640	1/5	1/10	1/40	1/160	1/320	1/640	1/5	1/10	1/40	1/160	1/320	1/640
M. bovoculi	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M. arginini	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Ureaplasma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Примечание: сыворотки против Г – глюкозоферментирующих *M. bovoculi*, А – аргининферментирующих *M. arginini* и У – *Ureaplasma*sp.

При определении специфичности микоплазменных антигенов с сыворотками против бруцеллеза, лептоспироза, листериоза, ПВ и коксиеллеза РНИФ была отрицательная. Положительная же реакция отмечалась только с аналогичными кроличьими антисыворотками (табл. 3.15).

Таблица 3.15

Специфичность микоплазменных антигенов в РНИФ

Антигены	Сыворотки против							
	бруцеллеза	лепто-спироза	листе-риоза	ПВ	лих. Ку	Г 1/10	А 1/10	У 1/10
M. bovoculi	-	-	-	-	-	+	-	-
M. arginini	-	-	-	-	-	-	+	-
Ureaplasma sp.	-	-	-	-	-	-	-	+

3.3.3.Диагностическая ценность бактериологического и серологического (РНИФ) методов диагностики в производственных условиях

При сравнительном анализе чувствительности бактериологического и серологического методов исследовали патологический

материал от абортированных плодов; цервико-вагинальные смывы, сыворотку крови и молоко от коров из четырех хозяйств Омской области. Посевы делали на жидкие и твердые элективные питательные среды для индикации микоплазм. Применяли бактериологический метод исследования – микроскопию мазков, посевы на элективные питательные среды и серологический метод – РНИФ с полученными нами сыворотками и антигенами.

В патологическом материале от абортированных плодов из ЗАО имени Кирова и СПК «Новороссийское» были выявлены: в обоих хозяйствах глюкозоферментирующие микоплазмы на питательных средах в 33 % случаев, а в РНИФ в 88 % проб в одном и в 83 % в другом; аргининферментирующие микоплазмы выделили на средах из 88 и 83 % проб, в РНИФ из 77 и 67 % соответственно; уреаплазмы на питательных средах не выросли, тогда, как в РНИФ их антигены зарегистрировали в 77 % пробах из первого хозяйства и в 50 % – из второго. В материале ЗАО имени Розы Люксембург глюкозоферментирующие микоплазмы на питательных средах были выделены из 15 % органов, тогда как в РНИФ прореагировало 35 % проб; присутствие аргининферментирующих микоплазм в 90 % проб и уреаплазм в 100 % подтвердилось и бактериологическим, и серологическим методами (табл. 3.16).

Таблица 3.16

Чувствительность РНИФ в сравнении с бактериологическим методом исследования патологического материала от абортированных плодов

Хозяйства	На средах, %			В РНИФ, %		
	Г	А	У	Г	А	У
Им. Кирова	33	88	0	88	77	77
«Новороссийское»	33	83	0	83	67	50
Им. Розы Люксембург	15	90	100	35	90	100

Для сравнения чувствительности РНИФ и бактериологического метода исследовали цервико-вагинальную слизь от коров из трех хозяйств: ОПХ «Боевое», ЗАО имени Кирова и СПК «Новороссийское». Глю-козоферментирующие микоплазмы на питательных средах выявляли в пределах от 19 до 35 %, в РНИФ – 50–70 %. Количество выде-

ленных на питательных средах *M. arginini* – 5–55 %, в РНИФ оно выше – 26–82,5 %. Уреаплазмы были выделены на питательных средах в 30–88 % пробах исследуемого материала, а в РНИФ несколько меньше – в 12,5–63 % случаев (табл. 3.17).

Таблица 3.17

Чувствительность РНИФ и бактериологического метода исследования цервико-вагинальной слизи коров

Хозяйства	Кол-во голов	На питательных средах, %			РНИФ		
		Г	А	У	Г	А	У
ОПХ «Боевое»	160	23	5	50	53	26	51
ЗАО имени Кирова	48	19	31	88	50	56	63
СПК «Новороссийское»	40	35	55	30	70	82,5	12,5

Для сравнения чувствительности РНИФ с сывороткой крови и бактериологического метода исследовали биоматериал из совхоза «Россия» и ОПХ «Боевое». В цервико-вагинальной слизи от коров совхоза «Россия» на питательных средах отмечали рост *M. bovoculi* и *M. arginini* в 20 % случаев, уреаплазм – в 80 %, в сыворотке крови от этих же животных были выявлены антитела к *M. bovoculi* и *M. arginini* также в 20 % случаев, а уреаплазм в 60 %. У коров из ОПХ «Боевое» на питательных средах было выделено глюкозоферментирующих микоплазм 61,5 %, аргининферментирующих 38 % и уреаплазм – 15 %, а в РНИФ положительно прореагировало 58, 73 и 69 % соответственно (табл. 3.18).

Таблица 3.18

Определение чувствительности микоплазменных антигенов в РНИФ с сывороткой крови в сравнении с бактериологическим методом

Хозяйства	Кол-во голов	На питательных средах, %			РНИФ, %		
		Г	А	У	Г	А	У
С-з «Россия»	20	20	20	80	20	20	60
ОПХ «Боевое»	26	61,5	38	15	58	73	69

Примечание: антигены Г – глюкозоферментирующих *M. bovoculi*, А – аргининферментирующих *M. arginini*, У – *Ureaplasma sp.*

По некоторым данным возбудители микоплазмоза крупного рогатого скота могут присутствовать в секрете вымени. Кроме того, под действием антигенов микоплазм здесь могут синтезироваться и «местные», локальные антитела. В связи с этим было

проведено исследование в РНИФ молока от 26 коров, принадлежащих ОПХ «Боевое», с микоплазменными антигенами и сыворотками. Антигены *M. bovoculi* в молоке выявлялись у 50 % животных, антитела присутствовали у большего количества коров – 61 %; антигены *M. arginini* – у 65 %, а аналогичные антитела у 61%; уреаплазмозные антигены – у 54 % животных, антитела были выявлены у 69 % животных. Антигены и антитела *M. bovoculi* были обнаружены у 35 % животных, *M. arginini* – у 42 %, и уреаплазмозные – у 50 %.

Таким образом, результаты исследований подтверждают, что полученные нами микоплазменные антигены и кроличьи микоплазменные сыворотки активны и специфичны в РНИФ, а данная реакция не уступает по чувствительности бактериологическому методу исследования, а в некоторых случаях даже превосходит его. С помощью РНИФ можно изучать патогенез данного заболевания и проводить прижизненные методы исследования, индикацию и идентификацию выделенных микоплазм по их антигенной структуре. Также можно исследовать секрет вымени на наличие микоплазменных антител и антигенов, что дает преимущество данного метода перед бактериологическим с использованием индикаторных питательных сред, который исключает такую возможность. Комплексное применение бактериологических и серологических исследований позволит своевременно выявлять как больных, так и микоплазмоносителей и проводить лечебно-профилактические мероприятия при данной инфекционной болезни.

3.3.4. Получение эритроцитарного диагностикума для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА)

В качестве клеточной основы для приготовления диагностикума были выбраны эритроциты барана, а для стабилизации 20 %-ный формальдегид. При формалинизации эритроцитов использовали свежую дефибринированную кровь барана-донора, которую разводили 1:1 буферным физраствором pH-7,2 (0,137 М NaCl, 0,001 М двузамещенный фосфорно-кислый К на 1 л дистиллированной воды). Фиксацию эритроцитов проводили по методу Фили в модификации Красикова А.П. (1996), которая за-

ключалась в более щадящем способе воздействия формалина на эритроциты и одновременно обеспечивала хорошую их фиксацию. Для чего, к 100 мл разведенной крови формалин добавлялся к эритроцитам не сразу, а порциями в возрастающих объемах, через определенный промежуток времени до приобретения ею темно-коричневого цвета. Взвесь эритроцитов четырехкратно отмывали фосфатно-буферным раствором pH-7,2, путем центрифугирования при 3000 g 2–5 минут и ресуспендировали в 400 мл того же буфера. Из осадка готовили 10 % рабочую взвесь на буферном физрастворе, содержащем 0,3 % двадцатипроцентного формальдегида. При данном способе фиксации эритроциты сохраняют свои сорбционные свойства в течение 5 лет.

Антиген готовили из трехсуточных убитых культур *M. bovoculi, M. argenini* и *Ureaplasma sp*., которые отмывали от питательной среды путем центрифугирования при 6000 g 30 мин, осадки трех культур после трехкратного ресуспензирования и последующего центрифугирования смешивали в равных количествах и разводили 1:10 физраствором. Для нагрузки формалинизированных 3 % эритроцитов их сенсибилизировали смесью трех убитых антигенов микоплазм в соотношении 2:1 (2V антигена : 1V эритроцитов) по разработанной авторской методике. Для контроля пригодности полученного эритроцитарного диагностикума проводили постановку РНГА. Реакцию ставили макрометодом в обьеме 0,5 мл в полистироловых пластинках, с микоплазменными (Г, А, У – сыворотками) и смешанной (Г +А + У) микоплазменными сыворотками в разведениях 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320. В качестве разбавителя применяли фосфатный буфер pH-6,4. В качестве контроля использовали фосфатный буферный раствор и отрицательную сыворотку. С микоплазменными сыворотками по отдельности и со смешенной против трех видов микоплазм сывороткой полученный диагностикум реагировал на три креста до разведения 1:80, на два креста 1:160. С отрицательной сывороткой сомнительная реакция на два креста отмечалась в первом разведении. В контроле с буферным раствором отрицательная реакция наблюдалась во всех разведениях. При изучении специфичности трех серий по-

лученных микоплазменных эритроцитарных диагностикумов (МЭД) установлено, что только в титре 1:10 МЭД в РНГА вызывал перекрестные реакции с бруцеллезной, лептоспирозной, сальмонеллезной и хламидиозной сыворотками, тогда как в последующих разведениях РНГА была отрицательной при четко выраженных положительных реакциях с гомологичными микоплазменными сыворотками (табл. 3.19, 3.20).

Таблица 3.19

Активность микоплазменных эритроцитарных диагностикумов (МЭД) в РНГА

Титр. сывор.	Микоплазмозные сыворотки			Г+А+У- сыворотка	Негативная сыворотка	ФБР
	Г	А	У			
1:10	++++	++++	++++	++++	++	-
1:20	++++	++++	++++	++++	-	-
1:40	++++	++++	++++	++++	-	-
1:80	++	++	++	+++	-	-
1:160	+	-	-	++	-	-
1:320	-	-	-	-	-	-

Таблица 3.20

Специфичность МЭД в РНГА

МЕД	Сыворотки						Г	А	У
	Бруц.	Лепт.	Лист.	ПВ	Сальм.	Хлам.	1/20	1/20	1/20
С-1	-	-	-	-	-	-	++++	++++	++++
С-2	-	-	-	-	-	-	++++	++++	++++
С-3	-	-	-	-	-	-	++++	++++	++++

Примечание: бруц. – бруцеллез; лепт. – лептоспироз; лист. – листериоз; ПВ – пустулезный вульвовагинит; сальм. – сальмонеллез; хлам. – хламидиоз; Г – глюкозоферментирующие *M. bovoculi*, А – аргининферментирующие *M. arginini* , У – *Ureaplasma sp*.

Таким образом, полученный нами эритроцитарный диагностикум (патент на изобретение № 2342155) можно использовать для диагностики урогенитального микоплазмоза крупного рогатого скота. При этом за диагностический титр в РНГА необходимо принимать разведение испытуемой сыворотки 1:20.

3.4. Средства и методы лечения животных репродуктивного стада при ассоциативном урогенитальном микоплазмозе

3.4.1. Чувствительность полевых культур микоплазм к антибактериальным препаратам *in vitro*

Для подбора наиболее эффективных препаратов для лечения животных при урогенитальном микоплазмозе определяли чувствительность полевых культур микоплазм к антибактериальным препаратам методом серийных разведений.

Для этого использовали культуры микоплазм, выделенных в хозяйствах Омской области. Предварительно перед этим устанавливали титр культур в цветообразующих единицах (ЦОЕ). Для постановки реакции использовали культуры микоплазм с титром, равным 10 тыс. ЦОЕ/мл. Чувствительность определяли по отсутствию роста на жидких питательных средах с добавлением антибиотиков, в контрольные среды антибиотик не добавляли (табл. 3.21).

Таблица 3.21

Чувствительность культур микоплазм к антибактериальным препаратам

Препараты	Чувствительность, %		
	M. bovoculi (n=30)	*M. arginini* (n=30)	*Ureaplasmasp.* (n=30)
Тетрациклин	97	90	83
Ципрофлоксацин	97	63	67
Норфлоксацин	90	53	40
Левомицетин	67	37	16
Эритромицин	40	10	10
Сульфадимезин	33	50	0
Тилозина-тартрат	0	20	63
Триметоприм	40	16	0
Тетра-триметосул	16	10	10
Тиланик	0	27	0
Бензилпенициллин	0	0	0
Контроль	-	-	-

Наиболее высокая чувствительность культур микоплазм к тетрациклину – 83–97 %, ципрофлоксацину – 63–90 % и норфлоксацину от 40 до 90 %. Около половины исследуемых культур не выросло на средах с левомицетином. Менее чувствительны данные культуры микоплазм к эритромицину, сульфадимезину, тиланику, тилозину, триметаприму и тетра-триметосулу. Совсем не чувствительны – к бензилпенициллину.

Чувствительность разных культур микоплазм к тем или иным препаратам была не одинакова: к тилозину тартрату чувствительны 63 % культур уреаплазм, 20 % – *M. arginini* и не чувствительны – *M. bovoculi*; к триметаприму чувствительны 40 % культур *M. bovoculi*, 16 % – *M. arginini* и нечувствительны уреаплазмы; тиланик действовал только на *M. arginini*. Культуры микоплазм более чувствительны к антибактериальным препаратам, чем уреаплазмы.

На основании результатов проведенных исследований видно, что наибольшей активностью in vitro в отношении культур, выделенных из урогенитального тракта крупного рогатого скота, обладал тетрациклин и препараты фторхинолонового ряда (ципрофлоксацин, норфлоксацин).

3.4.2. Схемы лечения и лабораторные методы контроля их эффективности

Действие различных схем лечения изучили на 75 коровах родильно-профилакторного периода с клиническими признаками эндометритов и положительными результатами лабораторных исследований. Животные были разделены на 14 групп по 5 голов в каждой, которых лечили по разным схемам и двух контрольных – больных не леченных и здоровых (табл. 3.22).

До и после лечения исследовали сыворотку крови, молоко (молозиво), маточно-влагалищный секрет лабораторными методами: серологическими – реакция прямой (РПИФ) и непрямой (РНИФ) иммунофлуоресценции (в качестве антигенов и антисывороток использовали стандартные диагностикумы для РА и РСК, инактивированные вакцинные штаммы, стандартные люминисцентные антивидовые кроличьи, бычьи сыворотки для РНИФ и люминисцентные сальмонеллезные типы А, В, Д, листериозную, коксиеллезную люминисцентные сыворотки для РПИФ, изготовленные НИИЭМ имени Н.Ф. Гамалеи, а также полученные нами кроличьи сыворотки против микоплазмоза, хламидиоза, диплококкоза, стафилококкоза и стрептококкоза; бак-

териологическими – с применением жидких и плотных микоплазмозных питательных сред.

Таблица 3.22

Схемы лечения при ассоциативном урогенитальном микоплазмозе крупного рогатого скота

Группы животных	Характеристика групп	Применяемые препараты	Продолжительность лечения (дней)
1	Лепт.+сальм.+Ку-лих.+мик.	Тетрасульфин (двукратно с интервалом 3 дня)	10
2	Лепт.+сальм.+Ку-лих.+мик.	Окситоцин + бициллин-3 + пункция по Логвинову + ихтиоглюковит + тетрасульфин	40
3	Сальм.+мик.	Тетрациклин ПВП (однократно)	10
4	Лепт.+лист.+сальм. +Ку-лих.+мик.	Окситоцин + бициллин-3 + ихтиоглюковит + тетрациклин ПВП	40
5	Лист. +сальм.+Ку-лих. + мик.	Левотетрасульфин ПЭГ (4-кратно)	26
6	Хлам.+лепт.+лист. +сальм.+Ку-лих.+мик.	Левоэритроциклин ПЭГ (2-кратно)	18
7	Лист.+сальм.+Ку-лих.+мик.	Окситоцин + бициллин-3 + пункция по Логвинову + левоэритроциклин ПЭГ	33
8	Хлам. + лепт.+ лист. + сальм.+ Ку-лих. + мик.	Окситоцин + бициллин-3 + ихтиоглюковит + тилоциклин ПЭГ	31
9	Мик.	Окситоцин + ихтиоглюковит + глюкоихтиол ПЭГ	34
10	Лист.+сальм.+мик.	Окситоцин + пункция по Логинову + ихтиоглюковит + глюкоихтиол ПЭГ	30
11	Сальм.+мик.	Глюкоихтиол ПЭГ (3-кратно)	19
12	Мик.	Окситоцин + ихтиоглюковит + тетрациклин ПВП	20
13	Сальм.+Ку-лих.+мик.	Пункция по Логинову + окситоцин + бициллин-3	12
14	Лепт.+лист.+сальм .+Ку-лих. +мик.	Фуразолидоновые палочки + окситоцин + бициллин-3 + ихтиоглюковит + пункция по Логинову	50
15	Хлам.+лепт.+лист. +сальм.+Ку-лих.+мик.	Контрольная не леченная группа	–
16		Контрольная интактная группа	–

Примечание: хлам. – хламидиоз; лепт. – лептоспироз; лист. – листериоз; сальм. – сальмонеллез; ку-лих. – Ку-лихорадка; мик. – микоплазмоз.

Установлено, что в сыворотке крови животных (табл. 3.23) антитела не выявлялись в РНИФ во всех группах против сальмонелле-

за, листериоза – у 57 % в восьми группах (1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 13-й), а в шестой группе – у 80 %, в 3, 9, 12-й группах – в 100 % случаев.

Лептоспирозные антитела у большинства животных после лечения также не регистрировали за исключением пятой группы, где их обнаружили у 40 % животных и во 2, 8, 13, 14-й группах, в которых антитела продолжали синтезироваться у всех животных.

Таблица 3.23

Результаты исследования сыворотки крови в РНИФ от больных эндометритами коров СПК «Россия» до / после лечения

№ группы	Выявлено животных в % по наличию флуоресцирующих антител			
	хлам.	лепт.	лист.	сальм.
	до/после	до/после	до/после	до/после
1	40/0	100/0	100/0	100/0
2	100/0	100/100	100/0	100/0
3	0/0	100/0	100/100	100/0
4	0/0	100/0	100/0	0/0
5	100/100	80/40	80/0	100/0
6	0/0	100/0	100/40	100/0
7	0/0	100/0	100/0	100/0
8	100/100	100/40	100/0	100/0
9	100/100	100/100	100/100	100/0
10	100/0	100/0	100/0	100/0
11	100/100	100/0	0/0	100/0
12	100/100	100/0	100/100	100/0
13	100/100	100/100	100/0	100/0
14	100/100	100/100	0/0	100/0
Всего:	67/50	98,5/34	84/24	93/0
15	100/100	100/100	100/100	100/100
16	0/0	0/0	0/0	0/0

Хламидиозные антитела исчезли у животных 1, 2, 10-й групп и сохранились у животных семи групп.

По результатам контрольного исследования цервико-вагинальной слизи (табл. 3.24 и 3.25) от больных эндометритами коров через 10 дней после их лечения по различным схемам по наличию или отсутствию антигенов микроорганизмов, установлено полное освобождение организма животных от хламидий, лептоспир и листерий.

Число носителей возбудителей сальмонеллеза снизилось на 77 % (в 10 раз), лихорадки Ку – на 38 % (в 3 раза), стрептококкоза – на 85,5 % (в 8 раз), стафилококкоза и диплококкоза – на 89 % (в 9 раз), что указывает на эффективность применяемых схем лечения. При этом высокоэффективными при ассоциативном микоплазмозе были 1–5-я и 7–8-я схемы лечения, тогда как 9–12-я схемы при моноинфекции и 10–14-я – при ассоциативном течении оказались не эффективными.

Таблица 3.24

Результаты исследования цервико-вагинальной слизи от больных эндометритами коров СПК «Россия» до / после лечения

№ группы	Выявлено животных носителей антигенов микроорганизмов в %.							
	хлам. до/после	лепт. до/после	лист. до/после	сальм. до/после	Ку-лих. до/после	Микоплазмы		
						Г до/после	А до/после	У до/после
1	0 / 0	40 / 0	0 / 0	100 / 80	100 / 40	0 / 0	100 / 0	100 / 0
2	0 / 0	100 / 0	0 / 0	100 / 0	100 / 40	0 / 0	100 / 0	100 / 0
3	0 / 0	0 / 0	0 / 0	100 / 0	0 / 0	0 / 0	100 / 0	100 / 0
4	0 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0	0 / 0	0 / 0	100 / 0
5	0 / 0	0 / 0	80 / 0	100 / 0	100 / 0	0 / 0	0 / 0	80 / 0
6	100 / 0	40 / 0	80 / 0	100 / 40	80 / 0	40 / 40	100 / 0	40 / 0
7	0 / 0	0 / 0	100 / 0	100/100	100 / 0	0 / 0	100 /0	0 / 0
8	100 / 0	100 / 0	80 / 0	100 / 0	80 / 40	80 / 0	0 / 0	0 / 0
9	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	100/100	100 / 0
10	0 / 0	0 / 0	100 / 0	100 / 0	0 / 0	0 / 0	100/100	100 / 0
11	0 / 0	0 / 0	0 / 0	100 / 0	0 / 0	0 / 0	100/100	100 / 0
12	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	100 / 0	100 / 0
13	0 / 0	0 / 0	0 / 0	100 / 0	100/100	100 / 40	0 / 0	0 / 0
14	0 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100/100	0 / 0	100/100	100 / 0
Всего:	14 / 0	34 / 0	46 / 0	86 / 8,5	61 / 23	16 / 6	64 / 36	73 / 0
15	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100
16	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0

Примечание: антигены Г – глюкозоферментирующих *M. bovoculi*, А – аргинин-ферментирующих *M. arginini*, У – *Ureaplasma sp*.

По отсутствию антигенов возбудителей хламидиоза и листериоза в молоке (табл. 3.26) 100 % эффективность лечения была отмечена во всех опытных группах. Антигены возбудителей сальмонеллеза, лептоспироза и риккетсиоза не выявлялись после применения 5, 11, 12-й схем лечения. Кокковая микрофлора в молоке полностью отсутствовала после применения девяти испытуемых схем лечения (см. табл. 3.26).

Таблица 3.25

Результаты исследования проб молока от больных эндометритами коров СПК «Россия» до / после лечения

№ группы	Выявлено животных носителей антигенов микроорганизмов, %				
	хлам.	лепт.	лист.	сальм.	Ку-лих.
	до/после	до/после	до/после	до/после	до/после
1	80/0	80 / 0	0 / 0	100 / 40	100 / 0
2	0/0	0 / 0	100 / 0	100 / 40	100 / 0

3	100/0	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0
4	0/0	100 / 40	0 / 0	100 / 40	100 / 40
5	0/0	40 / 0	80 / 0	100 / 0	100 / 0
6	80/0	100 / 40	0 / 0	100 / 0	100 / 0
7	0/0	0 / 0	0 / 0	100 / 40	100 / 0
8	40/0	80 / 0	80 / 0	100 / 40	100 / 0
9	100/0	100 / 0	100 / 0	100 / 80	100 / 100
10	0/0	100 / 0	0 / 0	100 / 80	100 / 100
11	100/0	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0
12	100/0	0 / 0	0 / 0	100 / 0	100 / 0
13	0/0	0 / 0	0 / 0	100 / 80	100 / 0
14	100/0	0 / 0	0 / 0	100 / 0	100 / 0
Всего:	50/0	51 / 6	40 / 0	100 / 31	100 / 17
15	100/100	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100
16	0/0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0

Таблица 3.26

Результаты исследования проб молока и цервико-вагинальной слизи от больных эндометритами коров СПК «Россия» до / после лечения

№ группы	Выявлено животных носителей антигенов микроорганизмов, %					
	Молоко			Цервико-вагинальная слизь		
	Стрепто-кокк	Диплококк	Стафило-кокк	Стрепто-кокк	Диплококк	Стафило-кокк
	до /после	до / после	до / после	до / после	до / после	до /после
1	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0
2	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 40	100 / 80
3	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0
4	100 / 100	100 / 100	100 / 0	100 / 100	100 / 0	100 / 0
5	100 / 0	100 / 0	100 / 40	100 / 0	100 / 40	100 / 80
6	100 / 40	100 / 0	100 / 40	80 / 40	100 / 40	100 / 40
7	100 / 0	100 / 40	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0
8	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 40	100 / 0
9	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0
10	100 / 100	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0
11	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0
12	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0
13	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 40	100 / 0	100 / 40
14	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0	100 / 0
Всего:	100 / 17	100 / 10	100 / 6	98,5 / 13	100 / 11	100 / 11
15	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100
16	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0

В цервико-вагинальной слизи после лечения по различным схемам стрептококки выявляли у 13 % животных, диплококки и стафилококки – у 11%, тогда как до лечения эти микроорганизмы присутствовали у всех коров. Наиболее эффективно действовали на кокковую микрофлору 1, 3, 9, 11 и 12-я схемы лечения.

При сравнительном анализе эффективность схем лечения в группах, где регистрировался лептоспироз, во всех, за исключением 4-й и 6-й (80 %), составила 100 % (табл. 3.27). Высокая эффективность (100 %) терапии при сальмонеллезе зарегистрирована в четырех группах (5, 6, 12, 14-й), тогда как в других восьми группах она не превышала 40–80 %. Такая же эффективность была в 11 группах животных, инфицированных возбудителем лихорадки Ку, лишь в 9–10-й группах лечение было неэффективным, а в 4-й группе эффективность составила 80 %. Для лечения коров с урогенитальным микоплазмозом наилучшими оказались 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8-я схемы.

Таблица 3.27

Эффективность различных схем лечения больных эндометритами коров (по отсутствию антигенов возбудителей инфекционных болезней)

№ группы	Эффективность по отсутствию отдельных возбудителей в РНИФ, %						Общая эффективность схем, %
	хлам.	лепт.	лист.	сальм.	Ку-лих.	микопл.	
1	-	100	-	20	60	100	70
2	-	100	-	100	60	100	90
3	-	-	-	100	-	100	100
4	-	100	100	100	100	100	100
5	-	-	100	100	100	100	100
6	100	100	100	60	100	80	90
7	-	-	100	100	100	100	100
8	100	100	100	100	40	100	90
9	-	-	-	-	-	0	0
10	-	-	100	100	-	0	66
11	-	-	-	100	-	0	50
12	-	-	-	-	-	100	100
13	-	-	-	100	0	60	60
14	-	100	100	100	0	0	60
15	0	0	0	0	0	0	0
16	-	-	-	-	-	-	-

Таким образом, для лечения коров с урогенитальным микоплазмозом наилучшей оказалась 12-я схема, а при урогенитальном микоплазмозе, ассоциированном двумя и более инфекциями, наиболее эффективными были 4, 5 и 7-я схемы. Данные схемы включают комплексные препараты, действующие не только на микоплазмы, но и на всю ассоциацию мик-

роорганизмов: (тетрациклин ПВП; левотетрасульфин ПЭГ; левоэритроциклин ПЭГ).

Эффективность комплексных препаратов была подтверждена в опытах в СПК «Новороссийское» и колхозе «Большевик». Для этого взяли 40 глубокостельных коров с носительством микоплазм, сальмонелл, лептоспир, хламидий, коксиелл и вируса пустулезного вульвовагинита. Из них сформировали три опытных и одну контрольную группы.

Животным вводили тетрациклин-ПВП и левоэритроциклин-ПЭГ внутримышечно двукратно с интервалом 10 дней (3-я и 6-я схемы). Контрольной группе животных ввели физиологический раствор. Сыворотку крови и цервико-вагинальную слизь исследовали до, и после санации (на 2–3-й день после отела) с помощью прямой и непрямой реакции иммунофлюоресценции.

В СПК «Новороссийское» до применения тетрациклина-ПВП реагировало 70 % животных на микоплазмоз, столько же на хламидиоз, 60 % – на ИРТ-ПВ и лептоспироз и 40 % – на сальмонеллез. После санации на хламидиоз реагировало 20 % коров, на лептоспироз – 30 % и на ИРТ-ПВ – 10 %. В цервико-вагинальной слизи регистрировали у 70 % коров на микоплазмы вирус ИРТ-ПВ, у 60 % – хламидии, у 50 % – сальмонеллы и у 20 % – коксиеллы Бернета. После применения препарата данные микроорганизмы не выявляли (табл. 3.28).

В опыте с применением левоэритроциклина-ПЭГ до санации реагировало 70 % коров на лептоспироз, 60 и 50 % – на ИРТ-ПВ и сальмонеллез соответственно. После использования препарата количество реагирующих уменьшилось: на хламидиоз – на 50 %, а на лептоспироз и ИРТ-ПВ – на 40 %. До профилактической санации микропаразитоценоз урогенитального тракта коров был представлен у 70 % – микоплазмами, у 50 % – вирусом ИРТ-ПВ, у 40 % – хламидиями, у 30 % – сальмонеллами и у 20 % – коксиеллами Бернета; после санации данные микроорганизмы не выявляли (табл. 3.29, 3.30).

Таблица 3.28

Применение тетрациклина-ПВП глубокостельным коровам СПК «Новороссийское»

№ п/п	Сыворотка крови на наличие антител				Цервико-вагинальная слизь на наличие антигенов					
	хлам.	ПВ	сальм	лепт.	хлам.	ПВ	Ку-лих.	сальм.	лепт.	мик.
1.	+/+	+/+	-/-	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
2.	+/-	+/-	-/-	+/+	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-
3.	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-
4.	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
5.	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-
6.	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
7.	+/+	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-
8.	+/-	+/-	-/-	+/+	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/-
9.	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
10.	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-
До, %	7	6	4	6	6	7	2	5	6	7
	70	60	40	60	60	70	20	50	60	70
После, %	2	1	0	3	0	0	0	0	0	0
	20	10	0	30	0	0	0	0	0	0

Таблица 3.29

Применение левоэритроциклина-ПВП глубокостельным коровам СПК «Новороссийское»

№ п/п	Сыворотка крови на наличие антител				Цервико-вагинальная слизь на наличие антигенов					
	хлам.	ПВ	сальм	лепт.	хлам.	ПВ	Ку-лих.	сальм.	лепт.	мик.
1.	-/+	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-
2.	+/+	+/-	-/-	+/+	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-
3.	-/-	+/-	-/-	+/+	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-
4.	+/-	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-
5.	+/-	+/+	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	-/-
6.	-/-	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-
7.	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-
8.	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-
9.	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-
10.	+/-	-/-	-/-	+/+	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	-/-
До, %	6	6	4	7	4	7	2	3	7	7
	60	60	40	70	40	70	20	30	70	70
После, %	2	1	0	3	0	0	0	0	0	0
	20	10	0	30	0	0	0	0	0	0

Таблица 3.30

Эффективность применения тетрациклина-ПВП для профилактики ассоциированного микробоносительства у глубокостельных коров в СПК «Большевик» по наличию антител

№ п/п	Антитела в сыворотки крови против возбудителей инфекционных болезней							
	До применения препарата				После применения препарата			
	хлам.	ПВ	лепт.	сальм.	хлам.	ПВ	лепт.	сальм.
1/11	+/-	+/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+
2/12	-/+	+/+	+/+	+/-	-/+	-/+	-/+	-/-
3/13	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-
4/14	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-
5/15	+/+	+/+	-/+	+/-	+/+	-/+	-/+	-/-
6/16	-/-	-/+	+/+	+/-	+/-	-/+	+/+	-/-
7/17	-/-	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+
8/18	+/-	+/-	-/-	+/+	+/-	-/-	-/-	+/+
9/19	-/-	-/+	+/-	-/+	-/-	-/+	+/-	-/+
10/20	+/+	+/-	-/-	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+
%	50/50	60/70	70/70	60/50	30/50	10/60	30/70	10/50

В СПК «Большевик» после применения тетрациклина-ПВП сальмонеллезные и лептоспирозные антитела сохранились в опытной группе у 30 % животных, а сальмонеллезные и ПВ-антитела – у 10 %. В контрольной группе после двукратного исследования у 60 % животных в сыворотке крови выявляли хламидиозные, лептоспирозные и против ИРТ-ПВ антитела и у 40 % – сальмонеллезные антитела (табл. 3.31).

В цервико-вагинальной слизи в обоих случаях выделяли у 60 % микоплазмы, у 50 % – хламидии и вирус ИРТ-ПВ, у 30 % – сальмонеллы (табл. 3.31). В контрольной группе они оставались на прежнем уровне. Лептоспиры и сальмонеллы у подопытных животных не регистрировали, а микоплазмы, хламидии и коксиеллы сохранились у одной коровы.

Данные опыты подтверждают, что испытанные нами препараты эффективны как для лечения больных с явными клиническими признаками, так и для профилактики носительства животными микоплазм и других микроорганизмов.

Таблица 3.31

Эффективность применения тетрациклина ПВП для профилактики ассоциированного микробоносительства у глубокостельных коров в СПК «Большевик» по отсутствию антигенов возбудителей инфекционных болезней

№ п/п	Антигены возбудителей в урогенитальном тракте											
	До применения препарата						После применения препарата					
	хлам.	ПВ	лепт.	сальм.	Ку-лих	мик.	хлам.	ПВ	лепт.	сальм	Ку-лих	мик.
1/11	+/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/+	+/-	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+
2/12	+/+	+/-	+/+	+/-	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+
3/13	+/+	-/+	+/-	-/+	+/-	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+
4/14	-/+	-/+	+/-	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-
5/15	+/+	+/-	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+
6/16	+/+	-/+	+/+	+/-	+/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-
7/17	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	+/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-
8/18	+/+	+/-	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-
9/19	-/-	-/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-
10/20	+/-	+/-	-/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+
%	70/70	50/60	70/70	50/50	30/20	60/50	10/70	10/60	0/70	0/50	10/20	10/50

Примечание: числитель – опытная группа / знаменатель – контрольная.

3.4.3. Экономическое обоснование схем лечения

Экономический ущерб от ассоциативного урогенитального микоплазмоза складывается из вынужденного убоя заболевших, значительного снижения мясной, молочной продуктивности, абортов, рождения нежизнеспособного молодняка. Нами был изучен экономический ущерб и определён экономический эффект от применения эффективных схем лечения, при микоплазмозе крупного рогатого скота в колхозе «Россия» за 2004 год (табл. 3.32).

Определение экономического ущерба

А. От вынужденного убоя животных по формуле

$$У_1 = М \cdot Ж \cdot Ц – С_ф,$$

где $М$ – количество убитых животных, голов; $Ж$ – средняя живая масса одного животного, ц; $Ц$ – закупочная цена 1 ц живой массы, руб.; $С_ф$ – выручка от реализации продуктов убоя, руб.

Расчет: $У_1 = 3 \cdot 4{,}5 \cdot 2050 – 7200 = 20475$ руб.

Б. От недополучения молока, вследствие сдачи на убой дойных коров:

$$У_2 = М_с \cdot Н_м \cdot Ц,$$

где $М_с$ – количество убитых дойных коров, голов; $Н_м$ – количество недополученного молока от убитой коровы, 1 ц; $Ц$ – цена 1 ц молока, руб.

Расчет: $У_2 = 3 \cdot 3 \cdot 800 = 7200$ руб.

Таблица 3.32

Расчетные данные для экономического обоснования при урогенитальном микоплазмозе крупного рогатого скота

Показатели	Единицы измерения	Коли-чество
1. Среднегодовое поголовье животных	голов	3120
2. Заболело животных	голов	75
3. Из них коров дойных	голов	75
4. Вынуждено убито	голов	3
5. Из них коров дойных	голов	3
6. Средняя масса одной головы	ц	4,5
7. Среднесуточный удой здоровой коровы	кг	9,7
8. Среднесуточный удой больной коровы	кг	8,7
9. Средняя продолжительность сервисного периода	дни	65
10. Коэффициент возможной заболеваемости	число	0,42
11. Недополученное молоко в пересчёте на кормодни от одной заболевшей коровы	ц	3
12. Закупочная цена 1ц живой массы	руб.	2050
13. Закупочная цена 1ц молока	руб.	800
14. Денежная выручка от сдачи одной головы на убой	руб.	9225
15. Ветеринарные затраты:		
а) серологические исследования(1 проба)	руб.	15,4
б) бактериологические исследования (1 проба)	руб.	50
в) лечебно-профилактические мероприятия	руб.	10000
г) прочие расходы	руб.	9500

В. Общий фактический ущерб:

$$У_0 = У_1 + У_2,$$

где $У_1$, $У_2$ – виды экономического ущерба в рублях от убоя животных, не до получения молока.

Расчет: $У_0 = 20475 + 7200 = 27675$ руб.

Г. Ущерб на одно заболевшее животное:

$$Ку_1 = У_0 : З,$$

где $У_0$ – фактический экономический ущерб, руб.; $З$ – количество заболевших животных, голов.

Расчет: $Ку_1 = 27675 : 75 = 369$ руб.

Д. Ущерб на одно животное стада:

$$Ку_2 = У_0 : М_0,$$

где $У_0$ – фактический экономический ущерб, руб.; $М_0$ – количество животных в стаде, голов.

Расчет: $Ку_2 = 27675 : 3120 = 9$

Ветеринарные затраты

А. Общие ветеринарные затраты, руб.:

серологические исследования 1155
бактериологические исследования 3750
лечебно-профилактические мероприятия . . . 10 000
прочие расходы 9500

$$З_в = 24405 \text{ руб.}$$

Б. Ветеринарные затраты на одно заболевшее животное:

$$К_{уз} = З_в : З,$$

где $З_в$ – ветеринарные затраты, руб.; $З$ – количество заболевших, голова.

Расчет: $К_{уз}$ = 24405 : 75= 325,4 руб.

В. Ветеринарные затраты на одно животное стада:

$$К_{ус} = З_в : М_0,$$

где $З_в$ – ветеринарные затраты, руб.; $М_0$ – количество животных в стаде, голов.

Расчет: Кус = 24405 : 3120 = 7,82 руб.

Предотвращенный экономический ущерб

$$П_{у1} = (М_0 \cdot К_{у1} \cdot К_{з1}) – У_0,$$

где $М_0$ – количество животных в стаде, голов; $К_{у1}$ – ущерб на одно заболевшее животное, руб.; $К_{з1}$ – коэффициент возможной заболеваемости; $У_0$ – фактический экономический ущерб, руб.

Расчет: $П_{у1}$ = (3120 · 369 · 0,42) –27675= 445862,6 руб.

Экономический эффект

$$Э_в = П_{у1} – З_в,$$

где $П_{у1}$ – предотвращенный экономический ущерб, руб.; $З_в$ – ветеринарные затраты, руб.

Расчет: $Э_в$ = 445862,6 - 24405 = 421 457,6 руб.

Экономический эффект на один рубль ветеринарных затрат

$$Э_р = Э_в : З_в,$$

где $Э_в$ – экономический эффект, руб.; $З_в$ – ветеринарный затраты, руб.

Расчет: $Э_р$ = 421457,6 : 24405 = 17,3 руб.

Таким образом, экономический ущерб от ассоциативного урогенитального микоплазмоза крупного рогатого скота за год составил – 27 675 руб. Применение разработанных схем лечения

в хозяйстве при микоплазмозе крупного рогатого скота позволило предотвратить экономический ущерб на сумму 445 862,6 руб., при этом экономический эффект от проведённых лечебно-профилактических мероприятий составил 550 056 руб., а экономический эффект на один рубль затрат – 17,3 руб.

3.5. Микоплазмоз – ассоциированная инфекция телят

3.5.1. Эпизоотическая ситуация по микоплазмозу телят и ассоциативным формам его проявления в хозяйствах Омской области

По результатам исследований установили, что микоплазмоз телят имеет широкое распространение в хозяйствах Омской области (табл. 3.33). При этом проявление микоплазмоза достоверно больше всех других инфекций ($p < 0,001$).

Наиболее насыщенный микробный пейзаж установлен в СПК «Украинский» Исилькульского района, где в различных сочетаниях выделяли возбудителей микоплазмоза и девять микроорганизмов у 50 % обследованных животных. В ООО «Русский хлеб» Кормиловского района микоплазмы выделяли у 100 % телят, при этом также выделялись ассоциации возбудителей ИРТ, хламидиоза, пастереллёза, лептоспироза, диплококкоза, эшерихиоза и сальмонеллёза (табл. 3.34, 3.35). Высокую степень ассоциации микоплазмоза с другими микроорганизмами отмечали в агрофирме «Кормиловская» Кормиловского района (100 %), СПК «Ермолаевское» Калачинского района (100 %) и СПК «Новороссийский» Нововаршавского района (50 %). В ОАО «Алексеевское» Кормиловского района и ЗАО «Знамя» Москаленского района отмечалось высокое микоплазмоносительство (100 %), другие микроорганизмы выделили в минимальном количестве.

В других хозяйствах: СПК «Россия», ЗАО имени Розы Люксембург, молзавод «Кормиловский», СПК «Некрасовский» – было поражено микоплазмами меньшее количество животных – от 38 до 88 %.

Из проб патологического материала микоплазмы также выделялись в ассоциации с другими возбудителями в 33–83 % случаев. При этом инфицированность патологического материала микоплазмами достоверно выше всех других инфекций ($p < 0,01$). В органах абортированных плодов из СПК имени Кирова Крутинского района микоплазмы обнаруживали у 81 % животных в ассоциации с хламидиями (33 %), лептоспирами (17 %), листериями (22 %) и сальмонеллами (33 %).

Таблица 3.33

Ассоциативные формы проявления микоплазмоза у телят в хозяйствах Омской области

Хозяйства	К-во гол.	Инфицировано (%), M±m, p<0,001									
		сал	пас	хлам	ИРТ	леп	лис	дип	стр	ста	мик
«Россия»	10	50,0±15,8	-	70,0±14,5	-	70,0±15,8	90,0±9,5	-	-	-	40,0±15,5
Имени Розы Люксембург	10	70,0±14,5	40,0±15,5	40,0±15,5	-	70,0±14,5	70,0±14,5	100,0	-	-	50,0±15,8
«Украинский»	15	60,0±12,6	60,0±12,6	58,0±12,7	75,0±11,2	53,0±12,9	60,0±12,6	40,0±12,7	-	-	50,0±12,9
«Русский хлеб»	20	50,0±11,2	15,0±7,8	40,0±11,0	10,0±6,7	20,0±8,9	50,0±11,2	60,0±10,9	-	-	100,0
Ермолаевское	10	40,0±15,5	-	90,0±9,5	-	60,0±15,5	50,0±15,8	70,0±14,5	50,0±15,8	20,0±12,6	100,0
Алексеевское	7	35,0±18,0	-	-	-	20,0±15,1	-	-	-	30,0±17,3	100,0
«Знамя»	8	-	-	-	-	-	-	13,0±11,9	-	13,0±11,9	100,0
Сосновское	6	32,0±19,0	33,0±19,1	67,0±19,2	-	-	17,0±15,3	17,0±15,3	-	-	50,0±24,0
агрофирма «Кормиловская»	8	60,0±17,3	20,0±14,1	80,0±14,1	-	80,0±14,1	80,0±14,1	100,0	-	-	100,0
Молзавод «Кормиловский»	9	11,0±10,4	11,0±10,4	20,0±13,3	-	44,0±16,5	33,0±15,7	11,0±10,4	33,0±15,7	-	88,0±10,8
«Нива»	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Новороссийское	10	10,0±9,5	20,0±12,6	20,0±12,6	30,0±14,5	50,0±15,8	40,0±15,5	50,0±15,8	-	-	50,0±15,8
Имени Кирова	10	10,0±9,5	-	-	-	-	-	-	-	-	100,0
«Технофарм»	10	-	-	10,0±9,5	-	20,0±12,6	20,0±12,6	10,0±9,5	-	-	-
«Новоцарицино»	10	70,0±14,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
«Овцевод»	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Некрасовский	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80,0±12,6
Всего (17)	168	42,0±3,8	28,0±3,5	50,0±3,9	38,0±3,7	49,0±3,9	51,0±3,9	47,0±3,8	42,0±3,8	21,0±3,1	77,0±3,2

Примечание: сал – сальмонеллы, пас – пастереллы, хл – хламидии, ИРТ – вирус инфекционного ринотрахеита, леп – лептоспиры, лис – листерии, дип – диплококки, стр – стрептококки, ста – стафилококки, мик – микоплазмы.

Таблица 3.34

Изучение микропаразитоценоза пищеварительного тракта в РНИФ

Хозяйства	К-во гол	Инфицированно, %							
		Антигены *E. coli*					Сальмонеллы		
		К-88	К-99	А-20	F-41	987-Р	Тип А	Тип В	Тип D
Украинский	15	20	-	20	20	40	-	-	60
Русский хлеб	20	20	10	0	40	-	-	-	50
Новороссийское	10	20	30	10	40	40	-	10	-
Имени Розы Люксембург	10	30	40	80	60	90	50	80	90
Ермолаевское	10	20	0	20	10	10	40	-	40
Алексеевское	7	18	50	18	35	35	-	35	-
Знамя	8	-	-	-	10	-	-	-	-
Им. Кирова	10	-	-	10	-	-	-	10	-
Агрофирма Кормиловская	13	60	100	0	13	26,5	-	80	40
Молзавод Кормиловский	9	11	11	-	11	-	11	-	-
Сосновское	11	45	9	-	65	27	-	27	36
Овцевод	5	-	-	-	-	-	-	-	-
Некрасовский	5	-	-	-	-	-	-	-	-
Россия	10	20	30	-	40	10	-	-	50
Технофарм	10	10	30	-	-	-	-	-	-
Новоцарицино	10	20	30	50	40	60	н/и	н/и	70
Всего	163	25	34	30	32	38	34	40	55

Таким образом, по результатам эпизоотологического обследования хозяйств Омской области установлено, что микоплазмоз телят имеет широкое распространение. Из 17 обследованных хозяйств с высоким уровнем гибели телят микоплазмоз отсутствовал только в четырёх хозяйствах, при этом в виде моноинфекции данную болезнь не регистрировали.

3.5.2. Микробиологические методы диагностики микоплазмоза телят

Индикация и идентификация микоплазм на питательных средах

При проведении микробиологического метода диагностики микоплазмоза на питательных средах исследовали бронхоальвеолярную слизь, суставную и конъюнктивальную жидкости от телят 0,5–4-месячного возраста, патологический материал

Таблица 3.35

Изучение инфицированности патологического материала от погибших или вынужденно убитых телят и абортированных плодов* в РНИФ

Хозяйства	К-во голов	Инфицировано (%), M±m, p<0,01						
		сал	пас	хлам	ИРТ	леп	лис	мик
«Солнцево»	6	-	33,0±19,0	-	-	33±19,2	17±15,3	-
«Знамя»	6	-	-	-	-	-	-	83±15,3
Имени Розы Люксембург	24	35,0±9,7	15,0±7,3	40,0±10,0	-	50±10,2	75±8,8	75±8,8
Имени Кирова	24	25,0±8,8	19,0±8,0	31,0±9,4	-	6,0±4,8	31,0±9,4	66±9,7
Имени Кирова*	18	33,0±11,1	-	33,0±11,1	-	17,0±8,8	22,0±9,8	81,0±9,2
Георгиевское	6	-	-	-	-	-	25,0±17,7	33,0±19,2
Сосновское	3	-	33,0±11,1	42,0±11,6	50,0±11,8	-	16,0±18,6	39,0±11,5
«Русский хлеб»	6	-	100	33,0±19,2	-	-	33,0±19,2	33,0±19,2
«Россия»	18	-	39,0±11,5	22,0±9,8	-	33,0±11,5	11,0±7,4	43,0±11,7
Всего:	126	31,0±4,1	39,0±4,3	33,5±4,2	50,0±4,5	27,0±3,9	28,0±4,0	56,0±4,4

от погибших телят и абортированных плодов. Использовали жидкие и плотные элективные питательные среды для индикации и идентификации микоплазм.

Учет роста колоний микоплазм на жидких питательных средах проводили визуально по изменению цвета среды при температуре 37 ^{0}С в течение трех суток. В процессе роста микоплазм сдвигается pH среды и изменяется её цвет. Ферментацию глюкозы, аргинина или мочевины отражает индикатор, а росту сопутствующей микрофлоры препятствуют входящие в состав среды ингибиторы.

В последующем для более детального изучения культуральных свойств микоплазм, изменивших цвет сред, культуры пересевали на аналогичные плотные диагностические среды, содержащие 1,3 % агара Дифко. Для чего 0,1 мл культуры микоплазм вносили пастеровской пипеткой или стерильным одноразовым шприцем на поверхность агара и подсушивали при комнатной температуре. Инкубацию посевов проводили в условиях термостата при температуре 37–38 ^{0}С в течение 5 суток. За ростом микоплазм наблюдали, просматривая чашки Петри под малым увеличением микроскопа (х 45–70).На плотной среде отмечали рост колоний микоплазм округлых форм, не сливающихся друг с другом с врастающим в агар центром и нежной поверхностной периферией (см. цветную вкл., рис. 1).

Также наблюдали мелкие зернистые колонии с невыраженной центральной зоной. В секторе роста первых колоний центр был более темного цвета, уплотнён, имел более выраженную зернистость (см. цветную вкл., рис. 2).

При нахождении колоний микоплазм их отсевали на жидкие элективные питательные среды с соответствующей ферментативной активностью вместе с агаровым блоком и учитывали изменение цвета. При отсутствии роста проводили 3–5 последовательных «слепых» пассажей, наблюдая за изменением цвета среды. Если он не менялся – фиксировали гибель микоплазм.

С целью исключения возможного роста L-форм бактерий, выделенные культуры пересевали 3–5 раз с интервалом 72 часа,

до восстановления исходных форм возбудителя. При проведении пассажа культур микоплазм с жидкой среды на жидкую в свежую среду соответствующей активности вносили культуру микоплазм из расчёта 2:0,1 мл и инкубировали в течение трех суток в термостате при температуре 37 ^{0}С, наблюдая за изменением цвета среды.

Для пассирования культур с жидкой среды на плотную вносили пастеровской пипеткой 0,1 мл культур на 1,3 %-ную агаровую среду. Наблюдали за ростом при 37 ^{0}С в течение пяти дней.

При пересеве с агаровой среды на агаровую бактериологической петлей вырезали агаровый блок с колонией микоплазм и обрабатывали им всю поверхность свежего агара, не нарушая целостности среды. Инкубацию посевов проводили в течение пяти дней в термостате при Т-37 ^{0}С. Быстрота роста колоний и их форма зависят от биохимических свойств выделенной культуры.

Таким образом, жидкие и плотные элективные питательные среды, разработанные совместно с НИИПОИ Роспотребнадзора (Н.Н. Новикова, 2002), можно использовать для индикации и идентификации микоплазм, выделенных из бронхоальвеолярных смывов у телят.

3.5.3. Морфологические и биохимические свойствамикоплазм

Тинкториальные и морфоологические свойства микоплазм изучали микроскопическим методом. Из трёхсуточной культуры микоплазм готовили мазки, высушивали на воздухе, фиксировали метиловым спиртом в течение 5 минут и окрашивали по Романовского-Гимзе 60 минут в термостате. Промывали и просматривали мазок под иммерсией. Наблюдали преимущественно кокки и овоидно-перстневидные формы микоплазм (0,3–0,5 мкм) сине-фиолетового цвета, а также палочки (2–5 мкм), скопления зернистой массы с включениями микроструктурных элементов.

Принадлежность выделенных культур к микоплазмам определяли по основным биохимическим свойствам: разложение глюкозы, аргинина, мочевины, культивируя их на специальных

жидких и твердых дифференциально-диагностических питательных средах.

Определяя видовую идентификацию микоплазм по ключу Gourlayand-Howard (1979), изучали протеолитическую активность, редукцию тетразоля, потребность в холестерине, дигитонин-чувствительность и рост при температуре 22 ^{0}С.

Протеолитическая активность характеризуется способностью разжижать или свертывать сыворотку крови, желатин, гидролизовать казеин. Проводя реакцию с разжижением сгустка сыворотки, питательную среду, состоящую из 16 мл сердечного экстракта, автоклавированного при 121 ^{0}С в течение 20 минут, 60 мл сыворотки крови лошади, 1,6 мл 25 %-ного дрожжевого экстракта, 2,4 мл стерильной воды разливали в пробирки по 2 мл. Пробирки высушивали под вакуумом 20–30 минут, после чего в наклоненном положении, подогревали текучим паром, в течение 45 минут. В эту среду вносили различные разведения исследуемой культуры и контрольного штамма. Пробирки инкубировали в течение 14–20 суток, просматривая их каждые два дня. Углубление и просветление поверхности агара, образование в нем отверстий, полостей, небольшого количества жидкости, подтверждало протеолитическую активность выделенных микоплазм.

Наблюдая за гидролизом казеина, 8 г порошка снятого молока растворяли в 90 мл воды (pH 7,6). Автоклавировали при 121 ^{0}С в течение 15 минут. Расплавляли 2 г очищенного агара (оксоид) в 120 мл воды, доводя pH до 7,6, и автоклавировали при 121 ^{0}С в течение 15 минут. В асептических условиях смешивали два раствора и разливали в пробирки по 2 мл. Расплавляя молочный агар на водяной бане, наносили несколько капель на колонии исследуемой культуры на агаре. Инкубировали в течение двух недель при 37 ^{0}С. Учет вели каждые два дня. Положительную реакцию считали при просветлении молочного агара над колониями микоплазм.

При эксперименте с разжижением желатина питательную среду, состоящую из 2,5 г сердечного экстракта (Дифко), 12 г

желатина (Дифко) и 100 мл воды, разливали по пробиркам по 3 и 7 мл, автоклавировали при 121 ^{0}С в течение 10 минут. Перед охлаждением в каждую пробирку добавляли 1 мл стерильной сыворотки крови лошади и 0,25 мл 25 %-ного дрожжевого экстракта. Агаровый блок с культурами микоплазм переносили в пробирку со средой. Эту пробирку, пробирку с контрольным штаммом и пробирку с питательной средой, не засеянной культурами микоплазм, помещали в термостат при 37 ^{0}С на 30 суток. Реакцию учитывали 2 раза в неделю, предварительно охлаждая пробирки до 4 ^{0}С, в течение часа.

Определяя способность микоплазм редуцировать тетразоль, добавляли к 72-часовым культурам, выделенным на жидких средах, 0,5 %-ный водный раствор тетразоля, после 7–10 дней инкубации их в термостате при 37 ^{0}С положительной считали реакцию при окрашивании среды в красный цвет, которую наблюдали на средах с посевами микоплазм.

При определении потребности микоплазм в холестерине, бульонную культуру центрифугировали при 20 тыс. об/мин в течение 20 минут. Осадок отмывали фосфатным буфером 2 раза. Взвесь осадка использовали для засева пробирок с питательной средой без холестерина, в соотношении 1:10 и для чашек с мясопептонным агаром в количестве 0,1 мл. После инкубационного периода (3–5 суток) из пробирок и чашек Петри с засеянными культурами производили пассирование 4–5 раз. Микоплазмы, выделенные у телят, погибали в течение 1–2 пассажей.

Проводя определение чувствительности микоплазм к дигитонину, 75 мг дигитонина взвешивали и вносили в 5 мл этанола, помещенного в плотно закрывающиеся пробирки. Смесь подогревали на водяной бане до полного растворения дигитонина. Диски стерильной фильтровальной бумаги, диаметром 6 мм, помещали в стерильные чашки Петри так, чтобы они не соприкасались. На каждый диск наносили 0,025 мл раствора дигитонина, высушивали в течение 8 часов при температуре 37 ^{0}С и хранили при 4 ^{0}С.

Исследуемую культуру добавляли таким образом, чтобы получить разведение, содержащее 10^5 КОЕ/мл. Наносили 0,2 мл разбавленной культуры на поверхность твердой среды, в виде протекающей капли. Засеянные чашки высушивали в течение 10 минут, затем на центр полосы протекающей капли накладывали диски, содержащие дигитонин. Культивировали при температуре 37 ^{0}С, измеряя зону ингибиции роста в мм от края диска до края зоны ингибиции. Наблюдали рост культур микоплазм на расстоянии 2–15 мм от края диска.

Проводили наблюдения также за образованием пленки и пятен, для чего в 90 мл агаровой суспензии (Дифко), содержащей сердечный экстракт, после охлаждения её до 50 ^{0}С, добавляли 20 мл стерильной сыворотки крови лошади, 13,6 мл яичного желтка, разбавленного 1:1 стерильным физиологическим раствором, 10 мл 25 % раствора дрожжевого экстракта, 1,2 мл 0,2 %-ного раствора дезоксирибонуклеиновой кислоты, 1,0 мл 1 %-ного раствора ацетата таллия и 0,25 мл раствора пенициллина, содержащего 20 тыс. ЕД/мл. Затем среду разливали по чашкам Петри и высевали исследуемые и контрольные культуры. Инкубировали их при 37 ^{0}С в течение 14 суток, ежедневно просматривая под микроскопом. В течение этого периода не наблюдали образования плёнки и пятен, а наоборот, среда вокруг колоний микоплазм была прозрачной.

Микоплазмы *M. arginini* и *Ureaplasma sp*., обнаруженные у телят в хозяйствах Омской области, были аналогичны таковым, выделенным ранее на кафедре эпизоотологии и инфекционных болезней ИВМ ОмГАУ О.В. Вологодской (2006), от коров родильно-профилакторного периода, что свидетельствует о передаче возбудителей от коров матерей телятам. Дополнительно был выделен вид *M. bovirhinis* (табл. 3.36).

Основные свойства микоплазм, выделенных от телят

Таблица 3.36

Патогенные свойства микоплазм

Род и вид	Ферментация глюкозы	Гидролиз аргинина	Уреазная активтивность	Пленка и пятна	Редукция тетразоля	Потребтребность в холестерине	Дигитонин чувствительность	Протеолитическая активость	Рост при 22 ^{0}С
M. bovirhinis	+	-	-	-	+	+	+	+	-
M. arginini	-	+	-	-	-	+	+	+	-
Ureaplasma sp.	-	-	+	-	-	+	+	+	-

Патогенность штаммов микоплазм, выделенных от телят в хозяйствах Омской области, изучали на белых мышах. Для этого использовали полевые штаммы *M. bovirhinis, M. arginini, Ureaplasma sp*., выделенные от телят. С этой целью мышей заражали трехсуточными культурами микоплазм, сконцентрированными в 100 раз, с помощью центрифугирования при 6000 g и трехкратного ресуспендирования в 0,85 %-ном физрастворе. Для микроскопии мазков из патологического материала их окрашивали по Граму и Романовскому-Гимзе.

При бактериологическом исследовании использовали три специальные диагностические жидкие и плотные питательные среды для индикации аргинин- глюкозоферментирующих микоплазм и уреаплазм.

В опыт взяли 20 белых мышей массой по 20 г, которых разделили на 4 группы, 3 опытных и 1 контрольная (интактная), по 5 голов в каждой группе. Культуры микоплазм вводили внутрибрюшинно, однократно в объеме 0,5 мл. На второй день после заражения наступила гибель всех мышей. Мыши контрольной группы были девитализированы на десятые сутки.

При бактериологическом исследовании микоплазмы были обнаружены в опытных группах у всех животных (табл. 3.37). В патматериале из паренхиматозных органов девитализированных мышей контрольной группы микоплазмы не были обнаружены.

Таблица 3.37

Инфицированность органов при экспериментальном микоплазмозе мышей

№ п/п	Группы животных	Выделено микоплазм, %				
		Печень	Почка	Легкое	Селезенка	Половые органы
1	*M. bovirhinis*	100	100	100	100	80
2	*M. arginini*	100	80	100	100	80
3	*Ureaplasma sp.*	100	100	100	100	100
4	Контрольная	-	-	-	-	-

Результаты проведенного опыта подтверждают высокую патогенность выделенных от телят микоплазм. При 100 %-ной летальности индекс инфицированности органов *M. bovirhinis* составил 96, *M. arginini* – 92, *Ureaplasma sp*. – 100.

3.5.4. Серологические методы диагностики микоплазмоза

Получение микоплазменных антигенов и диагностических сывороток для РНИФ

Исследования по данному разделу проводились с целью получения гипериммунных кроличьих сывороток с высоким титром антител против полевых штаммов микоплазм, выделенных от телят, и микоплазменных антигенов для реакции непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ).

Кроликов экспериментальных групп гипериммунизировали по схеме, описанной в материалах и методах. Антигены для РНИФ готовили из выделенных от телят, трехсуточных инактивированных на водяной бане при 70 ^{0}С в течение 30 минут культур (*M. bovirhinis, M. arginini* и *Ureaplasma sp*.), которые отмывали от питательной среды путем центрифугирования при 6000 g 30 минут. Осадок после трехкратного ресуспензирования и последующего центрифугирования разводили до концентрации 1,7 млрд микробных клеток в 1 мл по бактериальному стандарту мутности (ГИСК им. Л.А. Тарасевича). Кроликов разделили на 3 группы, по 2 головы на каждый штамм, которым вводили убитые культуры микоплазм (табл. 3.38).

Таблица 3.38

Схема гипериммунизации кроликов культурами микоплазм

Время введения, сут.	1	4	7	10	13	16	20	24
Доза антигена, млрд м.т.	0,85	1,7	1,7	1,7	3,4	3,4	3,4	3,4
Левамизол, мл	1	1	-	-	-	-	-	-

Синтез антител изучали в динамике на 7, 14, 21 и 30-е сутки после гипериммунизации в реакции непрямой иммунофлюоресценции, которую ставили на предметных стеклах по описанной выше методике, учет реакции проводили в крестах, свечение менее чем на два креста считали отрицательным (рис. 3.9).

На 7-й день после иммунизации антитела в РНИФ на все виды микоплазм выявлялись в низких титрах 1:10 – 1:20.

На 14-й день титр антител повысился с 1:10 до 1:640 на все вводимые антигены, а на 30-е сутки синтез микоплазмозных антител достиг максимального уровня 1:640 – 1:2560.

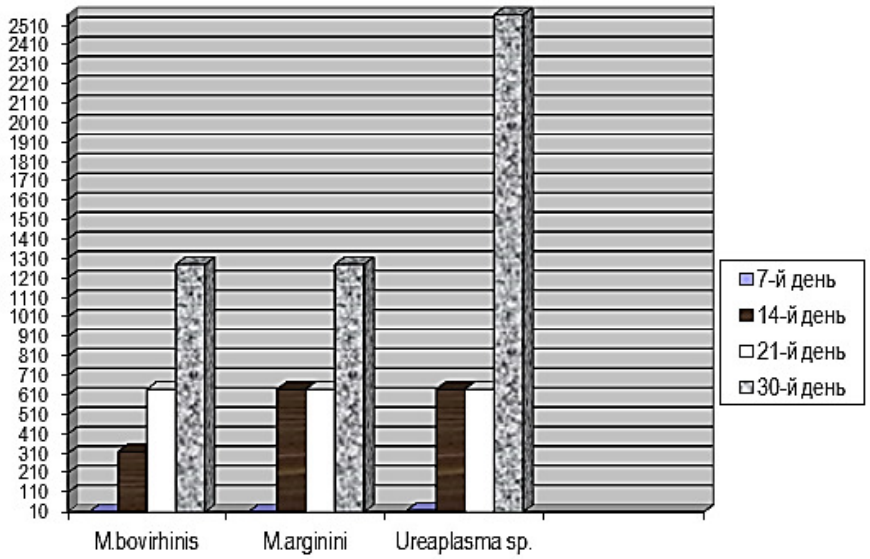


Рис. 3.9. Динамика синтеза антител у кроликов, гипериммунизированных культурами микоплазм: 7-е сут. – А, Г – 1:10, У – 1:20; 14-е сут. – А, У – 1:640, Г – 1:320; 21-е сут. – А, Г, У – 1:640; 30-е сут. – А, У – 1:1280, Г – 1:2560

Таким образом, нами были получены три высокоактивные кроличьи сыворотки с диагностическим титром 1:640 – 1:2560 в РНИФ для индикации из биоматериала (бронхоальвеолярная

слизь) больных телят и патологического материала от *M. bovirhinis, M. arginini* и *Ureaplasma sp*.

3.5.5. Специфичность и активность сывороток и антигенов в РНИФ

На следующем этапе исследований определяли специфичность и активность полученных микоплазмозных сывороток и антигенов в РНИФ. Для этих целей применяли кроличьи антимикоплазмозные сыворотки в разведениях 1:10 – 1:2560 и антигены, полученные вышеописанным способом. Для изучения специфичности антигенов в РНИФ применяли антимикоплазмозные сыворотки в разведении 1:10, а также сыворотки против хламидий, лептоспир, листерий, сальмонелл, коксиелл, эшерихий. При этом установили высокую видовую специфичность и чувствительность полученных микоплазмозных кроличьих сывороток в РНИФ, которые реагировали только с аналогичными антигенами, достигая активности антител до уровня 1:1280 – 1:2560 (табл. 3.39).

Таблица 3.39

Видовая специфичность и активность полученных микоплазменных кроличьих сывороток в РНИФ

Антигены	Сыворотки: 1-1:20, 2-1:40, 3-1:80, 4-1:160, 5-1:3320, 6-1:640, 7-1:1280, 8-1:2560																							
	M. bovirhinis								*M. arginini*								*Ureaplasma sp.*							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
M. bov.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M. arg.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea. sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Микоплазмозные антигены также показали высокую гетерологичную специфичность с сыворотками против хламидий, ИТР, листерий, диплоккоков, эшерихий и сальмонелл в РНИФ. Положительная же реакция отмечалась только с аналогичными кроличьими антисыворотками (табл. 3.40).

Таблица 3.40

Специфичность микоплазменных антигенов в РНИФ

Антигены	Сыворотки 1:10 против:							
	хлами-диоза	ИРТ	диплокок-коза	эшери-хиоза	сальмо-неллёза	Г	А	У
M. bovirhinis	-	-	-	-	-	+	-	-
M. arginini	-	-	-	-	-	-	+	-
Ureaplasma sp.	-	-	-	-	-	-	-	+

Примечание: сыворотки против Г– *M. bovirhinis*, А – *M.arginini* и У – *Ureaplasma sp*.

3.5.6. Получение эритроцитарного диагностикума для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА)

Для конструирования микоплазмозного эритроцитарного диагностикума в качестве клеточной основы использовали эритроциты барана, а для их стабилизации 20 %-ный формальдегид.

Антиген готовили из культур выделенных штаммов микоплазм. После трехсуточной инкубации культур в термостате при 37 ^{0}С их отмывали центрифугированием (6000 g 30 мин.). После 3-кратного ресуспензирования с последующим центрифугированием, осадки трех культур смешивали в равных частях, разводили физраствором 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 и прогревали в течение 30 мин на водяной бане при 70 ^{0}С.

Формалинизированные 3 %-ные эритроциты сенсибилизировали различными разведениями смесью трех антигенов микоплазм (1:5 – 1:80) в соотношении два обьёма антигена и один обьём эритроцитов на водяной бане при температуре 70 ^{0}С в течение 30 минут, через каждые 5 минут перемешивая взвесь. За 10 мин до окончания сенсибилизации добавляли 1 % формальдегида для закрепления сенсинита на эритроцитах.

Для контроля пригодности диагностикума проводили постановку РНГА макрометодом в объеме 0,5 мл в полистироловых пластинках с микоплазмозными (Г, А, У) и смешанной (Г + А + У) микоплазмозными сыворотками в разведениях от 1:10 до 1:2560. В качестве разбавителя применяли фосфатный буфер рН-6,4, что делает результаты реакции более демонстративными, чем при применении физиологического раствора. Для контроля использовали отрицательную сыворотку и фосфатный буферный раствор.

С тремя микоплазмозными сыворотками диагностикум реагировал на четыре креста до разведения 1:320, со смешанной против трех видов микоплазм сывороткой – на три креста до разведения 1:640. С отрицательной сывороткой во всех разведениях и буферным физиологическим раствором реакция была отрицательной (табл. 3.41).

При изучении специфичности микоплазменного эритроцитарного диагностикума (МЭД) в РНГА установлено, что оптимальным разведением антигена для сенсибилизации формалинизированных эритроцитов является 1:10, при котором отсутствовали перекрестные реакции с хламидиозной, эшерихиозной и противоинфекционного ринотрахеита сыворотками, тогда как при разведении антигена 1:5 РНГА с данными сыворотками была положительной.

С гомологичными микоплазменными сыворотками с титром 1:20 отмечалась реакция на четыре креста при разведении антигена 1:10, на три креста – при разведении 1:20, на два креста – при разведении 1:40 и отсутствие реакции с микоплазменными сыворотками при использовании МЭД, разведенного 1:80 (табл. 3.42).

Таким образом, полученный эритроцитарный диагностикум можно использовать для диагностики микоплазмоза телят, принимая за диагностический титр в РНГА разведение испытуемой сыворотки 1:20.

Таблица 3.41

Активность микоплазменного эритроцитарного диагностикума (МЭД) в РНГА

Титр сывороток	Микоплазмозные сыворотки			Г+А+У- сыворотка	Негативная сыворотка	ФБР
	Г	А	У			
1:10	++++	++++	++++	++++	-	-
1:20	++++	++++	++++	++++	-	-
1:40	++++	++++	++++	++++	-	-
1:80	++++	++++	++++	++++	-	-
1:160	++++	++++	++++	++++	-	-
1:320	++++	++++	++++	++++	-	-
1:640	-	-	-	+++	-	-
1:1280	-	-	-	+	-	-
1:2560	-	-	-	+	-	-

Таблица 3.42

Специфичность МЭД в РНГА

Разведения МЭД	Титр сывки	Сыворотки					Г	А	У
		хлам	ИРТ	сальм.	дипл.	эшер.	1/20	1/20	1/20
1:5	1:5	+++	+++	-	-	+++	++++	++++	++++
1:10	1:10	-	-	-	-	-	++++	++++	++++
1:20	1:20	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
1:40	1:40	-	-	-	-	-	++	++	++
1:80	1:80	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: хлам. – хламидиозная; ИРТ – сыворотка противинфекционного ринотрахеита; сальм. – сальмонеллезная; дипл. – диплококковая; эшер. – эшерихиозная; Г – глюкозоферментирующая (*M. bovirhinis*), А – аргининферментирующая (*M. arginini*), У – уреаплазмозная (*Ureaplasma sp*).

3.5.7. Сравнительная оценка диагностической ценности микробиологического и серологического (РНИФ, РНГА) методов диагностики микоплазмоза телят в производственных условиях

Чувствительность микробиологического метода диагностики изучали в сравнении серологическими методами (РНИФ, РНГА) с применением полученных нами сывороток и антигенов. Материалами для исследований являлись патологический материал от погибших, вынужденно убитых телят и абортированных плодов, бронхоальвеолярные смывы, сыворотка крови, внутрисуставная жидкость от телят из восемнадцати хозяйств Омской области.

В патологическом материале от погибших и вынужденно убитых телят и абортированных плодов из ЗАО имени Кирова были выявлены глюкозоферментирующие микоплазмы на питательных средах в 33 % случаев, а в РНИФ – в 88 % проб; аргинин-утилизирующие микоплазмы выделили на средах из 88 % проб, в РНИФ – в 77 %; уреаплазмы на питательных средах не выделились, тогда как в РНИФ их антигены зарегистрировали в 77 % пробах (табл. 3.43). В патологическом материале ЗАО имени Розы Люксембург глюкозоферментирующие микоплазмы на питательных средах были выделены из органов в 15 %, тогда как

в РНИФ из 35 % проб; присутствие аргининферментирующих микоплазм в 90 % проб и уреаплазм в 100 % подтвердилось как микробиологическим, так и серологическим методами.

Таблица 3.43

Чувствительность микробиологического метода в сравнении с РНИФ при исследовании патологического материала от погибших и вынужденно убитых телят и абортированных плодов

Хозяйства	Голов/ проб	На средах, %			В РНИФ, %		
		Г	А	У	Г	А	У
ЗАО имени Кирова*	3/9	33	88	-	88	77	77
ЗАО имени Розы Люксембург	4/20	15	90	100	35	90	100
ООО «Сосновское»	2/6	67	33	83	67	67	-
Всего:	9/35	38	70	61	63	78	59

В ООО «Сосновское» глюкозоферментирующие микоплазмы на питательных средах так же, как и в РНИФ, были выделены из 67 % проб; аргининферментирующие микоплазмы выделили на средах в 33 % проб, а в РНИФ – в 67 %; уреаплазмы на питательных средах выделялись в 83 % случаев, тогда как в РНИФ их антигены не обнаруживались. Для сравнения чувствительности РНИФ и бактериологического метода исследовали бронхоальвеолярную слизь от телят из пяти хозяйств: ЗАО имени Кирова, СПК «Новороссийский», ООО «Русское зерно», СПК «Украинский», СПК «Некрасовский». Глюкозоферментирующие микоплазмы на питательных средах выявляли в пределах от 30 до 40 %, в РНИФ – 20–40 %. Частота выделенных на питательных средах *M. arginini* 30–90 %, в РНИФ – 20–80 %. Уреаплазмы были выделены на питательных средах в 20–60 % проб исследуемого материала, а в РНИФ несколько меньше – в 10–50 % случаев (табл. 3.44). Для сравнения чувствительности РНИФ с сывороткой крови и микробиологческого метода исследовали биоматериал из СПК «Некрасовский», ООО «Русское зерно».

Таблица 3.44

Чувствительность РНИФ и микробиологического метода исследования бронхоальвеолярной слизи телят

Хозяйства	Кол-во голов	Выделено на питательных средах, %			Выделено в РНИФ, %		
		Г	А	У	Г	А	У
ЗАО им. Кирова	10	40	90	40	40	80	40
СПК Новороссийский	10	-	-	-	20	20	10
СПК Украинский	15	-	-	-	25	-	50
ООО Русское зерно	20	40	70	60	20	40	30
СПК Некрасовский	10	30	30	20	-	-	-
Всего:	65	22	38	24	21	28	26

В бронхоальвеолярной слизи от телят СПК «Некрасовский» на питательных средах отмечали рост *M. bovirhinis* и *M. arginini* в 30 % случаев, уреаплазм – в 20 %, в сыворотке крови от этих же животных были выявлены антитела к *M. bovirhinis* и *M. arginini* также в 30 % случаев, а уреаплазм – в 10 %. У телят из ООО «Русское зерно» на питательных средах было выделено глюкозоферментирующих микоплазм 40 %, аргининферментирующих 70 % и уреаплазм 60 %, а в РНИФ – 35, 85 и 30 % соответственно (табл. 3.45).

Таблица 3.45

Чувствительность РНИФ с сывороткой крови в сравнении с бактериологическим методом

Хозяйства	Кол-во голов	На питательных средах, %			РНИФ, %		
		Г	А	У	Г	А	У
СПК «Некрасовский»	10	30	30	20	30	30	10
ООО «Русское зерно»	20	40	70	60	35	85	30
Всего:	30	35	50	40	32,5	57,5	20

Примечание: антигены Г – *M. bovirhinis*, А – *M.arginini*, У – *Ureaplasma sp*.

Таким образом, при сопоставлении микробиологического метода с РНИФ показано, что при прижизненном исследовании бронхоальвеолярных смывов и сыворотки крови больных телят микоплазмоз регистрируется в 22 %, 35–38 %, 50 %; в 21 %, 20–28 %, 57,5 % случаев, а посмертно – в 61–70 % и 59–78 % соответственно.

Для сравнительной оценки РНГА и РНИФ провели выборочные исследования биоматериала от 138 телят (сыворотка крови, бронхоальвеолярные смывы) с клиническими признаками коньюнктивита, бронхита, бронхопневмонии, артритами, диареи (табл. 3.46) и от 100 здоровых животных из десяти хозяйств Омской области под контролем микробиологического исследования.

Так как специфичность и активность микоплазмозных антигенов и кроличьих антимикоплазмозных сывороток подтверждается результатами микробиологических исследований, то с их помощью можно проводить прижизненные исследования, идентифицировать микоплазмы по антигенной структуре. Наиболее чувствительным диагностическим тестом является РНИФ, с помощью которого выявляется 79,4–85,3 % больных микоплазмозом телят по результатам исследования сыворотки крови и бронхоальвеолярных смывов соответственно.

Таблица 3.46

Оценка диагностической ценности РНГА и РНИФ в производственных условиях при микоплазмозе телят

№ хоз-ва	Хозяйства	Кол-во телят	РНИФ в %		РНГА в %		Микробиологический метод, %
			сыворотка крови	бронхоальвеолярные смывы	сыворотка крови	бронхоальвеолярные смывы	
1	«Большевик»	20	67	90	35	70	90
2	Им. «Кирова»	20	100	100	35	85	100
3	«Россия»	20	75	85	70	80	90
4	Новороссийский	10	80	80	60	80	80
5	«Русское зерно»	10	90	90	60	90	70
6	«Сосновское»	10	70	90	70	90	50
7	«Некрасовский»	18	72	78	72	72	78
8	Им. Розы Люксембург	10	100	100	90	100	100
9	«Нива»	10	100	100	90	100	100
10	«Новоцарицино»	10	40	40	40	40	40
	Всего:	138	79,4	85,3	62,2	80,7	79,8

При исследовании бронхоальвеолярных смывов регистрируется на 5,9 % больше больных животных и с более высоким уровнем антител, что свидетельствует о выработке, наряду с общим, «местного» иммунитета у телят. РНГА по чувствительности незначительно уступает РНИФ.

Так, с помощью данного теста при исследовании сыворотки крови и бронхоальвеолярных смывов выявлено в среднем по десяти хозяйствам 62,2–80,7 % больных микоплазмозом телят, что на 17,2–4,6% соответственно меньше, чем в РНИФ (см. цветную вкл., рис. 3). Здесь также установлена аналогичная закономерность, указывающая на более высокий уровень антител в бронхоальвеолярных смывах, чем в сыворотке крови. При этом количество реагирующих животных тоже было на 18,5 % больше. Комплексное применение РНГА и РНИФ для исследования сыворотки крови и бронхоальвеолярных смывов позволяет более полно выявлять больных микоплазмозом телят. Так, в РНИФ по результатам исследования сыворотки крови выявлено 79,4 % телят, а при комплексном исследовании сыворотки крови и бронхоальвеолярных смывов с помощью данного теста зарегистрировано 81,5 % таких животных. Также в РНГА с сывороткой крови и в РНГА с бронхоальвеолярными смывами вместе выявлено 71 % реагирующих на микоплазмоз телят, тогда как только в РНГА с сывороткой крови реагировало 62,2 % животных. По результатам исследования бронхоальвеолярных смывов с помощью РНГА и РНИФ вместе зарегистрировано 84,5 % реагирующих на микоплазмоз телят, а в одной РНГА только 80,7 %.

В РНИФ с сывороткой крови дополнительно к РНГА было выявлено от 5 до 65 % телят (в среднем 22,5 %), в то же время в РНИФ с бронхоальвеолярными смывами дополнительно к РНГА обнаружено от 5 до 20 % (в среднем 6 %) животных. С помощью же РНГА при исследовании сыворотки крови удалось дополнительно к РНИФ выявить от 10 до 20 % (в среднем 4 %), реагирующих на микоплазмоз телят, а при исследовании бронхоальвеолярных смывов – до 10 % (в среднем 2 %). При этом положительные результаты серологических исследований подтверждаются выделением микоплазм при микробиологическом исследовании бронхоальвеолярных смывов телят в 79,8 % случаев. Это указывает на высокую диагностическую ценность РГНА и РНИФ для диагностики микоплазмоза телят.

При выборочном исследовании сыворотки крови и бронхоальвеолярных смывов от 100 клинически здоровых телят из данных хозяйств в РНГА и РНИФ результаты были отрицательными, что указывает на специфичность этих тестов.

3.5.8. Средства и методы лечения телят при микоплазмоз-ассоциированной инфекции

Чувствительность полевых культур микоплазм к антибактериальным препаратам *in vitro.* При изыскании средств лечения животных при микоплазмоз-ассоциированной инфекции определяли чувствительность полевых культур микоплазм к антибактериальным препаратам методом серийных разведений.

С целью определения чувствительности к препаратам использовали культуры микоплазм с титром, равным 10 тыс. цветообразующих единиц (ЦОЕ). Чувствительность определяли по отсутствию роста на жидких питательных средах с добавлением антибиотиков, в контрольные среды антибиотик не добавляли. Высокая чувствительность культур микоплазм была отмечена к тетрациклину – 80 %, тетра-триметосулу – 52 %, левотетрасульфину – 44 %, энрофлоксацину – 68 % и норфлоксацину – 64 %. Исследование культур на средах с левомицетином показало рост культур микоплазм в 93 % проб, а на средах с добавлением амоксициллина – в 50 % проб (см. цветную вкл., рис. 4).

Менее чувствительны культуры микоплазм к эритромицину, сульфадимезину, тиланику, триметаприму, не чувствительны – к бензилпенициллину. Микоплазмы более чувствительны к антибиотикам, чем уреаплазмы, что подтверждается результатами проведенных исследований (табл. 3.47).

Наибольшей активностью *in vitro* в отношении культур, выделенных из респираторного тракта телят, обладали препараты тетрациклинового (тетрациклин, левотетрасульфин, тетра-триметосул) и фторхинолонового ряда (энрофлоксацин, норфлоксацин). Данные препараты были испытаны в опытах при

изучении схем лечения микоплазмоз-ассоциированной инфекции телят в производственных условиях.

Таблица 3.47

Чувствительность культур микоплазм к антибактериальным препаратам *in vitro*

Препараты	*M. bovirhinis*	*M. arginini*	*Ureaplasma sp.*
	Чувствительность,% (n=21)	Чувствитель-ность,% (n=21)	Чувствитель-ность,% (n=21)
Тетрациклин	87	80	74
Энрофлоксацин	82	77	46
Норфлоксацин	75	68	49
Левотетрасульфин	67	38	27
Тетра-триметосул	65	52	39
Амоксициллин	54	41	38
Эритромицин	50	18	22
Левомицетин	18	16	19
Сульфадимезин	14	12	0
Триметоприм	15	10	0
Тиланик	10	12	0
Бензилпенициллин	0	0	0
Контроль	-	-	-

3.5.9. Схемы лечения телят и лабораторные методы контроля их эффективности

Действие различных схем лечения испытывали на 45 телятах с клиническими признаками бронхопневмонии, артритов, кератоконъюнктивитов и положительными результатами лабораторных исследований (табл. 3.48).

Таблица 3.48

Схемы лечения телят при микоплазмоз-ассоциированной инфекции

Группы животных	Характеристика групп	Применяемые препараты	Продолжитель-ность лечения, дней
Опыт 1			
1-я	Хлам. +лепт. +лист.+ сальм. +паст. +мик.+ эш.	Амоксициллин (однократно)	10
2-я	Хлам. +дипл +мик.+эш.	Тетратриметасул (двукратно с интервалом 3 дня)	10
3-я	Хлам. +лепт. +сальм.+мик. +эш.	Левотетрасульфин (двукратно с интервалом 3 дня)	10
4-я	Хлам. +лепт. +сальм. +паст. +мик. +эш.	Энроксил (3 дня подряд)	10

5-я	Хлам. +лепт. +лист. +сальм. +паст. +мик. + эш.	Контрольная группа, леченная по традиционной схеме, применяемой в хозяйстве (поливалентная сыворотка против сальмонеллеза, пастереллеза, парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита, миксоферон и тиланик)	10
Опыт 2			
6-я	Хлам. +лепт. +лист. +дипл. +паст. +мик. +эш.	Амоксициллин (двукратно с интервалом 24 часа) + левотетрасульфин ПЭГ через 6 дней (двукратно с интервалом 3 дня)	15
7-я	Хлам. +лепт. +лист.+дипл. +паст. +мик. + эш.	Энрофлокс (трёхкратно с интервалом 24 часа) + стрептомицин через 6 дней (двукратно с интервалом 3 дня)	18
8-я	Хлам. +лепт. +лист. +дипл. +паст. +мик. + эш.	Контрольная нелеченая группа	-
9-я	Клинически здоровые животные	Контрольная интактная группа	-

Примечание: хлам. – хламидиоз; лепт. – лептоспироз; лист. – листериоз; сальм. – сальмонеллез; мик. – микоплазмоз, эш. – эшерихиоз.

Первый производственный опыт был поставлен в ЗАО имени Кирова, а второй – в ЗАО имени Розы Люксембург. До лечения и через 10 дней после лечения исследовали сыворотку крови, бронхоальвеолярные смывы, фекальные массы и слизь из прямой кишки серологическими методами: реакция прямой (РПИФ) и непрямой (РНИФ) иммунофлюоресценции.

В качестве антигенов и антисывороток использовали стандартные диагностикумы для РА и РСК, инактивированные вакцинные штаммы, стандартные люминисцентные антивидовые кроличьи, бычьи сыворотки для РНИФ; люминисцентные (сальмонеллезные типы А, В, D), листериозная для РПИФ сыворотки, изготовленные НИИЭМ имени Гамалеи, а также полученные нами кроличьи сыворотки против хламидий, ИРТ-ПВ, диплококков и микробиологические – с применением жидких и плотных питательных сред для индикации и идентификации микоплазм. Критериями оценки эффективности схем лечения служили клинические признаки, сохранность телят и от-

сутствие или снижение количества животных-микробоносителей после лечения.

Опыт I (табл. 3.49). Больных телят 1–3-месячного возраста разделили на пять групп по 5 голов в каждой. Животных четырех опытных групп лечили по разным схемам, а контрольную – по традиционной схеме, применяемой в хозяйстве.

Опыт II (табл. 3.50). Аналогично первому опыту телят разделили на четыре группы по 5 голов в каждой. Животных двух опытных групп лечили по разным схемам, животных третьей (контрольной) группы не подвергали лечению, в четвёртую (контрольную) входили здоровые животные.

Результаты исследования

Опыт I. По результатам бактериологических исследований после лечения количество животных-носителей аргининзависимых микоплам в 1-й группе сократилось на 60 %, в 4-й – на 20 %, а во 2, 3, 5-й группах не изменилось. Количество животных-носителей глюкозозависимых микоплазм в 1, 3-й группах сократилось на 40 %, в 4-й – микоплазмы не выделялись, а во 2-й и 5-й группах количество их не изменилось. Число животных-уреаплазманосителей во 2, 3-й группах сократилось на 20 %, в 4-й – на 40 %, а в 1, 5-й группах не изменилось (рис. 3.12).

По снижению инфицированности животных микоплазмами эффективность применяемых схем лечения составила 20–100 %. Полностью удалось освободить организм телят только от глюкозоферментирующих микоплазм при лечении их по 4-й схеме с применением энроксила.

Таблица 3.49

Опыт 1. Изучение схем лечения при микоплазмоз-ассоциированной инфекции телят

№ п/п	Микоплаз-моносителей, %			Реагировало в РНИФ, % до и после лечения												Выделено возбудителей инфекционных болезней, %													
				сыворотка крови						б/а смывы						б/а смывы						фекальные массы и слизь из прямой кишки							
				Антитела												Антигены						Антигены E. coli					Сальмонеллы		
	А	Г	У	Хлам	ИРТ	Лепт	Лист	Сал	Паст	Хлам	ИРТ	Лепт	Лист	Сал	Паст	Хлам	Лепт	Лист	Сал	Паст	Дипл	К-88	К-99	987-Р	F-41	А-20	Тип А	ТипВ	Тип D
I схема (амоксициллин, однократно)																													
Всего	100/40	80/40	100/100	80/60	20/0	20/20	20/20	40/20	40/20	60/60	20/20	0/0	20/20	20/0	20/0	20/20	20/0	80/60	40/20	20/0	0/0	80/0	40/0	40/20	40/0	80/0	40/0	100/0	0/0
II схема (тетратриметасул, двукратно с интервалом 3 дня)																													
Всего	100/100	20/20	100/80	60/20	60/40	80/80	0/0	20/0	40/0	60/60	60/0	100/80	20/0	20/0	40/20	40/0	60/0	0/0	0/0	0/0	40/0	60/0	60/0	80/0	80/0	20/0	20/0	40/0	40/20
III схема (левотетрасульфин, двукратно с интервалом 3 дня)																													
Всего	100/100	60/20	100/80	60/60	60/60	40/40	0/0	40/20	20/0	40/40	60/40	60/40	20/20	0/0	0/0	40/0	40/0	0/0	60/0	0/0	0/0	60/0	60/0	80/20	60/0	60/0	80/0	60/0	40/0
IV схема (энроксил, 3 дня подряд)																													
Всего	80/60	60/0	80/40	40/40	0/0	20/20	0/0	40/40	0/0	40/40	40/40	40/40	0/0	20/20	20/20	20/20	60/40	0/0	40/0	40/0	0/0	40/0	40/0	20/0	100/0	20/0	60/0	40/0	0/0
V схема (контроль, лечение по традиционной схеме, применяемой в хозяйстве)																													
Всего	80/80	100/100	100/100	100/100	100/10	100/100	100/10	100/100	100/10	100/10	100/10	100/100	100/10	100/10	100/10	100/100	100/20	100/40	100/80	100/40	100/0	60/20	80/40	100/20	60/20	100/40	100/60	100/60	100/100

Примечание: 1-я группа (1-я схема) – погиб 1 теленок, 4-я группа (4-я схема) – погиб 1 теленок, 5-я группа (5-я схема) – погибло 2 теленка.

Анализ данных по синтезу антител в сыворотке крови животных показал, что реагирующие животные в РНИФ в 1-й группе на ИРТ полностью исчезли, на хламидиоз, сальмонеллёз и пастереллёз их количество уменьшилось на 20 %; при исследовании сыворотки крови животных из 2-й группы антитела против пастереллёза и сальмонеллёза не были обнаружены, на хламидиоз количество реагирующих животных снизилось на 40 %, на ИРТ – на 20 %; у животных 3-й группы пастереллёзные антитела не были выявлены, а количество сальмонеллёзных антител снизилось на 20 %; в 4-й и 5-й группах данные не изменились (рис. 3.13).

Уменьшился также процент реагирующих животных в РНИФ с бронхоальвеолярными смывами. В 1-й группе отсутствовали положительно реагирующие животные на сальмонеллез и пастереллез, а во 2-й группе – на ИРТ, листериоз и сальмонеллез; количество реагирующих животных во 2-й группе на лептоспироз и пастереллез снизилось на 20 %; в 3-й – на ИРТ и лептоспироз на 20 %; в 4-й и 5-й группах число реагирующих телят осталось без изменений (рис. 3.14).

При анализе процентного соотношения антигенов различных ассоциаций микроорганизмов в бронхоальвеолярных смывах установлено, что у животных 1-й группы лептоспиры и пастереллы полностью элиминировали из организма животных, а количество животных-носителей листерий и сальмонелл уменьшилось на 20 %. Не регистрировались животные-носители хламидий, лептоспир, диплококков во 2-й группе; хламидий, лептоспир и сальмонелл – в 3-й; сальмонелл и пастерелл – в 4-й диплококков – в 5-й; а количество носителей лептоспир в 4-й группе уменьшилось на 20 %; в 5-й – на 80 %, в этой группе также снизилось количество листерий и пастерелл – на 60 %, сальмонелл – на 20 % (рис. 3.15).

При исследовании фекальных масс телят установлено, что в 1-й группе носители энтеротоксигенных адгезивных антигенов кишечной палочки К-88, К-99, F-41, А-20, сальмонелл типа А и

В отсутствовали, а количество носителей антигена 987-Р уменьшилось на 20 %.

Во 2-й группе на 20 % сократилось количество сальмонелл типа D, а типы А и В не обнаруживались, животные-носители энтеротоксигенных адгезивных антигенов кишечной палочки полностью отсутствовали.

У телят 3-й и 4–й групп они тоже не регистрировались, за исключением 987-Р, который был выделен у 60 % животных в 3-й группе.

В 5-й группе количество животных-носителей энтеротоксигенных адгезивных антигенов кишечной палочки 987-Р снизилось на 80 %; К-88, К-99 и F-41 – на 40 %, А –20, сальмонелл типа А, В и D – на 60 % (рис. 3.16).

По сохранности телят эффективными были 2, 3-й группы (100 %), в 1, 4-й она составила 80 %, а в 5-й – 60 %. По лабораторным методам контроля (отсутствие микоплазмоносительства и др. микроорганизмов) эффективность 1, 4-й схемы составила 80 %, а 5-й – 60 %.

Опыт II (табл. 3.51). В контрольной группе у здоровых животных реакции на инфекционные болезни и микробоносительство отсутствовали на протяжении всего опыта, тогда как в контрольной группе больных животных в течение 3–7 дней после начала опыта погибло 4 телёнка.

По результатам бактериологического исследования, проведенного после лечения, количество животных-носителей аргининзависимых микоплазм в 1-й группе сократилось на 60 %, во 2-й группе они не выявлялись.

Таблица 3.51

Опыт 2. Изучение схем лечения телят при микоплазмоз-ассоциированной инфекции

№ п/п	Микрплазмо-носителей, %			Реагировало в РНИФ, %												Выделено возудителей инфекционных болезней,%												
				сыворотка крови						б/а смывы						б/а смывы					фекальные массы и слизь из прямой кишки							
				антитела												антигены					антигены E.coli					сальм.		
	А	Г	У	Хлам	ИРТ	Лепт	Лист	Сальм	Паст	Хлам	ИРТ	Лепт	Лист	Сальм	Паст	Хлам	Лепт	Лист	Дипл	Паст	К-88	К-99	А-20	987-Р	F-41	Тип А	Тип В	Тип D
1 группа 6 схема (Амоксициллин, двукратно с интервалом 24 часа + левотетрасульфин ч/з 6 дней, двукратно с интервалом 3 дня)																												
Всего	80/20	100/20	20/0	80/60	60/0	60/20	40/0	60/0	40/0	80/60	80/60	60/20	60/0	60/0	80/0	60/0	60/0	60/0	80/0	40/0	20/0	40/0	100/0	80/0	80/0	80/0	60/0	100/0
2 группа 7 схема (Энрофлокс трёхкратно с интервалом 24 часа +стрептомицин ч/з 6 дней, двукратно с интервалом 3 дня)																												
Всего	80/0	100/20	20/0	20/20	60/0	60/60	40/0	20/0	80/0	40/40	40/40	40/20	60/40	100/0	100/0	40/40	80/0	80/0	100/0	40/0	40/0	40/0	60/0	100/0	40/0	20/0	100/0	80/0

Примечание: числитель – до лечения, знаменатель – после лечения. Хлам – хламидиоз, ИРТ – инфекционный ринотрахеит, Лепт – лептоспироз, Лист – листериоз, Сальм – сальмонеллёз, Паст – пастереллёз, Дипл – диплококкоз.

Количество животных-носителей глюкозозависимых микоплазм в обеих группах сократилось на 80 %. Телята носители уреаплазм в этих группах не выявлялись (рис. 3.17). Следовательно, на аргининзависимые микоплазмы выраженный 100 %-ный терапевтический эффект оказало применение энрофлокса в сочетании со стрептомицином, а сочетание амоксициллина с левотетрасульфином было эффективным у 60 % животных. В отношении глюкозозависимых микоплазм одинаково эффективным оказалось сочетанное применение энрофлокса со стрептомицином и амоксициллина с левотетрасульфином (80 %). На уреаплазмы эффективно действовали как сочетания энрофлокса со стрептомицином, так и амоксицилина с левотетрасульфином (100 %).

Анализ данных по синтезу антител в сыворотке крови, показал, что реагирующие животные в 1, 2-й опытных группах (6, 7-я схемы) при исследовании на ИРТ, листериоз, сальмонеллез, и пастереллез не выявлялись, на лептоспироз их количество в 1-й группе снизилось на 40 %, во 2-й – осталось без изменений, на хламидиоз в 1-й группе снизилось на 20 %, во 2-й – осталось без изменений (рис. 3.18).

Уменьшился также процент реагирующих животных в РНИФ при исследовании бронхоальвеолярных смывов. Так, в 1-й группе положительно реагирующие животные на листериоз, сальмонеллез и пастереллез не регистрировались, на хламидиоз, ИРТ – их количество сократилось на 20 %, лептоспироз – на 40 %. Во 2-й группе животные, реагирующие на сальмонеллез и пастереллез, не выявлялись; а на лептоспироз и листериоз их количество снизилось на 20 %, на хламидиоз и ИРТ – осталось без изменений (рис. 3.19).

По результатам исследования бронхоальвеолярных смывов в опытных группах антигены возбудителей хламидиоза, лептоспироза, листериоза, диплококкоза, пастереллеза не были зарегистрированы, за исключением хламидий, которые были обнаружены у всех животных 2-й группы (рис. 3.20).

При исследовании фекальных масс телят 1-й и 2-й групп адгезивные энтеротоксигенные штаммы *E. coli* не выделялись (рис. 3.21).

Таким образом, установлена высокая чувствительность испытуемых питательных сред к микоплазмам респираторного тракта телят, которые позволяют выделить их и идентифицировать по основным показателям на микоплазмы и уреаплазмы. Микоплазмозные среды также можно применять для контроля микоплазмоносительства после лечения.

РНИФ и РПИФ могут использоваться для выявления антигенного дрейфа возбудителей инфекционных болезней в организме животных с целью контроля эффективности курса лечения через 10 дней после его проведения.

При микоплазмоз-ассоциированной инфекции с лептоспирозом, листериозом, пастереллезом, диплококкозом, наиболее эффективными являются 6, 7-я схемы лечения, включающие в себя сочетанное применение амоксициллина с левотетрасульфином и энрофлокса со стрептомицином.

3.5.10. Экономическое обоснование схем лечения телят при микоплазмоз-ассоциированной инфекции

По результатам внедрения схем лечения на примере ЗАО имени Розы Люксембург, в котором гибель телят была снижена в 3 раза за исследуемые периоды (2006 и 1-е полугодие 2007 года) со 120 до 36 голов, было дано экономическое обоснование по их применению (табл. 3.52).

Таблица 3.52

Расчётные данные для экономического обоснования при микоплазмозе телят

Показатели	Единицы измерения	Количество
1. Среднегодовое поголовье телят	голов	985
2. Количество заболевших животных	голов	200
3. Погибло животных в том числе молодняка	голов голов	51 36
4. Народилось телят	голов	968
5. Стоимость 1 ц молока	руб.	700
6. Стоимость телёнка при рождении	руб.	2527
7. Среднесуточный прирост живой массы	кг	0,6
8. Закупочная цена единицы массы	руб.	82
9. Выручка от реализации шкур	руб./шт	100
10. Количество выздоровевших телят	голов	84
11. Ветеринарные затраты	руб.	15000
12. Количество восприимчивых телят	голов	484

Расчет экономического ущерба

А. Ущерб от падежа телят, ($У_1$):

$$У_1 = М \cdot С_т + (В_п \cdot Т \cdot Ц) - С_ф,$$

где $М$ – количество павших телят (голов); $С_т$ – стоимость телёнка при рождении (руб.); $В_п$ – среднесуточный прирост живой массы, (кг); $Т$ – возраст павших телят (дн.); $Ц$ – закупочная цена единицы массы (руб.); $С_ф$ – выручка от реализации шкур (руб.);

$$С_т = 3{,}61 \cdot У,$$

где 3,61 – количество молока, которое можно получить за счёт коров, расходуемого на образование 1 головы приплода (ц); $У$ – закупочная цена 1 ц молока (руб.);

$$С_т = 3{,}61 \cdot 700 = 2527 \text{ руб.};$$

$$У_1 = 36 \cdot 2527 + (0{,}6 \cdot 30 \cdot 82) - 3600 = 88\,848 \text{ руб.}$$

Б. Ущерб от снижения привесов заболевших телят, $У_2$:

$$У_2 = М_з \cdot (В_з - В_б) \cdot Т \cdot У,$$

где $М_з$ – количество выздоровевших телят (голов); $В_з$, $В_б$ – среднесуточные привесы здоровых и больных телят в расчёте на 1 голову в сутки (кг); $Т$ – средняя продолжительность болезни (дн.);

$$У_2 = 84 \cdot (0{,}6 - 0{,}12) \cdot 10 \cdot 82 = 33062{,}4 \text{ (руб.)}.$$

В. Фактический ущерб от падежа телят и недополучения живой массы, ($У_3$):

$$У_3 = У_1 + У_2;$$

$$У_3 = 88848 + 33062{,}4 = 121910{,}4 \text{ (руб.)}.$$

Г. Ущерб на одно заболевшее животное, ($К_{у1}$):

$$К_{у1} = У : М_з,$$

где $У$ – экономический ущерб (руб.); $М_з$ – количество выздоровевших телят (голов); $К_{у1}$ = 121910,4:84 = 1451 (руб.).

Д. Ущерб на одно животное стада, ($К_{у2}$):

$$К_{у2} = У : М_о,$$

где $У$ – экономический ущерб (руб.); $М_о$ – количество полученных телят (голов);

$К_{у2}$ = 121910,4:484 = 252 (руб.).

Е. Ветеринарные затраты на одно заболевшее животное, ($К_{уз}$):

$$К_{уз} = З_в : З,$$

где $З_в$ – ветеринарные затраты (руб.); $З$ – количество заболевших телят (руб.);
$К_{уз}$ = 15000:200 = 75 (руб.).

Ж. Предотвращённый экономический ущерб, ($П_у$):

$$П_у = М_о \cdot К_з \cdot К_{у1} – У_з,$$

где $М_о$ – количество восприимчивых (голов); $К_з$ – коэфициент возможной заболеваемости; $К_{у1}$ – ущерб на одно заболевшее животное (руб.); $У_з$ – фактический экономический ущерб (руб.); $П_у$ = 484 ·0,62·1451 – 121910,4 = 313506 (руб.);

З. Экономический эффект, ($Э_в$):

$$Э_в = П_у – З_в;$$

$$Э_в = 313506 – 15000 = 298506 \text{ руб.};$$

И. Экономический эффект на 1 рубль затрат ($Э_р$):

$$Э_р = Э_в : З_в;$$

$$Э_р = 298506:15000 = 20 \text{ руб.}$$

После применения схем лечения телят все экономические показатели уменьшились в 3 раза. Так, ущерб от падежа телят снизился на 203 868 руб., ущерб от снижения привесов заболевших телят – на 70 754 руб., фактический ущерб от падежа и недополучения живой массы снизился на 274 323 руб., ущерб на одно заболевшее животное – на 56 руб., на одно животное стадо – на 783 руб. Таким образом, был предотвращен экономический ущерб на сумму 313 506 руб. Экономический эффект на один рубль ветеринарных затрат составил 20 руб.

3.6. Эпизоотическая ситуация по микоплазмозу свиней и ассоциативным формам его проявления в хозяйствах Омской и Тюменской областей

При изучении эпизоотической ситуации по микоплазмозу свиней и ассоциативным формам его проявления проведено комплексное обследование свиноводческих хозяйств Омской и Тюменской областей. Для этого использовали эпизоотологи-

ческий, клинический, микробиологический и серологические методы. Материалом для исследования служили сыворотка крови, цервико-вагинальная слизь от свиноматок, носовые истечения и внутрисуставная жидкость от поросят, патологический материал от павших или вынужденно убитых свиней и абортированных плодов.

По результатам исследований было установлено, что микоплазмоз свиней имеет широкое распространение в хозяйствах Омской и Тюменской областей (табл. 3.53–3.55; рис. 3.22–3.24), причем доля микоплазмоза в ассоциациях значительно больше, чем других инфекций. Так, при обследовании свиноматок из разных хозяйств наиболее насыщенный микробный пейзаж был выявлен в ЗАО «Рось», в ассоциации с микоплазмами и уреаплазмами обнаружены лептоспиры у 30 %, хламидии у 20 %, энтерококки у 10 %, сальмонеллы у 50 %, пастереллы у 30 % и диплококки у 20 % животных (см. табл. 3.53). В ООО «Атлант» микоплазмы и уреаплазмы выделены у 90 % свиноматок в ассоциации с хламидиями (30 %), лептоспирами (30 %), листериями (50 %), пастереллами (30 %), сальмонеллами (50 %). Высокую инфицированность свиноматок микоплазмами и уреаплазмами наблюдали в ООО «Агрокомплекс Ударный» (80 %), ООО «Титан» (90 %), ЗАО «Кам. Курское» (70 %), ЛПХ Ефремова М.Н. (70 %), СПК имени Чапаева (85 %), КХ Трейзе В.Ф. (70 %), а также в КХ «Рощино» (57,1 %) (см. рис. 3.22). В КФХ Вохмина Е.В. и в ЗАО «Новоазовское» микоплазмоз был обнаружен в виде моноинфекции у 60 и 90 % свиноматок соответственно.

При исследовании биоматериала от поросят из ООО «Агрокомплекс Ударный» микоплазмы и уреаплазмы были выделены у 82 % животных, а также обнаружены листерии у 20 %, хламидии у 40 %, энтерококки, сальмонеллы и пастереллы у 70 %, диплококки у 60 % поросят. У поросят ЗАО «Кам. Курское» также наблюдали пестрый микробный пейзаж: микоплазмы и уреаплазмы были выявлены у 100 % животных, лептоспиры и хламидии у 20 %, листерии и пастереллы у 40 %, сальмонеллы у 56 % обследованных животных.

Высокая инфицированность микоплазмами поросят также была в ООО «Титан» (80 %), ООО «Атлант» (80 %), СПК имени Чапаева (90 %), КХ Трейзе В.Ф. (65 %), ООО «Комплекс» (66,6 %) (см. рис. 3.23). В виде моноинфекции микоплазмоз поросят был зарегистрирован в одном хозяйстве КФХ Вохмин Е.В. (75 %).

При исследовании проб материала от погибших или вынужденно убитых свиней и абортированных плодов наибольшая инфицированность органов микоплазмами и уреаплазмами наблюдалась в СПК им. Чапаева (85 %), в сочетании с хламидиями и пастереллами (15%), сальмонеллами (25 %) и листериями (15 %), а также в КХ Трейзе В.Ф. (80 %).

Меньше микоплазмами и уреаплазмами были инфицированы пробы, взятые в ОАО «ОПХ СибМИС» (57,1 %), КФХ Вохмина Е.В. (65 %). При исследовании патологического материала из ООО «Агрокомплекс Ударный» микоплазмы и уреаплазмы обнаружены в 22,2 % проб, КХ «Рощино» – в 50 %, ЗАО «Согласие» – 28,5 %, и в ООО «Комплекс» выделены микоплазмы в 12,5 % проб.

Таблица 3.53

Распространение микоплазмоза и ассоциативных форм у свиноматок

Хоз-во №	К-во проб	Инфицировано, (%), M±m, p < 0,05								
		Лептоспироз	Листериоз	Хламидиоз	Энтерококкоз	Сальмонеллез	Пастереллез	Диплококкоз	Микоплазмоз	в т.ч. уреаплазмоз
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	20	0,0	20,0± ,9	0,0	-	-	10,0±6,7	-	70,0±10,2	25,0±9,7
2	10	30,0±14,5	0,0	20,0±12,6	10,0±9,5	50,0±15,8	30,0±14,5	20,0±12,6	90,0±9,5	60,0±15,5
3	10	0,0	20,0±12,6	40,0±15,5	-	10,0±9,5	0,0	-	80,0±12,6	50,0±15,8
4	10	0,0	10,0±9,5	0,0	-	30,0±14,5	30,0±14,5	-	90,0±9,5	40,0±15,5
5	20	0,0	0,0	0,0	-	0,0	0,0	0,0	90,0±6,7	50,0±11,2
6	20	0,0	0,0	25,0±9,7	-	25,0±9,7	0,0	0,0	70,0±10,2	55,0±11,1
7	10	30,0±14,5	50,0±15,8	30,0±14,5	-	50,0±15,8	30,0±14,5	-	90,0±9,5	60,0±15,5
8	20	0,0	15,0±7,9	20,0±8,9	-	35,0±10,6	30,0±10,2	-	85,0±7,9	40,0±10,9
9	20	0,0	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	60,0±10,9	35,0±10,6
10	20	10,0±6,7	0,0	5,0± 4,8	-	40,0±10,9	35,0±10,6	-	70,0±10,2	35,0±10,6
11	7	0,0	0,0	57,1±18,7	-	42,8±18,7	0,0	0,0	57,1±18,7	57,1±18,7
Всего:	167	23,3±3,2	23,0±3,2	28,1±3,4	10,0±2,3	35,2±3,7	27,5±3,4	20,0±3,1	77,4±3,2	46,1±3,8

Примечание: По Омской области: 1 – ЛПХ Ефремова М.Н.; 2 – ЗАО «Рось» Калачинского района; 3 – ООО «Агрокомплекс Ударный» Горьковского района;4 – ООО «Титан»; 5 – ЗАО «Новоазовское» Азовского района; 6 – ЗАО «Кам. Курское» Муромцевского района; по Тюменской области: 7 – ООО «Атлант» Бердюжского района; 8 – СПК им. Чапаева Казанского района; 9 – КФХ Вохмина Е.В.; 10 – КХ Трейзе В.Ф. Ишимского района; 11 – КХ «Рощино» Тюменского района.

Таблица 3.54

Распространение микоплазмоза и ассоциативных форм у поросят

Хоз-во, №	Кол-во проб	Инфицировано, (%), M±m, p < 0,05								
		Лептоспироз	Листериоз	Хламидиоз	Энтерококкоз	Сальмонеллез	Пастереллез	Липлококкоз	Микоплазмоз	в т.ч. уреаплазмоз
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	40	0,0	20,0±6,3	40,0±7,7	70,0±7,2	70,0±7,2	70,0±7,2	60,0±6,3	82,0±6,1	65,0±7,5
2	10	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0±12,6	30,0±14,5	0,0	80,0±12,6	40,0±15,5
3	25	20,0±8,0	40,0±9,8	20,0±8,0	-	40,0±9,8	56,0±9,9	-	100,0±0,0	48,0±9,9
4	10	0,0	20,0±12,6	0,0	10,0±9,5	30,0±14,5	0,0	0,0	80,0±12,6	20,0±12,6
5	10	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0±12,6	20,0±12,6	10,0±9,5	90,0±9,5	40,0±15,5
6	20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	75,0±9,7	35,0±10,6
7	20	0,0	0,0	0,0	0,0	15,0±7,9	20,0±8,9	0,0	65,0±10,6	40,0±10,9
8	9	0,0	0,0	11,1±10,5	-	0,0	0,0	0,0	66,6±15,7	44,4±16,5
Всего:	144	20,0±3,3	26,6±3,7	23,7±3,5	40,0±4,1	32,5±3,9	39,2±4,0	35,0±3,9	79,8±3,3	41,5±4,1

Примечание: По Омской области: 1 – ООО «Агрокомплекс Ударный» Горьковского района; 2 – ЗАО «Кам. Курское» Муромцевского района – ; по Тюменской области: 3 – ООО «Атлант» Бердюжского района; 4 – СПК им. Чапаева Казанского района; 5 – КФХ Вохмина Е.В. Ишимского района; 6 – КХ Трейзе В.Ф. Ишимского района; 7 – ООО «Комплекс» Исетского района.

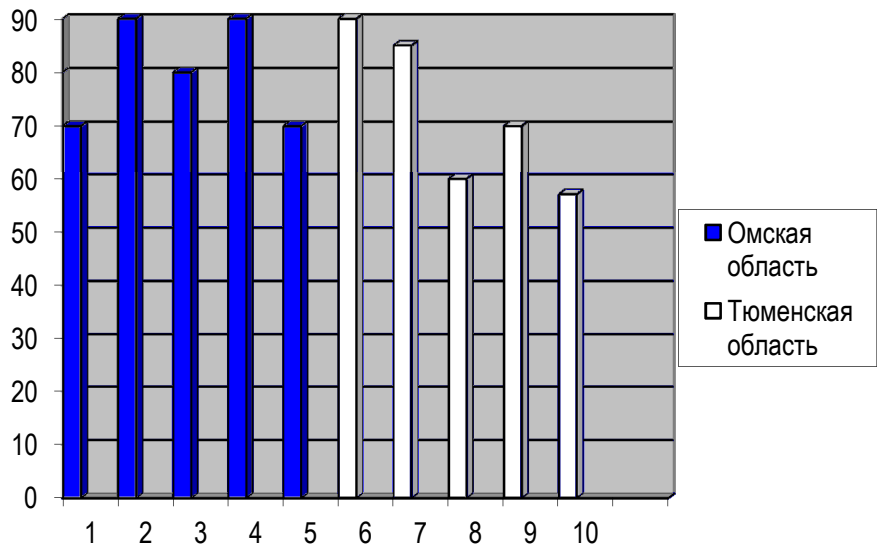


Рис. 3.22. Инфицированность свиноматок микоплазмами

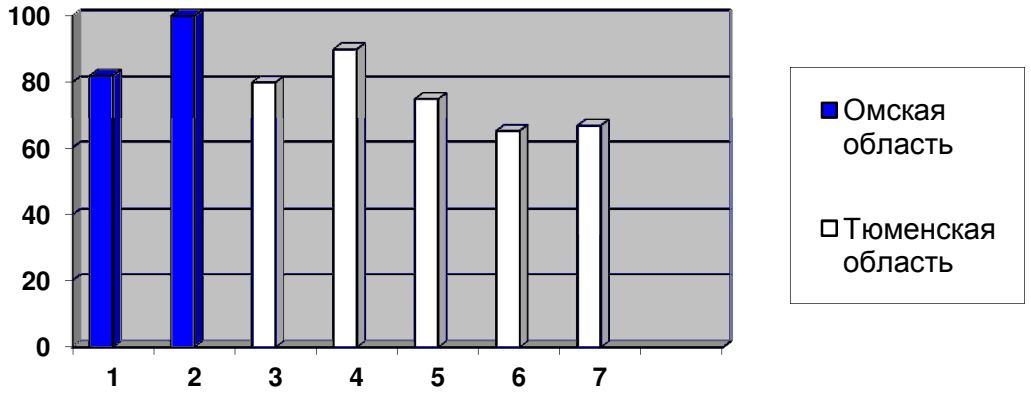


Рис. 3.23. Инфицированность поросят микоплазмами

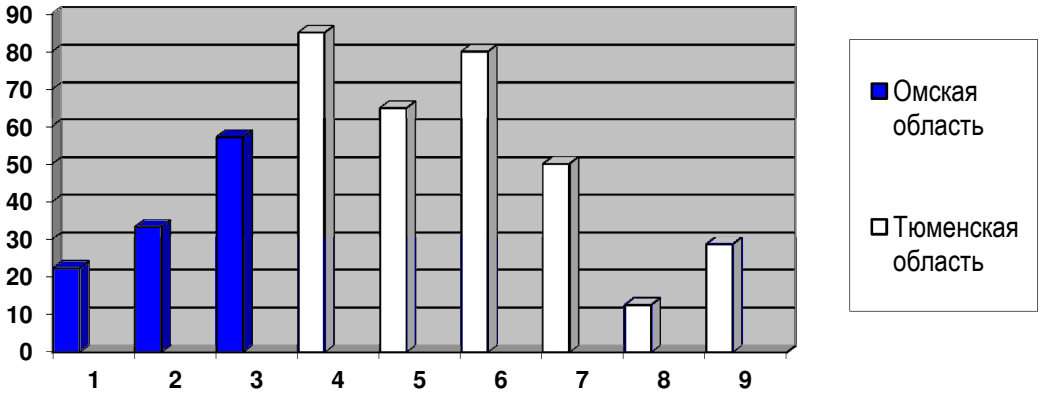


Рис. 3.24. Инфицированность микоплазмами патологического материала от погибших или вынужденно убитых свиней и абортированных плодов

Таблица 3.55

Инфицированность возбудителями патологического материала от погибших или вынужденно убитых свиней и абортированных плодов

Хоз-во, №	Кол-во проб	Инфицировано, (%), M±m,p < 0,05								
		Лептоспироз	Листериоз	Хламидиоз	Энтериоз	Сальмонеллез	Пастереллез	Диплококкоз	Микоплазмоз	в т.ч. уреаплазмоз
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	9	0,0	0,0	0,0	0,0	11,1±10,5	11,1±10,5	0,0	22,2±13,8	11,1±10,5
2	12	0,0	0,0	0,0	-	41,6±14,2	16,6±10,7	-	33,3±13,6	8,3±7,9
3*	7	0,0	0,0	0,0	0,0	14,3±13,2	0,0	0,0	57,1±18,7	42,8±18,7
4	20	0,0	10,0±6,7	15,0±7,9	-	25,0±9,7	15,0±7,9	-	85,0±7,9	45,0±11,1
5	20	0,0	0,0	0,0	-	30,0±10,2	25,0±9,7	-	65,0±10,6	30,0±10,2
6*	20	5,0± 4,9	10,0±6,7	0,0	-	25,0±9,7	25,0±9,7	-	80,0±8,9	30,0±10,2
7	8	0,0	0,0	12,5±11,7	-	0,0	0,0	-	50,0±17,7	25,0±15,3
8	8	0,0	12,5±11,7	0,0	-	0,0	0,0	-	12,5±11,7	0,0
9	7	14,2±13,2	14,2±13,2	14,2±13,2	-	0,0	14,2±13,2	-	28,5±17,0	14,2±13,2
Всего:	111	9,6± 2,8	11,6±3,0	13,9±3,3	0,0	24,5±4,1	17,8±3,6	0,0	48,2±4,7	25,8±4,1

Примечание: По Омской области: 1 – ООО «Агрокомплекс Ударный» Горьковского района; 2 – с. Еремеевское Полтавского района; 3 – ОАО «ОПХ СибМИС» Таврического района; по Тюменской области: 4 – СПК им. Чапаева Казанского района; 5 – КФХ Вохмина Е.В., 6 – КХ Трейзе В.Ф. Ишимского района; 7 – «Рощино» Тюменского района; 8 – ООО «Комплекс» Исетского района; 9 – ЗАО «Согласие» Заводоуковского района.

* абортированные плоды.

Таким образом, по результатам комплексных исследований хозяйств Омской и Тюменской областей установлено, что микоплазмоз свиней имеет широкое распространение. Из 15 обследованных хозяйств микоплазмоз был обнаружен во всех хозяйствах, при этом в виде моноинфекции он был зарегистрирован в двух хозяйствах (13 %), а в остальных носил ассоциативный характер.

3.7. Микробиологические методы диагностики микоплазмоза свиней

3.7.1. Индикация и идентификация микоплазм на питательных средах

Для прижизненной диагностики микоплазмоза свиней на питательных средах брали для исследования цервико-вагинальные смывы и соскобы со слизистой оболочки влагалища у супоросных свиноматок, а также после опороса суставную жидкость из пораженных суставов, носовые истечения у поросят различных возрастных групп; для посмертной диагностики – паренхиматозные органы (печень, почки, селезенку, легкие, сердце, лимфатические узлы), а также абортированные плоды.

Для культивирования посевов использовали стандартные (МПА, МПБ), а также специальные диагностические жидкие и плотные питательные среды (ИВМ ОмГАУ и НИИПИ Роспотребнадзора) для индикации и идентификации глюкозоферментирующих, аргининзависимых микоплазм и уреаплазм. Посевы на средах инкубировали при температуре 37˚С в течение 48–96 часов, учет роста проводили визуально по изменению цвета среды (см. цветную вкл., рис. 15).

Для более подробного изучения культуральных свойств микоплазм культуры, выросшие на жидких питательных средах, пересевали на аналогичные плотные среды, содержащие 1,3 % агара Дифко. Для этого 3 капли инокулята (бульонной культуры) микоплазм по 20 мкл в капле наносили на поверхность агара, не

делая штрихового посева, и подсушивали при комнатной температуре. Посевы инкубировали в термостате при температуре 37-38˚С в течение 5 суток. Чашки просматривали под малым увеличением микроскопа (х 45–70) через 24–72 часа и на 5-е сутки инкубации

На плотных средах микоплазмы представляют собой круглые, не сливающиеся друг с другом колонии, которые имеют характерный вид «яичницы-глазуньи» с врастающим в агар центром и более нежной поверхностной периферией с зубчатыми краями. Встречаются мелкие зернистые колонии без выраженной центральной зоны. Культуры штаммов рода Mycoplasma образуют колонии размером 0,5–3,0 мм. Размер колоний уреаплазм не превышает 0,05–0,5 мм. Поверхность колоний шероховатая (рис. 3.26, 3.27).

На плотных средах микоплазмы представляют собой круглые, не сливающиеся друг с другом колонии, которые имеют характерный вид «яичницы-глазуньи» с врастающим в агар центром и более нежной поверхностной периферией с зубчатыми краями. Встречаются мелкие зернистые колонии без выраженной центральной зоны. Культуры штаммов рода Mycoplasma образуют колонии размером 0,5–3,0 мм. Размер колоний уреаплазм не превышает 0,05–0,5 мм. Поверхность колоний шероховатая (см. цветную вкл., рис. 16, 17).

Выросшие на плотных средах колонии микоплазм и уреаплазм пересевали на жидкие среды с содержанием соответствующего питательного субстрата вместе с вырезанным агаровым блоком и инкубировали до изменения цвета среды в течение 48–96 часов. Если рост микоплазм отсутствовал, проводили 3–5 «слепых» пассажей, если в процессе этого цвет питательной среды не менялся, считали, что микоплазмы погибли при пересевах.

Для исключения роста L-форм бактерий проводили несколько последовательных пассажей выделенных культур на питательной среде без ингибиторов с интервалом в трое суток для восстановления исходных форм бактерий.

Для пересева выделенных культур микоплазм с жидкой среды на жидкую 0,2 мл бульонной культуры вносили в 2 мл свежей жидкой среды с соответствующим питательным субстратом. Посевы инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 48–96 часов до изменения цвета среды.

С плотной на плотную среду аккуратно бактериологической петлей вырезали агаровый блок с колониями микоплазм и переносили его стороной с колониями на поверхность свежей плотной среды, протирали этим кусочком всю его поверхность. Чашки с посевами инкубировали при температуре 37 °С в течение пяти суток, просматривая при малом увеличении микроскопа.

При пересеве с плотной среды на жидкую вырезали агаровый блок с колониями бактериологической петлей и переносили его в пробирку с жидкой питательной средой.

Для учета титра микоплазм использовали метод титрации цветообразующей единицы (ЦОЕ), на жидкой индикаторной среде готовили 10-кратные разведения микоплазм. Инкубировали в термостате при 37 °С в течение трех суток. Наибольшее разведение микоплазм, при котором изменяется цвет среды, рассматривается как конечная точка титрации, содержащая одну цветообразующую единицу (ЦОЕ).

Вели также подсчет колонеобразующих единиц (КОЕ) в 0,1 мл 10-кратных разведений исходной культуры. Результаты учитывали подсчетом колоний на плотной среде, допуская, что каждая колония получена из одной клетки. Подсчитав количество колоний, можно определить количество единиц, образующих колонии - КОЕ (табл. 3.56).

Таким образом, новые питательные среды ИВМ ОмГАУ и НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора можно применять также и для диагностики микоплазмоза свиней. Наряду с

Таблица 3.56

Показатели перевода количества колоний на плотной среде в КОЕ

Количество колоний в поле зрения	Титр образца, КОЕ
<1 колонии	1 000
1–5	10 000
6–15	100 000
>15 колоний	1 000 000

индикацией они позволяют проводить и идентификацию микоплазм и уреаплазм по основным показателям: ферментация глюкозы, гидролиз аргинина и разложение мочевины, а также посредством титрации оценивать степень их накопления в цветообразующих единицах (ЦОЕ) на жидких средах, а также в соответствующих им колонеобразующих единицах (КОЕ) на плотных средах.

После выделения чистой культуры микоплазм или уреаплазм проводили видовую идентификацию возбудителей на основании культурально-морфологических, биохимических и серологических показателей.

3.7.2. Основные биологические свойства микоплазм

Морфологические свойства

При изучении тинкториальных и морфологических свойств микоплазм и уреаплазм готовили мазки из трёхсуточных культур, затем их высушивали на воздухе, фиксировали метиловым спиртом или ацетоном в течение 5–10 минут и окрашивали краской Романовского-Гимзе (разведенной буферным раствором pH 7,2 в соотношении 7:3) в течение 3–4 часов. После чего мазки промывали и просматривали под иммерсионной системой микроскопа. Микоплазмы были преимущественно кокко-овоидно-перстневидной формы размером 0,3–0,5 мкм розово-фиолетового оттенка (рис. 3.28). Могут встречаться и фиолетовые шары размером 3–6 мкм, образования синего цвета величиной 2–6 мкм, единичные палочки (2–5 мкм), скопления зернистой и гомогенной массы с синеватым оттенком, в которые заключены микроструктурные элементы. Микоплазмы грамотрицательные, красного цвета, полиморфны, имеют овоидную, перстневидную, разветвленную и другие формы (рис. 3.29).

Биохимические свойства

Видовую принадлежность выделенных от свиней культур микоплазм определяли по биохимическим свойствам, используя

ключ Gourlayand Howard (1979). Изучали ферментацию глюкозы, гидролиз аргинина, разложение мочевины (на диагностических жидких и плотных питательных средах при культивировании микоплазм и уреаплазм), протеолитическую активность, редукцию тетразоля, фосфатазную активность, образование пленки и пятен.

Определение фосфатазной активности проводили на агаровых пластинах, содержащих 0,01 % фенолфталеиндифосфата натрия, на которые высевали исследуемые культуры. Инкубировали их в течение 5–7 дней. При наличии колоний агаровую среду заливали 5 – молярным раствором едкого натра по 1–2 мл на пластинку. Результат: появление розового или красного окрашивания через 30 секунд после добавления щелочи указывает на фосфатазную активность микоплазм.

На жидких средах определяли способность редуцировать 0,5 %-ный водный раствор 2, 3, 5-трифинилтетразолхлорида (тетразоль), его добавляли в среду и вносили трехсуточную культуру микоплазм. Результаты проб учитывали в течение 7–10 дней инкубации в термостате при температуре 37 ^{o}С. Положительная реакция проявляется окрашиванием среды в красный цвет.

Для определения способности микоплазм к образованию пленки и пятен в 90 мл агаровой суспензии, содержащей сердечный экстракт (Дифко) после охлаждения её до 50 ^{o}С добавляли 20 мл стерильной сыворотки крови лошади, 13,6 мл яичного желтка, разбавленного 1:1 стерильным буферным раствором, 10 мл 25 %-ного раствора дрожжевого экстракта, 1,2 мл 0,2 %-ного раствора дезоксирибонуклеиновой кислоты, 1,0 мл 1 %-ного раствора ацетата таллия и 0,25 мл раствора пенициллина, содержащего 20 тыс. ЕД/мл. Среду разливали в чашки Петри. Высевали исследуемые и контрольные (*M. fermentans*) культуры. Инкубировали при 37 °С в течение 14 суток, просматривали под микроскопом каждый день.

При интенсивном росте микоплазм пленка и зёрна появляются на поверхности агара через несколько дней. Пленка состоит

из холестерина и фосфолипидов, а зёрна – из выпавших в осадок солей кальция и магния, освобожденных от жирных кислот в результате липолитического действия микоплазм.

Протеолитическая активность микоплазм характеризуется способностью разжижать или свертывать сыворотку крови, желатин, гидролизовать казеин.

Разжижение сгустка сыворотки определяли на питательной среде, состоящей из 16 мл сердечного экстракта, который автоклавировали при 121 °С в течение 20 минут, 60 мл сыворотки крови лошади, 1,6 мл 25 %-ного дрожжевого экстракта, 2,4 мл стерильной воды. Среду разливали в пробирки по 2 мл, высушивали под вакуумом 20–30 минут, затем подогревали текучим паром в течение 45 минут.

В эту среду вносили различные разведения исследуемой культуры и контрольного штамма. Пробирки инкубировали 14-20 суток, просматривали их каждые 2 дня. Углубление и просветление поверхности агара, образование в нем отверстий, полостей, небольшого количества жидкости указывают на протеолитическую активность микоплазм.

Для изучения способности микоплазм гидролизовать казеин 8 г порошка снятого молока растворяли в 90 мл воды (pH 7,6). Автоклавировали при 121 ^{o}С в течение 15 минут. Расплавляли 2 г очищенного агара (оксоид) в 120 мл воды (pH 7,6) и автоклавировали 15 минут при 121 ^{o}С. Эти растворы смешивали и разливали в пробирки по 2 мл. Молочный агар расплавляли на водяной бане и наносили несколько капель на колонии исследуемой культуры на агаре. Инкубировали культуры 14 суток при температуре 37 ^{o}С. Учитывали каждые два дня. Просветление молочного агара над колониями микоплазм означало положительную реакцию.

Способность разжижать желатин определяли на питательной среде, состоящей из 2,5 г сердечного экстракта и 12 г желатина (Дифко) и 100 мл воды, (pH 7,6). Среду разливали по пробиркам по 3 и 7 мл, автоклавировали 10 минут при 121°С. Перед

охлаждением в каждую пробирку добавляли по 1 мл стерильной сыворотки крови лошади и 0,25 мл 25%-ного дрожжевого экстракта. Агаровый блок с культурами микоплазм переносили в пробирку со средой. Эту пробирку и контрольную не засеянную пробирку ставили в термостат на 30 суток при температуре 37 ^{o}C. Учет проводили 2 раза в неделю (перед этим пробирки предварительно охлаждали при 4 ^{o}C в течение часа). Некоторые виды микоплазм содержат желатиназу, которая активна при pH 6,0–9,5. Выделенные от свиней микоплазмы и уреаплазмы обладают соответствующими морфологическими и биохимическими свойствами (табл. 3.57), что позволило их отнести к *M. hyorhinis, M. hyosynoviae* и *Ureaplasma sp*.

Для изучения патогенных свойств заражали мышей микоплазмами, выделенными от свиней из хозяйств Омской и Тюменской областей. С этой целью использовали 20 белых мышей массой тела 20 г, которых разделили на 4 группы (3 опытных и 1 контрольная) по 5 голов в каждой. Мышам 1-й группы вводили *M. hyorhinis*, 2-й – *M. hyosynoviae*, и 3-й – *Ureaplasma sp*., 4-я группа служила контролем (табл. 3.58).

Таблица 3.57

Морфологические и биохимические свойства микоплазм, выделенных от свиней

Род и вид	Морфология микоплазм	Ферментация глюкозы	Гидролиз аргинина	Уреазная активность	Пленка и пятна	Редукция тетразоля	Протеолитич. активность	Фосфат. активность
M. hyorhinis	Очень короткие нити, редко с ответвлениями	+	-	-	-	+	-	+
M hyosynoviae	Кокковидные формы, короткие нити	-	+	-	+	-	-	-
Ureaplasma sp.	Сферические, иногда почкующиеся клетки	-	-	+	-	-	+	-

Таблица 3.58

Инфицированность патологического материала от белых мышей, зараженных культурами микоплазм, выделенных от свиней

Органы	*M. hyorhinis*					*M. hyosynoviae*					*Ureaplasma sp.*					Контроль (интактные животные)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1. Печень	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
2. Почки	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
3. Селезен.	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
4. Сердце	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
5. Легкие	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Всего:	19					19					21					0				

Патогенные свойства

Мышей заражали трехсуточными культурами микоплазм, сконцентрированными в 100 раз путем центрифугирования при 6000 g и трехкратного ресуспендирования в 0,85 %-ном физиологическом растворе. Для микроскопии мазков из патологического материала их окрашивали по Граму и Романовскому-Гимзе.

При микробиологическом исследовании использовали специальные диагностические питательные среды для индикации глюкозоферментирующих, аргининзависимых микоплазм и уреаплазм. При этом антигены в объеме 0,5 мл вводили внутрибрюшинно, однократно. Кожу нижней части живота обрабатывали 70° спиртом, иглу вводили под углом 45°, чтобы исключить прокол кишечника. В течение 10 дней после заражения погибло три мыши, зараженные *M. hyorhinis*, и по две мыши в каждой группе, зараженные *M. Hyosynoviae* и *Ureaplasma sp*. Остальные мыши, в том числе контрольной группы, на 10 сутки были девитализированы, а их внутренние органы исследованы микробиологическим методом.

Индекс инфицированности рассчитывали по формуле:

$$ИИ = \frac{a \cdot 100}{в \cdot c},$$

где *а* – количество выделенных культур, *в* – число животных в группе, *с* – число объектов, из материала которых проводились посевы.

ИИ (*M.hyorhinis*) = 19 · 100 / 5 · 5 = 76;
ИИ (*M.hyosynoviae*) = 19 · 100 / 5 · 5 = 76;
ИИ (*Ureaplasma sp.*) = 21 · 100 / 5 · 5 = 84.

Таким образом, летальность мышей при заражении их микоплазмами составила 60 % при заражении *M. hyorhinis*, 40 % – *M. hyosynoviae* и *Ureaplasma sp.*, при индексе инфицированности 76, 76 и 84 соответственно.

3.8. Серологические методы диагностики микоплазмоза

3.8.1. Получение микоплазмозных антигенов и диагностических сывороток для РНИФ

Для постановки реакции непрямой иммунофлуоресценции как экспресс-метода диагностики микоплазмоза у свиней было необходимо получить микоплазмозные антигены и гипериммунные антисыворотки с высоким титром антител против полевых штаммов микоплазм. Сыворотки получали путем гипериммунизации кроликов тремя видами выделенных от свиней микоплазм.

Проводили изучение основных свойств выделенных микоплазм и уреаплазм и использовали их для приготовления антигенов. Для этого трехсуточные культуры (*M. hyorhinis, M. Hyosynoviae* и *Ureaplasma spp.*) отмывали от питательной среды путем центрифугирования при 6000 g 30 минут, осадок после трехкратного ресуспензирования и последующего центрифугирования разводили до концентрации 1,7 млрд микробных клеток в 1 мл по бактериальному стандарту мутности (ГИСК им. Тарасевича Л.А.). Гипериммунизировали кроликов весом 2,5–3 кг по 2 головы на каждую культуру. Суть схемы гипериммунизации состоит в последовательном дробном внутривенном введении антигена кроликам каждые 3–4 дня с применением иммуностимулятора левамизола подкожно при первых двух введениях антигена (табл. 3.59).

Таблица 3.59

Схема гипериммунизации кроликов культурами микоплазм

Время введения, сут.	1	4	7	10	13	14	16	20	21	24	30
Доза антигена, млрд м.т.	0,85	1,7	1,7	1,7	3,4	-	3,4	3,4	-	3,4	-
Левамизол, мл	1	1	-	-	-	-	-		-	-	-

Примечание: 7, 14, 21 и 30-е сутки – взятие крови для постановки РНИФ (контроль за динамикой синтеза антител). На 30-е сутки – тотальное обескровливание и получение гипериммунных сывороток.

Для реакции непрямой имммунофлуоресценции в качестве антигенов использовали 500 млн взвеси микоплазм, выделенных от свиней, инактивированных на водяной бане при 70˚С в течение 30 минут.

На 7, 14, 21 и 30-е сутки после гипериммунизации брали кровь у опытных кроликов и наблюдали за уровнем синтеза антител в реакции непрямой иммунофлуоресценции, которую ставили на предметных стеклах по описанной ранее методике, учет реакции проводили в крестах, свечение менее чем на два креста считали отрицательным.

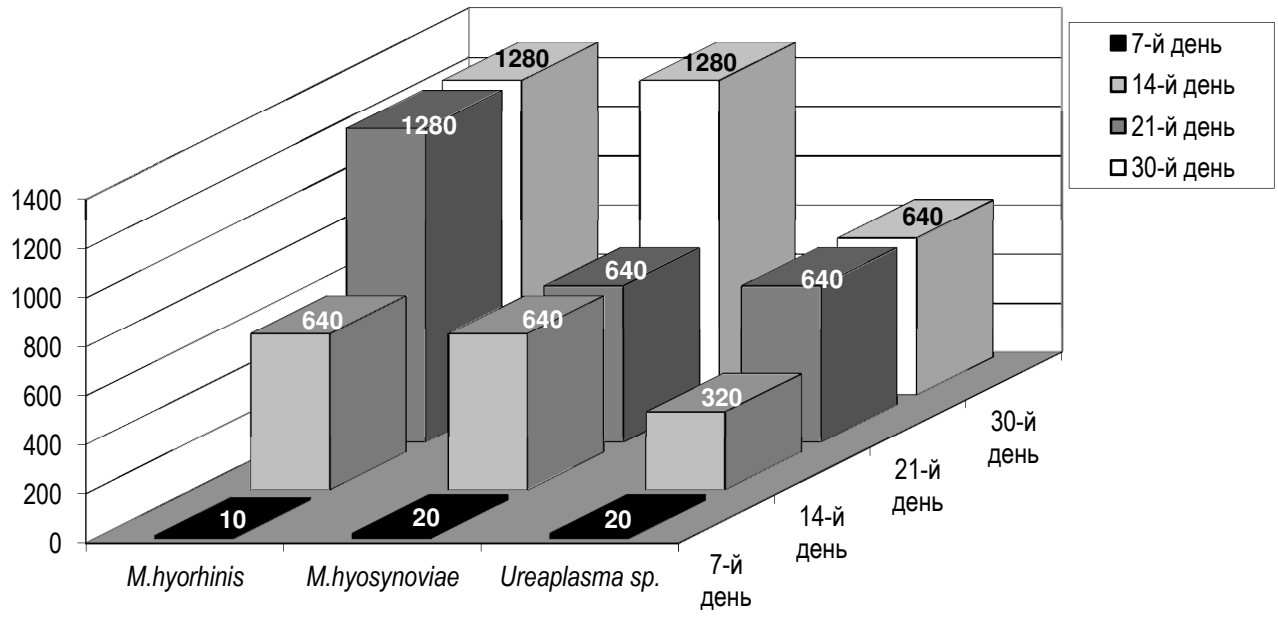


Рис. 3.30. Динамика синтеза антител у кроликов, гипериммунизированных культурами микоплазм, выделенных от свиней

На 7-й день после первого введения антигена антитела в РНИФ выявлялись в низких титрах 1:10 - 1:20. На 14-й день положительная реакция в РНИФ была при более высоких разведениях в пределах 1:320 – 1:640, а на 21-е и 30-е сутки синтез антител достиг максимального уровня 1:640 – 1:1280 (рис. 30).

3.8.2. Изучение специфичности и активности микоплазмозных антигенов и гипериммунных сывороток в РНИФ

Для определения активности и специфичности, полученных нами микоплазмозных антигенов и гипериммунных сывороток в РНИФ использовали убитые антигены в концентрациях 250 млн м.т., 500 млн м.т. и 1 млрд м.т., и сыворотки в разведениях от 1:10 до 1:640. Для изучения специфичности микоплазмозных антигенов в РНИФ применяли антимикоплазмозные сыворотки в разведении 1:10, а также сыворотки против хламидиоза, лептоспироза, листериоза, сальмонеллеза, пастереллеза. Микоплазмозные антигены показали высокую гетерологичную специфичность. Они не реагировали в РНИФ с сыворотками против хламидиоза, лептоспироза, листериоза, пастереллеза и сальмонеллёза. Положительная реакция отмечалась только с гомологичными кроличьими антисыворотками (табл. 3.60).

Таблица 3.60

Специфичность микоплазмозных антигенов в РНИФ

Антигены	Сыворотки (1:10)							
	хлам.	лепт.	лист.	паст.	сальм.	микоплазмы		
						Г	А	У
M. hyorhinis	-	-	-	-	-	+	-	-
M.hyosynoviae	-	-	-	-	-	-	+	-
Ureaplasma sp.	-	-	-	-	-	-	-	+

Примечание: сыворотки против Г – глюкозоферментирующих *M. hyorhinis*, А – аргининзависимых *M. hyosynoviae* и У – *Ureaplasma sp*., хлам. – хламидиоза, лепт. – лептоспироза, лист. – листериоза, паст. – пастереллеза, сальм. – сальмонеллеза.

Наибольшая активность всех трех микоплазмозных антигенов в РНИФ проявлялась в концентрации 500 млн м.т. (табл. 3.61, рис. 3.31–3.33).

Таблица 3.61

Активность микоплазмозных антигенов в РНИФ

Концентрация антигенов	Сыворотки		
	Г	А	У
1 млрд м.к.	+++	+++	++++
500 млн м.к.	**++++**	**++++**	**++++**
250 млн м.к.	+	++++	+++

Была установлена высокая внутривидовая специфичность полученных микоплазмозных антисывороток в РНИФ, которые реагировали только с гомологичными антигенами и были активны во всех разведениях (табл. 3.62).

Таким образом, полученные нами микоплазмозные антигены и гипериммунные сыворотки высокоактивны и специфичны в РНИФ. Кроличьи сыворотки (патент на изобретение № 2355422) могут использоваться для индикации и идентификации микоплазм (*M. hyorhinis, M.hyosynoviae, Ureaplasma sp.*) из биоматериала от свиней (цервиковагинальная слизь, носовые истечения, суставная жидкость) и патологического материала от погибших и вынужденно убитых животных, от абортированных плодов, а полученные нами антигены - для обнаружения антител к микоплазмам в сыворотке крови больных свиней.

Таблица 3.62

Видовая специфичность и активность микоплазменных кроличьих сывороток в РНИФ

Антигены	**Сыворотки**																	
	Г						**А**						**У**					
	1:10	**1:40**	**1:80**	**1:160**	**1:320**	**1:640**	**1:10**	**1:40**	**1:80**	**1:160**	**1:320**	**1:640**	**1:10**	**1:40**	**1:80**	**1:160**	**1:320**	**1:640**
M. hyorhinis	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M. hyosynoviae	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Ureaplasma sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

3.8.3. Изготовление микоплазмозного эритроцитарного диагностикума (МЭД) для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА)

Приготовление микоплазменного эритроцитарного диагностикума (МЭД) проходит в несколько этапов:

– дробная формалинизация эритроцитов барана;

– получение антигена из трех культур микоплазм;

– сенсибилизация формалинизированных эритроцитов антигеном;

– трехкратное отмывание диагностикума буферным раствором.

На первом этапе работы формалинизацию эритроцитов барана проводили по методике, аналогичной при микоплазмозе КРС.

На втором этапе приготовления эритроцитарного диагностикума в качестве сенситинов использовали корпускулярные антигены микоплазм, выделенных от свиней (*M. hyosynoviae, M. hyorhinis* и *Ureaplasma sp*.). Микоплазмы культивировали на трех жидких питательных средах: среда для индикации глюкозоферментирующих микоплазм, аргининзависимых микоплазм и уреаплазм.

На третьем этапе 3%-ную взвесь формалинизированных эритроцитов (предварительно трехкратно отмытых ФБР pH 7,2 от формальдегида при 3000 об/мин) сенсибилизировали с инактивированным прогреванием антигеном в соотношении 2:1 (2V антигена: 1V эритроцитов).

Четвертый этап приготовления предусматривает трехкратное отмывание нагруженных антигеном эритроцитов от несвязавшихся сенситинов фосфатно-буферным солевым раствором с pH-7,2 путем центрифугирования при 3000 об/мин, и ресуспендирование в этом же растворе с доведением до первоначальной 3 %-ной концентрации. После этого использовали МЭД для постановки РНГА макрометодом в объеме 0,5 мл на полистироловых планшетах.

Постановку РНГА проводили по следующей методике: испытуемые сыворотки после освобождения от неспецифических ге-

магглютининов путем инактивации в течение 20 минут при 56 °С, разводили в двукратной последовательности фосфатно-буферным раствором (рН-6,4), начиная с 1:25. К каждому разведению добавляли по одной капле (0,05 мл) эритроцитарного диагностикума, тщательно перемешивали встряхиванием и оставляли при комнатной температуре на 1,5–2 часа. Реакцию оценивали по четырехкрестной системе (рис. 3.34). Конечным титром считали последнее разведение сыворотки, дающее гемагглютинацию на три креста.

3.8.4. Изучение специфичности и активности МЭД в РНГА

Для изучения специфичности и активности полученного диагностикума проводили постановку РНГА макрометодом в обьеме 0,5 мл в полистироловых пластинках, с микоплазмозными (Г, А, У и смешанной Г+А+У) сыворотками в разведениях от 1:10 до 1:640. В качестве разбавителя применяли фосфатный буфер рН-6,4. В качестве контроля использовали фосфатный буферный раствор (ФБР) рН-6,4 и заведомо отрицательные и положительные на микоплазмоз сыворотки свиней в разведениях 1:25 – 1:1600 и кроликов в разведениях 1:10 – 1:640.

Были определены специфичность и активность четырех серий (С-1 – С-4) микоплазмозного эритроцитарного диагностикума в РНГА (табл. 3.63, 3.64).

Таблица 3.63

Специфичность МЭД в РНГА

МЭД	Стандартные диагностические сыворотки						Микоплазмозные сыворотки		
							Г	А	У
	бруц	паст	лепт	лист	сальм	хлам	1/10	1/10	1/10
С-1	-	-	-	-	-	-	++++	++++	++++
С-2	-	-	-	-	-	-	++++	++++	++++
С-3	-	-	-	-	-	-	++++	++++	++++
С-4	-	-	-	-	-	-	++++	++++	++++

Примечание: сыворотки: бруц – бруцеллёзная; паст – пастерелезная, лепт – лептоспирозная; лист – листериозная; сальм – сальмонеллёзная; хлам – хламидиозная; Г – глюкозоферментирующая – *M. hyorhinis*, А – аргининзависимая – *M. hyosynoviae* , У – *Ureaplasma sp*., С-1 – С-4 – серии МЭД.

Для контроля специфичности полученных серий микоплазмозных эритроцитарных диагностикумов ставили РНГА с гете-

рологичными сыворотками. МЭД в РНГА не вызывает перекрестных реакций с бруцеллезной, пастереллезной, лептоспирозной, листериозной, сальмонеллезной и хламидиозной гетерологичными сыворотками, во всех разведениях РНГА отрицательная при четко выраженных положительных реакциях с гомологичными микоплазмозными сыворотками (см. табл. 3.64).

Для контроля активности полученного эритроцитарного диагностикума проводили постановку РНГА с кроличьими микоплазмозными сыворотками в разведениях от 1:10 до 1:640, а также с положительными и отрицательными на микоплазмоз свиными сыворотками. С микоплазмозными сыворотками по отдельности и со смешанной сывороткой против трех видов микоплазм полученный диагностикум реагирует на три креста до разведения 1:160. В контроле с нормальной (негативной) сывороткой и буферным раствором положительные реакции отсутствуют (см. табл. 3.64).

Таблица 3.64

Активность МЭД в РНГА

Титр сыворотки	Микоплазмозные кроличьи сыворотки			Г+А+У сыворотка	Свиные сыворотки			ФБР р-р
	Г	А	У		титр сыворотки	Позитивная (микоплазмозная)	негативная	
1:10	++++	++++	++++	++++	1:25	++++	-	-
1:20	++++	++++	++++	++++	1:50	++++	-	-
1:40	++++	++++	++++	++++	1:100	++++	-	-
1:80	+++	+++	+++	+++	1:200	+++	-	-
1:160	+++	+++	+++	+++	1:400	+++	-	-
1:320	++	++	++	++	1:800	++	-	-
1:640	-	-	-	-	1:1600	-	-	-

Таким образом, полученный микоплазмозный эритроцитарный диагностикум (патент на изобретение № 2361218) высокоспецифичен и обладает достаточной активностью в РНГА при микоплазмозе свиней. Его можно использовать для обнаружения антител к микоплазмам в сыворотке крови больных свиней и микробоносителей. За диагностический титр в РНГА было принято разведение исследуемой сыворотки 1:25, при котором отсутствовала реакция гемагглютинации с негативной сывороткой свиней.

3.8.5. Сравнительная оценка диагностической ценности микробиологического и серологических (РНИФ, РНГА) методов диагностики микоплазмоза свиней в производственных условиях

При сравнительном изучении диагностической ценности разных методов диагностики микоплазмоза свиней нами было проведено комплексное исследование материала от свиней из хозяйств Омской и Тюменской областей.

Для изучения чувствительности РНИФ и микробиологического методов исследовали цервико-вагинальную и носовую слизь, суставную жидкость от животных с клиническими признаками вагинитов, эндометритов, артритов, бронхопневмоний, а также патологический материал от погибших, вынужденно убитых свиней и абортированных плодов (табл. 3.65–3.69).

Таблица 3.65

Чувствительность РНИФ и микробиологического метода исследования проб цервико-вагинальной слизи свиноматок на микоплазмоз

Хозяйства	Ко-во ж-х	M±m, p<0,05					
		на питательн. средах,%			в РНИФ,%		
		Г	А	У	Г	А	У
ООО «АК Ударный»	10	70±14,5	20±12,6	40±15,5	70±14,5	50±15,8	50±15,8
ООО «Титан»	10	50±15,8	10±9,5	10±9,5	60±15,5	10±9,5	20±12,6
ЗАО «Новоазовское»	20	45±11,1	40±10,9	50±11,2	65±10,6	55±11,1	50±11,2
ЗАО «Кам. Курское»	20	45±11,1	20±8,9	20±8,9	55±11,1	50±11,2	35±10,6
ООО «Атлант»	10	20±12,6	30±14,5	30±14,5	30±14,5	40±15,5	60±15,5
СПК им. Чапаева	20	40±10,9	25±9,7	30±10,2	45±11,1	25±9,7	40±10,9
КФХ Вохмин	20	25±9,7	5±4,8	25±9,7	25±9,7	15±7,9	35±10,6
КХ Трейзе	20	40±10,9	15±7,9	25±9,7	40±10,9	20±8,9	35±10,6
Всего (8):	130	41,8±4,3	20,6±3,5	28,7±3,9	48,7±4,4	33,1±4,1	40,6±4,3

Примечание: Г – глюкозоферментирующие микоплазмы *M. hyorhinis*, А – аргининзависимые микоплазмы *M. hyosynoviae* , У – уреаплазмы.

При исследовании цервико-вагинальной слизи от 130 свиноматок из 8 хозяйств Омской и Тюменской областей на питательных средах глюкозоферментирующие микоплазмы выделялись в пределах от 20 до 70 % (в среднем 41,8 %), аргининзависимые микоплазмы – от 5 до 40 % (20,6 %) и уреаплазмы – от 10 до 50 % (28,7 %), а в РНИФ – от 25 до 70 % (48,7 %), от 10 до 55 % (33,1 %) и от 20 до 60 % (40,6%) соответственно (табл. 3.67). Наибольшая инфицированность микоплазмами наблюдалась у свиноматок, принадлежащих ООО «АК Ударный» (микробиологическим методом выделено 70 % глюкозоферментирующих микоплазм, 20 % аргининзависимых микоплазм и 40 % уреаплазм, а в РНИФ – 70, 50 и 50 % соответственно).

В ЗАО «Новоазовское» обнаружение в РНИФ 65 % глюкозоферментирующих, 55 % аргининзависимых микоплазм и 50 % уреаплазм подтверждается выделением их на питательных средах в 45, 40 и 50 % случаев. В ООО «Титан» микробиологическим методом выделено 50 % глюкозоферментирующих, 10 % аргининзависимых микоплазм и уреаплаз. Вместе с тем, в РНИФ обнаружено на 10 % больше глюкозоферментирующих микоплазм и уреаплазм. В ЗАО «Кам. Курское» на питательных средах выделено 45 % глюкозоферментирующих микоплазм и 20 % аргининзависимых микоплазм и уреаплазм, а в РНИФ – 55, 50 и 35 % соответственно. В ООО «Атлант» на питательных средах было выделено 20 % глюкозоферментирующих микоплазм, 30 % аргининзависимых микоплазм и уреаплазм, тогда как с помощью РНИФ выявлено больше микоплазм: 30, 40 и 60 % соответственно.

В других обследованных нами свиноводческих хозяйствах Омской и Тюменской областей инфицированность свиноматок микоплазмами и уреаплазмами по результатам исследования цервико-вагинальной слизи была ниже, но почти во всех случаях процент их выявления при помощи РНИФ был больше, чем микробиологическим методом. Это может быть связано с тем, что микоплазмы и уреаплазмы сложно культивировать на питательных средах, они

прихотливы и не всегда могут адаптироваться к среде, а также могут погибнуть во время транспортировки. В РНИФ же обнаруживаются микоплазменные антигены, даже если сами микоплазмы погибли в процессе лабораторных исследований.

При исследовании проб цервико-вагинальной слизи и сыворотки крови от свиноматок (на примере ЗАО «Кам. Курское») при помощи микробиологического и серологических методов (РНИФ, РНГА) определяли количественные показатели (ЦОЕ, КОЕ) микоплазм на жидких и плотных питательных средах и титр микоплазмозных антител в крови в РНИФ и РНГА (см. табл. 3.66).

Таблица 3.66

Зависимость титра антител в крови свиноматок от концентрации возбудителя в исследуемом материале (цервико-вагинальной слизи)

№ п/п	Титр АТ в РНИФ	Титр АТ в РНГА	На питательных средах	
			ЦОЕ/мл	КОЕ/мл
1.	1:100	-	-	-
2.	1:25	1:100	≥10 000	10 000
3.	1:50	1:50	≥10 000	10 000
4.	1:100	-	≤10 000	<100
5.	-	-	-	-
6.	1:400	1:50	≥10 000	1 000 000
7.	1:25	1:100	≥10 000	10 000
8.	1:100	-	≤10 000	<100
9.	-	1:50	-	-
10.	1:50	-	≤10 000	-
11.	-	1:200	≥10 000	100 000
12.	-	1:25	≤10 000	<100
13.	1:50	-	≤10 000	-
14.	1:25	-	-	-
15.	-	-	-	-
16.	1:400	1:50	-	-
17.	-	1:50	≥10 000	1 000
18.	1:100	1:25	≤10 000	<100
19.	1:400	1:100	≥10 000	100 000
20.	1:100	-	≥10 000	1 000
Всего, %:	70	55	70	60

Таким образом, при сравнительном анализе титра антител, выявляемых в сыворотке крови с помощью РНИФ и РНГА, и количеством выделяемых на питательных средах микоплазм, обна-

руживается прямая пропорциональная зависимость, т. е. чем больше возбудителя в исследуемом материале, тем выше титр антител в крови животного.

При исследовании носовой слизи от поросят из ЗАО «Кам. Курское» микробиологическим методом выделено 40 % глюкозоферментирующих, 36 % аргининзависимых микоплазм и 24 % уреаплазм, а в РНИФ – 64, 60 и 28 % соответственно (см. табл. 3.67). В ООО «Агрокомплекс Ударный» глюкозоферментирующие микоплазмы из носовой слизи поросят обнаружены на питательных средах в 55 % проб, а в РНИФ – 75 %, аргининзависимые микоплазмы – в 30 % проб, а в РНИФ – 65 % и уреаплазмы – в 25 % проб, а в РНИФ – 45 %. В КХ Трейзе В.Ф. аргининзависимые микоплазмы и уреаплазмы из носовой слизи поросят выделены на питательных средах и в РНИФ в 20 и 30 % случаев соответственно, тогда как глюкозоферментирующие микоплазмы обнаружены на питательных средах в 30 % проб, а в РНИФ их было на 10 % больше.

Таблица 3.67

Чувствительность РНИФ и микробиологического метода исследования проб слизи из носовой полости поросят на микоплазмоз

Хозяйства	Кол-во ж-х	M±m, p<0,05					
		на питательн. средах, %			в РНИФ, %:		
		Г	А	У	Г	А	У
ЗАО «Кам. Курское»	25	40±9,8	36±9,6	24±8,5	64±9,6	60±9,8	28±8,9
ООО «АК Ударный»	40	55±7,8	30±7,2	25±6,8	75±6,8	65±7,5	45±7,8
КХ Трейзе	10	30±14,5	20±12,6	30±14,5	40±15,5	20±12,6	30±14,5
Всего (3):	75	41,6±5,7	28,6±5,2	26,3±5,1	59,6±5,6	48,3±5,7	34,3±5,5

При исследовании суставной жидкости от свиней в ООО «Титан» в РНИФ было выявлено 40 % глюкозоферментирующих микоплазм и уреаплазм и 60 % аргининзависимых микоплазм, что было подтверждено микробиологическим методом в 40 % для глюкозоферментирующих микоплазм, в 50 % – для аргининзависимых микоплазм и в 30 % случаев – для уреаплазм (см. табл. 3.68).

В ООО «Атлант» глюкозоферментирующие микоплазмы были выделены на питательных средах в 30 %, а аргининзависимые микоплазмы и уреаплазмы – в 20 % случаев. В РНИФ было выявлено на 30 % больше аргининзависимых микоплазм и на 10 % меньше уреаплазм.

Таблица 3.68

Чувствительность РНИФ и микробиологического метода исследования проб суставной жидкости от свиней на микоплазмоз

Хозяйства	Кол-во ж-х	M±m, p<0,05					
		на питательных средах, %			в РНИФ,%		
		Г	А	У	Г	А	У
ООО «Титан»	10	40±15,5	50±15,8	30±14,5	40±15,5	60±15,5	40±15,5
ООО «Атлант»	10	30±14,5	20±12,6	20±12,6	30±14,5	50±15,8	10±6,7
СПК им. Чапаева	10	30±14,5	20±12,6	30±14,5	50±15,8	40±15,5	40±15,5
Всего (3):	30	33,3±8,6	30±8,4	26,6±8,1	40±8,9	50±9,1	30±8,4

При помощи микробиологического метода и РНИФ исследовали патологический материал от свиней из 8 хозяйств Омской и Тюменской областей (см. табл. 3.69).

Таблица 3.69

Чувствительность РНИФ и микробиологического метода исследования патологического материала от погибших и вынужденно убитых свиней и абортированных плодов на микоплазмоз

Хозяйства	Кол-во проб	M±m, p<0,05					
		на средах, %			в РНИФ, %		
		Г	А	У	Г	А	У
ООО «АК Ударный»	9	0	0	0	11,1±10,4	11,1±10,4	11,1±10,4
ОАО «ОПХ СибМИС»	7	28,5±17,0	14,3±13,2	14,3±13,2	28,5±17,0	14,3±13,2	42,8±18,7
СПК им. Чапаева	20	20±8,9	15±7,9	30±10,2	40±10,9	35±10,6	45±11,1
КФХ Вохмин	20	20±8,9	5±4,8	25±9,7	40±10,9	10±6,7	30±10,2
ООО «Комплекс»	8	12,5±11,7	12,5±11,7	12,5±11,7	12,5±11,7	0	0
ООО «Согласие»	7	0	14,2±13,2	14,2±13,2	28,5±17,0	0	14,2±13,2
КХ Трейзе	20	20±8,9	15±7,9	20±8,9	35±10,6	30±10,2	30±10,2
КХ «Рощино»	8	25±15,3	0	0	25±15,3	0	25±15,3
Всего (8):	99	15,7±3,6	9,5±2,9	14,5±3,5	27,6±4,5	12,5±3,3	24,7±4,3

В СПК имени Чапаева глюкозоферментирующие микоплазмы и уреаплазмы были выделены из суставной жидкости бактериологическим методом в 30 %, а аргининзависимые микоплазмы – в 20 % проб, а в РНИФ глюкозоферментирующие микоплазмы обнаружены в 50 %, а аргининзависимые микоплазмы и уреаплазмы – в 40 % исследованных проб.

В ООО «АК Ударный» микоплазмы и уреаплазмы были выделены только в РНИФ в 11,1% случаев. В ООО «Комплекс» глюкозоферментирующие микоплазмы были выявлены микробиологическим методом и в РНИФ в 12,5% случаев, а аргининзависимые микоплазмы и уреаплазмы выделены только на питательных средах в 12,5% случаев.

В КХ «Рощино» глюкозоферментирующие микоплазмы были выявлены в 25 % в РНИФ, что подтвердилось микробиологическим методом, а уреаплазмы были обнаружены в 25 % только в РНИФ.

В патологическом материале СПК имени Чапаева глюкозоферментирующие микоплазмы на питательных средах были выделены из 20 % проб, тогда как в РНИФ из 40 %, аргининзависимые микоплазмы – из 15 и 35 %, а уреаплазмы – из 30 и 45 % проб соответственно.

В ООО «Согласие» уреаплазмы на питательных средах, так же, как и в РНИФ были выделены из 14,2 % проб; аргининферментирующие микоплазмы изолированы только на средах в 14,2 % проб, тогда как в РНИФ их антигены не обнаруживали, а глюкозоферментирующие микоплазмы выявлены только в РНИФ в 28,5 % случаев.

В ОАО «ОПХ СибМИС» глюкозоферментирующие микоплазмы выявлены в 28,5 %, а аргининзависимые – в 14,3 % случаев, что подтвердилось микробиологическим и серологическим методами, а уреаплазмы на питательных средах выделены в 14,3 %, а в РНИФ – в 42,8 % случаев. Из 30 проб легких погибших свиней было выделено 11 культур микоплазм, или 36,6 %: из печени – 28,5 %, из сердца – 25 %, из почек и селезенки – 20 % (табл. 3.70).

Таблица 3.70

Выделение микоплазм из патологического материала от погибших свиней из хозяйств Омской и Тюменской областей

Наименование пат. материала	Исследовано проб	Выделено культур микоплазм	%
Легкие	30	11	36,6
Печень	7	2	28,5
Почки	5	1	20
Селезенка	5	1	20
Сердце	4	1	25

Таким образом, результаты исследований подтверждают, что РНИФ не уступает по чувствительности микробиологическому методу исследования, а в некоторых случаях даже превосходит его. РНИФ, являясь экспресс-методом, позволяет в кратчайшие сроки в течение одного часа поставить диагноз на микоплазмоз. Кроме того, с помощью данного метода можно одновременно с индикацией микоплазм определять и их принадлежность к *M. hyosynoviae, M. hyorhinis* и *Ureaplasma sp*.

Для изучения чувствительности серологических методов (РНИФ, РНГА) диагностики микоплазмоза свиней провели выборочные исследования сыворотки крови свиней из хозяйств Омской и Тюменской областей под контролем микробиологического метода диагностики (табл. 3.71).

В целом при исследовании сыворотки крови от свиней из десяти хозяйств на микоплазмоз с помощью РНИФ было выявлено 69,6 %, а в РНГА 63,3 %. В некоторых случаях РНИФ выявляет больше больных и микоплазмоносителей, а иногда наоборот, что, по-видимому, связано с индивидуальными особенностями животных и синтезом у них различных антител: гемагглютининов, преимущественно улавливаемых в РНГА, и неполных антител, дополнительно обнаруживаемых в РНИФ. Эти методы равнозначны по чувствительности, дополняют друг друга и позволяют обнаруживать на 5–20 % (в среднем на 9 %) больше больных животных.

Таблица 3.71

Чувствительность РНИФ и РНГА по результатам исследования на микоплазмоз сыворотки крови поросят и свиней

№ п/п	Хозяйства	Кол-во проб крови	РНИФ, %	РНГА, %
1	ЗАО «Новоазовское»	120 ремонтный молодняк	71±4,1	65±4,3
2	ООО« АК Ударный»	10 ремонтный молодняк	100±0,0	90±9,5
3	ЗАО «Кам. Курское»	20 свиноматки 25 поросята	70±10,2 100±0,0	55±11,1 76±8,5
4	ООО «Титан»	10 ремонтный молодняк	90±9,5	60±15,5
5	ОАО «Атлант»	20 ремонтный молодняк	80±8,9	60±10,9
6	СПК им. Чапаева	15 свиноматки 10 поросята	66,6±12,2 90±9,5	60±12,6 70±14,5
7	КФХ Вохмин	15 свиноматки 20 поросята	60±12,6 75±9,7	66,6±12,2 65±10,6
8	КХ Трейзе	20 свиноматки 20 поросята	60±10,9 65±10,6	50±11,2 45±11,1
9	«Рощино»	7 свиноматки	14,3±13,2	57,1±18,7
10	ООО «Комплекс»	9 поросята	33,3±15,7	66,6±15,7
Всего:		321	69,6±2,6	63,3±2,7

После сравнения диагностической ценности изученных методов диагностики микоплазмоза свиней по результатам исследования сыворотки крови провели комплексное исследование биоматериала от свиней и поросят из свиноводческих хозяйств Омской и Тюменской областей (табл. 3.72).

Таким образом, РНИФ и РНГА являются высокочувствительными диагностическими тестами. Комплексное их применение для исследования сыворотки крови и цервико-вагинальной слизи позволяет, в среднем, на 9 % больше выявлять больных свиней и микоплазмоносителей. При этом положительные результаты РНГА и РНИФ подтверждаются выделением микоплазм из биоматериала при микробиологическом исследовании, что указывает на их высокую диагностическую ценность.

Таблица 3.72

Диагностическая ценность комплекса методов исследований на микоплазмоз в производственных условиях

№ хозяйства	РНИФ. Кол-во проб / результат, %					РНГА, %	Микробиол. метод, %
	сыворотка крови	цервико-вагин. слизь	суст. жидкость	пат. мат-л	нос. слизь	сыворотка крови	
1	-	-	-	-	-	10/90	10/90
2	10/90	10/90	10/80	-	-	10/60	20/75
3	120/71	20/90	-	-	-	120/65	20/85
4	10/100	10/80	-	9/22,2	40/65	10/90	59/64,4
5	45/85	20/90	-	-	25/92	45/65,5	45/75
6	-	-	-	-	-	-	20/70
7	-	-	-	7/57,1	-	-	7/42,8
8	-	-	-	-	-	-	12/33
9	25/78,3	20/85	10/90	20/85	-	25/64	50/64
10	35/67,5	20/60	-	20/65	-	35/65,7	40/45
11	40/62,5	20/70	-	20/80	10/60	40/47,5	50/62
12	20/80	10/90	10/60	-	-	20/60	20/65
13	9/33,3	-	-	8/12,5	-	9/66,6	8/25
14	-	-	-	7/28,5	-	-	7/28,5
15	7/14,3	-	-	8/50	-	7/57,1	8/25
Всего:	321/69	130/81,8	30/76,6	99/50	75/72,3	331/66,5	376/56,6

Примечание: материал получен из хозяйств: № 1 – ЗАО «Рось», № 2 – ООО «Группа компаний Титан», № 3 – ЗАО «Новоазовское», № 4 – ООО «Агрокомплекс Ударный», № 5 – ЗАО «Кам. Курское», № 6 – ЛПХ Ефремова, № 7 – ООО «ОПХ Сиб-МИС», № 8 – Еремеевское, № 9 – СПК им. Чапаева, № 10 – КФХ Вохмина, № 11 – КХ Трейзе, № 12 – ОАО «Атлант», №13 – ООО «Комплекс», № 14 – ООО «Согласие», № 15 – КХ «Рощино».

Оба теста являются экспресс-методами диагностики, с помощью которых можно проводить прижизненные и посмертные исследования биоматериала, индикацию и идентификацию выделенных микоплазм по их антигенной структуре, выявлению антител при проведении массовых исследований сыворотки крови на микоплазмоз и другие инфекционные болезни (пастереллез, хламидиоз, лептоспироз, сальмонеллез и др.). Комплексные микробиологические и серологические исследования позволяют своевременно выявлять как больных, так и микоплазмоносителей и проводить лечебно-профилактические мероприятия при данной инфекционной болезни.

3.8.6. Сравнительное изучение чувствительности микробиологического, серологического (РНИФ) и ПЦР методов диагностики

Для сравнительного изучения чувствительности микробиологического, серологического (РНИФ) методов диагностики микоплазмоза свиней и метода полимеразной цепной реакции нами было проведено исследование биоматериала от свиней из некоторых хозяйств Омской и Тюменской областей. Материалом для исследований служила цервико-вагинальная слизь от свиноматок, подозреваемых в спонтанном заражении микоплазмозом, а также патологический материал от павших или вынужденно убитых свиней и абортированных плодов (табл. 3.73, 3.74).

Таблица 3.73

Результаты комплексных исследований патологического материала от свиней из хозяйств Тюменской и Омской областей на микоплазмоз

№ п/п	Хозяйство	ПЦР	Микробиологич. метод			РНИФ		
			Г	А	У	Г	А	У
1	ООО «Комплекс»	+	-	-	-	-	-	-
2		+	+	-	-	-	-	-
3		+	-	+	+	-	-	-
4		+	-	-	-	-	-	-
5		+	-	-	-	-	-	-
6		+	-	-	-	+	-	-
7		+	-	-	-	-	-	-
8		+	-	-	-	-	-	-
9	ООО «Согласие»	+	-	-	-	+	-	+
10		+	-	-	-	+	-	-
11		+	-	+	-	-	-	-
12		+	-	-	-	-	-	-
13		+	-	-	+	-	-	-
14		+	-	-	-	-	-	-
15		+	-	-	-	-	-	-
16	ООО «Рощино»	+	+	-	-	-	-	+
17		+	-	-	-	+	-	-
18		+	-	-	-	-	-	-
19		+	-	-	-	-	-	-
20		+	-	-	-	+	-	-
21		+	-	-	-	-	-	-
22		+	+	-	-	-	-	-
23		+	-	-	-	-	-	+
24	ООО « АК Ударный»	-	-	-	-	-	-	-
25		-	-	-	-	-	-	-

26		-	-	-	-	-	-	-
27		+	+	-	-	+	-	-
28		+	-	-	+	+	-	+
29	ОАО «ОПХ СибМИС»	+	+	-	+	+	-	+
30		+	-	-	-	-	-	+
31		+	+	-	-	+	-	-
32		+	-	+	-	-	+	+
33		-	-	-	-	-	-	-
34		-	-	-	-	-	-	-
35		-	-	-	-	-	-	-
Всего, %:		83	17,2	8,5	11,4	25,7	2,8	20
			31,4			37,1		

Для микробиологической диагностики использовали жидкие и плотные микоплазмозные питательные среды: для индикации глюкозоферментирующих и аргининзависимых микоплазм, а также уреаплазм.

В качестве серологического теста использовали РНИФ с применением полученных нами микоплазмозных антигенов и гипериммунных сывороток. При исследовании проб патологического материала от поросят из 5 хозяйств Омской и Тюменской областей методом ПЦР было выявлено 83 % положительных на микоплазмоз проб. Микробиологическим методом выделено 31,4 % микоплазм (из них 17,2 % глюкозоферментирующих микоплазм, 8,5 % аргининзависимых микоплазм и 11,4 % уреаплазм), а в РНИФ 37,1 % (25,7, 2,8 и 20 % соответственно).

Таблица 3.74

Результаты комплексных исследований цервико-вагинальной слизи от свиноматок из хозяйств Омской области на микоплазмоз

№ п/п	Хозяйство	ПЦР	Микробиологический метод			РНИФ		
			Г	А	У	Г	А	У
1	ОАО «ОПХ СибМИС»	+	-	+	-	-	+	+
2		+	+	-	+	+	-	+
3		+	-	-	-	-	-	-
4		-	-	-	-	-	-	-
5		+	+	-	-	+	-	+
6	ЗАО «Рось»	+	-	+	+	-	+	+
7		+	-	+	-	+	+	-
8		+	-	-	-	-	-	+
9		-	-	-	-	-	-	-

10		+	+	-	+	+	+	+
11		+	+	-	+	-	-	+
12	ООО « Ударный»	+	+	-	-	+	-	-
13		+	-	-	+	+	-	+
14		+	+	-	-	+	+	-
15		-	-	-	-	-	-	-
Всего, %:		80	40	20	33,3	46,6	33,3	53,3
			66,6			73,3		

В ПЦР обнаружено на 51,6 %, а в РНИФ на 5,7 % больше микоплазм, чем при помощи микробиологического метода. Методом ПЦР дополнительно к микробиологическому выявлено 51,4 % положительных проб, а в РНИФ – 20 %. При исследовании проб цервико-вагинальной слизи от свиноматок из хозяйств Омской области методом ПЦР было выявлено 80 % положительных на микоплазмоз проб. Микробиологическим методом выделено 66,6 % (из них 40 % глюкозоферментирующих микоплазм, 20 % аргининзависимых микоплазм и 33,3 % уреаплазм), а в РНИФ 73,3 % (46,6, 33,3 и 53,3 % соответственно).

В ПЦР обнаружено на 13,4 % больше микоплазм, чем при помощи микробиологического метода, а в РНИФ на 6,7 % больше. Методом ПЦР дополнительно к микробиологическому выявлено 13,3 % положительных проб, а в РНИФ – 6,6%.

Таким образом, основным методом диагностики микоплазмоза остается микробиологическое выделение возбудителя на питательных средах, что дает возможность получения чистой культуры и последующего её изучения, а также чувствительности к антибиотикам. Вместе с тем микробиологический метод выделения микоплазм требует длительного времени для постановки диагноза, высококачественных питательных сред, оптимальных условий отбора, хранения и транспортировки анализируемых проб.

Серологические же методы являются ориентировочными, но они позволяют в более короткие сроки выявить больных и микоплазмоносителей (экспресс-методы). Они менее трудоемкие, позволяют проводить как прижизненную, так и посмертную диагностику, выявлять возбудителя в различных образцах. Кроме

того, с помощью специфических микоплазмозных сывороток можно идентифицировать возбудителя до вида. Метод ПЦР имеет множество достоинств: высокая чувствительность, специфичность, производительность, быстрота, возможность дифференциальной видовой диагностики, возможность диагностики возбудителя в различных образцах. С помощью тест-систем на основе ПЦР можно проводить единичные диагностические исследования и осуществлять широкомасштабный мониторинг поголовья в различных свиноводческих хозяйствах, что позволяет своевременно устанавливать или подтверждать диагноз у инфицированных животных. Однако для проведения ПЦР-диагностики необходимо иметь лаборатории, оснащенные специальным оборудованием и необходимым набором дорогостоящих реактивов.

3.9. Изыскание средств и методов лечения свиней при микоплазмозе, в том числе ассоциированном с другими инфекциями

3.9.1. Определение чувствительности выделенных от свиней культур микоплазм к антибактериальным препаратам in vitro

Перед назначением лечебных средств больным животным необходимо проводить определение чувствительности микрофлоры к антибактериальным препаратам.

Методом серийных разведений на жидких диагностических питательных средах (пробирочный вариант) определяли антибиотикочувствительность выделенных от свиней культур микоплазм и уреаплазм (*M. hyorhinis, M. hyosynoviae, Ureaplasma sp*.). Готовили растворы антибиотиков в различных разведениях на жидких питательных средах и после определения титра микоплазм (уреаплазм), который должен составлять не менее 10 000 ЦОЕ/мл, вносили культуры в пробирки с антибиотиками и без них для контроля роста. Оценку результатов проводили через

24–48 часов. Изменение цвета среды с антибиотиком свидетельствует о росте тестируемой культуры и ее резистентности к соответствующему антибиотику, отсутствие изменения цвета – об угнетении роста и чувствительности культуры к данному препарату. За минимальную подавляющую концентрацию антибактериального препарата принимали наименьшую концентрацию антибиотика (мкг/мл, ЕД/мл), которая in vitro полностью подавляет видимый рост микроорганизмов.

Наибольшую чувствительность микоплазмы проявили по отношению к энрофлоксацину, гентамицину, линкомицину, тетрациклину, норфлоксацину, тилану и триметоприму (табл. 3.75). Уреаплазмы, в отличие от микоплазм, были наиболее чувствительны к эритромицину и резистентны к ципрофлоксацину. Амоксициклин не оказывал влияния на тестируемые культуры в используемых разведениях. Тилан, тиланик, тилозина тартрат и триметоприм оказывали одинаковое ингибирующее действие на культуры как микоплазм, так и уреаплазм.

Таблица 3.75

Минимальная подавляющая концентрация различных антибиотиков в отношении культур микоплазм и уреаплазм, выделенных от свиней из хозяйств Омской и Тюменской областей (ЕД/мл)

№ п/п	Антибиотик	*M. hyorhinis*	*M. hyosynoviae*	*Ureaplasma sp.*
1	Энрофлоксацин	<0,2	<0,2	<0,2
2	Гентамицин	0,4	1,56	0,8
3	Линкомицин	<0,2	0,4	6,25
4	Тетрациклин	12,5	6,25	12,5
5	Окситетрациклин	6,25	3,12	3,12
6	Левомицетин	12,5	>50	>50
7	Эритромицин	25	>50	3,12
8	Ципрофлоксацин	<0,2	0,8	>50
9	Норфлоксацин	<0,2	3,12	3,12
10	Амоксициклин	>50	>50	>50
11	Тилан	12,5	6,25	6,25
12	Тилозина тартрат	6,25	12,5	25
13	Тиланик	3,12	3,12	25
14	Триметоприм	6,25	3,12	12,5
15	Сульфадимезин	12,5	50	>50
16	Норсульфазол	25	>50	>50

Наиболее активные в отношении выделенных культур микоплазм и уреаплазм антибактериальные препараты (энрофлоксацин, линкомицин, тетрациклин, тилан и др.) были использованы нами в опытах по изучению различных схем лечения микоплазмоза свиней и ассоциативных форм его проявления в производственных условиях.

3.9.2. Изучение различных схем лечения свиней при микоплазмозе и ассоциативных формах его проявления

Производственные опыты по изучению различных схем лечения свиней при микоплазмозе и ассоциативных формах его проявления были проведены в ЗАО «Кам. Курское» Омской области, исследования проводили в лаборатории микст-инфекций кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней ИВМ ОмГАУ.

Схемы лечения (табл. 3.76) испытывали на свиноматках с клиническими признаками эндометритов, послеродовыми осложнениями, абортами, мертворождаемостью и мумификацией плодов в анамнезе (опыт 1, табл. 3.77) и поросятах с признаками бронхитов, бронхопневмоний, артритов (опыт 2, табл. 3.78). После проведения лабораторных исследований биоматериала от отобранных животных их делили на группы по 5 голов в каждой. Свиноматок разделили на 5 групп, больные животные 4-й группы служили в качестве контроля, им лечение не проводилось, 5-я группа (плацебо группа) состояла из клинически здоровых (интактных) животных и служила вторым контролем манипуляции с препаратами. Поросята были разделены на 6 групп. 5-ю группу лечили по традиционной схеме, применяемой в хозяйстве, а 6-я была контрольной интактной группой.

Таблица 3.76

Схемы лечения свиней при микоплазмозе и ассоциативных формах его проявления

Группы животных	Характеристика групп	Применяемые препараты	Курс лечения
Опыт 1. Свиноматки			
1	Мик.	Энрофлокс 5 %	0,5–1 мл на 10 кг в теч. 3–5 дней
2	Мик.+сальм.	Тетрациклин ПВП	0,1 мл на 1 кг однократно
3	Хлам.+уреапл.	Левотетрасульфин ПЭГ	1 мл на 10 кг двукратно с интервалом 3 дня
4	Мик.+уреапл.	Контрольная нелеченая группа	–
5	Клинически здоровые животные	Контрольная интактная группа	–
Опыт 2. Поросята			
1	Мик.+уреапл.	Линкомицин	0,5–1 мл на 10 кг в теч. 5–7 дней
2	Мик.+паст.	Энрофлокс 5%	0,5–1 мл на 10 кг в теч. 3–5 дней
3	Мик.+уреапл.+ лепт.+лист.	Тилоциклин ПЭГ	0,1 мл на 1 кг однократно
4	Мик.+хлам.+ сальм.+лист.	Левотетрасульфин ПЭГ	1 мл на 10 кг двукратно с интервалом 3 дня
5	Мик.+паст.+ сальм.	Контрольная группа, леченная по традиционной схеме, применяемой в хозяйстве (Нитокс).	1 мл на 10 кг однократно
6	Клинически здоровые животные	Контрольная интактная группа	–

Примечание: хлам. – хламидиоз; лепт. – лептоспироз; лист. – листериоз; сальм. – сальмонеллез; паст. – пастереллез, мик. – микоплазмоз, уреапл. – уреаплазмоз.

До лечения и через 15 дней после него исследовали сыворотку крови, цервико-вагинальную слизь от свиноматок, носовые истечения от поросят лабораторными методами: микробиологическими – с применением жидких и плотных питательных сред для индикации и идентификации микоплазм; серологическими – реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) с использованием разработанного нами микоплазмозного эритроцитарного диагностикума (МЭД), реакция прямой (РПИФ) и непрямой (РНИФ) иммунофлуоресценции. В качестве антигенов и антисывороток

использовали стандартные диагностикумы для РА и РСК, инактивированные вакцинные штаммы, стандартные люминесцентные антивидовые кроличьи, свиные сыворотки для РНИФ и люминесцентную сальмонеллезную сыворотку для РПИФ, изготовленную НИИЭМ имени Гамалеи, а также полученные нами кроличьи сыворотки против микоплазмоза и уреаплазмоза. Критерием оценки эффективности схем лечения служило отсутствие микробоносительства у животных после лечения.

Целью данного опыта было изучение различных схем лечения свиней при микоплазмозе и ассоциативных формах его проявления с использованием препаратов, действующих на все микроорганизмы, участвующие в инфекционном процессе.

Характеристика препаратов. Тетрациклин-ПВП – лекарственная форма пролонгированного действия, состоящая из тетрациклина, антиокислителя, анестезирующего вещества, растворенных в полимере-наполнителе ПВП; левотетрасульфин-ПЭГ состоит из тетрациклина, левомицетина, сульфадимезина, растворенных в полимере-наполнителе ПЭГ, тилоциклин-ПЭГ – из тетрациклина, тилана, антиокислителя, анестезирующего вещества, растворенных в ПЭГ; 1 мл энрофлокса 5 % содержит 50 мг энрофлоксацина; нитокс – действующее вещество окситетрациклин; в 1 мл раствора линкомицин содержится 100 мг линкомицина гидрохлорида.

Результаты опыта 1

Таблица 3.77

Исследование сыворотки крови в РНИФ от свиноматок ЗАО «Кам. Курское» до / после лечения

№ группы	Выявлено животных по наличию флуоресцирующих антител, %							
	хлам.	лепт.	лист.	сальм.	паст.	Г	А	У
1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	100/0	80/0	0/0
2	0/0	0/0	0/0	80/0	0/0	100/0	100/0	0/0
3	80/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	100/60
4	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	100/100	100/100	100/100
5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

Примечание: хлам. – хламидиоз, лепт. – лептоспироз, лист. – листериоз, сальм. – сальмонеллез, паст. – пастереллез, Г – глюкозоферментирующие, А – аргининзависимые микоплазмы, У – уреаплазмы.

По результатам контрольного исследования сыворотки крови свиноматок после лечения (табл. 3.79) установлено, что антитела против хламидий в 3-й группе и сальмонелл во 2-й группе полностью исчезли. По отсутствию антител к микоплазмам 100 % -ная эффективность лечения была отмечена в 1 и 2-й группах. Число животных – уреаплазманосителей в 3-й группе сократилось на 40 %. В 4, 5-й контрольных группах показатели не изменились.

Таблица 3.78

Исследование цервико-вагинальной слизи от свиноматок ЗАО «Кам. Курское» до / после лечения

№ группы	Выявлено животных-носителей антигенов микроорганизмов, %							
	хлам.	лепт.	лист.	сальм.	паст.	Г	А	У
1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	100/0	100/0	0/0
2	0/0	0/0	0/0	100/0	0/0	100/0	80/0	0/0
3	100/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	80/40
4	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	100/100	100/100	100/100
5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

По отсутствию антигенов возбудителей хламидиоза в цервико-вагинальной слизи свиноматок 3-й группы и сальмонеллеза во 2-й группе была отмечена 100 %-ная эффективность лечения (табл. 3.79). Микоплазмы полностью исчезли у животных 1, 2-й групп, а в 3-й группе количество уреаплазмоносителей сократилось в 2 раза. У животных 4, 5-й групп показатели остались без изменений.

Результаты опыта 2

Таблица 3.79

Исследование сыворотки крови в РНИФ от поросят ЗАО «Кам. Курское» до / после лечения

№ группы	Выявлено животных по наличию флуоресцирующих антител, %							
	хлам.	лепт.	лист.	сальм.	паст.	Г	А	У
1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	100/0	80/0	80/0
2	0/0	0/0	0/0	0/0	60/0	100/0	80/0	0/0
3	0/0	60/20	80/40	0/0	0/0	80/20	100/0	80/20
4	60/40	0/0	80/40	100/40	0/0	80/0	80/20	0/0
5	0/0	0/0	0/0	100/20	60/0	80/0	60/0	0/0
6	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

По отсутствию антител, которые связали и элиминировались вместе с антигенами разрушенных препаратами возбудителей, 100 %-ная эффективность лечения наблюдалась в 1, 2 и 5-й группах (табл. 3.80). В 3-й группе снизилось количество носителей глюкозоферментирующих микоплазм и уреаплазм на 60 %, а антитела к аргининзависимым микоплазмам исчезли полностью. В 4-й группе количество носителей аргининзависимых микоплазм сократилось на 60 %, а антитела к глюкозоферментирующим микоплазмам исчезли полностью. По отсутствию пастереллезных антител 100 %-ная эффективность лечения наблюдалась во 2 и 5-й группах. Число носителей возбудителей хламидиоза в 4-й группе сократилось на 20 %, лептоспироза в 3-й группе – на 40 %, листериоза в 3 и 4-й группах – также на 40 % и сальмонеллеза в 4-й группе – на 60 %, а в 5-й группе – на 80 %.

Таблица 3.80

Исследование носовой слизи от поросят ЗАО «Кам. Курское» до / после лечения

№ группы	Выявлено животных-носителей антигенов микроорганизмов, %							
	хлам.	лепт.	лист.	сальм.	паст.	Г	А	У
1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	80/0	100/0	60/0
2	0/0	0/0	0/0	0/0	80/0	80/0	100/0	0/0
3	0/0	80/20	80/40	0/0	0/0	100/20	100/0	100/20
4	80/40	0/0	60/40	80/20	0/0	100/0	80/20	0/0
5	0/0	0/0	0/0	80/20	80/0	100/0	80/0	0/0
6	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

По результатам контрольного исследования носовой слизи поросят (табл. 3.80) установлено полное исчезновение антигенов микоплазм и уреаплазм у животных 1, 2 и 5-й групп. В 3 и 4-й группах их количество снизилось на 80 и 60 % соответственно. После лечения пастереллы у поросят 2, 5-й групп не выявлялись. Сальмонеллезные антигены после применения 4, 5-й схем лечения обнаруживались у 20 % животных. После применения 3-й схемы количество лептоспироносителей сократилось на 60 %, а листерионосителей – на 40 %. В 4-й группе после лечения хламидии и листерии выделялись у 40 % поросят. У животных контрольной группы показатели не изменились.

При сравнительном анализе эффективности схем лечения свиноматок в первом опыте (табл. 3.81) установлена 100 %-ная эффективность при микоплазмозе в 1-й группе, а при микоплазмозе в сочетании с сальмонеллезом – во 2-й группе. В остальных группах при микоплазмозе в ассоциации с другими инфекционными агентами эффективность лечения выбранными препаратами была ниже. При этом 100 %-ная эффективность терапии выявлена при хламидиозе у животных 3-й группы.

Во втором опыте при лечении поросят больных микоплазмозом и уреаплазмозом 100 %-ная эффективность наблюдалась в 1, 2 и 5-й группах. В 3, 4-й группах лечение при микоплазмоз-ассоциированной инфекции было менее успешным. Вместе с тем 100 %-ная эффективность лечения животных при пастереллезе отмечена во 2, 5-й группах.

Таблица 3.81

Эффективность различных схем лечения свиноматок и поросят (по отсутствию антигенов возбудителей в биоматериале)

№ групп-пы	Эффективность по отсутствию отдельных возбудителей в РНИФ, %								Общая эффективность схем, %
	хлам.	лепт.	лист.	сальм.	паст.	Г	А	У	
Опыт 1. Свиноматки									
1	-	-	-	-	-	100	100	-	100
2	-	-	-	100	-	100	100	-	100
3	100	-	-	-	-	-	-	40	70
4	-	-	-	-	-	0	0	0	0
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Опыт 2. Поросята									
1	-	-	-	-	-	100	100	100	100
2	-	-	-	-	100	100	100	-	100
3	-	60	40	-	-	80	100	80	72
4	40	-	20	60	-	100	60	-	56
5	-	-	-	60	100	100	100	-	90
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Таким образом, наиболее эффективной схемой лечения свиноматок при микоплазмозе оказалась 1-я при использовании энрофлокса 5 %, а при лечении от микоплазмоза в сочетании с сальмонеллезом – 2-я с применением тетрациклина-ПВП. При

лечении поросят, инфицированных микоплазмами и уреаплазмами, наиболее эффективной была 1-я схема с применением линкомицина, а при смешанной инфекции микоплазмоза с пастереллезом – 2-я (энрофлокс 5 %) и 5-я (нитокс) схемы. Общая эффективность 5-й схемы лечения поросят при микоплазмозе, ассоциированном с сальмонеллезом и пастереллезом, составила 90 %. У остальных схем лечения при микоплазмоз-ассоциированной инфекции с лептоспирозом и листериозом, листериозом и сальмонеллезом эффективность была ниже и составляла 72 и 56 % соответственно.

3.9.4.Экономическое обоснование схем лечения

Экономический ущерб от ассоциативного микоплазмоза складывается из вынужденного убоя заболевших, снижения мясной продуктивности, абортов, рождения нежизнеспособного молодняка. Нами был изучен экономический ущерб и определен экономический эффект от применения эффективных схем лечения при микоплазмозе свиней в ЗАО «Кам. Курское» за 2007 г.

Таблица 3.82

Расчётные данные для экономического обоснования при микоплазмозе свиней

№ п/п	Показатели	Единицы измерения	Количество голов
1	Среднегодовое поголовье свиней	голов	301
2	Количество заболевших животных	голов	45
3	Погибло животных	голов	9
4	Вынужденно убито животных	голов	15
5	Коэффициент возможной заболеваемости		0,23
6	Средняя живая масса 1 животного	ц	0,77
7	Закупочная цена 1 ц живой массы	руб.	6500
8	Ветеринарные затраты:	руб.	10 000
9	Среднесуточное количество продукции, полученное: – от здоровых животных в расчете на 1 гол. – от больных животных в расчете на 1 гол.	 кг кг	 0,365 0,125
10	Коэффициент рождаемости		23
11	Контингент маток для расплода	гол.	17
12	Фактическое кол-во родившихся поросят	гол.	369
13	Условная стоимость 1 гол. приплода	руб.	800

Определение экономического ущерба

А. От вынужденного убоя животных:

$$У_1 = М \cdot Ж \cdot Ц,$$

где $М$ – количество убитых животных, гол.; $Ж$ – средняя живая масса одного животного, ц; $Ц$ – закупочная цена 1 ц живой массы, руб.**;**

$$У_1 = 15 \cdot 0{,}77 \cdot 6500 = 75\ 075\ руб.$$

Б. От падежа животных:

$$У_2 = М \cdot С_п + (В_п \cdot Т \cdot Ц),$$

где $М$ – количество павших поросят, гол.; $С_п$ – стоимость поросенка при рождении, руб.; $В_п$ – среднесуточный прирост живой массы, кг; $Т$ – возраст павших поросят, дн.; $Ц$ – закупочная цена единицы живой массы, руб.

$$У_2 = 9 \cdot 800 + (0{,}365 \cdot 30 \cdot 65) = 7912\ руб.$$

В. От снижения продуктивности животных вследствие заболевания:

$$У_3 = М_з\ (А_з – А_б)\ Т \cdot Ц_а,$$

где $М_з$ – количество заболевших животных, гол.; $А_з$ и $А_б$ – среднесуточное количество продукции, полученное соответственно от здоровых и больных животных в расчете на 1 голову, кг; $Т$ – средняя продолжительность заболевания, дн.; $Ц_а$ – закупочная цена единицы продукции, руб.

$$У_3 = 45\ (0{,}365 – 0{,}125) \cdot 10 \cdot 65 = 7020\ руб.$$

Г. От недополучения приплода вследствие бесплодия свиноматок:

$$У_4 = (К_р \cdot Р_в – Р_ф) С_п,$$

где $К_р$ – коэффициент рождаемости; $Р_в$ – контингент маток для расплода, гол.; $Р_ф$ – фактическое количество родившихся поросят, гол.; $С_п$ – условная стоимость 1 головы приплода, руб.

$$У_4 = (23 \cdot 17 – 369)\ 800 = 17\ 600\ руб.$$

Д. Общий фактический ущерб:

$$У_0 = У_1 + У_2 + У_3 + У_4,$$

где $У_1$, $У_2$, $У_3$,$У_4$ – виды экономического ущерба в рублях от убоя животных, снижения продуктивности, недополучения приплода.

Расчет

$$У_0 = 75\ 075 + 7912 + 7020 + 17\ 600 = 107\ 607\ руб.$$

Е. Ущерб на одно заболевшее животное:

$$К_{у1} = У_0 : 3,$$

где $У_0$ – фактический экономический ущерб, руб.; 3 – количество заболевших животных, гол.

$$К_{у1} = 107\ 607 : 45 = 2391{,}2 \text{ руб.}$$

Ж. Ущерб на одно животное стада:

$$К_{у2} = У_0 : М_0,$$

где $У_0$ – фактический экономический ущерб, руб.; $М_0$ – количество животных в стаде, гол.

$$К_{у2} = 107\ 607 : 301 = 357{,}5 \text{ руб.}$$

Ветеринарные затраты на одно заболевшее животное:

$$К_{уз} = З\ в : З,$$

где $З_в$ – ветеринарные затраты, руб.; $З$ – количество заболевших, гол.

$$К_{уз} = 10\ 000 : 45 = 222 \text{ руб.}$$

Предотвращенный экономический ущерб

$$Пу_1 = (М_0 \cdot Ку_1 \cdot Кз_1) – У_0,$$

где $М_0$ – количество животных в стаде, гол.; $Ку_1$ – ущерб на одно заболевшее животное, руб.; $К_{з1}$ – коэффициент возможной заболеваемости; $У_0$ – фактический экономический ущерб, руб.

$$Пу_1 = (301 \cdot 2391{,}2 \cdot 0{,}23) – 107\ 607 = 57\ 936 \text{ руб.}$$

Экономический эффект

$$Эв = Пу_1 – Зв,$$

где $Пу_1$ – предотвращенный экономический ущерб, руб.; $З_в$ – ветеринарные затраты, руб.

$$Э_в = 57\ 936 – 10\ 000 = 47\ 936 \text{ руб.}$$

Экономический эффект на один рубль ветеринарных затрат

$$Эр = Эв : Зв,$$

где $Э_в$ – экономический эффект, руб.; $З_в$ – ветеринарные затраты, руб.

$$Э_р = 47\ 936 : 10\ 000 = 4{,}8 \text{ руб.}$$

Таким образом, экономический ущерб от микоплазмоз-ассоциированной инфекции свиней за год составил – 107 607 руб. Применение разработанных схем лечения свиней в хозяйстве позволило предотвратить экономический ущерб на сумму 57 936 руб., при этом экономический эффект от проведенных лечебно-профилактических мероприятий составил 47 936 руб., а экономический эффект на один рубль затрат – 4,8 руб.

4. ДИАГНОСТИКА, ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ПТИЦ ПРИ РЕСПИРАТОРНОМ И АССОЦИИРОВАННОМ С ДРУГИМИ ИНФЕКЦИЯМИ МИКОПЛАЗМОЗЕ

4.1. Этиологические и эпизоотологические аспекты респираторного микоплазмоза птиц

Респираторный микоплазмоз птиц (болезнь воздухоносных мешков, инфекционный синусит индеек, хроническая респираторная болезнь (chronic respiratory disease) – инфекционная болезнь птиц, характеризующаяся поражением органов дыхания и хроническим течением.

Возбудитель респираторного микоплазмоза птиц – *Mycoplasma gallisepticum*, который является представителем класса *Mollicutes* порядка *Mycoplasmatales* семейства *Mycoplasmataceae*.

В настоящее время известно более двух десятков видов микоплазм, паразитирующих у птиц. Одни из них не патогенны, другие же при определенных условиях способны вызывать развитие патологических процессов в органах респираторного тракта, репродуктивной системы и суставах. Установлению этиологии болезни предшествовали исследования многих ученых.

В 1935 г. в США J.B. Nelson и T. Gibbs впервые описали заболевание кур с медленным началом и продолжительным течением, которое они назвали Coryza. Рост возбудителя, имеющего коккобациллярную форму, был получен ими как на куриных эмбрионах, так и на искусственных питательных средах. Позднее, в 1938 г., Dickinson и Hinshaw назвали болезнь инфекционным синуситом. В 1943 г. J.P. Delaplane и H.O. Stuart в США от цыплят, имевших признаки поражения органов дыхания, и от индеек, больных инфекционным синуситом, также выделили своеобразный инфекционный агент, который по физическим и культуральным свойствам занимал промежуточное положение между фильтрующимися вирусами и бактериями. Выделенный J.P.

Delaplan et al. возбудитель был подобен микроорганизму, обнаруженному J.B. Nelson и T. Gibbs. Заболевание, вызванное этим мельчайшим трудно классифицируемым микробом, было названо хронической респираторной болезнью. В 1952 г. F.S. Markham и S.C. Wong отнесли возбудителя к группе плевропневмониеподобных, D.G. Edward и E.A. Freundt вследствие явных отличий от бактерий и вирусов назвали его *Mycoplasma*.

В 1957 г. микроорганизмы, вызывающие хроническую респираторную болезнь кур и синусит индеек, были названы *M. gallinarum*. В дальнейшем это наименование использовали для обозначения непатогенных видов микоплазм, а патогенные были отнесены к виду *M. gallisepticum*. В 1961 г. на XXIX сессии Международного эпизоотического бюро была утверждена новая нозологическая единица – «респираторный микоплазмоз птиц».

В период с 1950 по 1970 годы респираторный микоплазмоз птиц был зарегистрирован во многих странах Европы, Азии, Африки, Австралии и Южной Америки. По данным O. Osteen (1956), в США к началу 1956 г. не было ни одного штата, свободного от респираторного микоплазмоза птиц. В 1962 г. в Италии было зарегистрировано 11 845 вспышек болезни, что составило 25,8 % от всех болезней. H.E. Marthedal и др. (1969) сообщили, что в Дании данная болезнь среди бройлеров диагностирована в период 1955–1960 гг., ежегодно погибало 6–10 % бройлеров. По данным J. Tournut, J. Espinase (1969), только в 1964 г. ущерб от респираторных заболеваний во Франции составил 34 % от общего ущерба в птицеводстве. В 1959 г. респираторный микоплазмоз был зарегистрирован в Болгарии (Чечнев И., Обрешков К., Шишков Н., 1966), Индии (Rao K., 1969) и Японии (Ando K., 1969).

В России первые случаи микоплазмоза были установлены в 1959 г. По данным Я.Р. Коваленко (1960), они были зарегистрированы в хозяйствах среди 3-месячных цыплят породы корниш, которые были выведены из яиц, завезенных из США, и цыплят породы леггорн, завезенных из Канады. Несмотря на то что вся приобре-

тенная птица была убита, болезнь продолжала распространяться и через полгода была обнаружена среди местной птицы. В отдельных хозяйствах выращенная птица заболела в 7-месячном возрасте в период яйцекладки. По данным Г.А. Грошевой (1966), в пяти хозяйствах Московской и Тамбовской областей 1959–1960 гг. при патологоанатомическом вскрытии трупов и тушек больных птиц, как правило, обнаруживали поражение грудных и межключичного воздухоносных мешков, причем ранее подобного массового заболевания в нашей стране не наблюдалось.

Отечественные исследователи внесли большой вклад в изучение вопросов этиологии, эпизоотологии, патогенеза, диагностики, лечения и профилактики респираторного микоплазмоза птиц: Я.Р. Коваленко (1960, 1976, 1977, 1980), А.Я. Фомина (1962, 1966, 1968), Г.А. Грошева, А.С. Серебряков, В.А. Шубин (1966, 1962, 1970, 1971, 1972, 1978), Е.В. Дьяконова (1970), В.С. Осколков (1966), М.Т. Прокофьева (1972), В.В. Кирпич (1966, 1971, 1973), О.В. Виноходов (1974, 1975, 1976, 1977), З.П. Федорова и И.А. Сопчак (1972).

По данным большинства исследователей, ведущую роль в этиологии респираторного микоплазмоза птиц играет *M. gallisepticum*. Однако есть сообщения, что подобную клиническую картину способны вызывать и другие микоплазмы – *M. synoviae* (возбудитель инфекционного синовита) и *M. gallinarum* (обычно непатогенный вид). Так, по данным S.H. Kleven, S.C. Eidson и O.J. Fletcher (1978), *M. gallinarum*, обычно считающаяся непатогенным микроорганизмом, привела к развитию у бройлеров аэросаккулита при введении совместно с вакцинным вирусом ньюкаслской болезни, или инфекционного бронхита. При этом в развитии аэросаккулитов определяющим фактором является наслоение вирусных и бактериальных инфекций (Kleven S.H., Eidson S.C., Fletcher O.J., 1978; Kleven S.H., King D.D., Anderson D.P., 1972; Hopkins S.R., Yoder H.W., 1982, 1984).

Трудности выделения *M. gallisepticum* и дифференциация возбудителей при смешанных респираторных инфекциях дли-

тельное время вызывали дискуссию о роли фильтрующихся вирусов и некоторых патогенных бактерий в этиологии и патогенезе респираторного микоплазмоза. Кроме того, не всегда удавалось воспроизвести заболевание в экспериментальных условиях при заражении чистыми культурами микоплазм, тогда как заражение патологическим материалом вело к развитию болезни.

Благодаря многочисленным и трудоемким исследованиям, выполненным в различных странах, в настоящее время подтверждена первичная роль *M. gallisepticum* в этиологии заболевания. Г.А. Грошева с соавторами (1970) в своих исследованиях показала, что воспроизвести микоплазмоз культурой микоплазм вполне возможно. Для этого автор рекомендует центрифугированием бульонной культуры довести количество микробных тел до двух миллиардов по бруцеллезному оптическому стандарту мутности и вводить цыплятам или индюшатам интранозально или интратрахеально в дозе 0,1–0,2 мл.

В естественных условиях к респираторному микоплазмозу птиц восприимчивы индейки, куры, цесарки, фазаны, павлины, голуби, куропатки и перепела (Серебряков А.С., Грошева Г.А., Шубин В.А., 1970). Есть сообщения о выделении M. gallisepticum от уток (Bencina D., Tadina T., Dorrer D., 1988) и гусей (Buntz B., 1986).

Индийские ученые S.B. Singh, S.M. Singh (1967) при исследовании чувствительности различных пород кур к респираторному микоплазмозу установили, что наиболее чувствительны куры чистых линий. По данным А.С. Серебрякова (1972), большую восприимчивость также отмечают у кур чистых линий и мясных пород, причем петухи более восприимчивы к микоплазмозу, чем куры.

Заболеванию респираторным микоплазмозом наиболее подвержены 3–7-месячные цыплята и молодые 6–8-месячные куры в начале яйцекладки. У цыплят до 2-месячного возраста микоплазмоз в клинически выраженной форме встречается реже. Куры старше года также болеют редко (Серебряков А.С., Грошева

Г.А., Шубин В.А., 1970; Бессарабов Б.Ф., 2001). Однако в литературе есть данные о тяжелом переболевании респираторным микоплазмозом цыплят 1–2-месячного возраста (Конопаткин А.А. с соавт., 1984), 20–45-дневного возраста (Коромыслов Г.Ф. с соавт., 1987) и 30-дневного возраста (Nunoya T.T., 1995).

Ряд исследователей отмечает, что значительный ущерб от болезни и продолжительность инфекции возрастает в холодные месяцы года, летом болезнь протекает в более легкой форме (Коваленко Я.Р., 1976; Ley D.N., Yoder H.W., 2003).

Летальность цыплят колеблется в пределах от 5–10 % (Серебряков А.С. с соавторами, 1970) до 20–30 % (Коромыслов Г.Ф., 1987; Ley D.N., Yoder H.W., 2003). При осложнении бактериальными и вирусными инфекциями она достигает до 50 % и выше. Однако основные потери от респираторного микоплазмоза складываются за счет плохого развития и роста больных цыплят вследствие низкой усвояемости корма, что приводит к передержке бройлеров, неоправданному перерасходу кормов, снижению сортности тушек и к большому проценту выбраковки из-за плохой упитанности – вынужденный убой может достигать до 50–75 % (Серебряков А.С.,1970).

По данным ряда исследователей (Бессарабов Б.Ф., Мельникова И.И., 2001; Серебряков А.С., 1970; Branton S.L., Deaton J.W., 1984), летальность среди взрослых птиц может быть незначительной до 4–6 %, но отмечается снижение яйценоскости от 10 до 50 %. Среди зараженных микоплазмозом яиц много неоплодотворенных. Эмбрионы плохо развиваются, гибель их от микоплазм составляет от 8 до 30 %.

Источником возбудителя инфекции является больная и переболевшая респираторным микоплазмозом птица, яйца, полученные от такой птицы, используемые для инкубации, и выведенные из них цыплята.

Основной путь передачи инфекции – трансовариальный, а также возможно аэрогенное и контактное заражение птиц респираторным микоплазмозом (Серебряков А.С., Осколков В.С.,

1966; Серебряков А.С., Грошева Г.А., Шубин В.А., 1970). По данным D. McMartin (1963), заражение аэрогенным путем вызывает у цыплят локализованный процесс в носовой полости, а более глубокие участки дыхательных путей не поражаются. При контактном заражении инфекция распространяется медленно и носит как бы вползающий характер. Появление антител в возрасте 90–120 дней указывает на преобладание контактного пути заражения птиц в хозяйстве (Бессарабов Б.Ф., 2001).

В литературе есть единичные сообщения о выделении микоплазм из спермы больных петухов (Yoder H.W., Hofstad M.S., 1965).

Некоторые авторы считают, что птицы могут инфицироваться при иммунизации вакцинами, изготовленными на куриных эмбрионах неблагополучных по микоплазмозу стад птиц. Возможны пути передачи инфекции с инвентарем, с кормом, обслуживающим персоналом и т. д.

Переболевание респираторным микоплазмозом приводит к образованию специфических антител. При этом птица приобретает нестерильный иммунитет (McMartin D., 1963; Серебряков А.С., 1970).

Отличительная черта респираторного микоплазмоза – продолжительное носительство возбудителя в организме. Так, по данным А.С. Серебрякова (1970), микоплазмы у переболевших кур сохраняются до 19 месяцев. *M. gallisepticum* способна продолжительное время находиться в организме, не проявляя своих патогенных свойств. При ослаблении защитной функции организма под воздействием неблагоприятных факторов этот микроб проявляет свои агрессивные свойства. К последним относятся недостаточный воздухообмен в помещении, превышение плотности посадки птиц, переохлаждение, несбалансированное кормление.

В этиологии респираторного микоплазмоза значительную роль играют вакцинные штаммы вирусов. Г.А. Грошева с соавторами (1970) указывает на то, что возникновению болезни спо-

собствует иммунизация птицы живыми вакцинами, особенно против респираторных вирусных болезней: инфекционного бронхита кур, инфекционного ларинготрахеита и ньюкаслской болезни. А с другой стороны, микоплазмоз тормозит образование поствакцинального иммунитета против ньюкаслской болезни и ларинготрахеита. Б.У. Кэлнек с соавт. (2003) отмечает иммуносупрессивное действие на организм птицы вакцинных вирусов инфекционного бурсита и болезни Марека, обусловливающее развитие микоплазмозной инфекции.

В проявлении болезни большое значение имеют вирусные и бактериальные заболевания, возбудители которых способствуют активизации и более интенсивному развитию респираторного микоплазмоза (Серебряков А.С., Грошева Г.А., Шубин В.А., 1970).

В природе чаще всего встречаются именно многокомпонентные системы и имеют место многосторонние взаимодействия макроорганизмов со многими микроорганизмами (Митрофанов П.М., Хакимова К.М, Гаффаров Х.З., 1978; Пустовар А.Я., 1995; Шкиль Н.Н., 2000).

Среди вирусных инфекций ведущее значение имеют инфекционный бронхит, инфекционный ларинготрахеит, ньюкаслская болезнь. Известно, что взаимодействие с вирусами ньюкаслской болезни или инфекционного бронхита усиливает тяжесть инфекции, вызванной *M. gallisepticum* (Dunlop W.R., Parke G., Strout R.G. and Smith S.C., 1964; Rodriguez R., Kleven S.H., 1980). Такое же взаимодействие наблюдается с *M. synoviae* (Kleven S.H., King D.D., Anderson D.P., 1972; Hopkins S.R., Yoder H.W., 1982, 1984). Кроме того, имеются данные о взаимодействии между микоплазмой и аденовирусом, микоплазмой и реовирусом (Кэлнек Б.У., 2003).

К числу бактериальных инфекций, наслаивающихся на респираторный микоплазмоз, относятся колисептицемия (эшерихиоз), стафилококкоз, гемофилез и другие. При изучении микробного пейзажа организма больных микоплазмозом птиц

Г.А. Грошева (1972) отмечала, что дыхательные пути, паренхиматозные органы, головной и костный мозг в значительной степени инфицированы аэробными бактериями. При этом среди кокковых форм преобладающее значение имеют стафилококки и микрококки, а выделяемые культуры *E. coli* и *C. freundii* обладают вирулентными, токсигенными и гемолитическими свойствами. По данным В.С. Гусева с соавт. (2003), Н.В. Садовникова (2003), Т.А. Мандрусовой (2003), Н.Л. Андреевой (2004) и других исследователей, респираторный микоплазмоз на птицеводческих предприятиях чаще протекает в ассоциации с эшерихиозом (колибактериозом).

H.E. Adler (1958), J.R. Glisson (1988), А.Ф. Новикова (2004) указывают на синергическое действие *Haemophilus paragallinarum* и *M. gallisepticum*. В.Ф. Бессарабов (2001) также указывает на смешанное течение респираторного микоплазмоза с оспой, сальмонеллезом и гемофилезом.

Тройное взаимодействие вакцинного вируса (ньюкаслской болезни и/или инфекционного бронхита), микоплазмы (*M. gallisepticum* или *M. synoviae*) и кишечной палочки вызывает развитие более тяжелого заболевания, чем двойное действие любых из вышеназванных агентов. А контрольное заражение только одним из них вызывает развитие очень слабого заболевания или вообще не вызывает никакого (Nakamura K., Ueda H., Tanimura T., Noguchi K., 1994).

В настоящее время, несмотря на значительные успехи ветеринарной науки, проблема респираторного микоплазмоза в птицеводческих хозяйствах остается чрезвычайно острой. Из данных ретроспективных исследований, проведенных в диагностическом центре ВНИВИП в 1999 г., антитела в сыворотке крови птиц к микоплазмозу обнаружены в 37,2 % случаях (Придыбайло Н.Д., 2000).

В 2002 г. наибольший удельный вес в показателях отхода птицы по причине инфекционных заболеваний в целом по российским птицеводческим предприятиям приходился на эшерихиоз (59 %), болезнь Марека (19 %), микоплазмоз (7 %), на

остальные болезни -15% (Венгеренко Л.А., 2003). В структуре гибели от инфекционных болезней в 2003 г. микоплазмоз составлял 2 %. Однако же фактический ущерб значительно больше из-за сверхплановой выбраковки некондиционных бройлеров и курнесушек, недополучения пригодных для инкубации яиц от условно-неблагополучных стад (Фисинин В., 2004). В результате ретроспективных исследований, проведенных во ВНИИЗЖ за последние 5 лет, установлено, что из 250 птицефабрик России и СНГ в 221-й птица была инфицирована *M. gallisepticum*, что составило 88 % (Гирин М.В., 2004).

В настоящее время известно более двух десятков видов микоплазм, а также *A. laidlawii* и *Ureaplasma sp*., паразитирующих у птиц. Одни из них не патогенны, другие же при определенных условиях способны вызывать развитие патологических процессов в органах респираторного тракта, репродуктивной системы и суставах. Из них наибольшее практическое значение имеют *M. gallisepticum, M. synoviae* и *M. meleagridis*.

Информация об этиологической роли отдельных представителей рода Mycoplasma при естественном и искусственном инфицировании разных видов птиц колоссальна. Особого внимания заслуживают смешанные микоплазма-вирусные бактериальные инфекции, а также данные полипатогенности микоплазм (Серебряков А.С., Грошева Г.А., Шубин В.А., 1970; Алымбаева Д.Б., Миллер Г.Г., Раковская И.В., Быковская А.Ф., 1985; Миллер Г.Г., Раковская И.В., Березин В.Э., 1991; Пустовар А.Я., 1995; Фукс П.П., Калашник Н.В., Герус Г.Б., 1995; Liu C., Bai R.Z., Qu X.J., 1997; Talati A.J., Crouse D.T., English B.K., Newman C., Livingston L., Meals E., 1998). В природе чаще всего встречаются именно многокомпонентные системы, т. е. смешанные инфекции, и имеют место многосторонние взаимодействия макроорганизмов со многими микроорганизмами (Митрофанов П.М., Хакимова К.М, Гаффаров Х.З., 1978; Пустовар А.Я., 1995; Шкиль Н.Н., 2000).

Подобный синергизм встречается и при микоплазмозах птиц. Так, *M. gallinarum* обычно считается непатогенным микро-

организмом. Тем не менее он привел к развитию у бройлеров аэросаккулита при введении совместно с вакцинным вирусом ньюкаслской болезни или инфекционного бронхита (S.H. Kleven, S.C. Eidson и O.J. Fletcher, 1978). Трудности выделения *M. gallisepticum* и дифференциация возбудителей при смешанных респираторных инфекциях длительное время вызывали дискуссию о роли фильтрующихся вирусов и некоторых патогенных бактерий в этиологии и патогенезе респираторного микоплазмоза. Кроме того, при выделении чистой культуры микоплазм далеко не всегда удавалось воспроизвести заболевание в экспериментальных условиях. Данные научной литературы по искусственному заражению птицы весьма разноречивы. Например, Н. Келлер (1954) считает, что хронические заболевания дыхательных органов кур и синусит индеек могут быть вызваны заражением патологическим материалом от больных кур или куриных эмбрионов, и отрицательно высказывается о возможности воспроизведения микоплазмоза культурами микоплазм.

Х. Хартвик (1960) сообщал, что ему далеко не всегда удавалось вызвать заболевание голубей при заражении их культурами микоплазм, но посредством носового секрета от больных хронической респираторной болезнью автор вызывал у подопытных голубей насморк.

Н. Колер и Н. Буртшер (1959) не получили положительных результатов при заражении цыплят бульонными культурами микоплазм и сделали вывод, что одними чистыми культурами этого микроорганизма нельзя вызвать хроническую респираторную болезнь.

A. Brion (1961) высказал предположение, что для воспроизведения хронической респираторной болезни необходимо одновременное действие нескольких этиологических агентов, например: *E. coli*, вируса инфекционного бронхита и микоплазм.

H.E. Adler (1960) отмечает, что хроническая респираторная болезнь, вызываемая в естественных условиях микоплазмой, трудно воспроизводится в лабораторных условиях. Для искус-

ственного воспроизведения выраженного заболевания у кур, указывает автор, требуется наличие предрасполагающих факторов или наличие другой инфекции. В частности, он указывает на получение в эксперименте более тяжелой картины хронической респираторной болезни при комбинированном заражении птиц гемофильной палочкой и микоплазмой, чем при заражении этими же микроорганизмами в отдельности.

Трудность искусственного воспроизводства респираторного микоплазмоза культурой микоплазм H.E. Adler и R. Yamamoto (1957) объясняют сложностью выделения патогенных микоплазм, которые хотя и имеются в тканях больных, но при их изоляции не всегда выращиваются на питательных средах. Обычно на питательных средах растут непатогенные культуры микоплазм, которые не способны вызвать выраженный синдром болезни.

J. Fabricant (1960) также сообщал, что культуры микоплазм, выделенные от птиц, больных хронической респираторной болезнью, часто при заражении индеек не давали положительного результата. Автор предполагает, что в результате пассирования на питательных средах микоплазмы теряют свою патогенность.

Благодаря многочисленным и трудоемким исследованиям, выполненным в различных странах, в настоящее время подтверждена первичная роль *M. gallisepticum* в этиологии заболевания. Грошева Г.А. с соавторами (1970) в своих исследованиях показала, что воспроизвести микоплазмоз культурой микоплазм вполне возможно. Для этого автор рекомендует центрифугированием бульонной культуры довести количество микробных тел до двух миллиардов по бруцеллезному оптическому стандарту мутности и вводить цыплятам или индюшатам интранозально или интратрахеально в дозе 0,1–0,2 мл.

Тем не менее ассоциативное течение микоплазмоза преобладает над моноинфекцией. Неосложненные инфекции, вызванные *Mycoplasma gallisepticum*, обычно приводят у индеек к появлению респираторных симптомов, синусита и аэросаккулита. Однако простая инфекция, вызванная *M. Gallisepticum*, часто

приводит к проявлению у кур умеренного или даже субклинического течения заболевания. А.С. Серебряков, Г.А. Грошева и В.А. Шубин (1970) отмечали, что возбудители некоторых вирусных и бактериальных болезней способствуют активизации и более интенсивному развитию респираторного микоплазмоза. Среди вирусных инфекций ведущее значение имеют инфекционный бронхит, инфекционный ларинготрахеит и ньюкаслская болезнь. К числу бактериальных заболеваний, наслаивающихся на респираторный микоплазмоз, прежде всего, относится колибактериоз (эшерихиоз). При изучении микробного пейзажа организма больных микоплазмозом птиц Г.А. Грошева (1972) отмечала, что дыхательные пути, паренхиматозные органы, головной и костный мозг в значительной степени инфицированы аэробными бактериями. При этом среди кокковых форм преобладающее значение имеют стафилококки и микрококки, а выделяемые культуры *E. coli* и *C. freundii* обладают вирулентными, токсигенными и гемолитическими свойствами. Б.Ф. Бессарабов (1984, 2001) указывает также на смешанное течение респираторного микоплазмоза с оспой, сальмонеллезом и гемофилезом.

Известно, что взаимодействие с вирусами ньюкаслской болезни или инфекционного бронхита усиливает тяжесть инфекции, вызванной *M. gallisepticum* (W.R. Dunlop, G. Parke, R.G. Stroutand, S.C. Smith, 1964; R. Rodriguez, S.H. Kleven, 1980; S.H. Kleven, 2003). Такие же взаимодействия наблюдаются с *M. synoviae* (S.H. Kleven, D.D. King, D.M. Wenger, D.P. Anderson, 1972, 1973; S.R. Hopkins, H.W. Yoder, 1982, 1984).

H.J. Barnes и W.B. Gross (2003) указывают на *M. gallisepticum* как на фактор, повышающий восприимчивость домашней птицы к *E. coli*. Здоровые птицы с неповрежденной иммунной системой устойчивы к естественному инфицированию кишечной палочкой даже при наличии в организме вирулентных штаммов. Нарушение целостности слизистых оболочек микоплазмами в таких случаях является пусковым механизмом для развития инфекционного процесса.

D. Cavanagh и S.A. Naqi отмечают, что совместное действие микоплазм и вируса инфекционного бронхита на фоне температурного стресса приводило к развитию разной тяжести аэросаккулита.

В патогенезе осложненных инфекций важным моментом является также время воздействия инфекционных агентов. Обычно для проявления синергии респираторный вирус и инфекция, вызванная микоплазмой, должны действовать одновременно или в течение короткого промежутка времени (S.R. Hopkins, H.W. Yoder, 1984; S.H. Kleven, D.D. King, D.P. Anderson, 1972). Однако у свободных от микоплазм кур имелась более слабая клиническая реакция на контрольное заражение вирусом инфекционного бронхита, чем у птиц с хроническим заражением *M. gallisepticum* (S.H. Kleven, J.R. Glisson, 2003).

Тройное взаимодействие вакцинного вируса (ньюкаслской болезни и/или инфекционного бронхита), микоплазмы (*M. gallisepticum* или *M. synoviae*) и кишечной палочки вызывает развитие более тяжелого заболевания, чем двойное действие любых из вышеназванных агентов. А контрольное заражение только одним из них вызывает развитие очень слабого заболевания или вообще не вызывает никакого (Nakamura K., Ueda H., Tanimura T., Noguchi K., 1994).

Существуют и другие инфекционные агенты, взаимодействующие с *M. gallisepticum*. Так, Б.Ф. Бессарабов (1984, 2001), H.E. Adler (1960), S.H. Kleven и J.R. Glisson (2003) указывают на синергическое действие *Haemophilus paragallinarum* и *M. gallisepticum*. Исключение последней из инфекционного процесса приводит к развитию более слабого респираторного заболевания, обусловленного инфекционным ринитом. Кроме того, имеются данные о взаимодействии между микоплазмой и аденовирусом, микоплазмой и реовирусом (S.H. Kleven, J.R. Glisson, 2003).

В этиологии респираторного микоплазмоза значительную роль играют вакцинные штаммы вирусов. S.H. Kleven и J.R. Glisson (2003) отмечают иммуносупрессивное действие на орга-

низм птицы вакцинных вирусов инфекционного бурсита и болезни Марека, обуславливающее развитие микоплазмозной инфекции. Г.А. Грошева (1995) также указывает на то, что возникновению болезни способствует иммунизация птицы живыми вакцинами, особенно против респираторных вирусных болезней

Таким образом, приведенные данные показывают, что респираторный микоплазмоз действительно широко распространен во всем мире и занимает далеко не последнее место в ряду инфекционных болезней птиц. Микоплазмоз – типичная хроническая инфекция с присущей ей длительной персистенцией возбудителя в организме хозяина (до 19 месяцев – А.С. Серебряков, В.С. Осколков, 1966), обладающей механизмами, направленными на ускользание от защитных систем (прочное прикрепление к стенке клетки; сходство структуры и биохимического состава мембран с мембранами эукариотических клеток; присутствие в их мембране антигенов, перекрестно реагирующих с антигенами клетки хозяина; наличие структур и субстанций, препятствующих фагоцитозу или подавляющих его). К активному разрушающему воздействию микоплазм относят свойство сохранять жизнеспособность в фагоцитах и оказывать повреждающее действие на макрофаги, что приводит к нарушению их функции и снижению резистентности организма. При этом в процессе репликации они используют из клеток макроорганизма аминокислоты, жирные кислоты-предшественники макромолекул, в том числе и ДНК. Образующиеся продукты обмена (аммоний, кислые продукты, пероксидаза, блокирующие метаболиты) нарушают нормальную функцию клеток макроорганизма. Кроме того, микоплазмы, преодолевая тканевый барьер, проникают в кровяное русло, в результате чего блокируют систему мононуклеарных фагоцитов. Вступают в синергические отношения с вирусной и бактериальной, условно-патогенной микрофлорой, создают условия для её активного роста и развития. Поэтому, принимая во внимание и учитывая патогенез болезни, следует своевременно диагностировать болезнь с помощью современных методов,

выявляя при этом главную этиологическую роль воздействия микроорганизма на макроорганизм хозяина, не упуская из вида сопутствующие инфекционные агенты.

4.2. Лабораторные методы диагностики респираторного микоплазмоза птиц

Для постановки диагноза любой инфекционной болезни используют эпизоотологический, клинический и патологоанатомический методы диагностики. Однако окончательный диагноз, ставится на основании лабораторных методов исследования. Не является исключением и респираторный микоплазмоз птиц. Кроме того, данное заболевание не всегда сопровождается внешними клиническими признаками, может протекать латентно, либо в ассоциации с другими бактериальными или вирусными болезнями. Поэтому правильно поставить диагноз можно только с использованием лабораторных методов.

Микробиологические и иммунологические подходы в диагностическом плане остаются неизменными, к ним относятся метод индикации микоплазм на жидких и плотных питательных средах, а также дальнейшая типизация в серологических, иммунологических и генетических тестах.

4.2.1. Методы индикации и идентификации микоплазм

Многие авторы считают, что ведущим методом в лабораторных исследованиях при респираторном микоплазмозе является выделение культуры *M. gallisepticum* (А.С. Серебряков, Г.А. Грошева, В.А. Шубин, 1970; М.А. Шесточенко, 1983). Однако микоплазмы очень нежные, прихотливые к компонентам питательной среды и концентрации водородных ионов, имеют сходство с L-формами бактерий. Поэтому, несмотря на широкое распространение их в природе, имеется ряд трудностей в методике их выделения и идентификации. Кроме того, в пробах исследуемого материала наряду с патогенными микоплазмами встречают-

ся и апатогенные, характеризующиеся более активным метаболизмом и скоростью роста на искусственных питательных средах. E. Klieneberger-Nobel отмечала, что «у животных, страдающих болезнью, вызванной микроорганизмами группы PPLO, встречается несколько их типов, и только один можно рассматривать как причину заболевания». Эту точку зрения разделяют А.С. Серебряков с соавторами (1970).

В течение ряда лет создавались методические рекомендации по работе с микроорганизмами класса *Mollicutes* у разных видов животных, птиц и человека. Это наставления по диагностике респираторного микоплазмоза птиц (ГУВ МСХ СССР, Москва, 1969); микробиологическая и иммунологическая диагностика микоплазма-пневмонии инфекции (Алма-Ата, 1978); методические рекомендации по выделению, культивированию, поддержанию и идентификации микоплазм, ахолеплазм и уреаплазм (ВАСХНИЛ, Москва, 1982); генитального микоплазмоза крупного рогатого скота (Новосибирск, 1982); выделению и идентификации микоплазм из молока коров (ВАСХНИЛ, Москва, 1985); методические указания по диагностике, профилактике и мерам борьбы с микоплазмозом свиней (ГУВ МСХ СССР, Москва, 1988). В данных рекомендациях авторы указывали на актуальность проблемы и необходимость ознакомления практических ветеринарных и медицинских специалистов с основными методами диагностики, особенностями клинико-морфологической картины и мерами борьбы с этой болезнью. Различия между методами состоят в видовой характеристике животных (крупный рогатый скот, мелкий рогатый скот, свиньи, птица), особенностях исследования у людей и формах проявления болезни (конъюктивальная, суставная, легочная, урогенитальная). В зависимости от этого следуют принципиальные отличия во взятии биоматериала и первичной его обработке с целью выделения микоплазм, а также сопутствующей микрофлоры, являющейся ассоциирующей в течение всего инфекционного процесса.

Для бактериологического исследования на микоплазмоз Y.G. Leece и F.G. Sperling предлагают использовать трахеальный экссудат, так как *M. gallisepticum*, как правило, обнаруживается в трахее птиц, больных респираторным микоплазмозом. Микоплазмы были выделены из трахеи даже тогда, когда они отсутствовали в воздухоносных мешках, легких, синусе и перикарде.

Y.S. Kiser с соавт. обнаруживали *M. gallisepticum* в синовиальной жидкости больных птиц и одновременно в сердце и головном мозге. И.Н. Дорошенко (1966) изолировал микоплазмы из подглазничных синусов кур, уток, индеек, гусят. H.E. Adler сообщает о выделении *M. gallisepticum* из ротовой полости, головного мозга, клоаки; Y. Meszaros, L. Stipcovits – из дыхательных путей; М.Т. Прокофьева с соавторами – из носовой полости, синусов, гортани, трахеи, воздухоносных мешков и легких; Г.А. Грошева, В.А. Осколков – из дыхательных и паренхиматозных органов, головного и костного мозга, яичника, семенников птиц; R. Yamamoto и H.B. Ortmayer – из воздухоносных мешков и синусного экссудата; R. Yamamoto и C. Bigland, кроме того, – из яйцевода и семени.

Y.G. Leecl, F.G. Sperling выделяли PPLO из трахеи, легких и воздухоносных мешков путем суспензирования экссудата в 0,5 мл жидкой среды. Авторы добавляли 100 мг/мл дегидрострептомицина и 10 тыс. ед/мл пенициллина для подавления бактериальной флоры при первичном посеве биоматериала. А.С. Серебряков с соавторами (1970) рекомендуют с этой целью добавлять к суспензии патматериала 0,1 мл раствора 1%-ного уксусного таллия, что соответствует его конечной концентрации 1:2000 – 1:4000 и 5000 ед/мл пенициллина. А для исключения L-форм бактерий проводить 3–5 последовательных пассажа выделенных культур на полужидких средах (0,3 % агар-агара), содержащих сыворотку без ингибиторов.

D.H. Ley и H.W. Yoder (2003) для видовой идентификации культур микоплазм рекомендуют метод прямой иммунофлуоресценции с использованием колоний на поверхности агаровых пла-

стинок или мазков-отпечатков колонии (эпифлюоресценция). Этот метод и его модификации особенно полезны для идентификации *M. gallisepticum* в культурах, содержащих другие виды микоплазм.

С этой же целью используется реакция преципитации в агаровом геле (E.R. Aycardi, D.P. Anderson, R.P. Hanson, 1971; I. Nonomura, H.W. Yoder, 1977). Прямой иммунопероксидазный системный тест оказался эффективным для идентификации культур *M. gallisepticum* и *M. synoviae*, но чаще эта процедура используется в реакции (ELISA) твердофазного иммуноферментного анализа для выявления антител в сыворотке крови D.H. Ley и H.W. Yoder (2003).

Анализ данных отечественной и зарубежной литературы в отношении различных методик индикации и идентификации возбудителя из первичного материала, показывает, что в основном современная диагностика микоплазмоза основывается на бактериологических подходах. Полученные первичные изоляты на специальных питательных средах для роста микоплазм подвергают дальнейшим исследованиям с помощью экспресс-методов: ИФ, ИФА, МАТ или ПАТ, ДНК-зондов, ПЦР. Последний является не только более быстрым, но и наиболее точным, выявляя минимальное количество микоплазменной ДНК.

4.2.2. Питательные среды для культивирования микоплазм

Микоплазмы весьма требовательны к составу питательных сред и условиям культивирования. Они чувствительны к pH питательной среды, поверхностно-активных веществ и требуют значительного количества предшественников макромолекул. Поэтому к компонентам питательных сред предъявляются следующие требования:

1. Питательная среда должна обеспечить микоплазмам источник энергии. Это достигается с помощью экстрактов, полученных при отваре сердечной мышцы, печени, желудка и других органов, а также добавлением в питательную среду глюкозы (для ферментирующих видов), аргинина (для не ферментирующих видов), мочевины (для уреаплазм).

2. Содержание стерола в питательной среде необходимо для всех видов микоплазм и уреаплазм. Это обеспечивается введением в питательную среду сыворотки крови животных, из которых наиболее используемой является сыворотка крови лошадей, свиней, индеек (Г.А. Грошева, Л. Штипкович, 1987).

3. Питательная среда должна включать ингибиторы, задерживающие рост посторонней бактериальной и грибковой микрофлоры, но не влияющей на репликацию микоплазм. Для этой цели чаще используют ацетат таллия, а также пенициллин, действие которого ингибирует развитие грамположительных бактерий (Edward, 1947).

Следует иметь в виду, что при наличии пенициллина в питательной среде появляются L-формы бактерий, которые образуют микоплазмоподобные колонии. Поэтому при первичных посевах культуры на питательные среды без пенициллина надо исключить L-формы. Для задержки роста грамотрицательных бактерий рекомендуется использовать полимиксин Б. В этом случае нецелесообразно использовать ацетат таллия.

Для задержки роста грибов предлагается использовать амфотерицин Б (Г.А. Грошева, Л. Штипкович, 1987).

Первые исследователи, изучавшие респираторный микоплазмоз птиц и инфекционный синусит индеек, широко использовали для выделения микоплазм многие питательные среды, описанные ранее (среда BVF, среда Эдварда и др.). В 1954 г. H. Adler с соавторами предложили для выделения птичьих микоплазм питательную среду, которая состояла из скошенного бакто-PPLO агара (Difco), содержащего 10 % свежей дефибринированной крови лошади и наслоенной жидкой питательной среды, состоящей из бакто-бульона PPLO (Difco), дрожжевого гидролизата (1 %) и лошадиной сыворотки. В дальнейшем эта питательная среда в различных модификациях широко использовалась многими исследователями (А.Я. Фомина, Г.А. Грошева, 1962; M. Baharsefat, 1967; M. Frey et al., 1968; А.С. Серебряков, Г.А. Грошева, В.А. Шубин, 1970; и др.). В 1966 г. В.В. Киприч

предложил для выделения птичьих микоплазм питательную среду на основе перевара Хоттингера с пептоном, глюкозой и инактивированной свиной или лошадиной сывороткой. Несколько позже М.Т. Прокофьева с соавт. (1972) и В.И. Бобрышев (1973) изучили в сравнительном аспекте несколько различных модификаций питательных субстратов (триптические и кислотные гидролизаты кормовых дрожжей, пищевого казеина, мясного и рыбного фарша) и стимулирующих добавок (экстракты и автолизаты хлебных, пищевых и кормовых дрожжей, экстракты, кислотные и щелочные автолизаты мышечной ткани, сердца, печени и легких крупного рогатого скота). На основании этого разработали рецептуру и технологию промышленного приготовления концентрированных и сухих питательных сред для культивирования птичьих микоплазм.

Сыворотка крови является самым важным компонентом, входящим в состав питательных сред, в то же время количественные и качественные характеристики её различны. В 1935 г. Tang с соавт., испытали влияние сывороток различных видов животных на развитие возбудителя перипневмонии крупного рогатого скота и установили, что сыворотки лошадей, овец и кроликов благоприятно влияли на развитие этих микроорганизмов. В то время как сыворотки морских свинок, крупного рогатого скота были малопригодны для этих целей. Аналогичные выводы сделал D. Edward (1950) в отношении сыворотки крупного рогатого скота при изучении 17 штаммов микоплазм различного происхождения. По заключению W. Morton (1951), асцидная жидкость и кроличья сыворотка в 20 %-ной концентрации являются наиболее оптимальными добавками для изоляции микоплазм от человека. Остальные сыворотки, испытанные автором, в концентрации выше 10 % в некоторой степени обладали задерживающим действием. По данным Я.Р. Коваленко с соавторами (1976), свиная и лошадиная сыворотки в 20 %-ной концентрации благоприятно влияют на развитие шести исследованных видов микоплазм. В то время как сыворотка крупного рогатого скота в кон-

центрации 10 % и более оказывала ингибирующее действие на некоторые виды этих микроорганизмов. Оценивая качество сывороточной фракции PPLO (Difco), которая иногда используется вместо сыворотки, H. Baernstein, J. Quilligan (1963), установили, что эта фракция не заменяет цельной сыворотки и часто не обеспечивает удовлетворительного развития некоторых видов микоплазм. В качестве дополнительных факторов роста микоплазм отдельные исследователи рекомендовали:

- E. Klieneberger-Nobel (1962) – вносить в питательные среды 5 %-ную суспензию эритроцитов, а также некоторые аминокислоты, сахара, витаминные и минеральные добавки;
- D. Edward, W Fitzgerald (1951) – включать ДНК тимуса и муцин свиных желудков;
- Г.Р. Гаджиева, Э.М. Ахмедова, И.В. Раковская и Н.А. Гамова (1987) – вносить аргинин, цистин, глюкозу, тиаминобромид, натрий углекислый;
- Э.М. Ахмедова, М.М. Меджидов и С.М.А. Омаров (2000) – предложили витаминный препарат «ЭКД».

Все перечисленные выше компоненты являются основными и определяющими качество питательной среды в отношении её ростовых свойств. Второе главное свойство среды – это её селективность, т. е. избирательность в отношении посторонней микрофлоры, поэтому для подавления бактериальных контаминантов добавляют пенициллин, уксуснокислый таллий, сульфадимезин, полимиксин В, ампициллин и другие антисептики, к которым микоплазмы и ахолеплазмы не чувствительны.

В настоящее время российскими учеными для выделения микоплазмы галлисептикум наиболее часто используется среда Эдварда, однако, по имеющимся данным, существуют импортные стандартные среды. Так, D.H. Ley и H.W. Yoder, Jr. (2003) указывают на потребность *M. gallisepticum* в 10–15 % сыворотки лошади, свиньи или птиц. Для культивирования возбудителя рекомендуют среду, разработанную Frey с соавторами (1968), в модификации, которая включает в себя бакто-PPLO бульон, автоли-

зат дрожжей, декстрозу и никатинамид аденин динуклеотид. После добавления 10–15 % свиной сыворотки среда удобна и очень эффективна для культивирования большинства микоплазм.

Анализируя данные литературы можно заключить, что продолжают появляться новые разработки специальных питательных сред для выделения микоплазм и уреаплазм. Тем не менее не разработаны универсальные стандартные, серийно выпускаемые, с отработанной технологией производства среды, с помощью которых можно было проводить не только индикацию, но и идентификацию микоплазм.

4.2.3. Серологические и иммунологические методы диагностики микоплазмоза

Несмотря на то что было предложено большое количество методов идентификации микоплазм (Turner A., 1935; Edward D., Fitzgerald W., 1951; Klieneberger-Nobel E., 1959; Barber T., Fabricant J., 1962; Chanock R., Hayflick L., Barile M., 1962; Lemcke R., 1965; Тимаков В.Д., Каган Г.Я., 1973), серологические методы остаются основными методами типирования. Поэтому многие исследователи уделяют большое внимание их разработке как наиболее быстрых и специфичных. Кроме того, в племенных птицеводческих хозяйствах для организации мероприятий, направленных на ликвидацию респираторного микоплазмоза и получение здорового потомства, необходимо прижизненное выявление латентной инфекции у взрослой птицы и носительства возбудителя у клинически здоровых кур.

Наибольшее признание среди серологических методов в 70–80 гг. получили реакции агглютинации, связывания комплемента, ингибиции роста, гемагглютинации, задержки гемагглютинации, торможения, наведенной (косвенной) гемагглютинации, ингибиции метаболизма, а также реакция агглютинации с латексом.

В.Д. Тимаков и Г.Я. Каган (1973) указывают, что при проведении разносторонних иммунологических исследований, в

частности, при разработке вопросов, касающихся серологической и антигенной характеристики микоплазм, необходимо использовать несколько серологических методов, данные которых должны дополнять друг друга. Этой же точки зрения придерживаются и Я. Месарош, Г.А. Грошевой, Л. Штипкович (1987). Реакция агглютинации на предметном стекле позволяет выявить иммуноглобулины класса IgM, начиная с 5–7-го дня после заражения и далее на протяжении 30–40 дней. В позитивной РТГА главную роль играют иммуноглобулины класса IgG, которые образуются на 7–10-е сутки и циркулируют в организме более 5 месяцев. Таким образом, одновременное применение РА и РТГА дает возможность установить время заражения стада *M. gallisepticum*.

Для постановки различных серологических реакций необходимо иметь набор активных специфических антисывороток и антигенов. В связи с этим предложено большое количество схем и способов их получения, отличающихся друг от друга способом наращивания биомассы, способом, дозой и кратностью иммунизации кроликов: D. Taylor-Robinson et al. (1963); O. Plescia et al. (1964); R. Lemcke (1964); C. Dinter et al. (1965); Е. Клинебергер-Нобель (1966); E. Stanebringe, L. Hayflick (1967); D. Schimmel (1967); In Jen Pan, M. Ogata (1969); З.П. Федорова с соавт. (1969); J. Al-Aubaidi, J. Fabricant (1971) и др.

Большинство авторов в своих работах не сообщают о результатах сравнительного изучения различных схем иммунизации лабораторных и сельскохозяйственных животных. Такие данные имеются лишь в отдельных работах. Так, Федорова с соавт. (1972) пришли к выводу, что при иммунизации кроликов культурами микоплазм, выделенными от птиц, наиболее активные сыворотки получаются при использовании схем по R. Lemcke и O. Plescia (1964). Микоплазменный антиген с полным адъювантом Фрейнда в первом случае вводят сначала подкожно в боковые части живота, а в последующем – внутривенно, постепенно увеличивая дозу; во втором случае – по 0,5 мл внут-

рикожно в подушечку задней лапки и одновременно 0,5 мл внутримышечно в бедро той же лапки, повторяют трижды, меняя лапки.

Я.Р. Коваленко с соавт. (1971) для получения специфических гипериммунных сывороток использовал различные схемы гипериммунизации кроликов: по Клинебергер-Нобель, D. Shimmel, Th. Hubrig, Петросовой с соавт. и J. Al-Aubadi, J. Fabricant. Наиболее активные сыворотки были получены ими при применении схемы J. Al-Aubadi, J. Fabricant с введением еще одного дополнительного цикла, объясняя это тем, что малые дозы антигена в сравнении с массивными вызывают более быструю и интенсивную пролиферацию клеток памяти, которые при повторной встрече с гомологичным антигеном обусловливают длительный и напряженный иммунный ответ организма. При этом перед введением супердозы необходимо делать определенный интервал (в несколько недель) с целью максимального накопления популяции клеток этого типа. Данной схемой пользовались И.Я. Яблонская (1977); В.А. Поликарпов (1977); В.Н. Афонасьев (1980); П.В. Митрофанов (1982); Н.Н. Шкиль (2000).

Не менее известен также метод внутривенного введения антигена кроликам (D. Shimmel, Th. Hubrig, 1968), достоинство которого состоит в том, что за короткий промежуток времени можно получить противомикоплазмозные сыворотки с высокими диагностическими титрами.

Применению метода флюоресцирующих антител для идентификации семейства *Mycoplasataceae* придается особое значение, так как плевропневмониеподобные организмы характеризуются трудностью изоляции из тканей животных и человека. Метод флюоресцирующих антител при наличии специфического антигена и гомологичной антисыворотки обеспечит обнаружение PPLO в мазках из культур и других биологических субстратов без необходимости выделения возбудителя. Этот метод также перспективен для изучения колоний *M. gallisepticum*. Многими авторами доказана её высокая чувствительность и специ-

фичность в сравнении с классическими методами исследований (О.В. Виноходов, 1965; А.С. Серебряков, Г.А. Грошева, В.А. Шубин, 1970; И.А. Яблонская, 1976; П.М. Митрофанов и др., 1982; М.А. Шесточенко, 1983; J.W. Mors, J.T. Boothby, R. Yamamoto, 1986; И.Л. Куликова, Т.А. Феоктистова, 1989; Ю.В. Вульфович, И.В. Раковская, Н.А. Гамова, С.А. Гончарова, Л.Г. Горина, А.П. Джумигр, С.В. Прозоровский, 1995; Ф.Ш. Гамзаев, А.М. Ли, 1997; Г.А. Дмитриев, Н.С. Гладкова, Б.О. Дрижарова, 1997; Е.В. Белоусова, 1999; Т.А. Гасанова, 2001; D.H. Ley, H.W. Yoder, 2003). Основными условиями эффективности прямого метода являются достаточно высокий уровень антител для известного и определяемого антигена, а также минимальная возможность возникновения перекрестных реакций.

Непрямой метод флюоресценции предназначен для: а) определения неизвестного антигена, исходя из того что первая сыворотка или антитела известны; б) обнаружение специфических антител, если известен антиген. Сущность данного метода в обнаружении комплекса антиген – антитело с помощью видоспецифического реактива (соответствующего виду исследуемой сыворотки или антител – на первом этапе, которые на втором этапе играют роль антигена).

Одним из современным методических подходов к созданию надежных и высокочувствительных диагностикумов является использование различных модификаций метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). М.Ю. Бродский, В.М. Говорун, Э.М. Халилов, А.В. Жданов, Л.З. Файзуллин, Г.Т. Сухих, 1995, E.R. Nascimento, R. Yamamoto, M.I. Khan (1993) с большим успехом применили ПЦР при диагностике респираторного микоплазмоза птиц.

Е.Г. Румпель, В.А. Шаманин (2000) провели оценку диагностической ценности ПЦР-теста «Полимикс» (НПФ «Литех», Москва) и ПЦР-теста Новосибирского института биоорганической химии (НИБХ). Результаты ПЦР-тестов «Полимикс» и НИБХ совпадали в 97,8 %, что позволяет надежно определять

возбудителя этих инфекций. Полученные данные совпадают с результатами исследований других стран.

4.3. Эпизоотология, патогенез и течение ассоциированного респираторного микоплазмоза птиц

Распространение респираторного микоплазмоза связано с бурным развитием бройлерной промышленности, особенно с начала 60-х годов XX столетия. В естественных условиях респираторный микоплазмоз наблюдается у кур, индеек, цесарок, фазанов, павлинов, голубей, куропаток, перепелок (Kleven S.H., 2003).

Экономический ущерб от респираторного микоплазмоза птиц определяют по следующим показателям: по смертности птиц и эмбрионов, снижению яйценоскости, низкой оплодотворенности яиц и выводимости цыплят, задержке роста и развития цыплят, вынужденному убою птиц, а также по расходам на ветеринарно-санитарные мероприятия и покупку медикаментов.

Неосложненная хроническая респираторная болезнь (респираторный микоплазмоз) вызывает небольшую смертность, при осложнении же бактериальными и вирусными инфекциями смертность бывает высокой. Основные потери от респираторного микоплазмоза складываются за счет плохого развития и роста больных цыплят вследствие низкой усвояемости корма, что приводит к передержке бройлеров, неоправданному перерасходу кормов, снижению сортности тушек и к большому проценту выбраковки их из-за плохой упитанности и аэросаккулитов (Грошева Г.А., 1971).

По данным многих исследователей, заболеванию наиболее подвержены 5–6-месячные цыплята и молодые 6–8-месячные куры. У цыплят до 2-месячного возраста микоплазмоз в клинически выраженной форме встречается реже, куры старше года также болеют редко.

По наблюдениям А.С. Серебрякова, А.Г. Грошевой, В.А. Шубина (1970), выраженные характерные для микоплазмоза патоморфологические изменения отмечены у цыплят старше 3 месяцев и у кур 5–8-месячного возраста.

Г.Ф. Коромыслов, Я. Месарош, Л. Штипкович (1987) констатируют, что наиболее восприимчивы цыплята 20–45-дневного возраста, а также молодняк кур в период начала яйцекладки. Птицы культурных пород и линий с консолидированной наследственностью более восприимчивы.

Различную восприимчивость, связанную с возрастом, можно объяснить следующим: в сыворотке крови цыплят, выведенных из яиц кур неблагополучного по микоплазмозу стада, находятся антитела до 15–20 дней жизни цыплят. По-видимому, наличие специфических антител предохраняет зараженных цыплят от заболевания в клинической выраженной форме. После исчезновения пассивного иммунитета цыплята 1,5–2-месячного возраста вновь начинают реагировать на антиген, и к 4–5-месячному возрасту в неблагополучном хозяйстве число реагирующих цыплят может достигать 100 %. Появление клинических признаков в таком случае наблюдают у 2,5–3-месячных цыплят. У взрослых кур, переболевших микоплазмозом, по-видимому, наступает биологическое равновесие, в результате которого клинические признаки отсутствуют, а микоплазмоносительство остается. Петухи более восприимчивы к микоплазмозу, чем куры. Н. Шишков (1968) и M.S. Hofstad (1978) отмечают большую восприимчивость у кур чистых линий и мясных пород.

По мнению Г.Ф. Коромыслова (1987), микоплазмы проникают в яйцо гематогенным способом в период его формирования в яичнике и яйцеводе. А.С. Серебряков и В.С. Осколков (1966) при исследовании яиц и эмбрионов кур из неблагополучных хозяйств выделили *M. gallisepticum* в 2 % случаев. Они изолировали *M. gallsepticum* также из фолликулов яичника кур и из семенников больных микоплазмозом петухов. Наличие характерных для микоплазмоза изменений у эмбрионов и суточных цыплят

указывает на прямую передачу возбудителя через яйцо (Грошева Г.А., Савич Б.М., Малахова Л.С., 1970).

Помимо трансовариальной передачи возбудителя респираторный микоплазмоз может распространяться при совместном содержании больной и здоровой птицы, но в этом случае распространение медленное и носит как бы вползающий характер (Серебряков А.С., Грошева Г.А., Шубин В.А., 1970; Мандрусова Т.А. и др., 2003). Возможны пути передачи инфекции с инвентарем, кормом, через обслуживающий персонал. Возможен путь передачи инфекции с вакцинами, приготовленными на куриных эмбрионах неблагополучных стад птиц.

Изучая длительность микоплазмоносительства у кур, переболевших микоплазмозом, В.С. Осколков (1975) периодически проводил бактериологическое исследование соскобов со слизистой оболочки трахеи живых птиц. В результате этого установил, что куры в течение 19 месяцев после переболевания остаются носителями микоплазм. У кур, имевших контакт с больными, несмотря на то что они оставались клинически здоровыми, культуру *M. gallisepticum* выделяли на протяжении десяти месяцев.

Проявлению клинических признаков способствует снижение общей резистентности организма под воздействием неблагоприятных факторов. К последним относятся недостаточный воздухообмен в помещении, превышение плотности посадки птиц, иммунизация живыми вакцинами против респираторных вирусных инфекций (Коваленко Я.Р., 1960; Stipkovits L., 1975; Грошева Г.А., 1982).

Однако перечисленные факторы являются только предрасполагающими причинами, считают А.С. Серебряков, Г.А. Грошева и В.А. Шубин (1970). Микоплазмоз наблюдается и при удовлетворительном содержании птиц. Если среди взрослых птиц в возрасте старше года болезнь протекает субклинически, а гибель бывает в виде спорадических случаев, то среди молодняка и 6–9-месячных кур наблюдается большой отход от гибели и вынужденного убоя. Оставшаяся птица плохо развивается, при вы-

ращивании цыплят затрачивают больше корма на единицу привеса, а ремонтный молодняк оказывается неполноценным, непригодным для воспроизводства вследствие зараженности *M. gallisepticum*.

При исследовании неблагополучных по респираторному микоплазмозу хозяйств Н. Шишков, А. Резашка (1968), А.Я. Фомина (1969), Г.А. Грошева (1972), Т.А. Мандрусова (2002) установили, что заболевание проявляется в виде катарального воспаления верхних дыхательных путей. Когда на пораженную слизистую оболочку дыхательных путей попадает вторичная микрофлора (*E. coli*), возникает септический процесс с поражением перикарда, капсулы печени и воздухоносных мешков, что приводит к летальному исходу.

В случаях смешанной инфекции микоплазмоза и колисептицемии болезнь имела более острое течение и сопровождалась высокой летальностью (50%); наибольшая восприимчивость отмечалась у цыплят 1–3-месячного возраста. Распространение заболевания варьировало от 10–30 %, у взрослой птицы имело спорадический характер. В одном из хозяйств, неблагополучных по микоплазмозу, колисептицемия поражала до 70 % поголовья (Грошева Г.А., Савич Б.М., Малахова Л.С., 1970).

Часто микоплазмоз регистрируется в виде смешанной или ассоциированной инфекции с вирусными болезнями – инфекционным ларинготрахеитом, бронхитом, оспой, псевдочумой. В этом случае болезнь протекает более тяжело. Вирусы способствуют проявлению микоплазмоза, а также осложняют его течение. М. Т. Прокофьева (1974) отмечает, что из 27 обследованных неблагополучных по респираторным болезням хозяйств, только в трех из них наблюдался микоплазмоз в виде самостоятельной болезни. В остальных хозяйствах заболевание имело смешанный характер – микоплазмоз с ларинготрахеитом, оспой, колибактериозом. При заражении двойной инфекцией отмечали более резко выраженные изменения в виде поражения легких и воздухоносных мешков. А.С. Серебряков с соавт. (1966) также отмечает,

что микоплазмоз часто протекает в ассоциации с колибактериозом. При заражении цыплят микоплазмами и кишечной палочкой одновременно наблюдали более острое и интенсивное развитие процесса. В.А. Шубин с соавт. (1966) считают, что колисептицемия цыплят в естественных условиях является, главным образом, вторичной инфекцией, развивающейся на фоне болезней, вызываемых вирусами и *M. gallisepticum*.

В.С. Осколков (1975) с соавт. при изучении роли *E. coli* в этиологии респираторных болезней птиц в 11 обследованных птицехозяйствах, неблагополучных по респираторным болезням, выделил от больных птиц *M. gallisepticum*, патогенные серотипы кишечной палочки и вирус инфекционного бронхита птиц. При патоморфологическом исследовании материала от таких птиц был выявлен весь комплекс изменений, характерных для респираторного микоплазмоза.

М.Ф. Мезенцев (1969) отмечает, что гемофилез в ассоциации с респираторным микоплазмозом протекал хронически и длился несколько месяцев.

Т.А. Мандрусова, А.И. Молев (2003) констатируют, что возбудитель микоплазмоза снижает защитные функции организма, способствует возникновению вторичной бактериальной инфекции или обострению заболеваний при бессимптомном течении.

В свете изучения смешанных респираторных болезней особенно важным является вопрос о провоцирующем влиянии живых вирус-вакцин при иммунизации птиц неблагополучного по микоплазмозу стада. При этом отмечается широкое распространение инфекции. Отмечается также и более тяжелое течение, особенно при иммунизации живыми вирус-вакцинами против оспы, псевдочумы и ларинготрахеита, которые провоцируют латентную форму течения микоплазмоза в клинически выраженную (Мезенцев М.Ф., 2004).

А.С. Серебряков, Г.А. Грошева и В.А. Шубин (1970) установили, что микоплазмоз тормозит образование поствакциналь-

ного иммунитета против псевдочумы и ларинготрахеита. Латентная форма микоплазмоза в экспериментальных условиях оказывает подавляющее действие на формирование активного искусственного иммунитета.

4.3.1. Патолого-анатомическая картина при ассоциированном течении микоплазмоза с колибактериозом (эшерихиозом)

Патолого-анатомические изменения при естественном и экспериментальном респираторном микоплазмозе описаны многими исследователями (Серебряков А.С., Грошева Г.А., Шубин В.А., 1970; Коромыслов Г.Ф., Месарош Я., Штипкович Л., 1987; Виноходов В.В., Виноходов О.В., Лысенко С.Н., 2003; Мандрусова Т.А., Молев А.И. и др., 2002).

Большинство исследователей (Фомина А.Я. и др, 1968; Мезенцев М.Ф., 1969; Серебряков А.С., Грошева Г.А.. Шубин В.А., 1970; Ибрагимов А.А., Осколков В.С., Голод Я.Р., Трубицын Б.И., 1982; Мандрусова Т.А., Молев А.И., 2003) отмечают, что у трупов, павших от респираторного микоплазмоза, наблюдается истощение различной степени, а у цыплят – недоразвитие и отставание в росте. Кожа плюсны ног и клюва – серо-белой окраски.

Основные изменения при респираторном микоплазмозе в органах дыхания: носовой полости, инфраорбитальных синусах, гортани, трахее, легких и воздухоносных мешках - в виде острого катарального или фибринозного воспаления (Фомина А.Я. и др., 1968; Серебряков А.С., Грошева Г.А., Шубин В.А., 1970; Ибрагимов А.А., 1980; Виноходов О.В. и др., 1983). У некоторых птиц около ноздрей корочки засохшего экссудата серо-коричневого цвета, гиперемия и отек конъюнктивы с серозным истечением, редко – опухание инфраорбитальных синусов. При сдавливании области носа из ноздрей и небной щели выделяется серозный, катаральный, реже фибринозный экссудат.

В.В. Виноходов, О.В. Виноходов, С.Н. Лысенко (2003) также отмечают у трупов павших птиц наличие катарально-фибринозного воспаления слизистой оболочки носа и подглазничных синусов.

Скелетная мускулатура, особенно у цыплят, недостаточно развита. В грудобрюшной полости иногда накапливается большое количество жидкости светло-желтого цвета (Исматова Р.А., 1990). При бактериальном осложнении, особенно *E. coli*, серозные покровы гиперемированы, покрыты фибринозным экссудатом, в грудобрюшной полости различное количество экссудата, содержащего сгустки фибрина и комочки казеозных масс сероватого или желтоватого цвета (Серебряков А.С., Грошева Г.А., Шубин В.А., 1970).

С.Н. Борхениус (1989), В.В. Виноходов, О.В. Виноходов, С.Н. Лысенко (2003) констатируют, что при вскрытии павшей птицы от респираторного микоплазмоза сильно изменяются воздухоносные мешки. Они помутневшие, стенки их утолщены, содержат фибринозный экссудат, который при прогрессировании процесса становится казеозным. Этот процесс часто сопровождается перигепатитом и перикардитом. У птиц фибринозный аэросаккулит, перикардит, перигепатит являются вторичным бактериальным осложнением микоплазмоза, главным образом, колибактериозом. Сам по себе микоплазмоз как результат внутриклеточных поражений сопровождается острым катаральным воспалением.

А.Я. Фомина, Г.А. Грошева, А.С. Серебряков, В.А. Шубин, В.С. Осколков (1968) отмечают, что при одновременном заражении культурами *E. coli* и *M. gallisepticum* у птиц развиваются более интенсивные поражения, чем заражение одной из этих культур. Патолого-антомические изменения характеризовались острым фибринозным перикардитом, перигепатитом и аэросаккулитом.

Т.А. Мандрусова, А.И. Молев и др. (2003) подтверждают у павшей птицы развитие серозно-фибринозного перикардита, перигепатита, желточного перитонита и энтероколита.

В.М. Апатенко, В.М. Левощенко, В.Я. Пономаренко (1982) отмечают, что при ассоциированном течении колисептицемии и микоплазмоза развиваются значительные нарушения в респираторном тракте. Т.А. Мандрусова, А.И. Молев и др. (2003) обна-

ружили красноватые уплотненные очаги с синюшным оттенком на легком. На разрезе ткань выглядит однородной плотноватой массой сероватого цвета с желтоватым оттенком. При сильном поражении воздухоносных мешков развиваются диффузные наложения фибрина на плевре, которые полностью отделяли легкое от межреберной стенки. Изменения в легких, когда болезнь протекает без осложнения другими инфекциями, бывают незначительными, за исключением частого переполнения этого органа кровью.

По наблюдениям А.С. Серебрякова, Г.А. Грошевой, В.А. Шубина (1970), изменения в сердце чаще ограничиваются повышенным кровенаполнением коронарных сосудов и незначительным увеличением жидкости в перикардиальной полости, в отдельных случаях помутнением и утолщением перикарда. При более тяжелом течении болезни – слипчивый пери- и эпикардит, при этом сердечная сумка сильно растянута, заполнена фибринозно-казеозными массами, местами сращена с эпикардом. При хроническом течении респираторного микоплазмоза установили фибринозное воспаление плевры и брюшины. В этих случаях наблюдали слипчивое воспаление между перикардом, реже печенью и мышечным желудком, с прилегающим к этим органам воздухоносными мешками.

У некоторых павших птиц развивается острое фибринозное воспаление капсулы печени с обильным отложением фибрина на поверхности её в виде студневидных масс, легко отделяющееся от капсулы. Сама печень увеличена в объеме, дряблой консистенции, сероватой или желтовато-коричневой окраски. Нередко изменения в печени при респираторном микоплазмозе ограничивались застойной гиперемией и дистрофическими процессами (Шубин В.А., Осколков В.С., 1966; Апатенко В.М., Левощенко В.М., Пономаренко В.Я., 1982; Мандрусова Т.А., Молев А.И. и др., 2003).

В почках наблюдали застойное полнокровие паренхимы, и, как результат, их увеличение. А.С. Серебряков, Г.А. Грошева,

В.А. Шубин (1970) отмечают, что дистрофические изменения в этом органе встречаются чаще, чем в печени. Селезенка нередко гиперплазирована, на разрезе темно-вишневого цвета с сероватыми участками. Головной мозг без изменений, иногда кровенаполнен и отёчен.

4.3.2. Патолого-гистологические изменения при ассоциированном течении микоплазмоза с колибактериозом

При естественном инфицировании микоплазмы проникают через слизистые оболочки дыхательных путей, размножаются в клетках, главным образом, слизистых желез и респираторного эпителия. Уже через 7 дней после заражения возникает лимфофолликулярная реакция в трахее, легких и воздухоносных мешках. В.В. Виноходов, О.В. Виноходов, С.Н. Лысенко (2003) выявили пролиферацию мононуклеарных клеток, дистрофию и десквамацию респираторного эпителия. Через 13–30 дней после заражения происходит усиление экссудации и пролиферации лимфоидных, плазматических клеток слизистой оболочки верхних дыхательных путей. В легких сильнее выражена пролиферация лимфоидных, плазматических и эпителиальных клеток, острая застойная гиперемия, набухание сосудистой стенки и деапедез. А в бронхах клеточная пролиферация слизистой оболочки. В воздухоносных мешках развивается воспаление, сопровождающееся инфильтрацией лимфоидными, гистиоцитарными и плазматическими клетками, гнойно-фибринозное воспаление, сильное утолщение и помутнение стенки. В печени и почках – обширные лимфоидные скопления. В кишечнике лимфоидная ткань рассеяна по слизистой оболочке, особенно в зоне отхождения слепых кишок.

По данным А.С. Серебрякова, Г.А. Грошевой, В.А. Шубина (1970), В.В. Герман (1971), в начальной стадии болезни в верхних дыхательных путях развивается серозное и катаральное воспаление. Среди клеток экссудата встречаются лимфоидные и гистиоцитарные. Плазматических клеток немного. Псевдоэозинофильные лейкоциты в собственно слизистой оболочке встреча-

лись в небольшом количестве, преимущественно в субэпителиальном слое среди клеток эпителия. Вокруг кровеносных сосудов располагаются лимфоидные клетки. Клетки респираторного эпителия не изменены, участками лишены ресничек. Слизистые железы в состоянии повышенной секреции слизи.

При дальнейшем развитии болезни клеточно-пролиферативные процессы более выражены. Слизистая оболочка сильно утолщена в результате пролиферации мононуклеарных клеточных элементов, среди которых преобладают лимфоидные, в других – плазматические клетки, иногда гистиоциты, моноциты и псевдоэозинофильные лейкоциты. В этот период отмечается гиперплазия лимфатических фолликулов, дистрофические изменения в клетках респираторного эпителия (водяночная и слизистая дистрофия), а также десквамация клеток респираторного эпителия (Шубин В.А., 1970). Дистрофические изменения развиваются и в клетках секреторного эпителия. Просветы слизистых желез расширены и заполнены слизью с десквамированными клетками секреторного эпителия, псевдоэозинофильными лейкоцитами и лимфоцитами. При хроническом течении пролиферация эпителиальных клеток диффузная. В результате пролиферации клеток эпителия формируется многослойный пласт, состоящий из малодифференцированных клеток. Вследствие неравномерного утолщения слизистой оболочки образуются папилломатозные выросты, наблюдаемые чаще в гортани и в верхней трети трахеи. Этими выростами и обусловлена зернистость слизистой оболочки в верхних дыхательных путях у птиц при хроническом течении болезни (Фомина А.Я., Грошева Г.А., Серебряков А.С. , Шубин В.А., Осколков В.С., 1968; Мандрусова Т.А., Молев А.И. и др., 2003).

Изменения в легких при респираторном микоплазмозе характеризуются катаральным или крупозным воспалением, часто сопровождающимся образованием очаговых некрозов или гигантоклеточных гранулем. В начале развития заболевания происходит переполнение кровенаполненных сосудов, серозный отек,

слабая клеточная инфильтрация периваскулярной, перибронхиальной и интерстициальной соединительной ткани и выпот экссудата в просвет парабронхов и вестибул. В дальнейшем происходит накопление лимфоидных, гистиоцитарных и плазматических клеток. Просветы парабронхов, вестибул и респираторных капилляров заполнены катаральным экссудатом, содержащим большое количество десквамированных клеток респираторного эпителия и лейкоциты (Серебряков А.С., Грошева Г.А.. Шубин В.А., 1970).

В случаях, протекающих по типу крупозного воспаления, отмечались различные стадии его развития. В одних участках регистрировали начальную стадию развития процесса, в других просветы парабронхов и респираторных капилляров заполнены псевдоэозинофильными лейкоцитами и лимфоцитами, которые, распадаясь вместе с фибрином, составляли основу некротических масс (Шубин В.А., 1970). В поздних стадиях развития болезни некротические очаги окружены ободком из атипичных гигантских клеток. В некоторых из них образуется соединительнотканная капсула и секвестры.

По данным А.С. Серебрякова, Г.А. Грошевой, В.А. Шубина (1970), изменения в стенке воздухоносных мешков протекают по типу серозного или серозно-фибринозного воспаления. Начальные изменения в воздухоносных мешках характеризуются сильным кровенаполнением сосудов, серозным отеком соединительной ткани и слабой гистиоцитарной лимфоидно-клеточной реакцией. В толще стенки находили очаговые скопления лимфоидных клеток, локализующихся по ходу кровеносных сосудов. В дальнейшем эти процессы резко усиливаются. Стенка утолщалась за счет отека и пролиферации лимфоидных, гистиоцитарных, плазматических клеток. Полость воздухоносных мешков заполнена серозным экссудатом, содержащим разное количество клеточных элементов. При фибринозном воспалении отмечали скопление фибрина в полость воздухоносных мешков. Фибринозный экссудат содержит псевдоэозинофильные лейкоциты,

клетки десквамированного респираторного эпителия, лимфоциты (Шубин В.А., 1970; Мандрусова Т.А., Молев А.И. и др., 2003).

Изменения в плевре, брюшине, на пери- и эпикарде были такими же, что и в воздухоносных мешках. Фибринозное воспаление в пери- и эпикарде нередко наблюдали по дифтеритическому типу, на брюшине и плевре – чаще по типу крупозного. В поздних стадиях происходит организация фибрина с частичным сращением перикарда с эпикардом. При хроническом течении респираторного микоплазмоза в миокарде отмечали пролиферацию лимфоидных и гистиоцитарных клеток по межмышечным прослойкам, неравномерное набухание, зернистый распад и миолиз мышечных волокон.

В эпикарде как признак истощения наблюдали серозный отек и слизистое перерождение жира по ходу коронарных сосудов. При фибринозном пери- и эпикардите часто развивался некроз структур эпикарда, иногда с вовлечением миокарда (Серебряков А.С., Грошева Г.А.. Шубин В.А., 1970).

На поверхности капсулы печени развивается фибринозное воспаление, повышенное кровенаполнение сосудов, особенно межбалочных капилляров и центральных вен, зернистую дистрофию печеночных клеток, набухание и пролиферацию клеток Купфера, очаговые скопления лимфоидных клеток в паренхиме печени и транссудата в пространстве Диссе (Шубин В.А., Осколков В.С., 1966; Серебряков А.С., Грошева Г.А. Шубин В.А., 1970; Мандрусова Т.А., Молев А.И. и др., 2003).

В селезенке птиц, больных респираторным микоплазмозом, установлены гиперпластические процессы, характеризующиеся пролиферацией клеток лимфоидного типа в мальпигиевых тельцах, в лимфоидных влагалищах и пульпе (Шубин В.А., Осколков В.С., 1966; Серебряков А.С., Грошева Г.А.. Шубин В.А., 1970; Мандрусова Т.А., Молев А.И. и др., 2003). Гиперпластическое увеличение селезенки происходит за счет очаговой пролиферации клеток ретикулома и фолликулообразной пролиферации лимфоцитов. В.М. Апатенко, В.М. Левощенко, В.Я. Пономарен-

ко (1982) при ассоциированном микоплазмозе с колисептицемией и оспой указывают на некоторое увеличение белой пульпы. В лимфатических фолликулах хорошо выражены реактивные центры, скопление большого количества больших и средних лимфоцитов и плазматических клеток. В почках может развиваться острая застойная гиперемия, иногда зернистая дистрофия и некробиоз эпителия канальцев, и небольшие скопления лимфоидных клеток. Желудочно-кишечный тракт при респираторном микоплазмозе чаще не изменен. Редко наблюдается острое катаральное воспаление двенадцатиперстной кишки, протекающее с пролиферацией лимфоидных и плазматических клеток, псевдоэозинофильной инфильтрацией, гиперплазией лимфатических фолликулов и десквамацией железистого эпителия. Также выявили изменения в иммунокомпетентной системе птиц: в тимусе – уменьшение коркового слоя и обеднение его лимфоцитами, в мозговом веществе – его увеличение и появление новых телец Гассаля. В бурсе развивается лимфоидно-клеточная инфильтрация соединительной основы, значительное утолщение межфолликулярных перегородок. В фолликулах – уменьшение количества лимфоцитов мозгового слоя, некоторые лимфоциты – с признаками выраженной дистрофии и некроза. Акцидентальная инволюция тимуса, обеднение бурсы лимфоцитами соответствует стрессовой реакции с выраженным угнетением лимфоцитопоэза. Во вторичных лимфоидных органах признаки угнетения лимфоцитопоэза отсутствуют. Причиной уменьшения числа лимфоцитов в центральных лимфоидных органах является их сильный выброс для поддержания постоянства защиты от воздействия ассоциированной инфекции.

4.4. Меры борьбы и профилактики респираторного микоплазмоза птиц. Общие меры борьбы и профилактики

За рубежом проблеме респираторного микоплазмоза птиц (РМП) уделяют пристальное внимание. В США, странах ЕС и в Великобритании на государственном уровне осуществляются специальные программы по контролю РМП. Они предусматривают жесткий карантин на импорт, экспорт, передвижение инфицированной птицы и продуктов. Благодаря тепловой и глубинной обработке инкубационных яиц и убою серопозитивных стад были созданы благополучные родительские и промышленные стада.

Существующая в Российской Федерации стратегия борьбы с респираторным микоплазмозом основана на профилактических мероприятиях, направленных на выявление инфицированных стад, установление в них карантина, недопущение заноса инфекции в благополучные хозяйства. В неблагополучном хозяйстве обычно проводят медикаментозную терапию.

Основным методом профилактики РМП остается охрана хозяйств от заноса инфекции извне. Так, С.А. Серебряков, Г.А. Грошева и В.А. Шубин (1970) считают, что в числе мероприятий оборонительного плана главное внимание необходимо уделять контролю за реализуемой и поступающей племенной продукцией – живой птицей и инкубационными яйцами. Завозить племенной материал необходимо из благополучных по РМП хозяйств. Завезенную извне птицу надо содержать изолированно с соблюдением установленных инструкцией сроков карантинирования (в течение 30 дней). Инкубацию поступающих из других хозяйств яиц проводить отдельно, а выведенных цыплят выращивать изолированно от маточного стада до 6–8-месячного возраста.

Вторая задача состоит в строгом выполнении ветеринарно-санитарных правил, зоогигиенических и технологических норм. Прежде всего, это: обеспечение оптимального микроклимата в помещениях, где содержится птица (температура, влажность,

воздухообмен); соблюдение технологических параметров (плотность посадки, фронт кормления и поения); обеспечение её полноценным кормлением; изолированное выращивание разновозрастной птицы; соблюдение технологических перерывов после каждой выращиваемой партии, достаточных для проведения мероприятий по дезинфекции и подготовки помещений к новым партиям (Fahey J., Crawley J., 1957; Cottereau Ph., 1969; Коваленко Я.Р., 1976; Конопаткин А.А., 1984; Серебряков А.С., 1970; Белкин В.А. с соавт., 2004).

4.4.1. Вакцинопрофилактика

Ряд исследователей для профилактики РМП предлагает использовать живые и инактивированные вакцины. Работы по изготовлению и применению вакцин ведутся давно. Они не утратили своей актуальности и на сегодняшний день.

H.E. Adler, D. McMartin (1960) для иммунизации молодняка использовали живые и инактивированные культуры патогенных и непатогенных штаммов микоплазм. При этом живые вакцины оказались иммуногенными, продолжительность поствакцинального иммунитета у цыплят составляет около двух месяцев. Авторы пришли к выводу, что более напряженным является иммунитет, образующийся после заражения птиц через воздух, и предлагают иммунизировать птицу путем аппликации культуры на слизистую оболочку носовых ходов. К таким же выводам в своих опытах пришли H.E. Adler, DaSilva (1970).

J. Fabricant, P. Levin (1962) в течение нескольких лет разрабатывали методы специфической профилактики респираторного микоплазмоза. Основная задача их исследований заключалась в изыскании способа предупреждения передачи инфекции через яйцо путем двукратной иммунизации птицы в 5-недельном возрасте и в период начала яйцекладки. Максимальная эффективность иммунизации отмечена при введении вакцины в воздухоносные мешки, минимальная – при внутримышечной инъекции. Установлено, что с наступлением яйцекладки *M. gallisepticum* не обнаруживается в яйце. Кроме того, у вакцинированных птиц не

наблюдалось снижения яйценоскости в противоположность контрольным. Культуры *M. gallisepticum* умеренной вирулентности оказывались менее иммуногенными, а слабой вирулентности – неэффективными. Сравнительные исследования по подбору культур *M. gallisepticum*, пригодных для изготовления вакцины, говорят о необходимости использовать для этой цели вирулентные штаммы.

Имеются сообщения зарубежных исследователей об использовании живой вакцины штамма Коннектикут F в производственных условиях (Branton S.L., Deaton J.W., 1985; Glisson J.R., Kleven S.H., 1984; Branton S.L., 1988). Авторы отмечали повышение продуктивности у вакцинированных кур-несушек, по сравнению с невакцинированной птицей. Также снижалась передача возбудителя через яйцо, в связи с чем, уменьшалось количество случаев воспаления воздухоносных мешков у бройлеров, вызываемых M. gallisepticum.

Как сообщает B.L. Grumbles (1965), вакцинация птицы как средство борьбы с респираторным микоплазмозом имеет и преимущества и недостатки. Преимущества заключаются в следующем: вакцинированные птицы приобретают устойчивость к последующему заражению, включая период яйцекладки; передача инфекции через яйца снижается, поэтому во время короткого периода жизни бройлера *M. gallisepticum* реже вызывает воспаление воздухоносных мешков. Недостатки: вакцина, как и культура, которую используют для её приготовления, очень лабильна и должна использоваться сразу же после изготовления. Вакцинный штамм весьма изменчив, трудно поддерживается на определенной стадии патогенности, обладает остаточными вирулентными свойствами. Трансовариальная передача возбудителя сокращается, но не устраняется полностью, а куры после вакцинации остаются микоплазмоносителями (потенциальный источник инфекции).

М.Т. Прокофьева с соавт. (1972) провели исследования по разработке инактивированных вакцин для активной иммунизации птицы против респираторного микоплазмоза. При испыта-

нии образцов вакцин, приготовленных по разным методикам, было установлено, что все вакцины обеспечивают иммунологический ответ при исследовании привитой птицы через 30 дней. А также создают устойчивость вакцинированного молодняка птицы в течение 2–3 месяцев к заражению патогенными штаммами микоплазм. Вакцинированные убитой эмульсинвакциной куры с 16-го дня могут передавать цыплятам через яйца пассивный иммунитет, который сохраняется у них до 15–30 дней. Наилучшие результаты при испытании микоплазмозной вакцины были получены с вариантом вакцины, содержащей микоплазмы в 1 мл 20 млрд. За 5 месяцев опыта у вакцинированной птицы было выявлено микоплазмоносительство, которое также имело место и у птицы контрольной группы. Однако острая вспышка ларинготрахеита не спровоцировала развитие микоплазмоза у кур, привитых данной вакциной. В то же время в контрольной группе были обнаружены патологические изменения, характерные для респираторного микоплазмоза и ларинготрахеита.

По данным зарубежных исследователей, применение инактивированной вакцины позволило защитить бройлеров и кур-несушек от аэросаккулитов, вызванных патогенными штаммами *M. gallisepticum*, и предотвратило снижение продуктивности птицы (Yoder H.W., Hopkins S.R., Mitchell B.W., 1984; Yoder H.W., Hopkins S.R., 1985). В то же время другие исследователи не обнаружили особой эффективности данных мероприятий при развитии энзоотической микоплазмозной инфекции (Khan M.I. и др., 1986). Вакцинация инактивированными вакцинами вызывает снижение, но не устранение возбудителя в организме птиц, и они остаются микоплазмоносителями (Yoder H.W., Hopkins S.R., Mitchell B.W., 1984; Yoder H.W., Hopkins S.R., 1985; Yagihashi T.T., 1992).

В России работы по производству и испытанию инактивированных вакцин ведутся во Всероссийском научно-исследовательском институте защиты животных (г. Владимир) и Всероссийском научно-исследовательском ветеринарном институте птицеводства (г. Санкт-Петербург).

По данным В.М. Гирина (2004), при испытании инактивированной эмульсионной вакцины против РМП (созданной во ВНИИЗЖ) на ремонтном молодняке на двух птицефабриках были получены положительные результаты. Установлено, что яичная продуктивность вакцинированных птиц по сравнению с контролем была больше на 6,5 %, при этом инкубационного яйца было получено на 2,2 % больше. Следует отметить, что сохранность и среднесуточный привес цыплят-бройлеров, полученных от вакцинированных родителей, по сравнению с потомством от непривитых, были больше на 2,8 и 2 %, соответственно.

Г.В. Зоткин с соавт. (2004) сообщают, что при изучении в сравнительном аспекте лечебно-профилактической эффективности двух вакцин – инактивированной эмульсионной (предложена ВНИИЗЖ) и живой FVax-Mg (импортная) по всем показателям живая вакцина была более эффективна.

Необходимо отметить, что напряженность иммунитета при микоплазмозе не всегда является стабильной и находится под влиянием различных факторов. Отрицательное влияние на формирование и напряженность иммунитета оказывают внешние и внутренние факторы, ослабляющие общую резистентность организма. Колисептицемия, псевдочума, инфекционный бронхит часто осложняют течение респираторного микоплазмоза и приводят к прорыву иммунитета (Серебряков А.С., 1970).

4.4.2. Неспецифические средства и методы борьбы и профилактики. Чувствительность микоплазм к химиотерапевтическим препаратам

Широкое распространение микоплазм в природе, отсутствие эффективных средств лечения при многих болезнях сельскохозяйственных животных, птиц и человека, вызываемых микоплазмами, постоянно вынуждали исследователей изучать чувствительность этих микроорганизмов к различным антибиотикам и изыскивать новые, наиболее эффективные. Этому вопросу посвящены работы многих исследователей. Наиболее полно чув-

ствительность микоплазм к различным антибиотикам освещена в работах P. Leberman и др. (1950, 1952); J. Ward и др. (1958); J. Lampen и др. (1963); A. Newnham, H. Chu(1965); H. Kato и др. (1972); В.И. Ежовой с соавт. (1972); Я.Р. Коваленко, М.А. Сидорова, И.А. Яблонской (1971); Я.Р. Коваленко, Э.А. Шигедевич, И.А. Яблонской (1973) и многих других.

Анализ многочисленных данных свидетельствует о том, что чувствительность микоплазм к антибиотикам, за редким исключением, не имеет резко выраженных видовых различий и зависит от механизма действия определенных групп антибиотиков.

Микоплазмы обладают высокой резистентностью к антибиотикам, механизм действия которых характеризуется ингибицией синтеза клеточной оболочки, которая отсутствует у микоплазм. К этой группе препаратов в первую очередь относятся пенициллины (Ward J. и др., 1958; Leberman P. и др., 1950).

Подобно пенициллину, циклосерин, бацитрацин и некоторые другие полипептидные антибиотики не ингибируют развитие микоплазм в обычных применяемых бактериостатических дозах. Механизм их действия тоже связан с нарушением синтеза клеточной оболочки.

Исследованиями J. Lampen и др. (1963), установлено, что полиеновые антибиотики, механизм действия которых характеризуется нарушением синтеза цитоплазмотической мембраны и нарушением проницаемости клеток, ингибируют развитие микоплазм в различной концентрации. Изучая чувствительность *M. gallisepticum* к различным антибиотикам этой группы, авторы установили, что микоплазмы ингибируются филипином в концентрации 0,5 мкг/мл, амфотерицином В в концентрации 3 мкг/мл и фунгихромином в концентрации 10 мкг/мл. Нистатин и кандидин оказывали ингибирующее действие на микоплазмы в очень высоких концентрациях (100 и 50 мкг/мл соответственно). Эти данные позволили предположить, что ингибирующее действие полиеновых антибиотиков на микоплазмы зависит от размеров этих препаратов. Так называемые «малые» полиены: фи-

липин, амфотерицин В и фунгихромин, имеющие меньший размер молекул (34, 37 атомов углерода), лучше проникают в мембрану микоплазм и ингибируют развитие этих микроорганизмов в низкой концентрации (от 0,5 до 10,0 мкг/мл), чем «большие» полиеновые антибиотики (нистатин, кандидин и др.), которые имеют в своей молекуле от 46 до 63 углеродных атомов и оказывают ингибирующее действие на микоплазмы в очень больших концентрациях (50 мкг/мл и более).

Тироцидины, действующие как полиеновые антибиотики на цитоплазмотические мембраны клеток, тоже ингибируют развитие микоплазм (Smith P., 1971). Исключением являются полимиксины, которые не ингибируют развитие микоплазм в обычных бактериостатических концентрациях. По данным H. Kato и др. (1972) и многих других исследователей, микоплазмы различных видов ингибируются полимиксинами только в очень высоких концентрациях (100 мкг/мл и более).

Микоплазмы обладают высокой чувствительностью к различным группам антибиотиков, механизм действия которых связан с нарушением обменных процессов и подавлением синтеза внутриклеточного белка. К таким антибиотикам в первую очередь относятся: тилозин, спиромицин и некоторые другие макролиды, хлорамфеникол, антибиотики тетрациклинового ряда (тетрациклин, хлортетрациклин, окситетрациклин), аминогликозиды (канамицин, линкомицин, неомицин и некоторые другие).

Как показали A. Newnham, H. Chu (1965); H. Kato и др. (1972); Я.Р. Коваленко, М.А. Сидоров, И.А. Яблонская (1971); В.И. Ежова с соавт. (1972); Я.Р. Коваленко, Э.А. Шигедевич, И.А. Яблонская (1973), наиболее выраженным ингибирующим действием на микоплазмы обладает тилозин. Минимальная ингибирующая концентрация его для подавляющего большинства известных видов микоплазм составляет 0,004–1 мкг/мл. Хлорамфеникол, тетрациклин, линкомицин, спиромицин угнетают развитие микоплазм в несколько больших концентрациях (0,1–10 мкг/мл). В.И. Ежова с соавт. (1972) установили, что значительное

количество культур *M. gallisepticum* резистентно к антибиотикам, широко применяемым в ветеринарии, а отдельные культуры оказались устойчивыми к тилозину, который применялся в ограниченных количествах. Авторы рекомендуют, прежде чем применять тот или иной антибиотик в хозяйстве, в каждом случае проводить определение чувствительности выделенного возбудителя к действующим на этот микроорганизм препаратам.

В отношении ингибирующей концентрации эритромицина на различные виды микоплазм литературные данные очень противоречивы. Так, *M. gallisepticum* и *M. mycoides* ингибируются эритромицином в концентрации 0,02–4,0 мкг/мл, в то время как *M. pulmonis* резистентна к концентрациям этого антибиотика до 40 мкг/мл. *M. iners* ингибируется эритромицином только в концентрации более 100 мкг/мл (Newnham A., Chu H., 1965; Kato H. и др., 1972).

Нет единого мнения у исследователей и в отношении стрептомицина. По данным Я.Р. Коваленко с соавт. (1973), многие штаммы микоплазм различных видов (*M. gallisepticum, M. mycoidesvar. capri, M. iners, M. agalactiae* и др.) ингибируются этим антибиотиком только в концентрациях 50–100 мкг/мл.

Характеризуя чувствительность микоплазм к нитрофурановым препаратам, некоторые исследователи указывают, что фуразолидон и фурацилин ингибируют развитие микоплазм в очень широком диапазоне концентраций. Так, поданным A. Newnham, H. Chu (1965), *M. gallisepticum, M. mycoides var. mycoides* и другие микоплазмы, выделенные от млекопитающих и птиц, ингибируются фуразолидоном в концентрации от 0,5 до 40,0 мкг/мл, а фурацилином в концентрации от 2 до 200 мкг/мл.

По данным P. Smith (1971) и других исследователей, при серийном пассировании некоторых видов микоплазм в питательных средах, содержащих стрептомицин, хлорамфеникол, эритромицин и хлортетрациклин, возможно образование мутантов, резистентных к этим антибиотикам. Длительное применение традиционных антибиотиков для лечения респираторного мико-

плазмоза птиц также провоцирует рост резистентных микроорганизмов и снижает эффективность лечебных и профилактических мероприятий. В связи с этим возникла потребность в изыскании более эффективных и удобных для групповых обработок химиотерапевтических средств.

Начиная с 80-х гг. 20-го столетия многочисленные фармацевтические компании акцентировали свой выбор на группе синтетических химиотерапевтических средств в ряду 6-фтор-4-хинолон-3-карболовой кислоты, в дальнейшем получивших название фторхинолоны. Молекулы этих препаратов обладают высокой активностью как к микоплазмам, так и к другим микроорганизмам. С.Ж. Гюрджи-Оглы, И.М. Самородов, М.И. Рабинович (2004); А.А. Климов (2000) сообщают о высокой эффективности препаратов из группы фторхинолонов в отношении микоплазм. Мишенью их действия является ДНК-гираза, ключевой фермент бактериальной клетки, ответственный за нормальный процесс биосинтеза ДНК и, соответственно, за нормальный рост и деление клетки. Кроме подавления синтеза ДНК, фторхинолоны в высоких клеточных концентрациях также ингибируют биосинтез РНК и белка в клетке. В мировой ветеринарной практике используют несколько молекул фторхинолонов: энрофлоксацин, дифлоксацин, сарафлоксацин, данофлоксацин, марбофлоксацин, реже норфлоксацин и ципрофлоксацин. Вместе с тем резистентность микроорганизмов к данным препаратам также может возникнуть, но частота спонтанных мутаций для этой группы очень низка (Климова А.А., 2000).

Высокой активностью против микоплазм обладает антибиотик из группы плеуромутилина – тиамулин. Так, минимальная ингибирующая концентрация его для подавляющего большинства известных видов микоплазм птиц составляет 0,007–1 мкг/мл. Механизм действия связан с подавлением синтеза внутриклеточного белка.

Таким образом, различная активность химиотерапевтических препаратов в отношении микоплазм, способность микроорганизмов приобретать лекарственную устойчивость к антибиоти-

кам, разработка и внедрение новых препаратов создают необходимость постоянного контроля чувствительности микоплазм к антибактериальным препаратам как единственного способа для выбора наиболее эффективных.

Несмотря на значительные успехи ветеринарной и фармацевтической науки, до сего времени не удается применением антибиотиков излечить больных птиц и ликвидировать заболеваемость в стаде. Поисками лекарственных веществ и методов введения их больной микоплазмозом птице занимаются до сего времени многие зарубежные и отечественные исследователи.

Используют разные методы обработки антибиотиками и химиотерапевтическими средствами кур-несушек, петухов, молодняка и яиц, предназначенных для инкубации.

По данным специальной литературы, для уничтожения микоплазм в инфицированных яйцах предложено несколько методов. Одни из них основаны на низкой термостабильности микоплазм (нагрев яиц перед инкубацией), другие на губительном действии ультрафиолета на микоплазмы. С этой целью применяют и метод глубинной обработки яиц с использованием антибиотических растворов, причем для увеличения диффузии антибиотика внутрь яйца используется температурно-дифференциальный метод (нагрев яиц до температуры +37 ºС, с последующим погружением их в холодные растворы антибиотиков). Также рекомендуют метод переменного атмосферного давления (сначала давление на жидкость снижается с целью создания вакуума в воздушной камере, после чего восстанавливается до нормального уровня).

J. Fabricant, P. Levin (1962, 1963) в целях снижения гибели эмбрионов и получения свободного от респираторного микоплазмоза молодняка предлагали перед инкубацией погружать нагретые до +37 ºС яйца на 10–15 минут в растворы холодного (+5 ºС) эритромицина и тилозина. Авторы получили значительное снижение пораженных микоплазмозом цыплят и рекомендовали применять этот метод обработки яиц перед их инкубацией.

В опытах A. Cakala (1957) показано, что тилозин, введенный в воздушную камеру яиц в дозе 1,5–1,8 мг, полностью инактивирует микоплазмы во всех обработанных яйцах. Ни один из других проверенных препаратов не обладал таким эффективным действием. Эритромоцин задерживал развитие микоплазм у 70 % эмбрионов. Тетрациклин не подавлял микоплазм в яйцах, а детреомицин оказался токсичным для эмбрионов.

М.Е. Антонова (1966) сообщает о положительных результатах по обезвреживанию куриных яиц от микоплазм при введении в них раствора эритромицина, а Ph. Cottereau (1969) – при введении в яйца стерамицина и тилозина методом переменного атмосферного давления.

А. Берлин с соавт. (1981) провели глубинную обработку яиц 0,25 % раствором фармазина, что позволило повысить вывод цыплят с 80,7 до 82,8 % и сохранность – с 95,2 до 96,8 %, а среднесуточный прирост живой массы за 60 дней выращивания – с 9,7 до 10,1 г.

И. Безрукавая (1982) сообщает, что обработка яиц индеек, инфицированных микоплазмами, в растворах канамицина, фармазина и гентамицина обеспечивала их деконтаминацию на 100 %.

H.W. Yoder (1970) предложил для уничтожения *M. gallisepticum* в яйце нагревать его в течение 12–14 часов, пока температура внутри яйца не достигнет +46,1 ºС. При этом инактивировался возбудитель инфекции, но вывод цыплят уменьшался на 8–12 %. О положительных результатах при использовании данного метода сообщали M. Meroz с соавт. (1973) в Израиле. По данным С. Качановой (1974), обработка инкубационных яиц с целью профилактики микоплазмоза при температуре +45 ºС в течение 4 часов позволила сохранить выводимость цыплят не менее 70 % и получать цыплят свободных от микоплазм. О положительных результатах при прогреве яиц перед инкубацией сообщил Д. Ковинько (1982).

Многие исследователи пытались предотвращать передачу возбудителя респираторного микоплазмоза путем лечения курносителей *M. gallisepticum*.

И. Ченчевым, К Обрешковым и Н. Шишковым (1966) были поставлены опыты по оздоровлению неблагополучного по микоплазмозу стада путем обработки кур (каждые 15 дней) и цыплят (3-кратно) стрептомицином. В результате проведенных опытов исследователи пришли к заключению, что стрептомицин оказывает определенный терапевтический эффект, но полностью возбудителя не уничтожает. Авторы сообщают, что подобные результаты были получены и при применении биовита и фуразолидона. М.Т. Прокофьева и соавт (1966) считают, что применение курам несушкам стрептомицина и фуразолидона при респираторном микоплазмозе улучшает общее состояние, но в большинстве случаев не излечивает птицу.

Х. Рашев (1965) провел сравнительное испытание лечебной эффективности стрептомицина, тетрациклина и нативного биомицина и сообщил, что стрептомицин в дозе 0,25 г/кг веса оказывал лечебное действие. Тогда как, тетрациклин и биомицин в дозе 0,30 г/кг веса дает незначительный лечебный эффект или вообще не действует на птиц в развитой стадии заболевания.

Большой опыт по лечению стрептомицином и фуразолидоном маточного стада был проведен сотрудниками ВИЭВ А.Я. Фоминой, А.С. Серебряковым, Г.А. Грошевой и другими (1968). Для этого применяли следующую схему: за 2 недели до сбора яиц на инкубацию курам давали фуразолидон с кормом в дозе 30 мг/кг веса в течение 10 дней. В 1 и 5-й дни скармливания фуразолидона вводили внутримышечно стрептомицин (20–50 тыс. ед./кг веса) в масляном растворе витаминов А и D. Обработку проводили с интервалом 20 дней. Собранные яйца перед закладкой в инкубатор выдерживали в смеси фуразолидона (1:25 000) и стрептомицина (1:25 000) при температуре +30 ºС в течение 20 минут. Выведенных цыплят выращивали изолированно. По результатам проведенных опытов авторы сделали выводы о том, что используемая ими схема позволила не только снизить заболеваемость несушек РМП, но и профилактировать появление новых случаев заболевания кур в ста-

де. Отсутствие случаев микоплазмоза у молодняка до 6–8-месячного возраста убедительно свидетельствует о высокой эффективности предлагаемых схем. Появление отдельных случаев микоплазмоза среди птиц старше 6–8-месячного возраста авторы объясняют возможным попаданием в инкубацию инфицированных яиц, а также последующим прижизненным заражением птиц. Полного оздоровления хозяйства этим методом, по-видимому, достигнуть нельзя; однако терапевтическая эффективность свидетельствует о целесообразности его применения. Данная схема позволила значительно снизить экономический ущерб, выражающийся в снижении яйценоскости, выводимости цыплят и потерях в привесе при выращивании бройлеров.

E.E. Ose и др. (1979) сообщили, что систематическим применением тилозина курам-несушкам и введением этого же препарата в развивающиеся эмбрионы удалось приостановить заболевание птицы, снизить потери яиц. В последующих поколениях реагирующую на микоплазмоз птицу обнаруживали в незначительном количестве. Однако получить свободное от респираторного микоплазмоза поголовье не удалось. О положительных результатах при лечении РМП тилозином сообщали и другие зарубежные (Jordan F.T., 1993; Tanner A.C., 1993) и отечественные исследователи (Башкиров О.Г., 1999; Елесеева Е., 2003; Борисенкова А.Н., 2003; Колобов Е.А., 2004).

Тиамулин отдельно и тиамулин в комплексе с салиномицином оказались эффективными средствами лечения цыплят (Baughn C.O., 1978; Stipkovits L., 1992; Белкин В.А, 2004). Комбинация линкомицина и спектомицина была эффективна для лечения экспериментально вызванного аэросаккулита у молодых цыплят (Hamdi A.H., 1970).

Некоторые исследователи сообщают об эффективности применения данофлоксацина (препарат из группы фторхинолонов) цыплятам-бройлерам, экспериментально инфицированным *M. gallisepticum* (Jordan F.T., 1993; Tanner A.C., 1993; Kempf I., 1992).

А.А. Климов (2004) указывает на положительные результаты при испытании энроксила (ДВ энрофлоксацин – препарат из группы фторхинолонов) при ассоциативном течении микоплазмоза и колибактериоза. В результате опытов в группах цыплят, получавших энроксил, характерных патологоанатомических признаков поражения респираторных органов не установлено. Сохранность в подопытных группах была на 0,4–1,2 % выше, чем в контроле. Выделение культур *E. coli* в опытных группах отмечено значительно меньшее, чем в контрольной. При серологических исследованиях на наличие антител к возбудителю респираторного микоплазмоза установлено, что первые реагирующие цыплята появились в контрольной группе в возрасте 77 суток, в то время как в опытной группе реагирующие особи появились через 130 суток.

А.Д. Чекмарев (2000) изучил лечебно-профилактическую эффективность иммуностимуляторов: полиоксидония и грамидекса при микоплазмозе птиц. Автор сообщает, что при применении данных препаратов происходит коррекция защитных сил организма, что обеспечивает подавление возбудителя. При бактериологическом исследовании цыплят, обработанных полиоксидонием и грамидексом, штаммы *M. gallisepticum* изолированы от 8 и 12 % цыплят соответственно, в контрольной группе – от 40 %. Также уменьшается количество особей с патологоанатомическими изменениями, типичными для данной инфекции. Помимо этого коррекция иммунного ответа при вакцинации цыплят-микоплазмоносителей против ньюкаслской болезни характеризуется повышением в крови уровня противовирусных гемагглютининов.

Г.В. Зоткина с соавт. (2004) испытывала различные схемы профилактики и лечения микоплазмоза молодняка и кур. Для молодняка более высокая лечебно-профилактическая эффективность из двух схем получена при следующей последовательности применения: в суточном возрасте – нортрила, 3, 7 и 14-дневном возрасте – фуразолидона, в 4-недельном – иммунобака, 5-недельном – тилана, 9 и 11-недельном – энроксила, 12-недельном – фармазина, за 2 дня до и 3 дня после перевода птицы – иммунобака. Это позволило за 95 дней повысить сохран-

ность птицы до 99,38 %, что на 0,74 % больше, по сравнению со второй схемой. Кроме того, были выше на 0,57 г/гол среднесуточные приросты живой массы и на 6,7 % показатели по однородности стада. Экономический эффект составил 3,27 руб. на голову.

Выявлена высокая лечебно-профилактическая эффективность сочетанного применения фурациклина М (сульфатетрин М) с иммунобаком в 120–140 и 300-дневном возрасте кур, т. е. в периоды обострения эпизоотического процесса микоплазмоза и возникновения высокой вероятности вспышек бактериальных и вирусных инфекций. При этом в опытной группе яйценоскость на курицу-несушку повысилась на 36 яиц, на 0,66 г/гол повысился среднесуточный прирост живой массы, сохранность – на 6,15 % и снизилась на 6,16 % выбраковка.

Широкое использование антибиотиков в птицеводстве как в одной из составляющих отраслей животноводства привело к переносу антибиотикорезистентности от штаммов микроорганизмов животного происхождения к микроорганизмам человеческой популяции, следствием чего явилось сокращение выбора антибиотиков для людей. Особенно это относится к препаратам из группы фторхинолонов, против применения которых животным и птице активно выступают медицинские работники.

K. Stohr (1999) сообщает, что вопрос переноса резистентных микробов посредством продуктов питания животного происхождения все еще спорный. Поэтому лучше было бы сосредоточиться на предотвращении инфекций, вызванных продуктами питания и не осуждать использование антибиотиков в ветеринарии (применяемых уже 50 лет). Так, среди применяемых препаратов 75 % относится к тетрациклинам и пенициллинам и лишь 1,2 % – к фторхинолонам.

На конференции, состоявшейся в Женеве в 1998 г. («Назначение хинолонов животным на откорме и возможное воздействие на здоровье человека») не получено удовлетворяющих ответов на вопрос возможного переноса резистентных бактерий человеку (Bywater R., 1999).

В.Д. Соколов (2004), Леон Шчука (2005) отмечают, что для успешного разведения откормочных животных и птиц необходимость в антибиотиках будет существовать еще на протяжении нескольких десятилетий. Применение их в благоразумных рамках в птицеводстве вполне оправдано, поскольку позволяет значительно улучшать экономические показатели при выращивании птицы и повышать оплату корма. Применение антибиотиков должно быть обоснованно (предотвращение или лечение заболеваний) и проходить под контролем ветеринарного врача со строгим соблюдением дозировки, сроков дачи (не увеличивать время применения антибиотиков) и сроков убоя, с обязательным учетом чувствительности к ним возбудителей.

Для профилактики вторичных бактериальных инфекций, которые часто при микоплазмозе вызывает условно-патогенная микрофлора (эшерихии, сальмонеллы, стафилококки, протей, синегнойные палочки и др.), необходимо применение средств, повышающих общую резистентность организма птиц.

В специальной литературе имеется большое количество сообщений о положительном опыте применения пробиотиков для профилактики болезней птиц, вызванных условно-патогенной микрофлорой (Тараканов Б., 1999; Егоров И., 2003; Холдоенко А., 2003; Кудрявцева А.В., 2003; Понюхов В.А., Аликин Ю.С., Юшков Ю.Г., 2004; Бовкун Г.Ф., 2003, 2004; Бобрик О.Н., 2004; Мартыненко С., 2005).

Пробиотики проявляют антагонистическую активность в отношении условно-патогенной микрофлоры, угнетают её рост и снижают вирулентность, улучшают пищеварение, устраняют антибиотиковые дисбактериозы, нормализуют микрофлору желудочно-кишечного тракта цыплят, стимулируют иммунитет, повышают общую резистентность организма и способствуют получению экологически чистой продукции. Пробиотикотерапия является одним из перспективных направлений в постепенной замене антибиотиков в профилактике и лечении данных болезней

5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ПО РЕСПИРАТОРНОМУ МИКОПЛАЗМОЗУ ПТИЦ

Исследования проведены в лабораториях: микст-инфекций (кафедра эпизоотологии), электронной микроскопии (кафедра микробиологии, вирусологии, микологии и иммунологии) ИВМ ОмГАУ; зоонозных инфекций ОНИИПИ Роспотребнадзора, ветеринарии Сибирского НИИ птицеводства, а также в экспериментальном хозяйстве СибНИИП и других птицефабриках Омской области и Западно-Сибирского региона.

Объектом исследования служили инкубационные яйца, эмбрионы, цыплята-бройлеры и куры разных половозрастных групп. В опытах было использовано 4140 инкубационных яиц, 2680 цыплят-бройлеров в возрасте 1–42 дня и 2448 голов взрослых кур кросса «Сибиряк», а также 6 кроликов породы шиншилла массой 2,5–3,0 кг, 200 9-суточных эмбрионов и 140 цыплят-бройлеров кросса «Сибиряк» в возрасте 1–21 суток.

Материалом для прижизненного исследования служили сыворотка крови и соскобы со слизистой оболочки гортани, пробы спермы; от вынужденно убитой и павшей птицы – суспензия с пораженных органов; от эмбрионов – хориоалантоисная жидкость и желток.

Кровь для получения сыворотки брали из подкрыльцовой вены, у кроликов – из краевой вены уха в пробирки Флоринского, смоченные физиологическим раствором. Сыворотку получали по общепринятой методике.

Соскобы со слизистых оболочек брали стерильным хирургическим полым зондом на транспортную среду, представляющую собой питательную среду для микоплазм без ингибиторов и субстрата ферментативной активности. Посевы с пораженных органов делали по общепринятой в микробиологии методике на МПБ, МПА и специальные среды: на бульон Хоттингера, обогащенный 1 % глюкозы и 20 % нормальной лошадиной сыворотки, и три жидкие и плотные дифференциальные микоплазмозные:

аргинин-, глюкозазависимые и уреаплазменные питательные среды.

Посевы инкубировали в аэробных условиях при температуре (37±1)°С в течение 1–5 суток. В процессе выделения и культивирования микроорганизмов на питательных средах изучали их культуральные свойства. При этом учитывали характер и скорость роста, а также форму, рельеф, размер, поверхность и структуру колоний на плотных средах. В жидких средах определяли изменение цвета, образование и характер осадка, а также наличие или отсутствие пристеночного кольца и поверхностной пленки.

Морфологию бактериальных клеток изучали в мазках, окрашенных по Граму и Романовскому-Гимзе. В зависимости от морфологических свойств для выделения чистых культур с целью последующей идентификации выделенные микроорганизмы пересевали на следующие питательные среды: Эндо, висмут-сульфит-агар, желточно-солевой агар (ЖСА).

Биохимические свойства выделенных культур микроорганизмов изучали при помощи набора ММТЕ 1 тест согласно инструкции. Идентификацию проводили по прилагаемому ключу.

Патогенность выделенных культур микроорганизмов изучали постановкой биопробы на цыплятах. Заражение проводили внутрибрюшинно взвесью односуточных агаровых культур в дозе 1,0–1,5×10^9 микробных тел по ОСМ ГИСК имени Л.А. Тарасевича. Цыплятам контрольной плацебо группы вводили внутрибрюшинно 1 мл физиологического раствора. Наблюдение вели в течение 30 дней. По окончании наблюдения оставшихся в живых цыплят девитализировали, проводили патологоанатомическое и бактериологическое исследование.

Патогенность выделенных культур микоплазм также изучали постановкой биопробы на 9-суточных куриных эмбрионах. Заражение проводили в хориоалантоисную полость бульонной культурой в объеме 0,2 мл. Наблюдение вели до конца инкубации, ежедневно просматривая эмбрионы на овоскопе И11-А. По

окончании срока наблюдения вылупившихся цыплят девитализировали и проводили патологоанатомическое и бактериологическое исследование.

Изучение ультраструктурного строения микоплазмозных клеток проводили в лаборатории электронной микроскопии кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ИВМ ОмГАУ. С этой целью взвеси исследуемых культур фиксировали в смеси глутарового и параформальдегидного растворов. После промывки фосфатным буфером и дополнительной фиксации в 1 %-ном растворе четырехокиси осмия обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и ацетоне. Приготовленный материал заключали в аралдит. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме УМТП-4. После контрастирования срезы исследовали под электронным микроскопом ЭМ–125.

В опыте использовали разработанные нами совместно с ОНИИПИ Роспотребнадзора экспериментальные питательные среды в сравнении с контрольными питательными средами НИИЭМ имени Н.Ф. Гамалеи (для *M. fermentans* и *U. urealyticum*) и бульоном Хоттингера, обогащенным 1 % глюкозы и 20 % сыворотки, рекомендуемым для индикации *M. gallisepticum*.

Контроль качества питательных сред для индикации микоплазм и уреаплазм осуществляли, пользуясь методическими рекомендациями «Контроль качества питательных сред по биологическим показателям», М., 1980.

Чувствительность сред определяли методом десятикратных разведений референтных тест-штаммов *M. gallisepticum, M. fermentans и U. urealyticum*, полученных из НИИЭМ имени Н.Ф. Гамалеи.

Селективность (специфичность) определяли методом последовательных десятикратных разведений референтных тест-штаммов *Staphylococcus aureus* WHO–2, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* 9001, полученных из ГИСК имени Л.А. Тарасевича.

Стабильность биологических свойств сред определяли по показателям чувствительности и специфичности в разные сроки хранения в условиях холодильника.

Для серологической диагностики на наличие антител к возбудителю респираторного микоплазмоза применяли сывороточно-капельную реакцию агглютинации (СКРА) с цветным стандартным антигеном *M. gallisepticum* (производства ВНИИЗЖ) и метод иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов фирмы BioChec (Голландия) с учетом результатов с помощью спектрофотометра (ELx800) и компьютерной обработкой данных.

Видоспецифические сыворотки к полевым и референтному штаммам микоплазм получали путем гипериммунизации кроликов по схеме D. Schimmel в модификации А.П. Красикова и Н.Н. Новиковой (2002).

Для постановки РНИФ использовали антиген, полученный нами из полевой культры микоплазм *M. gallisepticum*, ослиный антикроличий глобулин, меченый ФИТЦ (флюоресцин изотиоционат натрия), изготовленный НИИ ЭМ имени Н.Ф. Гамалеи.

В экспериментальных и производственных опытах для бактериологических исследований на микоплазмы использовали жидкие и плотные испытуемые среды, а также для выделения сопутствующей микрофлоры (МПА, МПБ) элективные среды (Левина, Эндо, Плоскирева). Параллельно с культуральными методами проводили исследования на наличие антигенов *M. gallisepticum*, а также других микроорганизмов (*Echerichia coli, Staphilococcus aureus, Proteus vulgaris*), выделенных в ассоциации с ними в РНИФ.

Для изучения эпизоотической ситуации по респираторному микоплазмозу птиц и его ассоциациям закономерностей проявления инфекционного и эпизоотического процессов на птицефабриках Омской области использовали эпизоотологический, клинический, патологоанатомический и лабораторные (бактериологический, серологический) и иммуноморфологические методы диагностики.

Одновременно с исследованием на респираторный микоплазмоз и сопутствующую микрофлору определяли чувствительность выделенных полевых культур к лекарственным препаратам *in vitro*.

Чувствительность выделенных полевых культур к антибактериальным препаратам (*in vitro*) определяли методом дисков и методом серийных разведений по общепринятой методике, утвержденной Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 30.10.1971 г.

Экономическую эффективность рассчитывали по методике определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий, утвержденной Департаментом ветеринарии РФ 21.02.1997 г.

Всю погибшую и убитую с диагностической целью птицу подвергали патоморфологическому исследованию.

Материалом для гистологических исследований служили тимус, фабрициева бурса, селезенка и печень, отбор которых проводили от погибших и вынужденно убитых цыплят через 1, 2, 7, 14, 21-й день после заражения, что соответствовало 22, 23, 28, 35 и 42-дневному возрасту. Исследования проводили по общепринятой методике. Материал фиксировали в 10 %-ном растворе нейтрального формалина и заливали в парафин. Общие структурные изменения в органах изучали на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином.

Перед фиксацией определяли абсолютную массу органов. Относительную массу органов и весовой индекс рассчитывали по общепринятым формулам.

Количество лейкоцитов и эритроцитов определяли по общепринятым методикам. Лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) и индекс сдвига лейкоцитов крови (ИСЛК) рассчитывали по общепринятым в гематологии формулам (Козинец Г.И., 1995).

Количество иммунокомпетентных клеток в периферической крови цыплят определяли в реакциях розеткообразования с помощью эритроцитарных маркеров (Коромыслов Г.Ф. с соавт.

1980). Реакции розеткообразования были адаптированы к работе с клетками крови цыплят. В реакциях использовали эритроциты барана и кролика.

Специфический антиген готовили из трехсуточной культуры микоплазм, культивированной на жидкой глюкозоферментирующей среде. Культуру трехкратно отмывали и готовили 1-миллиардную взвесь, которую прогревали на водяной бане при 60 ^{0}С в течение 1 часа.

Цифровые данные экспериментов обработаны методами математической статистики, принятыми в биологии и медицине с использованием программы Microsoft Excel 2000 и критериев Стьюдента.

5.1. Эпизоотическая ситуация по респираторному микоплазмозу и другим инфекционным болезням на птицефабриках Западно-Сибирского региона

5.1.1. Эпизоотическая ситуация в Омской области

Промышленное птицеводство наших дней характеризуется высокой концентрацией поголовья на ограниченных площадях и поточной системой содержания, что обусловливает постоянное пассажирование через организм птиц условно-патогенной микрофлоры и повышению её вирулентности. Кроме того, искусственный микроклимат, нарушения технологии содержания и кормления, влияние стрессовых факторов привели к снижению общей резистентности организма птицы. На этом фоне широкое распространение получили такие инфекционные болезни, как эшерихиоз (колибактериоз), пастереллез, лейкоз, болезнь Марека, болезнь Гамборо, а также и респираторный микоплазмоз. Причем заболевания зачастую протекают в ассоциативной и смешанной формах, что создает сложную эпизоотическую ситуацию на птицефабриках, затрудняет своевременную диагностику, снижает эффективность лечебно-профилактических мероприятий и наносит значительный экономический ущерб.

Установлено, что на птицефабриках Омской области в структуре гибели кур от инфекционных болезней за 1998–2002 гг. преобладал эшерихиоз (51, 92, 88, 85, 73 %), тогда как за период 2003–2005 гг. болезнь Марека (28–47 %) и лейкоз (35–44 %), а эшерихиоз составлял от 11 до 29 %. При этом из общего количества погибшей птицы от эшерихиоза на долю молодняка в возрасте 1–60 дней приходилось от 59 до 98 %.

Респираторный микоплазмоз кур начали регистрировать в Омской области впервые на Сибирской птицефабрике с 1997 г., вначале только с помощью ККРА. При этом было выявлено 70 % птицы, реагирующей на микоплазмоз, а с 1998 г. стали дополнительно исследовать сыворотку крови с помощью ИФА во ВНИИИЗЖ.

Вместе с тем после применения в 2001 г. комплексной схемы профилактики и лечения птицы по результатам наших исследований стало реагировать в ККРА 21 %, т.е. почти в 3,5 раза меньше. При этом в 17,4 % случаев результаты серологических исследований были подтверждены бактериологическим методом.

В 2000 г. респираторный микоплазмоз был установлен наряду с Сибирской птицефабрикой также на Любинской птицефабрике и в ЭПХ СибНИИП. В этих же хозяйствах одновременно с микоплазмозом регистрировали эшерихиоз, стафилококкоз и сальмонеллез, т. е. инфекционный процесс имел ассоциативный характер. В последующие годы (2002–2004) респираторный микоплазмоз также регистрировался.

В 2005 г. при серологическом и бактериологическом исследовании респираторный микоплазмоз был выделен на птицефабрике Москаленская.

Серологические исследования сыворотки крови, проведенные нами в 2002 г. (1208 проб) на респираторный микоплазмоз, указывают на различную серопозитивность у птицы яичных и мясных пород. Среди молодняка яичной птицы процент серопозитивных не превышал 3 % от числа исследованных. Серопозитивность начиная с 10 % в 170-дневном возрасте увеличивалась до 70 % к 260 дням, затем до 420-дневного возраста отмечали незначительное снижение до 60 %, а в возрасте 450 дней регистрировали лишь 10 % положительно реагирующих кур.

Иную картину наблюдали среди птицы мясных пород. У суточного молодняка материнские антитела выявлялись до 45,5 %, затем к 40-дневному возрасту число положительно реагирующих сокращается, и в возрасте 110–125 дней серопозитивность не регистрируется. Затем снова начинают выявляться с 200–230-дневного возраста (29 %), к 300–320 дням жизни их число увеличивается и достигает 100 % и сохраняется до конца срока эксплуатации.

По данным Омской областной ветеринарной лаборатории по болезням птиц и отдела ветеринарии СибНИИП, можно за-

ключить, что в Омской области респираторный микоплазмоз протекает в ассоциированной форме с другими болезнями. Установлены в основном следующие ассоцианты: *E. coli, Diplococcus, Proteus, Citrobacter diversus, Klebsiella pneumoniae*. Причем на одной из птицефабрик как моноинфекция микоплазмоз встречается лишь в 7 % случаях и чаще всего (72 % случаях) в ассоциации с эшерихиозом.

По нашим наблюдениям, в спонтанных условиях птица восприимчива к эшерихиозу с суточного, а к респираторному микоплазмозу – с 20 дневного возраста.

Среди цыплят бройлеров наибольшая гибель от ассоциированного респираторного микоплазмоза с эшерихиозом наблюдается в возрасте 2–3 недель и до момента убоя смертность сохраняется на высоком уровне. Болезнь носит стационарный характер, сезонность не выражена.

Нашими исследованиями установлено, что распространению респираторного микоплазмоза и эшерихиоза способствуют предрасполагающие факторы: нарушение температурного режима, недостаточный воздухообмен, переуплотнение птицы, применение живых вакцин против вирусных инфекций.

Мясная птица более восприимчива к микоплазмозу, чем птица яичных пород: число кур, положительно реагировавших с цветным микоплазмозным антигеном достигало к 300-дневному возрасту 100 % и удерживалось на этом уровне до конца жизни.

Анализ данных по сохранности молодняка показал, что в возрасте 1–70 дней фактическая сохранность была на 3,3 % ниже, чем планируемая (рис. 5.1).

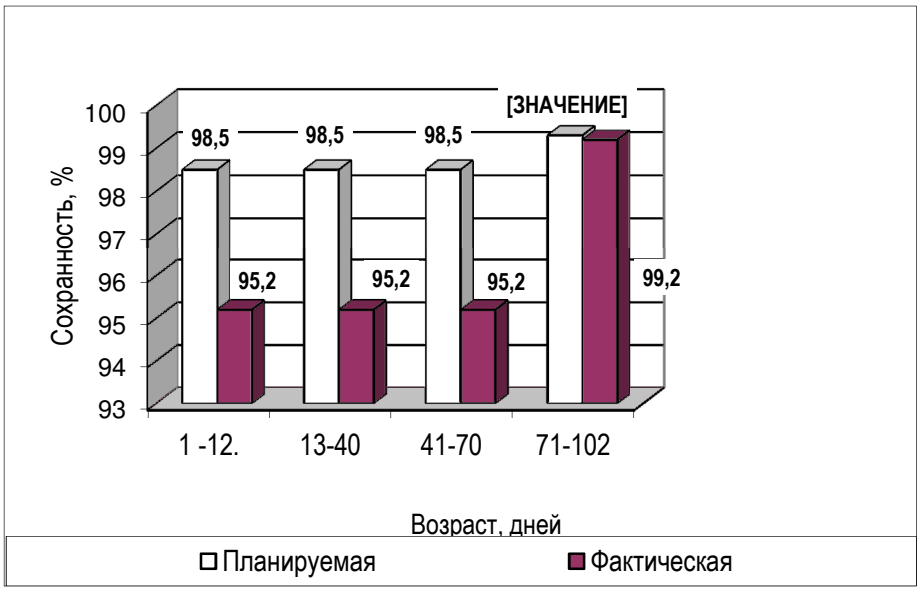


Рис. 5.1. Влияние микоплазмоза на сохранность молодняка

При этом в структуре гибели молодняка микоплазмоз в ассоциации с эшерихиозом составил 67,3 % в возрасте 13–40 дней и 36 % – в 41–70 дней (рис. 5.2). Среди незаразных болезней регистрировали энтерит, гепатит, подагру и нефрит.

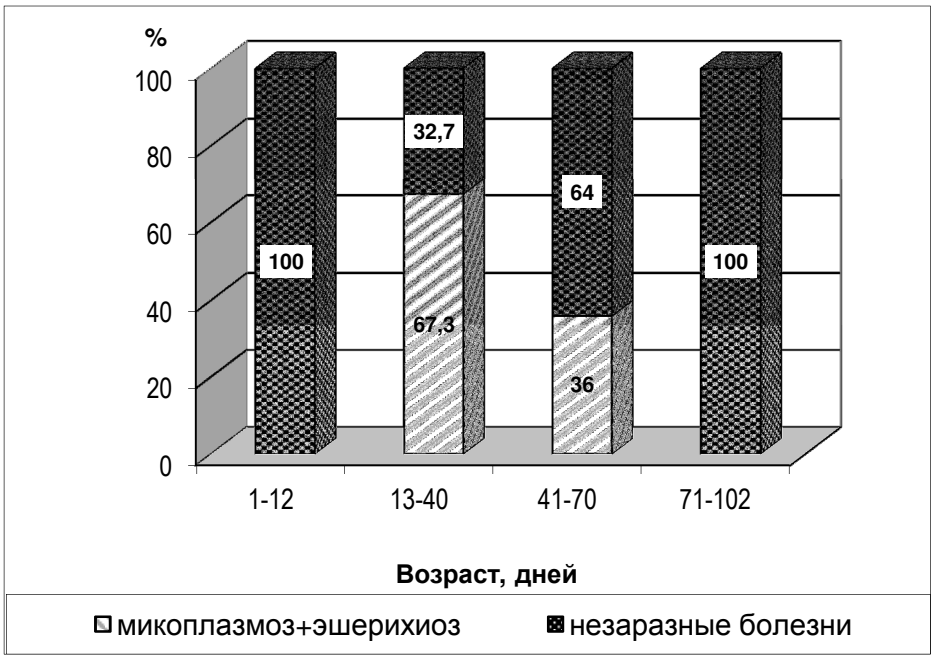


Рис. 5.2. Структура гибели молодняка от инфекционных и незаразных болезней

При вскрытии были обнаружены фибринозный аэросаккулит, одно- и двухсторонняя очаговая пневмония, фибринозный

перикардит и перигепатит. При бактериологическом исследовании были выделены патогенные культуры микоплазм и кишечной палочки.

На основании результатов серологических исследований установлено, что наибольшее количество положительно реагирующих на микоплазмоз цыплят в СКРА было зарегистрировано в суточном и 24-дневном возрастах (табл. 5.1). В 50-дневном антитела к респираторному микоплазмозу отсутствовали, а к 70 дням они снова стали регистрироваться у 3 % цыплят.

Таблица 5.1

Возрастные особенности заболеваемости микоплазмозом молодняка кур

№ п/п	Возраст, дней	Исследовано серологически, голов	Выделено в СКРА		Исследовано бактериологически, голов	Выделено	
			голов	%		культур	%
1	Отходы инкубации	-	-	-	30	13	43
2	1	74	48	65	20	11	55
3	24	150	77	51	20	9	45
4	50	100	0	0	20	3	15
5	70	100	3	3	20	11	55

Примечание: «-» – исследование не проводили.

Наибольшая доля культур микоплазм (55 и 45 %) была выделена от цыплят соответственно 1 и 24-дневного возраста. Количество цыплят-микоплазмоносителей в 50 дней составляло 15 %, а к 70 дням увеличилось до 55 %. Надо отметить, что культуры микоплазм были выделены как от положительно, так и отрицательно реагирующей птицы что, по-видимому, связано с высокой реактивностью птицы в первом и иммунологической толерантностью во втором случаях.

Наличие микоплазм у эмбрионов (выделено 13 культур из 30 исследованных – 43 %), а также наличие антител в сыворотке однодневных цыплят и выделение от них *M. gallisepticum* свидетельствуют о передаче инфекции трансовариальным путем.

С целью профилактики развития болезни цыплятам в возрасте 14 дней применяли энрофлоксацин в дозе 200 г/тонну комбикорма. Но он не оказал должного эффекта, так как после его применения у цыплят 20 дневного возраста наблюдали клинические признаки и патологоанатомическую картину, характерные для ассоциативного с эшерихиозом течения микоплазмоза. От трупов павшей птицы были выделены патогенные культуры микоплазм и *E. coli*. Наличие болезни также подтверждали результаты прижизненных серологических и бактериологических исследований птицы в 24 дня.

В течение 2002 года нами были проведены исследования 1208 проб сыворотки от птицы разных половозрастных групп и разного направления продуктивности, принадлежащей ОНО ЭПХ СибНИИП. Результаты исследований показали, что птица яичного и мясного кроссов реагировала не одинаково. Среди молодняка яичной птицы процент серопозитивных не превышал 3 % от числа исследованных. Увеличение числа положительно реагировавших отмечалось начиная со 170-дневного возраста (10 %) и достигало максимума к 260 дням (70 %), до 420 дней – снижалось незначительно (60 %), а затем резко снижалось (до 10 % в 450дней). Иную картину наблюдали среди птицы мясного направления продуктивности. У суточного молодняка материнские антитела выявлялись до 45,5 % случаев по выводам, к 40 дням число положительно реагирующих сокращается и сходит к 0 % в возрасте 110–125 дней. У взрослой птицы серопозитивные особи начинают выявляться с 200–230-дневного возраста (29 %), их число увеличивается и достигает 100 % к 300–320 дням жизни и сохраняется до конца срока эксплуатации.

Анализ данных по живой массе молодняка и сопоставление их с результатами серологического исследования позволили сделать заключение, что положительно реагирующая на микоплазмоз птица отставала в росте и развитии (рис. 5.3).

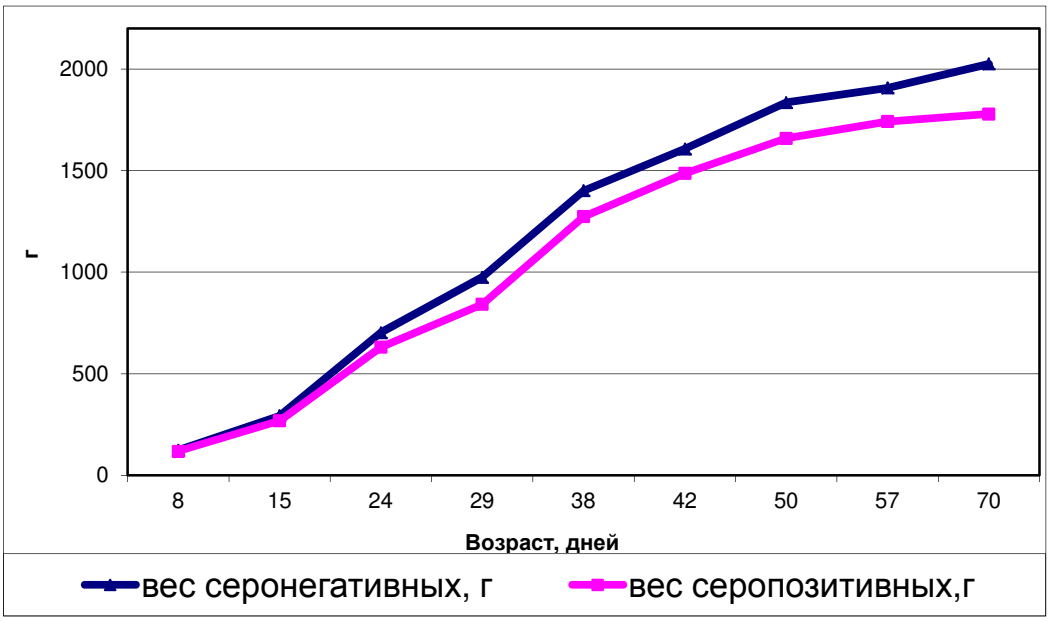


Рис. 5.3. Зависимость живой массы цыплят от заболеваемости респираторным микоплазмозом

При этом отставание в весе начиналось с 24-дневного возраста, который соответствовал периоду болезни птицы, и сохранялось весь период содержания с достоверной разницей (P≤0,01). Это было подтверждено результатами макрометрических исследований. Птица в возрасте 21–70 дней, положительно реагирующая на микоплазмоз, значительно отставала в массе тушек, при этом наблюдали гипертрофию сердца и печени и гипотрофию органов иммунной системы – тимуса, бурсы.

Одновременно с исследованиями на респираторный микоплазмоз был изучен состав сопутствующей микрофлоры. Были выделены культуры следующих микроорганизмов: *E. coli, Diplococcus, Proteus, Citrobacter diversus*. Причем как моноинфекция микоплазмоз встречался в 7 % случаев. В остальных случаях – в ассоциациях, и чаще всего в ассоциации *M. gallisepticum* + *E. coli* в 72 % случаев (рис. 5.4). При этом были выделены следующие серотипы кишечной палочки O_1, O_{111}, O_{78}, O_{119}, $O_{20.}$.

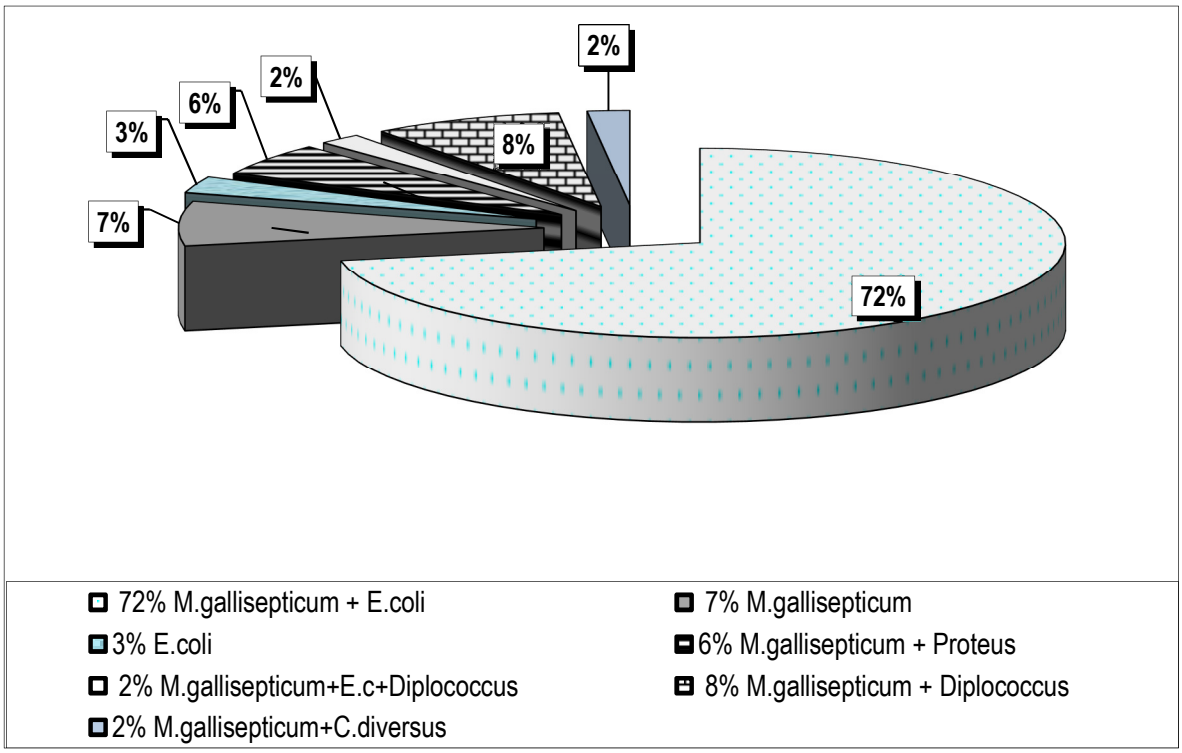


Рис. 5.4. Бактериальные ассоциации, выделяемые при респираторном микоплазмозе молодняка птиц

Сохранность кур-несушек за период эксплуатации составляла 94,4 %. В структуре гибели на долю инфекционных болезней пришлось 4,9 %, из которых 0,5 % – это микоплазмоз с эшерихиозом, 0,5 % – болезнь Марека и 3,9 % – лейкоз (рис. 5.5).

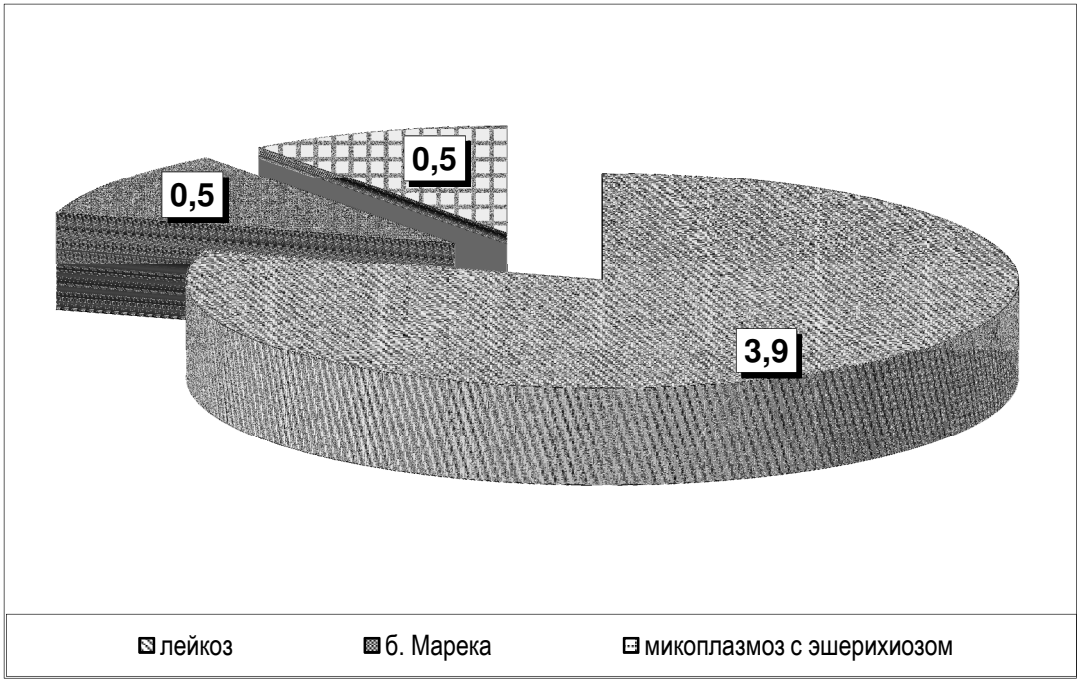


Рис. 5.5. Структура причин гибели кур-несушек от инфекционных болезней

При серологическом исследовании кур-несушек был установлен высокий процент реагирующей на респираторный микоплазмоз птицы (табл. 5.2).

Таблица 5.2

Возрастные особенности микоплазмоносительства у кур-несушек

№ п/п	Возраст, дней	Исследовано серологически, голов	Выделено				Исследовано бактериологически, голов	Выделено	
			в СКРА		в ИФА			Культур	%
			голов	%	%	ср. титр			
1	171	150	146	97,3	-	-	20	7	35
2	220	144	141	97,7	100	7387±1253	20	12	60
3	301	139	77	55,4	100	4852±1169	20	9	45
4	371	133	79	60	100	4579±1299	20	7	35

Примечание: «-» - исследование не проводили.

Так, количество серопозитивных кур в СКРА фиксировалось не ниже 55 %, а в период начала яйцекладки (171 день) и период интенсивной яичной продуктивности (220 дней) достигало максимума – 97,3 и 97,7 % соответственно. По результатам иммуноферментного анализа во все возрастные периоды были выявлены микоплазмозные антитела в 100 % случаях. При этом максимальный средний титр 7387± 1253 также отмечали в период интенсивной яичной продуктивности. С возрастом отмечали снижение среднего титр до 4579±1299.

При прижизненном бактериологическом исследовании соскобов с гортани у кур-несушек выделяли культуры *M. gallisepticum* во все возрастные периоды от 35 до 60 % случаев (см. табл. 5.2). При исследовании на сопутствующую микрофлору в единичных случаях были выделены культуры *Diplococcus* и *Streptococcus*. Применение биовита 1 раз в 15 дней с целью профилактики бактериальных инфекций не оказало положительного действия на возбудителя микоплазмоза.

Анализ данных по сохранности петухов показал, что она была на 6,1 % ниже, чем планируемая, и составила 89,8 %. В структуре гибели лейкоз составил 3,8 %, других инфекционных болезней не

регистрировали. Количество положительно реагирующих на микоплазмоз петухов в СКРА составляло 2,5 % в возрасте 212 дней, 31,3 % – в 280 дней и 37,5 % – в 372 дня (табл. 5.3).

Таблица 5.3

Возрастные особенности микоплазмоносительства у петухов

№ п/п	Возраст, дней	Исследовано серологически, голов	Выделено				Исследовано бактериологически, голов	Выделено			
			в СКРА		в ИФА			из соскобов с гортани		из спермы	
			голов	%	%	ср. титр		культур	%	культур	%
1	212	40	1	2,5	30	638±199	20	8	40	11	55
2	280	32	10	31,3	73	1940±610	20	6	30	8	40
3	372	40	15	37,5	82	5165±1379	20	13	65	14	70

По данным иммуноферментного анализа процент положительно реагирующих в несколько раз превышал результаты СКРА и составлял соответственно 30, 73 и 82 %, что можно объяснить более высокой чувствительностью данного метода. Средний титр антител также увеличивался с возрастом и к 372 дням был на уровне 5165±1379. При бактериологическом исследовании соскобов с гортани культуры микоплазм были выделены от 40, 30 и 65 % петухов соответственно в возрасте 212, 280 и 372 дней. Однако доля культур *M. gallisepticum*, выделенных из спермы петухов, было на 15, 10 и 5 % соответственно выше по сравнению с исследованиями соскобов, что свидетельствует об интенсивном выделении возбудителя болезни со спермой. Наличие возбудителя в сперме не отразилось на её качестве: подвижность спермиев в среднем составила 8,15 баллов (при норме не ниже 6 баллов), концентрация – 3,74 млрд/мл (при норме не менее 3 млрд/мл).

Проводимые профилактические мероприятия (дача биовита 1 раз в 15 дней) не оказали терапевтического действия.

Таким образом, на основании результатов проведенных исследований установлено широкое распространение респираторного микоплазмоза среди птицы разных половозрастных групп.

Респираторный микоплазмоз у молодняка чаще носит ассоциативный характер, среди выделенных ассоциаций наибольший процент составляет микоплазмоз осложненный эшерихиозом (72 % случев). При этом наиболее чувствительны к заражению с развитием комплекса клинических признаков и гибелью до 67,3 % цыплята в возрасте 1–60 дней. Переболевший молодняк отставал в росте и развитии.

Наличие возбудителя респираторного микоплазмоза у эмбрионов и суточного молодняка свидетельствовало о передаче инфекции трансовариальным путем.

Куры-несушки и петухи, не имеющие видимых клинических признаков болезни, являются скрытыми носителями возбудителя респираторного микоплазмоза и источником инфекции для потомства. Так, наибольшее количество кур-микоплазмоносителей (60 %) выявлено в пик яичной продуктивности (220 дней). Количество петухов-микоплазмоносителей увеличивалось с возрастом и к 372 дням составляло 70 %.

5.1.1. Эпизоотическая ситуация в Алтайском крае

Анализ результатов проведенных бактериологических, серологических и гистологических исследований в Алтайском крае в 1998 г. показал, что 66 % птицы было заражено пуллорозом, 22 % – эшерихиозом, 5 % – стафилококкозом, 4 % – стрептококкозом и 3 % – пастереллезом от количества исследованных за год. Отмечены ассоциативные формы течения: болезнь Марека + стрептококкоз в 3 %, эшерихиоз + болезнь Гамборо – в 4 % случаев.

В 1999 г. 60 % птицы от числа исследованной за год было заражено ССЯ-76, 17 % – сальмонеллезом, 14 % – эшерихиозом, 4,7 % – пастереллезом, 1–2 % – псевдомоннозом. В 2000 г. было выявлено 85 % больных сальмонеллезом, 15 % эшерихиозом. Микоплазмоз регистрировали на 9 птицефабриках из 19. При этом из числа выделенных микоплазм в 57 % случаев M. synoviae, в 33 % – ассоциацию M. synoviae + M. gallisepticum, в 5% - M. synoviae + возбудитель реовирусного теносиновита и в

5% - M. synoviae + M. gallisepticum + возбудитель реовирусного синовита (рис. 40).

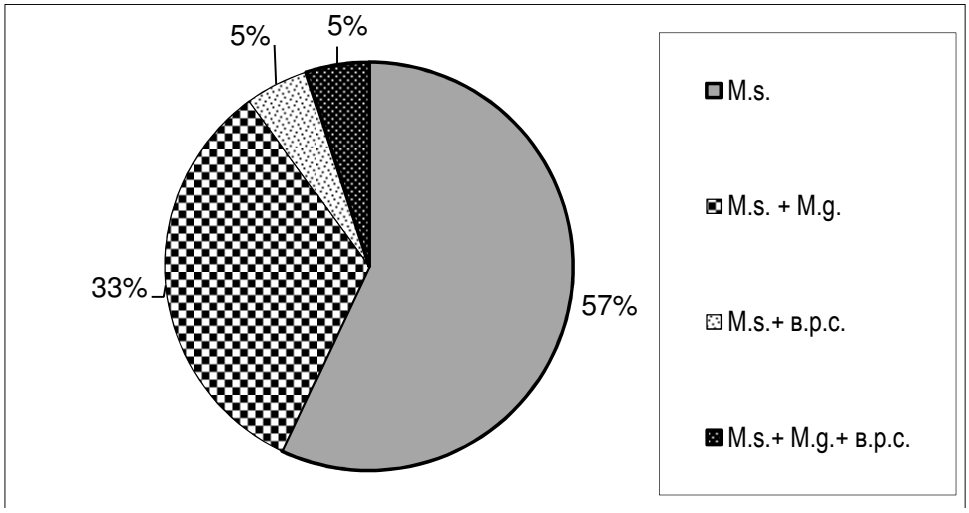


Рис. 40. Ассоциативный респираторный микоплазмоз птиц в Алтайском крае

В 2001 г. из восьми исследованных птицефабрик на двух регистрировали сальмонеллез, на восьми – реовирусный теносиновит, причем на одной из них – в ассоциации с болезнью Марека.

5.1.2. Эпизоотическая ситуация в Томской области

В Томской области в 1999 г. из восьми птицефабрик на двух были выявлены *S. enteritidis* – 20 % и *Pseudomonas* – 30 %, на двух других – *Citrobacter* – 40 % и *Proteus* – 10 %. В 2000 г. из числа выделенных культур *Pseudomonas* и *E. coli* составляли 26 %, *S. enteritidis* и *Proteus* – 21 %, *Citrobacter* – 6 %, причем ассоциация сальмонеллез + эшерихиоз + псевдомоноз была зарегистрирована на трех птицефабриках, а в 2001 г. на двух птицефабриках регистрировали *Proteus* – 67 %, *Citrobacter* – 20 % и *E. coli* – 13%, из них в одном случае ассоциацию *E. coli* + *Proteus*.

Материалы, полученные при изучении эпизоотической ситуации и клинической картины ассоциированного течения респираторного микоплазмоза птиц и эшерихиоза в хозяйствах Омской области, в основном подтверждают выводы отечественных и зарубежных исследователей (Терентьев А.А., 2000), и по-

казывают, что эта ассоциативная инфекция в настоящее время является одной из распространенных форм болезней.

Таким образом, на основании результатов проведенных исследований установлено, что на птицефабриках Омской области в структуре гибели кур от инфекционных болезней за 1998–2002 гг. преобладал эшерихиоз (51, 92, 88, 85, 74 %), за 2003–2005гг. болезнь Марека или лейкоз. При этом от общего количества погибшей птицы от эшерихиоза на долю молодняка в возрасте 1–60 дней приходилось от 68 до 98 %. Оставшуюся долю гибели птицы составляли лейкоз, теносиновит, сальмонеллез, пастереллез, клостридиоз, стафилококкоз и болезнь Марека.

Сезонность проявления эшерихиоза и других болезней не выражена. Респираторный микоплазмоз зарегистрирован на трех (25 %) птицефабриках Омской области, на 9 (47 %) Алтайского края. Чаще всего микоплазмоз протекал в ассоциации с эшерихиозом, стафилококкозом, реже с пастереллезом и реовирусным теносиновитом.

Распространению респираторного микоплазмоза и эшерихиоза способствуют предрасполагающие факторы: нарушение температурного режима, недостаточный воздухообмен, переуплотнение птицы, применение живых вакцин против вирусных инфекций.

Мясная птица более восприимчива к микоплазмозу, чем птица яичных пород: число кур, положительно реагировавших с цветным микоплазмозным антигеном достигало к 300-дневному возрасту 100 % и удерживалось на этом уровне до конца жизни.

5.2. Изыскание питательных сред для индикации и идентификации микоплазм

Наиболее простым и универсальным методом выявления микоплазм и уреаплазм является культуральный с использованием специальных жидких и плотных питательных сред.

Нами совместно с НИИПИ были разработаны оригинальные технологии производства жидких и сухих питательных сред для диагностики микоплазмозов, успешно прошедшие апробацию для индикации микоплазм у плотоядных животных (Новикова Н.Н., 2002) и у птиц:

1. Среда жидкая диагностическая для индикации глюкозоферментирующих микоплазм;
2. Среда жидкая диагностическая для индикации аргининферментирующих микоплазм;
3. Среда жидкая диагностическая для индикации уреаплазм;
4. Среда сухая диагностическая для выявления глюкозоферментирующих микоплазм;
5. Среда сухая диагностическая для выявления аргининферментирующих микоплазм;
6. Среда сухая диагностическая для выявления уреаплазм.

Применительно к жидким средам для индикации микоплазм осуществлен подбор оптимального состава для всех трех сред (для индикации аргинин- и глюкозоферментирующих микоплазм и уреаплазм) из стандартных ингредиентов: питательной основы, индикатора, оптимального набора и концентрации антибиотиков, оптимальных значений pH на разных стадиях технологического процесса. Отработана технология их получения, которая включает приготовление питательной основы с добавлением в нее питательных компонентов и соответствующих субстратов ферментативной активности (глюкоза, аргинин, мочевина), сыворотки и селективных антибиотиков, стерилизующую фильтрацию и заключительную пастеризацию.

Использование трех диагностических сред позволяет осуществлять индикацию и дифференциацию наиболее распространенных видов микоплазм, посредством титрации оценивать степень их накопления в цветообразующих единицах (ЦОЕ) на жидких средах, а также в соответствующих им колониеобразующих единицах (КОЕ) на плотных средах.

Разработана технология получения сухих питательных сред, служащих основой для приготовления плотных сред, что дает возможность идентифицировать выделенные культуры микоплазм и титровать их на специальных агаровых средах. Культуральный метод прост в постановке, не требует специального оборудования, позволяет проводить как индикацию, так и идентификацию возбудителей, определять их титры и оценивать эффективность проведенного лечения.

5.2.1. Чувствительность и специфичность жидких питательных сред

Чувствительность сред. Разработанные нами среды не имеют аналогов в связи с отсутствием стандартных коммерческих сред, выпускаемых промышленностью. Вместе с тем в научно-исследовательских целях предлагается большое количество прописей состава питательных сред для выделения микоплазм и уреаплазм. В качестве контрольных были выбраны среды для выделения микоплазм и уреаплазм, разработанные НИИЭМ имени Н.Ф. Гамалеи, и одна из рекомендуемых для индикации *M. gallisepticum*. Они являются индикаторными, сывороточными, обогащенными питательными веществами, содержат субстраты ферментативной активности (глюкоза, аргинин, мочевина) и ингибиторы (пенициллин). Контроль качества питательных сред осуществляли, пользуясь методическими рекомендациями «Контроль качества питательных сред по биологическим показателям», М., 1980.

Определение показателей чувствительности испытуемых сред. Контрольные и испытуемые жидкие питательные среды должны обеспечивать не позднее четырех суток инкубации при температуре 37±1 °С рост тест-штаммов *M. gallisepticum, M. fermentans* и *U. urealyticum*, визуально определяемый по изменению цвета среды во всей пробирке без помутнения, при посеве 0,2 мл микробной взвеси не ниже, чем из разведений 10^{-5} трижды повторяющегося опыта.

Для постановки опыта каждую опытную среду (контрольную и испытуемую) разливали по 2 мл в стерильные пробирки с ватно-марлевыми и резиновыми пробками (пониженное содержание кислорода).

Подготовка тест-штаммов. Для контроля сред использовали тест-*штаммы M. gallisepticum, M. fermentans* и *U. urealyticum*, полученные из НИИЭМ имени Н.Ф. Гамалеи РАМН. Используемые тест-штаммы были типичны по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам.

Ампулы с лиофилизированной культурой стерильно вскрывали, содержимое растворяли бульонной средой и переносили в бактериологические пробирки. Затем инкубировали при температуре 37±1 °С до изменения цвета среды (но не более четырех суток), что указывало на рост тест-штамма.

Из полученных бульонных культур готовили ряд последовательных десятикратных разведений (до 10^{-10}), для чего в первую пробирку ряда с 9 мл 0,9 %-ного раствора натрия хлорида вносили 1,0 мл бульонной культуры тест-штаммов.

Посев и учет результатов. Посев делали в объеме 0,2 мл из каждого разведения тест-штаммов на соответствующие контрольные и испытуемые среды. По одной пробирке оставляли незасеянной (контроль сред). Посевы инкубировали при температуре 37±1 °С в течение четырех суток. Учет результатов проводили ежедневно по изменению цвета среды. Опыт повторяли трижды.

Результаты опыта показали, что среды (испытуемые и контрольные) равноценны по чувствительности (рост до разведения 10^{-5}), но различны по скорости роста на них тест-штаммов (табл. 5.3). Так, на испытуемых средах рост микоплазм и уреаплазм отмечался на сутки быстрее, чем на контрольных.

Таблица 5.3

Показатели чувствительности и скорости роста микоплазм и уреаплазм на жидких питательных средах

Тест-штамм	Ферментация	Время роста, сутки	Разведения тест-штаммов					
			Контрольные среды			Испытуемые среды		
			10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
M. gallisepticum	глюкозы	1	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-
		3	-	-	-	+	+	-
		4	+	+	-	+	+	-
M. fermentans	аргинина	1	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-
		3	-	-	-	+	+	-
		4	+	+	-	+	+	-
U. urealyticum	мочевины	1	-	-	-	+	+	-
		2	+	+	-	+	+	-
		3	+	+	-	+	+	-
		4	+	+	-	+	+	-

Примечание: «+» – наличие роста; «-» – отсутствие роста.

5.2.2. Селективные свойства (специфичность) жидких питательных сред для выделения аргинин- и глюкозоферментирующих микоплазм и уреаплазм

Питательные среды должны полностью подавлять рост тест-штаммов: *Staphylococcus aureus* WHO–2, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* 9001 во всех пробирках при посеве 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10^3 в течение 2–4 суток инкубации при температуре 37±1 °С.

Определение показателя ингибиции. Тест-штаммы *Staphylococcus aureus* WHO–2, *Proteus mirabilis*, *Echerichia coli* 9001 были получены из ГИСК имени Л.А. Тарасевича РАМН. Используемые для контроля тест-штаммы были типичны по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам.

Лиофилизированные культуры из ампул стерильно вскрывали и растворяли бульонной средой, затем пересевали в пробирки с бульоном и чашки Петри с питательным агаром, инкубировали при температуре (37±1) °С в течение суток. Выросшую на питательном агаре культуру каждого тест-штамма проверяли на чистоту роста, затем пе-

ресевали в пробирки с питательным агаром. После инкубации посевов в течение суток при температуре (37±1) °С культуру тест-штаммов смывали с поверхности скошенного агара стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида, доводили концентрацию микробной взвеси до $1{,}0\times10^9$ микробных тел в мл по ОСМ ГИСК имени Л.А. Тарасевича. Полученные взвеси десятикратными разведениями (4,5 мл 0,9 %-ного раствора натрия хлорида с 0,5 мл микробной взвеси) доводили до концентрации 10 микробных тел (м. т.) в мл. В процессе титрации микробной взвеси перенос в следующую пробирку производили новой стерильной пипеткой объемом 1 мл.

Посев и учет результатов. Из каждого разведения тест-штаммов *Staphylococcus aureus* WHO–2, *Proteus mirabilis, Escherichia coli* 9001 делали посев в объеме 0,1 мл микробной взвеси на три испытуемые среды, три контрольные, на МПБ и МПА. По одной пробирке указанных жидких сред и одну чашку Петри с МПА оставляли не засеянными (контроль сред). Посевы инкубировали при заданной температуре в течение четырех суток. Опыт повторяли трижды.

Результаты опыта показали, что по окончании инкубации испытуемые среды оставались прозрачными и цвета не меняли, в то время как на контрольных средах рост отмечался в разведении 10^{-8}, питательный бульон мутнел, а на агаре отмечался рост характерных колоний (табл. 5.4).

Таблица 5.4

Показатели селективных свойств жидких диагностических сред

Тест-штаммы	Титр тест-штаммов, м. т.							
	Контрольные			Испытуемые			Простые	
	БХ	ГА	ГМ	Г	А	У	МПБ	МПА
	$1{,}0\times10^8$	$1{,}0\times10^8$	$1{,}0\times10^8$	$1{,}0\times10^9$	$1{,}0\times10^9$	$1{,}0\times10^9$	$1{,}0\times10^1$	$1{,}0\times10^1$
Staphylococcus aureus WHO–2,	+	+	+	-	-	-	+	+
Proteus mirabilis	+	+	+	-	-	-	+	+
Escherichia coli 9001	+	+	+	-	-	-	+	+

Примечание: БХ – обогащенный бульон Хоттингера; ГА и ГМ – среда по прописи НИИ ЭМ им. Н.Ф. Гамалеи с аргинином и мочевиной соответственно; Г, А, У – испытуемые среды для индикации глюкозо- и аргининферментирующих микоплазм и уреаплазм соответственно; «+» – наличие роста;«-» – отсутствие роста.

5.2.3. Определение влияния ингибиторов, входящих в состав испытуемых жидких питательных сред на скорость роста микоплазм

Показатель ингибирующих свойств антибиотиков. Содержащиеся в испытуемой жидкой питательной среде антибиотики не должны задерживать скорость роста тест-штаммов *M. gallisepticum, M. fermentans* и *U. urealyticum* в течение четырех суток инкубации при температуре 37±1 °С. Это визуально определяемый по изменению цвета среды во всей пробирке без помутнения, не ниже чем из разведений 10^{-5} при посеве 0,2 мл микробной взвеси в каждую из трех пробирок, трижды повторяющегося опыта. Подготовка питательных сред. Все испытуемые среды, содержащие и не содержащие антибиотики, разливали по 2 мл в стерильные пробирки с ватно-марлевыми пробками.

Посев и учет результатов. Из бульонных культур тест-штаммов *M. gallisepticum, M. fermentans, U. urealyticum* готовили последовательные десятикратные разведения на физиологическом растворе. Посев делали из разведений 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} на три среды с антибиотиками и на три среды без антибиотиков в объеме 0,2 мл взвеси тест-штаммов. По одной пробирке каждой среды оставляли не засеянной (контроль сред). Посевы инкубировали при температуре 37±1 °С в течение четырех суток. Учет результатов проводили путем визуального просмотра пробирок на наличие изменения цвета среды. Опыт повторяли трижды. При этом антибиотики, входящие в состав сред, не влияли на рост микоплазм и уреаплазм, которые росли в концентрации 10^{-5} как на средах с антибиотиками, так и без них (табл. 5.5).

Таблица 5.5

Показатели влияния ингибирующих свойств антибиотиков в испытуемых жидких питательных средах на рост микоплазм и уреаплазм

Тест-штамм	Ферментация	Время роста, сутки	Разведения тест-штаммов					
			Среды с антибиотиками			Среды без антибиотиков		
			10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
M. gallisepticum	глюкозы	1	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-
		3	+	-	-	+	-	-
		4	+	+	-	+	+	-
M. fermentans	аргинина	1	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-
		3	+	-	-	+	-	-
		4	+	-	-	+	-	-
U. urealiticum	мочевины	1	+	-	-	+	-	-
		2	+	-	-	+	-	-
		3	+	-	-	+	-	-
		4	+	-	-	+	-	-

Примечание: м. т. – микробные тела; «+» – наличие роста; «-» – отсутствие роста.

5.2.4. Определение сроков хранения жидких диагностических сред для индикации микоплазм по показателю стабильности их биологических свойств

Показателями биологической стабильности питательных сред являются чувствительность, скорость роста, селективность. Данные показатели не были изменены в течение первого, второго, третьего и шестого месяцев хранения сред при температуре + 4°С.

В результате проведенных опытов установлено, что жидкие диагностические среды для индикации и идентификации аргинин- и глюкозоферментирующих микоплазм и уреаплазм, разработанные нами совместно с НИИПИ и именуемые как испытуемые, соответствуют по всем показателям требованиям, предъявляемым к питательным средам, а именно:

- высокая чувствительность к ним микроорганизмов, относящихся к классу Mollicutes;
- скорость роста тест-штаммов *M. gallisepticum* и *M. Fermentans* – трое суток и *U. urealyticum* – в течение одних суток;

- селективная способность (специфичность), которая выражается в ингибиции данными питательными средами тест-штаммов *Staphylococcus aureus* WHO–2, *Proteus mirabilis, Escherichia coli* 9001, с отсутствием влияния на рост микоплазм и уреаплазм;
- стабильность биологических свойств испытуемых сред, позволяющая сохранять их в условиях холодильника до трех месяцев.

5.2.5. Чувствительность и специфичность экспериментальных полужидких и плотных питательных сред

Показатель чувствительности. Испытуемые плотные питательные среды с содержанием 1,3% агара должны обеспечивать рост тест-штаммов *M. gallisepticum, M. fermentans* и *U. urealyticum* не позднее 7 суток инкубации при температуре 37±1 °С, при наличии характерных колоний, и не ниже, чем из разведений 10^{-5} при посеве 0,1 мл микробной взвеси на каждую из трех сред трижды повторяющегося опыта.

Испытуемые полужидкие питательные среды с содержанием 0,3 % агара, должны обеспечивать рост тест-штаммов *M. gallisepticum, M. fermentans* и *U. urealyticum* не позднее, чем на четвертые сутки инкубации при указанной выше температуре, визуально обнаруживаемый по изменению цвета индикатора во всей пробирке без помутнения и образованию характерного роста в виде хлопкообразных облачков по центру среды из разведений не ниже, чем 10^{-5} при посеве 1 мл микробной взвеси на каждую из трех сред трижды повторяющегося опыта.

Определение чувствительности. Для контроля сред использовали вышеуказанные тест-штаммы *M. gallisepticum, M. fermentans* и *U. urealyticum*.

Подготовка питательных сред. Контрольные среды (НИИ ЭМ им. Н.Ф. Гамалеи) готовили непосредственно перед работой, совершая весь цикл технологических операций. К 850мл дистиллированной воды добавляли следующие компоненты (г/л): питательный бульон – 19,21; эритрит – 0,01; тиамин-бромид – 0,004;

аргинин – 0,08; цистин – 0,4; глюкоза – 0,8; ЭКД – 4,0; агар – 8,96; углекислый натрий – 0,64. Среду тщательно перемешивали и доводили до кипения, затем автоклавировали. После остывания добавляли 200 мл лошадиной сыворотки и пенициллин. Готовую среду разливали по чашкам Петри, поверхность агара подсушивали, помещая чашки в термостат на 10–15 минут при температуре (37±1) °С.

Плотные испытуемые питательные среды готовили из сухих сред (НИИПОИ), которые представляли собой лиофильно высушенные жидкие среды, имеющие вид таблетки или порошка. При добавлении 75 мл стерильной дистиллированной воды они растворялись в течение 3 минут при температуре (20±2) °С. Разведенные среды подогревали на водяной бане до температуры (50±5) °С, после чего соединяли с равным количеством 2,6 % стерильного агара (pH 7,5–8,0 для глюкозоферментирующих микоплазм и pH 6,2–6,4 для аргенинферментирующих микоплазм и уреаплазм). Полученный агар тщательно перемешивали и разливали по чашкам Петри, поверхность агара подсушивали, помещая чашки в термостат на 10–15 минут при температуре 37±1 °С.

Для приготовления полужидких сред в качестве основы также использовали сухие среды, но для этого добавляли не 2,6, а 0,6 % стерильного агара, полученный агар тщательно перемешивали со средой и разливали по 10 мл в бактериологические пробирки с ватно-марлевыми пробками.

Подготовка тест-штаммов. Для контроля сред использовали вышеуказанные тест-штаммы *M. gallisepticum, M. fermentans* и *U. urealyticum*. Из бульонных культур тест-штаммов готовили ряд последовательных десятикратных разведений на стерильном физиологическом растворе до концентрации 10^{-10} м. т.

Посев и учет результатов. Посев на плотные питательные среды (контрольные и испытуемые) делали в объеме 0,1 мл с каждого разведения тест-штаммов, при этом по одной чашке Петри оставляли не засеянной (контроль сред). Посевы инкубировали в эксикаторе при температуре 37±1 °С в течение семи суток. Параллельно с тех же раз-

ведений делали посев на полужидкие специальные диагностические среды (контрольные и испытуемые). Посев делали в столбик среды, равномерно распределяя 1 мл бактериальной взвеси. По одной пробирке оставляли не засеянной (контроль сред). Инкубировали в течение четырех суток при заданной температуре.

Учет результатов роста микоплазм и уреаплазм на плотных питательных средах проводили ежедневно, начиная с третьих суток, под малым увеличением микроскопа (х50). Колонии тест-штаммов *M. gallisepticum* и *M. fermentans* имели характерные для микоплазм формы с врастающим в агар четко выраженным центром и зоной периферии, а колонии *U. urealyticum* были очень мелкими, зернистыми, без четко выраженных границ. Рост отмечался из разведений до 10^{-5}.

Учет роста на полужидких средах проводили ежедневно со вторых суток по изменению цвета индикатора и по образованию характерного роста в виде хлопкообразных облачков в центре среды. Титр микоплазм и уреаплазм был равен 10^{-5} как на контрольных, так и на испытуемых средах. При этом скорость роста микоплазм на плотных испытуемых питательных средах была на двое суток быстрее, чем на контрольных, на испытуемой полужидкой среде *M. gallisepticum* росла на сутки быстрее, чем на контрольной, скорость роста *M. fermentans* на контрольных и опытных полужидких средах была одинаковой. Скорость роста уреаплазм не отличалась ни на плотных, ни на полужидких средах (табл. 5.6).

Таблица 5.6

Показатели чувствительности и скорости роста микоплазм и уреаплазм на плотных и полужидких питательных средах

Тест-штамм	Ферментация	Время роста (сутки)	Разведение культур тест-штаммов			
			контрольные среды		испытуемые среды	
			плотные (1,3 % агара)	полужидкие (0,3 % агара)	плотные (1,3 % агара)	полужидкие (0,3 % агара)
			10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}
M. gallisepticum	глюкозы	3	-	-	-	+
		4	-	+	-	+
		5	-	+	+	+
		7	+	+	+	+

M. fermentans	аргинина	3 4 5 7	- - - +	- + + +	- - + +	- + + +
U. urealiticum	мочевины	3 4 5 7	- + + +	+ + + +	- + + +	+ + + +

Примечание: м. т. – микробные тела; «+» – наличие роста; «-» – отсутствие роста.

Определение селективных свойств (специфичности) полужидких и плотных питательных сред. Контрольные и испытуемые плотные питательные среды должны полностью подавлять рост тест-штаммов: *Staphylococcus aureus* WHO–2, *Proteus mirabilis, Escherichia coli* 9001, во всех чашках Петри при посеве 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10^{-3} в течение семи суток инкубации, а полужидкие – в течение четырех суток инкубации при температуре 37±1 °С.

Определение показателя ингибиции. В качестве тест-штаммов использовали вышеуказанные культуры *Staphylococcus aureus* WHO–2, *Proteus mirabilis, Escherichia coli* 9001. Агаровую культуру каждого тест-штамма проверяли на чистоту роста, затем пересевали в пробирки с питательным агаром. После инкубации посевов в течение суток при температуре 37±1 °С культуру тест-штаммов смывали с поверхности скошенного агара стерильным 0,9 %-ным раствором натрия хлорида, доводили концентрацию микробной взвеси до $1{,}0\times10^{9}$ микробных тел в мл по ОСМ ГИСК имени Л.А. Тарасевича. Из полученных взвесей готовили последовательные десятикратные разведения на стерильном физиологическом растворе, доводя концентрацию микробных тел до $1{,}0\times10^{1}$ в мл.

Посев и учет результатов. Посев производили в объеме 0,1 мл взвеси каждого разведения тест-штаммов *Staphylococcus aureus* WHO–2, *Proteus mirabilis, Escherichia coli* 9001 на

поверхность трех контрольных и трех испытуемых плотных питательных сред, а также на МПА. По одной чашке каждой среды оставляли не засеянной (контроль сред). Учет проводили ежедневно, просматривая чашки на наличие колоний. Опыт повторяли трижды.

Посев на контрольные и испытуемые полужидкие среды производили в объеме 1 мл взвеси из каждого разведения тест-штаммов *Staphylococcus aureus WHO–2, Proteus mirabilis, Escherichia coli* 9001 и на МПА. По одной пробирке полужидких сред и одну чашку Петри с МПА оставляли не засеянной (контроль сред). Учет проводили ежедневно по изменению цвета среды и помутнению. Опыт повторяли трижды.

В результате после инкубации в течение вышеуказанного срока испытуемые среды остались без изменений, а на чашках Петри с плотной и в пробирках с полужидкой контрольными средами, а также на мясопептонном агаре образовались характерные колонии тест-штаммов микроорганизмов, соответствующие титру $1{,}0\times10^8$ и $1{,}0\times10^1$ (табл. 5.7 и 5.8).

Таблица 5.7

Показатели селективных свойств плотных питательных сред

Тест-штаммы	Титр тест-штаммов, м. т.						
	Контрольные			Испытуемые			МПА
	БХ	ГА	ГМ	Г	А	У	
	$1{,}0\times10^8$	$1{,}0\times10^8$	$1{,}0\times10^8$	$1{,}0\times10^9$	$1{,}0\times10^9$	$1{,}0\times10^9$	$1{,}0\times10^1$
Staphylococcus aureus WHO–2	+	+	+	-	-	-	+
Proteus mirabilis	+	+	+	-	-	-	+
Escherichia coli 9001	+	+	+	-	-	-	+

Примечание: БХ – обогащенный бульон Хоттингера; ГА и ГМ – среда по прописи НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи с аргинином и мочевиной соответственно; Г, А, У – испытуемые среды для индикации глюкозо- и аргининферментирующих микоплазм и уреаплазм соответственно; «+» – наличие роста; «-» – отсутствие роста.

Таблица 5.8

Показатели селективных свойств полужидких питательных сред

Тест-штаммы	Титр тест-штаммов, м. т.						
	контрольные			испытуемые			МПА
	БХ	ГА	ГМ	Г	А	У	
	$1,0\times10^8$	$1,0\times10^8$	$1,0\times10^8$	$1,0\times10^9$	$1,0\times10^9$	$1,0\times10^9$	$1,0\times10^1$
Staphylococcus aureus WHO–2	+	+	+	-	-	-	+
Proteus mirabilis	+	+	+	-	-	-	+
Escherichia coli 9001	+	+	+	-	-	-	+

Примечание: БХ – обогащенный бульон Хоттингера; ГА и ГМ – среда по прописи НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи с аргинином и мочевиной соответственно; Г, А, У – испытуемые среды для индикации глюкозо- и аргининферментирующих микоплазм и уреаплазм соответственно; «+» – наличие роста; «-» – отсутствие роста.

5.2.6. Определение влияния ингибиторов, входящих в состав плотных и полужидких питательных сред, на скорость роста микоплазм

Показатель ингибирующих свойств антибиотиков. Содержащиеся в испытуемых плотных питательных средах антибиотики не должны влиять на скорость роста тест-*штаммов M. gallisepticum, M. fermentans* и *U. urealiticum* в течение семи суток инкубации на плотной питательной среде при температуре 37±1 °С. Это видно по образованию характерных колоний, причем количество микробных клеток не должно быть ниже 10^{-5} при посеве 0,1 мл микробной взвеси в каждую из трех испытуемых питательных сред трижды повторяющегося опыта. Они также не должны в течение четырех суток при указанной температуре подавлять рост тест-штаммов в полужидких питательных средах, обнаруживаемый по изменению цвета индикатора и образованию роста в виде хлопкообразных облачков в центре столбика среды, прирост должен отмечаться не ниже, чем из 10^{-5} при посеве 1 мл микробной взвеси в каждую из трех пробирок трижды повторяющегося опыта.

Подготовка питательных сред. Испытуемые плотные питательные среды, содержащие и не содержащие антибиотики, разливали в чашки Петри и подсушивали в термостате в течение 10–15 минут.

Испытуемые полужидкие питательные среды, содержащие и не содержащие антибиотики, разливали по 10 мл в бактериологические пробирки.

Посев и учет результатов. По 0,1 мл бульонной взвеси тест-штаммов *M. gallisepticum, M. fermentans, U. urealiticum*. в разведениях 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} наносили на каждую испытуемую плотную питательную среду. По одной чашке оставляли не засеянной (контроль сред). Посевы инкубировали в эксикаторе при температуре 37±1 °С в течение семи суток. Учет результатов роста проводили под малым увеличением микроскопа по наличию характерных колоний.

По 1 мл бульонной взвеси тест-штаммов *M. gallisepticum, M. fermentas, U. urealiticum* в разведениях 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} пересевали на три испытуемые полужидкие содержащие ингибиторы и три испытуемые среды без ингибиторов (6 пробирок на каждый штамм). По одной пробирке оставляли не засеянной (контроль сред). Посевы инкубировали в эксикаторе при указанной температуре в течение четырех суток. Учет результатов роста проводили визуально по изменению цвета индикатора и образованию роста в виде хлопкообразных облачков в центральной части среды.

Установлено, что антибиотики, входящие в состав плотных сред, не влияют на рост микоплазм и уреаплазм, которые росли в концентрации 10^5 КОЕ как на средах с антибиотиками, так и без них (табл. 5.9).

Таблица 5.9

Показатели ингибирующих свойств антибиотиков, входящих в состав испытуемых плотных и полужидких питательных сред, на рост микоплазм и уреаплазмы

Тест-штамм	Ферментация	Время роста (сутки)	Титр тест-штаммов, м. т.											
			Испытуемые среды с антибиотиками						Испытуемые среды без антибиотиков					
			плотные (1,3 % агара)			полужидкие (0,3 % агара)			плотные (1,3 % агара)			полужидкие (0,3 % агара)		
			10^5	10^6	10^7	10^5	10^6	10^7	10^5	10^6	10^7	10^5	10^6	10^7
M. gallisepticum	глюкозы	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		4	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
		5	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
		7	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
M. fermentans	аргинина	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		4	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
		5	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
		7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U. urealyticum	мочевины	3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
		4	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
		5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: м. т. – микробные тела; «+» – наличие роста; «-» – отсутствие роста.

5.2.4. Определение сроков хранения сухих диагностических сред для индикации аргинин- и глюкозоферментирующих микоплазм и уреаплазм

Срок хранения сред определяли по показателю стабильности биологических свойств сред на протяжении девяти месяцев хранения в условиях холодильника.

Показатель биологической стабильности включает чувствительность, скорость роста, селективность питательных сред. Данные показатели не менялись в течение: 1, 3, 6, 9, 12 месяцев хранения при температуре +4 °С.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что сухие диагностические среды для индикации и идентификации аргинин- и глюкозоферментирующих микоплазм и уреаплазм, разработанные нами совместно с НИИПИ и именуемые как испытуемые, по всем показателям соответствуют требованиям, предъявляемым к питательным средам. Данные среды экономичны, удобны в применении, так как их можно использовать в качестве основ для приготовления плотных и полужидких сред, что повышает их диагностическую ценность и сроки хранения и упрощает транспортировку.

Среды обладают высокой чувствительностью к микроорганизмам, относящимся к классу *Mollicutes*, рост которых на плотной и полужидкой среде проявляется в концентрации не менее чем 10^5 КОЕ. При этом скорость роста тест-штаммов *U. urealiticum* на плотной среде – пять и на полужидкой – двое суток; а *M. fermentans* – пять и трое суток соответственно. Также выражена и селективная способность (специфичность), которая проявляется в ингибиции данными питательными средами тест-штаммов *Staphylococcus aureus* WHO–2, *Proteus mirabilis* и *Escherichiacoli* 9001, в то время как на скорость роста культур микоплазм и уреаплазм не влияет. Стабильность же биологических свойств позволяет сохранять среды в условиях холодильника до девяти месяцев. Обобщенные материалы опытов по изучению жидких, полужидких и плотных питательных сред для индика-

ции микоплазм показали, что среды действительно соответствуют всем требованиям, предъявляемым к ним (табл. 5.10).

Таблица 5.10

Основные показатели качества питательных сред для индикации и идентификации микоплазм

Среды	Чувствительность (рост min количества, м. т.)	Скорость роста тест-штаммов, (сутки)			Специфичность (селективные свойства)	Сроки хранения (месяцы)
		M. gallisepticum M ± m	*M. fermentans* M ±m	*U. urealyticum* M± m		
Жидкие	10^{-5}	3,12 ± 0,11*	3,28 ± 0,01*	1,33 ± 0,11*	100 %	6
Полужидкие	10^{-5}	4,57 ±0,11*	4,72 ±0,01**	2,33 ± 0,11**	100 %	6
Плотные	10^{-5}	5,12 ±0,11*	5,27 ± 0,01*	4,22 ± 0,04*	100 %	12

Примечание: * P≤0,05; ** P>0,05.

5.3. Получение кроличьих гипериммунных микоплазменных диагностических сывороток для РНИФ

Микоплазмы различных видов, выделенные от животных и птиц, трудно отличить друг от друга, хотя и существует некоторое своеобразие в быстроте роста, в морфологии колоний и клеточных элементов, а также в биохимических свойствах. Нелегко дифференцировать их и по патогенным свойствам, так как они весьма не постоянны, и воспроизвести заболевание в экспериментальных условиях не всегда удается. К тому же при длительном культивировании на бесклеточных питательных средах они могут терять свою вирулентность.

Поэтому серологические методы до сих пор остаются основными для видовой идентификации микоплазм, выделенных от птиц. При этом одной из наиболее практически значимой является реакция иммунофлуоресценции.

Для гипериммунизации использовали трехсуточные бульонные культуры референтного и полевого штаммов *M. gallisepticum*. Культуральную жидкость центрифугировали при 6000 g в тече-

ние часа. Полученный осадок трижды отмывали стерильным физиологическим раствором, центрифугируя в том же режиме, и доводили до концентрации $1{,}7\times10^9$ микробных тел в 1 мл по ОСМ ГИСК имени Л.А. Тарасевича. Гипериммунизацию проводили на 6 кроликах (по 3 головы на каждый штамм) породы шиншилла весом 2,5–3 кг по следующей схеме (табл. 5.11).

Таблица 5.11

Схема гипериммунизации кроликов культурами микоплазм

Время введения, сут.	1	4	7	10	13	16	20	24
Доза антигена, млрд м.т.	0,85	1,7	1,7	1,7	3,4	3,4	3,4	3,4
Левамизол, мл	1	-	-	-	-	-	-	-

Титры антител учитывали на 7, 14, 21 и 30-е сутки после введения антигена в реакции непрямой иммунофлуоресценции.

Для постановки реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) готовили антигены из референтного и полевого штаммов микоплазмы галлисептикум, использованных для гипериммунизации кроликов, по вышеописанной методике и инактивировали на водяной бане при температуре 70 °С в течение 30 минут.

Из полученных гипериммунных сывороток готовили ряд последовательных двукратных разведений на физиологическом растворе, начиная с 1:10. Разведения делали микродозатором в пластиковых планшетах.

Ход определения. Реакцию непрямой иммунофлюоресценции ставили по следующей методике. На чистые тщательно обезжиренные без царапин предметные стекла наносили параллельно друг другу несколько капель антигенов. Антигены высушивали и фиксировали над пламенем спиртовки. Затем на каждую каплю антигена наносили равную по объему каплю сыворотки из каждого разведения, начиная с последнего. Одновременно ставили контроль:

1. Антиген + сыворотка положительная;
2. Антиген + сыворотка отрицательная;
3. Антиген + физиологический раствор.

Стекла выдерживали во влажной камере при 37–38 °С, в течение 50–60 минут для образования комплекса антиген – антитело. После чего их промывали дистиллированной водой от не связавшихся антител, подсушивали и наносили в красящем титре (подобранном опытным путем) ослиный антикроличий глобулин, меченный ФИТЦ (флуоресцеин изотиоционатом натрия), изготовленный НИИЭМ имени Н.Ф. Гамалеи. Затем стекла помещали на 15–20 минут во влажную камеру при температуре 37–38 °С. По истечении этого времени мазки промывали дистиллированной водой, просушивали и просматривали в люминесцентном микроскопе.

Интенсивность свечения оценивали в крестах:

– очень яркая люминесценция по периферии микробной клетки, четко контрастирующая с телом клетки – ++++;

– яркая люминесцирующая периферия клетки – +++;

– слабое свечение периферии клетки – ++ или + .

При отрицательной реакции люминесценция клеток отсутствует. За положительный результат принимали яркое специфическое свечение контуров микробов в виде ободков с оценкой в 3 и 4 креста; сомнительные результаты оценивали в 2 креста при наличии слабого свечения контуров клеток.

Наиболее высокий средний уровень антител регистрировали в обеих группах на 21–30-й день после начала гипериммунизации, который колебался в пределах от 260 ± 53,33 до 1070 ± 213,33. При этом показатели среднего титра антител в эти сроки были выше у кроликов, гипериммунизированных полевым штаммом (750 ± 282,21 – 1070 ± 213,33), чем у животных, гипериммунизированных референтным штаммом (270 ± 53,33 – 530 ± 106,67) (рис. 5.7).

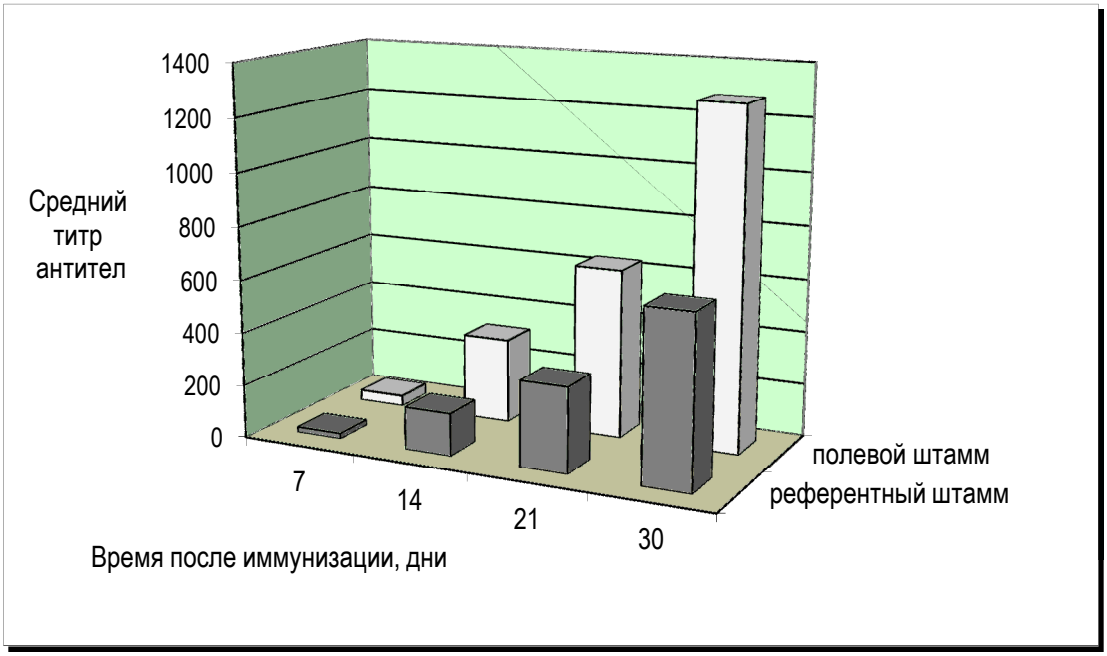


Рис. 5.7. Динамика синтеза антител у кроликов, иммунизированных культурами микоплазм

Таким образом, гипериммунизация кроликов по методу D. Schimmel в модификации Новиковой Н.Н. (2002) позволила получить активные антимикоплазменные сыворотки для РНИФ, причем полевой штамм *M. gallisepticum* оказался более иммуногенным. Реакция иммунофлуоресценции является одной из высокочувствительных и специфичных серологических тестов, с помощью которой можно проводить индикацию и идентификацию различных видов микоплазм, изучать их антигенные свойства и родство, эти знания необходимы для дальнейшего определения их роли в патологии сельскохозяйственной птицы, а также для изучения патогенеза болезни. Данный тест можно использовать и как дополнительный метод бактериологической диагностики при постановке первичного диагноза на микоплазмоз.

5.4. Изучение чувствительности и специфичности предлагаемых средств бактериологического и серологического экспресс-методов при экспериментальном микоплазмозе кур

Для моделирования ассоциативной формы респираторного микоплазмоза была изучена патогенность 19 штаммов микоплазм, выделенных от больных кур. Биопробу ставили на развивающихся 9-суточных куриных эмбрионах (по 10 на каждую культуру). С этой целью 0,2 мл бульонной культуры вводили в хориоалантоисную полость. Эмбрионам контрольной группы вводили равное количество стерильного физиологического раствора. Отверстия в скорлупе заливали парафином. Эмбрионы инкубировали в лабораторном инкубаторе ИЛУ-Ф-0,3, ежедневно просматривая на овоскопе на жизнеспособность. Гибель до 24 часов считали неспецифичной. Наблюдение проводили в течение 14 дней (до окончания инкубации). Вылупившихся цыплят девитализировали и исследовали патологоанатомически и бактериологически. Для постановки следующего опыта была отобрана наиболее патогенная культура микоплазм М383, вызвавшая гибель 80 % зараженных эмбрионов и вновь реизолированная на питательных средах.

Патогенность культур кишечной палочки изучали на 21-суточных цыплятах кросса «Сибиряк» согласно наставлению по диагностике колибактериоза птиц. Цыплят заражали внутрибрюшинно в дозе $1{,}0\times10^9$ микробных тел на голову. Патогенной считали культуру, вызывающую гибель хотя бы одной головы в течение первых четырех суток после заражения. В опыт была отобрана наименее патогенная культура, вызвавшая падеж одной головы на четвертые сутки, реизолированная и типированная как *E. coli* серотипа 020.

Микоплазменный антиген готовили из трехсуточных культур путем центрифугирования при 6000 g и трехкратного ресуспензирования в стерильном 0,9 %-ном растворе

натрия хлорида до концентрации $3{,}0\times10^{10}$ микробных тел по оптическому стандарту мутности. Для приготовления бактериальной взвеси кишечной палочки использовали суточную агаровую культуру. Колонии смывали со скоса стерильным физиологическим раствором и доводили до концентрации $1{,}0\times10^{9}$ микробных тел в мл по ОСМ ГИСК имени Л.А. Тарасевича.

Мазки из патологического материала окрашивали по Граму и Романовскому-Гимзе.

Для бактериологического исследования использовали три специальные диагностические жидкие и плотные питательные среды для индикации глюкозо- и аргининферментирующих микоплазм и уреаплазм. Для выделения сопутствующей микрофлоры применяли простые и элективные питательные среды: МПА, МПБ, Эндо, висмут-сульфит-агар, Клиглера, агар Симмонса. Биохимические свойства изучали при помощи набора ММТЕ 1.

При серологической диагностике для выделения микоплазм в реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) использовали полученные нами антимикоплазмозные сыворотки крови кроликов. Серотипы кишечной палочки определяли с помощью стандартного набора сывороток. Динамика иммунного ответа изучалась в СКРА с цветным микоплазмозным антигеном ВНИИЗЖ и ИФА наборами BioChec (чтение реакции проводили на ридере ELx800).

Опыт проводился в виварии отдела ветеринарии ГНУ СибНИИП. Для проведения опыта было сформировано 4 группы 21-дневных цыплят-бройлеров кросса «Сибиряк» по 20 голов в каждой (табл. 5.12). Перед заражением все цыплята были обследованы серологически с цветным микоплазмозным антигеном и клинически (с суточного возраста цыплята содержались в условиях вивария).

Таблица 5.12

Схема заражения цыплят

№ группы	Кол-во голов	Доза заражения, м. т.		Вакцинация
		M. gallisepticum	*E. coli*	
1-я контрольная (интактная)	20	-	-	+
2-я контрольная (зараженная Е. с.)	20	-	$1{,}0\times10^9$	+
3-я контрольная (зараженная M.g.)	20	$3{,}0\times10^{10}$	-	+
4-я опытная	20	$3{,}0\times10^{10}$	$1{,}0\times10^9$	+

Примечание: м. т. – микробных тел; M.g. – *M. gallisepticum*; Е.с. – *E. coli*.

Суспензию микоплазм вводили в дозе $3{,}0\times10^{10}$ микробных тел в грудной воздухоносный мешок на глубину не более 0,5–0,6 см между 1–3-м ребрами на расстоянии 1,5–2 см от позвоночника.

Взвесь клеток кишечной палочки вводили внутрибрюшинно по общепринятой методике в дозе $1{,}0\times10^9$ микробных тел в мл. Заражение проводили по схеме (см. табл. 5.12). Одновременно с заражением птицу вакцинировали интранозально десятикратной дозой вакцины против ньюкаслской болезни птиц из штамма «Ла-Сота» согласно инструкции и плану противоэпизоотических мероприятий.

Ежедневно учитывали сохранность опытной птицы, при наличии падежа проводили патологоанатомическое и бактериологическое исследование. Раз в неделю проводили исследование сыворотки крови в СКРА и ИФА.

На следующий день после заражения во 2-й группе (заражение *E. coli*) отмечалось угнетение, отказ от корма, которые полностью прошли через неделю. В этой группе пало две головы на пятые сутки после заражения. На вскрытии были обнаружены характерные для колибактериоза изменения (фибринозный перикардит, фибринозный перигепатит). При бактериологическом исследовании была выделена культура кишечной палочки, по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам аналогичная исходной.

В 4-й группе также отмечались угнетение и отказ от корма, а на четвертый день появились хрипы. На седьмой день после за-

ражения пало 4 головы. При вскрытии обнаружены фибринозный перикардит, перигепатит, фибринозный аэросаккулит и одно- двухсторонняя очаговая пневмония. При бактериологическом исследовании были выделены культуры микоплазм и кишечной палочки, а также в одном случае диплококка. В 1 и 3-й группах падежа и видимых клинических проявлений не отмечалось.

На 22-й день после заражения провели убой всей оставшейся птицы. При вскрытии определяли наличие и характер патологоанатомических изменений, делали мазки-отпечатки и проводили посев на общеупотребительные и специальные среды.

Данные результатов патологоанатомического и бактериологического исследований представлены в табл. 5.13. При вскрытии птицы 1-й группы видимых патологоанатомических изменений не обнаружено. При бактериологическом исследовании в двух случаях (10 %) были выделены культуры диплококков и в одном случае (5 %) – кишечная палочка.

Таблица 5.13

Изучение чувствительности и специфичности испытуемых жидких и твердых питательных сред по показателям роста микоплазм в опыте на цыплятах

№ группы	Питательные среды						
	Общепринятые, стандартные: МПБ, МПА, Эндо и др.	Испытуемые					
		жидкие			плотные		
		Г	А	У	Г	А	У
1	D. spp., *E. coli*	-	-	-	-	-	-
2	*E. coli, S. aureus, P. vulgaris*	-	-	-	-	-	-
3	*D. spp*.	M. g.	-	-	M. g.	-	-
4	*E. coli, C. freundii*	M. g.	-	-	M. g.	-	-

Примечание: Г – среда для индикации глюкозоферментирующих микоплазм; А – среда для индикации аргининферментирующих микоплазм; У – среда для индикации уреаплазм; «–» – отсутствие роста на питательных средах; M. g. – *M. gallisepticum*.

На вскрытии у цыплят 2-й группы (заражение кишечной палочкой) отмечали поражения сердца и печени, характерные для хронического течения. Культуры кишечной палочки были выделены от 18 голов (90 %), от одной головы в ассоциации со стафилококком и от одной головы была изолирована культура *Proteus vulgaris*.

У птицы 3-й группы на вскрытии отмечали уплотнение грудных воздухоносных мешков (у одной головы с наложением фибрина), очаги воспаления в легких, атрофию селезенки. Культуры микоплазм изолированы от 16 голов (80 %), при этом в четырех случаях в ассоциации с диплококком.

На вскрытии цыплят, зараженных ассоциацией «микоплазма + кишечная палочка», отмечали поражения, характерные для микоплазмоза и колибактериоза. При бактериологическом исследовании исходные культуры были изолированы от 17 голов (85 %).

При исследовании сыворотки крови в СКРА на восьмой день четкая положительная реакция отмечалась у птицы в 3 и 4-й группах, тогда как в 1 и 2-й на протяжении всего опыта положительно реагирующих не было (табл. 5.14). Полученные данные были подтверждены также методом иммуноферментного анализа. При этом титры антител повышались с 140 на 28-й до 1421 на 42-й день в 3-й и с 89 до 1248 – в 4-й группах (табл. 5.15).

Таблица 5.14

Показатели чувствительности и специфичности испытуемых микоплазмозных сывороток в РНИФ в опыте на цыплятах

№ группы	Серологическое исследование патологического материала			
	Специфические сыворотки			
	M. gallisepticum	*E. coli*	*S. aureus*	*P. mirabilis*
1	-	+	-	-
2	-	+	+	+
3	+	-	-	-
4	+	+	-	-

Примечание: «+» – положительная реакция; «-» – отрицательная реакция.

Таблица 5.15

Изучение динамики иммунного ответа у экспериментально зараженной птицы

№ группы	Возраст птицы, дни							
	21		28		35		42	
	СКРА	ИФА	СКРА	ИФА	СКРА	ИФА	СКРА	ИФА
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	+	140	+	1309	+	1421
4	-	-	+	89	+	868	+	1248

Таким образом, экспериментальные, специальные диагностические питательные среды для индикации и идентификации микоплазм и уреаплазм обладают высокой чувствительностью в отношении данных микроорганизмов и специфичностью, которая выражена в ингибиции роста других микробов, находящихся в ассоциации вместе с микоплазмами. При этом результаты исследования в РНИФ совпадают с показателями бактериологического исследования подтверждаются серологическими методами и являются высокочувствительными специфичными методами диагностики микоплазмозной инфекции.

5.4.1. Чувствительность, специфичность и диагностическая ценность усовершенствованных бактериологического и серологического экспресс-методов диагностики ассоциативного респираторного микоплазмоза птиц в производственных условиях

Испытание предлагаемых методов диагностики проводили в ОНО ЭПХ СибНИИП на мясной птице разных половозрастных групп. Материалом для бактериологического исследования служили соскобы со слизистой оболочки гортани, а от петухов дополнительно исследовалась сперма. Исследования сыворотки проводили методом СКРА, применяемым в производстве для контроля эпизоотической ситуации по респираторному микоплазмозу птиц. Исследование проводилось по схеме, состоящей из четырех этапов (рис. 5.8):

1) определение тинкториальных свойств микроорганизмов-ассоциантов в мазках с патматериала;

2) изучение антигенной структуры микоплазм и сопутствующей микрофлоры в РНИФ;

3) индикация микоплазм и сопутствующей микрофлоры бактериологическим методом;

4) идентификация возбудителей, участвующих в ассоциативном инфекционном процессе.

Методика взятия биоматериала. Взятие крови для серологического исследования проводили из подкрыльцовой вены по общепринятой методике. Соскоб со слизистой оболочки гортани брали стерильным хирургическим полым зондом. Содержимое зонда смывали в транспортную среду, предложенную НИИПИ (Н.В. Рудаков).

Параллельно с посевом делали три нативных мазка со слизистой оболочки гортани. Для этого на край чистого без царапин предметного стекла наносили каплю физиологического раствора. Затем стерильным полым хирургическим зондом делали соскоб со слизистой оболочки и переносили в физиологический раствор на предметное стекло, после чего вторым предметным стеклом проводили под углом 45° по поверхности первого стекла, в результате получался равномерный мазок по всей поверхности стекла. При исследовании павшей или вынужденно убитой птицы делали по три мазка-отпечатка с пораженных органов.

Рис. 5.8. Схема индикации и идентификации микоплазм из биоматериала

Определение тинкториальных свойств микроорганизмов-ассоциантов в мазках с патматериала. Для окраски по Граму микоплазмы окрашивались грамотрицательно и имели вид кокков, овоидов красного цвета. Остальная микрофлора респираторного тракта представляла собой сочетания грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов шаровидной или палочковидной формы. При окраске по Романовскому-Гимзе микоплазмы обнаруживали в цитоплазме слущенных эпителиальных клеток, макрофагов и внеклеточно, которые окрашивались в красно-фиолетовый цвет и были полиморфны.

Индикация микоплазм и сопутствующей микрофлоры бактериологическим методом. Биоматериал, помещенный в транспортную среду, через сутки центрифугировали при 3000 g в течение 15 минут. Надосадочную жидкость пересевали на три жидкие диагностические среды для индикации глюкозо- и аргининферментирующих микоплазм и уреаплазм, разлитые в стерильные бактериологические пробирки по 2 мл.

Осадок после центрифугирования пересевали на простые и элективные среды (МПА, МПБ, Эндо, ВСА и т.д.) для выделения чистых культур сопутствующей микрофлоры. Изучение биохимических свойств проводили с помощью тест-системы ММТ Е1 с последующей идентификацией по прилагаемому ключу.

При наличии роста на жидких микоплазмозных диагностических средах, определяемого по изменению цвета индикатора, делали пересевы на обычные питательные среды (МПА, МПБ) для проверки на бактериальную загрязненность, а также на плотные микоплазмозные диагностические среды с содержанием 1,3% агара Дифко с соответствующими субстратами ферментативной активности. Для приготовления плотных сред использовали сухие диагностические среды для индикации глюкозо- и аргининферментирующих микоплазм и уреаплазм.

Поверхность плотных питательных сред просматривали при малом увеличении микроскопа (×56-100). При обнаружении типичных колоний их вместе с агаровым блоком отсевали на жидкие специальные питательные среды с соответствующим субстратом ферментативной активностью. При отсутствии роста проводили 3–5 последо-

вательных слепых пассажа, и если в течение этого времени индикаторная среда не изменяла цвет, то считали, что микоплазмы погибли при пересевах.

Для исключения L-форм бактерий проводили 3–5 последовательных пассажей выделенных культур с трехсуточными интервалами на транспортной среде без ингибиторов для восстановления исходных форм бактерий. После выделения чистых микоплазмозных культур, проводили видовую идентификацию на основании: культурально-морфологических, биохимических, гемолитических и серологических показателей.

Изучение культурально-морфологических свойств микоплазм. На жидких диагностических средах учитывали изменение цвета, прозрачность, наличие осадка. На плотных средах учитывали скорость роста микроорганизмов, вид колоний, которые были круглой формы с глубоко врастающим в агар центром и зернистой периферией. Кроме того, выявляли мелкие, зернистые колонии без особо выраженной центральной зоны (рис. 5.9). Скорость роста и образования типичных колоний зависит от особенностей выделенной культуры, количества микробных клеток и от степени адаптации данной культуры к среде, на которую ее пересеяли. Некоторые культуры росли на жидких питательных средах лучше, чем на плотных, и наоборот.

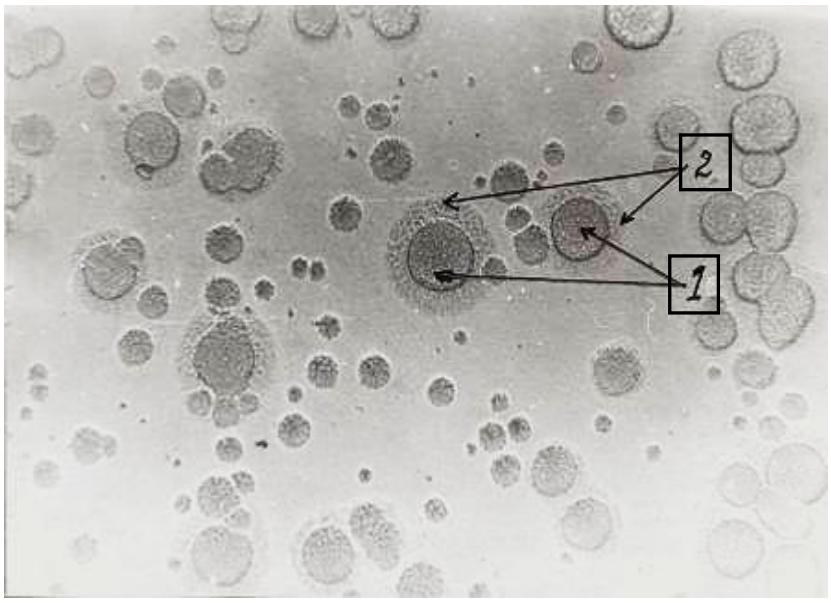


Рис. 5.9. Колонии изолята Mg11 (х 100 раз):
1 – вросший в агар центр колонии; 2 – периферийная зона роста

Для учета титра микоплазм использовали подсчет колонии образующих единиц (КОЕ) в 1 мл 10-кратных разведений исходной культуры.

Результаты учитывали подсчетом колоний на поверхности агара, допуская, что каждая колония получена из одной клетки, методом титрации цветообразующей единицы (ЦОЕ), для чего готовили 10-кратные разведения микоплазм на жидкой индикаторной среде. Инкубировали в термостате при 37 ^{0}С в течение трех суток. Наибольшее разведение микоплазм, при котором изменялся цвет среды, рассматривали как конечную точку титрации, содержащую одну ЦОЕ.

Для детального изучения морфологии колоний готовили их отпечатки на стеклах. Агаровый блок размером 1х1 см помещали колониями на предметное стекло, слегка придавливали и опускали под углом 45º в воду, нагретую до 90 ºС. Агар расплавлялся, сползал, а колонии фиксировались на стекле. Полученные отпечатки высушивали на воздухе, окрашивали краской Романовского-Гимзе и микроскопировали.

Для изучения тинкториальных и морфологических свойств микоплазм из капли 72-часовой бульонной культуры микоплазм готовили мазки, высушивали на воздухе, фиксировали метиловым спиртом в течение 5 минут и окрашивали неразведенной краской Романовского-Гимзе в течение 4–7 часов при комнатной температуре. Мазки промывали и просматривали под иммерсионной системой микроскопа. Клетки микоплазм были преимущественно кокко-овоидно-перстеневидной формы размером 0,3–0,5 мкм розово-фиолетового оттенка. Иногда встречались и фиолетовые шары размером 3–6 мкм, образования синего цвета величиной 2 – 6 мкм, скопления зернистости и гомогенной массы с синеватым оттенком, в которые заключены микроструктурные элементы.

Изучение ультраструктуры микоплазмозных клеток проводили в ультратонких срезах, приготовленных по ранее описанной методике. При просмотре срезов обращали внимание на форму микоплазм, которая обычно была округлой, овальной, иногда в

виде ракетки. Оболочка не имела клеточной стенки, представляла собой трехслойную цитоплазматическую мембрану, два слоя осмиофильных и один между ними осмиофобный (рис. 5.10). Внутренняя структура была представлена сильно контрастированным нуклеотидом и зернистыми тяжами, микрофибриллами, рибосомными, полисомными структурами.

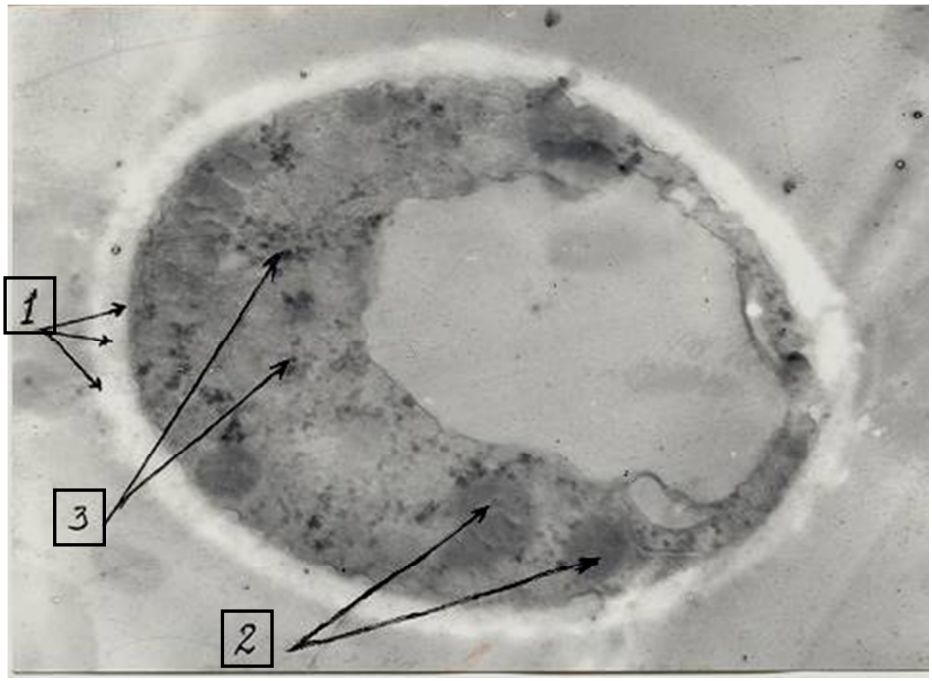


Рис. 5.10. Ультраструктурное строение микоплазменной клетки (х 20 000 раз): 1 – трехслойная мембрана; 2 – ядерный материал; 3 – рибосомы и полисомы

Изучение биохимических свойств микоплазм. При выделении микоплазм на жидких специальных диагностических средах производили дифференциацию по главному биохимическому признаку: ферментация глюкозы, аргинина, мочевины. Поэтому для видовой идентификации микоплазм были дополнительно изучены фосфотазная активность, редукция тетразола, гемолиз эритроцитов.

Для определения фосфатазной активности на агаровые пластины, содержащие 0,01 %-ный фенолфталеиндифосфат натрия, высевали культуры исследуемых штаммов, которые инкубировали в течение 5–7 дней. Агаровую среду при наличии колоний заливали 5-молярным раствором едкого натра, по 1–2 мл на пластинку. Появление розового или красного окрашивания через

30 секунд после добавления щелочи, указывало на фосфатазную активность микоплазм.

Способность редуцировать 0,5 %-ный водный раствор 2, 3, 5-трифинилтетразолилхлорида определяли на жидких средах, к которым добавляли его и вносили трехсуточную культуру микоплазм. Результаты проб учитывали в течение 7–10 дней инкубации в термостате при 37 ^{0}С. Положительная реакция – окрашивание среды в красный цвет.

Гемолитическую активность микоплазм изучали на плотной диагностической среде, к которой добавляли 5 %-ную суспензию эритроцитов кур. На указанную среду высевали трехсуточную культуру микоплазм и инкубировали при 37 ^{0}С. Ежедневно просматривали культуру микоплазм, отмечая зону гемолиза вокруг колоний.

Идентификацию культур микоплазм осуществляли на основании проведенных исследований, пользуясь микоплазмозным ключом (табл. 5.16).

Таблица 5.16

Биохимические свойства микоплазм, выделенных от кур

Виды (серотип) микоплазм	Рост в бульоне без сыворотки	Опалесценция в бульоне	Ферментация глюкозы	Ферментация аргинина	Редукция тетразола	Гемолитическая активность	Морфология	Патогенность для куриных эмбрионов
M. gallisepticum	-	+	+	-	+	+	Коккоиды	+
M. synoviae	-	+	+	-	+	+		+
M. gallinarum	-	+	-	+	+	±	Полиморфные образования	-
A. laidlawii var. inocum	+	+	+	-	+	-		-

Примечание: «+» – наличие признака; « - » – отсутствие признака; « ± » – признак вариабельный.

Изучение патогенных свойств микоплазм. Для изучения патогенных свойств выделенных культур микоплазм использовали 7–9-суточные куриные эмбрионы, полученные из хозяйств, благополучных по респираторному микоплазмозу по вышеописан-

ной методике. Гибель эмбрионов в первые 24 часа после инокуляции возбудителя считали неспецифичной.

Биопробу считали положительной при гибели 50 % зараженных эмбрионов. Из 19 исследованных культур, выделенных в ОНО ЭПХ СибНИИП, патогенными оказались 5, при этом гибель зародышей отмечали на 3–5-е сутки; 5 культур оказались слабо патогенными (гибель 20–30 % зараженных эмбрионов на 2–6-е сутки).

По описанной схеме нами было проведено исследование биоматериала от 424 цыплят-бройлеров, 427 кур-несушек и 112 петухов. Результаты проведенных лабораторных исследований представлены в табл. 5.17–5.18.

Таблица 5.17

Показатели чувствительности бактериологического метода диагностики респираторного микоплазмоза

Возрастная группа	Кол-во проб	*Рост на питательных средах*					
		Жидкие			Плотные		
		Г	А	У	Г	А	У
Цыплята	424	180/42,5	-	2/0,5	164/38,7	-	2/0,5
Куры	427	192/45	1/0,2	-	187/43,8	-	-
Петухи	112	55/49	-	-	46/41	-	-

Примечание: Г – среда для индикации глюкозоферментирующих микоплазм; А – среда для индикации аргининферментирующих микоплазм; У – среда для индикации уреаплазм; «–» – отсутствие роста на питательных средах; в числителе – количество выделенных культур, в знаменателе – процент от числа проведенных исследований.

Таблица 5.18

Изучение структуры сочленов при ассоциативном течении респираторного микоплазмоза в производственных условиях в РНИФ

Возбудитель	Возрастная группа		
	Цыплята	Куры	Петухи
M. gallisepticum	180/42,5	234/54,8	78/69,6
Escherichia coli	182/42,9	162/37,9	62/55,4
Streptococcus albus	-	34/7,9	-
Staphilococcus aureus	-	-	-
Proteus vulgaris	46/10,6	58/13,5	-
Diplococcus spp.	38/9	-	26/23

Примечание: в числителе – количество выделенных культур, в знаменателе – процент от числа проведенных исследований; «–» – отрицательная реакция.

По результатам исследований, представленным в таблицах, установлено, что предложенные методы достаточно эффективны и информативны в отношении микоплазмозной инфекции. Так, на специальных питательных средах для выделения микоплазм и уреаплазм рост сопутствующей микрофлоры ингибируется без отрицательного влияния на рост микоплазм. При этом индикация на жидких средах была параллельно подтверждена результатами роста на плотных средах (табл. 5.19). С помощью РНИФ удалось дополнительно выявить 23 петуха-микоплазмоносителя, при этом микоплазмы были выделены не только из слизистой гортани, но и из спермы, что определяет роль инфицированных петухов в распространении микоплазмоза внутри стада. Также были определены основные ассоциации микроорганизмов: *M. gallisepticum* + *E. coli, M. gallisepticum* + *P. mirabilis, M. gallisepticum* + *Diplococcus, M. gallisepticum* + *E. coli* + *Diplococcus,* при этом чаще выделяли ассоциацию микоплазмы с кишечной палочкой (45 %).

Таблица 5.19

Изучение диагностической ценности бактериологического и серологического методов диагностики ассоциативного микоплазмоза птиц в производственных условиях

Возбудитель			*M. gallisepticum*	*E. coli*	*S. albus*	*P. mirabilis*	*Diplococcus*
Цыплята	Выделено культур, %	Г	42,5	-	-	-	-
		А	-	-	-	-	-
		У	0,5	-	-	-	-
	Выделено серологически, %	СКРА	30,2	н/и	н/и	н/и	н/и
		РНИФ	42,5	42,9	-	10,6	9,0
Куры	Выделено культур, %	Г	45,0	-	-	-	-
		А	0,2	-	-	-	-
		У	-	-	-	-	-
	Выделено серологически, %	СКРА	85,7	н/и	н/и	н/и	н/и
		РНИФ	54,8	37,9	7,9	13,5	-
Петухи	Выделено культур, %	Г	49,0	-	-	-	-
		А	-	-	-	-	-
		У	-	-	-	-	-
	Выделено серологически, %	СКРА	23,2	н/и	н/и	н/и	н/и
		РНИФ	69,6	55,4	-	-	23,0

При исследовании цыплят и петухов число зараженных микоплазмами, выявленных РНИФ, было на 12,3–46,4 % больше, чем в СКРА, тогда как при исследовании кур картина была обратной. По-видимому, это объясняется слабой иммуногенностью микроорганизмов и пониженной иммунореактивностью макроорганизма, стадийностью антителогенеза и индивидуальными особенностями организма птицы, а также возможными неспецифическими реакциями при постановке реакции агглютинации.

При сравнении бактериологического и серологического методов видно, что результаты данных исследований не всегда соответствуют друг другу. Так, чувствительность РНИФ соответствовала результатам бактериологических исследований или была выше.

Таким образом, использование предлагаемых серологического и бактериологического методов способствует уточнению и повышению достоверности диагностики ассоциативного микоплазмоза птиц.

5.5. Экспериментальный респираторный микоплазмоз кур, ассоциированный с эшерихиозом

Исследования при спонтанном заражении цыплят респираторным микоплазмозом, ассоциированным с эшерихиозом, не позволили изучить динамику клинико-морфологических изменений и иммунологических параметров крови цыплят-бройлеров, а также выявить патоморфологические изменения в органах иммунной системы (тимуса, фабрициевой бурсы, селезенки и печени). Исходя из этого возникла необходимость в экспериментальном воспроизведении ассоциированного течения респираторного микоплазмоза с эшерихиозом у цыплят-бройлеров, что позволило установить клинические проявления и степень выраженности патологических изменений в динамике инфекционного процесса.

5.5.1. Клинические признаки и патолого-анатомические изменения

При экспериментальном воспроизведении ассоциированного течения респираторного микоплазмоза с эшерихиозом у цыплят установлено, что инкубационный период составил 6–18 часов.

Клиническое проявление болезни в начальный период характеризовалось общим угнетением, отказом от корма, тяжелым дыханием, взъерошенным оперением, скучиванием птицы небольшими группами. В дальнейшем угнетение усиливалось, птица не реагировала на раздражитель, наблюдалось расстройство пищеварения, дыхания. При спонтанном заражении у цыплят наблюдали сходные, но менее выраженные клинические признаки. В проведенном эксперименте гибель птицы начиналась через 8 часов после заражения и длилась до восьми дней. На 3–4-й день после заражения отмечали одно- или двусторонний ринит, одышку, трахеальные хрипы, а на 9-й день общее состояние несколько улучшалось, хрипы ослабевали. Через 12 дней после заражения состояние птицы было удовлетворительным, хрипы отсутствовали. Основные изменения при сочетанной болезни отмечали в сердце, легких, воздухоносных мешках, печени, селезенке, кишечнике, почках.

В первые 20 часов после заражения у погибших цыплят наблюдали множественные кровоизлияния в подкожной клетчатке, на серозных оболочках внутренних органов, внутренней поверхности грудной кости. Отмечали катаральное воспаление слизистой оболочки кишечника, его сосуды были переполнены кровью. Воспалительные процессы в легких отмечались уже через 8 часов после заражения в виде уплотненных очагов темно-красного цвета, с поверхности разреза пораженного участка стекала мутная жидкость, в последующем воспалительный процесс охватывал весь орган. Как правило, наблюдали двухстороннюю крупозную пневмонию на протяжении 10–12 дней после заражения. Легкие при этом были темно-красного цвета, уплотненные (рис. 5.11). В ряде случаев на фоне такого легкого выявлялись

серые, более плотные участки. К 21-му дню после заражения изменения на макроуровне не наблюдались.

Поражение воздухоносных мешков характеризовалось серозно-фибринозным или фибринозным аэросаккулитом. Стенка воздухоносных мешков тусклая, уплотненная, с наложением фибрина. В первую очередь (через два дня после заражения) наблюдали поражение брюшных воздухоносных мешков с одновременным развитием перитонита (рис. 5.12– 5.13).

Позже, на 7–8-й день заболевания, воспалительному процессу подвергались и грудные воздухоносные мешки. Изменения, выявленные в сердце со 2-го по 14-й день после заражения, можно охарактеризовать как серозный, серозно-фибринозный или фибринозный перикардит (рис. 5.14–5.15). На 21-й день отмечали остаточные явления фибринозного перикардита (рис. 5.16).

При исследовании печени в первые 7–8 дней эксперимента наблюдали полнокровие органа и увеличение его в объеме по сравнению с интактной группой, на капсуле органа выявляли легко снимающиеся серозно-фибринозные наложения различной толщины серо-белого цвета (см. рис. 5.12, 5.15). К 21-му дню после заражения наблюдали остаточные явления фибринозного перигепатита: на капсуле печени творожистой консистенции фибрин, который снимался с трудом.

Патологоанатомические изменения в селезенке в первые 7–8 дней характеризовались кровенаполнением, увеличением органа в объеме в 1,5–2 раза. В дальнейшем селезенка была дряблая или тестоватой консистенции, серовато коричневого цвета с кровоизлияниями под капсулой.

В почках под капсулой наблюдали очаги некроза на фоне серовато-красной паренхимы органа. Почки увеличены, в ряде случаев под капсулой отмечали кровоизлияние.

Изменения в кишечнике можно охарактеризовать как катаральный и, в отдельных случаях, геморрагический энтерит (рис. 5.17). В тимусе характерных изменений на макроуровне не

выявлено, за исключением уменьшения его в размерах. Фабрициева бурса также уменьшена в размерах по сравнению с таковой в интактной группе на всем протяжении опыта.

5.5.2. Динамика морфометрических показателей органов иммунной системы цыплят

При изучении массы цыплят контрольной группы на протяжении всего опыта наблюдали общую тенденцию равномерного развития (табл. 5.20).

Таблица 5.20

Изменение массы цыплят в возрастном аспекте (г) (M±m)

Возраст (после заражения), дней	Группа	
	интактная	опытная
22 (1)	491,0±15,03	375,0±11,51*
28 (7)	659,0±6,78	500,0±35,12*
35 (14)	994,0±22,27	830,0±25,26*
42 (21)	1410,0±61,56	835,0±35,0*

* P<0,05.

Масса цыплят опытной группы была достоверно ниже (P<0,05) интактной на протяжении всего опыта. Наибольшее отставание (на 41 %) отмечали в возрасте 42 дней (через 21 день после инфицирования).

Морфометрические показатели тимуса (табл. 5.21) в контрольной группе указывали на постепенное увеличение абсолютной массы органа с 2,85±0,14 г в возрасте 22 дней до 8,12±0,72 г в 42 дня. В тоже время относительная масса органа находилась в пределах от 0,48±0,16 до 0,69±0,05 %.

Таблица 5.21

Изменения абсолютной и относительной массы тимуса цыплят, (M±m)

Возраст, (после заражения), дней	Группа			
	интактная		опытная	
	абсолютная масса, г	относительная масса, %	абсолютная масса, г	относительная масса, %
22 (1)	2,85±0,14	0,58±0,04	1,22±0,15*	0,34±0,04*
28 (7)	3,97±0,90	0,48±0,16	1,00±0,06*	0,20±0,02*
35 (14)	6,77±0,40	0,69±0,05	3,09±0,3*	0,37±0,05*
42 (21)	8,12±0,72	0,58±0,03	4,51±0,28*	0,54±0,09

* P<0,05.

В отличие от контрольной, у цыплят опытной группы абсолютная масса во всех исследуемых возрастах (через 1, 7, 14 и 21 день после заражения) была достоверно ниже (на 57, 75, 55 и 45 %). Относительная масса тимуса в опытной группе цыплят через 1, 7 и 14 дней после заражения была достоверно ниже (P<0,05), чем в интактной – на 41, 58 и 46 % соответственно (рис. 5.18). Расчеты показали, что тимусный индекс в контрольной группе на протяжении всего опыта был выше (5,8; 4,8; 6,9 и 5,8), чем в опытной (3,4; 2,0; 3,7 и 5,4).

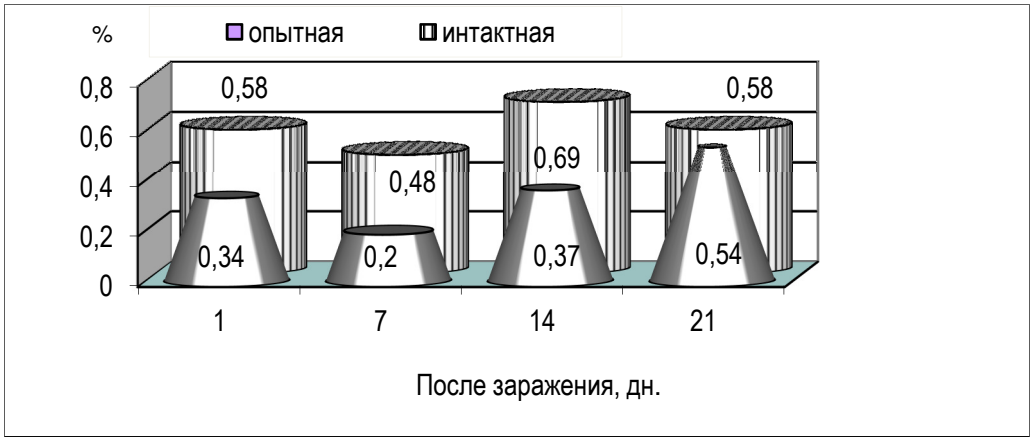


Рис. 5.18. Относительная масса тимуса в динамике инфекционного процесса

Результаты изучения абсолютной и относительной массы бурсы Фабрициуса интактной и опытной групп в возрастном аспекте приведены в табл. 5.22.

Таблица 5.22

Абсолютная и относительная массы бурсы Фабрициуса цыплят (M±m)

Возраст, (после заражения), дней	Группа			
	интактная		опытная	
	абсолютная масса, г	относительная масса, %	абсолютная масса, г	относительная масса, %
22 (1)	1,62±0,32	0,33±0,07	0,64±0,06*	0,18±0,02
28 (7)	2,08±0,14	0,32±0,02	0,50±0,11*	0,10±0,02*
35 (14)	2,90±0,18	0,29±0,02	0,75±0,08*	0,09±0,03*
42 (21)	4,36±0,70	0,31±0,05	0,52±0,08*	0,07±0,02*

*- P<0,05.

Абсолютная масса бурсы у цыплят контрольной группы

увеличивалась пропорционально массе тушки. В то же время отмечали незначительные колебания относительной массы органа в пределах от 0,29±0,02 до 0,33±0,07 %. В опытной группе абсолютная и относительная масса бурсы Фабрициуса была достоверно ниже аналогичных показателей в интактной группе, на всем протяжении опыта (за исключением относительной массы через 1 сутки после заражения). Более выраженные различия были выявлены через 21 день после заражения – на 3,8 г и 0,2 % соответственно (рис. 5.19).

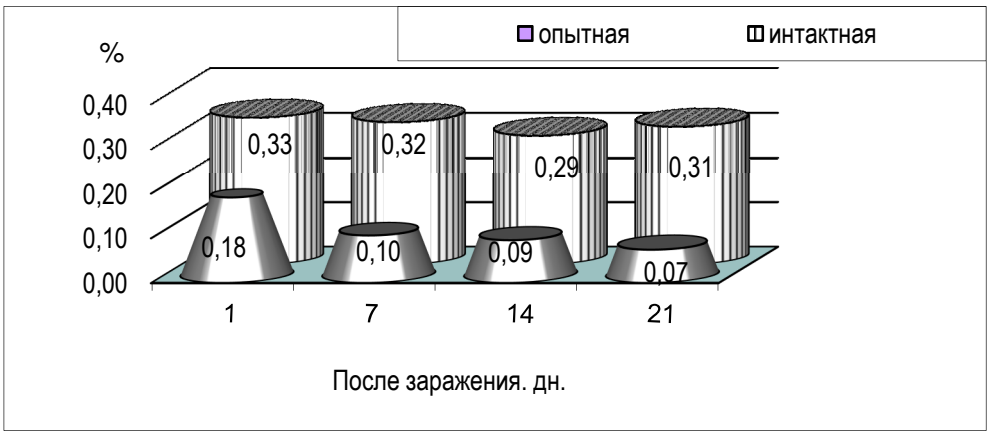


Рис. 5.19. Относительная масса бурсы Фабрициуса в динамике инфекционного процесса

Морфометрические исследования селезенки в контрольной группе на всем протяжении опыта указывают на равномерное развитие органа (табл. 5.23). Относительная масса в 22 дня составляла 0,15±0,02 %, а в 42-дневном возрасте она увеличивалась до 0,22±0,02 %.

Таблица 5.23

Изменение абсолютной и относительной массы селезенки цыплят, (M±m)

Возраст, (после заражения), дней	Интактная		Опытная	
	абсолютная масса, г	относительная масса, %	абсолютная масса, г	относительная масса, %
22 (1)	0,73±0,07	0,15±0,02	1,32±0,05*	0,37±0,01*
28 (7)	1,09±0,11	0,17±0,02	1,02±0,12	0,21±0,03
35 (14)	1,79±0,28	0,18±0,03	1,06±0,15	0,13±0,04
42 (21)	3,14±0,31	0,22±0,02	1,07±0,02*	0,15±0,01*

* P<0,05.

Селезенка у инфицированных цыплят в первые дни после заражения подвергалась значительным изменениям: её абсолютная и относительная массы соответственно в 2,5 и 1,2 раза были выше, чем в контроле. Через 7 дней после начала болезни (в 28-дневном возрасте) относительная масса селезенки превышала контрольную на 24 %. В дальнейшем отмечали тенденцию к уменьшению органа (рис. 5.20). Через 14 и 21 день после заражения абсолютная и относительная массы селезенки были ниже, чем в контрольной, причем через 21 день достоверно (P<0,05).

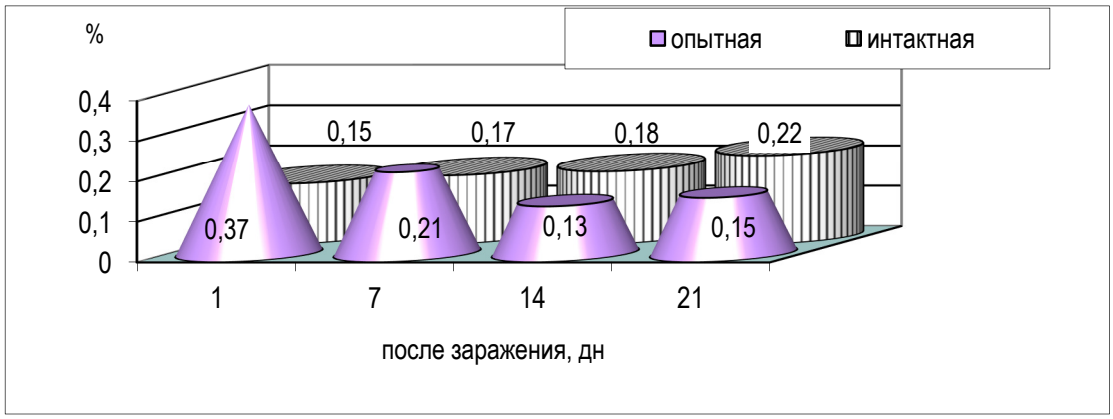


Рис. 5.20. Относительная масса селезенки в динамике инфекционного процесса

Изучение массы печени у цыплят контрольной группы указывает на нормальное развитие органа (табл. 5.24): абсолютная масса печени увеличивалась от 19,58±3,89 г в возрасте 22 дня до 35,35±2,59 г в 42 дня, а относительная в то же время снижалась от 3,65±0,77 до 2,47±0,11 %.

Таблица 5.24

Изменение абсолютной и относительной массы печени цыплят (M±m)

Возраст, (после заражения), дней	Группа			
	интактная		опытная	
	абсолютная масса, г	относительная масса, %	абсолютная масса, г	относительная масса, %
22 (1)	19,58±3,89	3,65±0,77	22,35±0,67	5,96±0,12*
28 (7)	22,21±1,25	3,37±0,18	27,91±2,16	5,65±0,68*
35 (14)	29,32±0,94	2,95±0,09	28,54±0,89	3,44±0,23
42 (21)	35,35±2,59	2,47±0,11	20,41±0,74*	2,79±0,15

* P<0,05.

В отличие от контрольной группы, в опытной отмечали значительные изменения с первых дней после заражения. Относительная масса органа в возрасте через сутки после инфицирования достоверно превосходила контрольную на 63 %, а через 7 дней – на 68 % и составляла 5,96±0,12 и 5,65±0,68 % соответственно. Через 14 дней после заражения отмечали тенденцию к снижению относительной массы печени, в 42 дня её масса приближалась к контрольной и составляла 2,79±0,15 % (рис. 5.21).

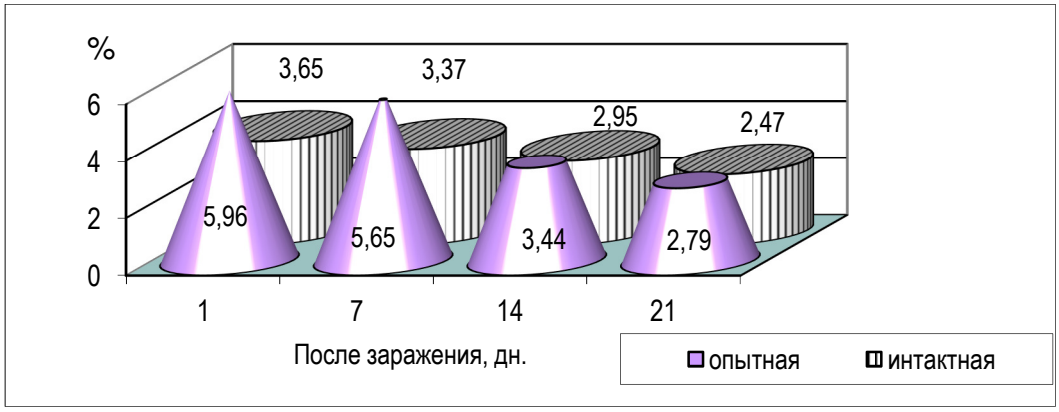


Рис. 5.21. Относительная масса печени в динамике инфекционного процесса

5.5.3. Патолого-гистологические изменения органов имунной системы

Основной целью данного иммуноморфологического исследования было изучение изменений, происходящих в некоторых органах иммунной системы (тимусе и фабрициевой бурсе и селезенке), а также и печени при ассоциативном влиянии на организм птицы *M. gallisepticum* и *E. coli*.

Тимус. При гистологическом исследовании срезов тимуса, окрашенных гемотоксилином и эозином, были выделены следующие изменения. В контрольной группе орган имел тонкую капсулу, хорошо выраженную дольчатость, равномерно развитые соединительнотканые перегородки, четкую границу между слоями. Корковое вещество в различные возрастные периоды всегда преобладало над мозговым. Лимфоциты коркового вещества располагались плотно. Мозговая зона светлее. С 28-дневного возраста часто встречались объединенные дольки, в которых

мозговое вещество 2–3-х долек сливалось вместе, а корковое было разделено трабекулами. По мере развития органа дольки укрупнялись.

Тельца Гассаля хорошо развиты, четко очерчены. В них просматривались процессы физиологического отмирания клеток (рис. 5.22). В медуллярной части долек отмечали скопления эпителиоретикулоцитов с большими ядрами и слабоацидофильной цитоплазмой, вокруг клеток содержалось секретоподобное вещество.

В тимусе цыплят опытной группы через 8 часов после инфицирования дольчатость была хорошо выражена и сохранялась до 7-го дня. Размеры долек по мере развития болезни уменьшались. В междольковых соединительнотканных перегородках появлялись застойная гиперемия, которая усиливалась к концу первых суток после заражения, инфильтрации лимфоидными клетками и периваскулярного отека. К концу опыта отмечали разрастание соединительной и жировой ткани (рис. 5.23, 5.24).

Граница между корковым и мозговым веществом в первые двое суток была отчетлива видна. Через 7 дней после заражения наблюдали частичную инверсию слоев, а к 14 –21-му дню граница не просматривалась.

Корковое вещество в начале опыта было плотное, в то же время отмечали множество клеток, ядра которых распадались на базофильные глыбки (кариорексис). На их месте оставались светлые пустоты, в результате чего корковое вещество имело вид «звездного неба». Через 14 дней после заражения корковое вещество было представлено в виде островков с рыхло лежащими в них лимфоцитами, а на 21-й день лимфоциты полностью мигрируют из коркового вещества. В мозговом веществе тимуса отмечали выраженную застойную гиперемию и кровоизлияния. В начале опыта наблюдали увеличение количества эпителиоретикулярных клеток, а затем формирования на месте тимусных телец кист, содержащих лимфоциты, измененные клетки или продукты их распада (рис. 5.25).

Размеры телец Гассаля сильно варьировали с преобладанием малых (одно-, двухклеточных образований). По мере развития болезни количество лимфоцитов уменьшалось, количество округлых кистозных полостей увеличивалось. Через 7 дней после инфицирования наблюдали неоднородность структуры мозгового вещества, сосуды расширены, их просветы четко определены, на 14–21-й день отмечали усиленную васкуляризацию долек и периваскулярный отек. Вдоль сосудов располагались соединительнотканые клетки (рис. 5.26).

Следовательно, острые циркуляторные расстройства, характерные для первых дней после инфицирования, сменяются нарастающими атрофическими процессами. В тимусе развиваются III и IV степени акцидентальной трансформации, по Н.Г. Колоусовой (1988), с уменьшением долек, исчезновением коркового вещества, перемещением лимфоцитов в мозговое вещество и формированием кист, разрастанием жировой ткани в междольковых прослойках.

Фабрициева бурса. При гистологическом исследовании препаратов фабрициевой бурсы контрольной группы наблюдается общая тенденция ее равномерного развития. Эпителий высокий, ровный, гладкий, с четко выраженным рисунком. Лимфоидные фолликулы располагались компактно, плотно прилегая друг к другу, они имели в основном крупный и средний размер.

Корковое вещество было представлено в виде широких полос, очень плотное, заполнено большими и малыми лимфоцитами. Мозговое вещество состояло из рыхло расположенных малых лимфоцитов, лимфобластов и плазмобластов. Интерфолликулярная ткань была представлена тонкими соединительнотканными прослойками, инфильтрированными единичными лимфоцитами и лимфоидными скоплениями (рис. 5.27).

Лимфоидные скопления, состоящие из малых и средних лимфоцитов и незрелых плазматических клеток, присутствуют и в подэпителиальном слое.

В фабрициевой бурсе цыплят опытной группы выявили ряд

изменений, различающихся в зависимости от срока после заражения культурами *M. gallisepticum* + *E. coli*. Через 8–48 часов после инфицирования цыплят отмечали кровоизлияния в подслизистом слое, резко выраженную застойную гиперемию интерфолликулярной ткани и умеренную гиперемию в базальной мембране фолликулов (рис. 5.28).

Эпителий на всем протяжении опыта в основном был гипертрофирован, особенно на вершинах складок, где уже через 8 часов после заражения появлялись микрокистозные полости, содержащие клеточный детрит (рис. 5.29), а через 48 часов были видны участки слущивания эпителия.

Лимфоидные фолликулы в начале патологического процесса еще довольно крупные и плотно расположены друг к другу. Через 48 часов отмечали незначительное разрастание интерфолликулярной ткани, в последующем, к 7-му дню, оно усиливалось, лимфофолликулы разрозненные, между ними широкие прослойки рыхлой соединительной ткани (рис. 5.30).

Через 14–21 день после заражения атрофия фолликулов и разрастание интерфолликулярной ткани возрастает (рис. 5.31). Граница между корковым и мозговым веществом первоначально не везде хорошо выражена, а к 14–21-му дню после заражения она не просматривается.

Изменения в корковом веществе через 8, 20 часов после заражения не отмечали. Через 48 часов ширина его уменьшалась, и в дальнейшем этот процесс усиливался. К 21-му дню исследования в единичных сохранившихся фолликулах корковый слой представлен разрозненными скоплениями лимфоидных клеток.

Мозговое вещество в начале болезни было представлено рыхло расположенными лимфоцитами и в дальнейшем их количество уменьшалось (рис. 5.32). Через 14–21 день после инфицирования на месте большинства лимфоидных фолликулов образовались кисты. Складки фабрициевой бурсы истончались за счет исчезновения фолликулов и приобретали ветвистую форму (рис. 5.33).

Исследование фабрициевой бурсы в группах разновозрастных цыплят-бройлеров показало, что переболевание респиратор-

ным микоплазмозом в ассоциации с колибактериозом приводит к более ранней инволюции органа и, по морфологическим показателям, к проявлению развития иммунодефицита, который через 14–21 день после заражения можно отнести к пятой степени, по Н.Г. Колоусовой (1988).

Селезенка. На всем протяжении опыта капсула селезенки и структурные элементы органа были хорошо выражены. Белая пульпа представлена периартериальными лимфоидными скоплениями и четко ограниченными лимфоидными фолликулами. Герминативные фолликулы представлены малыми лимфоцитами и бластными клетками. В фолликулах наблюдали активное размножение клеток лимфатического ростка. Светлые центры были хорошо выражены, равномерно распределены по всему органу и представлены рыхлорасположенными лимфобластами. К концу опыта отмечали увеличение количества лимфоидных фолликулов и их размеров.

Красная пульпа умеренно кровенаполнена, наряду с лимфоидными в ней отмечали плазматические клетки. В стенке сосудов пульпарных и трабекулярных сосудов видны умеренные процессы пролиферации эндотелия.

Рассматривая иммуноморфологические изменения у зараженной птицы в динамике, необходимо отметить неравномерное утолщение капсулы органа, особенно в первые 8 дней после заражения. Уже через 20 часов на капсуле просматривались рыхло лежащие нити фибрина, которые в дальнейшем уплотнялись (рис. 5.34).

В подкапсулярном слое на всем протяжении опыта отмечали скопления лимфоидных клеток. Начиная с 14 дня после заражения происходит очаговое разрастание соединительно-тканной стромы в виде отдельных пучков соединительно-тканных волокон вокруг фолликулов. Наиболее ярко оно выражено к 21-му дню исследования.

Через 8 часов после заражения наблюдали ярко выраженную иммуноморфологическую реакцию, которая проявлялась в виде крупноклеточной гиперплазии фолликулов. Лимфоидные

фолликулы – в основном крупные, без четкой границы. В белой пульпе отмечали множество формирующихся лимфоидных фолликулов, состоящих из больших и малых лимфоцитов и плазматических клеток (рис. 5.35). Через 2 дня после заражения отмечали резкое увеличение числа лимфоидных фолликулов разных размеров, которые не имели четких границ, а на 7-й день после заражения просматривались четко ограниченные герминативные фолликулы, их количество и размеры увеличивались. В герминативных фолликулах появлялось большое количество бластных и делящихся клеток. Наряду с этим наблюдали клетки с пикнотичными ядрами. Через 21 день после заражения отмечали множество больших и малых лимфоидных фолликулов, которые располагались ближе к периферии органа. На всем протяжении опыта просматривали, в большей или меньшей степени, периартериальные лимфоидные скопления.

Через 8 часов после заражения в белой пульпе отмечали гиперемию и нарушение проницаемости сосудов, которое характеризовалось периваскулярным отеком и появлением обширных участков плазматического пропитывания тканей в виде однородной бледно-розовой массы. Плазморагии в светлых центрах наблюдали до 7-го дня после заражения (рис. 5.36).

Через 7 дней после заражения кровеносные сосуды были умеренно кровенаполнены, наблюдались набухание и пролиферация клеток эндотелия и отек адвентициальной оболочки.

В начале инфекционного процесса красная пульпа была сильно кровенаполнена, в ней отмечали очаги кровоизлияний (рис. 5.37), а через 7 дней после заражения гиперемия постепенно исчезала.

Таким образом, сравнительное морфологическое исследование селезенки указывает на большую степень выраженности иммунологических и морфофункциональных изменений в органе под влиянием *M. gallisepticum* и *E. coli*.

Печень. При гистологическом исследовании срезов печени цыплят контрольной группы отмечали хорошую выраженность рисунка органа, его дольчатое строение. Печеночные балки четко

обозначены. Они образованы в основном двумя слоями гепатоцитов, ядра которых одинаковой величины равномерно окрашены, хорошо просматривались ядрышки и зерна хроматина. Система триад сформирована не во всех случаях. Лимфоидные фолликулы располагались внутри долек или между долек около кровеносных сосудов или желчных протоков (рис. 5.38).

Изменения в печени у цыплят опытной группы отмечали уже через 8 часов после заражения. В этот период происходило набухание гепатоцитов, разрушение их ядер, вакуолизация цитоплазмы. Ядра имели различную величину, одни слабо окрашеные и находились в стадии лизиса, другие интенсивно окрашенные, уменьшенные в объеме – в стадии пикноза (рис. 5.39).

Через 20 часов после заражения и на протяжении всего опыта балочное строение дольки сохранялось. Ядра гепатоцитов в основном располагались ацентрично, отмечались кариопикноз и кариолизис. Через 7 дней после заражения присутствовали признаки зернистой дистрофии, отмечали увеличение гепатоцитов и вакуолизацию цитоплазмы. Она была набухшая и помутневшая, приобретала зернистый вид, ядра плохо контурированы.

В начальный период заболевания в печени отмечали резкую гиперемию междольковых и центральных сосудов печеночной дольки, в их просвете были видны лейкоциты. Синусоидальные капилляры были заполнены лимфоцитами и клетками крови (рис.5.40). Наблюдали также периваскулярный отек и очаги кровоизлияний. Нарушение проницаемости сосудов отмечали до 14-го дня. В венозном русле наряду с эритроцитами были видны псевдоэозинофилы и единичные эозинофилы. Через 7 дней после заражения наблюдали расширение пространства Диссе, при этом печеночная долька приобретала ячеистый вид (рис. 5.41).

На 7-й и последующие дни после начала заболевания выявляли участки некротизированной ткани, где клетки утрачивали ядра и превращались в бесструктурную эозинофильную массу.

В системе триад отмечали обширные пролиферативные процессы в стенке и вокруг стенок кровеносных сосудов и желчных протоков.

В начальном периоде болезни прослеживали отсутствие лимфоидных фолликулов. Наблюдали скопления рыхло расположенных лимфоцитов, прилегающих к стенке отдельных сосудов, и единичные лимфоциты, которые рассеяны по всему органу. Через 20 часов после заражения и в последующем отмечали морфологические проявления иммунологической реакции: постепенное нарастание пролиферации купферовских (звездчатых) клеток, периваскулярное и перихолангиальное увеличение лимфоидных скоплений.

Через 21 день после заражения наблюдали процесс регенерации паренхимы печени. Цитоплазма гепатоцитов была однородна, ядра хорошо окрашены. В то же время на фоне регенерации сохранялись очаги зернистой дистрофии. Количество очагов некроза снижалось, просматривались единичные некротизированные гепатоциты. К концу опыта иммуноморфологические изменения в печени характеризовались образованием довольно крупных очажковых скоплений лимфоидных клеток в виде фолликулов и периваскулярных скоплений, среди которых имелись и плазмоциты (рис. 5.42).

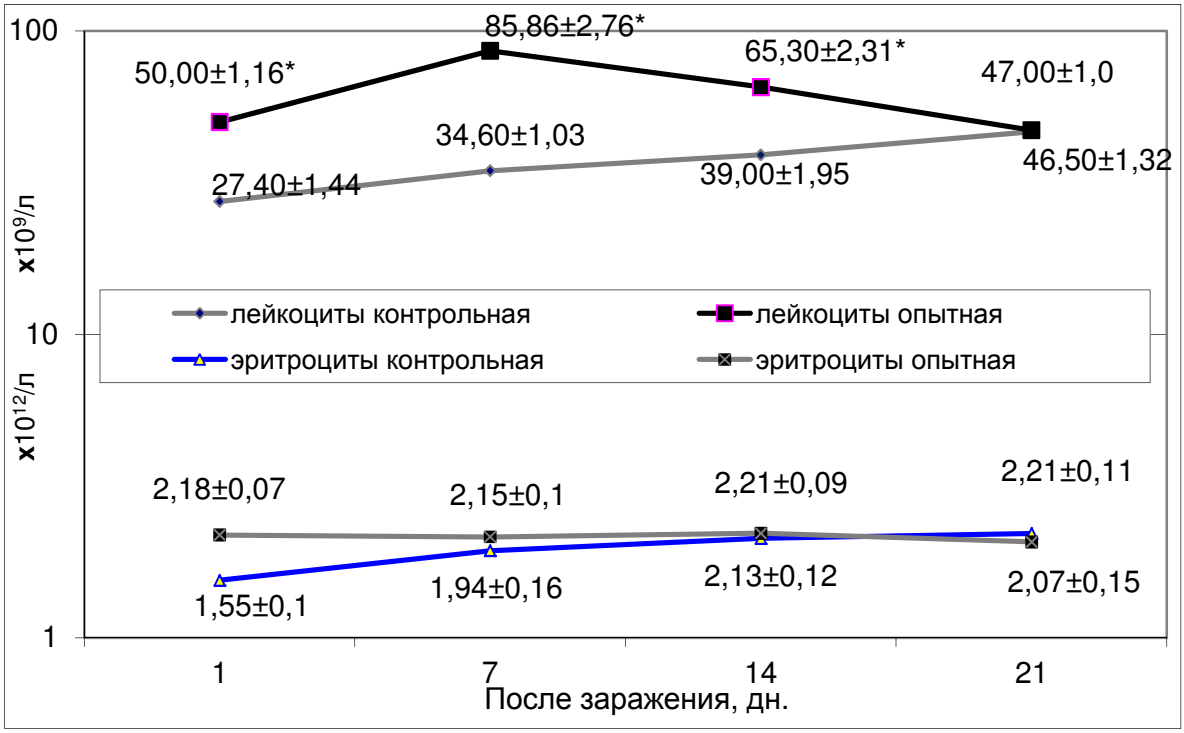
Сравнительное морфологическое исследование печени показало, что у цыплят опытной группы под влиянием культур *M. gallisepticum* и *E. coli* в начале заболевания и в последующем выявлены сосудистые нарушения, которые характеризуются застойной гиперемией, кровоизлияниями и периваскулярным отеком. Установлены зернистая и вакуольная дистрофии, очаги некроза, уменьшение, вплоть до отсутствия, количества лимфоидных образований. В заключительный период прослеживается регенерация структурных и иммунокомпетентных элементов органа.

Сочетание атрофических процессов в тимусе и фабрициевой бурсе с полным отсутствием лимфофолликулов и периартериальных лимфоидных скоплений в печени в начальном периоде заболевания позволяет предположить комбинированную форму иммунодефицита на этом этапе. В то же время в селезенке в этот период происходит активизация иммунных процессов. В дальнейшем в тимусе и фабрициевой бурсе атрофические процессы нарастают, что является причиной развития более ранней инволюции органов и проявления иммунодефицита через 14–21 день после заражения.

5.5.4. Гематологические показатели

Анализируя данные о содержании форменных элементов крови у птицы в контрольной и опытной группах в динамике, необходимо отметить, что количество лейкоцитов у здоровой птицы в разные возрастные периоды и сроки заражения у опытной птицы увеличивается в течение всего периода исследования.

При этом в опытной группе максимальное количество лейкоцитов (85,86±2,7 х 10^9/л) отмечали через 7 дней после заражения, что в 2,48 раза превышало показатели контрольной группы (34,60±1,03 х 10^9/л). Через 14 дней количество лейкоцитов в периферической крови было ниже на 20,56х10^9/л по сравнению с предыдущим периодом, но при этом, оставаясь в 1,7 раза выше контрольной группы, что указывает на снижение интенсивности воспалительного процесса (рис. 5.43). К 21-му дню исследования показатели лейкоцитов в опытной и контрольной группах выравнивались (47,0±1,0 и 46,5±1,32 х 10^9/л).

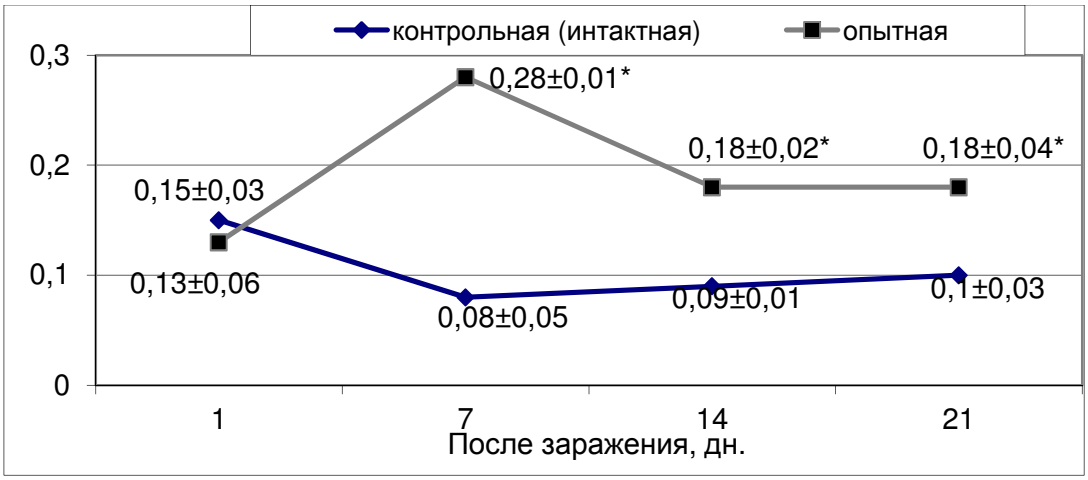


Примечание: * P< 0,05

Рис. 5.43. Количественные показатели лейкоцитов и эритроцитов в динамике развития инфекционного процесса

Также изменялось и количество эритроцитов в единицах объема крови цыплят, так в контрольной группе у интактной птицы с возрастом отмечали рост количества эритроцитов с 1,55±0,10 х 10^{12}/л на 22-й день до 2,21±0,11 х 10^{12}/л на 42-й день (рис. 5.44). В опытной группе через 1 сутки после заражения количество эритроцитов превышало показатели контрольной группы на 0,63 х 10^{12} /л. Анализ лейкоцитарной формулы показал, что у интактных цыплят клетки лимфоидного ряда преобладали на протяжении всего опыта от 66,25±2,09 до 76,40±2,68 %. Количество псевдоэозинофилов находилось в пределах от 15,75±1,6 до 21,6 ±1,56 % с преобладанием сегментоядерных клеток.

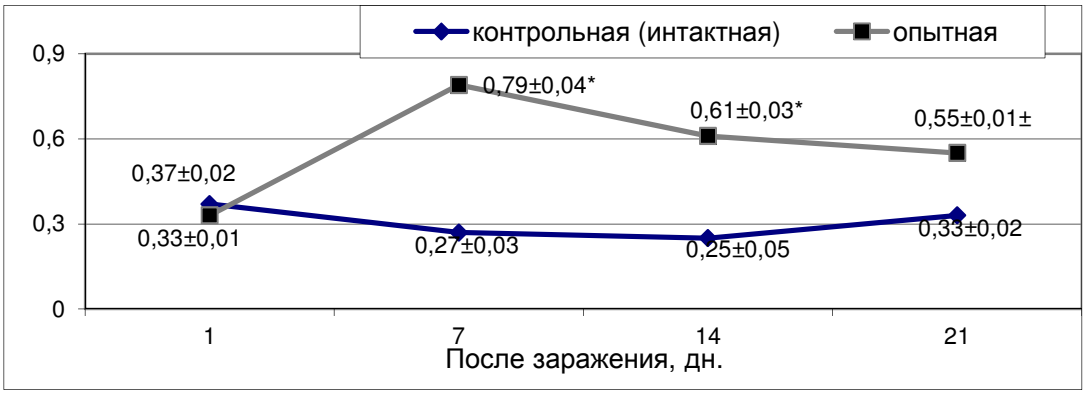
У инфицированных цыплят через 7, 14 и 21 день после заражения отмечали снижение количества лимфоцитов на 24,4, 18,75 и 13,75 % по сравнению со здоровыми. Вместе с тем содержание пседоэозинофилов было выше контрольной группы на 22,33, 13,5 и 8,5 % (со сдвигом ядра влево – 3,0±1,34 % юных псевдоэозинофилов) и эозинофилов на 1,87, 4,25 и 1,5 % по сравнению с интактными (табл. 5.25). Количество моноцитов через 7 дней после заражения снижалось в 3 раза по сравнению с предыдущим периодом (7,2±0,97 %) и увеличивалось через 21 день на 3,75 % по сравнению контролем.



Примечание: * P< 0,05

Рис. 5.44. Лейкоцитарный индекс интоксикации в динамике инфекционного процесса

Через 14 дней после заражения у инфицированных цыплят отмечали увеличение количества базофилов на 4,5 % по сравнению с интактными цыплятами. Лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) через 7 дней после заражения увеличился (в 3,5 раза) по сравнению с контрольной группой (рис. 5.45).



Примечание:* P< 0,05.

Рис. 5.45. Индекс сдвига лейкоцитов крови в динамике инфекционного процесса

Таблица 5.25

Динамика возрастных изменений морфологического состава белой крови у здоровых и инфицированных цыплят-бройлеров

Группа	М	Ю	П	С	Эозинофилы	Моноциты	Базофилы	Лимфоциты
22 дня								
Контрольная (интактная)	0,0±0,0	0,60±0,02	5,60±0,10	15,40±1,08	1,80±0,51	5,80±0,05	3,80±0,60	67,00±1,36
Опытная через 1 дн. после заражения	0,0±0,0	3,00*±0,03	4,80±0,68	13,40±0,2	1,00*±0,01	7,20±0,97	2,00*±0,95	68,60±1,08
28 дней								
Контрольная (интактная)	0,0±0,0	0,00±0,00	1,00±0,01	16,00±0,02	2,80±0,10	2,20±0,80	2,00±0,37	76,40±2,68
Опытная через 7 дн. после заражения	0,0±0,0	0,33*±0,01	7,67*±0,67	31,33*±0,65	4,67±0,87	2,33±1,33	1,67±0,33	52,00*±2,87*
35 дней								
Контрольная (интактная)	0,0±0,0	0,25±0,3	3,00±0,3	12,50±1,02	0,75±0,02	5,25±0,38	1,50±0,03	75,75±3,12
Опытная через 14 дн. после заражения	0,0±0,0	0,00±0,00	5,33*±0,33	23,67*±3,28	5,00*±2,08	3,00*±1,00	6,00*±0,21	57,00*±3,51
42 дня								
Контрольная (интактная)	0,0±0,0	0,00±0,00	2,50±0,65	18,0±2,61	4,00±0,01	5,75±1,03	5,50±0,75	66,25±2,09
Опытная через 21 дн. после заражения	0,0±0,0	0,00±0,00	2,50±0,30	26,5*±2,36	5,50±0,91	9,50*±1,50	3,50*±0,50	52,50±7,50

Примечание: * P< 0,05.

Через 14 дней после заражения у цыплят в опытной группе отмечалось некоторое снижение индекса интоксикации, оставаясь при этом в 2 и 1,8 раза выше по сравнению с интактной группой.

У инфицированных цыплят реакция на инфекционный агент максимально увеличивалась через 7 дней после заражения, индекс сдвига лейкоцитов на этот период был 0,79±0,04. А затем через 14 и 21 день снижался до 0,61±0,03 и 0,55±0,01 соответственно, оставаясь в 2,4 и 1,7 раза выше, чем в контрольной группе.

Увеличенное количество лейкоцитов в единицах объема крови цыплят опытной группы указывает на наличие интенсивно протекающего воспалительного процесса при сочетанном действии *M. gallisepticum* и *E. coli*.

У инфицированных цыплят на протяжении 7–14 дней после заражения отмечался псевдоэозинофильно-эозинофильный тип изменений в клеточном составе «белой» крови, который характеризовался лейкоцитозом, псевдоэозинофильным сдвигом влево, уменьшением содержания лимфоцитов и моноцитов с одновременным повышенным содержанием псевдоэозинофилов. Наблюдаемое увеличенное содержание псевдоэозинофилов у цыплят в опытной группе, возможно, обусловлено воспалительными процессами в результате инфицирования *M. gallisepticum* и *E. coli* и интоксикацией организма продуктами их распада.

Высокий уровень лейкоцитарного индекса интоксикации в опытной группе по сравнению с контрольной приводит к снижению индекса сдвига лейкоцитов крови через 14–21 день после заражения (в возрасте 35–42 дня), что указывает на уменьшение иммунологической реактивности организма цыплят на фоне ассоциированной инфекции, вызванной *M. gallisepticum* и *E. coli*.

5.5.5. Иммунологические показатели крови

В крови цыплят-бройлеров через 1, 7, 14 и 21 день после заражения *M. gallisepticum* и *E. coli* было определено число иммунокомпетентных клеток в абсолютном содержании.

При анализе иммунологических показателей выявлено, что в контрольной группе количество псевдоэозинофилов на протяжении всего опыта было в пределах от 5,92±0,86 до 9,53±0,23х10^9/л (рис. 5.46), а у инфицированных цыплят через сутки после заражения этот показатель превосходит интактных в 2 раза (10,60 ±1,50х10^9/л). Через 7 дней этот разрыв увеличивается до 4,5 раз. В дальнейшем отмечается снижение количества псевдоэозинофилов – на 14-й день исследования – в 1,4 раза от предыдущего периода, в то же время оставаясь выше показателя контрольной группы в 3 раза. К 21-му дню после заражения количество псевдоэозинофилов было близко к контролю (13,63±2,03х10^9/л).

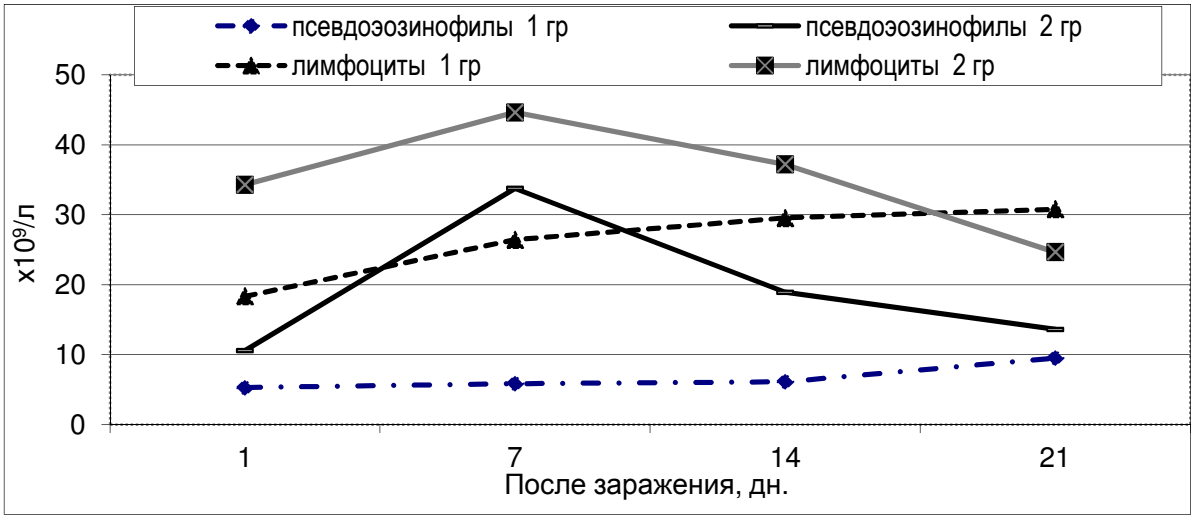


Рис. 5.46. Абсолютное количество псевдоэозинофилов и лимфоцитов в динамике инфекционного процесса

Содержание лимфоцитов у интактных цыплят на протяжении всего опыта увеличивалось от 18,36±3,0 до 30,81±2,98х10^9/л. В опытной группе количество лимфоцитов через сутки после заражения было в 1,9 раза выше, чем в контроле, что составляло 34,30±2,06 х10^9/л, через 7 дней – в 1,7 раза. В последующие периоды исследования наблюдалось снижение количества лимфоцитов в периферической крови и к 21-му дню исследования их на 6,13 х10^9/л меньше, чем у интактных цыплят (рис. 5.47).

При анализе абсолютных величин Т- и В-лимфоцитов, установлено, что количество Т-лимфоцитов у интактных цыплят

на 7-й день исследования превышало первоначальные показатели (3,23±1,03 х10^9/л) в 1,6 раза, а затем достоверно снижалось до 21-го дня исследования (1,91±0,46 х10^9/л). В группе инфицированных цыплят показатели Т-лимфоцитов (2,95±0,24 х10^9/л) через сутки после заражения были практически равны контролю (3,23±1,03 х10^9/л), а затем, увеличиваясь, превосходили на 14-й день после заражения в 1,8 раза, а через 21 день – в 2,5 раза (рис. 5.48).

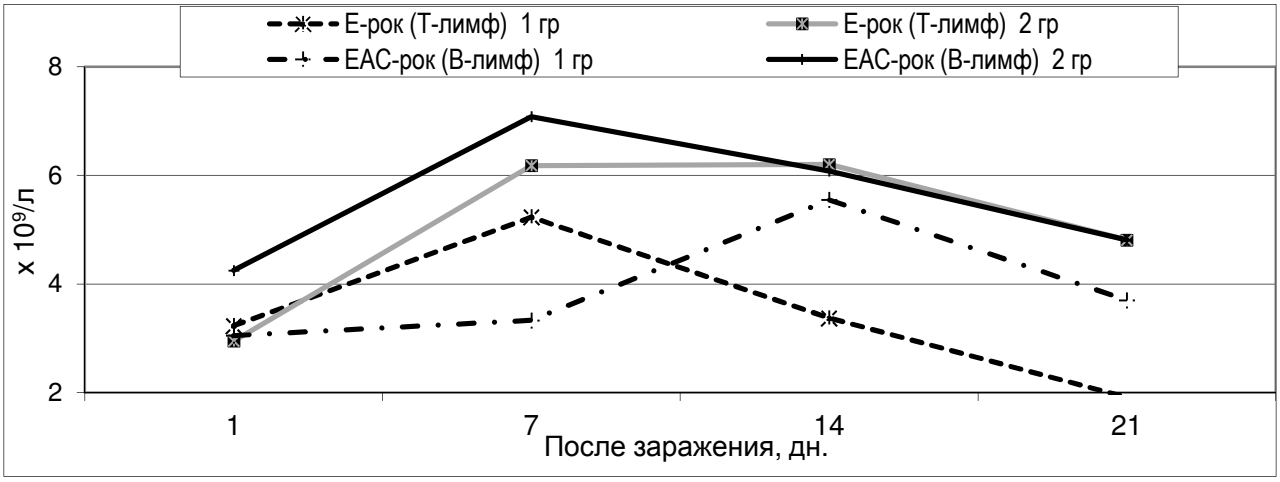


Рис. 5.48. Абсолютное количество Е-рок и ЕАС-рок в динамике инфекционного процесса

В-лимфоциты в контрольной группе на 14-й день исследования были в 1,6 раза выше первоначальных величин, а затем отмечается их снижение, и на 21-й день исследования они составляли 3,7±0,34 х10^9/л. В опытной группе этот показатель через 1 сутки после заражения был несколько выше (4,25±1,26х10^9/л), чем в контроле (3,05±1,42х10^9/л) и в дальнейшем он превышал контрольную группу через 7 и 14 дней после заражения в 2 и 1,8 раза соответственно, а через 21 день он был близок к контролю (4,81±0,93 и 3,7±0,34х10^9/л).

Анализ содержания Т-киллеров показывает, что у интактных цыплят этот показатель достоверно снижается на всем протяжении опыта с 17,42±1,56 до 9,81±1,65 х10^9/л. У инфицированных цыплят через одни сутки после заражения количество Т-киллеров было незначительно ниже, чем у интактных (на 2,19

х10^9/л), а через 7 дней после заражения - в 1,8 раза. Через 14 дней после заражения абсолютное количество Т-киллеров у зараженных цыплят увеличилось в 1,5 раза от предыдущего периода (14,06±1,23 х10^9/л) и было по своим показателям близко к контролю, лишь незначительно их превышая (на 1,64 х10^9/л). К 21-му дню исследования они вновь снижались до 8,93±0,68 х10^9/л (табл. 5.26).

Таблица 5.26

Динамика возрастных изменений содержания иммунокомпетентных клеток у здоровых и инфицированных цыплят

Группа	Абсолютное количество х10^9/л					
	Псевдоэозинофилы	Лимфоциты	Е-рок (Т-лимф)	ЕА-рок (Т-киллеры)	ЕАС-рок (В-лимф)	ЕАГ-рок (Т-антиген-реактивные)
Через 1 день после заражения						
1-я контрольная (интактная)	5,92±0,86	18,36±3,00	3,23±1,03	17,42±1,56	3,05±1,42	3,63±0,91
2-я опытная	10,60*±1,50	34,30*±2,06	2,95±0,24	15,23±1,03	4,25±1,26	10,36*±1,63
Через 7 дней после заражения						
1-я контрольная (интактная)	5,88±0,39	26,43±0,39	5,23±0,29	16,20±0,89	3,33±0,86	4,07±0,96
2-я опытная	33,77*±2,01	44,65*±1,33	6,18±1,86	9,14*±0,77	7,08*±0,68	12,43*±0,46
Через 14 дней после заражения						
1-я контрольная (интактная)	6,14±0,57	29,54±2,68	3,37±0,23	12,42±2,56	5,55±0,68	3,43±0,52
2-я опытная	18,94*±0,25	37,22*±0,69	6,20±1,20	14,06±1,23	6,08±1,46	13,40*±2,05
Через 21 день после заражения						
1-я контрольная (интактная)	9,53±0,23	30,81±2,98	1,91±0,46	9,81±1,65	3,70±0,34	3,82±0,32
2-я опытная	13,63±2,03	24,68±0,96	4,81*±0,43	8,93±0,68	4,81±0,93	3,33±0,69

Примечание: Е-рок – Т-лимфоциты несущие рецептор к эритроцитам барана, определены реакцией спонтанного розеткообразования; ЕА-рок – Т-киллеры определены реакцией непрямого глобулинового розеткообразования с эритроцитами кролика; ЕАС-рок – В-лимфоциты, несущие рецептор к 3-му компоненту комплемента, определены реакцией комплементарного розеткообразования с эритроцитами кролика; ЕАГ-рок – Т-антигенреактивные лимфоциты (распознающие антигены *M. gallisepticum*), адсорбированные на эритроцитах кролика;

*P<0,05.

Содержание в периферической крови Т-антигенреактивных лимфоцитов у интактных цыплят на всем протяжении опыта оставалось практически на одном уровне от 3,43±0,52 до 4,07±0,96 х10^9/л. В опытной группе они изменялись следующим образом. Через сутки после заражения количество Т-антигенреактивных лимфоцитов было в 2,6 раза больше, чем у интактных цыплят, и эта разница увеличивалась через 7 и 14 дней после заражения в 3 и 4 раза соответственно. К 21-му дню исследования содержание Т-антигенреактивных лимфоцитов в периферической крови снижалось до уровня контроля и составляло 3,33±0,69 х10^9/л (рис. 5.27).

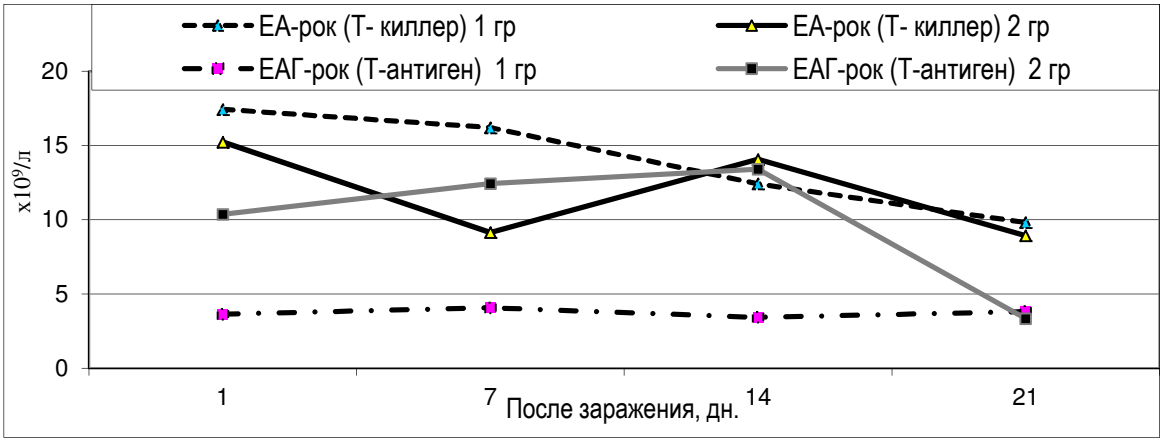


Рис. 5.27. Абсолютное количество ЕА-рок (Т-киллеров) и ЕАГ-рок (Т-антигенреактивных лимфоцитов) в динамике инфекционного процесса

В результате проведенного исследования установлено увеличение абсолютного и относительного количества лейкоцитов и нейтрофилов, особенно в первую неделю после заражения, что является ответной иммунологической реакцией на *M. gallisepticum* и *E. coli*. Снижение абсолютного количества лимфоцитов через 14–21 дней после заражения указывает на угнетение развития лимфоидной системы, торможения лимфопоэза, что негативно сказывается на функции Т- и В-систем иммунитета и сопровождается снижением абсолютного количества Т- и В-лимфоцитов у инфицированных цыплят (на 14–21-й день.).

Таким образом, заражение цыплят *M. gallisepticum* и *E. coli* вызывает значительные изменения в Т- и В-системах иммунитета и картине крови.

5.5.6. Серологические показатели

Инфицирование птиц культурами *Mycoplasma gallisepticum* сопровождается появлением в крови специфических микоплазмозных антител. Для изучения сроков появления и накопления микоплазмозных антител в динамике после заражения цыплят применяли СКРА с цветным антигеном и ИФА, начиная с 22-дневного возраста (с появлением первых признаков заболевания) и в последующем с интервалом в 7 дней. Результаты исследования приведены в табл. 5.27.

Таблица 5.27

Динамика синтеза и уровень антител у зараженных цыплят

Группа	Показатель	Кол-во голов	Реагировало после заражения, через			
			1 дн.	7 дн.	14 дн.	21 дн.
Контрольная (интактная)	СКРА, %	20	-	-	-	-
	ИФА, ср.т.	20	-	-	-	-
Опытная	СКРА, %	20	-	15	100	100
	ИФА, ср.т.	20	-	89±0,9	874±16,1	1319±76,89

Примечание: СКРА - сывороточнокапельная реакция агглютинации, % - реагирующих; ИФА – иммуноферментный анализ, ср.т. – средний титр.

По результатам серологического исследования в интактной группе на всем протяжении опыта в СКРА и в ИФА положительно реагирующих птиц не выявили.

В опытной группе через 7 дней после заражения в СКРА выявили 15 % положительно реагирующих цыплят, а к 14 и 21-му дню исследования – 100 %. С помощью ИФА была прослежена динамика накопления антител, так через 7 дней после инфицирования средний титр по группе составил 89,0±0,9, к 14-му дню – 874,0±16,1 и на 21-й день 1319±76,98, при этом оставаясь на уровне, незначительно превышающем диагностический титр (1:800).

Данные методы диагностики показывают, что цыплята опытной группы находятся в состоянии инфицированности *M. gallisepticum*, о чем свидетельствуют синтез антител у них через 7 дней после заражения и нарастание их уровня на 21-й день в пределах 1:1161 – 1:1602.

5.5.7. Бактериологические показатели

Для контроля чистоты опыта и установления причины гибели вся птица, посмертно, была исследована бактериологическим методом. Для чего были сделаны посевы на дифференциально-диагностические среды для выделения культур *M. gallisepticum* и сопутствующей микрофлоры.

Исследования проводились через 1, 7, 14 и 21 день после заражения в опытной группе и в эти же сроки в контрольной (таб. 5.28).

Таблица 5.28

Результаты бактериологических исследований

Группа	Культура	Сроки исследования после заражения, дни			
		1	7	14	21
Контрольная (интактная)	*M. gall.*	-	-	-	-
	прочие	-	-	-	-
Опытная	*M. gall.*	+	+	+	+
	прочие	*E. coli*	*E. coli*	*E. coli*	*E. coli*

При вскрытии птицы интактной группы видимых патологоанатомических изменений и патогенной микрофлоры не обнаружено. На вскрытии цыплят, зараженных ассоциацией «микоплазма + кишечная палочка» отмечали поражения, характерные для микоплазмоза и колибактериоза. При бактериологическом исследовании инфицированных цыплят были изолированы исходные культуры *E. coli* и *M. gallisepticum*. В контрольной группе патогенной микрофлоры на всем протяжении опыта не обнаружено.

5.6. Профилактика и лечение при респираторном и ассоциативном микоплазмозе птиц

5.6.1. Определение чувствительности полевых культур микоплазм и эшерихий к антибактериальным препаратам *in vitro*

С профилактической и терапевтической целью при респираторном микоплазмозе птиц применяют антибиотики широкого спектра действия. Однако бессистемное применение антибиоти-

ков в производстве без учета всех сочленов ассоциации, участвующих в инфекционном процессе, и чувствительности возбудителей к лекарственным препаратам зачастую не позволяет добиться желаемых результатов.

Для подбора наиболее эффективных препаратов для профилактики и лечения ассоциативного респираторного микоплазмоза птиц определяли чувствительность выделенных полевых культур микоплазм и эшерихий к антибактериальным препаратам *in vitro* методом дисков и методом серийных разведений.

При диско-диффузионном методе использовали диски, изготовленные промышленным способом. В качестве питательной среды применяли мясо-пептонный агар (pH 7,2) в чашках Петри, по 25 мл в одной чашке. Посевным материалом служили 18–20-часовые бульонные культуры *E. coli*. На поверхность агара наливали 1 мл бульонной культуры, равномерно распределяли её, после чего приоткрытые чашки подсушивали при комнатной температуре в течение 15 минут, раскладывали диски. После 18-часовой инкубации в термостате при +37 ºС учитывали диаметр зоны задержки роста. Чувствительность методом серийных разведений определяли по общепринятой методике, утвержденной Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 30 октября 1971 г.

Перед определением чувствительности методом серийных разведений проводили предварительную стандартизацию культур *M. gallisepticum*. Для этого определяли титр культур в цветообразующих единицах (ЦОЕ). Для постановки реакции использовали культуры микоплазм с титром, равным или более 10 тыс. ЦОЕ/мл.

Большинство культур *M. gallisepticum* были чувствительными к тиамулину – 90 %; препаратам тиланового ряда (антибиотики из группы макролидов): к фармазину и к тилозину тартрату – 86 %; препаратам из группы фторхинолонов: к ципрофлоксацину и к энроксилу – 80 %, к энрофлоксацину – 76 % (табл. 5.29). Чувствительность культур микоплазм к тетрациклину и фуразолидону составила всего 24 %, что свидетельствует о

Таблица 5.29

Чувствительность культур эшерихий и микоплазм к антибактериальным препаратам

Препараты	*M. gallisepticum*	*E. coli*
	Чувствительность, %	
	(n=21)	(n=55)
Тиамулин	90	38
Фармазин	86	7
Ципрофлоксацин	80	84
Тилозина тартрат	86	11
Энроксил	80	64
Энрофлоксацин	76	60
Тетрациклин	24	20
Амоксициллин	0	40
Гентамицин	0	89
Нетилмицин	0	36
Фуразолидон	24	31
Бензилпенициллин	0	2

большом количестве культур микоплазм, резистентных к данным препаратам. Наилучшими антибактериальными свойствами в отношении полевых культур *E. coli* обладал гентамицин – 89 % чувствительных культур. Второе место занимали препараты из группы фторхинолонов: ципрофлоксацин – 84 %, энроксил – 64 %, энрофлоксацин – 60 %. Лишь небольшое количество культур были чувствительны к тиамулину – 38 %, фуразолидону – 31 % и тетрациклину – 20 %. К остальным антибиотикам чувствительность кишечной палочки была низкой и колебалась в пределах 2–11 %.

Из приведенных данных видно, что наибольшей активностью *in vitro* в отношении культур *M. gallisepticum* обладали антибиотики из группы макролидов (тилозин тартрат, фармазин), антибиотики из группы плеуромутилина (тиамулин гидроген фумарат) и препараты из группы фторхинолонов (ципрофлоксацин, энрофлоксацин). В отношении культур *E. coli* – антибиотики из группы фторхинолонов (ципрофлоксацин, энрофлоксацин). Данные препараты были испытаны в опытах при изучении схем лечения и профилактики ассоциативного респираторного микоплазмоза птиц.

5.6.2. Схемы профилактики и лечения птиц при респираторном и ассоциативном микоплазмозе и методы лабораторного контроля их эффективности в экспериментальных условиях

Схемы деконтаминации куриных яиц от микоплазм. При разработке мер борьбы с микоплазмозом необходимо принимать во

внимание эпизоотические особенности болезни. Основной путь передачи *M. Gallisepticum* – трансовариальный (вертикальный), поэтому микоплазмоз широко распространяется через инфицированное возбудителем яйцо. Одним из способов, направленных на разрыв эпизоотической цепи взрослые птицы – яйцо – суточный молодняк, является обработка инфицированных инкубационных яиц. В связи с вышесказанным цель данного опыта – изучить различные схемы деконтаминации яиц от микоплазм и лабораторные методы контроля их эффективности в экспериментальных условиях.

Таблица 5.30

Изучение различных схем деконтаминации яиц от микоплазм в экспериментальных условиях

Группы	Схема деконтаминации	Кол-во яиц, шт.
Контрольная	Без обработки	20
1-я опытная	Термообработка +38,8 ºС в течение 24 часов	20
2-я опытная	Термообработка +45,8 ºС в течение 12 часов	20
3-я опытная	УФ-облучение в течение 15 минут	20
4-я опытная	УФ-облучение в течение 30 минут	20
5-я опытная	Погружение яиц нагретых до +38 ºС в 0,5 %-ный раствор фармазина t + 5 ºС на 15минут	20
6-я опытная	Обработка 1 %-ным раствором Виркона-С, аэрозольно 30 минут	20

Опыт проводили в отделе ветеринарии СибНИИП. Обработку яйца в экспериментальных условиях проводили согласно схеме опыта (табл. 5.30). Яйцо на инкубацию брали от кур-несушек 242-дневного возраста с положительными результатами серологических и бактериологических исследований на респираторный микоплазмоз. Сбор яйца проводили в течение трех дней. Яйцо инкубировали в лабораторном инкубаторе ИЛУ-Ф-03. Биологический контроль проводили на 7, 11 и 18-е сутки инкубации. Полученный молодняк исследовали серологическим и бактериологическим методами в одно- и семидневном возрасте на наличие возбудителя респираторного микоплазмоза. Ежедневно учитывали сохранность и клиническое состояние выведенных цыплят.

В возрасте семи дней провели убой всей птицы. При вскрытии определяли наличие и характер патологоанатомических изменений, проводили посев на общепринятые и специальные среды.

Анализ полученных данных показал, что выводимость яиц в 1-й опытной группе, где применяли нагрев яиц перед инкубацией в течение 24 часов при температуре +38,8 ºС, составила 56 %, что на 27 % ниже по сравнению с контрольной группой (83 %). Во 2-й группе, где яйцо перед инкубацией нагревали в течение 12 часов при температуре +45,8 ºС, наблюдали стопроцентную гибель эмбрионов в первые сутки инкубации. Снижение выводимости яиц на 6 и 27 % отмечали соответственно в 3 и 4-й группах (облучение яиц ультрафиолетовыми лучами в течение 15 и 30 минут), по сравнению с контролем при обработке яиц раствором фармазина (5-я группа) и аэрозолем Виркона-С (6-я группа) выводимость яиц была на 1 % выше (84 %) по сравнению с контролем (рис. 5.49).

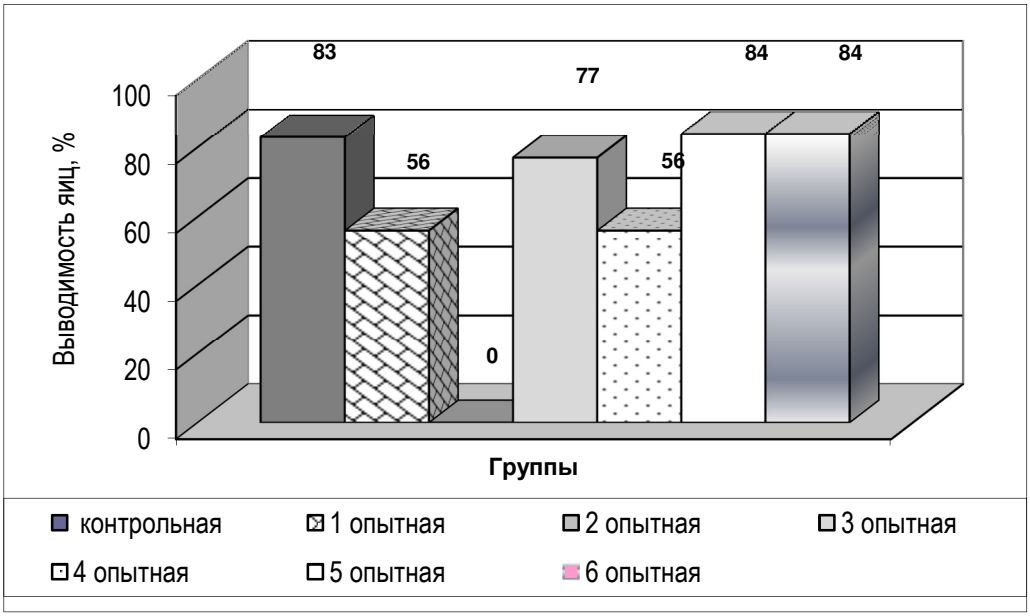


Рис. 5.49. Выводимость яиц при изучении схем деконтаминации их от микоплазм

Сохранность выведенного молодняка во всех группах составила 100 % на протяжении всего опыта. Видимых клинических изменений у цыплят не отмечали. При вскрытии 7-дневных цыплят 5-й группы видимых патологоанатомических изменений не обнаружено. В остальных группах регистрировали единичные случаи утолщения и помутнения грудных воздухоносных мешков, точечные кровоизлияния в головном мозге.

Установлено, что нагрев яиц перед инкубацией в течение 24 часов при температуре 38,8 ºС не обеспечил освобождения от возбудителя респираторного микоплазмоза, положительные результа-

ты серологических и бактериологических исследований были получены у 20 % птиц (табл. 5.31). Таким образом, применение термообработки яиц как способ обеззараживания их от возбудителя микоплазмоза оказался мало приемлемым, так как достаточно трудно достичь желаемой температуры внутри яйца без поражения зародыша и полного освобождения от *M. gallisepticum*.

Таблица 5.31

Серологический и бактериологический контроль эффективности схем деконтаминации инкубационных яиц от микоплазм в экспериментальных условиях

Группы	Кол-во голов	Однодневные цыплята		Семидневные цыплята	
		Реагировало в СКРА	Выделено культур	Реагировало в СКРА	Выделено культур
Контрольная	15	40	47	40	47
1-я опытная	10	20	20	20	20
2-я опытная	Рибель эмбрионов в 1 сутки инкубации				
3-я опытная	15	33	47	33	47
4-я опытная	10	30	30	30	30
5-я опытная	16	-	-	-	-
6-я опытная	16	6	13	6	13

Примечание: «-» – отрицательный результат.

Обработка яиц ультрафиолетовыми лучами в течение 15 и 30 минут также не оказала действие на возбудителя микоплазмоза внутри яйца, о чем свидетельствуют результаты серологических и бактериологических исследований выведенного молодняка. Так, серологическим методом выделено 33 и 30 % серопозитивной птицы, при бактериологическом исследовании культуры микоплазм выделены у 47 и 30 % цыплят соответственно. Вместе с тем при обработке яиц раствором фармазина методом прямого перепада температур в последующем у цыплят культуры микоплазм не были выделены.

При обработке яиц 1 %-ным раствором Виркона-С (6-я группа) в СКРА положительно реагировало 6 % птицы, культуры микоплазм выделены у 13 % цыплят. В контрольной группе, где обработку яйца перед инкубацией не проводили, выделено 47 % птицы с положительными результатами серологических и бактериологических исследований.

Таким образом, обработка яиц перед инкубацией раствором фармазина методом прямого перепада температур (от +38 до +5 ºС) позволила получить молодняк, свободный от возбудителя респираторного микоплазмоза, и повысить выводимость яиц на 1 %, по сравнению с контролем.

5.6.3. Схемы профилактики и лечения при ассоциативном респираторном микоплазмозе цыплят-бройлеров

Для воспроизведения в экспериментальных условиях респираторного микоплазмоза в ассоциации с эшерихиозом и изучения различных схем его профилактики и лечения нами были отобраны патогенные культуры микоплазм и кишечной палочки, выделенных от больных кур.

Для заражения была отобрана наиболее патогенная культура микоплазм, вызвавшая гибель 80 % зараженных эмбрионов и вновь реизолированная на питательных средах. Использована также патогенная культура *E. coli*, вызвавшая гибель двух голов на третьи сутки, реизолированная и типированная как *E. coli* серотипа 020.

Микоплазмозный антиген для заражения готовили из трехсуточных бульонных культур путем центрифугирования при 6000 g и трехкратного ресуспензирования в стерильном 0,9 %-ном растворе натрия хлорида до концентрации $3{,}0\times10^{10}$ микробных тел.

Для приготовления бактериальной взвеси кишечной палочки использовали суточную агаровую культуру. Колонии смывали со скоса стерильным физиологическим раствором и доводили до концентрации $1{,}0\times10^{9}$ микробных тел на голову.

Опыты проводили в виварии отдела ветеринарии СибНИИП. Методом аналогов было сформировано 2 контрольных и 9 опытных групп из цыплят-бройлеров кросса «Сибиряк» по 10 голов в каждой (табл. 33, 36). Перед заражением все цыплята не имели клинических признаков и не реагировали на микоплазмоз в СКРА с цветным микоплазмозным антигеном (с суточного возраста цыплята содержались в условиях вивария).

В отделе ветеринарии СибНИИП О.А. Сунцовой (2004) были проведены исследования по моделированию микоплазмозной инфекции, смешанной с эшерихиозом, на основании которых установлено, что воспроизвести данную болезнь можно при одновременном заражении цыплят 21-дневного возраста двумя возбудителями и созданием у цыплят иммунодепрессии с помощью интраназального введения десятикратной дозы вакцины против ньюкаслской болезни птиц из штамма «Ла-Сота». Данная схема была использована для заражения цыплят в экспериментальных условиях.

Суспензию микоплазм вводили в грудной воздухоносный мешок между 1–3-м ребрами на расстоянии 1,5–2 см от позвоночника. Иглу вводили на глубину не более 0,5–0,6 см. Взвесь клеток кишечной палочки вводили внутрибрюшинно по общепринятой методике.

Цыплятам контрольной интактной группы вводили равное по объему с опытными группами количество мл стерильного физиологического раствора.

Одновременно с заражением птице контрольных и опытных групп была интраназально введена десятикратная доза вакцины против ньюкаслской болезни птиц из штамма «Ла-Сота».

Антибактериальные препараты для лечения и профилактики были взяты с учетом их активности к выделенным культурам *in vitro*: ципрофлоксацин – антибиотик, активный в отношении микоплазм и кишечной палочки, тилозин тартрат – активный в отношении микоплазм.

Помимо антибактериальных препаратов в своих опытах мы использовали пробиотик «Астра-2», созданный и предоставленный нам ООО «БинКорм» (г. Бердск), представляющий собой сухой концентрат молочнокислых бактерий. Препарат проявляет антагонистическую активность в отношении патогенной микрофлоры, угнетая её рост и снижая вирулентность, улучшает пищеварение, устраняет антибиотиковые дисбактериозы. Пробиотик применяли в дозе 1 кг/тонну корма. В качестве иммуномодулятора использовали «Вестин», выпускаемый и предоставленный

нам ООО «Диафарм», произведенный по лицензии ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Бердск Новосибирской обл.). Препарат на системном уровне стимулирует фагоцитоз, обладает противовирусными свойствами, повышает устойчивость организма к инфекциям, а также предотвращает развитие вторичных инфекций. «Вестин» применяли интраназально в дозе 16 мкг/голову.

Профилактику ассоциативного микоплазмоза бройлеров проводили согласно схеме опыта (табл. 5.32). Ежедневно учитывали сохранность и клиническое состояние опытной птицы. При гибели цыплят проводили патологоанатомическое и бактериологическое исследование. Контроль эффективности применяемых схем осуществляли с использованием серологического и бактериологического прижизненных методов диагностики через 1, 7 и 21 день после заражения.

У цыплят 1-й контрольной (интактной) группы гибели и видимых клинических проявлений не регистрировали на протяжении всего опыта.

Таблица 5.32

Изучение схем профилактики респираторного ассоциативного микоплазмоза цыплят-бройлеров в экспериментальных условиях

Группы	Кол-во, гол.	Схема профилактики		
		Препарат	Доза	Срок дачи
1-я контрольная (интактная)	10	не проводилась		
2-я контрольная (зараженная)	10	не проводилась		
3-я опытная	10	ципрофлоксацин	10 мг/кг массы	3 дня до заражения
		«Астра-2»	1кг /тонну корма	за 7 дней до заражения до 42 дней
4-я опытная	10	тилозина тартрат	50 мг/кг массы	3 дня до заражения
		«Астра-2»	1кг /тонну корма	за 7 дней до заражения до 42 дней
5-я опытная	10	ципрофлоксацин	10 мг/кг массы	3 дня до заражения
		«Вестин»	16 мкг/голову	дважды до заражения с интервалом 7 дней
6-я опытная	10	тилозина тартрат	50 мг/кг массы	3 дня до заражения
		«Вестин»	16 мкг/голову	дважды до заражения с интервалом 7 дней

7-я опытная	10	«Астра-2»	1кг /тонну корма	за 7 дней до заражения до 42 дней
		«Вестин»	16 мкг/голову	дважды до заражения с интервалом 7 дней

Через день после заражения у бройлеров 2-й контрольной (зараженной) группы отмечалось угнетение, отказ от корма, ринит, конъюнктивит, а на четвертый день появились хрипы. Данные клинические признаки наблюдали в течение 14 дней после заражения. Хрипы, ринит и конъюнктивит сохранялись на протяжении всего опыта. В этой группе пало две головы на третьи и две головы на пятые сутки после заражения. При вскрытии были обнаружены фибринозный аэросаккулит, одно- и двухсторонняя очаговая пневмония, фибринозный перикардит и перигепатит. При бактериологическом исследовании были выделены культуры микоплазм и кишечной палочки, аналогичные исходным. Сохранность за период опыта составила 60 %.

У цыплят 3, 4 и 5-й опытных групп отмечали незначительное снижение аппетита, который полностью восстановился на второй день после заражения. Других видимых клинических изменений не наблюдали.

В 6 и 7-й группах в течение первых десяти дней после заражения отмечали снижение аппетита, общее угнетение, взъерошенность оперения. Помимо этого у цыплят 7-й группы на пятые сутки после заражения наблюдали серозный ринит и конъюнктивит, а на девятые сутки – свистящее дыхание и хрипы, которые сохранялись до конца опыта.

Сохранность во всех опытных группах составила 100 %.

При убое и вскрытии бройлеров через 21 день после заражения в 3, 4 и 5-й опытных группах видимых патологоанатомических изменений не обнаружено.

У цыплят 7-й опытной группы на вскрытии отмечали поражения, характерные для ассоциативного течения микоплазмоза с эшерихиозом: утолщение и помутнение грудных и брюшных воздухоносных мешков (у отдельных голов с наложением фибрина), очаги воспаления в легких, фибринозный перикардит и

перигепатит, атрофию селезенки. При вскрытии 6-й группы у пяти голов отмечали фибринозный перикардит и перигепатит.

По результатам бактериологических исследований у цыплят 1-й контрольной (интактной) группы культуры микоплазм и кишечной палочки не выделяли на протяжении всего опыта (табл. 5.33).

От цыплят 2-й контрольной (зараженной) группы исходные культуры микоплазм были изолированы в 100 % случаев во все сроки после заражения. Кишечная палочка также была выделена в 100 % случаев через 1, 7 дней и в 80 % случаев через 21 день после заражения.

Таблица 5.33

Контроль эффективности схем профилактики респираторного ассоциативного микоплазмоза цыплят-бройлеров с применением бактериологического метода диагностики в экспериментальных условиях

Группы	Количество цыплят-бактерионосителей, %					
	Через 1 день после заражения		Через 7 дней после заражения		Через 21 день после заражения	
	M. gallisepticum	*E. coli*	*M. gallisepticum*	*E. coli*	*M. gallisepticum*	*E. coli*
1-я контрольная (интактная)	0	0	0	0	0	0
2-я контрольная (зараженная)	100	100	100	100	100	80
3-я опытная	10	0	0	0	0	0
4-я опытная	10	20	0	10	0	0
5-я опытная	20	10	10	10	10	0
6-я опытная	10	70	0	50	0	40
7-я опытная	90	50	80	20	80	0

От цыплят 3, 4 и 6-й опытных групп исходные культуры микоплазм были выделены лишь в одном случае через день после заражения у 10 % цыплят из каждой группы. Культуры кишечной палочки у цыплят 3-й группы во все сроки после заражения не выделялись. В 4-й группе кишечная палочка была выделена от 20 % цыплят через день и от 10 % через 7 дней после заражения, тогда как в 6-й группе она была изолирована в 70 % случаев через день и в 50 и 40 % случаев соответственно через 7 и 21 день после заражения.

В 5-й группе исходные культуры микоплазм были выделены от 20 % цыплят через день и от 10 % через 7 и 21 день после заражения, кишечная палочка – в 10 % случаев через 1, 7 дней после заражения. У цыплят 7 группы через день в 90 % случаев и через 7 и 21 день после заражения в 80 % случаев были выделены культуры микоплазм. Кишечная палочка – в 50 % случаев через день и 20 % случаев через 7 дней после заражения.

При исследовании сыворотки крови положительно реагировали в СКРА цыплята 2-й (100 %) и 7-й (20 %) групп только через 21 день после заражения. В остальных группах положительно реагирующих в СКРА не было на протяжении всего опыта. При исследовании методом иммуноферментного анализа в диагностических титрах также регистрировали антитела в этих же группах у 100 и 60 % цыплят соответственно (табл. 5.34).

Таблица 5.34

Контроль эффективности схем профилактики респираторного ассоциативного микоплазмоза цыплят-бройлеров с применением серологических методов диагностики в экспериментальных условиях

Группы	Количество серопозитивных цыплят, %				
	Через 1 день после заражения	Через 7 дней после заражения	Через 21 день после заражения		
	СКРА	СКРА	СКРА	ИФА	
				%	ср. титр
1 контрольная (интактная)	0	0	0	0	0
2 контрольная (зараженная)	0	0	100	100	745±122
3 опытная	0	0	0	0	0
4 опытная	0	0	0	0	0
5 опытная	0	0	0	0	0
6 опытная	0	0	0	0	0
7 опытная	0	0	20	60	604±80

Лечение цыплят проводили на второй день после заражения при появлении первых клинических признаков, характерных для ассоциативной формы микоплазмоза с эшерихиозом, согласно схеме опыта (табл. 5.35).

Таблица 5.35

Изучение схем лечения цыплят-бройлеров при респираторном ассоциативном микоплазмозе в экспериментальных условиях

Группы	Кол-во, гол.	Схема лечения		
		Препарат	Доза	Срок дачи
1-я контрольная (интактная)	10	не проводилось		
2-я контрольная (зараженная)	10	не проводилось		
3-я опытная	10	ципрофлоксацин	10 мг/кг массы	первые 5 дней лечения
		«Астра-2»	1кг /тонну корма	от начала лечения до 42 дней
4-я опытная	10	тилозина тартрат	50 мг/кг массы	первые 5 дней лечения
		«Астра-2»	1кг /тонну корма	от начала лечения до 42 дней
5-я опытная	10	ципрофлоксацин	10 мг/кг массы	первые 5 дней лечения
		«Вестин»	16 мкг/голову	первые 3 дня лечения
6-я опытная	10	тилозина тартрат	50 мг/кг массы	первые 5 дней лечения
		«Вестин»	16 мкг/голову	первые 3 дня лечения

Ежедневно учитывали сохранность и клиническое состояние опытной птицы. При гибели цыплят проводили патологоанатомическое и бактериологическое исследования. Контроль эффективности применяемых схем лечения осуществляли с использованием серологического и бактериологического прижизненных методов диагностики через 7, 14 и 20 дней после лечения. Контрольные группы – 1-я (интактная) и 2-я (зараженная) были общими при изучении схем лечения и профилактики у бройлеров и описаны выше.

У цыплят 3, 4 и 5-й опытных групп аппетит был восстановлен на вторые сутки, а клинические признаки полностью исчезли к четвертому дню лечения. В 6-й группе клинические признаки исчезли к пятому дню лечения, за исключением одной головы, у которой ринит, конъюнктивит, угнетение и хрипы сохранились до конца опыта.

Сохранность цыплят-бройлеров во всех опытных группах составляла 100 %. Через 20 дней после лечения провели убой

всей оставшейся птицы. При вскрытии определяли наличие и характер патологоанатомических изменений. У цыплят 1-й контрольной (интактной), 3, 4 и 5-й опытных групп видимых патологоанатомических изменений не обнаружено. У бройлеров 2-й группы на вскрытии отмечали поражения, характерные для микоплазмоза и колибактериоза: утолщение грудных воздухоносных мешков (у трех голов – с наложением фибрина), очаги воспаления в легких, фибринозный перикардит и перигепатит, атрофию селезенки.

В 6-й группе у трех голов также отмечали фибринозный перикардит, перигепатит и аэросакулит. У остальных цыплят видимых патологоанатомических изменений не обнаружено.

По результатам бактериологических исследований у 3-й опытной группы культуры микоплазм и кишечной палочки не выделяли на протяжении всего опыта (табл. 5.36).

Таблица 5.36

Контроль эффективности схем лечения цыплят-бройлеров при респираторном ассоциативном микоплазмозе с применением бактериологического метода диагностики в экспериментальных условиях

Группы	Количество цыплят-бактерионосителей, %					
	Через 7 дней после лечения		Через 14 дней после лечения		Через 20 день после лечения	
	M. gallisepticum	*E. coli*	*M. gallisepticum*	*E. coli*	*M. gallisepticum*	*E. coli*
1-я контрольная (интактная)	0	0	0	0	0	0
2-я контрольная (зараженная)	100	100	100	100	100	80
3-я опытная	0	0	0	0	0	0
4-я опытная	0	20	0	10	0	0
5-я опытная	10	10	10	10	10	10
6-я опытная	0	60	0	40	0	40

Культуры микоплазм отсутствовали также у бройлеров 4 и 6-й опытных групп, где для лечения применяли тилозин тартрат, тогда как исходная культура кишечной палочки была изолирована от цыплят 4-й группы через 7 и 14 дней после лечения в 20 и

10 % случаев соответственно. В 6-й группе – от 60 % цыплят через 7 дней и от 40 % – через 14 и 20 дней после лечения.

При бактериологическом исследовании бройлеров 5-й опытной группы были выделены как культуры кишечной палочки, так и культуры микоплазм от 10 % цыплят.

Положительную СКРА отмечали у цыплят 2-й контрольной группы (100 %) в конце опыта. При исследовании методом иммуноферментного анализа антитела в диагностических титрах также регистрировали у бройлеров 2-й контрольной группы. В остальных группах антител не было (табл. 5.37). Наличие культур микоплазм в организме цыплят 5-й группы и отсутствие у них антител можно объяснить иммунодепрессивным действием антибиотиков.

Таблица 5.37

Контроль эффективности схем лечения цыплят-бройлеров при респираторном ассоциативном микоплазмозе с применением серологических методов диагностики в экспериментальных условиях

Группы	Количество серопозитивных цыплят, %				
	Через 7 дней после лечения	Через 14 дней после лечения	Через 20 день после лечения		
	СКРА	СКРА	СКРА	ИФА	
				%	ср. титр
1-я контрольная (интактная)	0	0	0	0	0
2-я контрольная (зараженная)	0	0	100	100	745±122
3-я опытная	0	0	0	0	0
4-я опытная	0	0	0	0	0
5-я опытная	0	0	0	0	0
6-я опытная	0	0	0	0	0

Таким образом, при изучении схем профилактики и лечения при респираторном ассоциативном микоплазмозе цыплят-бройлеров наилучшие результаты были получены в группах при использовании антибактериальных препаратов ципрофлоксацина и тилозина тартрата в сочетании с пробиотиком «Астра-2».

Применение предлагаемых серологических и бактериологических методов диагностики позволило контролировать эффективность лечебно-профилактических мероприятий.

5.6.4. Схемы лечения кур-несушек и петухов родительского стада при спонтанном респираторном микоплазмозе

Для изучения схем лечения птиц родительского стада при респираторном микоплазмозе методом аналогов были сформированы контрольная и 3 опытных группы по 6 голов кур-несушек и петухов в каждой. В опыте использовали спонтанно зараженную птицу с положительными результатами серологических и бактериологических прижизненных методов исследований. Для лечения были взяты препараты из разных фармакологических групп с учетом их активности *in vitro*: энрофлоксацин, фармазин и тиамулин. Лечение проводили согласно схеме опыта (табл. 5.38).

Таблица 5.38

Схемы лечения кур-несушек и петухов при спонтанном респираторном микоплазмозе

Группы	Кол-во кур/петухов, гол.	Схема лечения		
		Препарат	Доза, мг/кг массы	Срок дачи
Контрольная	6/6	не проводится		
1-я опытная	6/6	энрофлоксацин	10	5 дней подряд
2-я опытная	6/6	фармазин	50	5 дней подряд
3-я опытная	6/6	тиамулин	50	5 дней подряд

Контроль эффективности применяемых схем лечения осуществляли с использованием серологического и бактериологического прижизненных методов диагностики через 7 и 14 дней после дачи антибактериальных препаратов. Сохранность во всех группах за период опыта составила 100 %.

По результатам серологических исследований в 1 и 2-й опытных группах количество положительно реагирующих петухов в СКРА после лечения уменьшилось в 2 раза, в 3-й группе – на 33 %, по сравнению с контрольной группой, где количество серопозитивной птицы было 100 % (табл. 5.39).

По результатам иммуноферментного анализа во всех исследуемых группах в начале и конце опыта, количество положительно реагирующих петухов составляло 100 %. Вместе с тем в

количественном отношении после лечения наблюдали уменьшение среднего титра антител. Так, в 1-й группе он уменьшился с 6298±1132 до 3650±771, во 2-й – с 4700±633 до 1998±378, в 3-й – с 6988±1298 до 4764±1016 через 14 дней после лечения, тогда как в контрольной группе, где лечение не проводилось, титр антител продолжал увеличиваться и по окончании опыта составлял 8883±1367 (см. табл. 5.39). При исследовании соскобов с гортани культуры *M. gallisepticum* отсутствовали у петухов 2-ой и 3-ей опытных групп уже через 7 и 14 дней после применения антибактериальных препаратов. Тогда как, от петухов 1-ой группы они были изолированы в 27% случаев в указанные выше сроки.

Таблица 5.39

Контроль эффективности схем лечения петухов при респираторном микоплазмозе с применением серологических методов диагностики

Группы	Количество серопозитивных петухов,%								
	До лечения (в возрасте 220 дней)			Через 7 дней после лечения			Через 14 дней после лечения		
	СКРА	ИФА		СКРА	ИФА		СКРА	ИФА	
		%	ср. титр		%	ср. титр		%	ср. титр
Контрольная (не леченая)	100	100	6669±1734	100	100	6767±1868	100	100	8883±1367
1-я опытная	100	100	6298±1132	50	100	3933±917	50	100	3650±771
2-я опытная	100	100	4700±633	50	100	4356±955	50	100	1998±378
3-я опытная	100	100	6988±1298	67	100	4689±936	67	100	4764±1016

Через 40 дней после лечения от петухов 2 и 3-й групп было выделено соответственно 27 и 33 % культур микоплазм, а от петухов 1-й группы – 50 %, что указывает на повторное заражение возбудителем через 40 дней после применения антибиотиков. В контрольной группе микоплазмы были обнаружены у всех петухов (100 %). Аналогичная картина была получена и при бактериологическом исследовании спермы петухов (рис. 5.50).

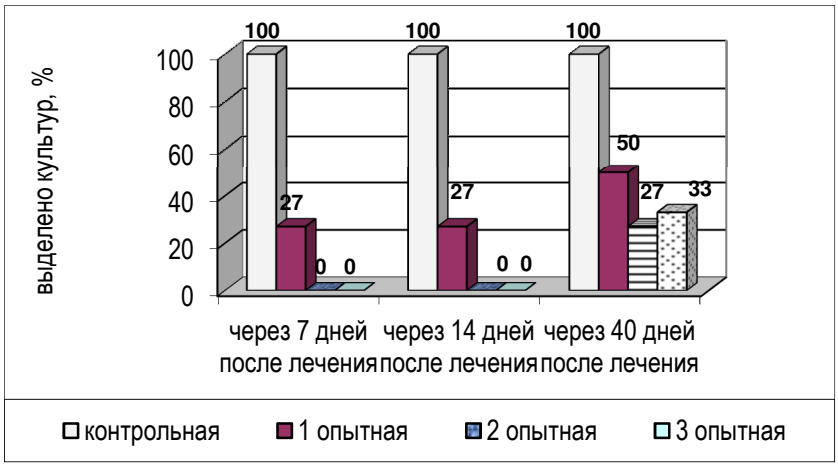


Рис. 5.50. Контроль эффективности схем лечения петухов, спонтанно инфицированных *M. gallisepticum* с применением бактериологического метода исследования спермы

Применение антибиотиков на петухах для лечения респираторного микоплазмоза не отразилось на качестве спермы. Объем эякулята в среднем по опытным группам после лечения составил от 0,49 до 0,7 мл, в контрольной группе 0,5 мл, при норме ни менее 0,3 мл. Подвижность спермиев в среднем была в опытных группах от 9 до 9,6 баллов, в контроле – 8,5 баллов, при норме не менее 7 баллов. Концентрация спермиев – от 3,88 до 4,59 млрд/мл, в контроле – 3,94 млрд/мл, при норме не менее 3 млрд/мл (табл. 5.40).

Таблица 5.40

Изучение влияния антибактериальных препаратов на качество спермы петухов, инфицированных *M. gallisepticum*

Группы	Показатели качества спермы петухов								
	До применения антибиотиков			Через 7 дней после лечения			Через 14 дней после лечения		
	Объем, мл	Подвиж-ность, бал	Концент-рация, млрд/мл	Объем, мл	Подвиж-ность, бал	Концент-рация, млрд/мл	Объем, мл	Подвиж-ность, бал	Концент-рация, млрд/мл
Контрольная (не леченая)	1,05	8,2	4,88	0,5	8,5	3,94	0,47	8,7	4,56
1-я опытная	0,73	8	3,87	0,43	9	3,88	0,77	8	3,92
2-я опытная	1,33	9	3,22	0,6	9,6	4,09	0,5	9	3,52
3-я опытная	0,9	9,3	3,70	0,7	9	4,59	0,53	8,7	3,99

Спермой петухов после проведенного лечения осеменяли кур-несушек опытных групп. Полученное яйцо закладывали на инкубацию, учитывали оплодотворяемость, выводимость яиц и вывод цыплят. Во 2-й группе оплодотворяемость яиц на 6,7 %, а выводимость яиц и вывод цыплят на 0,9 % были выше, чем в контроле (рис. 5.51). В 3-й группе показатели были такие же, как в контрольной группе: оплодотворяемость яиц – 93,3 %, выводимость яиц – 85,7 %, вывод цыплят – 80 %. В 1-й группе оплодотворяемость и выводимость яиц на 1,1 %, а вывод цыплят на 1,4 % были ниже по сравнению с контролем.

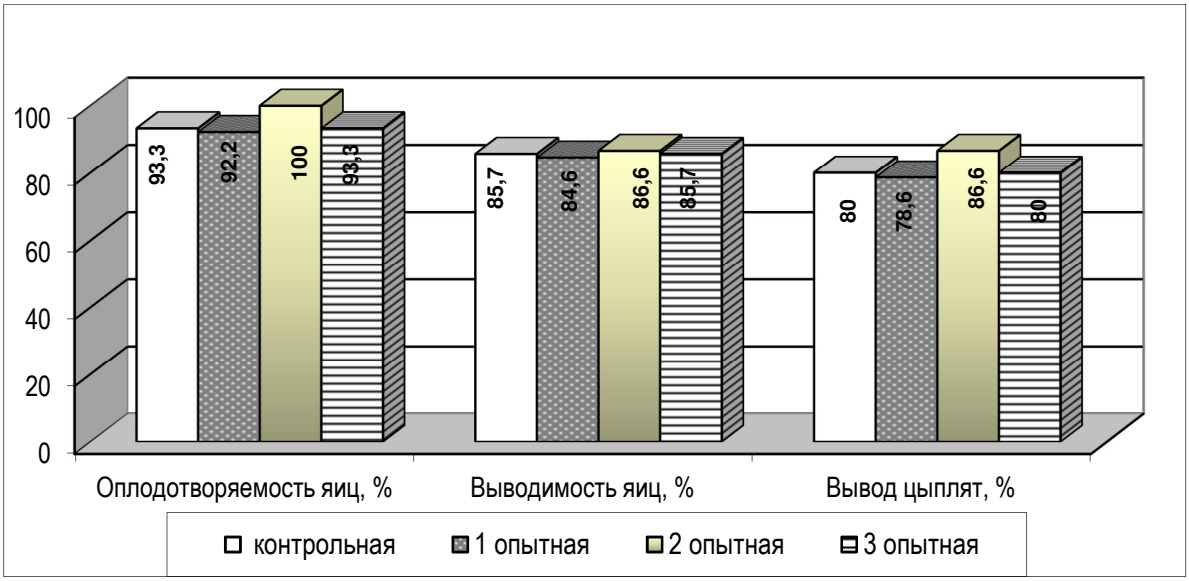


Рис. 5.51. Изучение влияния антибактериальных препаратов, применяемых для лечения кур-несушек и петухов, инфицированных микоплазмами на оплодотворяемость, выводимость яиц и вывод цыплят

При изучении схем лечения кур-несушек, больных респираторным микоплазмозом, антитела к возбудителю в ИФА регистрировали в 100 % случаев, при этом отмечали уменьшение среднего титра антител. Так, через 14 дней после лечения, в 1-й опытной группе он уменьшился с 4962±837 до 3873±652, во 2-й – с 7815±964 до 3664±837, в 3-й – с 6565±1292 до 4100±639, тогда как в контрольной группе, где лечение не проводили, средний титр антител продолжал увеличиваться и по окончанию опыта составлял 8568±1691 (табл. 5.41).

Таблица 5.41

Контроль эффективности схем лечения кур-несушек при респираторном микоплазмозе с применением серологических методов диагностики

Группы	Количество серопозитивных кур-несушек, %								
	До лечения (в возрасте 223 дней)			Через 7 дней после лечения			Через 14 дней после лечения		
	СКРА	ИФА		СКРА	ИФА		СКРА	ИФА	
		%	ср. титр		%	ср. титр		%	ср. титр
Контрольная (не леченая)	100	100	4821±1042	100	100	8568±1691	100	100	7316±1282
1-я опытная	100	100	4962±837	67	100	3305±479	67	100	3873±652
2-я опытная	100	100	7815±964	50	100	3684±740	50	100	3664±837
3-я опытная	100	100	6565±1292	67	100	4892±1179	67	100	4100±639

При прижизненном бактериологическом исследовании соскобов с гортани через 7 и 14 дней после лечения культуры микоплазм были выделены у 17 % кур-несушек во 2-й (фармазин) и 3-й (тиамулин) опытных группах. У кур 1-й группы (энрофлоксацин) они были изолированы в 33 % случаев, тогда как в контрольной группе культуры микоплазм выделяли в 100 % случаев на протяжении всего опыта (рис. 5.52).

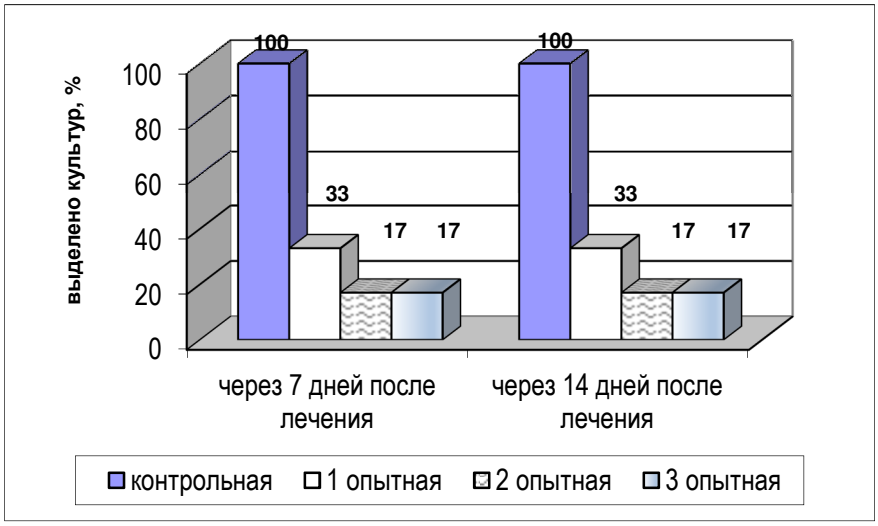


Рис. 5.52. Контроль эффективности схем лечения кур-несушек, спонтанно инфицированных *M. gallisepticum* с использованием прижизненного бактериологического метода исследования соскобов с гортани

На основании проведенных исследований с помощью бактериологического метода установлено, что использование для лечения петухов фармазина и тиамулина при респираторном микоплазмозе способствовало элиминации возбудителя из их организма в течение первых 14 дней после применения антибактериальных препаратов. Однако через 40 дней после лечения микоплазмоносительство вновь было выявлено в группе, где применяли фармазин у 27 %, а при использовании тиамулина – у 33 % петухов. Применение для лечения энрофлоксацина в первые 14 дней лечения уменьшило количество инфицированных петухов на 73 % по сравнению с контролем. Вместе с тем через 40 дней после лечения инфицированность увеличилась и была на уровне 50 % от контрольной группы.

Использование противомикоплазмознных препаратов не оказало отрицательного влияния на качество спермы петухов, оплодотворенность и выводимость яиц. А при использовании фармазина по сравнению с контролем даже повысилась оплодотворяемость яиц на 6,7 %, выводимость яиц и вывод цыплят – на 0,9 %.

Применение для лечения фармазина и тиамулина у курнесушек позволило снизить уровень их инфицированности микоплазмами в течение первых 14 дней после применения антибиотиков на 83 %, по сравнению с контролем, а применение энрофлоксацина – на 67 %.

5.6.5. Испытание эффективных схем профилактики и лечения при респираторном и ассоциативном микоплазмозе птиц и методов лабораторного контроля их эффективности в производственном контролируемом опыте

На основании проведенных экспериментальных исследований было установлено, что обработка яиц раствором фармазина перед инкубацией методом прямого перепада температур с +38 до +5ºС, позволила получить молодняк, свободный от возбудителя респираторного микоплазмоза, и повысить выводимость яиц на 1 % по сравнению с контролем.

Данная схема деконтаминации яиц от микоплазм была испытана в ЭПХ «СибНИИП» (табл. 5.42). Для проведения опыта было сформировано 2 группы из 2000 инкубационных яиц в каждой. Сбор яйца на инкубацию проводили в течение 7 дней от птицы, спонтанно инфицированной *M. gallisepticum*, что подтверждали серологическими и бактериологическими исследованиями. Яйцо инкубировали в производственном инкубаторе ИУФ-М-45. Биологический контроль проводили на 7, 11 и 18-е сутки инкубации.

Таблица 5.42

Испытание схем деконтаминации куриных яиц от микоплазм в производственных условиях

Группы	Схема деконтаминации	Кол-во яиц, шт.
Контрольная (по схеме хозяйства)	Обработка парами формальдегида 30 минут	2000
Опытная (испытуемая)	Погружение яиц нагретых до 38 ^{0}С в раствор фармазина (50 мг/кг массы) t + 5 ^{0}С на 15минут	2000

Контроль эффективности применяемых схем проводили с применением прижизненного серологического и бактериологического лабораторных методов диагностики цыплят, полученных из обработанных яиц в одно- и семидневном возрасте, на наличие возбудителя респираторного микоплазмоза. Обследовали 5 % птицы от общего поголовья.

Данная схема может быть рекомендована как один из способов в системе мер борьбы и профилактики при респираторном микоплазмозе птиц.

5.6.6. Испытание разработанных схем профилактики и лечения при респираторном ассоциативном микоплазмозе цыплят-бройлеров

При сравнении схем профилактики и лечения цыплят-бройлеров при экспериментальном респираторном ассоциативном микоплазмозе наилучшие результаты были получены при использовании антибактериальных препаратов ципрофлоксацина

и тилозина тартрата в сочетании с пробиотиком «Астра-2». Данные схемы были испытаны в производственных условиях в сравнении со схемами, применяемыми в ЭПХ «СибНИИП».

Для проведения опыта по профилактике методом аналогов было сформировано три группы из суточных цыплят-бройлеров кросса «Сибиряк» по 300 голов в каждой. Профилактические мероприятия проводили согласно схеме опыта (табл. 5.43).

Таблица 5.43

Испытание схем профилактики ассоциативного микоплазмоза цыплят-бройлеров в производственных условиях

Группы	Кол-во, гол.	Схема профилактики		
		Возраст, дней	Препарат	Дозы
Контрольная (по схеме хозяйства)	300	1–3	энроксил	10 мг/кг массы
		16–18	ципрофлоксацин	10 мг/кг массы
		28–30	ципрофлоксацин	10 мг/кг массы
1-я опытная	300	1–42	«Астра-2»	1кг /тонну корма
		28–30	ципрофлоксацин	10 мг/кг массы
2-я опытная	300	1–42	«Астра-2»	1кг /тонну корма
		28–30	тилозина тартрат	50 мг/кг массы

Ежедневно учитывали сохранность и клиническое состояние опытной птицы. При гибели цыплят проводили патологоанатомическое и бактериологическое исследования. Контроль эффективности применяемых схем профилактики осуществляли с использованием серологического и бактериологического прижизненных лабораторных методов диагностики в возрасте 32, 38 и 42 дней, исследовали 5 % от поголовья.

Анализ полученных данных показал, что сохранность за период выращивания бройлеров в 1 и 2-й опытных группах составляла соответственно 99 и 98,7 %, что на 3,3 и 3 % выше по сравнению с контролем (рис. 5.53).

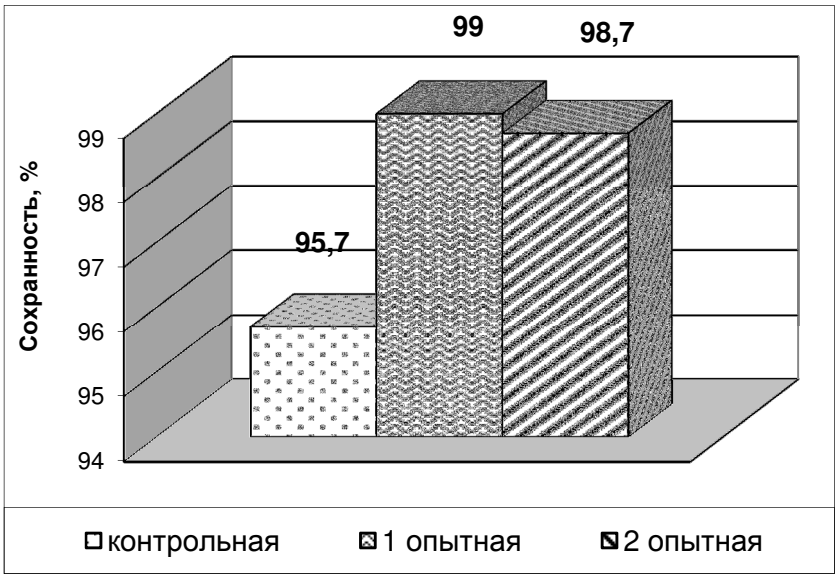


Рис. 5.53. Сохранность цыплят-бройлеров при испытании схем профилактики ассоциативного микоплазмоза в производственных условиях

В структуре гибели бройлеров микоплазмоз в ассоциации с эшерихиозом составил в контрольной группе 1,6 % от поголовья, во 2-й опытной группе – 0,33 % (рис. 5.54).

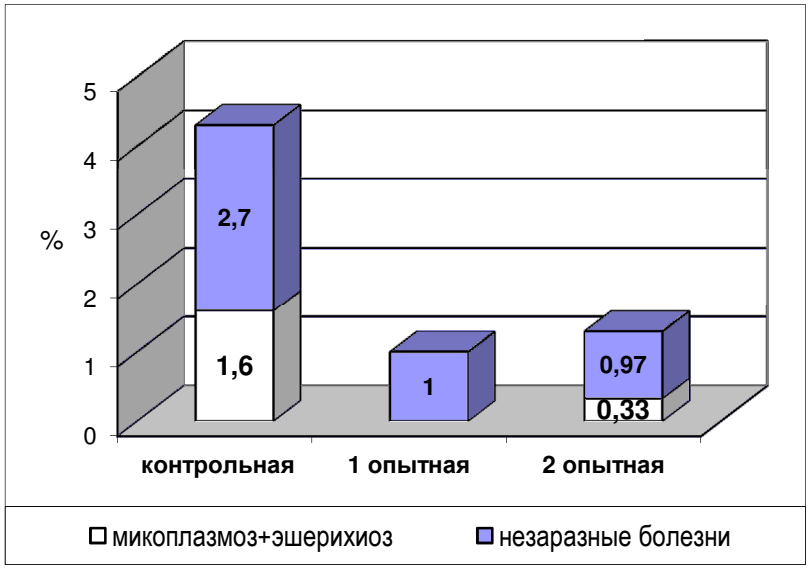


Рис. 5.54. Структура гибели цыплят-бройлеров при испытании схем профилактики ас социативного микоплазмоза в производственных условиях

При вскрытии были обнаружены фибринозный аэросаккулит, одно- и двухсторонняя очаговая пневмония, фибринозный перикардит и перигепатит. При бактериологическом исследовании были выделены патогенные культуры микоплазм и

кишечной палочки. В 1-й группе гибели бройлеров от инфекционных болезней не было. Среди причин гибели молодняка незаразного характера регистрировали энтерит, нефрит и гепатит. При прижизненном бактериологическом исследовании у цыплят 1-й опытной группы патогенные культуры микоплазм и эшерихий не выделяли на протяжении всего периода выращивания бройлеров. От бройлеров 2-й опытной группы была изолирована лишь кишечная палочка в возрасте 38 и 42 дней в 6,7 % случаев, от числа исследованных цыплят, тогда как в контрольной группе (по схеме хозяйства) помимо культур кишечной палочки – от 13,3 и 20 % бройлеров, были выделены культуры микоплазм в 6,7 и 13,3 % случаев соответственно в 38 и 42 дня (табл. 5.44).

По результатам серологических исследований микоплазмозные антитела были выявлены только в контрольной группе в СКРА у 6,7 и 13,3 % цыплят соответственно в 38 и 42 дня, а в ИФА – у 20 % в 42 дня со средним титром 501±84 (см. табл. 5.44).

Таблица 5.44

Бактериологический и серологический контроли эффективности испытуемых схем профилактики респираторного ассоциативного микоплазмоза цыплят-бройлеров в производственных условиях

Группы	Возраст птицы, дней	Количество цыплят-бактерионосителей, %		Количество серопозитивных цыплят,%		
		M. gallisepticum	*E. coli*	СКРА	ИФА	
					%	ср. титр
Контрольная (по схеме хозяйства)	32	0	0	0	-	-
	38	6,7	13,3	6,7	-	-
	42	13,3	20	13,3	20	501±84
1-я опытная	32	0	0	0	-	-
	38	0	0	0	-	-
	42	0	0	0	0	0
2-я опытная	32	0	0	0	-	-
	38	0	6,7	0	-	-
	42	0	6,7	0	0	0

Примечание: «-» исследование не проводили.

Наилучшие результаты были получены в опытных группах, где для профилактики ассоциативного микоплазмоза в возрасте

28–30 дней применяли антибактериальные препараты: ципрофлоксацин в одном и тилозин тартрат во втором случае – и использовали пробиотик «Астра-2» на протяжении всего периода выращивания бройлеров. Использование данных схем позволило повысить сохранность бройлеров до 99 и 98,7 % и получить здоровый молодняк. Применение пробиотика с суточного до 42-дневного возраста позволило сократить кратность дачи антибактериальных препаратов до одного раза.

Для испытания схем лечения ассоциативного микоплазмоза бройлеров в производственных условиях было сформировано три группы из 29-дневных цыплят-бройлеров кросса «Сибиряк» по 550 голов в каждой со следующими характерными клиническими признаками: цыплята были малоподвижны, нахохлившиеся, плохо поедали корм, отмечали серозные риниты и конъюнктивиты, вытягивали шею и издавали хрипы. При прижизненном и посмертном бактериологическом исследовании от цыплят были выделены культуры микоплазм и кишечной палочки (серопит О119) в 100 % случаях. Лечение проводили согласно схеме опыта (табл. 5.45).

Таблица 5.45

Испытание схем лечения цыплят-бройлеров при респираторном ассоциативном микоплазмозе в производственных условиях

Группы	Кол-во, гол.	Схема лечения		
		Возраст, дней	Препарат	Доза
Контрольная (по схеме хозяйства)	550	33–37	энроксил	10 мг/кг массы
1-я опытная	550	33–37	ципрофлоксацин	10 мг/кг массы
		33–42	«Астра-2»	1кг /тонну корма
2-я опытная	550	33–37	тилозина тартрат	50 мг/кг массы
		33–42	«Астра-2»	1кг /тонну корма

Ежедневно учитывали сохранность и клиническое состояние опытной птицы. При гибели цыплят проводили патологоанатомическое и бактериологическое исследования. Контроль эффективности применяемых схем лечения осуществляли с использованием серологического и бактериологического прижизненных методов диагностики в возрасте 37 и 42 дней, исследовали 5 % от поголовья.

Наибольшую сохранность отмечали у бройлеров 1-й опытной группы – 98 % (рис. 5.55). Во 2-й группе она составляла 97,8 %, что на 1,8 % выше по сравнению с контрольной группой.

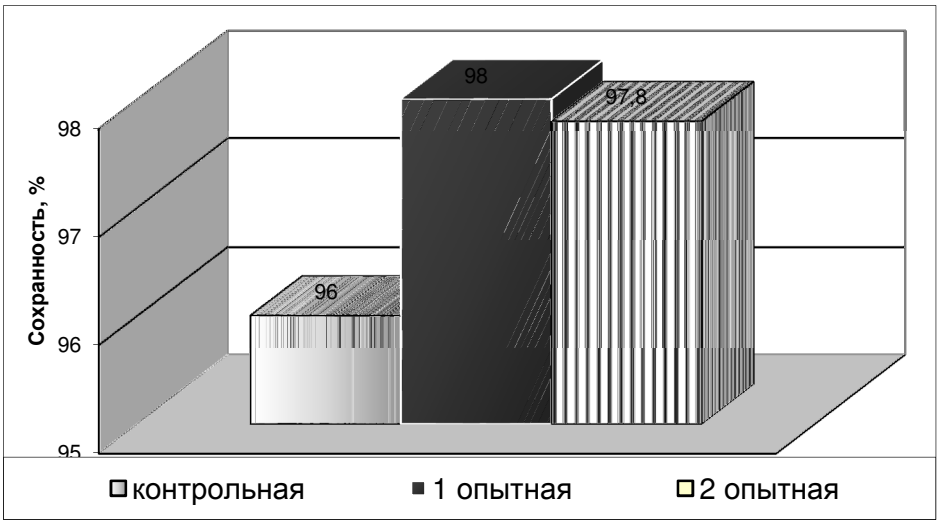


Рис. 5.55. Сохранность цыплят-бройлеров, больных респираторным ассоциативным микоплазмозом, после их лечения в производственных условиях

В структуре гибели бройлеров после лечения микоплазмоз в ассоциации с эшерихиозом составлял в контрольной группе 1,47 % от поголовья, во 2-й группе – 0,37 %. В 1-й опытной группе гибели от микоплазмоза в ассоциации с эшерихиозом и других инфекционных болезней не было (рис. 5.56).

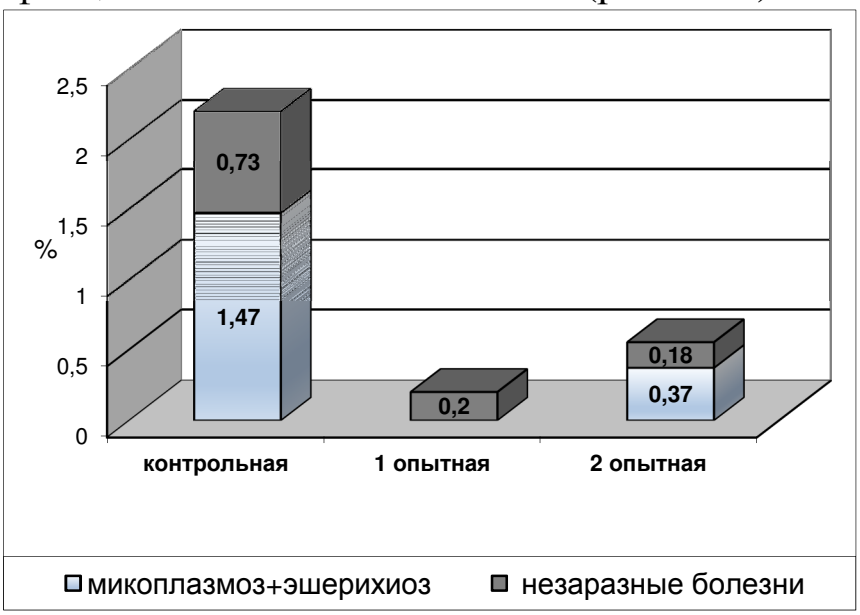


Рис. 5.56. Структура гибели цыплят-бройлеров после их лечения при респираторном ассоциативном микоплазмозе в производственных условиях

У цыплят 1-й группы аппетит был восстановлен на вторые сутки лечения, клинические признаки полностью исчезли к третьему дню лечения. Во 2-й группе аппетит был восстановлен на третьи сутки лечения, у отдельных особей отмечали серозные ринит и конъюнктивит на шестые сутки после применения тилозина тартрата, а хрипы сохранились до конца опыта. У цыплят контрольной группы аппетит был восстановлен лишь на пятые сутки лечения, клинические признаки у отдельных особей сохранились до конца выращивания цыплят. При прижизненном бактериологическом исследовании у цыплят 1-й опытной группы были выделены только культуры микоплазм в 6,7 % случаев. От бройлеров 2-й группы также были изолированы культуры микоплазм у 6,7 % цыплят и кишечная палочка в 26,7 % случаев в возрасте 37 и 42 дней. В контрольной группе микоплазмы были изолированы от 26,7 % цыплят, кишечная палочка – от 26,7 % в возрасте 37 дней, а к 42 дням этот показатель увеличился на 6,7 %.

По результатам серологического исследования в СКРА реагировали 6,7 и 53,3% цыплят контрольной группы в 37 и 42-дневном возрасте соответственно. Антитела в диагностических титрах в ИФА (более 1:450) также регистрировали в контрольной группе у 73,3 % цыплят со средним титром 1424±238 (табл. 5.46).

Таблица 5.46

Бактериологический и серологический контроли эффективности испытуемых схем лечения цыплят-бройлеров при респираторном ассоциативном микоплазмозе в производственных условиях

Группы	Возраст птицы, дней	Количество цыплят-бактерионосителей, %		Количество серопозитивных цыплят,%		
		M. gallisepticum	E. coli	СКРА	ИФА	
					%	ср. титр
Контрольная (по схеме хозяйства)	37	26,7	26,7	6,7	-	-
	42	26,7	33,3	53,3	73,3	1424±239
1-я опытная	37	6,7	0	0	-	-
	42	6,7	0	0	0	288±45
2-я опытная	37	6,7	26,7	0	-	-
	42	6,7	26,7	0	0	202±48

Примечание: «-» – исследование не проводили.

Таким образом, на основании клинических и лабораторных методов контроля эффективности применяемых схем наилучшие результаты при лечении цыплят-бройлеров при респираторном ассоциативном микоплазмозе были получены в 1-й опытной группе при использовании ципрофлоксацина и пробиотика «Астра-2». Применение данной схемы повысило сохранность бройлеров на 2 % и снизило количество цыплят-микоплазмоносителей на 20 % по сравнению со схемой, применяемой в хозяйстве.

5.6.7. Испытание схем профилактики респираторного микоплазмоза на птице родительского стада

С целью испытания схем профилактики респираторного микоплазмоза в родительском стаде из птицы кросса «Сибиряк» в возрасте 120–126 дней было сформированы контрольная и две опытных группы по 800 голов в каждой (табл. 5.47).

Ежедневно учитывали сохранность и клиническое состояние опытной птицы. При гибели птицы проводили патологоанатомическое и бактериологическое исследования. Контроль эффективности применяемых схем профилактики осуществляли с использованием серологического и бактериологического прижизненных методов диагностики через 14 дней после дачи антибактериальных препаратов, исследовали 3 % от поголовья.

Таблица 5.47

Испытание схем профилактики респираторного микоплазмоза на птице родительского стада в производственных условиях

Группы	Кол-во, гол.	Препарат доза,	Период дачи препарата
Контрольная (по схеме хозяйства)	800	биовит 5кг/т корма	1 раз в 15 дней
1-я опытная	800	ципрофлоксацин 10 мг/кг массы	5 дней подряд, ежемесячно
2-я опытная	800	тилозина тартрат 50 мг/кг массы	5 дней подряд, ежемесячно

Анализ полученных данных показал, что сохранность в опытных группах на протяжении всего опыта была выше, чем в контроле и с возрастом эта разница увеличивалась. Так, к 249 дням она была на 4,9 и 5,3 % выше контроля соответственно в 1 и 2-й опытных группах и составляла 97,9 и 98,3 % (рис. 5.57).

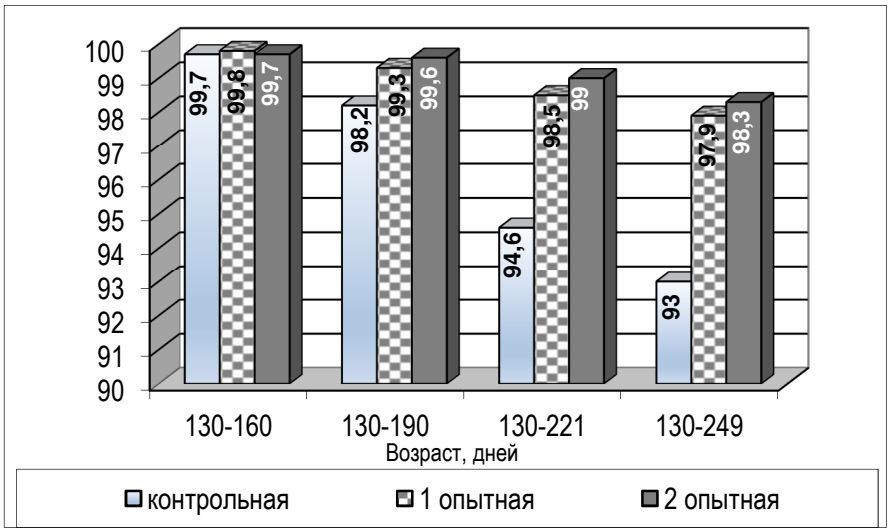


Рис. 5.57. Сохранность кур родительского стада при испытании схем профилактики респираторного микоплазмоза в производственных условиях

В структуре гибели птицы лейкоз составлял 0,4 % от поголовья во всех группах (рис. 5.58).

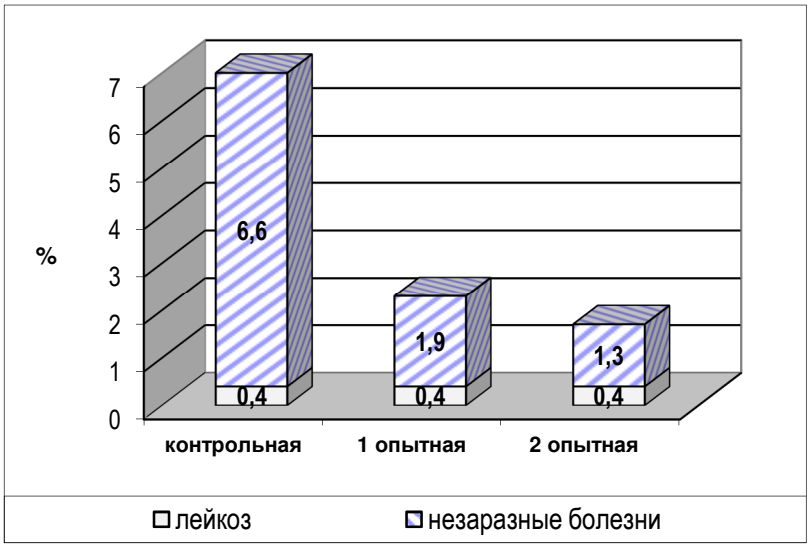


Рис. 5.58. Структура гибели птицы родительского стада при испытании схем профилактики респираторного микоплазмоза в производственных условиях

Яйценоскость в опытных группах также была выше по сравнению с контрольной группой на протяжении всего опыта. К 249 дням в 1 и 2-й опытных группах она составила 86,2 и 83 %, что на 3,8 и 0,6 % соответственно выше, чем в контроле (рис. 5.59).

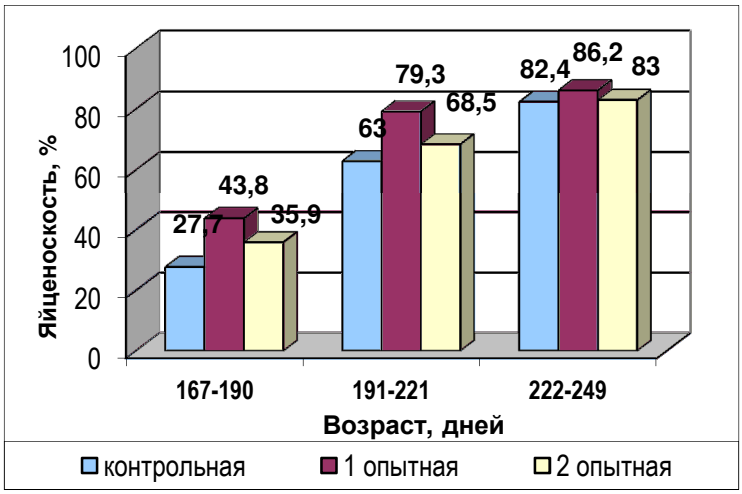


Рис. 5.58. Яйценоскость кур-несушек при испытании схем профилактики респираторного микоплазмоза в производственных условиях

При прижизненном бактериологическом исследовании соскобов с гортани от птицы 1 и 2-й групп культуры микоплазм были изолированы лишь в возрасте 212 и 249 дней соответственно от 13,3 и 20 % птицы, тогда как в контрольной группе (по схеме хозяйства) они были выделены уже в возрасте 156 дней от 26,7 % исследованной птицы, в 184 дня – от 60 % и в 212 и 249 дней от 100 % (табл. 5.48).

Таблица 5.48

Бактериологический контроль эффективности испытуемых схем профилактики микоплазмоза у птицы родительского стада

Группы	Количество птиц-микоплазмоносителей, %			
	156 дней	184 дня	212 дней	249 дней
Контрольная (по схеме хозяйства)	26,7	60	100	100
1-я опытная	0	0	20	20
2-я опытная	0	0	13,3	13,3

По результатам серологического исследования микоплаз-

мозные антитела в ИФА регистрировались в контрольной группе в возрасте 156 дней у 26 % птицы родительского стада со средним титром 976±284. С возрастом эти показатели увеличивались и к 249 дням количество серопозитивной птицы в контроле было 100 %, а средний титр увеличился более чем в пять раз и составлял 4995±329.

В 1 и 2-й опытных группах антитела в диагностических титрах регистрировали у птицы в возрасте 212 и 249 дней. При этом количество реагирующей птицы в эти сроки в ИФА в 1 и 2-й группах соответственно на 87–80 и 93–87 %, а в СКРА – на 93 % ниже, чем в контрольной группе (табл. 5.49).

Таким образом, применение ципрофлоксацина (1-я группа) и тилозина тартрата (2-я группа) на птице родительского стада в течение 5 дней ежемесячно позволило к 249 дням повысить сохранность птицы на 4,9 и 5,3 % соответственно, яйценоскость кур-несушек на 3,8 и 0,6 % и снизить количество птиц-микоплазмоносителей на 80 и 87%, по сравнению со схемой, применяемой в хозяйстве (биовит 1 раз в 15 дней).

Таблица 5.49

Серологический контроль эффективности испытуемых схем профилактики респираторного микоплазмоза на птице родительского стада

Группы	Количество серопозитивной птицы, %											
	156 дней			184 дня			212 дней			249 дней		
	СКРА	ИФА		СКРА	ИФА		СКРА	ИФА		СКРА	ИФА	
		%	ср. титр		%	ср. титр		%	ср. титр		%	ср. титр
Контрольная	13	26	976±284	40	53	2198±453	53	100	3469±272	100	100	4995±329
1-я опытная	0	0	0	0	0	0	7	13	812±62	7	20	1001±88
2-я опытная	0	0	0	0	0	0	0	7	1030±76	7	13	1103±111

Серологические тесты СКРА и ИФА являются ориентировочными при определении эффективности применяемых схем профилактики и лечения респираторного микоплазмоза у птиц по уменьшению количества реагирующей птицы в первом случае и снижению уровня антител во втором. Бактериологический метод с использованием элективных питательных сред позволяет выявить остаточное микоплазмоносительство у птиц и вносить корректировку в схемы.

Предложенные выше схемы могут быть рекомендованы для профилактики и лечения респираторного ассоциативного микоплазмоза птиц как отдельные элементы в общем комплексе мер борьбы и профилактики с данной болезнью.

5.6.8. Экономическое обоснование эффективных схем профилактики и лечения при респираторном и ассоциативном микоплазмозе птиц

По данным специальной литературы, экономический ущерб от респираторного микоплазмоза складывается из снижения яйценоскости на 5–50 % и привесов молодняка на 13–16%, задержки роста, развития и выбраковки молодняка – до 50–75 %; смертности цыплят – от 10–20 до 80 % при осложнении бактериальными и вирусными инфекциями, взрослых птиц – до 4–6 %, эмбрионов – от 8 до 30 % (Серебряков А.С. с соавт., 1970; Branton S.L., 1984; Коромыслов Г.Ф., 1987; Бессарабов Б.Ф., Мельникова И.И., 2001; Ley D.N., Yoder H.W., 2003).

В связи с этим для оценки предлагаемых нами схем лечения и профилактики ассоциативного микоплазмоза птиц в производственных условиях (испытуемые 1 и 2) было дано экономическое обоснование по их применению, в сравнении со схемами, применяемыми в хозяйстве (базовый вариант).

Профилактику ассоциативного микоплазмоза у цыплят-бройлеров проводили согласно схеме опыта, по 300 цыплят в группе (см. табл. 5.45).

1. Определение экономического ущерба, причиняемого ассоциированной инфекцией

А. $У_1$ – ущерб от падежа цыплят:

$$У_1 = М \times (Ст + (Вп \times Т \times Ц))$$

где *М* – количество павших цыплят (гол.); *Ст* – стоимость цыпленка при рождении (руб.) – 7 руб.; *Вп* – среднесуточный прирост живой массы (кг.) – 0,047; *Т* – возраст павших цыплят (дней); *Ц* – закупочная цена единицы массы – 54,50 руб.

$У_1$ (базовый) = 10 х (7 + (0,047 х 34 х 54,50) =941 (руб.);

$У_1$ (*новый 1)* = падежа от микоплазмоза в ассоциации с эшерихиозом не было;

$У_1$ (новый 2) = 1 х (7 + (0,047 х 29 х 54,50) = 81,3 (руб.).

Б. $У_2$ – ущерб от снижения прироста живой массы:

$$У_2 = Мз \times (Вз – Вб) \times Т \times Ц$$

где Мз – количество заболевших цыплят (гол.); *Вз, Вб* – среднесуточные привесы здоровых и больных цыплят в расчете на 1 гол. в сутки (кг); *Т* – средняя продолжительность болезни (дней); *Ц* – закупочная цена единицы массы – 54,50 руб.

$У_2$ (базовый)= 60 х (0,047 – 0,040) х 10 х 54,50 = 228,9 (руб.);
$У_2$ (новый 1) = не было;
$У_2$ (новый 2)= 20 х (0,047 – 0,040) х 3 х 54,50 = 22,9 (руб.).

В. *У* – фактический ущерб:

$$У = У1 + У2;$$

У (базовый) = 941+ 228,9 = 1169,9 (руб.);
У (новый 1) - нет;
У (новый 2) = 81,3+ 22,9 = 104,2 (руб.).

Г. $Ку_1$ – ущерб на одного заболевшего цыпленка:

$$Ку_1 = У : Мз,$$

где *У* – фактический ущерб; *Мз* – количество заболевших цыплят;

$Ку_1$ (базовый) = 1169,9 : 60 = 19,5 (руб.);
Ку1 (новый 2) = 104,2 : 20 = 5,21 (руб.).

Д. $Ку_2$ – ущерб на одного цыпленка стада:

$$Ку_1 = У : Мо,$$

где *У* – фактический ущерб; *Мо* – количество цыплят в стаде;

$Ку_1$ (базовый) = 1169,9 : 300 = 3,9 (руб.);
$Ку_1$ (новый 2) = 104,2 : 300 = 0,35 (руб.).

Ветеринарные затраты

Ж. *Ку*$_3$ – ветеринарные затраты на одного заболевшего цыпленка:

$$Ку_3 = Зв : З,$$

где *Зв* – общие ветеринарные затраты (стоимость препаратов, затраты труда – 6500 руб.); *З* – количество заболевших цыплят (голов);

Ку$_3$ (базовый) = 6590 : 60 = 109,8 (руб.);
Ку$_3$ (новый 2) = 6669 : 20= 333,5 (руб.).

И. *Пу* – предотвращенный экономический ущерб:

$$Пу = Мл \times Кл \times Ж \times Ц – У,$$

где *Мо* – количество цыплят в группе (голов); *Кз* – коэффициент возможной летальности (0,67); *Ж* – живая масса цыпленка, (кг); *Ц* – закупочная цена единицы массы (руб.); *У* – фактический ущерб;

Пу (базовый)= 300 х 0,67 х 2,02 х 54,50 – 1169,9 = 20958,2 (руб.);
Пу (новый 1)= 300 х 0,67 х 2,02 х 54,50 – 0 = 22128,1 (руб.);
Пу (новый 2)= 300 х 0,67 х 2,02 х 54,50 –104,2 = 22023,9 (руб.).

Экономический эффект (Эв):

Эв = Пу – Зв;

Эв (базовый) = 20958,2 – 6590 = 14368,2 (руб.);
Эв (новый 1) = 22128,1 – 6634= 15494,1 (руб.);
Эв (новый 2) = 22023,9 – 6669= 15354,9 (руб.).

Экономический эффект на 1 рубль затрат (Эр):

Эр = Эв : Зв;

Эр (базовый) = 14368,2 : 6590 = 2,1 (руб.);
Эр (новый 1) = 15494,1 : 6634 = 2,3 (руб.);
Эр (новый 2) = 15354,9 : 6669 = 2,3 (руб.).

При применении новых (1 и 2-й) схем профилактики, ущерб от падежа цыплят снизился на 941 руб. в первом случае и на 859,7 руб. – во втором, ущерб от снижения привесов соответственно на 228,9 и 206 руб., фактический ущерб на 1169,9 и 1065,7 руб., ущерб на одного заболевшего цыпленка на 19,5 и 14,3 руб., на одного цыпленка стада на 3,9 и 3,6 руб. Таким образом, был предотвращен экономический ущерб на сумму 22 128,1 и 22 023,9 руб. Экономический эффект на один рубль затрат составил 2,3 рубля.

Лечение ассоциативного микоплазмоза у цыплят-бройлеров проводили по 550 цыплят в группе согласно схеме опыта.

2. Определение экономического ущерба, причиняемого ассоциированной инфекцией

А. $У_1$ – ущерб от падежа цыплят:

$$У_1 = М \times (Ст + (Вп \times Т \times Ц)),$$

где *М* – количество павших цыплят (гол.); *Ст* – стоимость цыпленка при рождении (руб.) – 7; *Вп* – среднесуточный прирост живой массы (кг.) – 0,047; *Т* – возраст павших цыплят (дней); *Ц* – закупочная цена единицы массы – 54,50 руб.;

$У_1$ (базовый) = 8 х (7 + (0,047 х 36 х 54,50) = 793,7 (руб.);

$У_1$ (новый 1) = падежа от микоплазмоза в ассоциации с эшерихиозом не было;

У1 (новый 2) = 2 х (7 + (0,047 х 36 х 54,50) = 198,4 (руб.).

Б. $У_2$ – ущерб от снижения прироста живой массы:

$$У_2 = Мз \times (Вз – Вб) \times Т \times Ц,$$

где *Мз* – количество заболевших цыплят (гол.); *Вз, Вб* – среднесуточные привесы здоровых и больных цыплят в расчете на 1 гол. в сутки (кг); *Т* – средняя продолжительность болезни (дней); *Ц* – закупочная цена единицы массы – 54,50 руб.;

$У_2$ (базовый)= 550 х (0,047 – 0,040) х 10 х 54,50 = 2098,3 (руб.);
$У_2$ (новый 1) = 550 х (0,047 – 0,040) х 5 х 54,50 = 1049,1 (руб.);
$У_2$ (новый 2)= 550 х (0,047 – 0,040) х 6 х 54,50 = 1258,9 (руб.).

В. У – фактический ущерб:

$$У = У_1 + У_2;$$

У (базовый) = 793,7 + 2098,3 = 2892 (руб.);
У (новый 1) = 1049,1 (руб.);
У (новый 2) = 198,4 + 1258,9 = 1457,3 (руб.).

Г. $Ку_1$ – ущерб на одного заболевшего цыпленка:

$$Ку_1 = У : Мз,$$

где *У* – фактический ущерб; *Мз* – количество заболевших цыплят;

$Ку_1$ (базовый) = 2892 : 550 = 5,3 (руб.);
$Ку_1$ (новый 1) = 1049,1: 550= 1,9 (руб.);
$Ку_1$ (новый 2) = 1457,3 : 550 = 2,6 (руб.).

Ветеринарные затраты

Ж. $Ку_3$ – ветеринарные затраты на одного заболевшего цыпленка:

$$Ку_3 = Зв : З,$$

где *Зв* – общие ветеринарные затраты (стоимость препаратов, затраты труда – 3000); *З* – количество заболевших цыплят (голов);

$Ку_3$ = 3385 : 550 = 6,2 (руб.);
$Ку_3$ = 3123,5 : 550= 5,7 (руб.);
$Ку_3$ = 3371 : 550= 6,1 (руб.).

Предотвращенный экономический ущерб (Пу):

Пу = Мл х Кл х Ж х Ц – У,

где *Мо* – количество цыплят в группе (голов); *Кз* – коэффициент возможной летальности (0,67); *Ж* – живая масса цыпленка, (кг); *Ц* – закупочная цена единицы массы (руб); *У* – фактический ущерб;

Пу (базовый) = 550 х 0,67 х 2,02 х 54,50 – 2892,2= 37675,9 (руб.);
Пу (новый 1) = 550 х 0,67 х 2,02 х 54,50 – 1049,1 = 39519,1 (руб.);
Пу (новый 2) = 550 х 0,67 х 2,02 х 54,50 –1457,3 = 39110,9 (руб.).

Экономический эффект (Эв):

Эв = Пу – Зв;

Эв (базовый) = 37675,9 – 3385 = 34290,9 (руб.);
Эв (новый 1) = 39519,1 – 3123,5 = 36395,6 (руб.);
Эв (новый 2) = 39110,9 – 3371 = 35739,9 (руб.).

И. *Эр* – экономический эффект на 1 рубль затрат:

Эр = Эв : Зв;

Эр (базовый) = 34290,9 : 3385 = 10,1 (руб.);
Эр (новый 1) = 36395,6 : 3123,5 = 11,7 (руб.);
Эр (новый 2) = 35739,9 : 3371 = 10,6 (руб.).

Таким образом, при применении новых (1 и 2-й) схем лечения ущерб от падежа цыплят снизился на 793,7 руб. при применении 1 и на 595,3 руб. при использовании 2-й схемы, ущерб от снижения привесов соответственно на 1049,2 и 839,4 руб., фактический ущерб на 1842,9 и 1434,7 руб., ущерб на одного заболевшего цыпленка на 3,4 и 2,7 руб. Был предотвращен экономический ущерб на сумму 39 519,1 и 39 110,9 руб. Экономический эффект на один рубль затрат составил 11,7 руб. в первом случае и 10,6 руб. – во втором.

Профилактику респираторного микоплазмоза в родительском стаде проводили по 800 голов птиц в группе согласно схеме опыта.

3. Определение экономического ущерба, причиняемого инфекцией

А. $У_1$ – ущерб от недополучения племенных яиц:

$У_1$ = *(Рп.п. – Рф.п.) х Ся.п.*,

где *Рп.п.* – планируемое количество племенных яиц за месяц (на 800 несушек 18525,6 племенных яиц); *Рф.п.* – фактическое количество племенных яиц за месяц (шт.); *Ся.п.* – закупочная цена единицы продукции – племенного яйца (руб.);

$У_1$ (базовый)= (18525,6 – 14895,9) х 4,47 =16224,8 (руб.);
$У_1$ (новый 1) = (18525,6 – 16830,8) х 4,47 =7575,8 (руб.);
$У_1$ (новый 2)= (18525,6 – 15394,8) х 4,47 = 13994,7 (руб.).

Б. $У_2$ – ущерб от недополучения товарных яиц:

$У_2 = (Рп.т. – Рф.т.) х Ся.т.$,

где *Рп.т.* – планируемое количество товарных яиц за месяц (на 800 несушек 2058,4 товарных яиц); *Рф.т.* – фактическое количество товарных яиц за месяц (шт.); *Ст* – закупочная цена единицы продукции – товарного яйца (руб.);

$У_2$ (базовый)= (2058,4 – 1655,1) х 2,78 = 1121,2 (руб.);
$У_2$ (новый 1) = (2058,4 – 1862,2) х 2,78 = 545,4 (руб.);
$У_2$ (новый 2)= (2058,4 – 1752,2) х 2,78 = 851,2 (руб.).

В. У – фактический ущерб:

$У = У_1 + У_2;$

У (базовый) = 16224,8 + 1121,2 = 17346 (руб.);
У (новый 1) = 7575,8 + 545,4 = 8121,2 (руб.);
У (новый 2) = 13994,7 + 851,2 = 14845,9 (руб.).

Г. $Ку_1$ – ущерб на одну заболевшую курицу:

$Ку_1 = У : Мз,$

где *У* – фактический ущерб; Мз – количество заболевшей птицы;

$Ку_1$ (базовый) = 17346 : 900 = 19,3 (руб.);
$Ку_1$ (новый 1) -= 8121,2 : 180 = 45,1 (руб.);
$Ку_1$ (новый 2) = 14845,9 : 120 = 123,7 (руб.).

Ж. $Ку_2$ – ущерб на одну курицу стада:

$Ку_2 = У : Мо,$

где *У* – фактический ущерб; *Мо* – количество птицы в стаде;

$Ку_1$ (базовый) = 17346 : 900 = 19,3 (руб.);
$Ку_1$ (новый 1) -= 8121,2 : 900 = 9,02 (руб.);
$Ку_1$ (новый 2) = 14845,9 : 900 = 16,4 (руб.).

Ветеринарные затраты

$Ку_3$ – ветеринарные затраты на одну заболевшую курицу:

$Ку_3 = Зв : З,$

где *Зв* – общие вет. затраты (стоимость препаратов, затраты труда – 3000); *З* – количество птиц микоплазмоносителей (голов);

$Ку_3$ (базовый) = 3108 : 900 = 3,45 (руб.);
$Ку_3$ (новый 1) = 3315 : 180 = 18,4 (руб.);
$Ку_3$ (новый 2) =5250 : 120 = 43,8 (руб.).

Предотвращенный экономический ущерб (Пу):

Пу = Мо х Кз х (Рп.н. х Ся.п + Рт.н. х Ся.т.) – У,

где *Мо* – количество птиц в группе (голов); *Кз* – коэффициент возможной заболеваемости (1); *Рп.н.* – количество племенных яиц на несушку(шт.); *Ся.п.* – закупочная цена единицы продукции – племенного яйца (руб.); *Рт.н.* – количество товарных яиц на несушку(шт.); *Ся.т.* – закупочная цена единицы продукции – товарного яйца (руб.); *У* – фактический ущерб;

Пу (базовый) = 800 х 1 х (18,6 х 4,47 + 2,07 х 2,78) - 17346 = 53774 (руб.);
Пу (новый 1) = 800 х 1 х (21 х 4,47 + 2,33 х 2,78) - 8121,2 = 72198,8 (руб.);
Пу (новый 1) = 800 х 1 х (19,2 х 4,47 + 2,19 х 2,78) - 14845,9 = 58674,1 (руб.).

Экономический эффект (Эв):

Эв = Пу – Зв;

Эв (базовый) = 53774 – 3108 = 50666 (руб.);
Эв (новый 1) = 72198,8 – 3315 = 68883,8 (руб.);
Эв (новый 2)= 58674,1 – 5250 = 53424,1 (руб.).

Эр – экономический эффект на 1 рубль затрат:

Эр = Эв : Зв;

Эр (базовый) = 50666 : 3108 = 16,3 (руб.);
Эр (новый 1) = 68883,8 : 3315 = 20,8 (руб.);
Эр (новый 2) = 53424,1: 5250 = 10,2 (руб.).

Ущерб от недополучения племенных яиц снизился на 8649 руб. при применении 1-й схемы (новой 1) и на 2230,1 руб. – при использовании 2-й схемы (новой 2), 941 руб., от недополучения племенных яиц – соответственно на 575,8 и 270 руб., фактический ущерб на 9224,8 и 2500,1 руб., ущерб на одну курицу стада на 10,28 и 2,9 руб. Таким образом, был предотвращен экономический ущерб на сумму 72 198,8 и 58 674,1 руб. Экономический эффект на один рубль затрат составил 20,8 руб. в первом случае и 10,2 руб. – во втором.

6. МИКОПЛАЗМОЗЫ СОБАК, КОШЕК И СЕРЕБРИСТО-ЧЕРНЫХ ЛИСИЦ

В 1961 году В.Д. Тимаков и Г.Я. Каган предложили новый принцип классификации – этиологический, основанный на тропизме микоплазм к одинаковым оранам и тканям разных хозяев, который был дополнен в 1968 году Г.Я. Каган и И.В. Раковской. Так микоплазмы собак, кошек были отнесены к седьмой группе как условные комменсалы с неизученной патогенностью.

По данным литературных источников, наиболее часто микоплазмы от собак выделяют из верхних дыхательных путей, легких, половых органов и реже при конъюктивитах (Edward, 1954; Taulor-Robinson, 1969; Rosendal, 1978). Из влагалища и шейки матки чаще выделяют *M. canis, M. cynos, A. laidlawii*; из препуция, простаты и матки – *M. gateae, M. bovigenitalium, M. canis, M. cynos, M. opalescens*; из уретры, влагалища, препуция - уреаплазмы.

Окончательно роль того или иного вида микоплазм, ахолеплазм и уреаплазм не установлена. Однако при экспериментальном заражении интрабронхиально однодневных щенят *M. bovigenitalium, M. canis, M. cynos, M. sputans* (группа 2) и *M. gateae* (группа 1), ранее изолированных из легких собак, удалось воспроизвести некоторые патоморфологические изменения (Rosendal, 1978).

У экспериментально инфицированных щенят *M. cynos* развивался бронхит и перебронхит, сопровождавшийся нейтрофилией. Электронной микроскопией обнаружена деструкция эпителиальных клеток. Патоморфологически отмечают перебронхиальную и переваскулярную лимфоцетарную гиперплазию. Альвеолы заполнены нейтрофилами и разрушенными клетками. Через 3–5 недель после инокуляции у щенят наступает клиническое выздоровление.

M. bovigenitalium вызывает локальный бронхит и местное воспаление ткани. *M. canis, M. gateae* (группа 1) и *M. sputans*

(группа 2) не вызывают каких-либо патоморфологических изменений и клинических признаков болезни. Только *M. spumans* удается реизолировать из организма зараженных щенят (Rosendal, 1978).

R. Tan, J. Miles (1974) с 1969 по 1972 г. выделили от 236 больных кошек 407 штаммов микоплазм. Большинство из них было идентифицировано как *M. gateae, M. arginini, M. felis* и *A. laidlawii*. Частота выделения *M. felis* составляла 29,7 % у больных и 38 % у всех вскрытых кошек; *M. arginini* – 16,5 % у больных и 9,2 % у вскрытых; *A. laidlawii* – 0,5 % у больных. От клинически здоровых кошек чаще изолировали *M. felis* – 4,4 %; *M. arginini* – 6,7 %; *M. gateae* – 62,2 % и *A. laidlawii* – 22,2 %.

В основном были поражены дыхательные пути, отмечались конъюнктивиты, тонзиллиты, глосситы, уретриты, а также случаи дизентерии и различные пищевые отравления. Авторы пришли к выводу о том, что *M. felis* широко распространена в Новой Зеландии. Высокая частота её выделения от больных кошек говорит о том, что *M. felis* играет определенную роль при конъюнктивитах и различных респираторных заболеваниях. Кроме того, *M. felis*, вероятно, широко распространена среди отдельных популяций здоровых кошек, о чем свидетельствует её выделение из зева и наличие специфических антител, выявляемых в реакции связывания комплемента и пробе ингибиции роста, в сыворотках крови клинически здоровых животных.

Патогенность микоплазм, выделенных от кошек, окончательно не выяснена. В соответствии с данными J. Heyward et al. (1969), *M. gatae* может вызвать воспалительный процесс у этого вида животных.

При экспериментальном заражении *M. felis* в конъюнктиву и слизистую оболочку носовой полости 6–10-недельных котят наблюдали конъюнктивит, сопровождавшийся отеком и инфильтрацией лимфоцитами и макрофагами. У двух котят отмечали интерстициальную пневмонию. После заражения *M. arginini*, выделенной R. Tan et al. (1977) из легких кошек, 6–8-недельных ко-

тят в конъюнктиву и слизистую оболочку носовой полости интраперитонеально и интрапульмонально развилось только местное воспаление.

В 1996 году ученые из США D.F. Senior и M.B. Brown изучали болезнь под названием урологический синдром кошек (УСК) или заболевание нижних мочевыводящих путей. Синдром непроходимости уретры на уровне полового члена (губчатой части на уровне половой кости) у котов – это наиболее частое заболевание нижних мочевыводящих путей у кошек с полиэтиологичным характером. Исследователи старались выяснить, влияют ли микоплазмы, уреаплазмы на УСК, в результате чего пришли к выводу, что данные микроорганизмы могут быть причиной появления урологического синдрома.

Таким образом, приведенные данные показывают, что микоплазменная инфекция действительно широко распространена и является важным этиологическим аспектом при различных патологических состояниях (легочная, суставная, конъюнктивальная и урогенитальная формы).

6.1. Экспериментальные данные по микоплазмозу собак, кошек и серебристо-черных лисиц

Исследования были проведены в трех лабораториях: микст-инфекций кафедры эпизоотологии ИВМ ОмГАУ, электронной микроскопии кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, зоонозных инфекций НИИПИ, а также в хозяйствах, питомниках города Омска и Омской области.

В качестве объекта исследования служили собаки, кошки и лисицы, подозреваемые в заражении микоплазмозом. Материалом для исследования служила препуциальная и вагинальная слизь, полученная путем соскоба, а также пробы сыворотки крови от этих животных.

В экспериментальных условиях использовали: собак – 8, кроликов – 24, морских свинок – 24. Индикацию и идентифика-

цию возбудителей осуществляли микроскопическими методами, включающими и электронную микроскопию, а также бактериологическими и серологическими методами. Мазки окрашивали по Граму и Романовскому-Гимзе. Электоронно-микроскопическое исследование взвеси микоплазменных культур осуществляли путем просмотра ультратонких срезов в электроном микроскопе ЭМ–125. Контроль качества питательных сред для индикации микоплазм и уреаплазм осуществляли, пользуясь: методическими рекомендациями «Контроль качества питательных сред по биологическим показателям» (М., 1980).

В опыте использовали разработанные нами совместно с НИИПИ экспериментальные и контрольные питательные среды НИИЭМ имени Н.Ф. Гамалеи.

Чувствительность сред определяли методом десятикратных разведений референтных тест-штаммов *U. urealiticum, M. fermentans*, полученных из НИИЭМ имени Н.Ф. Гамалеи.

Селективность (специфичность) определяли методом десятикратных разведений референтных тест-штаммов *Staphylococcus aureus* WHO–2, *Proteus mirabilis, Echerichia coli* 9001, полученных из ГИСК имени Л.А. Тарасевича.

Стабильность биологических свойств сред определяли по показателям чувствительности и специфичности в разные сроки хранения в условиях холодильника.

Для серологической диагностики применяли: РНИФ, РПИФ, РТИФ, РА. При этом в качестве антигенов использовали референтный штамм *A. laidlawii* и полевые штаммы микоплазм, выделенные из биоматериала плотоядных животных, которые по культурально-морфологическим, биохимическим и ультраструктурным признакам были отнесены к *M. canis, M. fermentas, A. laidlawii, Ureaplasma*.

Видоспецифические сыворотки к полевым и референтному штамму микоплазм получали путем гипериммунизации кроликов по различным схемам: D. Schimmel (1967) и два метода D. Schimmel в нашей модификации: 1) с увеличением сроков

внутривенного введения антигенов на 3–4 дня; 2) сочетанным подкожным введением иммуностимулятора левамизола.

Специфические свойства полученных сывороток повышали путем добавления в них стафилококкового белка А, пользуясь: наставлением по применению стафилококкового реагента, содержащего белок А, сухого, разработанного НИИЭМ имени Пастера.

Для постановки РНИФ и РТИФ использовали ослиный антикроличий глобулин, меченый ФИТЦ (флуоресцеин изотиоционат натрия), изготовленный НИИЭМ имени Н.Ф. Гамалеи, а для РПИФ, применяли конъюгаты иммунных сывороток, полученных методом высаливания сернокислым аммонием и меченных ФИТЦ по методике Coons и Kaplan в модификации Riggs и Marshall.

В экспериментальных (на морских свинках) и производственных (на собаках) опытах использовали для бактериологических исследований микоплазм жидкие и плотные испытуемые среды, а для выделения сопутствующей микрофлоры (МПА, МПБ) элективные среды (Левина, Эндо, Плоскирева). Параллельно с культуральными методами проводили исследования на наличие антигенов микоплазм (*M. canis, M. fermentas, A. laidlawii, Ureaplasma*), а также других микроорганизмов (*Echerichia coli, Staphilococcus aureus, Proteus vulgaris*), выделенных в ассоциации с ними в РНИФ, РПИФ и антител в РТИФ.

Цифровые данные экспериментов обработаны методами математической статистики, принятыми в биологии и медицине с использованием таблиц Стьюдента (Усович А.Т., Лебедев П.Т., 1970), а также с использованием программы Microsoft Excel 97.

Наиболее простым и универсальным методом выявления уреаплазм и микоплазм является культуральный метод с использованием жидких и плотных питательных сред. Однако до недавнего времени в отечественной практике отсутствовали промышленные серийно выпускаемые среды для выделения этой группы микроорганизмов.

Нами совместно с НИИПИ были разработаны оригинальные технологии производства жидких и сухих питательных сред для диагностики ряда урогенитальных микоплазмозов, успешно прошедшие апробацию для индикации микоплазм у крупного рогатого скота, свиней и птиц. В предыдущих главах монографии изучена их специфичность, чувствительность, стабильность, элективность и сроки хранения.

6.1.1. Серологические методы изучения микоплазмоза. Схемы получения микоплазменных диагностических сывороток

Микоплазмы различных видов, выделенные от животных, трудно отличить друг от друга, хотя и существует некоторое своеобразие в быстроте роста, в морфологии колоний и клеточных элементов, а также в биохимических свойствах. Нелегко отдифференцировать их и по патогенным свойствам, так как они весьма непостоянны и воспроизвести заболевание не всегда удается. К тому же при длительном культивировании на бесклеточных питательных средах они могут утрачивать свою вирулентность. Поэтому серологические методы остаются основными для видовой типизации микоплазм, выделенных от животных. При этом наибольшее практическое значение имеет реакция иммунофлуоресценции.

Постановка серологических реакций требует набора специфических антигенов и антисывороток, получаемых различными способами и методами. Так, получить гипериммунные сыворотки можно путем внутривенного введения культур животным; инъекции культур с адъювантом внутримышечно, подкожно, внутрикожно, также сочетанного введения антигена с иммуностимулятором.

Для гипериммунизации использовали трехсуточные культуры микоплазм. Культуральную жидкость центрифугировали при 6 тыс. об/мин в течение часа. Осадок после трехкратного ресуспензирования в физиологическом растворе и последующего центрифугирования доводили до концентрации 1,7 млрд микробных тел в 1 мл по бактериальному стандарту мутности. Гипериммy-

низацию проводили на 24 кроликах (по две головы на каждый штамм) породы шиншилла весом 2,5–3 кг.

Диагностические сыворотки получали по различным схемам, выбрав из них затем наиболее рациональную и эффективную (табл. 6.1).

Таблица 6.1

Схемы гипериммунизации кроликов

Сроки гипериммунизации кроликов по разным схемам (дни)												
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**10**	**14**	**18**	**21**	**24**	**30**
1-я схема внутривенное введение антигена (млрд м.к.)												Полное обескровливание
0,85	1,7	1,7	1,7	3,4	3,4	3,4		3,4				
2-я схема внутривенное введение антигена (млрд м.к.)												
0,85			1,7			1,7	1,7	3,4	3,4	3,4	3,4	
3-я схема внутривенное введение антигена (млрд м.к.) + подкожное введение левамизола												
0,85+1мл 0,14 %	0,85+1мл 0,14%		1,7			1,7	1,7	3,4	3,4	3,4	3,4	
Сроки взятия крови												

1-я схема по методу D. Shimmel (1967): внутривенное введение кроликам антигена: в 1-й день – 0,5 мл; во 2, 3, 4-й – 1 мл; на 5, 6, 7 и 14-й – по 2 мл.

2-я схема по методу D. Shimmel в нашей модификации, суть которой инокуляция антигена кроликам с более длительным интервалом – через 3–4 дня.

3-я схема также по модифицированному нами методу D. Shimmel с применением подкожной инъекции иммуностимулятора левамизола при первом и втором введении антигена.

Титры антител учитывали на 7, 14, 21 и 30-е сутки после первого введения антигена в реакции непрямой иммунофлуоресценции. На основании проведенных исследований уровень антител был выше при иммунизации кроликов по III схеме.

6.1.2. Динамика иммунного ответа у кроликов в РНИФ после заражения их культурами микоплазм

Для постановки реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) готовили антигены (инактивированные на водяной бане

при температуре 70 ^{0}С в течение 30 минут) из гомологичных полевых штаммов микоплазм, использованных для гипериммунизации кроликов.

С целью повышения специфичности РНИФ применяли стафилококковый белок А. Принцип данного метода состоит в том, что Ig G сыворотки крови разных млекопитающих адсорбируется в различной степени на золотистом стафилококке, содержащем в клеточной стенке белок А. Ig G соединяется с белком А Fc-фрагментом. В результате Fab-фрагмент молекулы Ig G ориентируется наружу от бактериальной клетки, чем обеспечивает оптимальное соединение активного центра антитела с испытуемым антигеном. За счет этого повышается эффективность реакции антиген – антитело, так как антитела класса Ig G обладают к ряду антигенов большей специфичностью, чем антитела других классов иммуноглобулинов.

Приготовление специфического препарата. Содержимое флакона со стафилококковым реагентом за 2 часа до исследования растворяли в 2 мл дистиллированной воды и к этой взвеси добавляли 2 мл микоплазменной сыворотки крови кроликов. Смесь инкубировали на магнитной мешалке в течение часа при комнатной температуре. По окончанию процесса к содержимому флакона добавляли 5 мл 0,9 %-ного раствора хлорида натрия, после чего центрифугировали 20 минут при 3 тыс. об/мин. К образовавшемуся осадку добавляли 10 мл 0,9 %-ного раствора хлорида натрия (для получения 2 % взвеси), тщательно ресуспензировали и консервировали мертиолятом. Таким образом, получили суспензию стафилококкового реагента, сенсибилизированного специфической противомикоплазменной сывороткой.

Полученную суспензию сыворотки 0,1 мл титровали методом десятикратных разведений в 1 мл 0,9 %-ного раствора натрия хлорида. Разведения осуществляли, пользуясь аппаратом Флоринского.

Ход определения. При постановке РНИФ была использована следующая методика. На тщательно обезжиренные без цара-

пин предметные стекла наносили пастеровской пипеткой параллельно друг другу несколько капель антигенов. Антигены высушивали и фиксировали над пламенем спиртовки. Затем на каждую каплю антигена наносили такую же каплю сыворотки, начиная с последнего разведения. Стекла выдерживали во влажной камере при 37–38 ^{0}С, в течение 50–60 минут для образования комплекса антиген – антитело. После чего их промывали от несвязавшихся антител дистиллированной водой, подсушивали и наносили в красящем титре (подобранном опытным путем) ослиный антикроличий глобулин, меченый ФИТЦ (флуоресцеин изотиоционатом натрия), НИИЭМ имени Н.Ф. Гамалеи). Затем стекла помещали на 15–20 минут во влажную камеру при температуре 37–38 ^{0}С. По истечении этого времени мазки промывали дистиллированной водой, просушивали и просматривали в люминесцентном микроскопе, с обязательными контролями.

1. Антиген + сыворотка положительная + сыворотка люминесцентная;
2. Антиген + сыворотка отрицательная + сыворотка люминесцентная;
3. Антиген + физиологический раствор + сыворотка люминесцентная.

Микроскопию проводили в падающем свете микроскопа Люмам Р-8. Для оценки интенсивности свечения использовали четырех крестовую систему:

++++ – очень яркая люминесценция по периферии микробной клетки, четко контрастирующая с телом клетки;

+++ – яркая люминесцирующая периферия клетки;

++ или + – слабое свечение периферии клетки;

– (минус) люминесценция клеток отсутствует.

За положительный результат принимали яркое специфическое свечение контуров микробов в виде ободков с оценкой в 3 и 4 креста; сомнительные результаты оценивали в 2 креста при наличии слабого свечения контуров клеток.

Затем стекла помещали на 15–20 минут во влажную камеру при температуре 37–38 ^{0}С. По истечении этого времени мазки

промывали дистиллированной водой, просушивали и просматривали в люминесцентном микроскопе, с обязательными контролями.

4. Антиген + сыворотка положительная + сыворотка люминесцентная;
5. Антиген + сыворотка отрицательная + сыворотка люминесцентная;
6. Антиген + физиологический раствор + сыворотка люминесцентная.

Микроскопию проводили в падающем свете микроскопа Люмам Р-8.

Для оценки интенсивности свечения использовали четырехкрестовую систему:

++++ – очень яркая люминесценция по периферии микробной клетки, четко контрастирующая с телом клетки;

+++ – яркая люминесцирующая периферия клетки;

++ или + слабое свечение периферии клетки;

– (минус) люминесценция клеток отсутствует.

За положительный результат принимали яркое специфическое свечение контуров микробов в виде ободков с оценкой в 3 и 4 креста; сомнительные результаты оценивали в 2 креста при наличии слабого свечения контуров клеток.

Наиболее высокий средний уровень антител регистрировали во всех группах на 21–30-й дни после гипериммунизации, который колебался в пределах от 120±56,57 до 480±226,27. При этом показатели среднего титра антител в эти сроки у кроликов, гипериммунизированных по 3-й схеме с иммуностимулятором левамизолом, были выше (400±339,41 – 480±226,27), чем у животных 1-й и 3-й схем, и составляли 120±56,57 – 240±113,14 (рис. 6.1).

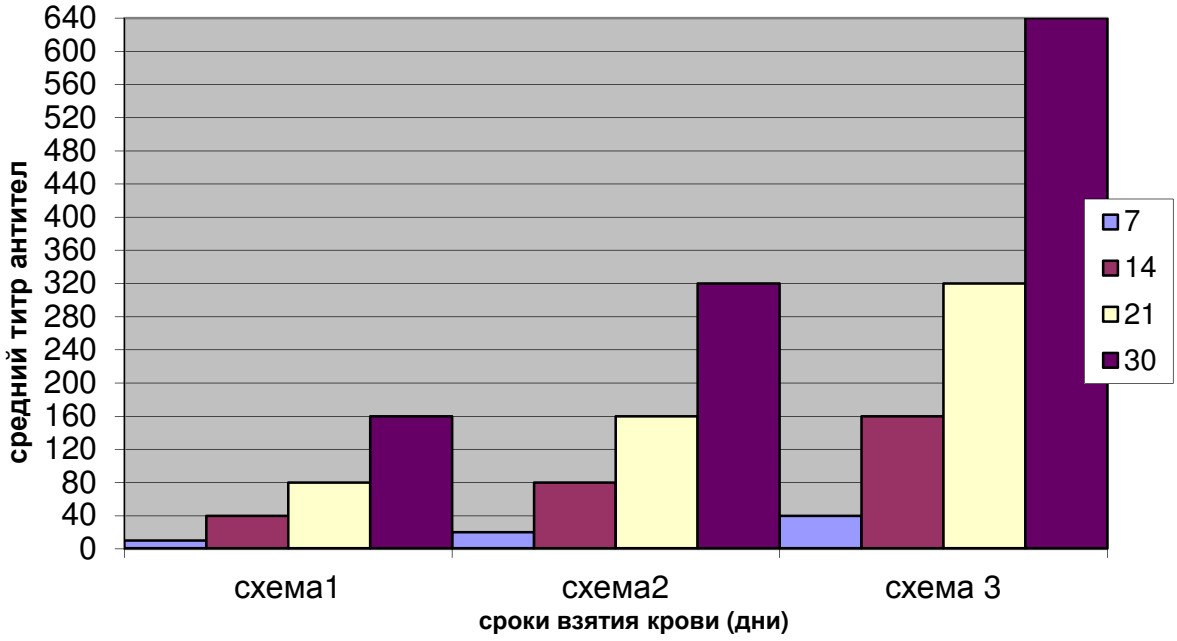


Рис. 6.1. Динамика синтеза антител у кроликов, гипериммунизированных культурами микоплазм

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что при гипериммунизации кроликов уровень антител растет быстрее при сочетанном введении микоплазм с иммуностимулятором левамизолом. Схемы 1 и 2-я являются менее эффективными по сравнению с 3-й, но в то же время они более практичны для получения достаточной концентрации противомикоплазменных антител при использовании их в реакциях иммунофлуоресценции.

РИФ является одной из высокочувствительных и специфичных серологических реакций, с помощью, которой можно проводить индикацию и идентификацию различных видов микоплазм, изучать их антигенные свойства и родство, эти знания необходимы для дальнейшего определения их роли в патологии урогенитального тракта мелких домашних животных и пушных зверей, а также для изучения патогенеза болезни. Данный тест можно использовать и как дополнительный метод бактериологической диагностики при постановке первичного диагноза на микоплазмоз.

6.1.3. Получение диагностических микоплазменных сывороток на собаках

В качестве антигенов для иммунизации собак использовали трехсуточные культуры микоплазм. Культуральную жидкость центрифугировали при 6 тыс. об/мин в течение часа. Осадок после трехкратного ресуспензирования и последующего центрифугирования доводили до концентрации 1,7 млрд микробных тел в 1 мл по бактериальному стандарту мутности. Антиген проверяли на чистоту, специфичность и активность по общепринятым методикам. Для иммунизации использовали беспородных щенков в возрасте 3–5 месяцев весом до 5 кг по две головы на каждый штамм микоплазм. Гипериммунизацию собак проводили аналогично 3-й схемы кроликов.

С целью повышения специфичности РА применяли стафилококковый белок А по методике, изложенной выше. Полученную суспензию стафилококкового реагента, сенсибилизированного противомикоплазменной сывороткой собак. 0,1 мл титровали методом десятикратных разведений в 1 мл 0,9 %-ного раствора натрия хлорида. Разведения осуществляли, пользуясь аппаратом Флоринского.

Титры антител учитывали на 7, 14, 21 и 30-е сутки после первого введения антигена в реакции агглютинации. Пробирочную РА ставили общепринятым методом, антиген для нее брали в концентрации 1,7 млрд микробных тел по оптическому стандарту мутности. Пластинчатую РА ставили на стекле. С гомологичными антигенами антисыворотки дали четкую положительную реакцию в пластинчатой и пробирочной РА на 7-й день – 5±7,07; 14-й – от 25±21,21 до 60±28,28; 21-й – 120±56,57 – 200±169,71; 30-й – 120±56,57 – 200±169,71 (табл. 6.2).

На основании проведенных исследований сделан вывод, что оптимальный срок взятия крови у собак при гипериммунизации микоплазменными антигенами – 21 день.

Таблица 6.2

Динамика синтеза антител у собак, гипериммунизированных культурами микоплазм

№ п/п	Культуры микоплазм	Сумарная доза иммунизации (млрд м. т.)	Средний титр агглютининов			
			сроки исследования в сутках			
			7 M±m	14 M±m	21 M±m	30 M±m
1	*M. canis*	19,55	5±7,07	50±14,14	200±169,71	200±169,71
2	*M. fermentas*	19,55	-	25±21,21	120±56,57	120±56,57
3	*A. laidlawii*	19,55	5±7,07	60±28,28	200±169,71	200±169,71
4	*Ureaplasma*	19,55	-	30±14,14	120±56,57	120±56,57

Примечание: млрд м. т. – миллиард микробных тел.

Иммунную сыворотку в объеме 10 мл помещали в химический стакан и смешивали с равным объемом 0,9 %-ного раствора натрия хлорида, затем добавляли 20 мл 60 %-ного насыщения сернокислый аммоний. Полученный раствор помещали в холодильник при температуре 4 ^{0}С на сутки, по истечении этого времени центрифугировали образовавшийся осадок при 3000 об/мин в течение 15 минут, осадок промывали 35 %-ным насыщенным сернокислым аммонием, затем растворяли в минимальном количестве дистиллированной воды и диализировали в течение 3 дней. Диализ осуществляли в мешочках из полупроницаемых оболочек и считали его оконченным после полного исчезновения сернокислого аммония из диализного мешочка и перехода его в диализационную жидкость, который контролировали реактивом Нейслера. Содержимое диализационного мешочка аккуратно переливали в пробирку. Мечение глобулиновой фракции проводили ФИТЦ по методу Coons и Kaplan в модификации Riggs и Marshall. Концентрацию белка в сыворотке крови собак определяли биуретовым колометрическим методом. Для этого нейтрализовали 10 мл белкового раствора, добавив к нему 10 % от объема белка 0,5 М. карбонатного буфера, для чего брали 1 мл 5,3 % карбонатного буфера и диализировали в течение суток, а осадок центрифугировали.

Затем нейтрализованный раствор белка в плоскодонной колбе помещали на магнитную мешалку в условиях холодильни-

ка, 4 ^{0}С. После начала смешивания постепенно увеличивали число оборотов, следя за тем, чтобы белок не вспенивался. В дальнейшем на поверхность раствора по каплям выливали отмеренное количество ФИТЦ из расчета 10 мг краски на 200 мг белка, предварительно растворив краску в 0,1 мл 3 %-ного раствора бикарбоната натрия.

Мечение ФИТЦ продолжали 16–18 часов на магнитной мешалке в условиях холодильника. Не связавшуюся краску удаляли, путем длительного диализа в течение 7–8 дней. Диализ осуществляли в мешочках из полупроницаемых оболочек, в которые вливали меченые иммуноглобулины. Верхний конец мешочка завязывали и погружали в жидкость для диализа. Диализационную жидкость меняли каждый день. Диализ заканчивали, когда пробы диализационных растворов, взятые за два идущих подряд дня, подсвеченные ультрафиолетовыми лучами, обнаруживали одну и ту же степень свечения.

Определение качества меченных флуоресцентных иммуноглобулинов осуществляли по следующим параметрам:

1) содержание белка;
2) содержание красителя;
3) титр антител;
4) оптимальное разведение реактива для окрашивания.

Содержание белка в реактивах по биуретовой реакции составило 20 мг/мл. Количество красителя определяли спектрофотометрически при длине волны 485 ммк, которое для флюоресцеина составляло $20 \cdot 10^{-3}$ мг/мл.

Титр антител определяли в реакции иммунофлюоресценции, путем раститровки меченных ФИТЦ сывороток, одновременно учитывали оптимальные параметры действия данного реактива (максимум специфической флюоресценции, минимум неспецифического свечения), оптимальное разведение составило 1:40.

Итак, в данном опыте определены оптимальные сроки взятия сыворотки крови у иммунизированных микоплазмами собак

на 21-й день после первого введения антигена. Изготовленный конъюгат для прямого метода иммунофлюоресценции позволит повысить специфичность реакции и сократить время диагностики микоплазмоза плотоядных животных.

6.1.4. Чувствительность и специфичность бактериологического и серологического экспресс-методов диагностики при экспериментальном микоплазмозе морских свинок

В опыте для моделирования микоплазмозной инфекции использовали полевые штаммы микоплазм (*M. canis, M. fermentas, A. laidlawii, Ureaplasma*), а также других микроорганизмов (*Echerichia coli, Staphilococcus aureus, Proteus vulgaris*), выделенных в ассоциации с ними от плотоядных животных г. Омска и Омской области.

Микоплазменный антиген готовили из трехсуточных культур, путем центрифугирования при 6000 об/мин и трехкратного ресуспензирования в 0,9 %-ном растворе натрия хлорида до концентрации 1,7 млрд микробных тел по оптическому стандарту мутности. Бактериальные антигены готовили из двухсуточных культур также в виде 1,7 млрд взвеси.

Мазки из патологического материала окрашивали по Граму и Романовскому-Гимзе.

Для бактериологического исследования использовали три специальные диагностические жидкие и плотные питательные среды для индикации аргинин- и глюкозоферментирующих микоплазм и уреаплазм. Для выделения сопутствующей микрофлоры применяли простые и элективные питательные среды: МПА, МПБ, Эндо, Левина, Плоскирева, агар Симмонса, молоко с метиленовым синим и углеводные Гисса, 3 %-ный раствор перекиси водорода для определения каталазной активности.

При серологической диагностике для выделения микоплазм, кокковой микрофлоры, протея использовали полученные в реакциях иммунофлуоресценции (РНИФ, РПИФ) антисыворотки крови кроликов. Серовары кишечной палочки определяли с помощью стандартного набора сывороток.

Для проведения опыта взяли 24 морские свинки, которых разделили на восемь групп. Семь опытных и одна контрольная (интактные животные) по три головы в каждой группе, из них один самец и две половозрелые беременные или находящиеся в охоте самки (табл. 6.3).

Таблица 6.3

Схема заражения морских свинок в эксперименте

№ группы	Микроорганизмы и их ассоциации
1	*M. canis + Echerichia coli, Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris*
2	*M. fermentas + Echerichia coli, Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris*
3	*A. laidlawii + Echerichia coli, Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris*
4	*Ureaplasma + Echerichia coli, Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris*
5	*Echerichia coli, Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris*
6	*M. canis + Ureaplasma*
7	*M. canis*
8	Контроль - интактные

Микроорганизмы в указанных выше дозах в объеме 1 мл вводили внутрибрюшинно, однократно, зафиксировав животное за холку и задние лапы так, чтобы голова его была направлена к низу. Кожу нижней части живота протирали 70-градусным спиртом, затем раздвигали шерсть и, сжав кожу складкой, вводили иглу в брюшную полость, держа шприц возле брюшного покрова. Иглу вводили не слишком глубоко и под углом не более 45^0, поэтому прокол кишечника был исключен.

После 14-го дня заражения, самка из 6-й группы абортировала. Других видимых клинических признаков болезни не наблюдалось. На 30-й день после заражения провели девитализацию всех морских свинок для бактериологического и серологического исследований патологического материала. При этом производили тотальный забор крови, из которой готовили диагностическую иммунную сыворотку для РНИФ.

При вскрытии было обнаружено, что почти все самки оказались беременными с разными сроками развития эмбрионов, видимых патологоанатомических изменений не было найдено. По результатам бактериологического и серологического исследований получены следующие данные (табл. 6.4, 6.5).

Таблица 6.4

Изучение чувствительности и специфичности испытуемых жидких и твердых питательных сред по показателям роста микоплазм в опыте на морских свинках

№ группы	Бактериологическое исследование патологического материала на питательных средах							
	простых		испытуемых					
	Жидкие	Плотные	Жидкие			Плотные		
	МПБ	МПА	У	Г	А	У	Г	А
1	+	+	-	+	-	-	+	-
2	+	+	-	+	+	-	+	+
3	+	+	-	+	-	-	+	-
4	+	+	+	-	-	+	-	-
5	+	+	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	-	+	+	-
7	-	-	-	+	-	-	+	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: У – уреаплазмы; Г – глюкозоферментирующие микоплазмы; А – аргенинферментирующие микоплазмы; «+» – наличие роста на питательных средах; «-» (минус) – отсутствие роста на питательных средах.

При сочетанном заражении морских свинок 1, 2, 3 и 4-й групп микоплазмами и бактериальной микрофлорой были выделены из органов соответствующие микоплазмы и микроорганизмы, которые применяли для заражения (*E. coli, S. aureus, P. vulgaris*).

У животных 5-й группы, инфицированных одними бактериями, из органов реизолированы исходные культуры бактерий, микоплазмы были не выделены. В 6-й группе от морских свинок, зараженных ассоциацией (микоплазма + уреаплазма), выделили возбудителей в сочетании с кишечной палочкой и стафилококком. У морских свинок 7-й группы, которых заражали одним видом микоплазм, был выделен специфический возбудитель *M. canis*. У контрольной 8-й группы микоплазмы и бактерии не выделены.

При серологическом исследовании мазков-отпечатков патологического материала от морских свинок в РНИФ со специфическими кроличьими микоплазменными сыворотками на наличие антигена видно, что наибольшее антигенное родство с микоплазмами имеет *A. laidlawii*, которая реагировала в перекрестных

реакциях с *M. canis* и *M. fermentans*. Перекрестных реакций между сопутствующей микрофлорой и микоплазмами не было обнаружено (см. табл. 6.5).

Таблица 6.5

Показатели чувствительности и специфичности испытуемых микоплазменных сывороток для РНИФ (РПИФ) в опыте на морских свинках

№ группы	Серологическое исследование патологического материала						
	Специфические сыворотки						
	M. canis	*M. fermentas*	*A. laidlawii*	*Ureaplasma*	*E. coli*	*St. aureus*	*Pr. vulgaris*
1	+	-	+	-	+	+	+
2	-	+	+	-	+	+	+
3	-	-	+	-	+	+	+
4	-	-	-	+	+	+	+
5	-	-	-	-	+	-	+
6	+	-	-	+	+	+	-
7	+	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: «+» (плюс) – положительная реакция; «-» (минус) – отрицательная реакция.

По результатам проведенного нами опыта видно, что специальные испытуемые диагностические питательные среды для индикации и идентификации микоплазм и уреаплазм обладают высокой чувствительностью в отношении данных микроорганизмов, и специфичностью, которая выражена в ингибиции роста других микробов находящихся в ассоциации вместе с микоплазмами. При этом результаты серологического метода исследования в РНИФ, РПИФ полностью совпадают с показателями бактериологического исследования и являются дополнительным высокочувствительным и специфичным методом диагностики микоплазмозной инфекции.

6.1.5. Чувствительность и специфичность усовершенствованных бактериологического и серологического экспресс-методов диагностики ассоциативного урогенитального микоплазмоза в контролируемом производственном опыте на собаках

Материалом для исследования служили собаки – кобели, суки старше года. Для проведения опыта по предварительным

данным бактериологического исследования были сформированы две группы животных, содержащихся в одинаковых условиях (в вольерах), у которых имелись незначительные отличия в рационе и системе ухода. Собаки первой группы, инфицированные микоплазмами, принадлежали питомнику УВД (поголовье немецких овчарок 30 голов) и муниципальному питомнику ЮКА (азиатские овчарки 30 голов). Собаки второй группы, у которых возбудитель микоплазмоза не был выделен – из питомника водоканала – поголовье кавказских овчарок из питомника фирмы «Алекс», по 30 голов от каждого.

Микоплазмоз – преимущественно хроническая инфекционная болезнь, поэтому характерных ярких клинических признаков у животных не было обнаружено. Предпосылками для проведения исследований являлся сложный симптомокомплекс различных патологий урогенитального тракта, выраженный в бесплодии самок и нарушении половой функции у самцов, рождении нежизнеспособного молодняка, послеродовых осложнениях в форме эндометритов, оваритов, сальпенгитов, цирвицитов; нарушениях в мочевой системе: нефриты, нефрозы, циститы, уретриты.

Индикацию и идентификацию возбудителей проводили по разработанной нами схеме, которая состояла из четырех этапов:

1) микроскопия нативных мазков (окраска по Граму и Романовскому-Гимзе);

2) экспресс-методы серологической диагностики (РПИФ, РНИФ, РТИФ);

3) экспресс-методы бактериологической диагностики, выделение чистых культур: микоплазм, сопутствующей микрофлоры;

4) идентификация выделенного возбудителя.

В мазках из урогенитального тракта опытных животных, окрашенных отрицательно по Граму и положительно по Романовскому-Гимзе, микоплазмы были величиной от 150–750 Нм. Они имели полиморфные формы: кокковидные, яйцевидные, кольцевидные, ветвистые и т. д., окрашивались от светлого до темно-красного цвета, находились в цитоплазме слущенных эпи-

телиальных клеток, макрофагов и внеклеточно. Остальная микрофлора урогенитального тракта представляла собой сочетания грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов шаровидной или палочковидной формы.

Нативные мазки также окрашивали методом РНИФ для выделения антигенов микоплазм, уреаплазм, стафилококков, стрептококков, протея, псевдомонад, при этом пользуясь антисыворотками, полученными на кроликах, и сыворотками кишечной палочки из стандартного набора. В РПИФ идентифицировали микоплазмы и уреаплазмы. Сыворотку крови исследовали методом РНИФ на наличие противомикоплазменных, стафилококковых, стрептококковых, псевдоманозных и к протею антител.

Для бактериологического исследования использовали три специальные испытуемые дифференциально-диагностические элективные жидкие и плотные питательные среды для индикации микоплазм и уреаплазм. Выделение сопутствующей микрофлоры производили вначале на простых (МПА, МПБ), а затем на элективных питательных средах (Эндо, Левина, среда Плоскирева, агар Симмонса, молоко с метиленовым синим и углеводные среды Гисса, 3 %-ный раствор перекиси водорода для определения каталазной активности) по общепринятым методикам.

Видовую идентификацию выделенных возбудителей проводили с помощью РНИФ и биохимических исследований выделенных культур. Результаты проведенных лабораторных исследований представлены в табл. 6.6–6.9.

Таблица 6.6

Показатели чувствительности и специфичности бактериологического метода исследования микоплазмоза плотоядных

Рост на питательных средах	1-я группа (60 голов) микоплазмоносители	2-я группа (60 голов) клинически здоровые
Жидкие		
Аргининферментирующие	12 / 20	-
Глюкозоферментирующие	18 / 30	-
Гидролизирующие мочевину	60 / 100	-
Плотные с содержанием 1,3% агара		
Аргининферментирующие	24 / 40	-

Глюкозоферментирующие	19 / 30	-
Гидролизирующие мочевину	60 / 100	-
МПА	60 / 100	60 / 100
МПБ	60 / 100	60 / 100

Примечание: числитель – количество, знаменатель % инфицированных животных от общего числа исследованных; «-» (минус) – рост микоплазм не выявлен.

Таблица 6.7

Показатели чувствительности серологических методов экспресс-диагностики микоплазмоза плотоядных

Возбудитель	1 группа			2 группа		
	Ат	Аг		Ат	Аг	
	РТИФ	РНИФ	РПИФ	РТИФ	РНИФ	РПИФ
M. canis	10 / 16,7	16 / 26,7	16 / 26,7	-	-	-
M. fermentas	12 / 20,0	24 / 40,0	24 / 40,0	-	1 / 1,7	1 / 1,7
A. laidlawii	10 / 16,7	12 / 20,0	12 / 20,0	-	-	-
Ureaplasma	52 / 86,7	60 / 100,0	60 / 100,0	-	1 / 1,7	1 / 1,7
Streptococcus albus	10 / 16,7	12 / 20,0	н / и	5 / 8,3	6 / 10,0	н / и
Staphilococcus aureus	16 / 26,7	24 / 40,0	н / и	14 / 23,3	16 / 26,7	н / и
Proteus vulgaris	16 / 26,7	20 / 33,3	н / и	12 / 20,0	14 / 23,3	н / и
Pseudomonas aeruginosa	4 / 6,7	6 / 10,0	н / и	5 / 8,3	6 / 10,0	н / и
Echerichia coli	6 / 10,0	10 / 16,7	н / и	5 / 8,3	12 / 20,0	н / и

Примечание: числитель – количество, знаменатель % инфицированных животных от общего числа исследованных; «-» (минус) – отрицательная реакция; н/и – не исследовали., Ат – антитела; Аг – антиген.

Таблица 6.8

Изучение специфичности реакций иммунофлуоресценции (РНИФ, РПИФ)

№ п/п	Антигены	Специфичные антисыворотки								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	*M. canis*	+	-	+	-	-	-	-	-	-
2	*M. fermentas*	-	+	+	-	-	-	-	-	-
3	*A. laidlawii*	-	-	+	-	-	-	-	-	-
4	*Ureaplasma*	-	-	-	+	-	-	-	-	-
5	*Streptococcus albus*	-	-	-	-	+	-	-	-	-
6	*Staphilococcus aureus*	-	-	-	-	-	+	-	-	-
7	*Proteus vulgaris*	-	-	-	-	-	-	+	-	-
8	*Pseudomonas aeruginosa*	-	-	-	-	-	-	-	+	-
9	*Echerichiacoli*	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Примечание: нумерация специфических сывороток соответствует нумерации антигенов.

Таблица 6.9

Сравнительный анализ бактериологического и серологических методов диагностики микоплазмоза

Возбудитель	1 группа						2 группа					
	среды			методы			среды			методы		
	% от общего числа						% от общего числа					
	У	Г	А	РТИФ	РНИФ	РПИФ	У	Г	А	РТИФ	РНИФ	РПИФ
M.C.	-	30	-	16,7	26,7	26,7	-	-	-	-	-	-
M.F.	-	30	20	20,0	40,0	40,0	-	-	-	-	1,7	1,7
A.L.	-	30	-	16,7	20,0	20,0	-	-	-	-	-	-
U.	100	-	-	86,7	100,0	100,0	-	-	-	-	1,7	1,7
St.	-	-	-	16,7	20,0	н / и	-	-	-	8,3	10,0	н / и
Staph.	-	-	-	26,7	40,0	н / и	-	-	-	23,3	26,7	н / и
Prot.	-	-	-	26,7	33,3	н / и	-	-	-	20,0	23,3	н / и
Pseud	-	-	-	6,7	10,0	н / и	-	-	-	8,3	10,0	н / и
Ech.	-	-	-	10,0	16,7	н / и	-	-	-	8,3	20,0	н / и

Примечание: У – уреаплазмы; Г – глюкозоферментирующие; А – аргининферментирующие микоплазмы; M. C. – *M. canis*, M. F. – *M. fermentans*, A. L. – *A. laidlawii*, U. – *Ureaplasma*, St. – *Streptococcus albus*, Stafph. – Staphylococcus aureus, Prot. – Proteus vulgaris, Pseud. – *Pseudomonas aeruginosa*, Ech. – *Echerichia coli*; «-» отриц. реакция; н/и – не исследовали.

По результатам исследования, представленным в таблицах, установлено, что предложенные методы достаточно эффективны и информативны в отношении микоплазмозной инфекции. Так, на специальных питательных средах для выделения микоплазм и уреаплазм ингибируется рост сопутствующей микрофлоры без отрицательного влияния на рост микоплазм. При этом индикация на жидких средах была параллельно подтверждена результатами роста на плотных средах (см. табл. 6.6). С помощью РНИФ и РПИФ удалось дополнительно выявить двух больных животных из второй группы (см. табл. 6.7).

Число животных зараженных микоплазмозмами (1-й группы), выявленных РТИФ было на 46,6 % меньше, чем в РНИФ и РПИФ, что, по-видимому, объясняется слабой иммуногенностью микроорганизмов и пониженной иммунореактивностью макроорганизма, стадийностью антителогенеза и индивидуальными особенностями животных. Поэтому данный метод может быть применен только в период обострения болезни.

По специфичности методов реакции иммунофлюоресценции (РНИФ, РПИФ) на выявление антигенов видно, что наибольшим антигенным родством к микоплазмам *M. canis* и*M. fermentans* обладает *Acholeplasma laidlawii*. Эти данные согласуются с результатами экспериментов на морских свинках, подробно изложенных выше.

Перекрестных реакций между посторонней микрофлорой и микоплазмами во всех случаях не выявляли (табл. 6.8). Из сравнении бактериологического и серологического методов видно, что результаты данных исследований, как правило, соответствуют друг другу, что способствует уточнению и повышению достоверности диагностики микоплазмоза (табл. 6.9).

6.2. Рациональная схема диагностики ассоциативного микоплазмоза плотоядных

Исследования, посвященные изучению роли микоплазм в инфекционной патологии животных, актуальны и современны. Накоплены сведения о распространении их в природе и роли при малоизученных болезнях урогенитального тракта. В то же время анализ научной литературы свидетельствует о том, что имеется очень много нерешенных проблем и разноречивых суждений, связанных с унификацией методик выделения и идентификации микоплазм и L-форм бактерий.

Развитие патологических процессов в органах урогенитального тракта, при которых особенно часто выделяются микоплазмы, происходит в несколько стадий. Первая стадия, вызываемая первопричиной болезни, очень часто бывает кратковременной и нередко протекает без отчетливо выраженных клинических признаков. Под действием защитных факторов организма и под влиянием антибиотиков, которые широко используются при лечении животных, микрофлора, осложняющая патологические процессы, а возможно, и основной этиологический фактор могут в инфицированном организме L-трансформироваться.

Поэтому изучение микоплазм не может вестись отдельно от других компонентов ассоциации, в которой они находятся. Касаясь методик выделения этих организмов, необходимо создавать такие условия анализа, которые гарантировали бы непосредственное выделение каждого агента из организма (рис. 6.10).

Рис. 6.10. Схема индикации и идентификации микоплазм из биоматериала

<table>
<tr><td>Микроскопия нативных мазков по Граму и Романовскому-Гимзе</td><td rowspan="3">Объект исследования (собака, кошка, лисица)</td><td>Взятие биоматериала на транспортную среду без ингибиторов</td><td>Взятие биопрепарата в пробирку</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Серологическое исследование нативных мазков РНИФ, РПИФ на наличие антигена во влагалищной и препуциальной слизи</td><td>Центрифугирование, фильтрация материала через мембранные фильтры</td><td>Высев на простые питательные среды МПА, МПБ</td></tr>
<tr><td>Высев на элективные (испытуемые) среды с ингибиторами с последующим изучением культурально-морфологических, биохимических свойств выделенных культур</td><td>Высев на элективные питательные среды Эндо, Левина, Плоскирева</td></tr>
<tr><td>РТИФ на наличие антител в сыворотке крови больных животных</td></tr>
</table>

Это позволит решить вопрос о том, какой этиологический фактор является главенствующим в возникновении заболевания, для чего требуется выделить и изучить всех возможных возбудителей болезни, при выяснении последовательности участия и взаимного действия каждого агента в развитии патологического процесса. Другими словами, установить этиологию заболеваний, при которых часто выделяются микоплазмы, можно только при комплексных исследованиях. Для дифференциации следует исключить: бруцеллез, хламидиоз, лептоспироз и специфических возбудителей других болезней, вызывающих различные поражения мочеполовых путей. Необходимо учитывать эпизоотологические данные, клинические признаки и результаты лабораторных исследований.

6.2.1. Экспресс-методы индикации и идентификации микоплазм как основные элементы схемы диагностики

Методика взятия биоматериала. Стерильными инструментами от животных берут кровь для исследования сыворотки на наличие микоплазмозных антител, а также соскоб со слизистой оболочки влагалища и препуция хирургическим полым зондом, содержимое зонда смывают в питательную среду для роста микоплазм без ингибиторов, предложенную НИИПИ. Эта, так называемая «транспортная среда» имеет все необходимые компоненты для роста микоплазм, но не содержит антибиотики, ингибирующие сопутствующую микрофлору урогенитального тракта.

Параллельно с посевом делают 2–3 нативных мазка со слизистой оболочки влагалища и препуция. Для этого на край чистого без царапин предметного стекла наносят каплю физиологического раствора. Затем стерильном полым хирургическим зондом делают соскоб со слизистой оболочки. При этом в полости зонда остается слизь, которую перемещают в физиологический раствор на предметное стекло, после чего вторым предметным стеклом проводят под углом 45^0 по поверхности первого стекла, в результате получался равномерный мазок по всей поверхности стекла. Стекла нумеруют и подписывают.

Дальнейшие исследования состоят из четырех этапов:

1) микроскопия нативных мазков (окраска по Граму и Романовскому-Гимзе);

2) экспресс-методы серологической диагностики (РПИФ, РНИФ, РТИФ);

3) экспресс-методы бактериологической диагностики, выделение чистых культур микоплазм, сопутствующей микрофлоры;

4) идентификация выделенного возбудителя.

Серологическую диагностику микоплазмоза проводят в двух направлениях – это обнаружение противомикоплазмозных антител в сыворотки крови или наличие антигена во влагалищной и препуциальной слизи. Антиген может быть дифференци-

рован в нативном мазке непосредственно от животного и в мазке, полученном из культуры.

В целях экспресс-диагностики урогенитального микоплазмоза плотоядных применяют реакцию непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ), реакцию прямой иммунофлюоресценции (РПИФ) и реакцию торможения иммунофлюоресценции (РНИФ).

Методика выявления антигена из нативных мазков в РНИФ, состоит в том, что мазки высушивают на воздухе и фиксируют над пламенем спиртовки. Затем наносят кроличьи иммунные сыворотки в рабочих разведениях, помещают их в чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой и ставят в термостат при 37 ^{0}С на 40 минут. Далее сыворотку смывают, трижды промывают дистиллированной водой и наносят антикроличью меченную ФИТЦ сыворотку, ставят во влажной камере в термостат при 37 ^{0}С на 15 минут. Затем препарат снова трижды промывают, подсушивают, накрывают сверху покровным стеклом и просматривают под люминесцентным микроскопом.

При учете реакций пользуются контролями: антиген + сыворотка положительная + люминесцентная сыворотка; антиген + сыворотка отрицательная + люминесцентная сыворотка; антиген + физиологический раствор + люминесцентная сыворотка.

Для выявления антигена из нативных мазков в РПИФ мазки высушивают на воздухе и фиксируют над пламенем спиртовки. Затем наносят собачий антимикоплазменный глобулин, меченный ФИТЦ (положительная люминесцентная сыворотка), ставят во влажную камеру в термостат при 37 ^{0}С на 15 минут. Затем препараты трижды промывают дистиллированной водой, подсушивают и просматривают под люминесцентным микроскопом.

При учете реакции пользуются контролями: микоплазменный антиген + положительная люминесцентная сыворотка; физиологический раствор + положительная люминесцентная сыворотка; гетерологичный антиген (бруцеллезный) + положительная люминесцентная сыворотка. Положительная реакция – яркое зеленоватое

свечение, в мазках, содержащих неродственный антиген или при отсутствии антигена, такого свечения не наблюдается.

Методика выявления антител из сыворотки крови методом торможения (блокирования) иммунофлюоресценции. На тщательно обезжиренные предметные стекла наносят несколько капель антигена. Антигены подсушивают и фиксируют над пламенем спиртовки, затем на каждую каплю антигена наносят такую же каплю исследуемой сыворотки. Стекла помещают в чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой и ставят в термостат при 37^{0}С на 40 минут, после чего их трижды промывают дистиллированной водой, подсушивают и наносят иммунные сыворотки в рабочих разведениях гомологичные нанесенным антигенам. По истечении времени стекла снова помещают во влажную камеру в термостат при 37 ^{0}С на 40 минут. Затем мазки промывают дистиллированной водой, подсушивают и наносят люминесцентную антикроличью меченную ФИТЦ сыворотку. Ставят в термостат во влажной камере при 37 ^{0}С на 15 минут, далее препарат трижды промывают дистиллированной водой, подсушивают, накрывают сверху покровными стеклами и просматривают под люминесцентным микроскопом.

Учет реакции проводят, пользуясь контролями:

1. Антиген + сыворотка положительная + сыворотка кроличья антимикоплазменная гомологичная антигену + люминесцентная сыворотка;

2. Антиген + сыворотка отрицательная + сыворотка кроличья антимикоплазменная гомологичная антигену + люминесцентная сыворотка;

3. Антиген + физиологический раствор + сыворотка кроличья антимикоплазменная негомологичная антигену + люминесцентная сыворотка.

Положительная реакция – отсутствие специфичного ярко-зеленого свечения, отрицательная – наличие свечения.

6.2.2. Микробиологическая диагностика микоплазмоза

Цель микробиологической диагностики – это выделение чистых культур для последующего их изучения.

Биоматериал, помещенный в «транспортную» среду, через сутки центрифугируют при 6 тыс. об/мин в течение часа. Надосадочную жидкость пропускают через мембранный фильтр, при помощи шприца, слабым движением поршня, культура проходит через мембранный фильтр и попадает в стерильную пробирку. Фильтрат пересевают на три среды – жидкие диагностические для индикации аргинин-, глюкозоферментирующих микоплазм и уреаплазм, разлитые в стерильные бактериологические пробирки с ватно-марлевыми пробками по 2 мл.

Осадок, оставшийся после центрифугирования, пересевают на простые и элективные среды (МПА, МПБ, Левина, Эндо, Плоскирева и т. д.) для выделения чистых культур сопутствующей (посторонней) микрофлоры.

Положительно реагирующие культуры, изменившие цвет на жидких микоплазмозных диагностических средах, пересевают на обычные питательные среды (МПА, МПБ) для проверки на бактериальную загрязненность, а также на плотные микоплазмозные диагностические среды при содержании 1,3 % агара Дифко с соответствующими субстратами ферментативной активности. При этом используют сухие диагностические среды для индикации аргинин-, глюкозоферментирующих микоплазм и уреаплазм, которые содержат тот же набор питательных компонентов, обогащающих добавок, субстратов ферментативной активности и ингибиторов, что и жидкие среды.

Поверхность плотных питательных сред просматривают под микроскопом при увеличении в 56–70 раз. При обнаружение типичных колоний их вместе с агаровым блоком отсеивают на жидкие специальные питательные среды с соответствующей ферментативной активностью. Если рост отсутствует, то проводят 3–5 последовательных слепых пассажей. Если в течение этого времени индикаторная среда не изменила цвет, то считается, что микоплазмы погибли при пересевах.

При подозрении на L-формы бактерий проводят 3–5 последовательных пассажей выделенных культур с трехсуточными интервалами на транспортной среде без ингибиторов для восстановления исходных форм бактерий.

После выделения чистых микоплазменных культур, проводят видовую идентификацию возбудителей на основании: культурально-морфологических, биохимических, гемолитических и серологических показателей.

Изучение культурально-морфологических свойств микоплазм. На жидких средах учитывают изменение цвета, прозрачности или наличие небольшого мутного или хлопьевидного осадка.

На плотных средах учитывают скорость роста микроорганизмов, вид колонии, которые в основном круглой формы с глубоко врастающим центром в агар и зернистой периферией. Кроме того, выявляют мелкие, зернистые колонии без особо выраженной центральной зоны, а у старых колоний центр, как правило, уплотнен, имеет более темный цвет, а периферия более зернистой (рис. 6.2–6.4).

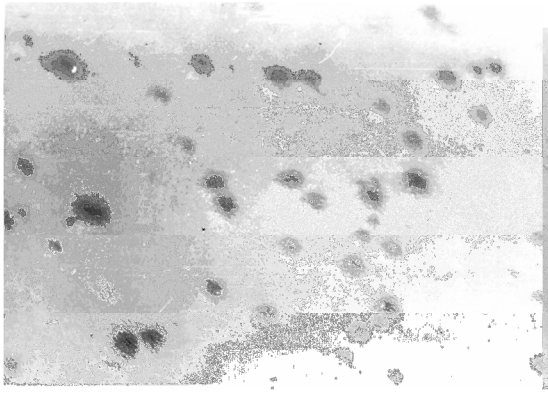


Рис. 6.2. Колонии уреаплазм (х 5)

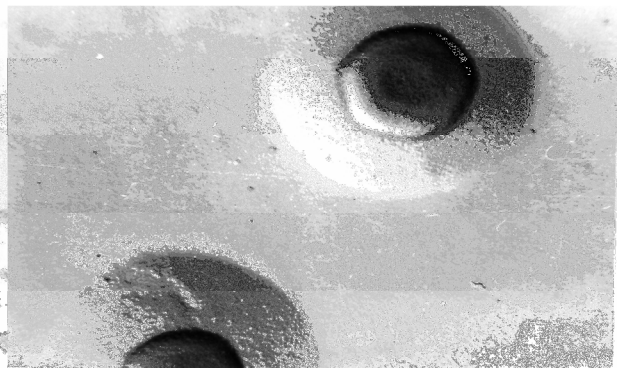


Рис. 6.3. Колонии микоплазм (х 70)

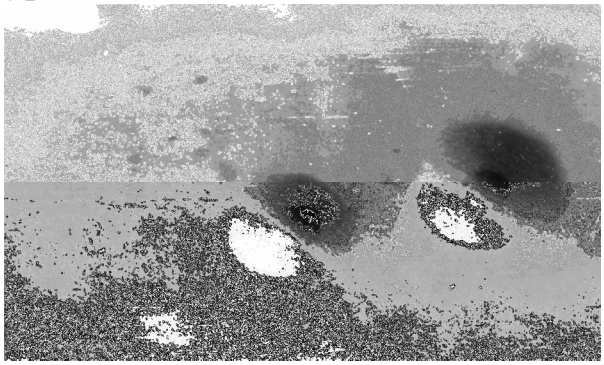


Рис. 6.4. Колонии ахолеплазм (х 50)

Быстрота роста и образования типичных колоний зависит от особенностей выделенной культуры, количества микробных клеток и от адаптированности к среде, на которую её пересеяли.

Для учета титра микоплазм используют подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл исходной культуры. Результаты учитывают подсчетом колоний в лунках 1,3 % агара, допуская что каждая колония получена из одной клетки. И методом титрации цветообразующей единицы (ЦОЕ), на жидкой индикаторной среде готовят 10-кратные разведения микоплазм. Инкубируют в термостате при 37 ^{0}С в течение трех суток. Наибольшее разведение микоплазм, при котором изменяется цвет среды, рассматривают как конечную точку титрации, содержащую одну ЦОЕ.

Для детального изучения морфологии колоний готовят их отпечатки на стеклах. Агаровый блок размером 1х1 см помещают колониями на предметное стекло, слегка придавливают и опускают под углом 45^0 в воду, нагретую до 90 ^{0}С. Агар расплавляется, сползает, а колонии фиксируются на стекле. Полученные отпечатки высушивают на воздухе, окрашивают краской по методу Романовского-Гимзе и микроскопируют.

Для изучения тинкториальных и морфологических свойств микоплазм из капли 72-часовой бульонной культуры микоплазм готовят мазки, высушивают на воздухе, фиксируют метиловым спиртом в течение 5 минут и окрашивают не разведенной краской Романовского-Гимзе в течение часа при температуре 37 ^{0}С. Мазки промывают и просматривают под иммерсионной системой микроскопа. Культуры преимущественно кокко-овоидно-перстеневидной формы размером 0,3–0,5 мкм розово-фиолетового оттенка. Иногда встречаются и фиолетовые шары размером 3–6 мкм, образования синего цвета величиной 2–6 мкм, единичные палочки, скопления зернистости и гомогенной массы с синеватым оттенком, в которые заключены микроструктурные элементы.

Для электронно-микроскопического исследования используют взвеси микоплазменных культур, фиксированных в смеси

глутарового и параформальдегидного растворов. После промывки их в фосфатном буфере и дополнительной фиксации в 1 %-ном растворе четырехокиси осмия, обезвоживают в спиртах восходящей крепости и ацетоне. Приготовленный материал заключают в араллдит. Ультратонкие срезы готовят на ультратоме УМТП–4. После контрастирования срезы исследуют в электронном микроскопе ЭМ–125. При просмотре срезов обращают внимание на форму микоплазм, которая обычно округлая, овальная, вытянутая, иногда в виде ракетки. Оболочка не имеет клеточной стенки, представляет собой трехслойную цитоплазматическую мембрану, два слоя осмиофильных и один между ними осмиофобный (рис. 6.5). Внутренняя структура представлена сильно контрастированным нуклеотидом и зернистыми тяжами, микрофибриллами, рибосомными, полисомными структурами (рис. 6.5–6.6).

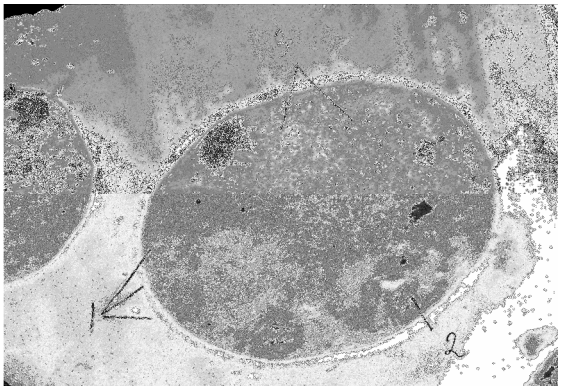


Рис. 6.5. Ультраструктура микоплазм (х 15000):
1 – трехслойная мембрана; 2 – нуклеоид; 3 – рибосомы и полисомы

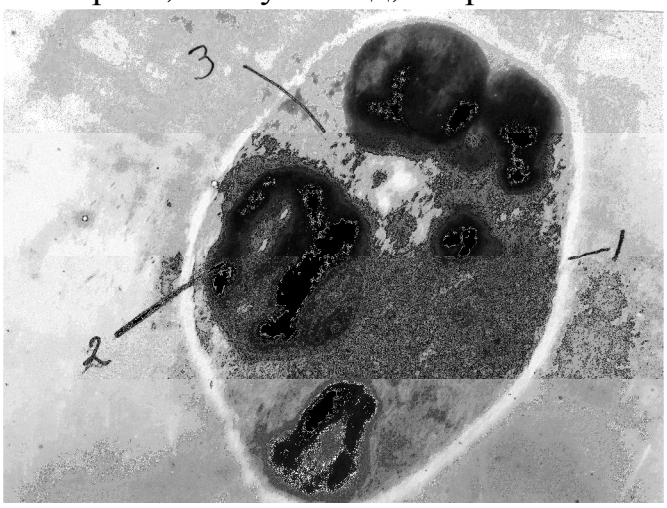


Рис. 6.6. Ультраструктура уреаплазмы (х 30000):
1 – трехслойная мембрана; 2 – сильно контрастированный нуклеоид; 3 – рибосомы и полисомы

6.2.3.Биохимические свойства микоплазм

При выделении микоплазм на жидких специальных диагностических средах производят дифференциацию по главному биохимическому признаку: глюкоза, аргинин, уреаза. Поэтому для видовой идентификации микоплазм плотоядных по ключу Soren Resenda l, были дополнительно изучены фосфотазная активность, редукция тетразола, гемолиз эритроцитов (табл. 6.11).

Таблица 6.11

Биохимические свойства микоплазм, выделенных от плотоядных животных

Возбудитель	Рост колоний	Ферментация глюкозы	Гидролиз аргинина	Фосфотазная активность	Редукция тетразола	Гемолиз эритроцитов	Уреазная активность
M. canis	Крупные с хорошо выраженным центром	+	-	-	-	+	-
M. fermentas	Крупные с хорошо выраженным центром	+	+	-	-	-	-
A. Laidlawii	Крупные с хорошо выраженным центром	+	-	-	-	-	-
Ureaplasma	Мелкие могут быть зернистые, ветвящиеся	-	-	-	+	-	+

Для определения фосфатазной активности на агаровые пластины, содержащие 0,01 % фенолфталеиндифосфат натрия, высевали культуры исследуемых штаммов, которые инкубировали в течение 5–7 дней. Агаровую среду при наличии колоний заливали 5-молярным раствором едкого натра по 1–2 мл на пластинку. Появление розового или красного окрашивания через 30 се-

кунд после добавления щелочи указывало на фосфатазную активность микоплазм.

Способность редуцировать 0,5 %-ный водный раствор 2, 3, 5-трифинилтетразолхлорида определяли на жидких средах, к которым добавляли его и вносили трехсуточную культуру микоплазм. Результаты проб учитывали в течение 7–10 дней инкубации в термостате при 37 ^{0}С. Окрашивание среды в красный цвет означало положительную реакцию.

Гемолитическую активность микоплазм изучали на плотной диагностической среде, к которой добавляли 5 %-ную суспензию эритроцитов барана. На указанную среду высевали трехсуточную культуру микоплазм и инкубировали при 37 ^{0}С. Ежедневно просматривали культуру микоплазм, отмечая зону гемолиза вокруг колоний.

6.2.4. Серологическая идентификация микоплазм

Для серологической идентификации микоплазм использовали методы иммунофлюоресценции – реакцию непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) и реакцию прямой иммунофлюоресценции (РПИФ). Эти методы являются специфичными, позволяющими определить видовую принадлежность изучаемых культур.

Идентификацию культур микоплазм, выделенных на жидких средах, проводили при помощи РИФ. В бульоне выращивали культуру микоплазм, затем осаждали её центрифугированием при 6000 – 8000 об/мин в течение часа, гомогенизировали, концентрируя осадок в 100 раз, и наносили на предметное стекло. При этом готовили столько препаратов, сколько имелось в наличии типоспецифических гипериммунных сывороток. Препараты высушивали на воздухе и фиксировали над пламенем спиртовки, затем окрашивали по методикам, используемым для окраски нативных мазков РПИФ и РНИФ.

Идентификацию колоний микоплазм, выделенных на плотных питательных средах, проводили в РПИФ и РНИФ. В чашку Петри с агаром, на котором были выращены колонии микоплазм,

наливали 2 мл фосфатно-солевого буфера (pH 7,2) и выдерживали 30 минут при комнатной температуре. Сливали раствор, наносили на агар 2 мл меченой ФИТЦ видоспецифической иммунной сыворотки в рабочем титре (при РНИФ – не меченую ФИТЦ иммунную сыворотку, также в рабочем титре), выдерживали 30 минут при 37 ^{0}С, затем сливали сыворотку, промывали поверхность агара тремя сменами буфера и переворачивали чашку для полного стекания жидкости. Окрашенные колонии просматривали под люминесцентным микроскопом

При РНИФ после промывки буфером от не связавшейся с колониями кроличьей антимикоплазменной сыворотки на чашку Петри с колониями культур микоплазм наносили в рабочем титре антикроличью меченую ФИТЦ сыворотку в количестве 2 мл в рабочем титре и выдерживали 15–20 минут при 37 ^{0}С. Затем сыворотку сливали, трижды промывали свежим буферным раствором и просматривали под люминесцентным микроскопом. Колонии, окрашенные гомологичной сывороткой, ярко флюоресцировали; гетерологичная сыворотка колоний не окрашивала.

Таким образом, схема индикации и идентификации микоплазм из первичного (нативного) биоматериала с помощью серологических экспресс-методов диагностики (РПИФ, РНИФ) позволяет выделить возбудителя инфекции в короткие сроки – за 30–60 минут. А наличие синтезируемых в организме антимикоплазмозных антител в сыворотке крови обнаруживается методом РТИФ в течение двух часов. Время бактериологического анализа по нашей схеме сокращается до трех суток. Анализ включает в себя культивирование не только микоплазм на специальных питательных средах, но и сопутствующей микрофлоры для изучения микст-форм инфекционного процесса. Данная методика поможет правильно и своевременно диагностировать ассоциативный микоплазмоз, что необходимо практикующим ветеринарным специалистам.

Предложенная нами схема идентификации может использоваться для определения видовой характеристики выделенных

культур с дальнейшим их применением в качестве антигенов серологических реакций, для изготовления вакцинных препаратов или для иммунизации лабораторных животных с целью получения лечебных или диагностических гипериммунных сывороток.

6.3. Внедрение схемы диагностики в производственных условиях для оценки эпизоотической ситуации по ассоциативному урогенитальному микоплазмозу плотоядных

В качестве объекта исследования использовали племенное поголовье собак, содержащихся в питомниках (водоканала, фирмы «Алекс», железной дороги, двух отделений УВД, муниципального ЮКА) и лисиц совхоза «Речной» Омского района, а также кошек, подозреваемых в заражении микоплазмозом, проходящих курс лечения в ветеринарных клиниках. Материалом для исследования послужили препуциальная и вагинальная слизь, полученные путем соскоба, а также сыворотка крови от этих животных.

В результате проведенных исследований (табл. 6.12), установлено, что 75,0 % собак от общего количества исследованных животных были заражены микоплазмозом. При этом поражен на 5,5 % больше сук, чем кобелей. Микоплазмоносительство среди лисиц было зарегистрировано в 65 % случаев от числа исследованных животных. Здесь так же, как и у собак, поражено самок на 21,4 % больше, чем самцов. Микоплазмоз кошек регистрировали у 68,7 %, при этом на 8,4 % больше было поражено котов. Анализ полученных данных показал, что в этиологической структуре микоплазмоза у собак и лисиц преобладают ахолеплазмы (67,5–55,0 %) и уреаплазмы (67,5–63,0 %) (табл. 6.13).

Таблица 6.12

Видовая и половая структура исследованных на микоплазмоз животных

Вид животного	Пол животного	Количество исследованных	Количество зараженных	% зараженных
Собаки	Кобели	70	50	71,4
	Суки	130	100	76,9
	Всего	200	150	75,0
Лисицы	Самцы	30	15	50,0
	Самки	70	50	71,4
	Всего	100	65	65,0
Кошки	Самцы	20	15	75,0
	Самки	60	40	66,6
	Всего	80	55	68,7

Таблица 6.13

Показатели микробиологических исследований на урогенитальный микоплазмоз

Название штамма	**Вид животного**			
	Собаки		**Лисицы**	
	всего реагирующих	% реагирующих от общего числа	всего реагирующих	% реагирующих от общего числа
M. canis	60	30,0	40	40,0
M. fermentans	105	52,5	50	50,0
A. laidlawii	135	67,5	55	55,0
Ureaplasma	135	67,5	63	63,0

Установлено, что у собак и серебристо-черных лисиц микропаразитоценоз урогенитального тракта представлен в основном ахолеплазмами (90–98,5 %), уреаплазмами (90–92,4 %) и микоплазмами (40–46,2 % и 70–80 %), а также микроорганизмами родов *Micrococcus, Staphylococcus, Streptococcus, Proteus, Pseudomonas, Echerichia*. У не реагирующих на микоплазмоз плотоядных выделяли те же микроорганизмы, что и у реагирующих, но их процентное соотношение в среднем было в 2–5 раз ниже, чем у микоплазмоносителей (табл. 6.14–6.15).

Таблица 6.14

Сравнительный состав микрофлоры урогенитального тракта собак и серебристо-черных лисиц

Состав микроорганизмов урогенитального тракта	Собаки		Лисицы	
	Микоплазмоносители, % от числа зараженных	Здоровые животные, % от общего количества животных	Микоплазмоносители, % от числа зараженных	Здоровые животные, % от общего количества животных
Micrococcus	20,0	11,5	30,8	6,0
Streptococcus	40,0	10,0	46,2	10,0
Staphylococcus	33,3	25,0	53,8	15,0
Proteus	10,0	2,5	23,08	5,0
Pseudomonas	15,0	5,0	23,08	5,0
Esherichia	44,0	20,0	53,8	20,0
M. canis	40,0	-	46,2	-
M. fermentas	70,0	-	80,0	-
A. laidlawii	90,0	-	98,5	-
Ureaplasma	90,0	-	92,4	-

Таблица 6.14

Показатели индикации и идентификации микоплазм, выделенных от плотоядных

Количество инфицированных животных	Выделено микоплазм на жидких средах			РНИФ (РПИФ), антигенная структура выделенных микоплазм			
	Г	А	У	M. C.	M. F.	A. L.	U.
СОБАКИ							
150	135/67,5	105/52,5	135/67,5	60/30,0	105/52,5	135/67,5	135/67,5
СЕРЕБРИСТО-ЧЕРНЫЕ ЛИСИЦЫ							
65	55/55,0	50/50,0	63/63,0	40/40,0	55/55,0	55/55,0	63/63,0
КОШКИ							
55	40/50,0	20/25,0	20/25,0	н/и	н/и	н/и	н/и

Примечание: в числителе количество, в знаменателе % инфицированных животных от общего числа исследованных; Г – глюкозоферментирующие; А – аргининферментирующие микоплазмы; У – уреаплазмы; M. C. – *M. canis*, M. F. – *M. fermentas*, A. L. – *A. laidlawii*, U. – *Ureaplasma*.

Сочетание двух и более микроорганизмов обнаружено во всех исследуемых пробах. Таким образом, на основании результатов проведенных исследований показано, что при наличии в организме животного микоплазменной инфекции начинает активизироваться условно патогенная микрофлора, приводящая к развитию дисбактериоза слизистой оболочки урогенитального тракта, в основном вызванном различными ассоциациями бактерий или кокковой группой микроорганизмов, которые обуславливают развитие воспаления катарально-гнойного характера.

С 1999 по 2002 год нами было проведено эпизоотологическое обследование шести хозяйств, занимающихся воспроизводством племенного поголовья собак в городе Омске. А именно питомники по содержанию служебных собак от Водоканала, фирмы «Алекс», от железной дороги, двух отделений УВД, муниципального ЮКА и одного звероводческого хозяйства – АОЗТ «Речной» Омского района Омской области по выращиванию серебристо-черных лисиц, а также животные (собаки, кошки), проходящие курс лечения в ветеринарных клиниках города.

При выяснении эпизоотической ситуации и этиологической структуры заболеваний животных на первом этапе нами были проведены клинико-эпизоотологические, бактериологические и серологические исследования взрослого, достигшего физиологической зрелости племенного поголовья. По результатам проведенных исследований выявили животных с клиническими признаками микоплазмоза, характеризующимися абортами, рождением мертвого или нежизнеспособного молодняка, эндометритами, циститами, уретритами, то есть хроническими болезнями мочеполовой системы, трудно поддающимися лечению.

При бактериологическом исследовании биоматериала от больных и подозреваемых в заражении животных было выделено и идентифицировано 4 вида возбудителей: *M. canis, M. fermentas, A. laidlawii, Ureaplasma*.

Важно отметить, что наряду с культурами патогенных микоплазм у значительной части животных были одновременно изолированы бактерии родов *Micrococcus, Streptococcus, Staphylococcus, Proteus, Pseudomonas, Echerichia*.

В ассоциативном течении принимали участие и различные рода из семейства *Mollicutes*. Так, у одних и тех же животных зачастую можно было выделить микоплазмы, уреаплазмы и ахолеплазмы.

После проведения ряда исследований у собак и пушных зверей (серебристо-черные лисицы) мы пришли к выводу о ши-

роком распространении у данной популяции в урогенитальном тракте: *M. canis, M. fermentans, A. laidlawii, Ureaplasma*.

При этом микоплазмоз протекает не в виде моноинфекции, а связан с различного рода бактериальными инфектами, такими как кокковая микрофлора, протей, хламидия и др., которые вызывают воспалительные процессы в органах мочеполовой системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Микоплазмозы широко распространены в различных странах мира среди людей, многих видов млекопитающих, птиц, растений и насекомых. В связи с широким распространением микоплазмозов, эта группа болезней в изучается по специальной международной программе ФАО/ВОЗ.

Микоплазмы длительно персистируют в организме хозяина, и обладают механизмами, направленными на ускользание от защитных систем, которое обусловлено прочным прикреплением к стенке клетки; сходством структуры и биохимического состава мембран с мембранами эукариотических клеток; присутствием в их мембране антигенов, перекрестно реагирующих с антигенами клетки хозяина; наличием структур и субстанций, препятствующих фагоцитозу или подавляющих его.

К активному разрушающему воздействию микоплазм относят свойство сохранять жизнеспособность в фагоцитах и оказывать повреждающее действие на макрофаги, что приводит к нарушению их функции и снижению резистентности организма (А.С. Серебряков, В.С. Осколков, 1966; С.В. Прозоровский и др., 1997). При этом в процессе репликации они используют из клеток макроорганизма аминокислоты, жирные кислоты-предшественники макромалекул, в том числе и ДНК. Образующиеся продукты обмена (аммоний, кислые продукты, пероксидаза, блокирующие метаболиты) нарушают нормальную функцию клеток макроорганизма. Кроме того, микоплазмы, преодолевая тканевый барьер, проникают в кровяное русло, в результате чего блокируют систему мононуклеарных фагоцитов.

Микоплазмы при попадании в половые пути вызывают катаральное воспаление слизистой оболочки. Воспаление сопровождается снижением количества гликогена в эпителиальных клетках, дистрофическими изменениями, а также сдвигом pH влагалищного содержимого в щелочную (уреаплазмы, аргинин-утилизующие микоплазмы) или кислую (глюкозоферментирую-

щие микоплазмы) сторону. При этом активизируется сапрофитная микрофлора, содержащаяся во влагалище; микоплазмы и другие микроорганизмы проникают восходящим путем в полость матки и другие участки полового аппарата, вызывая развитие эндометритов и сальпингитов. У естественно больных животных преимущественно отмечается хроническое воспаление (П.М. Митрофанов, И.А. Курбанов,1972). Поэтому, учитывая патогенез болезни, следует проводить своевременную диагностику микоплазмоза в ассоциации с сопутствующими микроорганизмами.

По данным литературных источников, для выделения из материала и идентификации микоплазм используют различные микробиологические, молекулярно-биологические и иммунологические методы (В.Д. Тимаков, Г.Я. Каган, 1973; С.Н. Борхениус, О.А. Чернова, 1989).

Для выявления глюкозоферментирующих, аргининферментирующих микоплазм и уреаплазм у человека, собак, кошек. и птиц были использованы селективные питательные среды, разработанные НИИ природно-очаговых инфекций и новые варианты сред для ветеринарии. Данные среды позволяют дифференцировать микоплазмы в зависимости от их ферментативной активности, они обладают высокой чувствительностью к микроорганизмам, относящимся к классу *Mollicutes*; селективной способностью, которая выражается в ингибиции роста стафилококков, протей и эшерихий, при этом, не влияет на скорость роста микоплазм и уреаплазм.

Анализ результатов проведенных нами исследований показал, что данные среды чувствительны и специфичны, могут использоваться для индикации и идентификации микоплазм выделенных из урогенитального тракта крупного рогатого скота. Предлагаемый культуральный метод прост в постановке, не требует специального оборудования, позволяет одновременно проводить как индикацию, так и дифференциацию возбудителей, оценивать эффективность лечения. В качестве дополнительных

тестов для диагностики микоплазмозной инфекции рекомендуют использовать серологические и иммунологические методы.

Эффективность различных методов лабораторной диагностики микоплазмоза и уреаплазмоза различна в зависимости от клинической формы инфекции. В то же время при всех исследованных нозологических формах отмечена высокая информативность серологических методов диагностики, которые позволяют в ряде случаев не только констатировать наличие генерализованного инфекционного процесса, но и выявить микоплазмозные воспалительные процессы нижних отделов гениталий, особенно при хронических заболеваниях (Ю.В. Вульфович с соавт., 1995).

Реакция иммунофлуоресценции позволяет быстро обнаруживать и четко отдифференцировать болезнетворные агенты, используя видоспецифичные сыворотки (О.В. Виноходов, 1965; П.М. Митрофанов и др.,1982; И.Л. Куликова, Т.А. Феоктистова, 1989; D.H. Ley, H.W. Yoder, 2003). С целью получения таких видоспецифичных сывороток в короткие сроки при достаточно высоком уровне антител нами была выбрана схема получения антисывороток к полевым штаммам микоплазм путем гипериммунизации кроликов по схеме D. Schimmel (1967) в модификации А.П. Красикова, Н.Н. Новиковой (2002) с дополнительным подкожным введением иммуностимулятора левамизола при первых двух внутривенных введениях антигена. Иммунизация кроликов данным методом позволила получить активные и специфичные в РНИФ сыворотки для диагностики микоплазмоза крупного рогатого скота, свиней и плотоядных животных.

По результатам наших исследований РНИФ не уступает по чувствительности бактериологическому методу исследования, а в некоторых случаях даже превосходит его. С помощью РНИФ можно изучать патогенез данного заболевания и проводить прижизненные методы исследования, индикацию и идентификацию выделенных микоплазм по их антигенной структуре. Используя микоплазмозные антигены, можно исследовать сыворотку крови на наличие антител, секрет вымени на наличие микоплазмозных

антител и антигенов, что дает преимущество данного метода перед бактериологическим с использованием индикаторных питательных сред, который исключает такую возможность.

Для выявления микоплазмозных антител в сыворотке крови некоторые исследователи применяли реакцию непрямой гемагглютинации, так как она чувствительна, специфична и может применяться в качестве простого и быстрого метода (Ю.В. Вульфович с соавт.,1995; П.М. Митрофанов, 1982; Н.Н. Шкиль, 2000).

В связи с этим нами были сконструированы стойкие специфичные и высокочувствительные эритроцитарные антигены для серологической диагностики в РНГА микоплазмоза крупного рогатого скота и свиней. При сравнении бактериологического и серологического методов установлено, что результаты данных исследований при микоплазмозах животных, как правило, совпадают.

Анализ данных отечественной и зарубежной литературы в отношении различных методик индикации и идентификации микоплазм из первичного материала показывает, что в основном современная диагностика микоплазмоза основывается на бактериологическом и молекулярно-генетическом подходах. Полученные первичные изоляты на специальных питательных средах для роста микоплазм подвергают дальнейшим исследованиям с помощью экспресс-методов: реакций иммунофлуоресценции (РНИФ, РПИФ, РТИФ), иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием поликлональных или моноклональных антител, полимеразной цепной реакции (ПЦР). Последний является не только более быстрым, но и наиболее точным, выявляя минимальное количество микоплазмозной ДНК.

Нами предложена схема индикации и идентификации микоплазм из первичного (нативного) биоматериала, основанная на комплексном подходе изучения ассоциативной формы микоплазмозной инфекции, легко выполнимая в производственных и лабораторных условиях.

При выявлении микоплазмозного антигена с помощью серологического экспресс-метода (РНИФ) время диагностики сокращается до 1 часа. Наличие в организме антимикоплазмозных антител в сыворотки крови, синтезируемых методом РНГА, также можно обнаружить через 1 час после постановки реакции. Бактериологический анализ, включающий культивирование не только микоплазм на специальных питательных средах, а также сопутствующей микрофлоры для изучения микс-форм течения инфекционного процесса, осуществим в течение одних-трех суток.

Данная методика поможет правильно и своевременно диагностировать ассоциативный микоплазмоз, что необходимо практикующим ветеринарным специалистам для разработки эффективных методов борьбы и профилактики с данной инфекцией. Предложенная схема идентификации может использоваться для определения видовой характеристики выделенных культур с дальнейшим их применением в качестве антигенов серологических реакций, изготовления вакцинных препаратов или для иммунизации лабораторных животных с целью получения лечебных или диагностических гипериммунных сывороток. Производственное испытание предложенной схемы диагностики ассоциативного урогенитального микоплазмоза подтверждает, что предложенные методы эффективны и информативны в отношении микоплазмозной инфекции.

На основании полученных результатов комплексных исследований цервико-вагинальной слизи, молока и сыворотки крови коров родильно-профилакторного периода, препуциальных смывов, спермы и сыворотки крови быков-производителей, патологического материала от абортированных плодов было установлено, что урогенитальный микоплазмоз крупного рогатого скота широко распространен в Омской области. Из 34-х обследованных хозяйств микоплазмоз отсутствовал только в трех, при этом в виде моноинфекции данная болезнь проявлялась лишь в 16 % хозяйств, а в остальных инфекционный процесс носил ассоциативный характер.

Комплексное применение бактериологических и серологических исследований позволит своевременно выявлять как больных, так и микоплазмоносителей и проводить лечебно-профилактические мероприятия при данной инфекционной болезни.

Выбор наиболее эффективных химиотерапевтических препаратов для лечения микоплазмоза необходимо проводить с учетом их активности в отношении полевых культур возбудителя. Анализ отечественной и зарубежной литературы, показывает, что антибактериальные препараты обладают высокой чувствительностью к различным группам антибиотиков, механизм действия которых связан с нарушением обменных процессов и подавлением синтеза внутриклеточного белка (A. Newnhman, H. Chu, 1965; Я.Р. Коваленко, М.А. Сидоров, И.А. Яблонская, 1971; В.И. Ежова, 1972). К таким антибиотикам относятся препараты тетрациклинового ряда (тетрациклин, окситетрациклин, хлортетрациклин), тилозин и некоторые другие макролиды, а также аминогликозиды (линкомицин, спиромицин). Характеризуя чувствительность микоплазм к нитрофуранам, A. Neuman, H.Chu (1965) указывают, что микоплазмы, выделенные от млекопитающих и птиц, ингибируются фурацилином и фурозолидоном. Синтетические химиотерапевтические средства, получившие название фторхинолоны обладают высокой активностью как к микоплазмам, так и к другим микроорганизмам (А.А. Климов, 2000; С.Ж. Грюджи-Оглы, И.М. Самородов, М.И. Рабинович, 2004). Мишенью их действия является ДНК-геназа – ключевой фрагмент бактериальной клетки, ответственный за нормальный процесс биосинтеза ДНК и, соответственно, за нормальный рост и деление клетки. Кроме подавления синтеза ДНК, фторхинолоны ингибируют также биосинтез РНК и белка в клетке. В мировой ветеринарной практике используют различные фторхинолоновые препараты: энрофлоксацин, дифлоксацин, сарафлоксацин, данофлоксацин, марбофлоксацин, норфлоксацин и ципрофлоксацин.

Результаты наших исследований согласуются с данными литературы. Так, микоплазмы, выделенные из урогенитального тракта крупного рогатого скота были наиболее чувствитель к препаратам фторхинолонового ряда норфлоксацину и ципрофлоксацину, а также тетрациклину, левомицетину. Менее чувствительны данные культуры микоплазм к сульфадимезину, тиланику, тилозину, триметаприму, тетратриметасулу и эритромицину.

При урогенитальном микоплазмозе наиболее эффективна схема лечения, включающая тетрациклин ПВП, окситоцин и ихтиоглюковит, а при ассоциативном урогенитальном микоплазмозе наиболее эффективными являются 3 схемы лечения: 1) окситоцин + бициллин-3 + ихглюковит + тетрациклин ПВП; 2) левотетрасульфин ПЭГ; 3) окситоцин + бициллин-3 + пункция по Логвинову + левоэритроциклин ПЭГ.

Комплексные антимикробные препараты (левотетрасульфин-ПЭГ, тетрациклин-ПВП, левоэритроциклин-ПЭГ), включенные в разработанные схемы, обладают широким спектром действия, как на микоплазмы, так и на выявленные бактериальные ассоциации.

Микоплазмоз-ассоциированая инфекция телят на сегодняшний день также остаётся актуальной проблемой для животноводства. По результатам эпизоотологического обследовния хозяйств Омской области нами установлено, что микоплазмоз телят имеет широкое распространение. Из 17 обследованных хозяйств с высоким уровнем гибели телят микоплазмоз отсутствовал только в четырёх хозяйствах, при этом в виде моноинфекции данная болезнь не регистрировалась.

Микоплазмы *M. arginini* и *Ureaplasma sp.*, обнаруженные у телят в хозяйствах Омской области, были аналогичны таковым, выделенным от коров родильно-профилакторного периода, что свидетельствует о передаче возбудителей от коров-матерей телятам. Дополнительно у телят был зарегистрирован вид *M. bovirhinis*. Изолированные микоплазмы обладали высой патоген-

ностью и стопроцентной летальностью. При этом индекс инфицированности органов белых мышей *M. bovirhinis* составил 96, *M. arginini* – 92, *Ureaplasma sp*. – 100.

Микоплазмоз у телят характеризуется развитием пневмоний, ринитов, кератоконъюнктивитов, артритов, а при вовлечении в инфекционный процесс эшерихий и сальмонелл – заболеваниями желудочно-кишечного тракта, что приносит хозяйствам значительный экономический ущерб. Поэтому основной задачей для ветеринарных специалистов является своевременное выявление и лечение больных животных.

Лечебный эффект при микоплазмозе телят был отмечен при применении антибиотиков из группы макролидов и тетрациклинового ряда: тилозина, эритромицина, спирамицина, окситетрациклина (В.А. Атамась и др., 1986).

Г.Ф. Коромыслов с соавт. (1987) не получили желаемого результата от применения эритромициновых, стрептомициновых, пенициллиновых препаратов, рекомендуя применять тилозин, спектомицин и линкомицин.

Для лечения телят, больных микоплазмозом, также рекомендуют применять вестин с альнорином (Н.А. Шкиль и др., 2004), вестин с левотетрасульфином (Ю.С. Аликин и др., 2006).

При ассоциативных инфекционных болезнях телят мы рекомендуем для лечения применять комплексный антимикробный препарат (КАП) и пробиотик Ветом 1.1 в сочетании с антибиотикотерапией (А.П. Красиков, В.И. Афанасенко, 2008).

По результатам проведённых исследований, микоплазмы, выделенные от телят, обладают наибольшей чувствительностью к тетрациклину и энрофлоксацину, менее чувствительны к эритромицину, сульфадимезину, тиланику.

Высокую эффективность наблюдали от применения схем лечения, включающих амоксициллин с левотетрасульфином, а также энрофлокс со стрептомицином.

После применения данных схем лечения телят экономические показатели уменьшились в 3 раза. Так, ущерб от падежа те-

лят только в одном хозяйстве снизился на 203 868 руб., ущерб от снижения привесов заболевших телят – на 70 754 руб., фактический ущерб от падежа и недополучения живой массы снизился на 274 323 руб., ущерб на одно заболевшее животное – на 56 руб., на одно животное стада – на 783 руб. Таким образом, был предотвращён экономический ущерб на сумму 313 506 руб. Экономический эффект на один рубль ветеринарных затрат составил 20 рублей.

Микоплазмоз свиней является весьма актуальной проблемой в свиноводстве. По результатам проведенных исследований в хозяйствах Омской и Тюменской областей установлено, что микоплазмоз свиней имеет широкое распространение, причем доля микоплазмоза в ассоциациях значительно больше, чем других инфекций. Из 15 обследованных хозяйств микоплазмоз был обнаружен во всех, при этом в виде моноинфекции он был зарегистрирован только в двух хозяйствах (13 %), а в остальных носил ассоциативный характер. По результатам биохимических исследований выделенные штаммы отнесены к микоплазмам: *M. hyorhinis, M. hyosynoviae* и *Ureaplasma sp*.

Наши исследования показали, что селективные микоплазмозные среды также чувствительны к микоплазмам, выделенным от свиней, и пригодны для их индикации и уреаплазм из цервико-вагинальной слизи от свиноматок, носовой слизи поросят и из патологического материала. Таким образом, их можно применять также и для диагностики микоплазмоза у свиней.

При сравнении диагностической ценности микробиологического и серологических методов диагностики микоплазмоза нами было установлено, что РНИФ и РНГА равноценны по чувствительности. Комплексное применение этих методов для исследования сыворотки крови и цервико-вагинальной слизи позволяет на 5–20 % (в среднем на 9 %) больше выявлять больных свиней и микоплазмоносителей. При этом положительные результаты РНГА и РНИФ подтверждаются выделением микоплазм из биоматериала при микробиологическом исследовании и

в ПЦР, что указывает на их высокую диагностическую ценность.

Комплексные микробиологические и серологические исследования позволяют своевременно выявлять как больных, так и микоплазмоносителей и проводить лечебно-профилактические мероприятия при данной инфекционной болезни.

За многолетний период изучения вопросов терапии микоплазмозов свиней испытаны различные препараты, предложено множество схем и методов их использования. Наиболее широкое практическое применение получили антибиотики. Несмотря на значительные успехи в области антибиотикотерапии, поиск новых препаратов продолжает оставаться актуальной проблемой. Это связано с возникновением антибиотикоустойчивых микроорганизмов, а также трудностями лечения животных при болезнях, вызываемых ассоциацией инфекционных агентов.

С середины 60-х годов большое значение при микоплазмозе свиней приобрел тилан (тилозин тартрат): Х. Эйкмайер и Х. Майер, 1967; В. Свитцер, 1964–1967 и др.; Д. Шиммель (1967), Д. Кингстон (1970) и другие подчеркивали высокие лечебно-профилактические свойства тилана.

А. Беттс, В. Беверидж (1953), Л. Бернфорс, К. Ланнек (1955), Д. Джолли (1965), Д. Шиммель (1967), В. Свитцер (1964), Х. Ян (1969) при микоплазмозах рогатого скота показали определенную эффективность стрептомицина, тетрациклиновых препаратов, неомицина, спирамицина и прочих антибиотиков. И.И. Грачев и А.Н. Евдокимов (1965) для лечения больных микоплазменной пневмонией поросят применяли окситетрациклин; тетрациклин и окситетрациклин (Н. Ланнек и С. Бернфорс, 1956; А. Беттс и Р. Кемпбелл, 1956, и др.). В последние годы достаточно перспективными считают фторхинолоны. Наибольшую популярность завоевал энрофлоксацин (Д.Ф. Осидзе, 1975; G.E. Kenny, 1987; S. Ruedinger, 1991; Г.Г. Полянская и др., 1993; В.Т. Ночевный и др., 2002; А.А. Климов, 2003; И.М. Самородов, 2004; и др.).

Микоплазмы, выделенные от свиней, были наиболее чувствительны к препаратам фторхинолонового ряда (энрофлокса-

цин, норфлоксацин), тетрациклинового ряда (тетрациклин, окситетрациклин), макролидам (тилан, тиланик, тилозин, тилозина тартрат), линкомицину, гентамицину. Менее чувствительны к ципрофлоксацину, левомицетину, сульфадимезину. Из применяемых схем лечения свиноматок от микоплазмоза наиболее эффективной была 1-ая с применением энрофлокса-5 %, а при лечении от микоплазмоза в сочетании с сальмонеллезом – 2-я с применением тетрациклина-ПВП. При лечении поросят от микоплазмоза и уреаплазмоза наиболее эффективной оказалась 1-я схема с применением линкомицина, а при смешанной инфекции микоплазмоза и пастереллеза – 2-я (энрофлокс-5 %) и 5-я (нитокс) схемы. Эффективным оказалось сочетанное применение при ассоциативном микоплазмозе свиноматок и поросят комплексных антибактериальных препаратов с бетулином (И.Е. Земляницына, 2013).

Применение разработанных нами рациональных и эффективных схем лечения в одном из базовых хозяйств позволило предотвратить экономический ущерб на сумму 57 936 рублей и получить экономический эффект 4,8 рубля на один рубль ветеринарных затрат. Внедрение данных схем лечения в хозяйствах с поголовьем 1000 голов позволит получить экономический эффект 193 120 рублей.

Возбудителем респираторного микоплазмоза птиц является наиболее патогенный вид микоплазм – *Mycoplasma gallisepticum*, который вызывает инфекционное заболевание у кур и индеек и характеризуется поражением органов дыхания и хроническим течением болезни.

Mycoplasma gallisepticum также обладает механизмами, направленными на противостояние защитным системам организма (прочное прикрепление к стенкам клетки; присутствие в мембране антигенов, перекрестно реагирующих с антигенами клетки хозяина; наличие структур и субстанций, препятствующих фагоцитозу или подавляющих его). Кроме этого, возбудитель способен сохранять жизнеспособность в фагоцитах и оказы-

вать повреждающее действие на макрофаги, что сопровождается нарушением их функции и снижением резистентности организма. Микоплазмы вступают в синергические отношения с вирусной и бактериальной условно-патогенной микрофлорой, создают условия для их активного роста и развития (Штипкович Л., 1987). В инфекционный процесс вместе с микоплазмами часто вовлекаются вирусы инфекционного бронхита, ларинго-трахеита и оспы.

У птицы, переболевшей микоплазмозом, после применения различных вакцин не вырабатывается напряженный посвакцинальный иммунитет к бактериальным и вирусным инфекциям (Йовчев Е., Лозанов Л., 1973).

Респираторный микоплазмоз зарегистрирован на четырех (33,3 %) птицефабриках Омской области, на одной птицефабрике Новосибирской области (9 %) и на 9 (47 %) Алтайского края. При этом микоплазмоз протекаетчаще всего в ассоциации с эшерихиозом, стафилококкозом, реже с пастереллезом и реовирусным теносиновитом, что согласуется с данными полученными Фоминой А. Я. (1968), Серебрякова А. С. (1970) и Коромысловой Г.Ф. (1987). Причем из всех ассоциаций эшерихиоз встречался наиболее часто. Так, на одной из исследуемых птицефабрик Омской области микоплазмоз в ассоциации с эшерихиозом зарегистрирован в 72 % случаев. Наиболее часто встречали серотипы кишечной палочки: O_1, O_3, O_{20}, O_{78}, O_{103}, O_{111}, O_{119}. В пределах одного хозяйства регистрировали два, реже – три серотипа. Вместе с тем, по данным А.А. Терентьева (2000), в Саратовской области среди птиц циркулируют серотипы: O_1, O_2, O_8, O_{78}, O_{111}.

По нашим наблюдениям, в спонтанных условиях птица восприимчива к эшерихиозу с суточного, а к респираторному микоплазмозу – с 20-дневного возраста, что согласуется с данными О.В. Виноходова (1976), А.Г. Грошевой (1980), Н.А. Радчук (1990), А.А. Терентьева (2000).

Распространению респираторного микоплазмоза и эшерихиоза на птицефабриках Омской области способствуют предрас-

полагающие факторы: нарушение температурного режима, недостаточный воздухообмен, переуплотнение птицы, применение живых вакцин против вирусных инфекций.

Мясная птица более восприимчива к микоплазмозу, чем птица яичных пород: число кур, положительно реагировавших с цветным микоплазмозным антигеном, достигало к 300-дневному возрасту 100 % и удерживалось на этом уровне до конца жизни.

Ассоциативные формы течения инфекционных болезней осложняют эпизоотическую ситуацию, затрудняют диагностику, профилактику и меры борьбы с ними. Материалы, полученные при изучении эпизоотической ситуации и клинической картины ассоциированного течения респираторного микоплазмоза и эшерихиоза птиц в хозяйствах Омской области, в основном подтверждают выводы отечественных исследователей (Терентьев А.А., 2000, Гусев В., 2003) и показывают, что эта инфекция в настоящее время считается одной из распространенных болезней бактериальной природы.

При экспериментальном воспроизведении ассоциированного течения респираторного микоплазмоза с эшерихиозом у цыплят установлено, что инкубационный период составил 6–18 часов. Клиническое проявление болезни в начальный период характеризуется общим угнетением, отказом от корма, тяжелым дыханием, взъерошенным оперением, скучиванием птицы небольшими группами. В дальнейшем угнетение усиливается, птица не реагирует на раздражитель, наблюдается расстройство пищеварения, дыхания. При спонтанном заражении у цыплят наблюдали сходные, но менее выраженные клинические признаки. При этом результаты наших исследований согласуются с данными В.А. Шубина (1978) и Н.А. Радчук (1990).

Основные патологоанатомические изменения при респираторном микоплазмозе, ассоциированном с эшерихиозом, локализуются в сердце, легких, воздухоносных мешках, печени, селезенке, кишечнике в виде серозного, серозно-фибринозного и фибринозного воспаления. Участие *E. coli* в ассоциативном ин-

фекционном процессе проявляется развитием фибринозного воспаления перикарда, капсулы печени, воздухоносных мешков и брюшины. Результаты наших исследований согласуются с данными, полученными другими исследователями (Фомина А.Я., Грошева Г.А., Серебряков А.С. , Шубин В.А., Осколков В.С., 1968), которые указывают, что при одновременном заражении культурами *E. coli* и *M. gallisepticum* патолого-анатомические изменения, развивающиеся у птиц, характеризуются острым фибринозным перикардитом, перигепатитом и аэросаккулитом. Т.А. Мандрусова, А.И. Молев и др. (2003) подтверждают у павшей птицы развитие серозно-фибринозного перикардита, перигепатита, желточного перитонита и энтероколита.

Анализ проведенного нами эксперимента позволил установить степень выраженности патологических изменений в динамике в зависимости от продолжительности болезни. Выявленные клинико-анатомические признаки, морфологические и иммунологические данные дают основание считать *M. gallisepticum* основным этиологическим фактором болезни. По мнению И.А. Ибрагимова (1986), микоплазмы, сенсибилизируя организм, создают патогенетическую основу для развития эшерихиоза, который определяет проявление и исход смешанной респираторной инфекции у птиц.

Морфометрическими исследованиями центральных и периферических органов иммуногенеза цыплят при экспериментальном заражении культурами *Mycoplasma gallisepticum* и *E. coli* установлено, что масса цыплят опытной группы была достоверно ниже контрольной (интактной) на протяжении всего опыта. Наибольшее отставание (на 41 %) отмечается в возрасте 42 дня. У цыплят опытной группы абсолютная и относительная массы тимуса достоверно ниже во всех исследуемых периодах (исключение составляет относительная масса через 21 день после заражения $P>0.05$). Расчеты показали, что тимусный индекс в опытной группе был ниже, чем в контроле на протяжении всего опыта.

В опытной группе абсолютная и относительная масса бурсы Фабрициуса достоверно ниже аналогичных показателей в интактной группе, более выраженные различия были на 21-й день исследования на 3,84 г и 0,24 % соответственно. Абсолютная и относительная массы селезенки в первую неделю после заражения были выше, чем в контроле в 2,5 и 1,2 раза соответственно. В дальнейшем отмечали тенденцию к уменьшению органа. Через 14 и 21 день после заражения абсолютная и относительная массы его были ниже, чем в контрольной, причем на 21-й день – достоверно ($P<0,05$). Относительная масса печени у инфицированных цыплят в первую неделю достоверно превосходила контрольную на 68 %. Через 14 дней после заражения отмечалась тенденция к её снижению, а на 21-й день этот показатель приближался к контролю (2,79±0,15 %).

Главным объектом нашего иммуноморфологического исследования являлась фабрициева бурса, поскольку именно она играет роль краеугольного камня иммунной системы птицы. При гистологическом исследовании фабрициевой бурсы у опытных цыплят выявлен ряд изменений, различающихся в зависимости от срока после заражения культурами *M. gallisepticum* + *E. coli*. Для первых дней характерны острые циркуляторные расстройства, которые проявляются кровоизлияниями и выраженной застойной гиперемией, и обеднение мозгового вещества лимфоцитами. В дальнейшем развивается лимфоидно-клеточная инфильтрация соединительной основы, значительно утолщаются межфолликулярные перегородки. В фолликулах отмечается уменьшение количества лимфоцитов в мозговом веществе, некоторые лимфоциты с признаками выраженной дистрофии и некроза, уменьшение коркового вещества, а затем его исчезновение. Через 14–21 день после заражения на месте большинства лимфоидных фолликулов образуются кисты. Это согласуется с данными В.М. Апатенко, В.М. Левощенко, В.Я. Пономаренко (1982).

Исследование фабрициевой бурсы в группах разновозрастных цыплят-бройлеров показало, что переболевание респиратор-

ным микоплазмозом в ассоциации с эшерихиозом приводит к более ранней инволюции органа и по морфологическим показателям к развитию иммунодефицита, который через 14–21 день после заражения можно отнести к иммунодефициту V степени (по Колоусовой Н.Г., 1988).

Не менее важным для раскрытия механизмов подавления иммунитета, было исследование тимуса – центрального органа иммуногенеза, ответственного за развитие и функционирование клеточной системы иммунитета. При гистологическом исследовании тимуса у цыплят опытной группы установлены выраженная застойная гиперемия в начале инфекционного процесса; через 7 дней после заражения уменьшение коркового вещества и обеднение его лимфоцитами; к 14-му дню оно представлено в виде островков рыхлолежащих лимфоцитов, а на 21-й день – отсутствует; в мозговом веществе – его увеличение и появление новых телец Гассаля. Таким образом, в тимусе острые циркуляторные расстройства, характерные для первых дней после инфицирования, сменяются нарастающими атрофическими процессами. Развиваются III и IV стадии акцидентальной трансформации (по Колоусовой Н.Г., 1988), характеризующиеся исчезновением коркового слоя, перемещением лимфоцитов в мозговую зону, уменьшением количества лимфоцитов в условном поле зрения коры.

При гистологическом исследовании селезенки установлено выраженное кровенаполнение красной пульпы в первые 7 дней после инфицирования, в ней отмечаются очаги кровоизлияний. В белой пульпе отмечается гиперемия и нарушение проницаемости сосудов, которое характеризуется периваскулярным отеком и появлением обширных участков плазматического пропитывания тканей. Через 8 часов после заражения наблюдается ярко выраженная иммуноморфологическая реакция, которая проявляется в виде крупноклеточной гиперплазии фолликулов, формирование множества лимфоидных фолликулов, состоящих из больших и малых лимфоцитов, молодых плазматических клеток. Через 2

дня белая пульпа преобладает над красной. К 21-му дню исследования отмечается множество больших и маленьких лимфоидных фолликулов, которые располагаются ближе к периферии органа.

Таким образом, сравнительное морфологическое исследование селезенки указывает на усиление иммунологических и морфофункциональных изменений в органе под влиянием ассоциированного течения микоплазмоза. Увеличение селезенки происходит за счет застойной гиперемии и фолликулообразной пролиферации лимфоцитов. Наши данные согласуются с результатами исследований В.А. Шубина, В.С. Осколкова (1966), А.С. Серебрякова и др. (1970), Т.А. Мандрусовой, А.И. Молева и др. (2003).

Сравнительное морфологическое исследование печени показало, что у цыплят опытной группы под влиянием культур *M. gallisepticum* и *E. coli* в начале заболевания и в последующем выявлены сосудистые нарушения, которые характеризуются застойной гиперемией, кровоизлияниями и периваскулярным отеком. Установлены зернистая и вакуольная дистрофии, очаги некроза, уменьшение, вплоть до отсутствия, количества лимфоидных образований в начале инфекционного процесса. В заключительный период прослеживается регенерация структурных и иммунокомпетентных элементов органа. Это согласуется с наблюдениями В.А. Шубина, В.С. Осколкова (1966), А.С. Серебрякова, Г.А. Грошевой и др. (1970), Т.А. Мандрусовой, А.И. Молева и др. (2003).

Интенсивность лимфопоэза, митотическая активность их клеток, образование зародышевых центров и плазматических клеток, наблюдаемые в селезенке и печени, зависят от антигенной стимуляции *M. gallisepticum* и *E. coli*. Таким образом, иммунноморфологические изменения в центральных лимфоидных органах цыплят при ассоциированном влиянии микоплазм и эшерихий свидетельствуют о недостаточности иммунной системы. Сочетание атрофических процессов в тимусе и фабрициевой

бурсе с полным отсутствием лимфофолликулов и периартериальных лимфоидных скоплений в печени в начальном периоде заболевания позволяет предположить комбинированную форму иммунодефицита на этом этапе. В то же время в селезенке в этот период происходит активизация иммунных процессов. В дальнейшем в тимусе и фабрициевой бурсе нарастают атрофические процессы, что является причиной развития более ранней инволюции органов и проявления иммунодефицита через 14–21 день после заражения.

Характер инфекционного процесса и степень выраженности защитных реакций организма определяется уровнем развития иммунной системы, которая, наряду с другими системами, функционирует в тесной взаимосвязи с системой кроветворения (Олейник Е.К. 1982).

Проведенный гематологический анализ крови цыплят-бройлеров подтверждает данные морфологических исследований. Полученные гематологические показатели отражают физиологическую реактивность и естественную резистентность организма цыплят. У инфицированных цыплят на протяжении 7–14 дней после заражения отмечается нейтрофильно-эозинофильный тип изменений в клеточном составе «белой» крови, который характеризовался лейкоцитозом, нейтрофильным сдвигом влево, уменьшением содержания лимфоцитов и моноцитов с одновременным повышенным содержанием эоозинофилов.

Наиболее выражена острота инфекционного процесса у инфицированных цыплят в течение первых семи дней после заражения: в периферической крови появляются миелоциты и юные псевдоэозинофилы, снижается количество моноцитов и усилена псевдоэозинофильная реакция.

Увеличение количества лейкоцитов и псевдоэозинофилов, особенно в первые две недели после заражения, является ответной иммунологической реакцией организма на патогенные агенты *M. gallisepticum* и *E. coli*. Увеличение содержания псевдоэозинофилов у цыплят в опытной группе через 7–21 день по-

сле заражения характерно для инфекционного заболевания, вызванного *M. gallisepticum* и *E. coli* и интоксикацией организма продуктами их распада.

Высокий уровень лейкоцитарного индекса интоксикации в опытной группе, по сравнению с контрольной, приводит к снижению индекса сдвига лейкоцитов крови через 14–21 день после заражения (в возрасте 35–42 дня), что указывает на уменьшение иммунологической реактивности организма цыплят на фоне ассоциированной инфекции, вызванной *M. gallisepticum* и *E. coli*.

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

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

печенью), что подтверждается иммуннологическими и морфофункциональными изменениями в этих органах при гистологических исследованиях. Такие же явления наблюдали N.L. Payne (1971) и C. Riddell (1982) у взрослых кур при возрастной атрофии тимуса и фабрициевой бурсы.

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

По результатам серологического исследования в интактной группе на всем протяжении опыта в СКРА и в ИФА положительно реагирующих птиц не выявили.

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

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

Таким образом, заражение цыплят *M. gallisepticum* и *E. coli* вызывает значительные изменения в Т- и В-системах иммунитета

и картине крови. Иммунодефицитное состояние в данном случае – это приобретенный дефект иммунной системы, выражающийся в неспособности организма в полной мере осуществлять реакции клеточного и гуморального иммунитета. Причиной иммунологической недостаточности явилась ранняя инволюция центральных органов иммунной системы (тимуса и бурсы), которая выражается делимфотизацией и кистозным перерождением лимфоидных фолликулов и разрастанием межфолликулярной ткани бурсы, а также исчезновением коркового вещества, перемещением лимфоцитов в мозговую зону, образование кистозных полостей, уменьшением долек тимуса и окружением их жировой тканью.

Исследования тимуса, фабрициевой бурсы, селезенки, печени и крови с целью диагностирования иммунодефицита дают полную информацию относительно уровня как клеточного и гуморального иммунитета, так и общего состояния иммунной системы цыплят.

С целью выявления главенствующего этиологического фактора в возникновении заболевания требуется изучить всех возможных возбудителей болезни, при выяснении последовательности участия и взаимного действия каждого агента в развитии патологического процесса. Другими словами, установить этиологию заболеваний, при которых часто выделяются микоплазмы, можно только при комплексных исследованиях. Поэтому изучение роли микоплазм в развитии патологического процесса не может проводиться отдельно от других сочленов ассоциации, в которой они находятся. При проведении диагностических исследований необходимо создать такие условия анализа, которые гарантировали бы непосредственное выделение каждого агента из организма с последующей его типизацией.

Предлагаемые нами среды отвечают требованиям, предъявляемым к питательным средам. Оригинальный состав ингредиентов представлен основой с унифицированным набором стандартных питательных компонентов и внесенными необходимыми обогащающими добавками, определенного количества инди-

катора, оптимального набора и концентрации антибиотиков, сыворотки крови, оптимальных значений pH на разных стадиях технологического процесса. Отработанная стандартная технология получения жидких диагностических сред для индикации микоплазм респираторного тракта включает получение основы с добавлением в нее питательных компонентов и соответствующих субстратов ферментативной активности (глюкоза, аргинин, мочевина), сыворотки и антибиотиков, а также стерилизующую фильтрацию и заключительную пастеризацию. Технологически обоснован процесс получения сухих основ плотных сред, что дает возможность идентифицировать выделенные культуры по характеру роста колоний. Использование трех диагностических сред позволяет осуществлять индикацию и групповую дифференциацию микоплазм и уреаплазм, а также посредством титрации оценивать степень их накопления в цветообразующих единицах (ЦОЕ) или колониеобразующих единицах (КОЕ).

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

Анализ результатов проведенных опытов показал, что питательные среды, разработанные нами и именуемые как экспериментальные, соответствуют по всем показателям предъявляемым к ним требованиям: высокой чувствительности к микроорганизмам, относящимся к классу *Mollicutes*; скорости роста тест-штаммов *M. gallisepticum* и *M. fermentans* – в течение трех суток и *U. Urealyticum* – в течение суток; селективной способностью, которая выражается в ингибиции данными питательными средами тест-штаммов *Staphylococcus aureus* WHO–2, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* 9001, при этом не влияя на скорость роста микоплазм и уреаплазм. Присущая им стабильность биологических свойств позволяет сохранять жидкие среды в условиях холодильника до полугода.

Сухие диагностические среды для индикации глюкозо- и аргининферментирующих микоплазм и уреаплазм также отвечают предъявляемым к ним требованиям. Данные среды экономичны, удобны в применении. Их можно использовать в качестве основ для приготовления плотных и полужидких сред, что повышает их диагностическую ценность, сроки хранения и упрощает транспортировку. Высокая чувствительность сред обеспечивает рост на плотной и полужидкой среде не менее чем $1{,}0\times10^5$ КОЕ. Скорость роста тест-штаммов *M. gallisepticum* на плотной среде пять и на полужидкой – трое суток, *M. fermentans* – пять и четверо суток и *U. urealyticum* – четверо и трое суток соответственно. Селективная способность выражена в ингибиции данными питательными средами роста тест-штаммов *Staphylococcus aureus* WHO–2, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* 9001 и отсутствии таковой на микоплазмы и уреаплазмы. Биологические свойства среды в условиях холодильника сохраняются до года.

Предлагаемый нами культуральный метод прост в постановке, не требует специального оборудования и позволяет проводить как индикацию, так и дифференциацию возбудителей, определять их титры и оценивать эффективность проведенного лечения.

В качестве дополнительного теста для диагностики микоплазмозной инфекции мы рекомендуем реакцию непрямой иммунофлуоресценции. При этом данные нашей работы согласуются с данными других авторов (Виноходов О.В., 1965; Митрофанов П.М. и др., 1982; Газовская Л.А., 1997; Гасанова Т.А., 2001), указывающих на значительную роль данного метода при диагностике инфекционных болезней вообще и микоплазмозов в частности. Способность микоплазм к длительной персистенции в инфицированном организме без проявления своего присутствия в нем требует высокочувствительных и специфичных методов для своевременной постановки диагноза. Современные подходы к исследованию проблемы позволяют наиболее точно и в короткие сроки не только выделить возбудителя, но и отдифференциро-

вать его от других видов микроорганизмов, используя видоспецифичные сыворотки в реакции иммунофлуоресценции.

Для получения таких видоспецифичных сывороток с достаточно высоким уровнем антител была использована схема получения антисывороток к полевому и референтному штаммам *M. gallisepticum* путем гипериммунизации кроликов по методике D. Schimmel в модификации А.П. Красикова, Н.Н. Новиковой (2002). Метод заключается в дробном внутривенном введении микоплазмозного антигена с дополнительным подкожным введением иммуностимулятора (левамизола) при первой инъекции. Иммунизация кроликов данным методом позволила получить активные антимикоплазменные сыворотки для РНИФ, причем полевой штамм *M. gallisepticum* оказался более иммуногенным. Реакция иммунофлуоресценции является одной из высокочувствительных и специфичных серологических реакций, с помощью которой можно проводить индикацию различных видов микоплазм, изучать их антигенные свойства и родство. Данный тест можно использовать и как дополнительный метод при бактериологической диагностике для постановки первичного диагноза на микоплазмоз.

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

случаях перекрестных реакций между сопутствующей микрофлорой и микоплазмами не было обнаружено.

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

Респираторный микоплазмоз зарегистрирован на трех птицефабриках Омской области и на 9 – Алтайского края. При этом чаще всего микоплазмоз протекает в ассоциации с эшерихиозом, стафилококкозом, реже с пастереллезом и реовирусным теносиновитом. Причем в последние годы отмечается тенденция роста числа инфицированной птицы. В качестве этиологического фактора выделяют M. gallisepticum и M. synoviae. При апробации разработанных питательных сред в производстве культуры микоплазм выделялись не только от серопозитивных, но и от негативных голов. Сочетание двух и более микроорганизмов обнаружено в большинстве исследуемых проб.

Анализируя результаты бактериологических и серологических исследований, нужно отметить, что, несмотря на отсутствие выраженной клинической картины респираторного микоплазмо-

за возбудитель присутствует в ряде птицеводческих хозяйств Омской области и Алтайского края. При этом источником инфекции являются не только куры, но и петухи, выделяя микоплазмы со спермой, способствуя тем самым дальнейшему распространению возбудителя.

В настоящее время проблема респираторного микоплазмоза остается актуальной для птицеводческих хозяйств. Так, в результате ретроспективных исследований за последние 5 лет, проведенных во ВНИИЗЖ, из 250 птицефабрик России и стран содружества в 221-й птица инфицирована *M. gallisepticum*, что составило 88 % (Гирин М.В., 2004). Экономический ущерб от респираторного микоплазмоза складывается из следующих показателей: смертельность цыплят колеблется в пределах от 5–10 % (Серебряков А.С. с соавт., 1970) до 20–30 % (Коромыслов Г.Ф., 1987; Ley D.N., Yoder H.W., 2003). При осложнении бактериальными и вирусными инфекциями она достигает 80 % и выше. Однако основные потери от респираторного микоплазмоза складываются за счет плохого развития и роста больных цыплят, что приводит к большому проценту выбраковки из-за плохой упитанности – вынужденный убой может достигать 50–75 % (Серебряков А.С., 1970). По данным ряда исследователей (Бессарабов Б.Ф., Мельникова И.И., 2001; Серебряков А.С., 1970; Branton S.L., Deaton J.W., 1984), летальность среди взрослых птиц может быть незначительной, до 4–6 %, но отмечается снижение яйценоскости от 5 до 50 %. Среди зараженных микоплазмозом яиц много неоплодотворенных. Эмбрионы плохо развиваются, гибель их от микоплазм составляет от 8 до 30 %.

Заболеванию респираторным микоплазмозом наиболее подвержены 3–7-месячные цыплята и молодые 6–8-месячные куры в начале яйцекладки. У цыплят до 2-месячного возраста микоплазмоз в клинически выраженной форме встречается реже. Куры старше года также болеют редко. (Серебряков А.С., Грошева Г.А., Шубин В.А., 1970; Бессарабов Б.Ф., 2001). В литературе есть данные о тяжелом переболевании респираторным ми-

коплазмозом цыплят 1–2-месячного возраста (Конопаткин А.А. с соавт., 1984), 20–45-дневного возраста (Коромыслов Г.Ф. с соавт., 1987) и 30-дневного возраста (Nunoya T.T., 1995).

По результатам наших исследований также было установлено, что наиболее чувствительны к заражению респираторным ассоциативным микоплазмозом с развитием комплекса клинических признаков цыплята в возрасте 1–50 дней. При этом в структуре гибели молодняка доля инфекционных болезней составляла 67,3 %, из них 100 % приходилось на микоплазмоз в ассоциации с колибактериозом. Переболевший молодняк отставал в росте и развитии.

Нами также показано, что куры-несушки и петухи, не имеющие видимых клинических признаков болезни, являются скрытыми носителями возбудителя респираторного микоплазмоза и источником инфекции для потомства. Так, по результатам бактериологических исследований наибольшее количество кур-микоплазмоносителей (60 %) выявлено в пик яичной продуктивности (220 дней), при этом средний титр антител в ИФА составлял 7387±1253. Количество же петухов-микоплазмоносителей увеличивалось с возрастом и к 372 дням достигало 70 %, а число реагирующих в ИФА – до 82 % со средним титром 5165±137.

Индикация микоплазм у 43 % эмбрионов, а также наличие антител у суточных цыплят (64,8 %) и выделение от них *M. gallisepticum* (55 %) свидетельствуют о передаче инфекции трансовариальным путем, который является основным, что согласуется с данными, полученными другими исследователями (McMartin D., 1963; Серебряков А.С., Осколков В.С., 1966; Серебряков А.С., Грошева Г.А., Шубин В.А., 1970; Бессарабов Б.Ф., 2001). В литературе имеются отдельные сведения о выделении микоплазм из спермы больных петухов (Yoder H.W., Hofstad M.S., 1965). По результатам наших исследований значительное количество культур *M. gallisepticum* было выделено из спермы петухов, что свидетельствует об её интенсивной обсемененности и заражении ею кур, особенно при их искусственном осеменении полиспермой.

Респираторный микоплазмоз является типичной хронической инфекцией с присущей ей длительной персистенцией возбудителя в организме, который проявляет себя при возникновении благоприятных для него условий. При этом микоплазмы вступают в синергические отношения с вирусной, бактериальной и условно-патогенной микрофлорой. Создаются благоприятные условия для развития микоплазмоза, при этом болезнь протекает в более тяжелой форме, увеличивается летальность птицы. Ассоциативное течение инфекции затрудняет диагностику болезни, снижает эффективность проведения лечебно-профилактических мероприятий.

Среди вирусных инфекций ведущее значение имеют инфекционный бронхит, инфекционный ларинготрахеит, ньюкаслская болезнь, которые усиливают тяжесть инфекции, вызванной M. gallisepticum (Dunlop W.R., Parke G., Strout R.G. and Smith S.C., 1964; Rodriguez R., Kleven S.H., 1980). Такие же взаимодействия наблюдаются с M. synoviae (Kleven S.H., King D.D., Anderson D.P., 1972; Hopkins S.R., Yoder H.W., 1982, 1984). Кроме того, имеются данные о взаимодействии между микоплазмами и аденовирусами, микоплазмами и реовирусами (Кэлнек Б.У., 2003).

К числу бактериальных инфекций, наслаивающихся на респираторный микоплазмоз, относятся колисептицемия (эшерихиоз), стафилококкоз, гемофилез, сальмонеллез и другие (Adler H.E., 1958; Грошева Г.А., 1972; Glisson J.R., 1988; Бессарабов В.Ф., 2001; Новикова А.Ф., 2004).

Ряд исследователей (Гусев В.С. с соавт., 2003; Садовников Н.В., 2003; Мандрусова Т.А., 2003; Андреева Н.Л., 2004) сообщают, что респираторный микоплазмоз на птицеводческих предприятиях чаще протекает в ассоциации с эшерихиозом (колибактериозом), что согласуется и с нашими данными. В результате проведенных исследований наряду с культурами *M. gallisepticum* были выделены культуры следующих микроорганизмов: *E. coli, Diplococcus, Proteus, Citrobacter diversus*. Причем как моноинфекция микоплазмоз встречался только в 7 % случаях. В осталь-

ных случаях – в ассоциациях, и чаще всего в 72 % случаях в ассоциации *M. gallisepticum* + *E. coli*.

Выбор наиболее эффективных химиотерапевтических препаратов для профилактики и лечения любой бактериальной болезни, в том числе и микоплазмоза, необходимо проводить с учетом их активности в отношении полевых культур возбудителя. Наиболее полно чувствительность микоплазм к различным антибиотикам освещена в работах P. Leberman и др. (1950, 1952); J. Ward и др. (1958); J. Lampen и др. (1963); A. Newnham, H. Chu (1965); Я.Р. Коваленко, М.А. Сидорова, И.А. Яблонской (1971); H. Kato и др. (1972); В.И. Ежова с соавт. (1972); Я.Р. Коваленко, Э.А. Шигедевич, И.А. Яблонской (1973) и многих других.

Анализ отечественной и зарубежной литературы в отношении чувствительности микоплазм к антибактериальным препаратам показывает, что они обладают высокой чувствительностью к различным группам антибиотиков, механизм действия которых связан с нарушением обменных процессов и подавлением синтеза внутриклеточного белка. К таким антибиотикам, в первую очередь, относятся: тилозин, спиромицин и некоторые другие макролиды, хлорамфеникол, антибиотики тетрациклинового ряда (тетрациклин, хлортетрациклин, окситетрациклин), аминогликозиды (канамицин, линкомицин, неомицин и некоторые другие), антибиотики из группы плеуромутилина (тиамулин). Характеризуя чувствительность микоплазм к нитрофурановым препаратам, A. Newnham, H. Chu (1965) и другие, считают что фуразолидон и фурацилин ингибируют развитие микоплазм в очень широком диапазоне концентраций. По данным А.А. Климова (2000), С.Ж. Гюрджи-Оглы, И.М. Самородова и М.И. Рабиновича (2004), препараты из группы фторхинолонов обладают высокими бактерицидными свойствами в отношении микоплазм. Мишенью их действия является ДНК-гираза, ключевой фермент бактериальной клетки, ответственный за нормальный процесс биосинтеза ДНК.

Однако длительное применение антибиотиков для лечения респираторного микоплазмоза птиц провоцирует рост ре-

зистентных микроорганизмов и снижает эффективность лечебных и профилактических мероприятий. Поэтому прежде чем применять тот или иной антибиотик в хозяйстве, в каждом конкретном случае авторы рекомендуют проводить определение чувствительности возбудителя заболевания к действующим на этот микроорганизм препаратам. А так как респираторный микоплазмоз протекает чаще в ассоциации с другими бактериальными болезнями, то необходимо учитывать чувствительность всех возбудителей, участвующих в инфекционном процессе.

Результаты наших исследований по определению чувствительности подтверждаются данными литературы о высокой чувствительности *M. gallisepticum* к антибиотикам:

– тиланового ряда (группа макролидов) – к фармазину и тилозину – чувствительно 86 % культур;

– препаратам из группы фторхинолонов – к ципрофлоксацину и к энроксилу – 80 %, к энрофлоксацину – 76 %

– из группы плеуромутилина – к тиамулину – 90 %.

Однако чувствительность культур микоплазм к тетрациклину и фуразолидону составила всего 24 %, что свидетельствует о большом количестве культур микоплазм, резистентных к данному препарату.

Основываясь на том, что среди выделенных ассоциаций наибольший процент занимает микоплазмоз с эшерихиозом (72 % случаев), нами была изучена чувствительность культур *E. coli* к химиотерапевтическим препаратам *in vitro*. Наилучшими антибактериальными свойствами в отношении полевых культур *E. coli* обладал гентамицин – 89 %. Второе место занимали препараты из группы фторхинолонов: ципрофлоксацин – 84 %, энроксил – 64 %, энрофлоксацин – 60 %. Лишь небольшое количество культур было чувствительно к тиамулину – 38 %, фуразолидону – 31 % и тетрациклину – 20 %. К антибиотикам тиланового ряда чувствительность кишечной палочки была низкой и колебалась в пределах 7–11%.

Из приведенных данных видно, что чувствительность одних и тех же препаратов к микоплазмам и кишечной палочке может быть неодинакова, что необходимо учитывать при выборе препаратов для проведения лечебно-профилактических мероприятий.

Благодаря жесткому карантину на импорт, экспорт, передвижение инфицированной птицы и продуктов, а также тепловой и глубинной обработке инкубационных яиц и убою серопозитивных стад, за рубежом были созданы благополучные родительские и промышленные стада по респираторному микоплазмозу птиц.

Существующая в Российской Федерации стратегия борьбы с респираторным микоплазмозом основана на профилактических мероприятиях, направленных на выявление инфицированных стад, установление в них карантина, недопущение заноса инфекции в благополучные хозяйства. В неблагополучных хозяйствах обычно проводят лечебно-профилактические мероприятия с применением химиотерапевтических препаратов.

Основным методом профилактики РМП остается охрана хозяйств от заноса инфекции извне. Так, С.А. Серебряков, Г.А. Грошева и В.А. Шубин (1970) считают, что в числе мероприятий оборонительного плана главное внимание необходимо уделять контролю за реализуемой и поступающей племенной продукцией – живой птицей и инкубационным яйцом.

Вторая задача состоит в строгом выполнении ветеринарно-санитарных правил, зоогигиенических и технологических норм, которые провоцируют развитие болезни и способствуют ему (Fahey J., Crawley J., 1957; Cottereau Ph., 1969; Серебряков А.С., 1970; Коваленко Я.Р., 1976; Конопаткин А.А., 1984, Белкин В.А. с соавт., 2004).

Ряд исследователей для профилактики РМП предлагает использовать живые и инактивированные вакцины (Adler H.E., McMartin D., 1960; Fabricant J., Levin P., 1962; Adler H.E., Silva D., 1970; Прокофьева М.Т. с соавт., 1972; Glisson J.R., Kleven S.H., 1984; Branton S.L., Deaton J.W., 1985; Branton S.L., 1988; Зоткин Г.В. с соавт., 2004; Белкин В.А., 2004).

Имеются многочисленные сообщения зарубежных исследователей об использовании живой вакцины штамма Коннектикут F в производственных условиях (Glisson J.R., Kleven S.H., 1984; Branton S.L., Deaton J.W., 1985; Branton S.L., 1988). Авторы отмечали повышение продуктивности у вакцинированных кур-несушек, по сравнению с невакцинированной птицей. Снижалась передача возбудителя через яйцо, в связи с чем уменьшалось количество случаев воспаления воздухоносных мешков у бройлеров, вызываемых *M. gallisepticum*. Однако после вакцинации куры остаются микоплазмоносителями (потенциальный источник инфекции). Кроме того, вакцина, как и культура, которую используют для её приготовления, очень лабильны, в связи с этим трудно поддерживать культуру на определенной стадии патогенности, а вакцина, изготовленная из нее, должна использоваться сразу же после изготовления. Кроме того, вакцину готовят из вирулентной культуры, следовательно, существует опасность поствакцинальных реакций (Grumbles B.L., 1965).

Применение инактивированных вакцин позволило защитить бройлеров и кур-несушек от аэросаккулитов, вызванных вирулентными штаммами *M. gallisepticum*, и предотвратило снижение продуктивности птицы. Однако такие вакцины способствуют снижению, но не устраняют возбудителя в организме птиц, которые остаются микоплазмоносителями (Прокофьева М.Т. с соавт., 1972; Yoder H.W., Hopkins S.R., Mitchell B.W., 1984; Yoder H.W., Hopkins S.R., 1985; Yagihashi T.T., 1992).

Необходимо также отметить, что напряженность иммунитета при микоплазмозе не всегда является стабильной и находится под влиянием различных факторов. Отрицательное влияние на формирование и напряженность иммунитета оказывают факторы, ослабляющие общую резистентность организма. Эшерихиоз, псевдочума, инфекционный бронхит часто осложняют течение респираторного микоплазмоза и приводят к прорыву иммунитета (Серебряков А.С. с соавт., 1970).

Несмотря на значительные успехи ветеринарной и фармацевтической науки, до сего времени не удается применением антибиотиков излечить больных птиц и ликвидировать заболевание в стаде. Поисками лекарственных веществ и методов введения их больной микоплазмозом птице занимаются до сего времени многие зарубежные и отечественные исследователи. Используют разные методы обработки антибиотиками и химиотерапевтическими средствами кур-несушек, петухов, молодняка и яиц, предназначенных для инкубации.

По данным отечественных и зарубежных источников, для уничтожения микоплазм в инфицированных яйцах и снижения гибели эмбрионов предложено несколько методов. Так, ряд исследователей (Yoder H.W., 1970; Meroz M. с соавт., 1973; Качановой С., 1974; Ковинько Д., 1982) предлагают для уничтожения *M. gallisepticum* в яйце нагревать их в течение 12–14 часов, пока температура внутри яйца не достигнет 46,1 ºС. При таком методе вывод цыплят уменьшался на 8–12 %, но при этом инактивировался возбудитель инфекции.

Другие авторы (Fabricant J., Levin P., 1962, 1963; Антонова М.Е., 1966; Cottereau Ph., 1969; Берлин А. с соавт., 1981) с этой целью предлагают использовать метод глубинной обработки яйца с использованием антибиотических растворов, причем для увеличения диффузии антибиотика внутрь яйца используется температурно-дифференциальный метод, или метод переменного атмосферного давления. Ряд исследователей отмечает, что наиболее эффективной является обработка яиц растворами тилозина, которая обеспечивает 100 %-ную деконтаминацию яиц от микоплазм (Cakala A., 1957; Берлин А. с соавт. 1981; Безрукавая И., 1982), что согласуется с результатами наших исследований. Так, обработка яиц раствором фармазина (тилозина тартрат) перед инкубацией методом прямого перепада температур, обеспечила получение молодняка, свободного от возбудителя респираторного микоплазмоза, и позволила повысить выводимость яиц на 1,3 %, вывод цыплят – на 5 %.

Многие исследователи пытались предотвращать передачу возбудителя респираторного микоплазмоза путем лечения химиотерапевтическими препаратами кур, носителей *M. gallisepticum*, одновременно проводя обработку кур-несушек в сочетании с обработкой яиц (Рашев Х., 1965; Ченчев И., Обрешков К., Шишков Н., 1966; Прокофьева М.Т. и соавт, 1966; Фомина А.Я., Серебряков А.С., Грошева Г.А., 1968; Hamdi A.H., 1970; Ose E.E., 1979; Зоткина Г.В. с соавт., 2004). В результате проведенных опытов как отечественные, так и зарубежные исследователи пришли к заключению, что применение противомикоплазмозных препаратов оказывает определенный терапевтический эффект, позволяет снизить заболеваемость несушек РМП и профилактировать появление новых случаев заболевания кур в стаде, снижает передачу *M. gallisepticum* с яйцом, но полностью возбудителя не уничтожает. Полного оздоровления хозяйства этим методом достигнуть нельзя. Однако его терапевтическая эффективность и снижение экономического ущерба за счет повышения яйценоскости, выводимости цыплят и привесов при выращивании бройлеров свидетельствует о целесообразности применения данного метода.

Использование для лечения петухов фармазина и тиамулина при респираторном микоплазмозе способствовало элиминации возбудителя из организма в течение первых 14 дней после применения антибактериальных препаратов. Однако через 40 дней после лечения микоплазмоносительство вновь было выявлено в группе, где применяли фармазин у 27 %, а при использовании тиамулина – у 33 % петухов. Применение для лечения энрофлоксацина в первые 14 дней лечения уменьшило количество инфицированных петухов на 73 %, по сравнению с контролем. Вместе с тем через 40 дней после лечения инфицированность увеличилась и была на уровне 50 %, по сравнению с контрольной группой. Использование противомикоплазмозных препаратов не оказало отрицательного влияния на качество спермы петухов, оплодотворенность и выводимость яиц. А при использовании

фармазина, по сравнению с контролем, даже оплодотворенность яиц повысилась на 6,7 %, выводимость яиц и вывод цыплят – на 0,9 %.

Применение для лечения фармазина и тиамулина у кур-несушек позволило снизить уровень их инфицированности микоплазмами в течение первых 14 дней после применения антибиотиков на 83 %, по сравнению с контролем, а применение энрофлоксацина – на 67 %.

По данным C.O. Baughn (1978); L. Stipkovits (1992); В.А. Белкина (2004), эффективным для лечения цыплят являлся тиамулин. О положительных результатах при использовании тилозина для лечения микоплазмоза сообщали зарубежные (Jordan F.T., 1993; Tanner A.C., 1993) и отечественные исследователи (Башкиров О.Г., 1999; Елесеева Е., 2003; Борисенкова А.Н., 2003; Колобов Е.А., 2004). Некоторые исследователи сообщают о применении на цыплятах-бройлерах, экспериментально инфицированных *M. gallisepticum*, данофлоксацина (препарат из группы фторхинолонов) (I. Kempf, 1992; F.T. Jordan, 1993; A.C. Tanner, 1993). А.А. Климов (2004) сообщает о положительных результатах при испытании энроксила (ДВ энрофлоксацин – препарат из группы фторхинолонов) при ассоциативном течении микоплазмоза и колибактериоза. Однако применение антибиотиков на цыплятах должно сводиться к минимуму и быть рациональным, так как мясо цыплят – это продукция птицеводства, поступающая в пищу людям (Соколов В.Д., 2004; Шчука Л., 2005). Для уменьшения кратности дачи антибактериальных препаратов и повышения общей резистентности организма птиц к инфекциям, особенно при ассоциативных инфекциях, для получения экологически чистой продукции помимо антибактериальных препаратов целесообразно применять пробиотические препараты (Тараканов Б., 1999; Егоров И., 2003; Холдоенко А., 2003; Кудрявцева А.В., 2003; Понюхов В.А., Аликин Ю.С., Юшков Ю.Г., 2004; Бовкун Г.Ф., 2003, 2004; Бобрик О.Н., 2004; Мартыненко С., 2005) и иммуномодуляторы (Чекмарев А.Д., 2000).

При разработке схем профилактики и лечения при респираторном ассоциативном микоплазмозе цыплят-бройлеров мы учли данные отечественной и зарубежной литературы. По результатам проведенных исследований наилучшие результаты нами были получены в опытных группах, где для профилактики респираторного ассоциативного микоплазмоза в возрасте 28–30 дней применяли антибактериальные препараты ципрофлоксацин в одном, и тилозин тартрат – во втором случае и пробиотик «Астра-2» (создан ООО «БинКорм» г. Бердск) на протяжении всего периода выращивания бройлеров. Использование данных схем позволило повысить сохранность бройлеров до 99 и 98,7 % и получить здоровый молодняк. Применение пробиотика позволило сократить кратность дачи антибактериальных препаратов до одного раза за период выращивания бройлеров.

Наилучшие результаты при лечении цыплят-бройлеров при респираторном ассоциативном микоплазмозе были получены при использовании ципрофлоксацина и пробиотика «Астра-2». Применение данной схемы повысило сохранность бройлеров на 2 % и снизило количество цыплят микоплазмоносителей на 20 % по сравнению со схемой, применяемой в хозяйстве.

По результатам наших исследований серологические тесты СКРА и ИФА являются ориентировочными при определении эффективности применяемых схем профилактики и лечения респираторного микоплазмоза у птиц, критериями которых являются уменьшение количества реагирующей птицы в первом случае и снижение уровня антител во втором. Бактериологический метод с использованием элективных питательных сред позволяет выявлять остаточное микоплазмоносительство у птиц и вносить корректировку в схемы профилактики и лечения и контролировать их эффективность.

Разработанные нами схемы (деконтаминация инкубационных яиц от микоплазм, профилактика и лечение респираторного микоплазмоза у кур родительского стада, в том числе в ассоциативной форме с эшерихиозом у молодняка) позволили в производственных

условиях снизить инфицированность микоплазмозом кур, повысить сохранность и продуктивность птицепоголовья.

Предлагаемый нами культуральный метод прост в постановке, не требует специального оборудования, позволяет проводить, как индикацию, так и дифференциацию возбудителей, определять их титры, оценивать эффективность проведенного лечения.

В качестве дополнительных тестов для диагностики микоплазмозной инфекции рекомендуем использовать серологические и иммунологические методы. При этом данные нашей работы согласуются с мнениями других авторов (Виноходов О. В., 1965; Митрофанов П. М. и др., 1982; Газовская Л. А., 1997; Гасанова Т. А., 2001), указывающих на значительную роль данных методов при диагностической работе с инфекционными болезнями вообще и микоплазмозом в частности. Способность микоплазм к длительному персистированию в инфицированном организме, никак не проявляя своего присутствия в нем, требует высокочувствительных и специфичных методов для своевременной постановки диагноза. Современные подходы к исследованию проблемы позволяют наиболее точно и в короткие сроки не только выделить возбудителя, но и отдифференцировать его от других видов микроорганизмов, используя видоспецифичные сыворотки в реакциях иммунофлуоресценции.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при гипериммунизации кроликов уровень антител растет быстрее при сочетанном введении микоплазм с иммуностимулятором (левамизолом). Схемы I и II являются менее результативными (предельные титры 1:160 и 1:320) по сравнению с III (1:640 предельный титр), но в то же время они более практичны, для получения достаточной концентрации противомикоплазменных антител при использовании их в реакциях иммунофлюоресценции (РИФ). Данный тест необходимо использовать как дополнительный метод бактериологической диагностики при постановке первичного диагноза на микоплазмоз.

Полученные гипериммунные микоплазменные сыворотки на собаках были использованы для изготовления люминесцентного конъюгата в качестве положительной люминесцентной сыворотки в РПИФ, что позволило повысить специфичность реакции и сократить время диагностики микоплазмоза плотоядных животных.

Рекомендуемые методы микробиологической и серологической диагностики были изучены в экспериментальных условиях на лабораторных животных (морские свинки). В результате проведенного опыта показано, что специальные диагностические питательные среды для индикации микоплазм и уреаплазм активны и чувствительны в отношении данных микроорганизмов, в то же время стабильно ингибируют рост других микробов, находящихся в ассоциации вместе с микоплазмами. Серологические исследования подтверждают данные бактериологического исследования и являются дополнительными высокочувствительными и специфичными методами диагностики микоплазмозной инфекции. При серологическом исследовании в РНИФ патологического материала от морских свинок со специфическими кроличьими противомикоплазмозными сыворотками на наличие антигена показано, что наибольшим антигенным родством обладает *A. laidlawii*, этот вид широко распространен в природе, вследствие чего эволюционно сложившаяся антигенная структура его имеет максимальное родство с другими видами микоплазм. Перекрестных реакций между сопутствующей микрофлорой и микоплазмами не было обнаружено.

Производственный опыт на собаках по изучению чувствительности и специфичности микробиологического и серологического методов диагностики урогенитального микоплазмоза плотоядных подтверждает данные экспериментальных исследований на морских свинках. Предложенные методы эффективны и информативны в отношении микоплазмозной инфекции. Так, на специальных питательных средах для выделения микоплазм и уреаплазм ингибируется рост сопутствующей микрофлоры без

отрицательного влияния на рост микоплазм, при этом индикация на жидких средах была параллельно подтверждена результатами роста на плотных средах. У серологических тестов (РНИФ и РПИФ) наблюдали высокую чувствительность, с помощью которых выявляли даже самые малые дозы антигена в организме животных. Чувствительность же метода РТИФ при выявлении антител была значительно ниже (на 46,6 %). Это объясняется слабой иммуногенностью микроорганизмов и пониженной иммунореактивностью макроорганизма, поэтому данный метод может быть применен только в период обострения болезни.

Изучая специфичность методов реакции иммунофлуоресценции (РНИФ, РПИФ) на выявление антигенов, установили отсутствие перекрестных реакций между посторонней микрофлорой и микоплазмами. Сравнение микробиологического и серологического методов показало, что результаты данных исследований, как правило, соответствуют друг другу, что повышает достоверность диагностики.

Предложенная нами схема индикации и идентификации микоплазм из первичного (нативного) биоматериала основана на комплексном подходе изучения ассоциативной формы микоплазмозной инфекции, легко выполнима в производственных и лабораторных условиях. С помощью серологических экспресс-методов (РПИФ, РНИФ) при выявлении микоплазменного антигена время диагностики сокращается до 30–60 минут. А наличие синтезируемых в организме антимикоплазмозных антител в сыворотке крови методом РТИФ – до 2 часов. Микробиологический анализ осуществим в течение 1–3 суток, он включает в себя культивирование не только микоплазм на специальных питательных средах, но и сопутствующей микрофлоры для изучения микст-форм инфекционного процесса. Данная методика поможет правильно и своевременно диагностировать ассоциированный микоплазмоз с другими инфекционными болезнями, что необходимо практикующим ветеринарным специалистам. Предложенная схема идентификации может использоваться для определе-

ния видовой характеристики выделенных культур с дальнейшим их применением в качестве антигенов серологических реакций, изготовления вакцинных препаратов или для иммунизации лабораторных животных с целью получения лечебных или диагностических гипериммунных сывороток.

Проведенные исследования животных на микоплазмоз и его ассоциативные формы проявления в хозяйствах, занимающихся воспроизводством племенного поголовья собак в городе Омске и звероводческом хозяйстве, специализирующемся на разведении серебристо-черных лисиц, а также изучение животных, проходящих курс лечения в ветеринарных клиниках г. Омска, показали, что у плотоядных животных паразитоценоз урогенитального тракта представлен в основном ахолеплазмами (90–98 %), уреаплазмами (90–92 %) и микоплазмами (40–55 %), а также микроорганизмами родов *Micrococcus, Staphilococcus, Streptococcus, Proteus, Pseudomonas, Echerichia*. У не реагирующих на микоплазмоз животных выявляли те же микроорганизмы, что и у микоплазмоносителей, но их количество было в 2–5 раз ниже. Сочетание двух и более микроорганизмов обнаружено во всех исследуемых пробах.

Показано, что при микоплазмозной инфекции начинает активизироваться условно патогенная микрофлора, приводящая к развитию дисбактериоза слизистой оболочки урогенитального тракта, в основном вызванном различными ассоциациями бактерий или кокковой группой микроорганизмов, которые обуславливают развитие воспаления катарально-гнойного характера.

Анализируя результаты бактериологических и серологических исследований, можно заметить, что на территории города Омска и Омской области источником возбудителя микоплазмоза могут быть мелкие домашние животные (собаки, кошки), которые наиболее близко находятся к человеку, и пушные звери (серебристо-черные лисицы).

На основе изучения научной литературы и результатов собственных исследований показано, что проблема микоплазмоза у

людей и животных весьма актуальна. Авторы надеются, что материалы их исследований по урогенитальному микоплазмозу и его ассоциациям с возбудителями других инфекционных болезней плотоядных внесут определенный вклад в развитие науки микоплазмологии и послужат основой для дальнейших более глубоких исследований по диагностике, профилактике и лечению при урогенитальной микоплазмоз-ассоциированной инфекции плотоядных.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

К главам 1–3

1. Адаскевич В.П. Инфекции, передаваемые половым путём // Медицинские новости. 2006; 4: 8–12.

2. Аковбян В.А., Резайкина А.В., Тихонова Л.И. Характеристика эпидемиологических закономерностей, определяющих распространение заболеваний, передаваемых половым путем, в России // Вестн. дерматологии и венерологии. 1998; 1: 4–7.

3. Акопян Т.Э. Бактериальный вагиноз и беременность. Акушерство и гинекология. 1996; 6: 3–5.

4. Алымбаева Д.Б., Миллер Г.Г., Раковская И.В., Быковская А.Ф. Влияние микоплазм на продукцию онкогенного вируса HTLV Т-лимфобластными клетками НИТ–102. Вопросы вирусологии. 1985; 1: 75–7.

5. Александрова Н.О. К вопросу о диагностике микоплазменной инфекции у гинекологически больных. Совершенная многопрофильная клиническая больница: Пробл. и перспективы: сб. науч. работ к 125-летию больницы Святого Великомученника Георгия. СПб. 1995: 109–10.

6. Андреев Е.В., Фукс П.П. Смешанная вирусомикоплазменная инфекция. Ветеринария. 1980; 8: 30–2.

7. Андреев Е.В., Фукс П.П. Изучение патогенных свойств. М. бовиринис. Микробиология. 1981; 43 (3): 347–53.

8. Андросик Н.Н., Душук Р.В., Иванов Д.П. Изучение действия окситетрациклина при инфекционной пневмонии свиней микоплазмозной этиологии. Ветеринарная наука – производству: тр. / Научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени С.Н. Вышелесского. Минск. 1974; 12: 72–4.

9. Андросик Н.Н. Изучение микоплазм, выделенных от больных пневмонией свиней. Ветеринарная наука – производству: Труды / Белорусский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского. Минск. 1976; 14: 136–9.

10. Андросик Н.Н. О серологической диагностике микоплазмозной пневмонии свиней. Достижения ветеринарной науки и передового опыта – животноводству: Межведомственный сборник / Белорусский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени С.Н. Вышелесского. Минск. 1977;3: 59–62.

11. Андросик Н.Н. К вопросу о диагностике энзоотической пневмонии свиней. Профилактика желудочно-кишечных и респираторных болезней свиней: тезисы докладов всесоюзной научно-технической конференции. М., 1978: 57–8.

12. Андросик Н.Н. Применение РНГА для выявления противо-микоплазменных антител сыворотке крови свиней. Ветеринария. 1986; 4: 32–5.

13. Андросик Н.Н. Источники и пути передачи возбудителя при микоплазмозе свиней. Современные проблемы профилактики зоонозных болезней и пути их решения. Минск. 1987: 185.

14. Андросик Н.Н. Повышение активности эритроцитарных микоплазменных диагностикумов. Ветеринария. 2000; 3: 25–9.

15. Анкирская А.Е. Бактериальный вагиноз. Акушерство и гинекология. 1995; 6: 13–6.

16. Анкирская А.С., Муравьева В.В. Опыт диагностики оппортунистических инфекций влагалища. Клин. микробиол. и антимикробная химиотерапия. 2001; 3 (2): 190–4.

17. Антонов Б.И., Борисова В.В., Волкова П.М. Лабораторные исследования в ветеринарии – бактериальные инфекции. Справочник. М.: Агропромиздат. 1986: 1–352.

18. Апатенко В.М., Ливощенко М.Г. Ассоциированные инфекции в патоморфологическом и иммуноморфологическом аспекте. Паразитоценология на начальном этапе: Труды 11 Всесоюзного съезда паразитоценологов. Киев: Наукова думка. 1985: 58.

19. Апатенко В.М. Смешанные инфекции с/х животных. Киев: Урожай. 1990: 34–40.

20. Атамась В.А. Методические рекомендации по борьбе с острыми респираторными болезнями телят. Киев. 1984: 14–20.

21. Атамась В.А. Респираторные болезни сельскохозяйственных животных. Киев: Урожай. 1986: 1–184.

22. Афанасенко В.И. Заместительная и стимулирующая иммунокоррекция при ассоциативных инфекциях телят. /16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология и иммунология, дисс. канд. вет. наук. Омск, 2000.

23. Афонасьев В.Н. Методы получения гипериммунных сывороток к микоплазмам. Новое в инфекционной патологии сельскохозяйственных животных: тр. ВИЭВ. М. 1980; 51: 53–7.

24. Афонасьев В.Н. Локализация видовых антигенов в микоплазмах. Новое в инфекционной патологии сельскохозяйственных животных: тр. ВИЭВ. М. 1983; 58: 73–6.

25. Бакулов И.А., Барышников П.И., Котляров В.М., Семенихин А.Л. Серологическая диагностика контагиозной плевропневмонии крупного рогатого скота. Ветеринария. 1988; 8: 59–61.

26. Барышников П.И. Идентификация микоплазм методом иммуно-ферментного анализа. Ветеринария. 1995; 2: 33–5.

27. Бердник В.П., Настенко В.Д. Получение мутантов микоплазм и ахолеплазм для изготовления вакцины против инфекционной пневмонии свиней. Проблемы ветеринарной иммунологии. М. 1985: 118–21.

28. Блехерман Б.Е., Грошева Г.А. Сравнительная морфология и ультраструктура некоторых штаммов микоплазм: тр. ВИЭВ. 1971; XXXIV: 1–172.

29. Бонецкий А.А., Филипченко А.И., Иванова Динамика и сезонный ритм частоты *C. trachomatis, U.urealyticum, M.hominis* у пациентов, обследованных по поводу УГИ с 1998 по 2002 г. в городе Бишкек. Генодиагностика инфекционных заболеваний: тез. докл. IV Всерос. науч.-практ. конф. – М. 2002: 6–7.

30. Борхсениус С.Н., Чернова О.А. Микоплазмы: молекулярная и клеточная биология, патогенность, диагностика – Л.: Наука. 1989: 1–156.

31. Брагина Л.Е., Васильева Л.И. Дисбиозы женской половой сферы при неспецифических вагинитах. Дисбактериозы и эубиотики: тез. докл. науч. конф. М. 1996: 8.

32. Брико Н.И., Лыткина И.Н., Абоймова О.А. Принципы эпидемиологического надзора за болезнями, передающимися половым путем. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2004; 2: 11–5.

33. Брилис В.Н., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов. Лаб. дело. 1986; 4: 210–2.

34. Бродский М.Ю. Идентификация *Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum* и *Chlamydia trachomatis* методом полимеразной цепной реакции. Бюлл. Экспер. биол. и медицины. 1995;12: 606–9.

35. Бухарин О.В., Васильев Н.В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине. Томск, 1974: 1–183.

36. Бухарин О.В., Усвяцов Б.Я., Малышкин А.П., Немцева Н.В. Метод определения антилизоцимной активности микроорганизмов. Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1989; 27: 27–8.

37. Васильева Е.И., Фесечко Л.В. Оценка этиологической роли микоплазм, уреаплазм и хламидий в развитии воспалительных процессов урогенитального тракта заболеваний. Актуальные вопросы клинической железнодорожной медицины: опыт диагностики и лечения больных: сб. ст. М. 1997: 125–7.

38. Волков М.С. Разработка средств диагностики микоплазмозного синовита птиц: автореф. дис… канд. ветеринар. наук: 16.00.03 / М.С. Волков; Владимир. 2003: 1–18.

39. Вологодская О.В. Ассоциативный урогенитальный микоплазмоз крупного рогатого скота (диагностика и лечение): автореф. дис…канд. ветеринар. наук: 16.00.03. Омск 2006: 1–18.

40. Вульфович Ю.В., Жевержеева И.В., Горина Л.Г., Гамова Н.А. Выявление антигенов микоплазм (*M.arthritidis* и *M.fermentans*)

в тканях экспериментально зараженных животных с помощью РНИФ и агрегат-гемагглютинации. ЖМЭИ. 1985; 3: 81–3.

41. Вульфович Ю.В., Раковская И.В., Гамова Н.А. Гончарова С.А., Горина Л.Г., Джумигр А.П., Прозоровский С.В. Лабораторная диагностика микоплазмоза и уреаплазмоза у урологических и гинекологических больных. ЖМЭИ. 1995; 5: 97–100.

42. Гамова Н.А. *Ureaplasma urealyticum* и ее роль в патогенезе урогенитальной инфекции : автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М. 1993: 1–23.

43. Гельвиг Э.Г. Заболевания свиней. М.: Астрель. 2003: 1–112.

44. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М. : Практика, 1999: 1–459.

45. Горина Л.Г., Гончарова С.А., Игумнов А.В. Лабораторная диагностика микоплазмозов человека. Вестник академии медицинских наук СССР. М.: Медицина. 1991: 31–42.

46. Горина Л.Г., Вульфович Ю.В., Прозоровский С.В., Гамова Н.А., Раковская И.В. Персистенция микоплазм в инфицированном организме: наблюдения, причины и механизмы, диагностика. ЖМЭИ. 1997; 4: 47–51.

47. Горина Л.Г., Гамова Н.А., Раковская И.В., Гончарова С.А., Бархатова О.И., Балабанов Д.Н. Сравнительная оценка методов диагностики микоплазменных инфекций урогенитального тракта. ЖМЭИ. 2006; 4 : 82–5.

48. Гречухин А.Н., Шафиев А.П. Диагностика микоплазменной пневмонии свиней. Ветеринарная практика: научно-практический журнал / Ин-т вет. биологии. СПб. 2002; 1: 10–5.

49. Гречухин А.Н. Специфическая профилактика микоплазмозной пневмонии свиней вакциной «Респишур». Ветинформ. 2003; 4:16–7.

50. Гречухин А.Н. Эффективные средства лечения и профилактики при респираторном симптомокомплексе свиней. Ветеринария. 2006; 8: 13–5.

51. Григорьева Г.И., Арбузова А.А., Кульчицкая М.А., Панитков М.А. Способ приготовления эритроцитарного диагностикума. Ветеринарная патология. 2005; 4: 15–7.

52. Грошева Г.А. Результаты работ по ветеринарной микоплазмологии // Эпизотологическое прогнозирование мероприятий по профилактике и борьбе с заразными болезнями: труды ВИЭВ. М. 1982; 55: 31–7.

53. Гюрджи-Оглы С.Ж., Самородов И.М., Рабинович М.И. Фторхинолоны – новые синтетические препараты. БИО. 2004; 4: 5–8.

54. Дададжанов Ю.Х., Бурлаков В.А. Модифицированный метод постановки связывания комплемента при микоплазмозах. Проблемы лейкоза и инфекционных заболеваний с/х животных. М. 1988: 125 –8.

55. Дмитриев Г.А. Современные подходы к лабораторной диагностике ИППП. Генодиагностика инфекционных заболеваний : тез.докл. IV Всерос. науч.-практ. конф. М. 2002: 23–4.

56. Дунаев Г.В. Патогенные микоплазмы. Ветеринарная микробиология и иммунология: под ред. Н. А. Радчука. М.: Агропромиздат. 1991: 300–12.

57. Душук Р.В. Респираторные болезни свиней. М.: Колос. 1982: 1–186.

58. Душук Р.В. Культуральные и морфологические свойства микоплазм свиней. Ветеринария. 1997; 1: 55–8.

59. Евстигнеева Н.П. Выявляемость *U. urealyticum* методом ПЦР в зависимости от состояния микробиоценоза влагалища. Клин. лаб. диагностика. 2000; 10: 3–7.

60. Евстигнеева Н.П., Кузовкова Т.В., Герасимова Н.М. Онкогенные типы ВПЧ у женщин с заболеваниями шейки матки. Генодиагностика инфекционных заболеваний: тез докл. IV Всерос. науч.-практ. конф. М. 2002: 24–5.

61. Ежов В.И., Грошева Г.А., Савич Б.М. Изучение чувствительности птичьих микоплазм к антибиотикам и другим

химиотерапевтическим препаратам. Бюллетень ВИЭВ. М. 1972; 12: 110.

62. Жбанова Т.В., Дрыгин В.В., Дудникова Н.С. Микоплазмозы свиней. Владимир: ФГУ ФЦОЗЖ, 2005: 1–75 с.

63. Жонголович А.Е. Этио-эпизоотологические особенности микоплазмоза свиней и усовершенствование методов его диагностики и лечения: автореф. дис…канд. ветеринар. наук: 16.00.03 / А.Е. Жонголович. Омск. 2008:1–18.

64. Зеленуха Е.А., Гречухин А.Н. Мероприятия при респираторных болезнях свиней в промышленных свинокомплексах. Ветеринария. 2007; 5: 13–5.

65. Ивашков Е.А., Ивашкова О.В. Динамика повозрастной частоты выявления возбудителей ИППП у женщин Хабаровска на протяжении 1998-2003 гг. Генодиагностика инфекционных заболеваний : тез.докл. V Всерос. науч.-практ. конф. М. 2004: 39–43.

66. Ивашков Е.А. Подводные камни на пути внедрения количественного определения урогенитальных инфекций. Генодиагностика инфекционных заболеваний : тез.докл. V Всерос. науч.-практ. конф. М. 2004: 46–7.

67. Изучение механизмов персистенции и патогенности микоплазм и разработка методов диагностики микоплазма-инфекции / Рук. Прозоровский, С.В. / Жур. НИР и ОКР. – 1993. Сер. 5. № 1.

68. Каган Г.Я. О патогенных потенциях семейства *Mycoplasmataceae*. ЖМЭИ. 1972;11: 33–7.

69. Каральник Б.В. Эритроцитарные диагностикумы. М.: Медицина. 1976: 1–164.

70. Карамова А.Э., А.В. Поляков, Хамаганова И.В. Значение *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma genitalium* как возбудителей воспалительных заболеваний урогенитального тракта. Клин. микробиол. и антимикробная химиотерапия. 2004; 4: 365–70.

71. Кафарская Л.И., Коршунова О.В., Ефимов Б.А. Микробная экология влагалища. Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2002; 6: 91-9.

72. Киприч В.В. Иммунобиологические реакции при микоплазмозе птиц. Болезни птиц: сб. тр. Л.: Колос. 1971; 7(18): 208–13.

73. Киприч В.В. Реакция задержки гемагглютинации и ее диагностическое значение при респираторном микоплазмозе птицы. Ветеринария: сб. тр. Киев : Урожай. 1973; 34 : 53–6.

74. Киприч В.В. Микоплазмозы сельскохозяйственных животных. Киев: Урожай. 1978: 1–165.

75. Кира Е.Ф. Бактериальный вагиноз (клиника, диагностика, лечение) : автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб. 1995: 1–44.

76. Кира Е.Ф. Бактериальный вагиноз. СПб. 2001: 1–364.

77. Кирьянов Е.А. Микоплазмы и L-формы бактерий в патологии животных. Лекция: Уссурийск, Приморский сельскохозяйственный институт. 1983: 4–8.

78. Кисина В.И Современное состояние вопроса о значении *Ureaplasma urealyticum* в генезе урогенитальных заболеваний. Инфекции, передаваемые половым путем. 2002; 2: 8–16.

79. Кисина В.И., Канищева Е.Ю., Дмитриев Г.А. Клинико-микробиологические и морфологические особенности хронических воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин. Инфекции, передаваемые половым путем. 2002; 2: 10–4.

80. Кисина В.И., Полищук Н.А., Канищева Е.Ю. Бактериальный вагиноз: современное состояние проблемы. Вестн. дерматологии и венерологии. 2003; 4: 16–22.

81. Кисина В.И., Говорун В.М., Загребина О.С., Екимов А.Н., Мешков В.В. Предварительная оценка клинического значения генотипирования *U. urealyticum* при воспалительных заболеваниях мочевых и половых органов женщин. Вестн. дерматологии и венерологии. 2003; 1: 4–9.

82. Кисина В.И., Кирпатовский В.И., Кудрявцев Ю.В., Забиров К.И., Загребина О.С., Мешков В.В. Экспериментальное

моделирование воспалительного процесса в органах мочеполовой системы с *U. urealyticum* различных биоваров. Вестн. дерматологии и венерологии. 2003; 3: 9–12.

83. Кисина В.И., Ширшова Е.В., Забиров К.И., Чижов С.А., Разина С.Е. Клинические синдромы, ассоциированные с генитальными микоплазмами: диагностика и лечение. Вестн. дерматологии и венерологии. 2004; 5: 16–23.

84. Климов А.А. Повышение эффективности фторхинолонов в индустриальном животноводстве. Ветеринария. 2003; 5: 53–6.

85. Коваленко Я.Р., Шегидович Э.А., Яблонская И.А. Использование тилана и антибиотиков тетрациклинового ряда при лечении массовых пневмоний телят в крупных откормочных хозяйствах. Бюл. ВИЭВ. М. 1973; 16: 33–6.

86. Коваленко Я.Р., Сидоров М.А., Яблонская И.А. Устойчивость различных видов микоплазм к некоторым антибиотикам. Бюллетень ВИЭВ. М. 1971; 11: 52.

87. Коваленко Я.Р., Шегидевич Э.А. Чувствительность микоплазм и ахолеплазм различных видов к некоторым антибиотикам. Доклады ВАСХНИЛ. 1978; 2: 28–32.

88. Коваленко Я.Р., Сидоров М.А. Микоплазмы и микоплазмозы животных. Бюллетень ВИЭВ. М. 1980; 38: 5–13.

89. Коваленко Я.Р., Шегидевич Э.А., Яблонская И.А. Микоплазмы и их роль в патологии животных: тр. ВИЭВ. 1980; 51: 24–9.

90. Козлова Е.А, Пухмер И.В. Диагностика микоплазмоза. Медицинские новости. 2004; 2: 16.

91. Константинова О.Д., Кремлева Е.А., Черкасов С.В., Чертков К.Л. Микрофлора репродуктивного тракта женщин при внутриматочных вмешательствах. Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2000; 2: 98–100.

92. Корж Б.А., Злонкевич Я.Д. Роль условно-патогенной микрофлоры в этиологии острых расстройств желудочно-

кишечного тракта новорождённых телят. Инфекционные болезни телят. Кишинёв. 1988: 12–5.

93. Коромыслов Г.Ф., Месарош Я., Штипкович Л. Микоплазмы в патологии животных. М.: Агропромиздат. 1987: 1– 255.

94. Костюк С.А., Хулуп Г.Я., Костин Г.М. Применение полимеразной цепной реакции для определения тетрациклин- и макролидустойчивых урогенитальных *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum.* Генодиагностика инфекционных заболеваний: тез. докл. V Всерос. науч.-практ. конф. М. 2004: 59–62.

95. Красиков А.П. Новые механизмы исскуственной регуляции паразито-хозяинных отношений : автореф. дис… доктора вет. наук.: 16.00.03. Новосибирск. 1996: 1–42.

96. Красиков А.П., Рудаков Н.В., Николаева Н.Н. К вопросу об урогенитальном микоплазмозе мелких домашних животных в городе Омске. Проблемы ветеринарного образования в агропромышленном комплексе: сб. науч.тр. ИВМ ОМГАУ. Омск. 2001: 47–8.

97. Красиков А.П., Лобанова Н.В. Профилактика и меры борьбы с ассоциативными инфекционными и инвазионными болезнями животных. Сб. реф. НИР и ОКР: отчёт о НИР. Сельское и лесное хозяйство. 2001; 5 (25): 59.

98. Красиков А.П., Рудаков Н.В., Сунцова О.А. Ассоциативный респираторный микоплазмоз птиц. Актуальные проблемы обеспечения санитарного благополучия населения. Омск. 2003; 1 : 260–4.

99. Красиков А.П., Рудаков Н.В., Сунцова О.А. Производственные испытания питательных сред для диагностики микоплазмоза животных и птиц. Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов: материалы Междунар. науч.-практ. конф. Щелково. 2003: 92–5.

100. Красиков А.П., Новикова Н.Н. Эпизоотология и лабораторная диагностика урогенитального микоплазмоза собак и кошек. Проблемы ветеринарного образования в агропромышленном комплексе: сб. науч.тр. ИВМ ОМГАУ. Омск. 2003: 171–3.

101. Красиков А.П., Малошевич В.Э. Паразито-хозяинные отношения и их значение в эпизоотологии. Вестник ОмГАУ. 2003; 4: 96–101.

102. Красиков А.П., Малошевич В.Э. Профилактика, лечение и коррекция иммунной системы при микропаразитоценозах животных. Вестник ОмГАУ. 2003; 4: 101–4.

103. Красиков А.П., Сунцова О.А., Рудаков Н.В., Беспалова Т.А. Культурально-биохимические и ультраструктурные свойства микоплазм, выделенных на территории Западной Сибири Роль ветеринарного образования в подготовке специалистов АПК: сб. науч. трудов / ИВМ ОмГАУ. Омск. 2003: 157–60.

104. Красиков А.П., Новикова Н.Н., Варбанский В.Н., Приступа О.А. Урогенитальный ассоциативный микоплазмоз плотоядных: эпизоотологические и диагностические аспекты. Ветеринарная патология. 2005; 1 (12): 68–9.

105. Красиков А.П., Жонголович А.Е. Способ получения эритроцитарного диагностикума для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) при микоплазмозе свиней. Патент на изобретение № 2361218. Бюллетень № 19. Изобретения. Полезные модели. 2009.

106. Красиков А.П., Жонголович А.Е. Способ получения микоплазмозных диагностических сывороток для реакции непрямой иммунофлуоресценции путем гипериммунизации кроликов. Патент на изобретение № 2355422. Бюллетень № 20. Изобретения. Полезные модели. 2009.

107. Красиков А.П., Вологодская О.В., Свиридова А.Н. Способ получения эритроцитарного диагностикума для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) при микоплазмозе крупного рогатого скота. Патент на изобретение № 2342155. Бюллетень № 36. Изобретения. Полезные модели. 2009.

108. Красноголовец В.Н. Дисбактериоз кишечника. М.: Медицина. 1989: 1–207.

109. Кругликов В.Т. Серологическая диагностика респираторного микоплазмоза человека: автореф. дис. … канд. мед. наук: 03.00.07. НИИ эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л. В. Гормашевского. Киев. 1989: 1–20.

110. Кудрявцева Л.В., Ильина Е.Н., Говорун В.М. Бактериальный вагиноз : пособие для врачей. М. : ЛИТЕХ. 2001: 1–58.

111. Кукушкин С.А., Рахманов А.М. Болезни свиней, протекающие с нарушением воспроизводства, и их профилактика. Актуальные проблемы болезней органов размножения и молочной железы у животных: материалы науч.- практич. конф., посвящ. 35-летию ВНИВИ патологии, фармакологии и терапии. Воронеж. 2005: 259–64.

112. Кулеско И.И., Пустовар А.Я. Данные экспериментального изучения роли микоплазм при инфекционных заболеваниях свиней. Бюлл. ВИЭВ. 1972; 13: 46–9.

113. Куликова И.Л., Феоктистова Т.А. Иммуноферментный анализ для видовой идентификации микоплазм, выделенных из культур клеток. Труды ВИЭВ. 1989; 67: 50–5.

114. Куликова И.Л. Диагностика микоплазма-контаминации в культурах клеток животных. Ветеринария. 1989; 3: 35–7.

115. Куликова И.Л., Гальмутдинов Г., Дьяконов Л.П. Гибридомы и моноклональные антитела в разработке высокоэффективных методов идентификации микоплазм и диагностике микоплазмозов. Ветеринария. 1993; 9: 13–8.

116. Курдина М.И., Колмогорова И.В. Аспекты лабораторной диагностики урогенитального микоплазмоза. Вестн. дерматологии и венерологии. 2004; 6: 13–6.

117. Курлович Д.В., Андросик Н.Н. Роль микоплазм в этиологии абортов у свиноматок. Ветеринарная наука - производству: Научные труды. Белорусский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии. Минск. 1999; 34: 122–9.

118. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа. 1980: 1–293.

119. Ларсен Б. Микрофлора родовых путей в норме. Репродуктивное здоровье. Общие инфекции : пер. с англ. М. 1988; 1: 17–45.

120. Ленцер А.А., Ленцер Х.П. Актуальные проблемы микроэкологии человека. Аутофлора человека в норме и патологии и ее коррекция. Горький. 1988: 10–4.

121. Лобанова Н.В., Барановский В.Н. Этиологическая структура инфекционных болезней молодняка в хозяйствах Омской области. Вклад учёных и специалистов в развитие животноводства и ветеринарии: материалы науч. конф. ППС и аспирантов ИВМ ОмГАУ. Омск. 2001: 57–9.

122. Лобанова Н.В. Микропаразитоценозы при ассоциативных инфекционных болезнях телят: автореф. дис. канд. ветеринар. наук: 16.00.03. Омск. 2004: 1–14.

123. Лыско С.Б. Схемы профилактики и лечения респираторного и ассоциативного микоплазмоза птиц: автореф. дис… канд. ветеринар. наук: 16.00.03. Омск. 2005:1–18.

124. Максимов И.А. Смешанные респираторные инфекции КРС. Ветеринарный консультант. 2003; 9–10: 14.

125.Малова И.О. Особенности уреаплазменной инфекции урогенитального тракта у девочек. Вестн. дерматологии и венерологии. 1999; 6: 77–80.

126. Мальцева Е.С. Клиническое значение микоплазменной инфекции при хроническом пиелонефрите у детей: автореф. дис. канд. мед. наук: 14.00.09. Казань. 1996: 1–23.

127. Мананков В.В., Смелянский В. П., Пашнина Т.П., Рыбкина Р.А. Радиоиммунологические и хемилюминесцентный методы лабораторной диагностики хламидиозов и микоплазмозов человека. Природноочаговые инфекции в России: Соврем. эпидемиология, диагностика, тактика защиты населения: матер. Всерос. науч.-практ. конф. Омск. 1998: 199–200.

128. Мананков В.В., Напалкова Г.М., Пашнина Т.П., Смелянский В.П. Использование точечного твердофазного иммуноферментного анализа для диагностики хламидиоза и микоплазмоза. Природноочаговые инфекции в России: Соврем. эпидемиология, диагностика, тактика защиты населения : Всерос. науч.-практ. конф.; 20–21 окт. 1998 г.: тез. докл. Омск. 1998: 200–201.

129. Манин Б.Л. Мониторинг микоплазменной контаминации постоянных клеточных культур: материалы временных коллективов. Актуальные проблемы инфекционной патологии животных: материалы международной научной конференции, посвященной 45-летию ФГУ ВНИИЗЖ. Владимир. 2003: 250–4.

130. Маркина О.С. Сравнительное изучение геномов микоплазм инфицирующих рогатый скот : автореф. дис. … канд. ветеринар. наук. Казань. 1995: 1–18.

131. Махи Э.Ю. Культурально-биохимические свойства микоплазм и ахолеплазм отдельных видов. Труды ВИЭВ. М. 1977; 46: 58–61.

132. Методические рекомендации по выделению культивированию, поддержанию и идентификации микоплазм, ахолеплазм и уреаплазм. ВАСХНИЛ. М. 1982: 1–49.

133. Микоплазмозы животных / под ред.Я. Р. Коваленко. М.: Колос, 1976: 1–304.

134. Микоплазмы. Краткий определитель бактерий Берджи. М.: Мир, 1980: 425–34.

135. Микоплазмы и микоплазмозы: сб. науч. тр. НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. М. 1985: 70–8.

136. Миллер Г.Г., Раковская И.В., Березин В.Э. Взаимодействие микоплазм с вирусами человека и животных. Ультраструктурный анализ. Вестн. АМН СССР. 1991; 6: 36–43.

137. Миллер Г.Г. Микстинфектология, основные понятия, направления исследований, клиническое и общебиологическое значение (лекция). Клин. лаб. диагностика. 2002; 6: 25–32.

138. Митрофанов П.М., Курбанов И.А. Патоморфология микоплазмоза половых органов крупного рогатого скота. Труды ВИЭВ. М. 1972; 13: 34–6.

139. Митрофанов П.М., Курбанов И.А. Микоплазмоз половых органов у быков. Труды ВИЭВ. М. 1977; 46: 33–4.

140. Митрофанов П.М., Хакимова К.М., Гаффаров Х.З. Влияние бактерий при микоплазмозе телят. Ветеринария. 1978; 3: 52–55.

141. Митрофанов П.М. Патоморфология и патогенез микоплазменных инфекций крупного рогатого скота вызванных *M. bovirhinis* и *M. bovigenitalium.* Научно-технический бюллетень. 1981; 33: 16–22.

142. Михайлова Г.Р. Использование антибиотиков для деконтаминации клеточных культур от микоплазм. Ветеринарная патология: научно-практический журнал по фундаментальным и прикладным вопросам ветеринарии. М. 2005; 1: 48–65.

143. Момыналиев К.Т., Говорун В.М., Жукоцкий А.В., Коган Э.М., Орлова В.Ф. Использование метода полимеразной цепной реакции in situ для выявления внутриклеточной локализации *M. hominis* в культивируемых клетках Hela. Цитология. 2000; 2: 202–8.

144. Мосин Л.М. Особенности микробного пейзажа и определение терапевтических подходов на фоне урогенитальной хламидийной инфекции у женщин. Клин. лаб. диагностика. 2000; 10: 44.

145. Муравьева В.В. Микробиологическая диагностика бактериального вагиноза у женщин репродуктивного возраста : автореф. дис. ... канд. мед. наук. М. 1997: 1–23.

146. Назарова Е.К., Гиммельфарб Е.И., Созаева Л.Г. Микробиоценоз влагалища и его нарушения (этиология, патогенез, клиника, лабораторная диагностика): лекция. Клин. лаб. диагностика. 2003; 2: 25–32.

147. Наумец З.П., Андреев Е.В., Журавлёв В.М., Красников Г.А. Патогенность полевых штамммов *M. bovigenitalium* для

генитального тракта быков производителей. Труды ВИЭВ. М. 1977; 46: 35–7.

148. Наумкина Е.В., Рудаков Н.В., Темникова Н.В. *Ureaplasma urealiticum* в этиологии урогенитальных микст-инфекций. ЖМЭИ. 2006; 3: 93–5.

149. Новикова Н.Н. Сравнительный анализ микрофлоры урогенитального тракта у собак, зараженных микоплазмозом. Проблемы и перспективы развития науки в Ин-те вет. мед. ОмГАУ: к 75-летию аспирантуры: сб. науч. тр./ Ом. Гос. Аграр. Ун-т, Ин-т ветеринар. медицины. Омск: Изд-во ИВМ ОмГАУ. 2002: 173-7.

150. Новикова Н.Н. Экспресс-методы диагностики ассоциативного урогенитального микоплазмоза плотоядных: автореф. дис… канд. ветеринар. наук: 16.00.03. Новосибирск. 2002: 1–18.

151. Ночевный В.Т., Новохатский А.С., Карпухина О.Г. Профилактика и методы деконтаминации клеточных культур от бактерий и микоплазм при помощи фторхинолонов. Клеточные культуры. Информ. бюл. СПб. 2002; 17: 9–15.

152. Оганесян В.А. Приготовление и применение эритроцитарных микоплазменных антигенов в реакции непрямой гемагглютинации. Система мероприятий по обеспечению эпизоотического благополучия и эффективности птицеводческих хозяйств промышленного типа: сб.тр. Киев. 1986: 47–8.

153. Орлянкин Б.Г., Непоклонов Е.А. Инфекционные респираторные болезни свиней. Ветеринария. 2005; 11: 3–6.

154. Петровская В.Г., Марко О.П. Микрофлора человека в норме и патологии. М. : Медицина. 1976: 1–231.

155. Поликарпов В.П., Нестеров И.А. Выделение микоплазм от ягнят больных пневмониями. Бюллетень ВИЭВ. М. 1972; 13: 61.

156. Прозоровский С.В., Шмидт Т. Микоплазмы и микоплазмозы. М. 1985: 1–225.

157. Прозоровский С.В., Раковская И.В., Вульфович Ю.В. Медицинская микоплазмология. М.: Медицина. 1995: 1–288.

158. Пустовар А.Я., Киприч В.В., Авдосьева И.К. Микоплазмозы сельскохозяйственных животных. Киев: Урожай. 1978: 1–116.

159. Пустовар А.Я. Иммунобиологическая характеристика антигенов *Mycoplasma hyopneumoniae* и диагностика вызываемой ею инфекции. Вестник академии медицинских наук СССР. М.: Медицина. 1991; 6: 8–19.

160. Пустовар А.Я. Микст-инфекции, обусловленные микоплазмами и другими бактериальными агентами. VI съезд паразитоценологов Украины. Харьков. 1995: 113–4.

161. Разработка среды для накопления микоплазм / рук. Г.Р. Гаджиева // Жур.НИР и ОКР. Сер.5 Микробиология. 1992; 7: 14.

162. Раковская И.В. Микоплазмы человека и микоплазменные инфекции: (Лекция. Ч. 1). Клин. лаб. диагностика. 2005; 2: 25–32.

163. Раковская И.В. Микоплазмы человека и микоплазменные инфекции (Лекция. Ч. 2). Клин.лаб. диагностика. 2005; 3: 25–32.

164. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М. 2003: 1–312.

165. Рубинский И.А., Романова Л.Я. Эпизоотология факторно-инфекционных болезней свиней в зоне Урала. Научные основы профилактики и лечения болезней животных: сб. науч. тр. ведущих ученых России, СНГ и других стран. Екатеринбург. 2005: 328–34.

166. Рудаков Н.В., Самойленко И.Е., Калмин О.Б., Решетникова Т.А., Березкина Г.В. Разработка новых питательных сред для диагностики урогенитальных инфекций. Разработка и производство диагностических питательных сред и микротестсистем: материалы междунар. науч. конф., посвящ. 70-летию НПО «Питательные среды». Махачкала. 1998: 55–6.

167. Рудаков Н.В., Самойленко И.Е., Калмин О.Б., Решетникова Т.А., Березкина Г.В. Новые питательные среды для диагностики урогенитальных инфекций. Природноочаговые инфекции в России: соврем. эпидемиология, диагностика, тактика защиты населения / Всерос. науч.- практ. конф.: тез. докл. Омск. 1998: 201–3.

168. Рудаков Н.В., Самойленко И.Е. Актуальные вопросы урогенитальной инфекции. Актуальные вопросы рациональной диагностики и терапии хламидийно-микоплазменной инфекции. Омск. 1998: 11–3.

169. Русалеев В.С., В.М. Гневашев, О.В. Прунтова, и др. Проблемы профилактики респираторных болезней свиней бактериальной этиологии. Ветеринария. 2006; 7: 18–20.

170. Рысков А.Р., Джинчарадзе А.Г., Просняк М.И. Геномная «дактилоскопия» организмов различных таксономических групп. Использование в качестве гибридизационной пробы ДНК фага М-13. Генетика. 1988; 2 (24): 227–8.

171. Рюмин Д.В., Радзинский В.Е. Лабораторно-диагностический скрининг при обследовании больных с инфекциями, передаваемыми половым путем. Клин.лаб. диагностика. 2000; 10: 13–4.

172. Рюмин Д.В. О значении определения основных биоваров *U. urealyticum parvo* и Т-960 в клинической и лабораторной практике. Клин. лаб. диагностика. 2000; 10: 49.

Рюмин Д.В. Характеристика симбионтного состава микрофлоры мочеполовых путей у больных с рецидивирующим течением урогенитального хламидиоза. Клин.лаб. диагностика. 2001; 10: 12.

173. Савичева А.М., Башмакова М.А. Микробиоценозы влагалища и их регуляция. Дисбактериозы и эубиотики : тез. докл. науч. конф. М. 1996: 33.

174. Савичева А.М.,Прилепская В.Н., Соколовский Е.В., Кисина В.И., Гущин А.Е., Забиров К.И. Роль микоплазм в уроге-

нитальной патологии у женщин и их половых партнеров. Журнал акушерства и женских болезней. 2008; 1: 11–22.

175. Саламова Р.Э., Горина Л.Г., Волкова И.Я. Определение антигенов *Mycoplasma pneumoniae* и антител к ним иммуноферментным методом у больных с заболеванием дыхательных путей. ЖМЭИ. 1985; 7: 11–6.

176. Свиридова А.Н. Диагностика и лечение телят при микоплазмоз-ассоциированной инфекции: автореф. дис….канд. ветеринар. наук: 16.00.03. Омск. 2007: 1–18.

177. Сергевнин В.И., Пинаев К.И., Сармометов Е.В., Панов Н.Б. О половом пути передачи мочеполового уреамикоплазмоза. Здоровье населения и среда обитания: информ. бюл. 2004; 2 (131): 35–8.

178. Серебряков А.С., Осколков В.С. Изучение некоторых вопросов эпизоотологии респираторного микоплазмоза птиц. Сб. трудов ВИВЭ. М : Колос. 1966; 32: 9–23.

179. Серологические и иммуномодулирующие свойства антигенов хламидий, бруцелл и микоплазм / Рук. В.Р. Нестеренко. Журн. НИР и ОКР. Сер. 5. 2001; 2: 51.

180. Сидоров М.А., Коваленко Я.Р., Шегидевич Э.А. Методы идентификации и серологической типизации микоплазм, выделенных от животных. Бюлл. ВИЭВ. 1972; 13: 68–75.

181. Сидоров М.А., Скородумов Д.И., Федотов В.Б. Определитель зоопатогенных микроорганизмов. М.: Колос. 1995: 137–44.

182. Скворцов С.В., Найденов Ю.Н., Лыцарь Б.Н., Комаров И.А., Гончарук А.И. Диагностика хламидиоза и урогенитальных микоплазмозов при помощи цепной полимеразной реакции. Воен.-мед. журн. 1995; 7: 49–50.

183. Смирнова И. Р. Культуральные и биохимические свойства различных штаммов микоплазм. Ветеринария. 1983; 4: 63–4.

184. Соловьева С.В. Разработка и использование амплификационных тест-систем для выявления возбудителей урогени-

тальных микоплазмозов: автореф. дис. … канд. биол. наук: 03.00.07. НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Рос. АМН. М. 1997: 1–30.

185. Соловьева С.В., Цой Е.Г., Зигангирова Н.А., Гамова Н.А., Раковская И.В., Гинцбург А.Л. Выявление тетрациклин – и эритромицин устойчивых штаммов урогенитальных микоплазм с помощью ПЦР. ЖМЭИ. 1998; 6: 3–7.

186. Сунцова О.А. Усовершенствование лабораторной диагностики ассоциативного респираторного микоплазмоза птиц: автореф. дис…. канд. ветеринар. наук: 16.00.03. Омск 2004: 1–18.

187. Татарчук О.П. Ограничение вертикальной передачи микоплазм. Ветеринария. М. 2005; 12: 9–10.

188.Теохаров К.Б. Клинико-эпидемиологическая характеристика трех видов урогенитальных микоплазм у мужчин с негонорейными воспалительными заболеваниями. Актуальные вопросы рациональной диагностики и терапии хламидийно микоплазменной инфекции. Омск. 1998: 41–3.

189. Тихонова Л.И. Общий обзор ситуации с инфекциями, передаваемыми половым путем. Анализ заболеваемости врожденным сифилисом в Российской Федерации. Вестн. дерматологии и венерологии. 1999; 2. : 4–8.

190. Федоров Ю.Н., Яблонская И.А. и др. Экспресс-методы выявления антител к микоплазмам. Бюлл. ВИЭВ. 1988; 65: 11–3.

191. Федорова З.П., Виноходов О.В., Собчак И.А. Серологический анализ микоплазм, выделенных от птиц, в РСК и РА. Бюллетень ВИЭВ. М. 1972; 13: 83–5.

192. Фофанова И.Ю. Роль микоплазменной инфекции в акушерстве и гинекологии. Гинекология. 2000; 2 (3): 72–3.

193. Хан И.Н., Кучерский В.М., Чеботкевич В.Н. Комплексная молекулярно-биологическая и микробиологическая диагностика урогенитальных инфекций. Генодиагностика инфекционных заболеваний: тез.докл. IV Всерос. науч.-практ. конф. М. 2002 : 88–9.

194. Цвелев Ю.В. Анаэробная инфекция в акушерско-гинекологической практике. СПб.: Питер Пресс. 1995: 1– 320.

195. Чеботкевич В.Н., Ведмецкая Т.И., Волкова С.Д., Волков А.В., Егоров А.А. Значение молекулярных и микробиологических методов диагностики для обоснования этиопатогенетической терапии урогенитального микоплазмоза. Генодиагностика инфекционных заболеваний : тез.докл. V Всерос. науч.-практ. конф. М. 2004: 139–41.

196.Черкасова А.В., Дашенко Л.М., Пономарева М.И. Болезни свиноматок и хряков-производителей. Киев: Урожай. 1978: 1–570.

197. Шагинян И.А., Токарская О.Н., Грижебовский Г.М. Современные направления медицинских диагностикумов. М. 1990: 1–80.

198.Шаповалова Г.П. Реакция агглютинации для прижизненной диагностики микоплазма-милиагридис инфекции индеек: тез. докл. Всесоюз. науч.-произв. конф. Комплексная система ветеринарных мероприятий в птицеводстве – резерв повышения эффективности производства. М. 1989: 24–6.

199. Шафиев А.П. Микоплазмозная пневмония свиней: диагностика и меры борьбы: автореф. дис. … канд. ветеринар. наук: 16.00.03. ФГОУ ВПО «СПбГАВМ». 2005: 1–18.

200. Шафиев А.П., Кудряшов А.А. Патоморфологические изменения при микоплазмозной пневмонии свиней. Ветеринарная практика: научно-практический журнал. СПб. 2002; 1: 38–41.

201. Шахов А.Г., Лесных В.И., Шведковская Е. В., Бригадиров Ю.Н., Чернов В.В. Профилактика респираторных болезней свиней. Ветеринария. 1988; 11: 41–3.

202. Шахов А.Г., Бригадиров Ю.Н., Сашнина Л.Ю., Лебедев М.И. Этиологическая структура массовых болезней поросят в крупных специализированных свиноводческих хозяйствах. Проблемы инфекционной патологии свиней. М. 2007: 51–5.

203. Швацкова Т.А., Цыганко Е.В. Частота встречаемости *Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis и Ureaplasma urealyt-*

icum в Екатеринбурге. Генодиагностика инфекционных заболеваний: тез. докл. V Всерос. науч.-практ. конф. М. 2004: 145–7.

204. Шендеров Б.А. Микроэкологическая токсикология: реальность, проблемы и перспективы. Антибиотики и микроэкология человека и животных. М.1988: 3–7.

205. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. 1. Микрофлора человека и животных и ее функции. М. : Грантъ. 1998: 1–288.

206. Шегидевич Э.А. Методы выделения и идентификации микоплазм и L-форм бактерий. Труды ВИЭВ. 1977; 46: 35.

207. Шкиль Н.Н., Стеблева Г.М., Шадрина М.Н. К вопросу антигенного родства бруцелл и микоплазм. Вклад молодых ученых в развитие Сибирской аграрной науки: мат. конф. науч. молод. СО Россельхозакадемии (23 апреля 1998 г.). Новосибирск. 1999: 157–8.

208. Юцковская Я.А., ЮцковскийА.Д. Особенности сексуального поведения и социальные характеристики лиц, инфицированных *U. urealyticum*. Инфекции, передаваемые половым путем. 2003; 3: 36–7.

209. Яблонская И.А. Серологическая типизация микоплазм сельскохозяйственных животных. Труды ВИЭВ. 1977; 46: 13.

210. Якубович А.И.,Чупин А.Е., Корепанов А.Р. Структура урогенитальной патологии у мужчин, обратившихся в кабинет анонимного обследования и лечения в 2000-2002 гг. Журн. инфекционной патологии. 2003; 4 (10): 120–1.

211. Abele-Horn M., Wolff C., Dressel P., Pfaff F., Zimmermann A. Association of *Ureaplasma urealyticum* biovars with clinical outcome for neonates, obstetric patients, and gynecological patients with pelvic inflammatory disease. J. Clin. Microbiol. 1997; 35 (5): 1199–202.

212. Adegboye D. Immune mechanisms in *M. suipneumoniae* infection of pigs with special reference to cell.-mediated immunity. Dis. Abstr. International. 1978; 38: 30–45.

213. Ameri-Mahabadi M., Zhou E.M., Hsu W.H.. Comparison of two swine Mycoplasma hyopneumoniae enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies from vaccinated pigs and field serum samples. J. Vet. Diagn. Invest. 2005; 17 (1): 4–61.

214. Amsel R., Totten P.A., Spiegel C.A., Chen K.C., Eschenbach D., Holmes K.K. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic assotiations. Amer. J. Med. 1983; 74 (1): 14–22.

215. Albertsen B.E. Pleuropneumonia-like organisms in the sement of danishartificial insemination bulls. Nord. Vet. Med. 1955; 7: 169.

216. Armstrong C.H., Freeman M.J., Sands-Freeman L. Comparison of the ensyme- linked immunosorbent assay and the indirect haemagglutination and complement fixation tests for detecting antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. Canad. J. Comp. Med. 1983; 47 (4): 464–70.

217. Armstrong C.H., Scheldt A.B., Thacker H.L., Runnels L.J., Freeman M.J. Evaluation of criteria for the postmortem diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine. Canad. J. Comp. Med. 1984; 48: 278–81.

218. Artiushin S., Stipkovits L., Minion F.C. Development of polymerase chain reaction primers to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*. Mol. Cell. Probes. 1993; 7: 381–5.

219. Baier R.J., Loggins J., Kruger T.E. Failure of erythromycin to elimimate airway colonization with ureaplasma urealiticum in very low birth weight infants. BMC Pediatr. 2003; 4 : 3–10.

220.Barber T.L., Fabricant J. Primari isolation of mycoplasma organisms (PPLO) from mammalian sources. J. Bact. 1962; 83 (6): 1268.

221. Bartlett J. G., Polk B.F. Bacterial flora of the vagina:quantitative study. Rev. Infect. Dis. 1984; 6 (1): 67–72.

222. Bartlett J. G. Cervical and vaginal bacterial flora: ecologic niches in the female lower genital tract. Am. J. Obstret. Ginecol. 1987; 130: 658–61.

223. Bashiruddin J.B., Frey J., Konigsson M.N. Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*: a collaborative trial. Vet. J. 2005; 169 (2): 268–343.

224. Baumeister A.K., Runge M., Ganter M., Feenstra A.A., Delbeck F., Kirchhoff H. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluids of pigs by PCR. J. Clin. Microbiol. 1998; 36: 1984–8.

225. Bernet C., Carret M., de Barbeyrac B. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by using the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1989; 27 (11): 2492–5.

226. Bihari A. Screening of sexually transmitted diseases (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Chlamydia trachomatis*) in young women. Orv. Hetil. 1997; 138 (13): 799–803.

227.Blanchard B., Kobisch M., Bove J.M., Saillard C. Polymerase chain reaction for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in tracheobronchiolar washings from pigs. Mol. Cell. Probes. 1996; 10: 15–22.

228. Blom E., Ern H. Mycoplasmosis infections of the genital organs of Bulls. Acta Vet. Scand. 1967; 8 : 186.

229. Blom E., Ern H. Mycoplasmas in semen of Danish breeding bulls. Proc. II Nordic Vet. Cong. 1970: 254.

230. Boatman E. Morphology and ultrastructure of mycoplasmas. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1973; 225: 172.

231. Boye M., Jensen T.K., Ahrens P., Hagedorn-Olsen T., Friis N.F. In situ hybridisation for identification and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae, Mycoplasma hyosynoviae* and *Mycoplasma hyorhinis* in formalin-fixed porcine tissue sections. APMIS. 2001; 109 (10): 64–5.

232. Bredt W. Pathogenicity factors of mycoplasmosis. Infections. 1976; 4 (1): 9–12.

233. Bruggman S., Engberg B., Ehrenspercer F. Demonstration of *M. suipneumoniae* in pig lungs by the enzyme-linked immunoperoxidase technique. Vet. Rec. 1977; 101:137.

234. Cai H.Y., Bell-Rogers P., Parker L. Development of real-time PCR for detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk and lung samples. J. Vet. Diagn. Invest. 2006; 17(6): 537–82.

235.Caron J., Ouardani M., Dea S. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. J. Clin. Microbiol. 2000; 38 (4): 1390–6.

236. Caron J., Sawyer N., Ben Abdel Moumen B., Cheikh Saad Bouh K., Dea S. Species-specific monoclonal antibodies to *Escherichia coli*-expressed p36 cytosolic protein of *Mycoplasma hyopneumoniae.* Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2000; 7 (4): 35–528.

237. Cedillo-Ramirez L., Gil C., Zago I., Ybcez A., Giono S. Association of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* with some indicators of nonspecific vaginitis. Rev. Latinoam. Microbiol. 2000; 42: 1–6.

238. Chanock R., Hayflick L., Barile M. Growth on artificial medium of an agent asociated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. Proc. Nat. Acad. Sci. 1962; 48 (1): 41.

239. Chanock R., Hayflick L., Barile M. Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. Proc. Nat. Acad. Sci. 1962;48 (1): 41.

240.Chapin-Robertson K. Use of molecular diagnostics in sexually transmitted diseases. Critical assessment. Diagn. Microbiol. Infect.Dis. 1993; 16 (2): 173–84.

241. Chiarini F., Pisani S., Gallinelli C., Papi E., Seganti L., Degener A.M., Pierangeli A., Gentile V., Brunori S., Di Silverio F. Simultaneous detection of HPV and other sexually transmitted agents in chronic urethritis. Minerva Urol. Nefrol. 1998; 50 (4): 225–31.

242. Chima J.C., Onoviran O. A passive haemagglutination test for detection of antibodies against *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* using glutaraedehydede fixed sheep erythrocytes. Vet. Microbiol. 1982;7: 343–9.

243. Christiansen G., Jensen L.T., Boesen T., Emmersen J., Ladefoged S. A, Schiøtz L.K., Birkelund S. Molecular-biology of mycoplasma. Wiener Klinische Wochenschrift. 1997; 109 (14–15): 557–61.

244. Chua K.B., Ngeow Y.F., Ng K.B., Chye J.K., Lim C.T. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* isolation from cervical secretions of pregnant women and nasopharyngeal secretions of their babies at deliver. Singapore Med. J. 1998; 39 (7): 300–2.

245. Dark L.K., Armstrong C.H., Scheidt A.B., Van Alstine W.G. The effect of Mycoplasma hyopneumoniae infection on growth in pigs with or without environmental constraints. Swine Health Prod. 1993; 1: 10–8.

246. Da Silva C.S., Adad S.J., Hazarabedian de Souza M.A., Macêdo Barcelos A.C., Sarreta Terra A.P., Murta E.F. Increased frequency of bacterial vaginosis and *Chlamydia trachomatis* in pregnant women with human papillomavirus infection. Gynecol. Obstet. Invest. 2004; 58 (4): 89–193.

247. Deng S.H. Environmental factors affecting the severity of pneumonia in pigs. Vet. Rec. 1991; 128: 582–6.

248. Deng G., McIntosh M.A. An amplifiable DNA region from the *Mycoplasma hyorhinis* genome. J. Bacteriol. 1994; 176 (19): 5929–37.

249. Demirezen S., KorkmazE., Beksac M.S. Assotiation between trichomoniasis and bacterial vaginosis: examination of 600 cervicovaginal smears. Cent. Eur. J. Public Health. 2005; 13 (2): 96–8.

250. De Moreno N.O., L. de Richard, X. Lean The presence of genital mycoplasmas in women of reproductive age. Rev. Med. Panama. 1993; 18, (3): 238–41.

251. Dienes L., Edsall G. Observation of the L-organism of Klieneberger. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.1937; 36:740–4. Hayflick L., Chanock R.M. Mycoplasma Species of Man.Bacteriol. Rev.1965; 29 (2): 185–221.

252. Doster A.R., Lin B.C. Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* in formalin-fixed porcine lung, using an indirect immunoperoxidase method. Am. J. Vet. Rec. 1988; 49 (10): 1719–21.

253. Dussurget O., Roulland-Dussoix D. Rapid, sensitive PCR-based detection of mycoplasmas in simulated samples of animal sera. Appl. Environ. Microbiol. 1994; 60 (3): 953-9.

254. Edward D.G. Selective medium for pleuropneumonia-like organism. J. Gen. Microbiol. 1947; 1 (2): 238–43.

255. Edward D. An investigatio of the biological properties of organisms of the pleuropneumonia group, with suggestions regarding the identification of strains. J. Gen. Microbiol. 1950; 4: 311.

256. Edward D. An investigation of pleuropneumonia-like organism isolated from the bovine genital tract. J. Gen. Microbiol. 1950; 4: 4.

257. Edward D., Fitzgerald W. The isolation of organisms the pleuropneumonia group of dogs. J. Gen. Microbiol. 1951; 5: 566–9.

258. Edward D. The pleuropneumonia group of organism: a reiew together with some new observations. J. Gen. Microbiol. 1954; 10: 27.

259.Edward D.G., Freundt E.A. The classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group. J. Gen. Microbiol.1956; 14 (1): 197–207.

260. Edward D.G., Freundt E.A. Proposal for *Mollicutes* as name of the class established for the order Mycoplasmatales. Int. J. Syst. Bacteriol.1967; 17 (3): 267–8.

261. Edward D.G., Freundt E.A. Type strains of special of the order *Mycoplasmatales*, including designation of neotypes for *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides, Mycoplasma agalactiae subsp. agalactiae* and *Mycoplasma arthriditis.* Int. J. Syst. Bacteriol. 1973; 23: 55–61.

262. Erno H., Salih M.M. The growth precipitation test as a diagnostic methods for differentiation of mycoplasma and acholeplasma species. Acta Vet. Scand. 1980; 21: 469–81.

263. Feenstra A., Madsen E. B., Friis N.F., Meyling A., Ahrens P.A field study of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. J.Vet. Med.B. 1991; 38 (3): 195–202.

264. Finegold S.M. History of obligate anaerobes as part of human microflora. Microb. Ecol. Health Dis. 1996; 9: 11.

265. Fox L.K., Kirk J.H., Britten A.J. *Mycoplasma mastitis*: a review of transmission and control. Vet. Med. 2005; 52 (4): 153–160.

266. Freeman M.J., Armstrong C.H., Sands-Freeman L.L., Lopez-Osuna M. Serological cross-reactivity of porcine reference antisera to *Mycoplasma hyopneumoniae, M. flocculare, M. hyorhinis* and *M. hyosynoviae* indicated by the enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation and indirect haemagglutination tests. Can. J. Comp. Med. 1984; 48 (2): 202–7.

267.Freundt E.A. The taxonomy of *Mycoplasmatales* recent progress and current problems. Mycoplasmatales. Paradubice. 1973: 9.

268. Friis N.F. *Mycoplasma suipneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* in comparative pathogenicity studies Acta Vet. Scand. 1974; 15: 507–18.

269. Friis N.F. Mycoplasms of swine. A review. Nord Vet. Med. 1975; 27 (6): 36–329.

270. Friis N.F. Some recommendation concerning primary isolation of *M. suipneumoniae* and *M. flocculare* a survey. Nord. Vet. Med. 1975; 27 (6): 337–339.

271.Friis N.F., Feenstr A.A. *Mycoplasma hyorhinis* in the etiology of serositis among piglets. Acta Vet. Scand. 1994; 35 (1): 93–8.

272. Furr P.M., Taylor-Robinson D. Factors influencing the ability of different mycoplasmae to colonize the genital tract of hormone-treated female miceInt. J. Exp. Pathol. 1993; 74 (l): 97–10l.

273. Galask R.P., B. Larsen, M.S. Ohm Vaginal flora and it is role in disease entities. Clin. Obstet. Ginecol. 1976; 19 (1): 61–81.

274. Garrity G.M., Bell J.A.& Lilburn T.G.The Taxonomic Outline of the Prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology; Second Edition, Release 5.0 2004: 140–204.

275. Garrity G.M., Lilburn T.G., Cole J.R., Harrison S.H., Euzeby J. Tindall B.J. The Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea. (TOBA Release 7.7); March 2007.

276. Garsia M., Ikuta N., Levisohn S. Evaluation and comparison of various PCR metods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. Avian Dis. 2005; 49(1): 125–57.

277. Geary S.J., Forsyth M.N. PCR: random amplified polymorphic DNA fingerprinting. Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology. 1996: 81–5.

278. Gerlach H. Occurrence of mycoplasmas in pigeons. Berl. Munch. Tierarztl. Wsch. 1977; 90: 140.

279. Giraldo P. Vaginal heat shock protein expression in symptom-free women with a history of recurrent vulvovaginitis. Am. J. Obstet. Gynecol. 1999; 180 (3, pt. l): 524–9.

280. Gil-Juarez C., Calderon B.A., Montero J., Yanez A. Detection of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in women sexually active or not. Rev. Latinoam. Microbiol. 1996; 38: 81–8.

281. Gobel U.B., Geiser A., Stanbrige E.J. Oligonucleotide probes complementary to variable region of ribosomal RNA discriminate between *Mycoplasma* species. J. Gen. Microbiol. 1987; 133: 1969–74.

282. Gois M., Kuksa F. Intranasal infections of gnotobiotic piglets with *Mycoplasma hyorhinis*: differences in virulence of the strains and influense of age en the development of infection. Zentralblatt fur Veterinar medizin. 1974; 21(5): 352–61.

283. Goodwin R.F.W. The phenomenon of suppressed respiratory disease in the litters of older sows. Vet. Rec. 1965; 77: 383–7.

284. Goodwin R.F.W. The detection of enzootic pneumonia in pig herds. Vet. Rec. 1967;81: 643–7.

285. Goodwin R.F.W., Pomeroy A.P., Whittlestone P. Attempts to recover *M. suipneumoniae* from experimental and natural cases of enzootic pneumonia in pig. J. Hyg. 1969; 66: 595–603.

286. Goodwin R.F.W. Apparent reinfection of enzootic-pneumonia-free pig herds: Early signs and incubation period. Vet. Rec. 1984; 115: 320–4.

287. Goodwin R.F.W. Apparent reinfection of enzootic-pneumonia-free pig herds: Search for possible causes. Vet. Rec. 1985; 116: 690–4.

288. Gourlay R.N. Mycoplasma-induced arthritis in farm animals. Isr. J. Med. Sci. 1981; 17 (7): 626–7.

289. Hagedorn-Olsen T., Nilsen N.S., Friis N.F. Induction of arthritis with *Mycoplasma hyosynoviae* in pigs: clinical response and reisolation of the organism from body fluids and organs. Transboundary and Emerging Diseases. 1999; 46 (6): 317–25.

290. Hames B.O., Higgins S.J. Nucleic acid hybridization: A Practical Approach. Oxford University Press. 1985: 1–264.

291.Hasmussen V.F. The economic importance of chronic plevritis in slaughter pig production. Proc. Int. Pig Vet. Soc. 1984; 8: 374.

292. Hoelzle L.E., Adelt D., Hoelzle K., Heinritzi K., Wittenbrink M.M. Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* in porcine blood. Vet. Microbiol. 2003; 93 (3): 185–96.

293. Hoelzle L.E., Hoelzle K., Ritzmann M., Heinritzi K. & Wittenbrink M.M. *Mycoplasma suis* antigens recognized during humoral immune response in experimentally infected pigs. Clin. Vaccine Immunol. 2006; 13 (1): 116–122.

294. Howard W.W., Rosenbush F.R., Lauerman L.H. Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis. Mycoplasmosis Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. 1993: 1–173.

295.Hoare M., Haig D. Survey of the incidence of Mycoplasma infection in the Oviducts of Dairy Cows. Vet. Rec. 1969; 85 (13): 351–5.

296. Iles R., Ross P., McIntosh N. Infection with *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* and the development of chronic lung disease in preterm infants. Acta Pediat. 1996; 4: 482–4.

297. Jamieson D.J. Longitudinal analysis of bacterial vaginosis: findings from the HIV epidemiology research study. Obstet. Gynecol. 2001; 98 (4): 656–63.

298. Jansson E., Backman A., Hakkarainen K., Miettinen A., Seniusová B. Mycoplasmas and arthritis. Z. Rheumatol. 1983; 42 (6): 315–9.

299. Jasper D. Mycoplasma: Their role in bovine disease. J. Am. Vet. Med. Ass. 1967;12: 650.

300. Jurstrang M., Jasen J.S., Fredlung H., Falk L., Molling P. Detection of *Mycoplasma genitalium* in urogenital speciments by real-time PCR and by conventional PCR assay. J. Med. Microbiol. 2005; 54 (1): 23–32.

301. Jeremias J., Giraldo P., Durrant S., Ribeiro-Filho A. and Witkin S.S. Relationship between *Ureaplasma urealyticum* vaginal colonization and polymorphism in the interleukin-1 receptor antagonist gene. J. Infect. Dis. 1999; 180 (3): 912–4.

302. Johansson K.-E., Pettersson B. Taxonomy of Mollicutes. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas (Razin S, Herrmann R, eds.). New York: Kluwer Academic Plenum. 2002: 1–30.

303. Karaca M., Bayram A., Kocoglu M.E., Gocmen A., Eksi F. Comparison of clinical diagnosis and microbiological test results in vaginal infections. Clin. Exp. Obstet. Gynecol. 2005; 32 (3): 172–174.

304. Kataoka S., Yamada T., Chou K., Nishida R., Morikawa M., Minami M., Yamada H., Sakuragi N., Minakami H. Assotiation between preterm birth and vaginal colonisation by mycoplasmas in early pregnancy. J. Clin. Microbiol. 2006; 44 (1) : 51–5.

305. Keane F.E., Thomas B.J., Gilroy C.B., Renton A., Taylor-Robinson D. The assotiation of *Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* with bacterial vaginosis: observations on heterosexual women and their male partners. / Int. J. STD AIDS. 2000; 11: 356–60.

306. Кehoe I., Norcross N.L., Carmichael L. Bovine *Mycoplasma mastitis.* Ann. N.Y. Acad. Sci. 1967; 143 (1): 337–44.

307. Klieneberger-Nobel E. Pleuropneumonia-like organisms in genital infections. Brit. Med. J. 1959; 1: 19.

308. Kobayashi H., Munthali G., Miyamoto C., Morozumi T., Mitani K., Ito N. Simple preparation of Mycoplasmal DNA-template for PCR from biological samples using effective surfactants J. of Vet. Med. Science. – 1996; 58 (5): 477–9.

309. Kobayashi H., Hirose R., Worarach A., Paugtes P., Ito N., Morozumi T. In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovirhinis, Mycoplasma alkalescens* and *Mycoplasma bovigenitalium* by PCR. J. Vet. Med. Sci. 1999; 60 (12): 1299–303.

310. Koch A., Bilina A., Teodorowicz L., Stary A. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in patients with sexually transmitted diseases. Wien Klin. Wochenschr. 1997. Vol. 109; 14–15. P. 584–589.

311. Kong F., Zhu X., Wang W., Zhou X., Gordon S., Gilbert G.L. Comparative analysis and serovar-specific identification of multiple-banded antigen genes of *Ureaplasma urealyticum* biovar 1.J. Clin. Microbiol. 1999; 37 (3): 538–43.

312. Larsen B. Vaginal flora in health and disease. Clin. Obstet. Ginecol. 1993; 36 (1): 1–10.

313. Lauerman L.H., Chilina A.R., Closser J.A. and Johansen D. Avian mycoplasma identification using polymerase chain reaction amplicon and restriction-fragment-length-polymorphism analysis. Avian Diseases. 1995; 39 (4): 804–11.

314. Leach R.N. Comparative studies of Mycoplasma of bovine origin. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1967; 143 (1): 305–316.

315. Leberman P., Smith P., Morton H. Symbiotic growth of pleuropneumonia-like organisms with bacterial colonies. Proc. Soc. Exp. Biol. 1949; 72 (2): 328–30.

316. Leberman P., Smith P., Morton H. The susceptibility of pleuropneumonia-like organisms to the in vitro action of antibiotics:

erythromycin, chloramphenicol, dehydrostreptomycin and sodium penicillin. J. Urol. 1950; 64: 167–73.

317. Leberman P., Smith P., Morton H. Susceptibility of pleurapnevmonia-like organisms to the in vitro action of antibiotics: terramycin and neomycin. J. Urol. 1952; 68 (1): 399–402.

318. Lemcke R. Media for the *Mycoplasmatoceae.* Lab. Pract. 1965; 14 (6): 712.

319. Levy J.A., Sumner P.E., Hooser L.E. Rapid tissue culture method for detection of *Mycoplasma hyorhinis*. J. Gen. Microbiol. 1982; 128 (11): 2817-20.

320. Ley D.N., Yoder H. W. *Mycoplasma gallisepticum.* Diseases of poultry. USA. 2003: 227–43.

321. Ludwig W., Schleifer K.-H. and Whitman W. B. Revised road map to the phylum Firmicutes. *In* P. De Vos et al. (eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 3 (The Firmicutes). Springer-Verlag, New York. 2009.

322. Luo M., Zhang L., Xiao Y. The prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum* cervical infection in infertility women and the observation of therapeutic efficacy. Hunan I Ko Ta Hsueh Hsueh Pao. 1998; 23 (5): 444–6.

323. Mabanta C.G., Pryhuber G.S., Weinberg G.A., Phelps D.L. Erytromycin for the prevention of chronic lung disease in intubated preterm infants at risk for, or colonized or infected with *Ureaplasma urealiticum*. Cochrane Database Systs Rev. 2003; 4: CD0033744.

324. Madjar S., Nativ O., Barbara J., Tal J., Potasman I., Srugo I. Diagnostic and therapeutic approach to sexually transmitted diseases. Harefuah. 1996; 130 (2): 811–4.

325. Mahony J.B., Jang D., Chong S., Luinstra K., Sellors J., Tyndall M., Chernesky M. Detection of *Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Ureaplasma urealyticum*, and *Mycoplasma genitalium* in First-void Urine Specimens by Multiplex Polymerase Chain Reaction. Mol. Diagn. 1997; 2: 161–8.

326. Mare C.J., Switzer W.P. *Mycoplasma hyopneumoniae*. A causative agent of virus pig pneumonia. Vet. Med. 1965; 60: 841–6.

327. Meens J., Selke M., Gerlach G.F. Identification and immunological characterization of conserved *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoproteins Mhp378 and Mhp651. Vet. Microbiol. 2006; 116: 85–95.

328. Meyling A. *Mycoplasma suipneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* demonstrated in pneumonic pig lungs by the fluorescent antibody technique. Acta vet. scand. 1971; 12: 137–41.

329. Mehta A., Talwalkar J., Shetty C.V., Motashaw N.D. Microbial flora of the vagina. Microecol. Ther. 1995; 23: 1–7.

330.Moller B.R., Freundt E.A. Monkey animal model for study of mycoplasmal infections of the urogenital tract. Sex Transm. Dis. 1983; 10, Suppl 4: 359–62.

331.Morris C., Gardner I., Hietala S., Carpender T., Anderson R.J., Parker R.M. Persistence of passively acquired antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd. Prev. Vet. Med. 1994; 21: 29–41.

332. Morris C., Gardner I., Hietala S., Carpender T. Enzootic pneumonia: Comparison of cough and lung lesions as predictors of weight gain in swine. Can. J. Vet. Rec. 1995; 59 (3): 197–204.

333. Murray R.G.E. Fine structure and taxonomy of bacteria. In Ainsworth G.C. and Sneath P.H. A. (ed.), Microbial classification, 12th Symposium, Society for General Microbiology. Cambridge UniversityPress, Cambridge. 1962: 119–144.

334. Naessens A., X. Cheng, Lauwers S. Development of a monoclonal antibody to a *Ureaplasma urealyticum* serotype 9 antigen. J. Clin. Microbiol. 1998; 36, Apr.: 1125–27.

335. Newnham A., Chu H. An in vitro comparison of some antibacterial, antifungal and antiprotozoal agents in various strains of Mycoplasma (PPLO). J. Hyg. 1965; 63: 1–23.

336. Nicolet J., Paroz P., Bruggmann S. Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme linked immunosorbent assay. Res. Vet. Sci. 1980; 29: 305–9.

337. Nielsen E.O., Lauritsen K.T., Friis N.F., Enoe C., Hagedorn-Olsen T., Jungersen G. Use of a novel serum ELISA method and the tonsil-carrier state for evaluation of *Mycoplasma hyosynoviae* distributions in pig herds with or without clinical arthritis. Vet. Microbiol. 2005; 1–2: 41–50.

338. Nielsen E.O., Nielsen N.C., Friis N.F. *Mycoplasma hyosynoviae* arthritis in grower-finisher pigs. J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med. 2001; 48 (8): 475–86.

339. Nocard E., Roux E. (1990). The microbe of pleuropneumonia. 1896. Rev. Infect. Dis.1990. 12 (2): 354–8. "Translation of *Le microbe de la péripneumonie.* Ann Inst Pasteur 12, 240–262, 1898".

340. Ohashi A. Clinicobacteriological study of microbial flora in vagnal microbial flora according to the menstrual cycle. / J. Jap. Ass. Infect. Dis. 1980; 54: 321–30.

341. Ogata M. Mycoplasma infections in animals. J. Jap. Ass. Infect. Dis. 1974; 49: 417.

342. Ogasava K.K., Goodwin T.M. Efficacy of azitromycin in reducing lower genital *Ureaplasma urealiticum* colonization in women at risks for preterm delivery. J. Matern Fetal Med. 1999; 1: 12–18.

343. Oleen-Burkey M.A. , Hillier S.L. Pregnancy complycations associated with bacterial vaginosis and their estimated costs. Infect. Dis. Obsted. Gynecol. 1995; 3: 149–57.

344. Olson N., Seymour W.R., Boothe A.D., Dozsa L. Characteristics of PPLO isolated from the genital and respiratory tracts of cattle. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1960; 79: 677–685.

345. Oshima K., Nishida H. Phylogenetic relationships among mycoplasmas based on the whole genomic information. J. Mol. Evol.2007; 65 (3): 249–58.

346. Overmann B.A. The vaginal as an ecologyc sistem. Current understandin and clinical applications. J. Nurse Midwifery. 1993; 38 (3): 146–51.

347. Page L.A., Frey M.L., Ward J.K., Newman F.S., Gerloff R.K., Stalheim O.H. Isolation of a new serotype of Mycoplasma from a bovine placenta. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1972; 161 (8): 919–25.

348. Patai K., Fuzi M., Kanjo A.H., Sipos M., Paulin F. Severe genital mycoplasma infection following cesarean section. Orv. Hetil. 1998; 139 (11): 641–3.

349. Potgieter L.N., Ross R.F. Identification of *Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma hyosynoviae* by immunofluorescence. Am. J. Vet. Res. 1972; 33 (1): 91–8.

350.Potts J.M., Ward A.M., Racklev R.R. Association of chronic urinary symptoms in women and *Ureaplasma urealyticum.* Urology. 2000; 55 (4): 486–9.

351. Povlsen K., Thorsen P., Lind I. Relationship of *Ureaplasma urealyticum* biovars to the presence or absence to the time of delirry. Eur. J. Microbiol. Infect. Dis. 2001; 20: 65–7.

352. Priestley C.J., Jones B.M., Dhar J., Goodwin L. What is normal vaginal flora? Genitourin. Med. 1997; 73 (1): 23–8.

353. Qi H., Liu X., Gu M. *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum* infection in patients with tubalpregnancy. Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih. 1997; 32 (2): 93–6.

354. Ramires A.S., Naylor C.J., Hammond P.P. Development and evaluation of diagnostic PCR for Mycoplasma sinovia using primers located in the intergenic spacer region the 23S RNA gene. Vet. Microbiol.. 2006; 7: 12–8.

355. Razin S., Barile M.F., Harasawa R., Amikam D., Glaser G. Characterization of the Mycoplasma genome. Yale J. Biol. Med. 1983; 56 (5-6): 357–366.

356. Razin S. DNA probes and PCR in diagnosis of mycoplasma infections. Molecular and cellular probes. 1994; 8 (6): 497-511.

357.Razin S., Yogev D., Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. Microbiol. Molec. Biol. 1998; 62 (4): 1094–156.

358. Ro L.H., Ross R.F. Comparison of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains by serologic methods. Am. J. Vet. Res. – 1983; 44 (11): 2087–94.

359. Ross R.F., Duncan J.R. *Mycoplasma hyosynoviae* arthritis of swine. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1970; 157 (11): 1515–8.

360. Ross R.F., Switzer W.P., Duncan J.R. Experimental production of *Mycoplasma hyosynoviae* arthritis in swine. Am. J. Vet. Res. 1971; 32 (11): 1743–9.

361. Richter S.S. Antifungal susceptibilities of Candida species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. J. Clin. Microbiol. 2005; 43 (5): 2155–62.

362. Ross S.A., Novak Z., Ashrith G., Rivera L. B., Britt W. J., Hedges S., Schwebke J. R., Boppana A. S. Assotiation betveen genital tract cytomegalovirus infection and bacterial vaginosis. J. Infect. Dis. 2005; 192 (10): 1727–30.

363. Schaeverbeke T., Renaudin H. Systematic detection of mycoplasmas by culture and polymerase chain reaction (PCR) procedures in 209 synovial fluid samples. Br. J. Rheumatol. 1997; 36, Mar. : 310–4.

364. Schwebke J.R., Desmond R. Risk factors for bacterial vaginosis in women at high risk for sexually transmitted diseases. Sex. Transm. Dis. 2005; 32 (11): 654–8.

365.Schoetensack H. M. Pure cultivation of the filtrabl virus isolated from canin distemper. Kitasato Arch. Exp. Med. 1934; 11: 277.

366. Shifrine M., Gourlay R. Serological relationship between *Mycoplasma mycoides* and other bacteria. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1967; 143: 317–24.

367. Skerk V., Barsic B., Car V. Comprative analisis of azitromycin and doxycylline efficacy in the treatment of female patients with acute uretral syndrome caused by *Ureaplasma urealiticum* in very low birth weight infants. J. Chemother. 2000; 12 (2). 186–94.

368. Skerk V., I. Marecovic, J.Begovac et al. Comprative randomized pilot stady of azitromycin and doxycylline efficacy and tolerability in the treatment of prostate infection caused by *Ureaplasma urealiticum*. Chemotherapy. 2006; 52(1): 9–11.

369. Sobel J.D., Schneider J., Kaye D. and Levison M.E. Adherence of bacteria to vaginal epithelial cells at various times in the menstrual cycle. Infect. Immun. – 1981; 31: 194–7.

370. Soepr D.E. Bacterial vaginosis and postoperative infections. Am. J. Obstet. Gynecol. 1993; 169 (2): 467–9.

371.Sorensen V., Barfod K., Feld N.C., Vraa-Andersen L. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for the surveillance of Mycoplasma hyopneumoniae infection in pigs. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 1993; 12: 593–604.

372. Speck J. PPLO from the genital system of cattle. Tierheilk. 1962;14: 244.

373. Stamm W.E., Running K., Hale J., Holmes K.K. Etiologic role of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in women with the acute urethral svndrome. Sex Transm. Dis. 1983; 10 (4) ,Suppl.: 318–22.

374. Stemke G.W. A gene probe to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*, the causative etiological agent of enzootic porcine pneumonia. Mol. Cell. Probes. 1989; 3: 225–32.

375. Stipkovits L., Rashwan A., Takacs J. and Lapis K. Occurrence of ureaplasma in swine semen. Zbl. Vet. Med. B. 1978; 25 (7): 605–608.

376. Stipkovits L., G. Laber, E. Schutze Treatment of enzootic pneumonia with tiamulin. Proc. 5 th World Int. Pig. Vet. Soc. Cong. Zagreb. 1978: 56–8.

377. Stipkovits L. *Mycoplasma pneumoniae* of swine. Vet. Med. Res. Ins. of Hungarian Acad. of Sciences. Budapest, Hungary. 1995: 18–9.

378. Straw B. Controlling pneumonia in swine herds. Vet. Med. 1992; 1: 78–86.

379. Sung H., Kang S.H., Bae Y.J. PCR-based detection of Mycoplasma species. J. Microbiol. 2006; 44 (1): 9–42.

380. Switzer W.P., Roberts E.D., Ramsey F.K. Pathology of the visceral organs of swine inoculated with *Mycoplasma hyorhinis.* Am. J. Vet. Res. 1963; 24: 9–18.

381. Tang F. F., Wei H., Edgar J. Further investigations on the causal agent of bovine pleuropneumania. J. Path. Bact. 1936; 42 (1): 45–51.

382. Taylor M.A., Wise K.S., McIntosh M.A. Species-specific detection of *Mycoplasma hyorhinis* using DNA probes. Isr. J. Med. Sci. 1984; 20 (9): 778–80.

383. Taylor M.A., Wise K.S., McIntosh M.A. Selective detection of *Mycoplasma hyorhinis* using cloned genomic DNA fragments. Infect. Immun. 1985; 47 (3): 827–30.

384. Taylor-Robinson D., Willams M., Haig Leach D. The isolation and comparative biological and physical characteristics of T-mycoplamas of cattle. J. Gen. Microbiol. 1968; 54: 33.

385. Taylor-Robinson D. Models of infection due to mycoplasmas, including *Mycoplasma fermentans*, in the genital tract and other sites in mice. Clin. Infect. Dis. 1993; 17, Suppl1: 280–2.

386. Taylor-Robinson D. The history of nongonococcal urethritis. Thomas Parran Award Led. Sex Transm. Dis. 1996; 23 (1): 86–91.

387. Taylor-Robinson D., Furr P.M. Genital mycoplasma infections. Wien Klin. Wochenschr. 1997; 109 (14–15): 578–83.

388. Taylor-Robinson D. The role of *Ureaplasma urealyticum*. Int. J. STD AIDS. 1998; 9 (2): 123–4.

389. Taylor-Robinson D. *Mycoplasma genitalium* – an up-date. Int. J. STD AIDS. 2002; 13 (3): 145–51.

390. Thacker E.L., Halbur P.G., Ross R.F., Thanawongnuwech R., Thacker B.J. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. J. Clin. Microbiol. 1999; 37: 620–7.

391. Turner A. W. Growth-inhibition tests with *Micoplasma micoides* as a basis for chemotherapy and selectiva culture media. Austr. Vet. J. 1960; 36 (5) : 221–224.

392. Ursi D., Leven M., Noordhoek G.T., Ritzler M., Zandleven H., Altwegg M. An interlaboratory comparison for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory samples by the polymerase chain reaction. J. Microbiol. Methods. 2003; 53 (3): 289–94.

393. Vazquez F., Carreno F., Perez A.F. Comparison of 3 culture methods for genital mycoplasmas. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 1995; 13, Oct.: 460–3.

394. Waites K.B., B. Katz, R.L. Schelonka Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. Clin. Microbiol. Rev. 2005; 18 (4): 757–89.

395. Wise K.S., Watson R.K. Monoclonal antibodies to *Mycoplasma hyorhinis* surface antigens: tools for analyzing mycoplasma-lymphoid cell interactions. J. Biol. Med. 1983; 56: 623–9.

396. Woese C.R., Maniloff J. and Zablen L.B. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas.Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980; 77(1): 494–8.

397. Wolf M., Müller T., Dandekar T., Pollack J.D.Phylogeny of Firmicutes with special reference to Mycoplasma (Mollicutes) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004;54 (3): 871–5.

398. Yamasaki T., Narita M., Sasaki N., Kenri T., Arakawa Y. and Sasaki T. Comparison of PCR for sputum samples obtained by induced cough and serological tests for diagnosis of *Mycoplasma pneumonia*e infection in children. Clin. Vaccine Immunol. 2006; 13(6), Jan. : 708–18.

399. Zhao S., Yamamoto R. Detection of *Mycoplasma meleagridis* by polymerase chain reaction. Vet. Microbiol. 1993; 36: 91–7.

400. Zheng X., Lau K., Frazier M., Cassell G.H. and Watson H.L. Epitope mapping of the variable repetitive region with the MB antigen of *Ureaplasma urealyticum*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1996; 3: 774–8.

401. Zimmermann B.J., Ross R.F. Antibody response of swine experimentally infected with Mycoplasma hyosynoviae. Vet. Microbiol. 1982; 7: 135–146.

402. Zurovac-Jovanovic G., Nadazdin M. The significance of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in nonspecific urethritis. Med. Arch. 1989; 43 (4–6): 215–8.

К главам 4–5

1. Абелев Г.И. Основы иммунитета. Соросовский образовательный журнал. 1996; 5: 5–10.

2. Аганесян В.А. Приготовление и применение эритроцитарного микоплазменного антигена в реакции непрямой гемагглютинации. Система мероприятий по обеспечению эпизоотического благополучия и эффективности птицеводческих хозяйств. Сб. тр. 1986: 45–7.

3. Алымбаева Д.Б., Миллер Г.Г., Раковская И.В., Быковская А.Ф. Влияние микоплазм на продукцию онкогенного вируса HTLV Т-лимфобластными клетками НИТ-102. Вопросы вирусологии. 1985; 1: 75–7.

4. Андреева Н.Л., Дмитриева М.Е., Климов А.А., Фогель Л.С. Изучение бактериальных инфекций на птицефабриках. Ветеринария. 2004; 5: 14–6.

5. Андросик Н.Н. Использование магнитного поля для конструирования эритроцитарных диагностикумов для микоплазмоза свиней в РНГА. Вет. наука – производству. Сб. тр. 1998; 33: 84–90.

6. Антонова М.Е. Обеззараживание племенных куриных яиц при микоплазмозе птиц. Новые данные в изучении болезней сельскохозяйственных птиц : тр. ВИЭВ. М. 1966; 27: 64–71.

7. Апатенко В.М., Ливощенко М.Г., Пономаренко В.Я. Иммунокомпетентная система птиц при ассоциированной инфекции. Актуальные вопросы патологоанатомической диагностики болезней животных. Л. 1982: 200–2.

8. Апатенко В.М., Ливощенко М.Г., Косенко Г.Н. Иммуноморфологическая характеристика пастереллеза бройлеров. Актуальные вопросы патологоанатомической диагностики болезней животных. Л. 1982: 202–204.

9. Апатенко В.М. Смешанные инфекции сельскохозяйственных животных. Киев : Урожай. 1990: 1–187.

10. Афонасьев В.Н. Локализация видовых антигенов в микоплазмах. Новое в инфекционной патологии сельскохозяйственных животных : тр. ВИЭВ. 1983; 58: 73–5.

11. Байдевлятов А.Б. Изучение стадийности развития микоплазм. Ветеринария. 1974; 8: 43–5.

12. Байдевлятов А.Б. Серологическая оценка респираторного микоплазмоза сельскохозяйственных птиц. Тр. ВИЭВ. 1977; 46: 91–4.

13. Байжоматов М.С. Быстрое получение гипериммунных сывороток к *M. pneumoniae*. Лабораторное дело. 1974; 1: 54–55.

14. Байжомартов М.С., Прозоровский С.В., Царевский Л.П. Этиопатогенез и ускоренная лабораторная диагностика микоплазмсниой пневмонии. Алма-Ата. 1998: 1–164.

15. Барышников П.И. Получение специфических микоплазменных сывороток. Ветеринария. 1994; 7: 6–8.

16. Барышников П.И. Серологические и иммунологические свойства антигенов микоплазм. Ветеринария. 1999; 1: 6–8.

17. Барышников П.И., Бакулов И.А., Котляров В.М., Семенихин А.Л. Использование иммуноферментного анализа для диагностики микоплазмозов крупного рогатого скота. Ветеринария. 1994; 12: 18–21.

18. Башкиров О.Г. Тилан растворимый - ваш правильный выбор для профилактики и лечения при микоплазмозе птиц. Ветеринария. 1999; 12: 11–3.

19. Безрукавая И., Рева Е., Ивко И. Глубинное обеззараживание индюшиных яиц. Птицеводство. 1982; 2: 34–5.

20. Бекетова Т.П. К обоснованию специализаций функций различных по структуре гепатоцитов. Актуальные вопросы клинической морфологии. М. 1982: 64–7.

21. Белецкая Л.В. Морфофункциональная характеристика печени и желчных протоков линейных и гибридных кур в некоторые периоды онтогенеза : автореф. дис. … канд. вет. наук :16.00.02. Витебск. 1983: 1–19.

22. Белкин В.А. Влияние нового дезинфектанта «Дезинпол» на возбудителя респираторного микоплазмоза птиц. Новое в эпизоотологии, диагностике и профилактике инфекционных и незаразных болезней птиц в промышленном птицеводстве: материалы междунар. юбилейной науч.-практ. конференции. ВНИВИП. СПб.: Ломоносов, 2004: 153.

23. Белкин В.А., Белкина И.В. Профилактика респираторного микоплазмоза птиц (РМ) Новое в эпизоотологии, диагностике и профилактике инфекционных и незаразных болезней птиц в промышленном птицеводстве: материалы междунар. юбилейной науч.-практ. конф. ВНИВИП. СПб.: Ломоносов. 2004: 160–1.

24. Берлин А., Резвых А., Шкандин В. Глубинная обработка яиц на красногорской птицефабрике. Птицеводство. 1981; 10: 37–38.

25. Бессарабов Б.Ф., И.И. Мельникова. Респираторный микоплазмоз птиц. Био. 2001; 1: 8–16.

26. Бессарабов Б.Ф. Респираторный микоплазмоз кур: лекция. МГАВМиБ им К.И. Скрябина. М. 2001: 1–28.

27. Бессарабов Б.Ф. Болезни сельскохозяйственной птицы. М. 2001: 1–106.

28. Блехерман Б.Е. Сравнительная морфология и ультраструктура некоторых штаммов микоплазм. Тр. ВИЭВ. 1971; 34: 172–4.

29. Бобрик О.Н. Влияние коррекции толстокишечного микробиоценоза на продуктивность бройлеров. Новое в эпизоотологии, диагностике и профилактике инфекционных и незаразных болезней птиц в промышленном птицеводстве: материалы междунар. юбилейной науч.-практ. конференции. ВНИВИП. СПб. – Ломоносов. 2004: 125–7.

30. Бобрышев В.И. Результаты экспериментальных работ по усовершенствованию питательных сред для культивирования возбудителя микоплазмоза. Новое в профилактике и лечении болезней птиц: сб. тр. 1976; 11 (22): 106–11.

31. Бовкун Г.Ф. Пробиотикотерапия и профилактика при смешанной кишечной инфекции у цыплят. Птица и птицепродукты. 2003; 4: 33–5.

32. Бовкун Г.Ф. Кишечная микрофлора при гипотрофиях молодняка птиц, крупного рогатого скота и лечебное действие бифидогенной добавки Ветелакт. Новое в эпизоотологии, диагностике и профилактике инфекционных и незаразных болезней птиц в промышленном птицеводстве: материалы междунар. юбилейной науч.-практ. конференции. ВНИВИП. СПб.: Ломоносов. 2004: 123–5.

33. Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц / под ред. Б.У. Кэлнека; пер. с англ. И. Григорьева. М.: АКВАРИУМ БУК. 2003: 1–1232.

34. Болотников И.А., Соловьев Ю.В. Гематология птиц. Л.: Наука, 1980: 1–114.

35. Болотников И.А. Иммунопрофилактика инфекционных болезней птицы. М.: Росссельхозиздат. 1982. 1–183.

36. Болотников И.А. Иммунопрофилактика инфекционных болезней птиц. М.: Россельхозиздат. 1983: 1–111.

37. Болотников И.А., Конопатов Ю.В. Физиолого-биохимические основы иммунитета сельскохозяйственной птицы. СПб.: Наука. 1987: 64–9.

38. Болотников И.А., Конопатов Ю.В. Практическая иммунология сельскохозяйственной птицы. СПб.: Наука. 1993: 11–31.

39. Бондаренко Г.М., Радцева Г.Л. Возрастные особенности морфологии надпочечников, щитовидной и поджелудочной желез, тимуса и сумки Фабрициуса у петушков. Физиолого-биохимические и морфологические показатели продуктивных животных: сб. науч. тр. Ставропольский СХИ. Ставрополь. 1986: 64–8.

40. Борисенкова А.Н., Рождественская Т.Н., Елисеева Е.Н. Определение активности Энрофлона при бактериальных болезнях птиц. Био. 2003; 3: 9–10.

41. Борисенкова А.Н., Рожденственская Т.Н., Новикова О.Б., Головещенко К.А., Елисеева Е.Н. Отечественные препараты на основе тилозина при бактериальных болезнях птиц. Ветеринария. 2003; 8: 12–4.

42. Борисенкова А.Н., Рождественская Т.Н., Новикова О.Б. Бактериальные болезни птиц, вызываемые зоопатогенными и эпидемиологически опасными микроорганизмами: материалы науч.-практ. конф. «Современная ветеринарная защита в промышленном птицеводстве». М. 2004: 34–6.

43. Борисенкова А.Н. Особенности проблемы бактериальных болезней птиц в современных условиях промышленного птицеводства. Новое в эпизоотологии, диагностике и профилактике инфекционных и незаразных болезней птиц в промышленном птицеводстве: материалы междунар. юбилейной науч.-практ. конференции. ВНИВИП. СПб.: Ломоносов, 2004: 108–17.

44. Валеев Ф.Н. Патоморфология и некоторые вопросы патогенеза пастереллеза птиц (кур, гусей, индеек) : автореф. дис. … канд. вет. наук. Витебск. 1970:1–19.

45. Васильев Н.В. Очерки о роли кроветворной ткани в антителообразовании. Томск: Изд-во Том. ун-та. 1975: 1–301.

46. Васенко С.В. Лечение и профилактика респираторного микоплазмоза в условиях Томилинского ППО. Проблемы лейкоза и инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных : сб. тр. М. 1988: 133–7.

47. Венгеренко Л.А. Эпизоотическое состояние на Российских птицеводческих предприятиях. Ветеринарный консультант. 2003; 7: 13–7.

48. Виноходов О.В., Маккавейская Е.А., Гаврилова В.С. Приготовление и испытание микоплазмозного антигена. Бюл. ВИЭВ. 1972; 13: 100–3.

49. Виноходов О.В. Микоплазма-инфекции птиц. Новое в профилактике и лечении болезней птиц: сб. тр. 1976; 11 (22): 35–9.

50. Виноходов О.В., Собчак И.А., Белкин В.А. Микоплазмозы индеек. Новочеркасск. 1977: 1–24.

51. Виолин Б.В., Абрамов В.Е., Ковелев В.Ф. Химиотерапия при бактериальных и паразитарных болезнях. Ветеринария. 2001; 1: 42–6.

52. Воробьев А.Н., Полубедова Е.М., Игнатьев М.А. Серологическая диагностика респираторного микоплазмоза птиц. Бюл. ВИЭВ. 1972; 13: 115–8.

53. Воронин Е.С., Петров А.М., Серых М.М., Девришов Д.А. Иммунология / под ред. Е. С. Воронина. М.: Колос. Пресс. 2002: 1–408.

54. Вракин В.Ф., Сидорова М.В. Анатомия и гистология домашней птицы. М.: Колос. 1984: 1–288.

55. Галактионов В. Г. Графические модели в иммунологии. М. 1986: 1–240.

56. Герберт У.Дж. Ветеринарная иммунология : пер. с англ. М.: Колос. 1974: 82–7.

57. Герман В.В. О гистологической диагностике ассоциированных форм микоплазмоза птиц. Болезни птиц: сб. трудов. Л. 1971; 7 (18): 218–21.

58. Гирин М.В. Эпизоотическая ситуация по микоплазмозам птиц в России и странах СНГ, способы борьбы с этими заболеваниями. Новое в эпизоотологии, диагностике и профилактике инфекционных и незаразных болезней птиц в промышленном птицеводстве: материалы междунар. юбилейной науч.-практ. конференции. ВНИВИП. СПб.: Ломоносов, 2004: 150–2.

59. Гладков Б.А. Некоторые морфологические и возрастные особенности кроветворных тканей у кур. Эколого-экспертные аспекты функциональной и возрастной морфологии домашних птиц: межвуз. сб. науч. тр. Воронеж, 1988: 90–4.

60. Гладков Б.А. Некоторые физиологические и возрастные особенности иммунной системы кур. Диагностика, патоморфология, патогенез и профилактика болезней в промышленном животноводстве: межвуз. науч. сб. М. 1990: 132.

61. Горбатов А.В., Елисеева Е.Н. Профилактика и лечение микоплазмоза, осложненного колиинфекцией. Ветинформ. 2003; 1: 10–1.

62. Грошева Г.А., Смирнов А.Н., Осколков В.С. Изучение морфологии *M. gallisepticum*, выделяемых от больных микоплазмозом птиц. Сб. тр. ВИЭВ. М., 1966; 32: 40–7.

63. Грошева Г.А., Осколков В.С. Локализация *M. gallisepticum* в организме кур, больных респираторным микоплазмозом. Сб. тр. ВИЭВ. М. 1966; 32: 34–9.

64. Грошева Г.А., Смирнов А.Н., Осколков В.С. Изучение морфологии *M. gallisepticum*, выделяемых от больных микоплазмозом птиц. Сб. тр. ВИЭВ. 1966; 32: 40–7.

65. Грошева Г.А. Разработка серологического метода диагностики респираторного микоплазмоза птиц. Бюл. ВИЭВ.М. 1970; 7: 8–12.

66. Грошева Г. А., Савич Б. М., Малахова Л. С. Колисептицемия птиц и методы ее диагностики. Ветеринария. 1970; 4: 65.

67. Грошева Г.А. Диагностика респираторных болезней птиц. Болезни птиц: сб. тр. Л. 1971; 7 (18): 46–51.

68. Грошева Г.А. Микробный пейзаж организма здоровых и больных микоплазмозом птиц. Труды ВИЭВ. М. 1972; XL: 360.

69. Грошева Г.А. Изучение пассивного иммунитета при респираторном микоплазмозе птиц. Бюл. ВИЭВ. 1972; 14: 111–4.

70. Грошева Г.А. Методы диагностики респираторного микоплазмоза птиц. Бюл. ВИЭВ. 1972; 13: 85–7.

71. Грошева Г.А. Этиология, патогенез и способы диагностики респираторного микоплазмоза птиц: автореф. дис. … д-ра вет. наук: 16.00.03. М. 1973: 1–16.

72. Грошева Г.А., Серебряков А.С. Профилактика респираторных заболеваний птиц. М.: Россельхозиздат 1978: 8–10.

73. Грошева Г.А. Микоплазмозные инфекции птиц и меры борьбы с ними. Труды ВИЭВ. М. 1980; 51: 48–54.

74. Грошева Г.А., Есакова Н.Р. Взаимосвязь факторов естественной устойчивости организма птиц и иммунитета при вакцинации. Ветеринария. 2000; 8: 24.

75. Гусев В.В., Светоч Э.А., Теймуразов М.Г. К вопросу контроля возбудителей бактериальных инфекций в промышленном птицеводстве. Птица и птицепродукты. 2003; 2: 23–5.

76. Гюрджи-Оглы С.Ж., Самородов И.М., Рабинович М.И. Фторхинолоны – новые синтетические препараты. БИО. 2004; 4: 5–8.

77. Демкин Г.П. Патологическая морфология и дифференциальная диагностика острой формы болезни Марека у кур: автореф. дис. … канд. вет. наук: 16.00.02. Саратов. 1975: 1–18.

78. Донев Б. Микоплазмоз птицы и меры по ограничению его распространения. БИО. – 2005; 4: 12–4.

79. Дорофеева С.Г. Респираторный микоплазмоз птиц и методы его предупреждения. Ветеринария. 2005; 8: 15–8.

80. Дьяконова Е.В. Взаимодействие вируса инфекционного бронхита и возбудителя микоплазмоза птиц при совместном культивировании их в куриных эмбрионах. Бюл. ВИЭВ. М. 1970; 7: 20–3.

81. Дьяконова Е.В., Шубин В.А. Изучение экспериментальной смешанной инфекции оспы и респираторного микоплазмоза птиц. Бюл. ВИЭВ. М. 1970; 7: 26–30.

82. Дьяконова Е.В., Шубин В.А. Изучение экспериментальной смешанной инфекции оспы и респираторного микоплазмоза птиц. Бюл. ВИЭВ.М. 1970; 7: 26–30.

83. Дюскалиева Г.У. Исследование циркулирующих иммунных комплексов при диагностике инфекции *Mycoplasma pneumoniae*. ЖМЭИ. 1995; 12: 58–61.

84. Егоров И., Мягких Ф. Пробиотик бифидум – СХЖ. Птицеводство. 2003; 3: 9.

85. Ежов В.И. Чувствительность микоплазм, выделенных от птиц, к антибиотиам и другим препаратам. Бюл. ВИЭВ. М. 1972; 13 : 109.

86. Ежов В.И., Грошева Г.А., Савич Б.М. Изучение чувствительности птичьих микоплазм к антибиотикам и другим химиотерапевтическим препаратам. Бюл. ВИЭВ. М. 1972; 12 : 110.

87. Елисеева Е., Горбатов А. Тиланик для лечения и профилактики микоплазмоза птиц. Птицеводство. 2003; 5: 40.

88. Жибинов В.И. Изменения в органах иммунопоэза при болезни Марека. Ветеринария. 1989; 7: 32.

89. Здродовский П.Ф. Проблемы инфекции и иммунитета. М.: Медгиз. 1961: 1–458.

90. Змушко Е.И., Белозаров Е.С., Митин Ю.А. Клиническая иммунология. СПб.: Питер. 2001: 1–576.

91. Зябкин А.С. Сравнительное электронномикроскопическое исследование изучение морфологии отечественных и зарубежных штаммов микоплазм, выделенных от кур, больных микоплазмозом. Болезни птиц: сб. тр. Л.: Колос. 1973; 9 (20): 166–73.

92. Ибрагимов А.А. Патоморфология и дифференциальная диагностика респираторного микоплазмоза и инфекционного бронхита кур. Патоморфология, патогенез и диагностика болезней сельскохозяйственных животных. М. 1980: 167–8.

93. Ибрагимов А.А., Осколков В.С., Голод Я.Р., Трубицин Б.И. Патоморфологическая диагностика респираторных инфекций птиц. Актуальные вопросы патологоанатомической диагностики болезней животных. Л. 1982: 228–31.

94. Ибрагимов А.А. Особенности иммуноморфологической реакции у птиц. Проблемы патоморфологической диагностики болезней в промышленном животноводстве. Вильнюс: Мокслас. 1986: 67–9.

95. Ибрагимов А.А., Ибрагимов В.А. Гистоморфология стрессовой реакции у птиц. Диагностика, патоморфология, патогенез и профилактика болезней в промышленом животноводстве: межвуз. науч. сб. Ч. 2. М. 1990: 129.

96. Ильчевич Н. В., Лисяный Н. И., Янчий Р. И. Антитела и регуляция функций организма. Киев. 1986: 1–248.

97. Инструкция о мероприятиях по борьбе с микоплазмозом птиц. (ГУВ МСХ СССР 10 мая 1961). М., 1961: 1–7.

98. Исматова Р.А., Незаметдинова К.А. Патоморфология респираторного микоплазмоза птиц в Узбекистане. Диагностика, патоморфология, патогегез и профилактика болезней в промышленном животноводстве: межвуз. науч. сб. Саратов. 1990: 99.

99. Йовчев Е., Лозанов Л. Сравнительное изучение образование агглютининов к пуллорному антигену у птиц, больных лимфоматозом и микоплазмозом. Болезни птиц: сб. трудов. Л.: Колос. 1973; 9 (20): 173–7.

100. Камелединова Н.Н., Колабская Л.С., Шорникова Л.А. Изучение антигенного состава микоплазм методом иммуноэлектрофореза. Бюл. ВИЭВ. М. 1972; 13: 105–9.

101. Камелединова Н.Н. Идентификация микоплазм и изучение их антигенной структуры с помощью реакции преципитации в агаровом геле. Болезни птиц: сб. тр. Л., 1974; 10 (21): 244–8.

102. Кантль Э.Т. Борьба с респираторным микоплазмозом птиц. 13-й Всемирный конгресс по птицеводству: сб. тр. Киев. 1966: 350–4.

103. Карпуть И.М. Гематологический атлас сельскохозяйственных животных. Минск: Урожай. 1986: 1–183.

104. Касьяненко И. И. Лейкозы птиц. М.: Колос. 1964: 1–175.

105. Качанова С. Тепловая обработка инкубационных яиц для профилактики микоплазмоза. С.-х. экспресс-информ. 1974; 26: 39.

106. Киприч В.В. Динамика проявления смешанной инфекции в птицеводческих хозяйствах. Сб. тр. Киев, 1966; 9: 87–91.

107. Киприч В.В. Изучение биологических свойств птичьих микоплазм при культивировании их на различных питательных средах. Ветеринария: сб. тр. Киев. 1966; 9: 113–5.

108. Киприч В.В. Иммунобиологические реакции при микоплазмозе птиц. Болезни птиц: сб. тр. Л.: Колос. 1971; 7 (18): 208–13.

109. Киприч В.В. Реакция задержки гемагглютинации и ее диагностическое значение при респираторном микоплазмозе птицы. Ветеринария: сб. тр. Киев: Урожай. 1973; 34 : 53–6.

110.Климов А.А. Повышение эффективности фторхинолонов в индустриальном животноводстве. Ветеринария. 2003; 5: 9–11.

111. Климов А.А. Результаты применения Энроксила при респираторном микоплазмозе птицы. Новое в эпизоотологии, диагностике и профилактике инфекционных и незаразных болезней птиц в промышленном птицеводстве : материалы междунар. юбилейной науч.-практ. конференции. ВНИВИП. СПб. – Ломоносов. 2004: 158–60.

112. Коваленко Я.Р., Фомина А.Я. Наблюдения за течением хронической респираторной болезни кур. Ветеринария. 1960; 12: 34–6.

113. Коваленко Я.Р. Хроническая респираторная болезнь птиц. Ветеринария. 1960; 5: 89–90.

114. Коваленко Я.Р. , Сидоров М.А., Яблонская И.А. Устойчивость различных видов микоплазм к некоторым антибиотикам. Бюл. ВИЭВ. М. 1971; 11 : 52.

115. Коваленко Я.Р., Шегидевич Э.А., Яблонская И.А. Использование тилана и антибиотиков тетрациклинового ряда при лечении массовых пневмоний телят в крупных откормочных хозяйствах. Бюл. ВИЭВ. М. 1973; 16 : 33–6.

116. Козинец Г. И. Интерпритация анализов крови и мочи. Клиническое значение анализов. С.-Петербург: АОЗТ «САЛИТ». 1995: 1–123.

117. Колабская Л. С. Иммуноглобулины птицы. Птицеводство. 1987; 9: 16–7.

118. Колобов Е.А., Пахмутов А.А., Татарчук О.П. Опыт ликвидации респираторного микоплазмоза птиц в условиях птицефабрики ОАО «Линдовское». Ветеринарная жизнь. 2004; 7: 6.

119. Коптев В.Ю., Леонов С.В., Афонюшкин В.Н. О рациональном применении антибиотиков. Ветеринарный консультант. 2002; 23: 4.

120. Кудрявцев Ф.С., Зеленский В.П., Малыгин А.И. Профилактика болезней птиц. Л. 1981: 1–274.

121. Кудрявцева А.В. Влияние пробиотиков на формирование и коррекцию кишечной микрофлоры цыплят при колибактериозе : автореф. дис. … канд. вет. наук : 16.00.03. ВНИВИП. СПб. 2003: 1–18.

122. Куликова И.Л., Феоктистова Т.А. Иммуноферментный анализ для видовой идентификации микоплазм выделенных из культур клеток. Иммунитет сельскохозяйственных животных : тр. ВИЭВ. М. 1989; 67: 50–5.

123. Лазуревская О.С. Количественная характеристика Т- и В-систем иммунитета клинически здорового крупного рогатого скота. Профилактика и меры борьбы с инфекционными и незаразными болезнями сельскохозяйственных. животных в Казахстане. Алма-Ата. 1984: 48–51.

124. Лев Д. Эффективность антибиотиков в промышленном птицеводстве. Птицеводство. 1982 ; 8: 30.

125. Луппова И.М. Иммуноморфогенез у кур, вакцинированных против болезни Ньюкасла, и влияние на него триметазана: автореф. дис. … канд. вет. наук. Витебск. 1998: 1–19.

126. Мандрусова Т.А., Молев А.И. Респираторный микоплазмоз кур: как определить степень инфицированности стада. Ветеринарный консультант. 2003; 4 (52): 5–7.

127. Маккавейская Е.А., Федорова З.П., Гаврилова В.С. Методика приготовления и испытания моноштаммного микоплазмозного антигена. Новое в профилактике и лечении болезней птиц: сб. тр. Л.: Колос. 1976; 11 (22): 112–3.

128. Мезенцев М.Ф. Микоплазмы птиц и их роль в патологии хронической респираторной болезни. Болезни птиц: сб. тр. Л. 1969; 3 (14): 77–83.

129. Мезенцев М. Ф. Меры борьбы с респираторными заболеваниями птиц в хозяйствах Украины. Болезни птиц: сб. тр. Л., 1971; 7 (18): 61–7.

130. Мезенцев С.В. Факторы снижающие иммунную стабильность организма птицы и меры борьбы с ними. БИО. 2004; 12: 5–6.

131. Митрофанов П.М., Хакимова К.М., Гаффаров Х.З. Влияние бактерий при микоплазмозе телят. Ветеринария. 1978; 3 : 52–5.

132. Месарош Я. , Штипкович Л. Роль бактерий *E. coli* в патогенезе хронической респираторной болезни. Тр. 13 Всемирного конгресса по птицеводству. Киев. 1966: 370–3.

133. Миллер Г.Г., Раковская И.В., Березин В.Э. Взаимодействие микоплазм с вирусами человека и животных. Ультраструктурный анализ. Вестн. АМН СССР. 1991; 6: 36–43.

134. Митрофанов П.М Генитальный микоплазмоз крупного рогатого скота : метод. рекомендации. Новосибирск. 1982: 1–20.

135. Мушинский Ю.Н. Отработка методики постановки реакции диффузионной преципитации в агаре и иммуноэлектроосмофореза при респираторном микоплазмозе птиц. Проблемы лейкоза и инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных : сб. тр. 1988: 116–9.

136. Мушинский Ю.Н. Применение ВИЭФ для выявления противомикоплазменных антител в сыворотке крови кур. Проблемы лейкоза и инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных : сб. тр. 1988: 119–20.

137. Мартыненко С., Сипайлова О. Пробиотик споробактерин. Птицеводство. 2005; 1: 25.

138. Николаева Н.Н. Схемы гипериммунизации кроликов для получения антимикоплазменных сывороток. Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера: Вторая научная конференция с международным участием. Новосибирск: ЦЭРИС. 2002: 93.

139. Новикова А.Ф. Питательная среда для выделения глюкозоферментирующих микоплазм. Новое в эпизоотологии, диагностике и профилактике инфекционных и незаразных болезней птиц в промышленном птицеводстве : материалы междунар. юбилейной науч.-практ. конференции. ВНИВИП. СПб. – Ломоносов. 2004: 137–8.

140. Новикова А.Ф. Течение гемофилеза и респираторного микоплазмоза на птицефабриках яичного направления. Новое в эпизоотологии, диагностике и профилактике инфекционных и незаразных болезней птиц в промышленном птицеводстве : материалы междунар. юбилейной науч.-практ. конференции. ВНИВИП. СПб. – Ломоносов. 2004: 252.

141. Оганесян В.А. Приготовление и применение эритроцитарных микоплаз-менных антигенов в реакции непрямой гемагглютинации. Система мероприятий по обеспечению эпизоотического благополучия и эффективности птицеводческих хозяйств промышленного типа: сб. тр. 1986: 47–8.

142. Осколков В.С. Влияние факторов внешней среды на распространение и течение респираторного микоплазмоза птиц. Сб. тр. ВИЭВ. М.: Колос. 1966; 32: 24–33.

143. Отрыганьев Г.К., Бессарабов Б.Ф., Исаев Ю.В. Болезни эмбрионов птиц. М. : Россельхозиздат. 1981: 1–107.

144. Отрыганьев Г., Умняшкин В., Воробьёв С. Глубинное обеззараживание инкубационных яиц. Птицеводство. 1983; 12: 24–5.

145. Оуен Р.Л. Иммунная система птицы. Птицеводство. 1996;2: 39–41.

146. Петров Р. В. Иммунология. М.: Медицина. 1987: 1–416.

147. Петросова В.Н., Раковская И.В., Каган Г.Я. Серологическая характеристика некоторых видов микоплазм по данным реакции агглютинации, связывания комплемента и ингибиции роста. ЖМЭИ. 1969; 10: 11–3.

148. Пол У. Иммунология. М.: Мир. 1987; 1: 1–476.

149. Полякова О.А. Люминесцентная микроскопия как эффективный, ускоренный метод диагностики инфекционных заболеваний животных. Сб. трудов ВИЭВ. М. 1968; 35: 110–29.

150. Понюхов В.А., Аликин Ю.С., Юшков Ю.Г. Опыт применения пробиотиков в промышленном птицеводстве. Новое в эпизоотологии, диагностике и профилактике инфекционных и незаразных болезней птиц в промышленном птицеводстве: материалы междунар. юбилейной науч.-практ. конференции. ВНИВИП. СПб. – Ломоносов. 2004: 245–6.

151. Прибытько С.П. Влияние иммуностимулятора натрияитиосульфата на иммуноморфогенез у цыплят вакцинированных против болезни Марека : автореф. дис. … канд. ветеринар. наук. Витебск. 1998: 1–18.

152. Придыбайло Н.Д., Романов С.Г. Маркетинговые исследования на рынке ветбиопрепаратов для птицеводства. Ветеринария. 2000; 9: 15–7.

153. Прокофьева М.Т., Киприч В.В., Бобрышев В.И. Усовершенствование диагностики микоплазмоза птиц. Бюл. ВИЭВ. М. 1972; 13: 96–100.

154. Прокофьева М.Т., Киприч В.В., Бобрышев В.И. Изготовление питательных сред из кислотного пищевого казеина и альбумина сыворотки крови для культивирования возбудителя респираторного микоплазмоза птиц. Бюл. ВИЭВ. М. 1972; 13: 102–4.

155. Прокофьева М. Т., В. В. Киприч Аллергические реакции при инфицировании птицы *M. gallisepticum.* Ветеринария: сб. Киев: Урожай. 1974: 39:107.

156. Пустовар А.Я. Микст-инфекции, обусловленные микоплазмами и другими бактериальными агентами. Материалы VI съезда паразитоценологов Украины. Харьков. 1995: 113–4.

157. Радчук Н. А. Колибактериоз птиц. Л.: Агропромиздат. 1990: 1–71.

158. Резвых А. Лекарственные препараты при респираторных заболеваниях птицы. Птицеводство. 1980; 7: 31–2.

159. Садовников Н.В. Ветеринарно-санитарные требования к профилактическим мероприятиям. Био. 2003; 5: 9–12.

160. Серебряков А.С., Осколков В.С. Изучение некоторых вопросов эпизоотологии респираторного микоплазмоза птиц. Сб. трудов ВИЭВ. М.: Колос. 1966; 32: 9-12.

161. Серебряков А.С., Грошева Г.А., Шубин В.А. Респираторный микоплазмоз птиц. М.: Колос. 1970: 1–256.

162.Серебряков А.С. Профилактика респираторного микоплазмоза птиц. Болезни птиц: сб. тр. Л: Колос. 1971; 7 (18). – С. 222–227.

163. Серебряков А.С., Грошева Г.А. Основы диагностики и профилактики респираторного микоплазмоза птиц. Новое в лечении и профилактике инфекционных болезней животных: сб. тр. М. 1972: 111–4.

164. Смирнова И.Р. Культуральные и биохимические свойства различных штаммов микоплазм. Ветеринария. 1983; 4: 63–4.

165. Симонова Н.П. Ультрафиолетовое облучение инкубационных яиц. Ветеринария. 1999; 3: 48–50.

166. Соколов В. Д. Лекарственные препараты в аэрозолях. Птицеводство. 1981; 5: 34–5.

167. Соколов В.Д. Рациональное применение химиотерапевтических средств в птицеводстве. Новое в эпизоотологии, диагностике и профилактике инфекционных и незаразных болезней птиц в промышленном птицеводстве : материалы междунар. юбилейной науч.-практ. конференции. ВНИВИП. СПб. – Ломоносов. 2004: 183–4.

168. Сунцова О.А. Усовершенствование лабораторной диагностики ассоциативного респираторного микоплазмоза птиц: автореф. дис. … канд. вет. наук : 16.00.03. Омск. 2004: 1–18.

169. Терентьев А. А. Патоморфология и дифференциальная диагностика колисептицемии у кур: автореф. дис. … канд. ветеринар. наук. Саратов. 2000: 1–21.

170. Трускова Т.Ю. Влияние стабилизаторов на качество лиофилизированного *M. gallisepticum* - антигена для реакции агглютинации. Ветеринария: сб. тр. Киев: Урожай. 1981; 54: 56–60.

171. Турицына Е.Г. Иммуноморфология вирусно-бактериальной ассоциированной инфекции птиц и диагностика иммунодефицитов. Проблемы патоморфологической диагностики болезней в промышленном животноводстве. Вильнюс. Мокслас. 1986: 78–81.

172. Турицына Е. Г. Патоморфология поствакцинальных осложнений у кур, иммунизированных против ньюкаслской болезни : автореф. дис. … канд. вет. наук. Омск. 1988: 1–18.

173. Тыщенко Г.А. Прижизненная диагностика микоплазма мелеагридис-инфекции индеек: Автореф. дис. … канд. вет. наук: 16. 00. 03. СПб. 1992: 1–20.

174. Федорова З.П., Виноходов О.В., Собчак И.А. Серологический анализ микоплазм, выделенных от птиц в РСК и РА. Бюл. ВИЭВ. М. 1972; 13: 83–5.

175. Федорчук Ф. Профилактика респираторного микоплазмоза птиц. Птицеводство. 1981; 2:21–2.

176. Фисинин В. Учимся управлять рынком. Птицеводство. 2004; 4: 3–9.

177. Фомина А.Я., Грошева Г.А. Сравнительное изучение некоторых свойств микоплазм, выделенных от кур. Тр. ВИЭВ. М. 1962; 29: 79–82.

178. Фомина А.Я. Краткие данные по изучению болезней птиц. Сб. тр. ВИЭВ. М.: Колос. 1966; 32: 3–8.

179. Фомина А. Я. Респираторный микоплазмоз. Эпизоотология. М. 1969: 357.

180. Фукс П.П. , Калашник Н.В., Гончарова Л.В. Влияние состава питательной среды на активность диагностикума при микоплазма-инфекции. Материалы междунар. научн. конф. «Общая эпизоотология : иммунологические и методологические проблемы». Харьков. 1995: 355–8.

181. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. М.: Медицина. 2000: 1–432.

182. Холдоенко А., Давтян Д. Пробиотический препарат «Эсид-пак». Птицеводство. 2003; 1: 20–1.

183. Цулая А.Г. Диагностика и профилактика респираторного микоплазмоза среди ремонтного молодняка кур. Система мероприятий по обеспечению эпизоотического благополучия и эффективности птицеводческих хозяйств промышленного типа : сб. тр. 1986: 39–40.

184. Чекишев В.М., Еремеева Г.А. Способ идентификации специфических антигенов в сложных биологических смесях. Сиб. Вест. с.-х. науки. Новосибирск. 1991;1: 86–9.

185. Чекмарев А.Д. Антибиотики и синтетические иммуностимуляторы при респираторном микоплазмозе птиц. Ветеринария. 2000; 8: 12–3.

186. Ченчев И., Обрешков К., Шишков Н. О диагностике и борьбе с респираторным микоплазмозом птиц в НРБ. 13-й Всемирный конгресс по птицеводству. Киев. 1966: 358–60.

187. Шесточенко М.А. Обнаружение микоплазмозного антигена с помощью флюоресцирующих антител. Ветеринария. 1965; 8: 10–3.

188. Шесточенко М.А., Серебряков А.С., Чистова З.Я. Конъюгаты оранжево-красного свечения при индикации микоплазмозного антигена. Ветеринария. 1969; 3: 29–31.

189. Шесточенко М.А., Таранова Л.А., Косенко В.И. Профилактика инфекционных болезней молодняка. М. : Колос. 1983.- 1–207.

190. Шишков Н., Резашка А. Сравнительное испытание серологических реакций для диагностики респираторного микоплазмоза птиц. Вет. мед. науки. 1968; 9: 85–7.

191. Шубин В.А., Осколков В.С. О «специфичности» лимфофолликулярной реакции при респираторном микоплазмозе птиц. Новые данные в изучении болезней сельскохозяйственных птиц: труды ВИЭВ. М. 1966; 32: 57–61.

192. Шубин В. А. Патоморфологическая дифференциальная диагностика респираторного микоплазмоза и инфекционного ларинготрахеита кур. Ветеринария. 1970; 2: 52–3.

193. Шубин В.А. Влияние вакцинации против псевдочумы, инфекционного ларинготрахеита и оспы на течение респираторного микоплазмоза птиц. Болезни птиц: сб. тр. Л.: Колос. 1971; 7 (18): 202–7.

194. Шчука Л. Резистентность бактерий к противобактериальным активным субстанциям и их применение в ветеринарии. Био. 2005; 3: 9–12.

195. Яблонская И.А. Серологическая типизация микоплазм сельскохозяйственных животных. Микоплазмозы сельскохозяйственных животных : тр. ВИЭВ. М. 1977; 46: 13–6.

196. Adler H.E. A PPLO aggentination test for the detection of infections sinusitis of turkey. Poultry Sci. 1958; 37: 1116-25.

197. Adler H.E. , Mc Martin D., Shifrine M. Immunization against Mycoplasma infection of Poultry. Am. J. Vet. Res. 1960; 21: 482–4.

198. Adler H.E., Da Silva J.M. Immunization against *Mycoplasma gallisepticum*. Avian. Dis. 1970; 14: 763.

199. Ando K. Diagnosis and prevention of CRD *Mycoplasma gallisepticum* infection of chicken in Japan. Bull. Off. Int. Epiz. 1969; 72: 381.

200. Arbelot B., Doyen J.F., Mamis D., Gueye J.C., Tati F., Samb H. Enquete sur la prevalence serologique des principalespatologies aviaires au Senegal: mycoplasmoses, pullorose, typhose, maladie de Bewcastle, maladie de Gumboro et bronchite infectieuse / // Rev. Elevage Med. Veter. Peys trop. – 1997. – T. 50. – 3. – P. 197–203.

201. Aycard E.R., Anderson D.P., Hanson R.P. Classification of avian Mycoplasmas by gel diffusion and growth inhibition tests. Avian. Dis. 1971; 15: 434–47.

202. Barber T.L., J. Fabricant Primari isolation of mycoplasma organisms (PPLO) from mammalian sources. J. Bact. 1962. 83; 6: 1268.

203. Barbour E.K., Newman J.A., Sivanandan V., Sasipreeyajan J. Newbiotin-conjugated antisera forquantitation of *Mycoplasma gallisepticum*-specific immunoglobulin A in chicken. AvianDis. 1988; 32 (3): 416–20.

204. Baughn C.O., Alpaugh W.C., Linkenheimer W.H., Maplesden D.C. Effect of Tiamulin in chickens and turkeys infected experimentally with avian Mycoplasma. Avian Dis. 1978; 22: 620–6.

205. Bencina D., Tadina T., Dorrer D. Natural infections of ducks with *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* and Mycoplasma egg transmissions. Avian Pathol. 1988; 17: 441–9.

206. Bermudez A.J. Mg: eradication or control the economic incentive to establish an MG negative flock is great, but that's not always practical. Poultry Tribune. 1988; 94. (7): 29–30.

207. Branton S.L., Gerlach H., Kleven S.H. *Mycoplasma gallisepticum* isolation in layers. Poult Sci. 1984 ; 63 : 1917–19.

208. Branton S.L., Deaton J.W. Egg production, egg weight, eggshell strength, and mortality in three strains of commercial layers with F strain *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Dis. 1985; 29: 832–37.

209. Branton S.L., Lott B.D., Deaton J.W., Hardin J.M., Maslin W. F strain *Mycoplasma gallisepticum* vaccination of post- production-peak commercial leghorns and its effect on egg and eggshell quality. Avian Dis. 1988; 32: 304–7.

210. Buntz B., Bradbury J., Vuilaume A., Rousselot-Paillet D. Isolations of *Mycoplasma gallisepticum* from geese. Avian Pathol. – 1986; 15 (3): 615–7.

211. Bywater R. Assessing the probability, risks and mechanisms of transferring resistant bacteria from animals to man. Proceebings of International Business Communication conference, Antimicrobial Resistance. London. 1999: 16–9.

212. Cabel M. C., Waldroup P. W. Effects of ethoxyquin feed preservative and peroxide level on broiler performances. Poultry. Sci. 1967: 1725–30.

213. Chanock R., Hayflick L., Barile M. Growth on artificial medium of an agent asociated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. Proc. Nat. Acad. Sci. 1962; 48 (1): 41–9.

214. Dunlop W.R., Parke G., Strout R.G. The effect of sequence of infection on complex respiratory disease. Avian Dis. 1964: 321–7.

215. Fabricant J., Levine P. Experimental pro-auction of complicated chronic respiratory disease infection. Avian Dis. 1962; 6: 13–23.

216. Fabricant J., Levin P. Infection in young chickens for the prevention of egg transmission of *Mycoplasma gallisepticum* in breeders. Proc 17th World Vet.org. 1963: 1469–74.

217. Feltkamp T.E.W., Aosterhuis H.J. G.H. Pros. Soc. Exp. Biol. (New-York). 1964; 115: 782.

218. Frey M.L., Hanson R.P., Anderson D.P. A medium for the isolation of avian Mycoplasmas. Am J Vet. Res. 1968; 29: 2163–71.

219. Furr P.M. Cultivation of ureaplasmas. Methods Mol Biol. 1998; 104: 51–9.

220. Glisson J.R., Kleven S.H. *Mycoplasma gallisepticum* vaccination: Effects on egg transmission and egg production. Avian Dis. 1984; 28: 406–15.

221. Glisson J.R. Mycoplasmosis in laying hens. Poultry Dig. 1988; 47: 493–5.

222. Hamdi A.H. Therapeutic effect of Lincospectin on airsacculitis in chickens. Avian Dis. 1970; 14: 706–14.

223. Hopkins S.R., Yoder H.W. Influence of infectious bronchitis strains and vaccines on the incidence of *Mycoplasma synoviae* airsacculitis. Avian Dis. 1982; 26 : 741–52.

224.Hopkins S.R., Yoder H.W. Increased incidence of airsacculitis in broilers infected with *Mycoplasma synoviae* and chicken passaged infections bronchitis vaccine virus. Avian Dis. 1984; 28 : 386–96.

225. Huang H.S., Chen J., Teng L.J., Lai M.K. Use of polymerase chain reaction to detect *Proteus mirabilis* and *Ureaplasma urea-*

lyticum in urinary calculi. J. Formosan Med Assoc. 2000; 98(12): 844–50.

226. Jordan F.T., Horrooks D.K., Jones K., Cooper A.C. and Gilles C.J. A comparison of the efficacy of danofloxacin and tylosin in the control of *Mycoplasma gallisepticum* infection in broiler chicks. J. Vet. Pharmacol Therapeut. 1993; 16: 79–86.

227. Kato H., Murakami T, Takase S, Ono K. Sensitivities in vitro to antibiotics of Mycoplasma isolated from canine sources. Japan. J. Vet. Sci. 1972; 34: 197–206.

228. Kempf I. DNA Amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. Acta vet.Hung. 1997; 45 (3): 373–86.

229. Kempf I., Gesbert F., Guittet M., Bennejean G., Cooper A.C. Efficacy of danofloxacin in the therapy of experimental mycoplasmosis in chicks. Res. Vet. Sci. 1992; 53: 257–9.

230. Khan M.I., I M., McMartin D.A., Yamamoto R., Ortmayer H.B. Observations on commercial layers vaccinated with *Mycoplasma gallisepticum* (MG) bacterin on a multiple-age site endemically infected with MG. Avian Dis. 1986; 30: 309–12.

231. King D.D., Kleven S.H., Wenger D.M. and Anderson D.P. Field studies with *Mycoplasma synoviae.* Avian Dis. 1973; 17: 722–6.

232. Kleven S.H., King D.D., Anderson D.P. Airsacculitis in broilers from *Mycoplasma synoviae*: effect on airsac lesions of vaccinating with infectious bronchitis and Newcastle virus. Avian Dis. 1972; 16: 915–24.

233. Kleven S.H., Eidson S.C., Fletcher O.J. Airsacculitis induced in broilers with a combination of *Mycoplasma gallinarum* and respiratory viruses. Avian Dis. 1978; 22 (4): 707–16.

234. Kleven S.H., Morrow C.J., Whithear K.G. Comparison of *Mycoplasma gallisepticum* strains by hemagglutination-inhibition and restriction endonuclease analysis. Avian. Dis. – 1988; 32: 731–41.

235. Kleven S.H., Soliman A. Mycoplasmosis: Priieba y diagnostico. Ind. avic. 1989; 36 (5): 24–6.

236. Kleven S.H. Микоплазмозы. Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц. М.: Аквариум. 2003: 224–56.

237. Klieneberger-Nobel E. Pleuropneumonia-like organisms in genital infections. Brit. Med. J. 1959; 1: 19–23.

238. Lampen J., Gill J.W., Arnow P.M. and Magana-Plaza I. Inhibition of the pleurophneumonia-like organisms *Mycoplasma gallisepticum* by certain polyene antifungal antibiotics. J. Bact. 1963; 86 (5): 945–9.

239. Leberman P., Smith P., Morton H. The susceptibility of pleurophneumonia-like organisms to the in vitro action of antibiotics: aureomycin, chloramphenicol, dihydrostreptomycin and sodium penicillin. J. Urol. – 1950. – V. 64. – P. 167–169.

240. Leberman P., Smith P., Morton H. Susceptibility of pleurophneumonia-like organisms to action of antibiotics: terramycin and neomycin. J. Urol. 1952; 68: 399–402.

241. Lemcke R. Media for the Mycoplasmataceae. Lab. Pract. 1965; 14 (6): 712.

242. Lemcke R. Serological reactions of Mycoplasmas. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1973; 225: 46–53.

243. Ley D.H., Yoder H.W. *Mycoplasma gallisepticum.* Diseases of poultry. USA. 2003: 227–43.

244. Luo M., Zhang L., Xiao Y. The prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum* cervical infection in infertility women and the observation of therapeutic efficacy. Bulletin of Hunan Medical University. 1998; 23(5): 444-6.

245. Marthedal H.E., Villing G., Badstue P. Control of avian Mycoplasmosis in Denmark. Bull. Off. Int. Epiz. 1969; 72: 387–401.

246. Mezor M., Hadash D., Samberg Y. Elimination of avian Mycoplasma organisms by heat treatment of eggs prior to incubation-some technical aspects. Refu Vet. 1973; 30: 101–9.

247. Moalic P.-Y., Gesbert F., Kempf I. Utility of an internal control for evoluation of a *Mycoplasma meleagridis* PCR test. Veter. Microbiol. 1998; 61 (1–2): 41–9.

248. Mortoon H.E., Robers R.J. Production of anti-Mycoplasma (PPLO) antibodies in rabbits. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1967; 125 (2). – P. 538–543.

249. Morse J.W., Boothby J.T., Yamamoto R. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* by direct immuno-fluorescence using a species-specific monoclonal antibody. Avian. Dis. 1986; 30: 204–6.

250. Nagatomo H., Kato H., Shimizu T., Katayama B. Isolation of mycoplasmas from fantail pigeons. J. Vet Med Sci. 1997; 59(6): 461–462.

251. Nakamura K., Ueda H., Tanimura T., Noguchi K. Effect of mixed live vaccine (Newcastle disease and infectious bronchitis) and *Mycoplasma gallisepticum* on the chicken respiratory tract and on *Escherichia coli* infection. J. Comp Pathol. 1994; 111 (1): 33–42.

252. Nascimento E.R., Yamamoto R., Khan M.I. *Mycoplasma gallisepticum* F-vaccine strain-specific polymerase chein reaction. Avian. Dis. 1993; 37: 203–11.

253. Newnham A., Chu H. An in vitro comparison of some antibacterial, antifungal and antiprotozoal agents in various strains of Mycoplasma (PPLO). J. Hyg. Camb. 1965; 63:1–3.

254. Nonomura I., Yoder H.W. Identification of avian Mycoplasma isolates by the agar gel precipitin test. Avian. Dis. 1977; 21: 370–81.

255. Nunoya T.T., Yagihashi T., Nagassawa Y. Occurrence of keratoconjunctivitis apparently caused by *Mycoplasma gallisepticum* in layer chickens. Vet. Pathol. 1995; 32: 11–8.

256. Rodriguez R., Kleven S.H. Pathogenicity of two strains of *Mycoplasma gallisepticum* in broiler chickens. Avian Dis. 1980; 24: 800–7.

257. Talati A.J., Crouse D.T., English B.K., Newman C., Livingston L. and Meals E. Exogenous bovine surfactant suppresses tumor necrosis factor-alpha release by murine macrophages stimulated by genital mycoplasmas. J. Infect. Dis. 1998;178, Oct.: 1122–5.

258. Shimizu T. An adhesion-hemadsorption inhibition test for the detection of serum antibody to *Mycoplasma gallisepticum.* Japan. J. vet. Sc. 1989; 51 (3). 491–5.

259. Singh S.B., Singh C.M. Studies on avian PPLO. Incidence of CRD of poultry in India. Indian Vet. 1967; 44 (1): 7.

260. Slavik M.F., Wang R.F., Cao W.W. Development and evaluation of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. Mol. Cell. Probes. 1993; 7: 459–463.

261. Smith P. The Biology of Mycoplasmas. N.Y. London. 1971: 1– 294.

262. Stipkovits L., EL-Ebeedy A.A., Kisary J., Varga L. Mycoplasma infection of geese. I. Incidence of mycoplasmas and acholeplasmas in geese. Avian. Path. 1975; 4 (1): 35–43.

263. Stipkovits L., Csiba E., Laber G. Simultaneous treatment of chickens with salinomycin and tiamulin in feed. Avian Dis. 1992; 36 (1): 11–16.

264. Stohr K. WHO and non-human use of antimicrobials. Proceebings of International Business Communication conference, Antimicrobial Resistance. London. 1999: 19–20.

265. Talkington F.D., Kleven S.H. Research note: Additional information on the classification of avian Mycoplasma serotypes. Avian. Dis. 1984; 28: 278–80.

266. Tanner A.C., Avakian A.P., Barnes H.J., Ley D.H., Migaki T.T., Magonigle R.A. A comparison of danofloxacin and tylosin in the control of induced *Mycoplasma gallisepticum* infection in broiler chicks. Avian Dis. 1993; 37 (2): 515–22.

267. Tiwary B.K., Goel M. Experimental *Mycoplasma gallisepticum* infection in normal IgA- and CMI-deficient chickens. Indian. anim. Sc. 1986; 56: 719–25.

268. Turner A.W. Growth-inhibition tests with *Mycoplasma micoides* as a basis for chemotherapy and selectiva culture media. Austr. Vet. J. 1960; 36 (5): 221–4.

269. Tyagi P. Mycoplasmal antibodies as determined with an enzyme-linked immunosorbent assay, in tubal factor infertility. Indian J Med Sci. 1999; 53(11): 481–5.

270. Vardaman T.H. A culture medium for the production of *Mycoplasma gallisepticum* antigen. Avian. Dis. 1967; 11: 123–9.

271. Yagihashi T.T., Nunoya T., Sannai S., Tajima M. Comparison of immunity induced with a *Mycoplasma gallisepticum* bacterin between hidh- and low-responder lines of chickens. Avian Dis. – 1992; 36: 125–33.

272. Yamamoto R. *Mycoplasma meleagridis* infection. Dis. Poultry (Eighth edition). 1984: 202–12.

273. Ward J., Madoff S., Dienes L. In vitro sensitivity of some bacteria, their L-forms and pleurophneumonia-like organisms to antibiotics. Proc. Soc. Exp. Biol. 1985; 97: 132–9.

274. Yoder H.W., Hofstad M.S. Evaluation of tyiosin in preventing egg transmission of *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. Avian Dis. 1965; 9: 291–301.

275. Yoder I.W. Preincubation heat treatment of chicken hatching eggs to inactivate Mycoplasma. Avian Dis. 1970; 14: 75–86.

276. Yoder H.W., Hopkins S.R., Mitchell B.W. Evaluation of inactivated *Mycoplasma gallisepticum* oil-emulsion bacterins for protection against airsacculitis in broilers. Avian Dis. 1984; 28: 224–34.

277. Yoder H.W., Hopkins S.R. Efficacy of experimental inactivated *Mycoplasma gallisepticum* oil-emulsion bacterin in egg-layer chickens. Avian Dis. 1985; 29: 322–34.

К главе 6

1. Александрова Н.О., Чеботкевич В.Н., Панова Э.А., Сизонов В.Д. К вопросу о диагностике микоплазменной инфекции у гинекологически больных. Совершенная многопрофильная клиническая больница: Пробл. и перспективы: Сб. науч. работ к 125-летию больницы Святого Великомученника Георгия. – СПб. 1995: 109–10.

2. Аликин Ю.С. Стимуляторы неспецифической резистентности на основе РНК для ветеринарной медицины. Автореф. дис. док. биолог. наук. Новосибирск. 1998: 1–44.

3. Алымбаева Д.Б. , Миллер Г.Г., Раковская И.В., Быковская А.Ф. Влияние микоплазм на продукцию онкогенного вируса HTLV Т-лимфобластными клетками НИТ – 102. Вопросы вирусологии. 1985; 1: 75–7.

4. Андреев Е.В., Фукс П.П. Смешанная вирусомикоплазменная инфекция. Ветеринария. 1980; 8: 30–2.

5. Андросик Н.Н. Изучение эффективности противомикоплазменной вакцинации. Ветеринария. 1981; 11: 26–7.

6. Андросик Н.Н. Иммунопатологические реакции при микоплазмозе свиней. Ветеринарная наука – производству: Межведом. сборник НИИЭВ. 1987; 25: 65–70.

7. Андросик Н.Н. Сыворотка крови реконвалесцентов в системе мероприятий против респираторого микоплазмоза свиней. Ветеринарная наука – производству: Межведом. сб. НИИЭВ. 1989: 27: 26–7.

8. Андросик Н.Н., Курлович Д.В. Экспериментальная модель для воспроизведения генитального микоплазмоза свиней. Технология получения и выращивания здорового молодняка с.-х. животных и рыбопосадочного материала: Тез. докл. Респ. Науч.-практ. конф. Минск. 1993: 125–6.

9. Асанин М.М., Павлов И.А., Гаффаров Х.З. Случай микоплазменной инфекции у телят. Бюл. ВИЭВ. 1972; 13: 30–2.

10. Астапова А.А., Мельникова Э.А., Зборовская А.А. Микоплазменные инфекции. Мед. новости. 2000; 7: 26–30.

11. Афонасьев В.Н. Методы получения гипериммунных сывороток к микоплазмам. ВКИ: Новое в инфекционной патологии с/х животных. Тр. ВИЭВ. 1980; 51: 58–61.

12. Афонасьев В.Н. Локализация видовых антигенов в микоплазмах. ВКИ: Новое в инфекционной патологии с/х животных. Тр. ВИЭВ; 58. М. 1983: 130–4.

13. Ахмедова Э.М., Меджидов М.М., Муртузалиева П.М. Клиническое испытание сухой питательной среды для индикации уреаплазм. Разработка и производство диагностических питательных сред и микротестсистем: материалы Международной научной конференции, посвященные 70-летию НПО «Питательные среды». – Махачкала. 1998: 54–5.

14. Ахмедшин З.Х., Ахмедшин Р.З., Коновалов С.А., Коновалова Л.В., Гоман Д.Н. Хламидии и микоплазмы у детей с заболеваниями мочевыводящих путей. Актуальные проблемы детской и подрастковой гинекологии и эндокринологии: материалы 2-й Респ. науч.-практ. конф. Уфа. 1996: 85–8.

15. Байдевлятов А.Б. Изучение стадийности микоплазм. Ветеринария. 1974; 8: 43–5.

16. Байжоматов М.С. Быстрое получение гипериммунных сывороток к *M. pneumoniae*. Лабораторное дело. 1974; 1: 54.

17. Бакулов И.А., Барышников П.И. Иммуноферментный анализ при диагностике микоплазмозов животных. Ветеринария. 1987; 11: 53–6.

18. Батраков В.В. О диагностики микоплазмозов. Вопросы ветеринарной микробиологии, эпизоотологии и вет.-сан. экспертизы. Ульяновск. 1990: 60–3.

19. Белоусова Е.В. Сравнительная оценка эффективности методов выявления возбудителей урогенитальных микоплазм : Автореф. дис. … канд. мед. наук : 03.00.07. / СПб. Гос. мед. акад. им. И.И. Мечникова. СПб. 1999: 1–16.

20. Бердник В.П. РДСК в микрообъеме при микоплазмозе свиней. Ветеринария. 1986; 1: 23–7.

21. Бердник В.П., Настенко В.Д. Получение мутантов микоплазм и ахолеплазм для изготовления вакцины против инфекционной пневмонии свиней. Проблемы ветеринарной иммунологии. М. 1985: 118–21.

22. Борхсениус С. Н. , Чернова О. А. Микоплазмозы. Л. : Наука. 1989: 37–41.

23. Бочкарев В.Г., Лебедева И.П., Островерхов А.В., Тювакина А.В., Селезнева М.А., Боряк Л.Р., Щербакова В.В., Спаденко А.И. Применение полимеразной цепной реакции (ДНК – диагностика) в диагностики урогенитальных инфекций в условиях курорта и ее медико-экономическая эффективность. Вопр. курортологии, физиотерапии и лечеб. физ. культуры. 1997; 3: 28–30.

24. Бродский М.Ю. Говорун В.М. Халилов Э.М. Жданов А.В. Файзуллин Л.З. Сухих Г.Т. Идентификация *Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum* и *Chlamydia trachomatis* методом полимеразной цепной реакции. Бюл. эксперим. биол. и медицины. 1995; 12: 606–9.

25. Васильева Е.И., Фесячко Л.В., Марченкова А.В., Бурлаку Л.Н. Оценка этиологической роли микоплазм, уреаплазм и хламидий в развитии воспалительных процессов урогенитального тракта заболеваний. Актуальные вопросы клинической железнодорожной медицины: опыт диагностики и лечения больных: Сб. ст. М., 1997: 125–7.

26. Виноходов О. В. Флюресцентный метод исследования колоний микоплазм //Сб. науч. тр. ВНИИБП. 1965; 1 (12): 201.

27. Вульфович Ю.В., Раковская И.В., Гамова Н.А., Гончарова С.А., Горина Л.Г., Джумигр А.П., Прозоровский С.В. Лабораторная диагностика микоплазмоза и уреаплазмоза у урологических и гинекологических больных. ЖМЭИ. 1995; 5: 97–100.

28. Газовская Л.А. Клиническое течение и лабораторная диагностика внутриутробных инфекций (хламидийной, микоплазменной, цитомегаловирусной и герпесной) у новорожденных детей : Автореф. дис. … канд. мед. наук : 14. 00. 09. / Моск. мед. акад. им. И.М. Сеченова. М. 1997: 1–20.

29. Гамзаев Ф.Ш., Ли А.М. Сравнительная характеристика диагностических методов для идентификации микоплазменной инфекции урогенитального тракта. Актуальные проблемы внутренней медицины и стоматологии : Сб. науч. тр. СПб. 1997; 1: 184.

30. Гамзаев Ф.Ш. Особенности диагностики, патогенеза и лечения микоплазменной инфекции урогенитального тракта мужчин : Автореф. дис. … канд. мед. наук : 14. 00. 11. / Кубан. Гос. мед. акад. М. 1999: 1–18.

31. Гасанова Т.А. Лабораторная диагностика инфекций передающихся половым путем при хронических воспалительных заболеваниях репродуктивной системы. ЖМЭИ. 2001; 3: 60–5.

32. Гаффаров Х.З., Боровик Р.В. Способ повышения специфических свойств микоплазменных антисывороток. Микоплазмозы с/х животных / Тр. ВИЭВ. 1977; 46: 17–20.

33. Гущин А.Е., Тополь Ю.Ю., Говорун В.М. Механизмы формирования антибиотикоустойчивости клинических штаммов микоплазм и методы их выявления. Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний: материалы II Всерос. научно-практ. конф. М. 1998: 16–20.

34. Дададжанов Ю.Х., Бурлаков В.А. Модифицированный метод постановки связывания комплемента при микоплазмозах. Проблемы лейкоза и инфекционных заболеваний с/х животных. М. 1988: 125–8.

35. Дерябин Д.Г., Борисов С.Д., Михайленко С.В. Смешанные урогенитальные инфекции у мужчин. ЖМЭИ. 2000; 2: 15–8.

36. Дмитриев Г.А., Гладкова Н.С., Дрижарова Б.О. Сравнительное изучение различных методов диагностики урогенитального уреаплазмоза и микоплазмоза. Актуальные вопросы дерматол. и венерол. : Сб. тр. юбил. конф., посвящ. 5-ти летию каф. кож. и венер. болезней педиатр. фак. РГМУ. М. 1997: 42–3.

37. Дунаев Г.В. Патогенные микоплазмы. Ветеринарная микробиология и иммунология: под. ред. Н.А. Радчука. М. : Агропромиздат. 1991: 300–12.

38. Жданов А В., Малина Э.В., Бурменская О.В., Файзуллин Л.З., Кулаков В.И., Сухих Г.Т., Бродских М.Ю., Говорун В.М., Халилов Э. М. Выявление *Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* методом полиме-

разной реакции при патологиях репродуктивной системы мужчин и женщин. Бюл. эксперим. биол. и медицины. 1996; 5: 547–50.

39. Карпенко А.Е. Диагностика и клинико-эпидемиологические аспекты урогенитальной уреаплазменной инфекции: Автореф. дис. … канд. мед. наук: 14.00.11. / Киев. ин-т усоверш. врачей. Киев. 1988: 1–20.

40. Карташева В.М., Игнатьев С.В., Корягин В.И. Мастит у коров вызванный микоплазмами: обзор лит. Ветеринария. 1981; 7: 69–76.

41. Коваленко Я.Р., Сидоров М.А. Микоплазмы и микоплазмозы животных. Бюл. ВИЭВ. 1972; 13: 5 –13.

42. Коваленко Я.Р. Микоплазмозы животных. М.: Колос. 1976: 1–304.

43. Коваленко Я.Р. Новые данные в изучение микоплазм и микоплазмозов животных. Микоплазмозы с/х животных. Тр. ВИЭВ. М. 1977; 46: 3–7.

44. Коваленко Я.Р., Шегидович Э.А., Яблонская И.А. Микоплазмы и их роль в патологии сельскохозяйственных животных. Тр. ВИЭВ. М. 1980; 51: 24–9.

45. Комелединова Н.Н., Колабская Л.С., Шорникова Л.А. Изучение антигенного состава микоплазм методом иммуноэлектрофореза. Бюлл. ВИЭВ. 1972; 13: 105.

46. Куликова И.Л. Диагностика микоплазма-контаминации в культуре клеток животных. Ветеринария. 1989; 8: 35–7.

47. Левашов В.С., Клушина Т.Н. Биологисческие свойства реверсированных культур некоторых микоплазм, выделенных из культур тканей и нормальной бычьей сыворотки. ЖМЭИ. 1969; 6: 107–8.

48. Мальцева Е.С. Клиническое значение микоплазменной инфекции при хроническом пиелонефрите у детей: автореф. дис. … канд. мед. Наук: 14.00.09. / Казан. гос. мед. акад. Казань. 1996: 1–23.

49. Мананков В.В., Смелянский В.П., Пашнина Т.П., Рыбкина Р.А. Радиоиммунологические и хемилюминесцентный методы лабораторной диагностики хламидиозов и микоплазмозов человека. Природноочаговые инфекции в России: Соврем. эпидемиология, диагностика, тактика защиты населения: Всерос. науч.-практ. конф. Омск. 1998: 199 – 200.

50. Мананков В.В., Напалкова Г.М., Пашнина Т.П., Смелянский В.П. Использование точечного твердофазного иммуноферментного анализа для диагностики хламидиоза и микоплазмоза. Природно-очаговые инфекции в России: Современная эпидемиология, диагностика, тактика защиты населения: Всерос. науч.-практ. конф. Омск. 1998: 200–1.

51. Махи Э.Ю. Культурально-биохимические свойства микоплазм и ахолеплазм отдельных видов. Тр. ВИЭВ. – Т. 46. – М., 1977. – С. 58–61.

52. Методические рекомендации по контролю качества питательных сред по биологическим показателям. М. 1980: 1–20.

53. Методические рекомендации по выделению культивированию, поддержанию и идентификации микоплазм, ахолеплазм и уреаплазм. ВАСХНИЛ. Москва. 1982: 1–49.

54. Методические рекомендации по выделению и идентификации микоплазм из молока коров. ВАСХНИЛ. Москва. 1985: 1–16.

55. Методические указания по диагностике, профилактике и мерам борьбы с микоплазмозом свиней. ГУВ МСХ СССР. Москва. 1988: 1–68.

56. Микоплазмы. Краткий определитель бактерий Берги. М.: Мир. 1980: 425–34.

57. Микоплазмозы в патологии животных. Под ред. Г. Ф. Коромыслова. М.: Агропромиздат. 1987: 1–256.

58. Микробиологическая и иммунологическая диагностика микоплазма – пневмонии инфекции: Методические рекомендации. Алма-Ата. 1978: 7–8.

59. Миллер Г.Г., Раковская И.В., Березин В.Э. Взаимодействие микоплазм с вирусами человека и животных. Ультраструктурный анализ. Вестн. АМН СССР. 1991; 6: 36–43.

60. Митрофанов П.М., Курбанов И.А. Микоплазмоз половых органов у быков. Тр. ВИЭВ. М. 1977; 46: 33-4.

61. Митрофанов П.М., Хакимова К.М, Гаффаров Х.З. Влияние бактерий при микоплазмозе телят. Ветеринария. 1978; 3: 52–5.

62. Митрофанов П.М., Гаффаров Х.З. Микоплазменные инфекции телят и меры борьбы с ними. Метод. рекомендации. Новосибирск. 1979: 1–72.

63. Митрофанов П.М. Патоморфология и патогенез органов дыхания у телят. Патоморфология, патогенез и диагностика болезней сельскохозяйственных животных. М. 1980: 134–6.

64. Митрофанов П.М. Патоморфология и патогенез микоплазменных инфекций крупного рогатого скота вызванных *M. bovirhinis* и *M. bovigenitalium*. Науч. тех. бюл. 1981; 33: 16–22.

65. Митрофанов П.М. Генитальный микоплазмоз крупного рогатого скота. Метод. реком. Новосибирск. 1982: 1-20.

66. Митрофанов П.М., Гаффаров Х.З., Боровик Р.В. Иммунопатология при микоплазмозе животных. Ветеринария. 1984; 5: 35–7.

67. Михайлов А.В., Самсыгина Г.А., Гасанова Т.А., Лаврова Д.Б. Скрининговое выявление контаминации новорожденных микоплазмами. Патология беременности и родов: Тез. докл. III межобл. Науч.-практ. конф. Саратов, 1997: 68–70.

68. Момыналиев К.Т., Орлова В.Ф., Жукоцкий А.В., Коган Э.М., Говорун В.М. Использование метода полимеразной цепной реакции in situ для выявления внутриклеточной локализации *M. hominis* в культивируемых клетках Hela. Цитология. 2000; 2: 202–8.

69. Наумец З.П., Андреев Е.В., Журавлев В.М. Красиников Г.А. Патогенность полевых штамммов *M. bovigenitalium* для генитального тракта быков производителей. Тр. ВИЭВ. М. 1977; 46: 35–7.

70. Неустроева В.В. Взаимодействие микоплазм и макрофагов. Вестн. АМН СССР. 1991; 6: 30–4.

71. Новикова Л.Н., Башмакова М.А., Тараскина А.Е. Современные микробиологические подходы к диагностике микоплазменных инфекций Актуальные вопросы рациональной диагностики и терапии хламидийно микоплазменной инфекции. Омск. 1998: 29–32.

72. Ощепков В.Г., Шадрина М.Н., Шкиль Н.Н. Диагностика, лечение и профилактика микоплазмоза у телят: рекомендации. Омск. 2000: 1 15.

73. Ощепков В.Г., Шадрина, М.Н., Шкиль НН. Результаты изучения антигенного родства бруцелл и микоплазм. Инфекционная патология животных: Сб. науч. тр. Юбилейный выпуск ВНИИБТЖ. Омск. 2001: 130–2.

74. Ощепков В.Г., Шадрина М.Н, Шкиль Н.Н. Этиологическая структура и пути распространения микоплазмозов у телят на территории Сибири. Инфекционная патология животных: Сб. науч. тр. Юбил. выпуск ВНИИБТЖ. Омск. 2001: 292–3.

75. Паутов Ю.М. Активность антигенов разных видов микоплазм в РА и РДСК. Ветеринария. 1988; 1: 61–2.

76. Петросова В.Н., Раковская И.В., Раскова Ш.М., Каган Г.Я. Серологическая характеристика некоторых видов микоплазм по данным реакции агглютинации, связывания комплемента и ингибиции роста. ЖМЭИ. 1969; 10: 11.

77. Плотко Е. Э. Роль хламидийной и микоплазменной инфекции в генезе послеродового эндометрита, оптимизация его диагностики и терапии: автореф. дис. … канд. мед. наук: 14.00.01. Урал. гос. мед акад. Омск. 1996: 1–22.

78. Поликарпов В. А., Никитенко А. М. Морфологическое строение микоплазм, выделенных из паринхиматозных органов больных пневмонией ягнят. Тр. ВИЭВ. М. 1977; 46: 50–2.

79. Полухина Т.В., Одинец В.С. Возможности диагностики и лечения урогенитальных инфекций в условиях диагностиче-

ского центра. Материалы Юбилейной конференции, посвященной 10-летию Ставропольского Краевого клинического диагностического центра: сб. ст. Ставрополь. 1999; 2: 290–1.

80. Прилепская В. Н., Абуд И. Ю. Урогенитальный микоплазмоз. Рус. мед. журн. 1998; 5: 195 – 200.

81. Прилепская В.Н., Фосфанова И.Ю. Микоплазменная инфекция. Контрацепция и здоровье женщины. 1999; 2: 3–11.

82. Пристли С. Дж. Ф., Джонс В. М., Дхар Д., Гудвин Л. Что такое нормальная влагалищная флора. Заболевания передаваемые половым путем. 1997; 4: 12–8.

83. Прозоровский С. В, Покровский В. И., Васильева В. И. Микоплазма пневмонии – инфекция. М.: Медицина. 1972: 1–225.

84. Прозоровский С.В., Вульфович Ю.В., Соколова И.И., Раковская И.В., Гамова Н.А., Гончарова С.А., Малышева Э.В. Урогенитальный микоплазмоз и микоплазмоносительство при беременности и воспалительных процессах гениталий у работниц электронной промышелнности. ЖМЭИ. 1995; 5: 93–6.

85. Прозоровский С.В., Раковская И.В., Вульфович Ю.В. Медицинская микоплазмология. М: Медицина. 1995: 1–287.

86. Прозоровский С.В., Раковская И.В., Горина Л.Г., Вульфович Ю.В., Гончарова С.А., Неустроева В.В., Гамова Н.А. Персистенция микоплазм в инфицированном организме: наблюдения, причины и механизмы, диагностика. ЖМЭИ. 1997; 4: 47–51.

87. Пронин А.В., Титц Х., Келер Р. и др. Микоплазмы и микоплазмозы. Сб. науч. тр. НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. М. 1985: 66–9.

88. Пустовар А.Я. Особенности микоплазма-инфекции при энзоотической пневмонии свиней. Тр. ВИЭВ. М. 1977; 46: 65–9.

89. Пустовар А.Я. Микст-инфекции, обусловленные микоплазмами и другими бактериальными агентами. VI съезд паразитоценологов Украины. Харьков. 1995: 113–4.

90. Рудаков Н.В., Самойленко И.Е. Актуальные вопросы урогенитальной инфекции. Актуальные вопросы рациональной

диагностики и терапии хламидийно микоплазменной инфекции. Омск. 1998: 11–3.

91. Рудаков Н.В., Самойленко И.Е., Калмин О.Б., Решетникова Т.А., Березкина Г.В. Разработка новых питательных сред для диагностики урогенитальных инфекций. Разработка и производство диагностических питательных сред и микротестсистем: Материалы Международной научной конференции, посвященные 70-летию НПО «Питательные среды». Махачкала. 1998: 55–6.

92. Рудаков Н. В., Самойленко И. Е., Калмин О. Б., Решетникова Т. А., Березкина Г. В. Новые питательные среды для диагностики урогенитальных инфекций // Природноочаговые инфекции в России: Соврем. Эпидемиология, диагностика, тактика защиты населения: Всерос. науч.-практ. конф. Омск. 1998: 201–3.

93. Рудаков Н В. Хламидии, микоплазмы, уреаплазмы. Краткий курс лекций по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. Омск. 2002; 2: 61–70.

94. Румпель Е.Г., Шаманин В.А. Сравнение различных ПЦР – тестов для выявления *Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* у женщин с нарушением репродуктивной функции. ЖМЭИ. 2000; 6: 80–3.

95. Сидоров М.А., Коваленко Я.Р. Шегидевич Э.А. Методы идентификации и серологической типизации микоплазм выделенных от животных. Бюл. ВИЭВ. 1972; 13: 68–73.

96. Скворцов С.В., Найденов Ю.Н., Лыцарь Б.Н., Комаров И.А., Гончарук А.И. Диагностика хламидиоза и урогенитальных микоплазмозов при помощи цепной полимеразной реакции. Воен.-мед. журн. 1995; 7: 49–50.

97. Смирнова И.Р. Культуральные и биохимические свойства различных штаммов микоплазм. Ветеринария. 1983; 4: 63–4.

98. Соловьева С.В. Разработка и использование амплификационных тест-систем для выявления возбудителей урогенитальных микоплазмозов: Автореф. дис. … канд. биол. наук:

03.00.07. НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи. М. 1997. 1–30.

99. Соловьева С.В., Цой Е.Г., Зигангирова Н.А., Гамова Н.А., Раковская И.В., Гинцбург А.И. Выявление тетрациклин- и эритромицин устойчивых штаммов урогенитальных микоплазм с помощью ПЦР. ЖМЭИ. 1998; 6: 3–7.

100. Супрум А.П. Изучение чувствительности некоторых штаммов микоплазм на исскуственной питательной среде, в культуре клеток и в организме птиц. автореф. дис. … канд. вет. наук. Тарту. 1972: 1–18.

101. Теохаров К.Б. Клинико-эпидемиологическая характеристика трех видов урогенитальных микоплазм у мужчин с негонорейными воспалительными заболеваниями. Актуальные вопросы рациональной диагностики и терапии хламидийно микоплазменной инфекции. Омск. 1998: 41–3.

102. Терешин А.Т., Хворостьянов А.И. Урогенитальный микоплазмоз: Клиника диагностика, терапия. Пятигор. НИИ Курортологии. Пятигорск. 1999: 1–11.

103. Тимаков В. Д., Каган Г. Я. L-формы бактерий и семейство *Mycoplasmatoceae* в патологии. М.: Медицина. 1973: 1–278.

104. Фарзалиев М.М., Касумов У.А. Сохранение жизнеспособности и патогенности культур *M. agalactiae.* Тр. ВИЭВ. М. 1977; 46: 44–7.

105. Фомичева Е.Н., Зарубина Е.Н., Минаев В.И., Маликов В.Е., Тымчишина В.А. Роль уреаплазменной и хламидийной инфекции в акушерской практике. Акушерство и гинекология. 1997; 2: 55–7.

106. Фукс П.П., Калашник Н.В., Герус Г.Б. К вопросу о лабораторной диагностике микоплазмоза. Инф. Бюл. ИЭКВМ. Харьков. 1995: 253–5.

107. Чеботкевич В.Н., Боженко Л.В., Лисин В.В. Состояние клеточного иммунитета и фагоцитозов при заражении морских свинок *M. pneumoniae.* ЖМЭИ. 1981; 1: 84–9.

108. Чекишев В.М., Еремеева Г.А. Способ идентификации специфических антигенов в сложных биологических смесях. Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. Новосибирск. 1991; 1: 86–9.

109. Чибисов В.А., Бурлаков В.А. Разработка питательной среды для культивирования микоплазм и ахолеплазм. Проблемы лейкоза и инфекционных заболеваний. М. 1988: 123–5.

110. Чернова О.А. Биохимические аспекты патогенеза при персистенции микоплазм у человека: автореф. дис. … д-ра биол. наук : 03.00.04. / Рос. АН Ин-т биохимии им. А.Н. Баха. М. 1997: 1–51.

111. Чернов В. М., Чернова О. А. Микоплазменные инфекции как возможный фактор генетических изменений в клетках высших эукариот. Цитология. 1996; 2: 107–14.

112. Чумаченко Н.В., Смирнова Т.Д. Метод иммунизации лабораторных животных микоплазмами и L-формами бактерий. Лабораторное дело. 1974; 1: 39–41.

113. Шадрина М. Н., Корнев В. К. Чувствительность микоплазм, выделенных при полиартритах телят, к антибиотикам. Эпизоотология и меры борьбы с инфекционными болезнями животных: сб. науч. тр. / ВАСХНИЛ. СО. Новосибирск. 1985: 113–8.

114. Шадрина М. Н., Корнев В. К. Виды микоплазм изолированные из органов больных полиартритами телят. Эпизоотология и меры борьбы с инфекционными болезнями животных: сб. науч. тр. /ВАСХНИЛ. СО Новосибирск. 1985: 120–3.

115. Шадрина М. Н., Шкиль Н. Н. Результаты серологических исследований на микоплазмоз телят, больных бронхопневмонией. Проблемы адаптации сельскохозяйственных животных: материалы науч.-практ. конф., посвящ. 65-летию Иркутской НИВС. Иркутск. 1997: 73–74.

116. Шарабрин О. И. Болезни, вызываемые микоплазмами. Микоплазмозы Инфекц. болезни животных: справочник / под ред. Д. Ф. Осидзе. М.: Агропромиздат. 1987: 158–68.

117. Шегидевич Э.А., Яблоньская И.А., Сидоров М.А. О методах выделения и культивирования микоплазм. Бюл. ВИЭВ. 1972; 13: 64–8.

118. Шкиль Н.Н. Особенности персистенции *Mycoplasma agalactiae* у купного рогатого скота. Зоогигиена, профилактика и терапия болезней сельскохозяйственных и мелких домашних животных. Новосибирск. 1999: 12–3.

119. Шкиль Н. Н. Эпизоотологические и иммунологические аспекты микоплазм телят во взаимосвязи с бруцеллезом и другими инфекциями: автореф. дис. … канд. вет. наук: 16.00.03 / ИЭВСиДВ. Новосибирск. 2000: 1–23.

120. Шкиль Н.Н., Шадрина М.Н. Особенности проявления микоплазмоза молодняка крупного рогатого скота. Зоогигиена, профилактика и терапия болезней сельскохозяйственных и мелких домашних животных. Новосибирск. 1999: 50–1.

121. Шкиль Н.Н., Стеблева Г.М., Шадрина М.Н. К вопросу антигенного родства бруцелл и микоплазм. Вклад молодых ученых в развитие Сибирской аграрной науки: Мат. конф. науч. молод. СО Россельхозакадемии. Новосибирск. 1999: 157–8.

122. Ялфимова Е.Ю., Пронин А.В. Суперантигены и их роль в патологии: Обзор. ЖМЭИ. 1999; 3: 98–104.

123. Abele-Horn M., Wolff C., Dressel P., Zimmermann A., Vahlensieck W., Pfaff F., Ruckdeschel G. Polymerase chain reaction versus culture for detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in the urogenital tract of adults and the respiratory tract of newborns. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996; 15, Jul.: 595–8.

124. Abele-Horn M., Wolff C., Dressel P., Pfaff F., Zimmermann A. Association of *Ureaplasma urealyticum* biovars with clinical outcome for neonates, obstetric patients, and gynecological patients with pelvic inflammatory disease. J. Clin. Microbiol. 1997; 35, May: 1199–202.

125. Andrews W. W., Shah S. R., Goldenberg R. L., Cliver S. P., Hauth J. C., Cassell G. H. Association of post-cesarean delivery en-

dometritis with colonization of the chorioamnion by *Ureaplasma urealyticum*. Obstet. Gynecol. 1995; 85, Apr.: 509–14.

126. Athayde N., Romero R., Maymon E., Gomez R., Pacora P., Yoon B. H., Edwin S. S. Interleukin 16 in pregnancy, parturition, rupture of fetal membranes, and microbial invasion of the amniotic cavity. Am. J. Obstet. Gynecol. 2000; 182, Jan.: 35–41.

127. Barber T. L., Fabricant J. Primari isolation of mycoplasma organisms (PPLO) from mammalian sources. J. Bact. 1962; 83 (6): 1268–73.

128. Bebear C.M., Renaudin H., Boudjadja A., Bebear C. In vitro activity of BAY 12-8039, a new fluoroquinolone against mycoplasmas. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42: 703–4.

129. Bihari A. Screening of sexually transmitted diseases (*Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum* and *Chlamydia trachomatis*) in young women. Orv. Hetil. 1997; 138: 799–803.

130. Brunner H. Models of mycoplasma respiratory and genital tract infections. Wien Klin Wochenschr. 1997; 109: 569–73.

131. Cedillo-Ramirez L., Gil C., Zago I., Yanez A., Giono S. Association of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* with some indicators of nonspecific vaginitis. Rev. Latinoam. Microbiol. 2000; 42: 1–6.

132. Chanock R., Hayflick L., Barile M. Growth on artificial medium of an agent asociated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. Proc. Nat. Acad. Sci. 1962; 48 (1): 41–49.

133. Chua K.B., Ngeow Y.F., Ng K.B., Chye J.K., Lim C.T. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* isolation from cervical secretions of pregnant women and nasopharyngeal secretions of their babies at delivery. Singapore. Med. J. 1998; 39: 100–2.

134. Cordero L., Coley B. D., Miller R. L., Mueller C. F. Bacterial and Ureaplasma colonization of the airway: radiologic findings in infants with bronchopulmonary dysplasia. J. Perinatol. 1997; 17: 428–33.

135. Cravello L., Porcu G., D'Ercole C., Roger V., Blanc B. Identification and treatment of endometritis. Contracept. Fertil. Sex. 1997; 25: 585–6.

136. Crouse D. T., English B. K., Livingston L., Meals E. A. Genital mycoplasmas stimulate tumor necrosis factor-alpha and inducible nitric oxide synthase production from a murine macrophage cell line. Pediatr. Res. 1998; 44: 785–90.

137. Cultrera R., Roulland-Dussoix D., Romani R., Contini C. Use of PCR to detect mycoplasma DNA in respiratory tract specimens from adult HIV-positive patients. J. Med. Microbiol. 1998; 47: 983–6.

138. Cunningham C.K., Bonville C.A., Hagen J.H., Belkowitz J.L., Kawatu R.M., Higgins A.M., Weiner L.B. Immunoblot analysis of anti-*Ureaplasma urealyticum* antibody in pregnant women and newborn infants. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1996; 3: 487–92.

139. da Cunha R.A., Takei K., Vaz A.J., Rosenthal C. Detection of mycoplasmas in urethral swabs from HIV-1 infected patients and control individuals using culture techniques and polymerase chain reaction. Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo. 1998; 40: 1–5.

140. Edward D. G. A. Selective medium for pleuropneumonia-like organisms. J. Gen. Microbiol. 1947; 1 (2): 238–43.

141. Edward D. G. An investigatio of the biological properties of organisms of the pleuropneumonia group, with suggestions regarding the identification of strains. J. Gen. Microbiol. 1950; 4: 311–29.

142. Edward D., Fitzgerald W. The isoletion of organisms the pleuropneumonia group of dogs. J. Gen. Microbiol. 1951; 5: 566–75.

143. Elias M., Goluda M., Kuryllo M., Maczynska B., Stankiewicz M., Kmieciak K., Jedryka M. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* of cervical canal and in the pouch of Douglas in infertile women: a preliminary report. Ginekol. Pol. 1998; 69: 1150–2.

144. Felmingham D., Robbins M. J., Ingley K., Mathias I., Bhogal H., Leakey A., Ridgway G. L., Gruneberg R. N. In-vitro activity

of trovafloxacin, a new fluoroquinolone, against recent clinical isolates. J. Antimicrob. Chemother. 1997; 39: 43–9.

145. Font G. E., Gauthier D. W., Meyer W. J., Myles T. D., Janda W., Bieniarz A. Catalase activity as a predictor of amniotic fluid culture results in preterm labor or premature rupture of membranes. Obstet. Gynecol. 1995; 85: 656–8.

146. Freundt E. A. The taxonomy of *Mycoplasmatales* recent progress and current problems. – Mycoplasmatales. Paradubice. 1973: 9.

147. Grattard F., Pozzetto B., de Barbeyrac B., Renaudin H., Clerc M., Gaudin O. G., Bebear C. Arbitrarily-primed PCR confirms the differentiation of strains of *Ureaplasma urealyticum* into two biovars. Mol. Cell. Probes. 1995; 9 (6): 383–9.

148. Gil-Juarez C., Calderon B. A., Montero J., Yanez A., Cedillo L. Detection of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in women sexually active or not. Rev. Latinoam. Microbiol. 1996; 38: 81–8.

149. Gonzalez Pedraza A., Catalina Ortiz-Zaragoza M. A., Inzunza-Montiel A.E., Ponce-Rosas E.R. Frequency of isolation of *Ureaplasma urealyticum* in an open population from southern Mexico City. Rev. Latinoam. Microbiol. 1995; 37: 79–86.

150. Guay D.R. Macrolide antibiotics in paediatric infectious diseases. Drugs. 1996; 51 (4): 515–36.

151. Harasawa R., Lefkowitz E.J., Glass J.I. Cassell GH. Phylogenetic analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of the genus *Ureaplasma.* J. Vet. Med. Sci. 1996; 58: 191–5.

152. Harasawa R., Kanamoto Y. Differentiation of two biovars of *Ureaplasma urealyticum* based on the 16S-23S rRNA intergenic spacer region. J. Clin. Microbiol. 1999; 37: 4135–8.

153. Heyward J.T., Sabry M.Z., Dowdle W.R. Characterization of Mycoplasma species feline origin. Amer. J. Vet. Res. 1969; 30 (4): 615–22.

154. Horowitz S., Mazor M., Horowitz J., Porath A., Glezerman M. Antibodies to *Ureaplasma urealyticum* in women with intraamni-

otic infection and adverse pregnancy outcome. Acta. Obstet. Gynecol. Scand. 1995; 74: 132–6.

155. Iles R., Lyon A., Ross P., McIntosh N. Infection with *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* and the development of chronic lung disease in preterm infants. Acta. Paediatr. 1996; 85 (4): 482–4.

156. Jeremias J., Giraldo P., Durrant S., Ribeiro-Filho A., Witkin S.S. Relationship between *Ureaplasma urealyticum* vaginal colonization and polymorphism in the interleukin-1 receptor antagonist gene. J. Infect. Dis. 1999; 180 (3): 912–4.

157. Joly-Guillou M. L., Judlin P., Lefevre J. C., Catalan F., Sednaoui P., Askienazy-Elbhar M., Pastorini E., Pavis A. Bacteria isolated in 1994-1995 in female upper genitalia infections and in male urethritis. Distribution and sensitivity to antibiotics. Presse. Med. 1996; 25 (8): 342–8.

158. Kamla V., Henrich B., Hadding U. Phylogeny based on elongation factor Tu reflects the phenotypic features of mycoplasmas better than that based on 16S rRNA. Gene. 1996; 171 (1): 83–7.

159. Kenny G.E., Cartwright F.D. Susceptibilities of *Mycoplasma hominis, M. pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to GAR-936, Dalfopristin, Dirithromycin, Evernimicin, Gatifloxacin, Linezolid, Moxifloxacin, Quinupristin-Dalfopristin, and Telithromycin Compared to Their Susceptibilities to Reference Macrolides, Tetracyclines, and Quinolones. Antimicrob. Agents Chemother. 2001; 45 (9): 2604–8.

160. Klieneberger-Nobel E. Pleuropneumonia-like organisms in genital infections. Brit. Med. J. 1959; 1 (5113): 19–23.

161. Knox C.L., Timms P. Comparison of PCR, nested PCR, and random amplified polymorphic DNA PCR for detection and typing of *Ureaplasma urealyticum* in specimens from pregnant women. J. Clin. Microbiol. 1998; 36 (10): 3032–9.

162. Kobayashi H., Hirose K., Worarach A., Paugtes P., Ito N., Morozumi T., Yamamoto K. In vitro amplification of the 16S rRNA

genes from *Mycoplasma bovirhinis, Mycoplasma alkalescens* and *Mycoplasma bovigenitalium* by PCR. J. Vet. Med. Sci. 1998; 60: 1299–1303.

163. Kong F., Zhu X., Zhou J. Grouping and typing of *Ureaplasma urealyticum*. Chung. Hua. I Hsueh Tsa Chih. 1996; 76: 138–40.

164. Kong F. R., Zhu X. J., Wang X. H. The study of *Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum* infection status by polymerase chain reaction. Chung. Hua Liu Hsing Ping Hsueh Tsa Chih. 1995; 16: 217–9.

165. Kong F., Zhu X., Wang W., Zhou X., Gordon S., Gilbert G.L. Comparative analysis and serovar-specific identification of multiple-banded antigen genes of *Ureaplasma urealyticum* biovar 1. J. Clin. Microbiol. 1999; 37: 538–43.

166. Korn A.P., Bolan G., Padian N., Ohm-Smith M., Schachter J., Landers D.V.. Plasma cell endometritis in women with symptomatic bacterial vaginosis. Obstet. Gynecol. 1995; 85: 387–90.

167. Kusiluka L.J., Ojeniyi B., Friis N.F. Increasing prevalence of *Mycoplasma bovis* in Danish cattle. Acta. Vet. Scand. 2000; 41 (2): 139–46.

168. Leon B. A., Campos E., Bolanos H., Caballero M. Risk factors for *Ureaplasma diversum* infections in cattle of a tropical environment. Rev. Biol. Trop. 1995; 43 (1–3): 21–5.

169. Levi N., Eiberg J., Skov Jensen J., Prag J., Jorgensen J., Schroeder T. V. Mycoplasma in urine and blood following catheterisation of patients undergoing vascular surgery. J. Cardiovasc. Surg. 1997; 38: 355–8.

170. Liu C., Bai R.Z., Qu X.J. Detection and analysis of mycoplasma in 400 cases of genitourinary infection in Wuhan area. Chung Hua Liu Hsing Ping Hsueh Tsa Chih. 1997; 18 (2): 86–8.

171. MacKenzie C.R., Henrich B., Hadding U. Biovar-specific epitopes of the urease enzyme of *Ureaplasma urealyticum*. J. Med. Microbiol. 1996; 45 (5): 366–71.

172. Mahony J.B., Jang D., Chong S., Luinstra K., Sellors J., Tyndall M., Chernesky M. Detection of *Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Ureaplasma urealyticum*, and *Mycoplasma genitalium* in First-void Urine Specimens by Multiplex Polymerase Chain Reaction. Mol. Diagn. 1997; 2 (3): 161–8.

173. Mardh P. A., Elshibly S., Kallings I., Hellberg D. Vaginal flora changes associated with *Mycoplasma hominis*. Am J Obstet Gynecol. 1997; 176 (1 Pt 1): 173–8.

174. Morton H., Smith P., Leberman P. Symbiotic growth of pleuropneumonia-like organisms with bacterial colonies. Proc. Soc. Exp. Biol. 1949; 72 (2): 328.

175. Naessens A., Cheng X., Lauwers S., Robertson J. Development of a monoclonal antibody to a *Ureaplasma urealyticum* serotype 9 antigen. J. Clin. Microbiol. 1998; 36 (4): 1125–7.

176. Nagatomo H., Kato H., Shimizu T., Katayama B. Isolation of mycoplasmas from fantail pigeons. J. Vet. Med. Sci. 1997; 59: 461–2.

177. Nir-Paz R., Israel S., Honigman A., Kahane I. Mycoplasmas regulate HIV-LTR-dependent gene expression. FEMS Microbiol. Lett. 1995; 128: 63–8.

178. Patterson A.M., Taciak V., Lovchik J., Fox R.E., Campbell A.B., Viscardi R.M. *Ureaplasma urealyticum* respiratory tract colonization is associated with an increase in interleukin 1-beta and tumor necrosis factor alpha relative to interleukin 6 in tracheal aspirates of preterm infants. Pediatr. Infect. Dis. J. 1998; 17: 321–8.

179. Paul V.K., Gupta U., Singh M., Nag V.L., Takkar D., Bhan M.K. Association of genital mycoplasma colonization with low birth weight. Int J Gynaecol Obstet. 1998; 63 (2, 1): 109–14.

180. Pigrau C., Almirante B., Gasser I., Pahissa A. Sternotomy infection due to *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1995; 14: 597–8.

181. Potasman I., Oren A., Srugo I. Isolation of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* from public toilet bowls. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 1999; 20: 66–8.

182. Povlsen K., Jensen J.S., Lind I. Detection of *Ureaplasma urealyticum* by PCR and biovar determination by liquid hybridization. J. Clin. Microbiol. 1998; 36: 3211–6.

183. Priestley C.J., Jones B. M., Dhar J., Goodwin L. What is normal vaginal flora. Genitourin. Med. 1997; 73 (1): 23–8.

184. Rawadi G., Roman-Roman S., Castedo M., Dutilleul V., Susin S., Marchetti P., Geuskens M., Kroemer G. Effects of *Mycoplasma fermentans* on the myelomonocytic lineage. Different Molecular entities with cytokine-inducing and cytocidal potential. J. Immunol. – 1996; 156 (1): 670–8.

185. Ren P., Yan X., Yang Y. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum* from aborted tissues by polymerase chain reaction technique. Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih. 1997; 32 (4): 214–6.

186. Ridgway G.L., Salman H., Robbins M.J., Dencer C., Felmingham D. The in-vitro activity of grepafloxacin against *Chlamydia spp., Mycoplasma spp., Ureaplasma urealyticum* and *Legionella spp*. J. Antimicrob. Chemother. 1997; 40 (suppl. 1): 31–4.

187. Rizzo G., Capponi A., Vlachopoulou A., Angelini E., Grassi C., Romanini C. Ultrasonographic assessment of the uterine cervix and interleukin-8 concentrations in cervical secretions predict intrauterine infection in patients with preterm labor and intact membranes. Ultrasound. Obstet. Gynecol. 1998; 12: 86–92.

188. Rosendal S. , Laber G. Identification of 38 Mycoplasma strains isolaitad from the vagina of dogs. Zbl. Bakt. Hyg. 1973; 225 (2–3): 346.

189. Ruifu Y., Minli Z., Guo Z., Wang X. Biovar diversity is reflected by variations of genes encoding urease of *Ureaplasma urealyticum.* Microbiol. Immunol. 1997; 41 (8): 625–7.

190. Runge M., Rykena S., Wildhagen K., Deicher H., Kirchhoff H. Detection of *Ureaplasma urealyticum* in urine of patients with systemic lupus erythematosus and healthy individuals by culture and polymerase chain reaction. J. Med. Microbiol. 1997; 46 (5): 413–8.

191. Senior D. F., Brown M. B. The role of Mycoplasma species and Ureaplasma species in feline lower urinary tract disease. Vet. Clin. North. Am Small Anim. Pract. 1996; 26 (2): 305–8.

192. Schaeverbeke T., Renaudin H., Clerc M., Lequen L., Vernhes J. P., De Barbeyrac B., Bannwarth B., Bebear C., Dehais J. Systematic detection of mycoplasmas by culture and polymerase chain reaction (PCR) procedures in 209 synovial fluid samples // Br. J. Rheumatol. 1997; 36: 310–4.

193. Schaeverbeke T., Bebear C. M., Clerc M., Lequen L., Bebear C., Dehais J. What is the role of mycoplasmas in human inflammatory rheumatic disorders. Rev. Rhum. Engl. Ed. 1999; 66: 23–7.

194. Schoetensack H. M. Pure cultivation of the filtrabl virus isolated from canin distemper // Kitasato Arch. Exp. Med. 1934; 11: 277.

195. Shalika S., Dugan K., Smith R. D., Padilla S. L. The effect of positive semen bacterial and Ureaplasma cultures on in-vitro fertilization success. Hum. Reprod. 1996; 11: 2789–92.

196. Stemke G.W., Robertson J.A. *Ureaplasma gallorale*, an isolate from chickens, is most closely related to the human isolate, *U. urealyticum.* Int. J. Syst. Bacteriol. 1996; 46 (4): 1183–4.

197. Switzer W. P. The genus Mycoplasma. Veterinary, Bacteriology and Virology. Iowa State University Press. 1967: 15–8.

198. Tan R. J. S., Miles J. A. R. Incidence and significance of Mycoplasmas in sick cats. Res. Vet. Sci. 1974; 16 (1): 27–34.

199. Tang F.F., Wei H., Edgar J. Further investigations on the causal agent of bovine pleuropneumania. J. Path. Bact. 1936; 42 (1): 45–51.

200. Talati A.J., Crouse D.T., English B.K., Newman C., Livingston L., Meals E. Exogenous bovine surfactant suppresses tumor necrosis factor-alpha release by murine macrophages stimulated by genital mycoplasmas. J. Infect. Dis. 1998; 178 (4): 1122–5.

201. Taylor-Robinson D., Furr P.M. Genital mycoplasma infections. Wien. Klin. Wochenschr. 1997; 109 (14-15): 578–83.

202. Taylor-Robinson D., Purcell R.H., London W.T., Sly D.L. Uretral infection of chimpanzees by *U. ureallyticum.* J. Med. Microbiol. 1978; 11: 197–201.

203. Teng L. J., Ho S. W., Ho H. N., Liaw S.J., Lai H. C., Luh K.T. Rapid detection and biovar differentiation of *Ureaplasma urealyticum* in clinical specimens by PCR. J. Formos. Med. Assoc. 1995; 94: 396–400.

204. Turner A. W. Growth-inhibition tests with Mycoplasma mycoides as a basis for chemotherapy and selective culture media // Austr. Vet. J. 1960; 36 (5): 221–224.

205. Tyagi P. Mycoplasmal antibodies as determined with an enzyme-linked immunosorbent assay, in tubal factor infertility. Indian. J. Med. Sci. 1999; 53: 481–5.

206. Vazquez F., Carreno F., Perez A. F., Cuesta M. M., Ordonez M. L., Palacio V. Comparison of 3 culture methods for genital mycoplasmas. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 1995; 13 (8): 460–3.

207. Vittecoq O., Schaeverbeke T., Favre S., Daragon A., Biga N., Cambon-Michot C., Bebear C., Le Loet X. Molecular diagnosis of *Ureaplasma urealyticum* in an immunocompetent patient with destructive reactive polyarthritis. Arthritis Rheum. 1997; 40 (11): 2084–9.

208. Walther T., Retzlaff C., Stepan H., Faber R. A simple technique to isolate DNA and supernatant of genital *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. J. Perinat. Med. 1998; 26 (2): 123–4.

209. Wang N., Zhao J.W., Xu C.Y. A study on serotypes of *U. urealyticum* isolated from different populations. Chung Hua Liu Hsing Ping Hsueh Tsa Chih. 1995; 16: 207–10.

210. Witkin S.S., Kligman I., Grifo J. A., Rosenwaks Z. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* detected by the polymerase chain reaction in the cervices of women undergoing in vitro fertilization: prevalence and consequences. J. Assist. Reprod. Genet. 1995; 12: 610–4.

211. Xia M., Pang Y., Roberts M. C. Detection of two groups of 25.2 MDa Tet M plasmids by polymerase chain reaction of the downstream region. Mol. Cell. Probes. 1995; 9: 327–32.

212. Xiang Y., Chen Q. Study on infertility caused by infections of *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum*. Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih. 1996; 31: 223–5.

213. Yoon B.H., Romero R., Park J.S., Chang J.W., Kim Y.A., Kim J.C., Kim K.S. Microbial invasion of the amniotic cavity with *Ureaplasma urealyticum* is associated with a robust host response in fetal, amniotic, and maternal compartments. Am. J. Obstet. Gynecol. 1998; 179: 1254–1260.

214. Yoon B.H., Chang J.W., Romero R. Isolation of *Ureaplasma urealyticum* from the amniotic cavity and adverse outcome in preterm labor. Obstet. Gynecol. 1998; 92: 77–82.

215. Zheng X., Lau K., Frazier M., Cassell G.H., Watson H.L. Epitope mapping of the variable repetitive region with the MB antigen of *Ureaplasma urealyticum.* Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1996; 3: 774–8.

Монография

Александр Пантелеевич Красиков,
Николай Викторович Рудаков

МИКОПЛАЗМОЗЫ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ
И ИХ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ
И ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

В авторской редакции

Подписано в печать 19.12.2015
Формат 60x84/16. Бумага писчая.
Оперативный способ печати.
Усл. печ. л. 0. Тираж 100 экз. Заказ № 0

«Полиграфический центр КАН»
тел. (3812) 24-70-79, 8-904-585-98-84.
E-mail: pc_kan@mail.ru
644122, г. Омск, ул. Красный Путь, 30
Лицензия ПЛД № 58-47 от 21.04.97