

УДК: 619:579.833.1: 577.213.32:608.2

DOI: 10.17238/issn2072-2419.2021.1.24

ЭФФЕКТИВНЫЕ МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ РЕСПИРАТОРНЫХ БОЛЕЗНЕЙ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ПТИЦ

Семина А.Н. – к.в.н., вед. науч. сотр. – зав. отделом диагностики и эпизоотологического анализа ВНИВИП - филиал ФНЦ «ВНИТИП» РАН, Новикова О.Б. к.в.н., вед. науч. сотрудник – зав. отделом микробиологии ВНИВИП - филиал ФНЦ «ВНИТИП» РАН.

Ключевые слова: бактериологическое исследование, птица, молекулярно-генетические исследования, ДНК, праймеры. **Key words:** bacteriological research, poultry, molecular genetic research, DNA, primers.

РЕФЕРАТ



Бактериальные болезни имеющие аэрогенный путь распространения остаются основной трудно решаемой проблемой для многих птицеводческих хозяйств. Современные темпы технологического развития в птицеводстве в свою очередь могут приводить к различным нарушениям со стороны организма птицы. Также под воздействием внешних факторов и самого макроорганизма происходят изменения патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. В частности, приобретение ими устойчивости к действию лекарственных препаратов, изменение их вирулентных свойств приводит к тому, что в организме птицы они проявляют не характерное для них течение болезни иногда вызывают атипичное течение. В совокупности все эти факторы затрудняют постановку диагноза, что в свою очередь ведет к неправильному или не своевременному назначению лечения.

Целью наших исследований явилось определить спектр циркулирующих в птицеводческих хозяйствах возбудителей вызывающие респираторные болезни птиц. Нами были установлены наиболее часто встречаемые возбудители данных заболеваний, а также особый интерес представляло выделение их из различного биологического материала. Были исследованы образцы проб разных птицеводческих хозяйств от клинически больной птицы, павшей, а также птицы не имеющих клинических проявлений заболевания на случай выявления бактерионосительства. Исследования проводились с использованием стандартных методов, применяемых в бактериологии, а также молекулярно-генетических методов диагностики. Такой подход в использовании разных методов диагностики позволяет определить наиболее эффективные быстрые и точные методы идентификации бактериальных возбудителей респираторных болезней птиц.

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальные болезни имеющие аэрогенный путь распространения остаются основной трудно решаемой проблемой для многих птицеводческих хозяйств. В основном это связано с вопросами технологического выращивания птицы содержание их на не больших площадях при достаточно плотной посадки. Отмечено, что болезни, характеризующиеся

ассоциативным течением с проявлением респираторного синдрома, становятся серьезной проблемой для промышленного птицеводства. Чаще всего это связано с нахождением в хозяйстве сразу нескольких патогенных возбудителей и присоединения к ним условно-патогенной микрофлоры [1,2].

Не соблюдения технологических правил содержания, выращивания и кормления птиц, нарушения температурно-

влажностных режимов, скорости движения воздуха, повышение сероводорода, аммиака, углекислого газа в воздухе птичника, значительное микробное давление в производственных помещениях, несбалансированное по питательным веществам, макро-, микро-элементам и витаминам кормление, загрязнение кормов микотоксинами все это в итоге приводит к возникновению заболеваний характеризующихся проявлениями респираторного синдрома. Также следует учитывать тот факт, что в организме птицы может происходить накопление сразу нескольких микотоксинов. Это в свою очередь может спровоцировать со стороны иммунной системы ее значительное угнетение. Очень часто хронические полимикотоксикозы протекают с нагрузкой виде респираторных бактериальных или вирусных инфекций [3].

Длительная аллергическая перестройка организма цыплят на фоне микотоксиновой интоксикации представляет серьезную потенциальную опасность ввиду глубокой нарушения функции иммунной системы, и, как следствие, непредсказуемых результатов проводимых вакцинаций, высокой вероятности вспышек бактериальных болезней, вызванных условно-патогенной микрофлорой (гемофилез, колибактериоз, пастереллез и др.) [4].

Многие исследователи отмечают, что наличие в хозяйстве респираторно бактериальных инфекции зачастую определяют дальнейшее формирование иммунного статуса в организме птицы. Поэтому своевременная диагностика выявления таких заболеваний может приводить в последствии к оздоровлению поголовья и формированию у такой птицы более реактогенного иммунного ответа. В ходе наших исследований был определен метод, который позволяет идентифицировать спектр циркулирующих возбудителей респираторных болезней птиц в различных птицеводческих хозяйствах. Быстрота и точность данного метода

позволит в дальнейшем осуществлять планирование противоэпизоотологических мероприятий в хозяйствах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях использовали материал, полученный от птицы из разных птицеводств. Основная работа проводилась во ВНИВИП отделе диагностики и эпизоотологического анализа, а также в отделе микробиологии. В начале необходимо было определить наличие респираторных бактериальных возбудителей в исследуемом материале. С этой целью проводился посев исследуемых образцов на специальные питательные среды для получения изолированных колоний и дальнейшие их изучение с помощью бактериологической диагностики. Таким образом были получены чистые культуры таких микроорганизмов как гемофилеза, колибактериоза, пастереллеза и др. являющихся зачастую возбудителями респираторных болезней птиц. Всего было про исследовано 86 образцов, полученных из различных органов больной и павшей птицы, а также 12 образцов от клинически здоровой птицы на выявление бактерионосительства.

Следующим этапом наших исследований было определить с помощью молекулярно-генетических методов данных возбудителей в исследуемых образцах. Существует множество методов типирования микроорганизмов. В настоящее время доказано, что методы, основанные на полиморфизме геномной ДНК (генотипирование), являются наиболее чувствительными и воспроизводимыми. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - метод молекулярной диагностики, ставший для многих инфекций «золотым стандартом», проверен временем и тщательно апробирован клинически. Высокая чувствительность и специфичность метода позволяют гарантированно обнаруживать единичные возбудители в биологическом материале на основе их генетической информации. Аналитическая чувствительность ПЦР для большинства вирусов и бактерий составляет 1000 микроорганизмов в 1 мл пробы. Специфичность ПЦР для вирусных, хламидийных, микоплазменных и большинства других бактериальных инфекций достигает 100%.

С целью обнаружения ДНК в клиническом материале использовался комплект

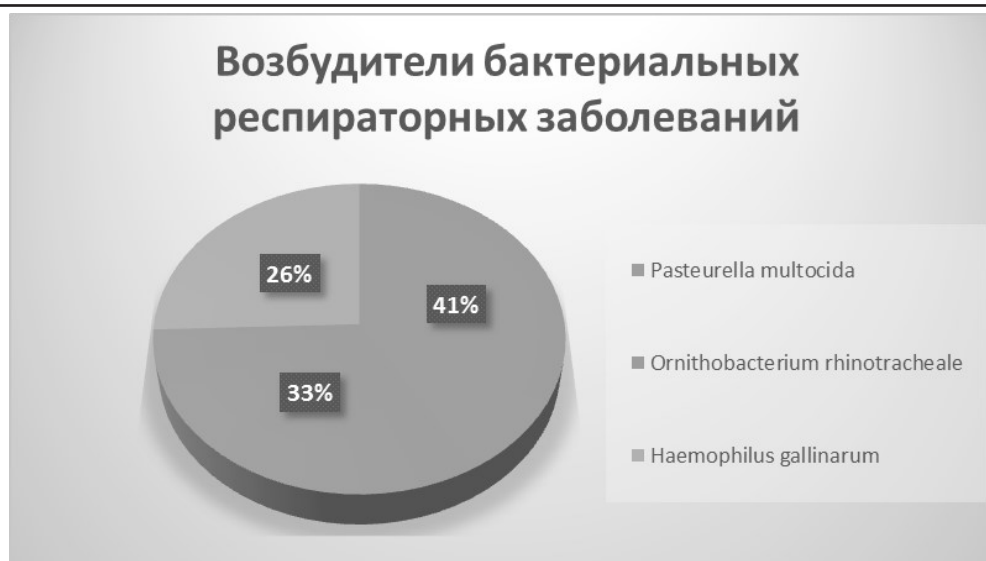


Рис 1. Процент выделения культур при бактериологических исследованиях материала от птицы.

реагентов для выделения нуклеиновых кислот. Одним из важных этапов в проведении ПЦР является правильно подобранные праймеры для реакции, поэтому особо внимание в наших исследованиях уделялось именно этому процессу. Нами была разработана методология подбора уникальных образцов олигонуклеотидных последовательностей праймеров для ряда бактериальных респираторных заболеваний птиц. За основу моделирования праймеров под каждого выделенного возбудителя взяты нуклеотидные последовательности генов из базы данных Genbank, с использованием пакета компьютерных программ Vector, проведено попарное сравнение последовательности нуклеотидов между собой для определения наиболее варибельных и консервативных участков генома. Чувствительность и достоверность данного метода зависят от таких параметров как температурный режим и время амплификации каждого цикла реакции. Данные параметры подбирались экспериментальным путем для каждой пары нуклеотидных последовательностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе бактериологических исследо-

ваний в изучаемых образцах были выявлены наиболее часто встречающиеся возбудители респираторных бактериальных инфекций у птиц. Чаще всего в исследуемом материале выделяли *Pasteurella multocida* процент ее составил около 41%, следующий за ней был возбудитель *Ornithobacterium rhinotracheale* – около 33% и *Haemophilus gallinarum* – 26% (рисунок 1).

Необходимо отметить, что в большинстве случаев наблюдалось выделение данных возбудителей из исследуемого материала в сочетании друг с другом.

На этапе молекулярно-генетических исследований были подобраны праймеры для каждого вида выделенного возбудителя (таблица 1).

Данные образцы праймеров были в дальнейшем синтезированы с помощью синтезатора Applied Biosystems ABI 3900, который отличается высоким качеством синтеза полученные олигонуклеотиды не нуждаются в дополнительной очистке на ПААГ. Синтезированные праймеры использовались в ПЦР в рабочей концентрации 10 пмоль.

ПЦР исследования проводились с подбором разных температурных режимов. Вы-

Таблица 1

Подобранные праймеры для исследований

Ген	Последовательность	Положение в геноме	Размер ампл.уч.п.н
IpsA	5'-ATAACGTCCTCCGCTACACC-3' 5'-TGTGCCGAACCTTGCTACTGCT-3'	123 - 576	352
orf B	5'-CACCATATAGACCACGGAAC-3' 5'-ATGTGGAAAATCTCACATGTACC-3'	67-876	510
pm62	5'-TGAGAACTCAAGAGTCAGAATGT-3' 5'-GCCATGAGCCTGTTCCATA-3'	345 - 1267	289

Таблица 2

Состав реакционной смеси с праймерами

Компонент	Объем на один образец
Готовая смесь для ПЦР ScreenMix	10 мкл
Прямой праймер	1 мкл
Обратный праймер	1 мкл
Деионизированная вода	8 мкл
ДНК	5 мкл

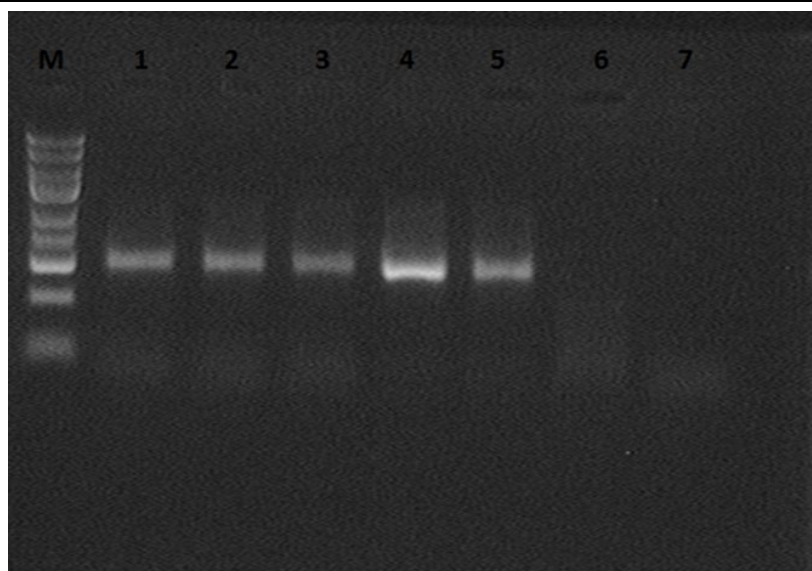


Рис 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР с использованием праймеров *orf B*. М - Маркер молекулярного веса с фрагментами ДНК известных размеров: 100, 300, 500 и т.д пар нуклеотидов (п.н.); 1-7 – исследуемые образцы.

бор температуры для этапов амплификации во многом зависит от праймеров используемых в реакции в большей степени от сочетаний в них таких последовательностей в основаниях как GC. Учитывая данную особенность опытным путем нами был определен следующий температурный режим:

пре-денатурация: 3 мин, 95°C (1 цикл)
денатурация: 10 с, 95°C
отжиг: 20 с, 58°C
синтез: 17 с, 70°C

C
35 циклов

Использовали реакционную смесь на 25 мкл в составе представленной в таблица 2.

Результаты исследования после амплификации с праймерами orfB показали, что в положительных образцах образуются полосы размером от 500 пар нуклеотидов, что соответствует обнаружению в данном образце возбудителя *Ornithobacterium rhinotracheale* (рисунок 2).

Праймеры IpsA, pm62 также показали свою специфичность выявлении соответствующих возбудителей *Pasteurella multocida* и *Haemophilus gallinarum*, в исследуемых образцах.

ВЫВОДЫ

Совокупность используемых в наших исследования методов обнаружения возбудителей респираторных бактериальных заболеваний птиц показали, что данные возбудители продолжают оставаться нерешенной проблемой для многих птицеводческих хозяйств. Для их выявления необходимы эффективные методы диагностики. Одним из таких методов может быть молекулярно-генетический метод ПЦР диагностики. Использование данного метода со специфически подобранными праймерами позволяет достоверно и в короткие сроки диагностировать возбудителей респираторных бактериальных заболеваний. Это в дальнейшем определяет правильность и своевременность проведения оздоровительных мероприятий в хозяйствах, направленных на ликвидацию данных возбудителей.

Статья написана по госзаданию 0599-2019-0025.

Effective methods for detecting respiratory pathogens in the biological material of birds. Semina A.N. – PhD of vet.scie, leading researcher, "AllRussian Research

Veterinary Institute of Poultry Science" - Branch FNTS "VNITIP" RAS (VNIVIP), Novikova B.K. - PhD of vet.scie, leading researcher, "AllRussian Research Veterinary Institute of Poultry Science" - Branch FNTS "VNITIP" RAS (VNIVIP).

ABSTRACT

Bacterial diseases with an aerogenic path of spread remain the main difficult problem for many poultry farms. Modern rates of technological development in poultry farming, in turn, can lead to various disorders on the part of the bird's body. In addition, under the influence of external factors and the macro organism itself, changes in pathogenic and opportunistic microorganisms occur. In particular, the acquisition of their resistance to the action of drugs, changes in their virulent properties lead to the fact that in the body of birds they show a course of disease that is not characteristic of them, sometimes cause an atypical course. Together, all these factors make it difficult to make a diagnosis, which in turn leads to incorrect or not timely treatment.

The aim of our research was to determine the spectrum of pathogens circulating in poultry farms that cause respiratory diseases of birds. We have identified the most common pathogens of these diseases, and their isolation from various biological materials was of particular interest. Samples of samples from different poultry farms from clinically ill birds, fallen birds, as well as birds that do not have clinical manifestations of the disease were examined in case of detection of bacteriocarriage. The studies were conducted using standard methods used in bacteriology, as well as molecular genetic diagnostic methods. This approach to the use of different diagnostic methods allows us to determine the most effective, fast and accurate methods for identifying bacterial pathogens of respiratory diseases in birds.

ЛИТЕРАТУРА

1.Новикова О.Б. Микрофлора, выделяемая в птицеводствах различного технологического направления и контроль бактериальных болезней птиц / Новикова О.Б., Павлова М.А. // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветерина-

рии. - 2018. - № 3. - С. 34-36.

2.Новикова О.Б. Респираторный синдром бактериальной этиологии / Новикова О.Б., Павлова М.А. // Животноводство России. - 2019. - № 6. - С. 9-11.

3.Новикова А.Ф. Изучение орнитобактериоза птиц в экспериментальных условиях / Новикова А.Ф., Новикова О.Б., Павлова М.А., Семина А.Н., Титова Т.Г. // Эффективное животноводство. - 2019. - № 4 (152). - С. 70.

4.Терлецкий В.П., Тыщенко В.И., Новикова О.Б., Джавадов Э.Д., Шахтамиров И.Я., Адаев Н.Л. Эффективный метод идентификации штаммов *Escherichia coli*, выделенных из различных органов домашней птицы (*Gallus gallus domesticus*). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):270-276.

ИНФОРМАЦИЯ

По заявкам ветспециалистов, граждан, юридических лиц проводим консультации, семинары по организационно-правовым вопросам, касающихся содержательного и текстуального анализа нормативных правовых актов по ветеринарии, практики их использования в отношении планирования, организации, проведения, ветеринарных мероприятиях при заразных и незаразных болезнях животных и птиц.

Консультации и семинары могут быть проведены на базе Санкт-Петербургского университета ветеринарной медицины или с выездом специалистов в любой субъект России.

**Тел/факс (812) 365-69-35,
Моб. тел.: 8(911) 176-81-53, 8(911) 913-85-49,
e-mail: 3656935@gmail.com**