

Разработка методов диагностики орнитобактериоза у экзотических птиц

Назарова Е. – ст-ка 4 курса ФВМ

Руководители: Разорвина А.С., Молофеева Н.И., Васильев Д.А.

ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия»

В последние годы в различных изданиях упоминается и описывается бактерия *Ornithobacterium rhinotracheale* (ОРТ), которая рассматривается как возбудитель нового респираторного заболевания птиц – орнитобактериоза, сопровождающееся высокой смертностью, задержкой в развитии и сокращением яичного производства (Махмутова Л.Р., Макаров В.В., 2006). Многие авторы указывают на возникновение вспышек данного заболевания в основном у кур-несушек, бройлеров и индеек – домашней промышленной птицы. Но ОРТ так же изолирован у куропаток, фазанов, голубей, чаек, страусов, уток, гусей, грачей, а так же, что особенно важно у попугаев (Vandamm et al., 1994; Charlton et al., 1993; Van Empel and Hafez, 1999).

Это медленно растущая, полиморфная, грамотрицательная, имеющая форму прута, неспорообразующая бактерия rRNA суперсемейства V, в таксономическом соседстве родов *Cytophaga*, *Riemerella*, *Flavobacterium*, *Weeksella*, *Sporocytophaga* и *Carnocytophaga*. ОРТ - отдельная бактериальная разновидность, основанная на филогенетическом положении и различных генотипичных, хемотаксономических и классических фенотипичных характеристиках. В пределах этого бактериального вида существует несколько серотипов с различной вирулентностью (Bock et al., 1995; Ryll et al., 1996; Van Empel et al., 1997).

Присутствие *Ornithobacterium rhinotracheale* в промышленной и дикой птице показывает, что во всем мире есть потенциальный резервуар возбудителя. Глобальное распространение бактерии подтверждено присутствием материнских антител против ОРТ в яйце и старой птице со всех континентов. Единичные случаи данной инфекции регистрировали у попугаев в естественных условиях обитания (Hafez et al., 1993). Сложность обнаружения и изучения течения орнитобактериоза у этого вида птиц в дикой природе ставит перед многими исследователями вопрос о полном изучении механизма заражения, передачи данного агента со своевременным, быстрым и точным его выделением и идентификацией.

Точная постановка диагноза должна быть основана на выделении и опознании причинных бактерий или обнаружении антител, применяя серологические исследования. В данной статье сделан обзор текущего состояния лабораторной диагностики ОРТ

Образцы для бактериального выделения необходимо собрать на ранней стадии заболевания. ОРТ обычно выделяют из трахей, бронхиального дерева, легких и воздухоносных мешков. В сердечной крови и тканях печени культура не была обнаружена. Однако, бактерии могли быть выделены из других органов, таких как суставы и мозг, яичники и яйцеводы после экспериментального заражения (Van Empel, 1994; Bock et al., 1996).

ОРТ - бактерия трудно поддающаяся культивированию. Она растет медленно и требует специальных условий. В зараженных образцах с быстро растущими бактериями, такими как *E. coli*, *Proteus* или *Pseudomonas*, ОРТ колонии забиваются и следовательно их нельзя выявить для дальнейшего исследования. Некоторые авторы указывали, что большинство штаммов *Ornithobacterium rhinotracheale* устойчиво к гентамицину (Hafez et al., 1993; Van Empel, 1994, Back et al., 1996), в результате чего было рекомендовано использовать 10 мл гентамицина на мл кровяного агара с целью выделения ОРТ в чистую культуру без контаминации образцов.

Исследования проводились со штаммами бактерии вида *Ornithobacterium rhinotracheale* К 282 и К 33 на базе Научно-исследовательского Инновационного Центра Микробиологии и Биотехнологии, кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновской ГСХА по общепринятым микробиологическим методикам. Изучали ростовые характеристики на оптимальных питательных средах, биохимические свойства, антибиотикочувствительность, серологические реакции.

Использовали следующую схему исследования:

1. Доставка проб (транспортная среда) - 0,3% сердечно-мозговой экстракт, 0,3 % сердечно-мозговой экстракт с содержанием бриллиантового зеленого, селективного агента;
2. Среда накопления - сердечно-мозговой экстракт, бульон Хоттингера с содержанием бриллиантового зеленого (генцианвиолета), триптозо-соевый бульон (24-48 ч при 37 °С), с содержанием селективного агента;
3. Бактериоскопия;
4. Селективная среда - 48-72 ч при 37 °С;
5. Бактериоскопия → Серологические исследования (РА, РИД).
6. Биохимические тесты - биохимические тесты, используемые для идентификации ОРТ (время учета зависит от используемого теста: 1-2 мин до 48 ч при 37 °С)

Для первичного культивирования возбудителя использовали кровяной агар с 10% дефибринированной овечьей кровью. С целью оптимального культивирования ОРТ рекомендуем инкубировать на агаре в чашках Петри при 37 °С в течении 48-72 часов в анаэробных или микроаэробных условиях (5-10% CO₂). Слабый рост либо его отсутствие возникает при 24 °С. Организмы охотно растут на бульоне Хоттингера, в пептонной воде, а так же на триптозо-соевом и PPLO агаре аэробно и анаэробно. Хранение проводили в течении 6 недель в температурном режиме 6-8 °С на кровяном агаре с последующим субкультивированием культур вновь на этой же среде без каких-либо потерь микроорганизма.

На кровяном агаре через 48 часов инкубации *Ornithobacterium rhinotracheale* появляются небольшие серые или серо-белые колонии, непрозрачные, с красноватым оттенком, не гемолитические, длиной в среднем 0,6-5 мм и шириной 0,2-0,9 мм. Большинство ОРТ – колоний имеет специфический запах, схожий с запахом масляной кислоты. Бактерии

грамотрицательные, полиморфные палочки, не растут на агаре МакКонки, Дригальского, Эндо, цитрате Симмонса.

При исследовании морфологических свойств штамма *Ornithobacterium rhinotracheale* К 282 установлен рост колоний, различных по типу роста, размеру и интенсивности окрашивания. Колонии первого типа, условно обозначенные К 282 «<>» (малые) характеризуются появлением роста на твердых питательных средах в течение 36 часов, бледным молочно-белым окрашиванием и размерами колоний 1-3 мм. Колонии второго типа, условно обозначенные К 282 «>>» (большие) характеризуются появлением роста в течение 24 часов, интенсивным молочно-белым окрашиванием с ярко выраженным темным центром и размерами колоний до 4 мм. Интересно, что при культивировании представителей бактерий обеих типов колоний на твердой питательной среде в течение 24 часов обнаружен однородный рост, морфологически не различим, но по истечении 48 часов различия установить не сложно.

При разработке селективной среды проводили многочисленные исследования ростовых свойств микроорганизма на различных средах. На основании полученных результатов предположили, что в качестве селективного агента наиболее оптимально использовать фурагин и нистатин (точный объем агента на данный момент устанавливается опытным путем).

Для постановки РА и РИД в агаре (Difko) получена сыворотка от гипериммунных животных (кроликов).

Для установления видовой принадлежности использовали тесты, которые наиболее полно характеризуют ферментативные свойства бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale*. Таким образом, мы получили следующие результаты: интенсивное синие окрашивание дисков для исследования на оксидазу (HiMedia) говорит о положительной реакции на цитохромоксидазу; индол и сероводород не образуют; при добавлении метилового красного кислоту не образуют и окрашивание среды остается желтого цвета; на среде Симмонса цитрат не утилизируют; фермент ДНК-аза не деполимеризует ДНК вокруг культуры и цвет среды остается без изменений; тест окисления/ферментации отрицательный. При ферментации углеводов в «пестром ряду Гисса» производят слабое сбраживание (интенсивное синее окрашивание по ходу укола практически без изменения цвета среды) с образованием газа лактозу, глюкозу, сахарозу, мальтозу, что отражает положительную сторону проведенных тестов.

Определяли так же биохимические свойства на наборах ускоренного определения, произведенные ФГУН НИИЭМ им. Пастера Роспотребнадзора Отдел Новых Технологий. Получили следующие результаты:

1. на сероводород – черного осадка нет, результат отрицательный.
2. на орнитин – синее окрашивание, результат положительный.
3. на лизин – сине-зеленой окраски нет, результат отрицательны.
4. на аргинин - зеленого или синего окрашивания нет, результат отрицательный.
5. на уреазу – малинового окрашивания нет, результат отрицательный.

6. на индол – красное кольцо отсутствует, результат отрицательный.
7. на арабинозу – окрашивание малиновое, результат отрицательный.
8. на маннозу - окрашивание желтое, результат положительный.
9. на сахарозу - окрашивание желтое, результат положительный.
10. на глюкозу - окрашивание желтое, результат положительный.
11. на маннит - окрашивание малиновое, результат отрицательный.
12. на адонит - окрашивание малиновое, результат отрицательный.
13. на сорбит - окрашивание малиновое, результат отрицательный.
14. на лактозу - окрашивание желтое, результат положительный.

Полученные результаты идентичны проведенным предварительно исследованиям, но значительно расходятся с известными литературными данными.

Определения морфологических и фенотипических факторов на гемолитическую активность проводили на триптозо-соевом агаре (Difko) с добавлением 10 % овечьей и человеческой дефибрированной крови. Для чего культуру предварительно культивировали в течение 48ч при 37 °С на бульоне Хоттингера. При изучении гемолитической активности не зависимо от вида крови зона лизиса отсутствует.

Основываясь на полученные данные проведенных многочисленных исследований, можно заключить, что для диагностики орнитобактериоза оптимальным вариантом является использование вышеуказанной схемы. Учитывая литературные данные нельзя игнорировать попугаев, как основной экзотический вид птиц, содержащийся во многих странах мира в домашних условиях, являющихся резервуаром и латентным источником *Ornithobacterium rhinotracheale* для промышленной птицы. Следовательно, лабораторные исследования по разработке схемы выделения указанного микроорганизма для постановки бактериологического диагноза актуальны, что позволит более точно и в сжатые сроки локализовать и предотвратить возникновение и распространение орнитобактериоза в России не только через ввозимые промышленные, но и экзотические виды птиц.

Литература

1. Charlton, B.R., S. E. Channing-Santiago, A. A. Bickford, C. J. Cardona, R. P. Chin, G. L. Coopeer, R. Droual, J. S. Jeffrey, C. U. Meteyer, H. L. Shivaprasad and R. L. Walker, 1993. Preliminary characterization of a pleomorphic gram-negative rod associated with avian respiratory disease. *J. Vet. Diagnostic Invest.*, 5:47-51.
2. Hafez, H. M., W. Kruse, J. Emele and R. Sting, 1993. Eine Atemwegsinfektion bei Mastputen durch Pasteurella-ähnliche Erreger: Klinik, Diagnostik und Therapie. *Proceedings of the International Conference on Poultry Diseases, Potsdam*, p: 105 -112.
3. Hafez, H.M. and D. Schulze, 1998. Efficacy of clinical disinfectants on *Ornithobacterium rhinotracheale* in vitro: Short communication. In *Proceedings of the 1st international symposium on the turkey diseases*, Berlin. ISBN 3-930511-53-3. P:146-150.
4. Hinz, K.-H., and H.M. Hafez. Early history of *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT). *Arch. Geflügelkd.*61: 95-96, 1997.
5. Joubert, P., Higgins, R., Laperle, A., Mikaclian, I., Venne, D. And Silin, A. (1999): Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from turkeys in Quebec, Canada. *Avian Diseases*, 43:622-626.

6. Roepke, D.C., A. Back, D.P. Shaw, K.V. Nagaraja, S.J. Sprenger, and D.A. Halvorson. Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from commercial turkey flocks in the upper Midwest. *Avian Dis.* 42: 219-221. 1998.
7. Travers, A.F., 1998. Concomitant *Ornithobacterium rhinotracheale* and Newcastle disease infection in broilers in South Africa. *Avian Dis.*, 40: 488-490.
8. Van Empel, P.C.M. and Hafez, H.M. (1999): *Ornithobacterium rhinotracheale*: a revive. *Avian Pathology*, 28, 217-227.
9. Van Beek, P. (1994): *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT), clinical aspect in broilers and turkeys. Annual Meeting of the Veterinary Study Group of the EU, Amsterdam, November, 1994.
10. Vandamme P., Segers P., Vancaneyt M., van Hover K., Muters R., Homme J., Dewirst F., Paster B., Kersters K., Falsen E., Devrieze L., Bisgaard M., Hinz K-H., and Mannheim W. (1994). Description of *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov. sp. nov. isolated from the avian respiratory tract. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44: 24-37.

Эпизоотологическая ситуация некоторых гельминтозов рыб в Куйбышевском водохранилище

Вандышева М.А., Глухова П. – студентки 4 курса ФВМ

Руководитель: Померанцев Д.А.

ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия»

В последние годы территория распространения многих заболеваний рыб расширяется. Связано это как с ухудшением экологической обстановки, что ведёт к снижению общей сопротивляемости рыб болезням, так и с изменением границ ареалов различных животных-переносчиков заболеваний.

Нами проводились исследования, в части Куйбышевского водохранилища, по диагностике двух самых распространённых паразитарных заболеваний рыб – это постодиплостомоз и лигулез.

Постодиплостомоз - распространённое инвазионное заболевание, характеризующееся поражением кожи, мышц, искривлением позвоночника. Проявляется оно появлением на теле рыб черных пятен различной величины. Эти пятна образуются в результате отложения чёрного пигмента в местах локализации возбудителя болезни – метацеркарии дигенетического сосальщика *Posthodiplostomum cuticola* из семейства *Diplostomatidae*. Постодиплостомоз разных видов рыб довольно широко распространён как в естественных водоемах, в нерестово-выростных и прудовых хозяйствах, так и в аквариумах. К постодиплостомозу восприимчивы разные виды пресноводных рыб, такие как карп, сазан, лещ, плотва, амур, толстолобик, красноперка, чехонь, вобла, густера, окунь.

Лигулез – это заболевание рыб, вызываемое плероцеркоидами ремнецов из родов *Ligula*, *Digramma* и *Schistocephalus*, относящихся к семейству *Ligulidae*. Источником распространения инвазии служат рыбацкие птицы, инвазированные половозрелыми стадиями гельминта. При осмотре рыбы обращают на себя внимание вздутие брюшка, которое становится твердым, благодаря скоплению в нем плероцеркоидов лигулид. Внутренние органы больных рыб выглядят недоразвитыми. Происходит атрофия половых желез, рыба становится бесплодной. Заболеванию подвержены многие виды рыб, но преимущественно – рыбы, относящиеся к семейству карповых.