Изображение Государственного Герба Республики Казахстан

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Животные**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА РЕСПИРАТОРНОГО МИКОПЛАЗМОЗА**

**Основные положения**

**СТ РК**

*Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его утверждения*

**Комитет технического регулирования и метрологии**

**Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан**

**(Госстандарт)**

**Астана**

**Предисловие**

**1 РАЗРАБОТАН** **И ВНЕСЕН** Республиканским государственным предприятием на праве хозяйственного ведения «Казахстанский институт стандартизации и метрологии» Комитета технического регулирования и метрологии Министерство торговли и интеграции Республики Казахстан

**2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ** Приказом Председателя Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан №\_\_\_\_\_\_от \_\_\_\_20 года

**3** В настоящем стандарте реализованы нормы закона Республики Казахстан «Закон Республики Казахстан «О ветеринарии»» от 10 июля 2002 года № 339

**4 ВВЕДЕН ВЗАМЕН**

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном каталоге национальных стандартов и национальных классификаторов технико-экономической информации Республики Казахстан, а текст изменений и поправок – в периодических информационных указателях стандартов.*   
*В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в периодическом информационном указателе стандартов*

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

**Содержание**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Введение | | IV |
| 1 | Область применения | 1 |
| 2 | Обозначения и сокращения | 2 |
| 3 | Дифференциальный диагноз | 2 |
| 4  5 | Диагностические методы  Идентификация возбудителя | 3  4 |
| 5.1 | Культура | 4 |
| 5.2 | Иммунологические методы | 6 |
| 5.3 | Методы выявления нуклеиновых кислот | 8 |
| 5.4 | Электрофорез | 10 |
| 5.5 | ПЦР в реальном времени | 12 |
| 5.6  6 | ПЦР в реальном времени  Составляющие документы | 13  13 |
| 6.1 | Быстрая реакция сывороточной агглютинации | 14 |
| 6.2 | Запросы на выражение заинтересованности | 15 |
| 6.3 | Реакция торможения гемагглютинации | 16 |
| 6.4 | Контроль качества антигенов Mycoplasma gallisepticum и M. Synoviae | 16 |
| 7 | Требования к вакцинам и диагностическим биологическим препаратам | 17 |
| 8 | Схема производства и минимальные требования к вакцинам | 18 |
| 8.1 | Характеристики посева | 18 |
| 8.2 | Метод культивирования | 18 |
| 8.3 | Валидация вакцины | 19 |
| 8.4 | Метод производства | 19 |
| 8.5 | Требования для получения разрешения регулирующих органов | 21 |
| Библиография | | 22 |
|  |  |  |

**Введение**

Mycoplasma gallisepticum (MG) и M. synoviae (MS) принадлежат к классу Mollicutes, отряд Mycoplamatales, семейство Mycoplamataceae. Однако следует отметить, что M. meleagridis и M. iowae могут также вызывать болезнь домашней птицы, но MG и MS считаются наиболее значимыми из патогенных микоплазм, и обе возникают повсеместно в мире.

Инфекция MG наиболее значима у кур и индеек, будучи причиной респираторной болезни и снижения мясной массы и яйценоскости [1]. Она также может вызывать заболевания верхних дыхательных путей у диких птиц. Некоторые штаммы MG были признаны в Северной Америке на домовых вьюрках, как причина конъюнктивита с важными последствиями для популяций диких птиц, такими как неспособность, найти пищу, голодание или смерть, но они не являются патогенными для домашней птицы. Среди домашней птицы, инфекция распространяется вертикально через зараженные яйца и горизонтально при тесном контакте; нуклеиновая кислота MG была идентифицирована в образцах окружающей среды. Недавно было показано, что MG и MS могут выживать до 9 дней в синтетических волокнах, но меньше в человеческих волосах [2], что свидетельствует о предрасположенности этих микоплазм к прикреплению к поверхностям. Другие способы распространения описаны намного меньше.

Клинические признаки MG у инфицированной домашней птицы могут варьироваться от явных респираторных признаков, включая острый ринит, конъюнктивит, кашель и чихание. Могут наблюдаться выделения из носа, хрипы и дыхание через приоткрытый клюв. Односторонний или двусторонний синусит также может быть характерным признаком, особенно у индеек и диких птиц, а подглазные пазухи могут быть настолько воспалены, что глаза закрываются. Конъюнктивит с пенистыми выделениями из глаз также является распространенным признаком у индеек и диких птиц, а иногда и у кур. У индеек часто наблюдаются загрязнения перьев крыльев в результате попыток удалить выделения из глаз. У инфицированных чечевиц в дополнение к конъюнктивиту могут наблюдаться выделения из глаз и носа, воспаленные веки.

Mycoplasma gallisepticum может быть ассоциирована с острой респираторной болезнью кур и индеек, особенно молодых птиц, причем индейки более восприимчивы. Тяжесть болезни в большой степени зависит от степени вторичной инфекции такими вирусами, как вирус болезни Ньюкасла и вирус инфекционного бронхита и/или бактериями, такими как Escherichia coli. У индеек наблюдается синергия с инфекцией пневмовирусом птиц. Может проявиться более хроническая форма болезни, которая может привести к снижению яйценоскости у племенной птицы и несушек.

Поражения дыхательных путей вначале проявляются в виде избыточного слизистого экссудата, затем катарального и казеозного экссудата, который может образовывать аморфные массы в воздушных мешках. У индеек и диких птиц опухшие инфраорбитальные пазухи содержат мукоидный или казеозный экссудат.

MS может быть связан у кур с инфекционным синовитом; у птиц могут наблюдаться бледные гребни, хромота и замедленный рост. Вокруг суставов могут возникать припухлости. Обычно наблюдается зеленоватый помет, содержащий большое количество уратов. Суставы могут содержать вязкий экссудат кремового или серого цвета в суставе и вдоль сухожильных влагалищ, наряду с гепатоспленомегалией и пятнистыми опухшими почками [3]. Респираторные признаки и поражения схожи с теми, что наблюдаются при MG, за исключением того, что они обычно более мягкие, и, как и при MG, наблюдается синергический эффект с другими респираторными агентами. Штаммы MS демонстрируют значительную изменчивость в отношении их вирулентности и тканевого тропизма [4]; [5]; [6]. Недавно в Европе [7]; [8]; [9], а затем и во всем мире появилась информация о новой клинической форме, приводящей к большому разрушению скорлупы и низкой яйценоскости у кур-несушек. Поражения ограничиваются вершиной скорлупы и представляют собой грубые темные участки диаметром 2 см с четкими краями; кроме того, отмечается снижение яйценоскости [4]; [7].

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Животные**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА РЕСПИРАТОРНОГО МИКОПЛАЗМОЗА**

**Основные положения**

**Дата введения \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

**1 Область применения**

Настоящий стандарт устанавливает требования к проведению лабораторной диагностики респираторного микоплазмоза.

Микоплазмоз птиц вызывается несколькими патогенными микроорганизмами, среди которых Mycoplasma gallisepticum (MG) и M. synoviae (MS) являются наиболее значимыми; MG вызывает хроническое респираторное заболевание домашней птицы, особенно когда стада находятся в состоянии стресса и/или присутствуют другие респираторные патогены. Болезнь характеризуется острым насморком, конъюнктивитом, чиханием и синуситом, особенно у индеек и диких птиц. Это может привести к значительным производственным потерям и снижению качества птицы мясного типа, а также к потере яйценоскости. MS может вызывать респираторные заболевания, синовит, изменение скорлупы яиц, потерю яйценоскости и ухудшение качества туши или может привести к скрытой инфекции. Штаммы MG и MS различаются по инфекционности и вирулентности, и иногда инфекция может быть бессимптомной.

Идентификация возбудителя: MG и MS можно идентифицировать иммунологическими методами после выделения из среды для выделения микоплазм или посредством выявления их ДНК в полевых образцах или культурах.

Образцы для выделения могут представлять собой мазки органов или тканей, выделения, разведенные гомогенаты ткани, аспираты из инфраорбитальных пазух или суставных полостей, или материалы из яичного желтка или эмбрионов. Клинические признаки и поражения обуславливают выбор образцы. Бульон и агар в сочетании с основными биохимическими тестами используются для выделения и первого распознавания Mycoplasma, но идентификация рода и вида осуществляется с помощью иммунологических тестов (например, флуоресцентных антител или иммунопероксидазных тестов) и/или биомолекулярных тестов.

Методы выявления ДНК на основе полимеразной цепной реакции используются в специализированных лабораториях.

Серологические тесты: Некоторые серологические тесты используются для выявления антител к MG и MS, но вследствие различий специфичности и чувствительности, они рекомендуются для проведения скрининга стад, а не для тестирования отдельных особей.

Наиболее часто используется экспресс-реакция сывороточной агглютинации (РСА), твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) и реакция торможения гемагглютинации (РТГ). При РСА, сыворотки смешивают с серийными окрашенными антигенами, и сыворотки, которые вступают в реакцию через 2 минуты, нагревают при температуре 56 °С в течение 30 минут и повторно тестируют. Сыворотки, которые все еще реагируют, особенно в разведении, считаются положительными, и для подтверждения их тестируют либо посредством ИФА, либо в РТГ. В продаже имеются несколько коммерческих ИФА наборов для выявления антител к MG и MS.

Требования к вакцинам: Несмотря на то, что предпочтительным методом контроля является сохранение стад, свободных от Mycoplasma gallisepticum и Mycoplasma synoviae, для цыплят используется как живая, так и инактивированная вакцина. Вакцинацию следует рассматривать только в особых случаях на основании эпидемиологической ситуации в данной местности или в хозяйствах, где заражение неизбежно. Обычно вакцины используются для предотвращения потерь при производстве яиц у коммерческих несушек, хотя вакцины могут также использоваться для снижения передачи яиц племенному поголовью или для помощи в уничтожении MG на разновозрастных участках. Важно провести вакцинацию до заражения в полевых условиях.

Имеющиеся вакцины против Mycoplasma gallisepticum производятся из штамма F и, в последнее время, из штаммов ts-11 и 6/85, которые являются апатогенными штаммами с улучшенными характеристиками безопасности. Введение штамма F интраназально или посредством закапывания в глаза предпочтительно, но возможно также аэрозольное введение или введение с питьевой водой. Метод закапывания в глаза рекомендуется в случае ts-11, а тонкое распыление для 6/85. Молодняк обычно вакцинируют в возрасте от 12 до 16 недель. Одной дозы достаточно, и вакцинированные птицы остаются постоянными переносчиками. Длительное использование штамма F в местах содержания разновозрастной птицы приводит к вытеснению полевых штаммов. Штамм ts-11 успешно используется для искоренения штамма F у коммерческих несушек различного возраста. За последние несколько лет, в нескольких странах были лицензированы две живые вакцины против MS, произведенные из штамма MS-H и MS1. Для штамма MS-H рекомендуется использовать глазные капли, а для MS1 - мелкодисперсный аэрозоль. Птицы должны быть вакцинированы к 5 - недельному возрасту. Изучаются новые кандидаты в вакцины против MG, некоторые из них представляют собой аттенуированные штаммы, а другие основаны на технологии вектор-вирусов.

Инактивированные вакцины, состоящие из концентрированной суспензии организмов MG или MS в масляной эмульсии, лицензированы в нескольких странах. Их следует вводить парентерально цыплятам в возрасте 12 - 16 недель. Желательно вводить две дозы. Бактерины MG эффективны для предотвращения потерь яйценоскости и респираторных заболеваний, но они не предотвращают заражение MG дикого типа. Инактивированная вакцина против MS не используется повсеместно.

**2 Обозначения и сокращения**

В настоящем стандарте применены следующие обозначения и сокращения

ПЦР - полимеразная цепная реакция;

ДГГЭ - денатурирующий градиентный гель-электрофорез;

РТГ - ингибирование гемагглютинации;

РСА - реакция сывороточной агглютинации;

ИФА - иммуноферментный анализ.

**3. Дифференциальный диагноз**

Болезнь MG или MS у кур может внешне напоминать респираторное заболевание, вызванное другими патогенами, такими как легкие штаммы вируса болезни Ньюкасла [10], и вирус инфекционного бронхита птиц [11]. Они также могут присутствовать при смешанных инфекциях с MG или MS. Также следует исключить инфекции Avibacterium paragallinarum и Pasteurella multocida. У бройлеров коинфекция птичьим метапневмовирусом и кE. coliможет проявлять сходные черты. MG у индеек можно спутать с птичьей метапневмовирусной инфекцией, а наличие синусита может также свидетельствовать об инфекции Bordetella avium, Pasteurella multocida, Chlamydia [12], или MS. Инфекционный синовит, вызванный MS, следует дифференцировать от инфекций суставов, вызванных Staphylococcus aureus, Riemerella anatipestifer, Ornithobacterium rhinotracheale и Enterococcus, а у кур - от инфекционного теносиновита, вызванного птичьими ортореовирусами.

**4 Диагностические методы**

Наличие MG или MS может быть подтверждено путем выделения организма в бесклеточной среде или путем обнаружения его ДНК непосредственно в инфицированных тканях или образцах мазков. Серологические тесты также широко используются для диагностики. Когда результаты неоднозначны, птиц обычно отбирают повторно.

**Таблица 1 - Методы испытаний для диагностики микоплазмоза птиц (Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae) и их цель**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Метод | Цель | | | | | |
| Отсутствие инфекции в популяции | Отсутствие инфекции у отдельных животных до переме-щения | Содействие политике искоренения | Подтвер-ждение клиничес-ких случаев | Прева-лентность инфекции - надзор | Иммунный статус у отдельных животных или популяций после вакцинации |

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Идентификация возбудителя[[1]](#footnote-1) | | | | | | |
| Выделение на культуральных средах | +a | - | + | + | - | - |
| Обычная ПЦР | ++a | ++a | ++ | +++ | ++ | - |
| ПЦР в реальном времени | +++a | +++a | +++ | +++ | +++ | - |
| ПЦР-ДГГЭ b | + | - | + | + | - | - |
| Определение иммунной реакции | | | | | | |
| РТГ | ++c | - | + | ++e | ++ | + |
| РСА | +d | - | + | +e | + | + |
| ИФА | ++c | - | ++ | ++e | ++ | ++f |
| Условные обозначения:  +++ - рекомендуется;  ++ - рекомендуется, но имеет ограничения;  + - подходит в очень ограниченных случаях;  – - не соответствует;  a - не подходит для однодневных птиц;  b - применяется в питательной среде изолированными колониями;  c - подходит для обеспечения отсутствия инфекций давностью более 2 - 3 недель;  d - подходит для обеспечения отсутствия инфекций более 5 - 8 дней;  e - подходит при условии, что можно проанализировать парные образцы, собранные с интервалом в несколько недель;  f - подходит только для группы, вакцинированной убитой вакциной, штаммом F и вакцинами, чувствительными к температуре. | | | | | | |

**5 Идентификация возбудителя**

**5.1 Культура**

Образцы отбираются от живой птицы, свежих тушек или тушек птицы, замороженной в свежем состоянии. Мазок из трахеи считается лучшим образцом у живых животных для выявления большинства видов микоплазм. Кроме того, в целях выделения можно собирать мазки из хоанальной расщелины. При наличии мертвых птиц выделение микоплазм может быть проведено с помощью мазков из различных тканей или органов, таких как верхняя и/или средняя трахея, легкие, воздушные мешки, яйцевод и суставы.

Мазки из желточного мешка следует собирать в последней трети периода инкубации яиц, когда наблюдается снижение выводимости эмбриональных яиц (т.е. после 15-го и   
20-го дня инкубации у кур и индеек, соответственно).

Образцы могут быть взяты с внутренней поверхности вителлиновой мембраны, а также из ротоглотки и воздушных мешков эмбриона.

Все образцы должны быть исследованы, как можно скорее после сбора. При необходимости транспортировки, собранные мазки следует энергично перемешать в   
1 -2 мл микоплазменного бульона и затем выбросить; ткани или органы следует заморозить. Следует использовать пакет со льдом или какое-либо другое средство охлаждения, поскольку MG и MS быстро погибают при комнатной температуре. Серийные разведения образца в бульоне для микоплазм может быть полезным, т.к. присутствие специфичных антител или антибиотиков, или ингибирующих веществ в тканях, может тормозить рост микоплазмы.

Для поддержания роста птичьей микоплазмы было разработано несколько подходящих культуральных сред; кроме того, имеется несколько коммерческих сред.

Среды для выращивания микоплазм обычно содержат белковый гидролизат и мясной экстракт, дополненные сывороткой или сывороточной фракцией, дрожжевыми факторами, глюкозными или бактериальными ингибиторами. Важно чтобы каждая новая партия среды исследовалась с помощью свежевыделенных культур MG низкого пассажа in vitro, т.к. некоторые компоненты, особенно дрожжевой экстракт и сыворотка, могут отличаться своими способностями поддерживать рост.

Среда, разработанная Frey et al. широко используется в Соединенных Штатах Америки (США) и других странах для выделения MG и MS [13]. Никотинамидадениндинуклеотид (НАД) обязателен для роста при первичном выделении MS, но он не обязателен для среды для культивирования MG.

Следующие бульонная и агаровая среды также подходят:

1. Часть А: Бульонная основа для плевропневмоноподобных организмов (PPLO) без кристаллического фиолетового (14,7 г); дистиллированная или деионизированная вода (700 мл).
2. Часть В: Сыворотка крови свиней (нагретая при температуре 56 °С в течение   
   1 часа) (150 мл): 25 % (вес/объем) свежего дрожжевого экстракта (100 мл); 10 % (вес/объем) раствора глюкозы (10 мл); 5 % (вес/объем) ацетата талия (10 мл); 200 000 международных единиц (МЕ)/мл пенициллина G (5 мл); и 0,1 % (вес/объем) раствора фенолового красного (20 мл). Ацетат талия может быть токсичным для людей, и при его использовании следует соблюдать меры предосторожности. Уровень рН доводится до 7.8. Сыворотка крови свиней можно заменить сывороткой крови лошадей, но важно убедиться, что она поддерживает рост MG. Для первичного выделения MS в эту среду также добавляют смесь 10 % (в/в) раствора NAD (1 мл) и 10 % (в/в) раствора цистеина   
   (1 мл).

Часть А автоклавируется при 121 °C, при давлении 1 атмосфера в течение 15 минут и после охлаждения добавляется к части В, которая ранее была стерилизована путем фильтрации.

Для получения соответствующей твердой среды, 10 г очищенного агара, поддерживающего рост микроплазмы, добавляют к части А выше. Смесь автоклавируют как и прежде и выдерживают на водяной бане при температуре 56 °С. Составляющие части В, за исключением феноловго красного, смешивают отдельно и затем инкубируют при температуре 56 °С. Части А и В аккуратно смешивают, избегая образования пузырьков воздуха, и помещают на 50 мм планшеты по 7-9 мл/планшет. Избыточную поверхностную влагу можно удалить посредством кратковременного инкубирования при температуре 37 °С. Планшеты хранят в герметичном контейнере при температуре около   
4 °С в течение 2 недель.

Свежий дрожжевой экстракт имеется в продаже, хотя предпочтительно приготавливать его «на месте» посредством разведения активных сухих пекарских дрожжей (250 г) в дистиллированной воде (1 литр). Смесь нагревают до кипения, охлаждают и затем центрифугируют в течение 20 минут при 3000 g. Надосадочную жидкость отфильтровывают и доводят рН до уровня 8,0 посредством 0,1 М NaOH. Смесь очищают посредством центрифугирования или фильтрации, а затем стерилизуют посредством фильтрации. Экстракт хранят при температуре -20 °C. Глюкозу для реактивов (10 г) растворяют в дистиллированной или деионизированной воде (100 мл) и доводят до рН 7,8 - 8,0 с помощью 0,1 м NaOH. Стерилизуют посредством фильтрации и хранят при температуре 4 °С. Ацетат таллия для реагентов растворяют (5 г) в дистиллированной или деионизированной воде (100 мл), стерилизуют фильтром и хранят при температуре -20 °C. Раствор пенициллина (106 МЕ бензилпенициллина в 5 мл дистиллированной воды) хранится при температуре 4 °C и имеет срок годности одну неделю. Для выделения из очень контаминированных образцов, концентрацию пенициллина можно увеличить до 2000 ед/мл или вместо пенициллина можно использовать 0,5 - 1,0 мг/мл амипициллина. Феноловый красный (0,1 г) измельчают в   
0,1 М NaOH (2,8 мл), а затем доводят до 100 мл дистиллированной водой и автоклавируют при температуре 115 °С при 1 атмосфере в течение 30 минут. Хранят при температуре   
4 °С

Примечание - Ацетат талия высокотоксичен, и при подготовке базового раствора следует соблюдать осторожность.

Образцы инокулируют на агар с микоплазмой и в бульон. При выявлении медленно растущих колоний микоплазм, которые могут зарасти сапрофитами в бульоне, может содействовать твердая среда. Для успешного выделения может возникнуть необходимость провести серийные разведения до 10 – 3. Инокулированные планшеты инкубируют при температуре 37 °C в герметичных контейнерах. Сообщается, что повышенная влажность и давление CO2 в атмосфере усиливают рост; этих условий можно достигнуть при помещении влажной бумаги или ваты, а также посредством обработки контейнера   
5 – 10 % CO2 в азоте, посредством помещения зажженной свечи в контейнер или при использовании CO2 инкубатора или подходящей газогенерирующей системы.

Крышки контейнеров с жидкой средой необходимо герметично закрыть перед инкубированием при температуре 37 °C во избежание нетипичных изменений уровня pH. В течение первых нескольких дней планшеты ежедневно исследуют на наличие колоний с помощью стереоскопического микроскопа; после этого их исследуют реже. Культуры из полевого материала не следует считать отрицательными ранее, чем через 20 дней.

Бульонные культуры следует исследовать ежедневно на предмет изменения цвета и/или помутнения. Большинство микоплазм, включая MG и MS, метаболизируют сахар, выделяя кислоту, что приводит к изменению pH среды с красного/оранжевого на желтый. Другие микоплазмы, гидролизуют аргинин, создавая щелочные условия, что приводит к изменению pH и, соответственно, цвета бульона от красного/оранжевого до насыщенного красного или цвета фуксии. Любой наблюдаемый рост в бульоне немедленно субкультивируется на твердую среду. Если через 7 - 14 дней цвет не изменился, бульон следует субкультивировать на твердую среду. Это необходимо сделать потому, что присутствие аргинин-гидролизующего (продуцирующего щелочь) вида микоплазмы может маскировать кислотное изменение цвета, производимое MG или MS, или потому, что могут существовать штаммы микоплазмы с менее активным метаболизмом.

Колонии микоплазмы на твердой среде обычно можно распознать, хотя они и не имеют типичного вида «жареного яйца». Бактериальные колонии могут появиться при первом пассаже, но они зачастую более пигментированные и не подлежат пассированию на средах с микоплазмами.

Биохимические реакции (например, ферментация глюкозы и неспособность гидролизировать аргинин) могут способствовать идентификации, но они неспецифичны для MG или MS и требуют очистки культуры клонированием.

Для идентификации изолятов микоплазмы можно использовать иммунологические методы и методы обнаружения ДНК. Они включают непрямой метод флуоресцирующих антител (НМФА) и иммунопероксидазные методы (ИП), которые являются простыми, чувствительными, специфичными и легкими в постановке; реакцию подавления роста (РПР); и реакцию подавления метаболизма (РПМ). Очищенные культуры (произведенные одной колонией) требуются для тестов РПР и РПМ, но не для тестов НМФА или ИП. НМФА и ИП могут выявить присутствие более чем одного вида микоплазм, поскольку реагировать будут только колонии, специфичные для антисыворотки. Однако в некоторых странах M. imitans, вид микоплазмы, серологически и биохимически сходный с MG, был выделен от уток, гусей, а иногда и от других видов птиц, не являющихся домашними. Ее можно отличить от MG с помощью специфических биомолекулярных методов. В качестве альтернативы, колонии изолята можно исследовать посредством иммунофлуоресценции, параллельно используя серийные разведения антисыворотки MG и M. imitans. Гомологичные антисыворотки должны иметь значительно более высокий титр.

Методы обнаружения ДНК для идентификации MG или MS непосредственно в тканях или для идентификации лабораторных изолятов обсуждаются ниже и обычно основаны на полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В некоторых условиях, когда результаты вышеуказанных методов неубедительны, может быть целесообразной инокуляция куриных эмбрионов или биопробы. Однако эти методы трудоемки и дорогостоящи, и их все больше замещают методы ПЦР, хотя они и остаются полезным научно-исследовательским инструментом. Образцы, необходимые для инокуляции куриных эмбрионов, – те же, что и используемые для искусственных сред. Их готовят в бульоне без ацетата таллия, инкубируют в течение 30 - 60 минут при температуре 37 °C, и затем аликвоты 0,05 – 0,1 мл инокулируют в желточный мешок нескольких 6 - 8 - дневных куриных эмбрионов, полученных из свободных от микоплазм стад. Яйца ежедневно овоскопируют и отбраковывают эмбрионов, погибших в течение   
24 часов после инокуляции. Всех погибших впоследствии эмбрионов хранят в холодильнике до культивирования, а выживших по истечении 5 дней помещают на 4 часа в температурные условия 4 °C для умерщвления и снижения геморрагий при вскрытии. Желток разводят в бульоне и добавляют к агару. Липиды желтка стремятся затемнить колонии, поэтому важно наносить желток тонкими штрихами, или предпочтительно сначала развести его в бульоне для культивирования микоплазм.

**5.2 Иммунологические методы**

Процедуры иммунофлуоресценции и ИП для диагностики обычно применяются к подозрительным изолятам, а не непосредственно к инфицированным экссудатам или тканям. Это связано с тем, что организмы слишком малы для окончательного распознавания под световым микроскопом, а также с тем, что соответствующие отрицательные и положительные контрольные образцы вряд ли будут легко доступны.

Рекомендуемая методика для теста НМФА [14], требует агаровой культуры неизвестного изолята, состоящей из множества небольших дискретных колоний, известной культуры MG или MS в качестве положительного контроля и культуры другого вида микоплазм, такого как M. gallinaceum или M. gallinarum в качестве отрицательного контроля. Также необходима поликлональная кроличья антисыворотка против MG или MS, нормальная кроличья сыворотка и флуорохромконъюгированная сыворотка с антикроличьим иммуноглобулином. Сыворотки можно готовить на других животных помимо кроликов, но не следует использовать мониклональные антитела (МАт), т.к. MG или MS демонстрирует разнообразный уровень экспрессии поверхностных эпитопов, и Мат могут не распознать организм. Подходящие рабочие разведения в стерильном фосфатно-буферном растворе (ФБР; 0,01 M, pH 7.2) сыворотки антител к MG или MS и конъюгата впервые определяют посредством перекрестного титрования, и их выбирают для использования при двухкратном-четырехкратном разведении, меньшем чем фактические конечные точки. Данные процедуры применяют в отношении колоний подлежащих определению микоплазм, предварительно выращенных в чашках с агаром, как указано ниже.

1. Содержимое чашек с агаром и колониями нарезают блоками, размером около   
   1,0 × 0,5 см и помещают на маркированные предметные стекла колониями кверху.
2. Для обеспечения последующей ориентации нижний правый угол блоков срезают. Один блок с неизвестным изолятом, блок с известной культурой MG, блок с известной культурой MS и блок с отличной, но известной культурой микоплазмы помещают на одно предметное стекло. Блок с неизвестным изолятом помещают на другое предметное стекло.
3. На поверхность каждого блока на первом предметном стекле, добавляют каплю походящего разведения антисыворотки MG (или MS), на блок на втором предметном стекле добавляют нормальную кроличью антисыворотку.
4. Все блоки инкубируют во влажной атмосфере при комнатной температуре в течение 30 минут.
5. Каждый блок помещают в маркированную пробирку с ФБР, pH 7,2, и в течение 10 минут промывают в ротационном смесителе, затем аналогичным образом снова промывают и в итоге возвращают блоки на первоначальные предметные стекла микроскопа.
6. Промакивают излишнюю влагу с боков блоков. Добавляют одну каплю конъюгата на каждый блок и инкубируют и промывают как раньше.
7. Блоки возвращают на первоначальные предметные стекла и исследуют колонии под падающим светом с использованием флуоресцентной микроскопии.

Интерпретация результатов субъективна и требует определенного опыта; сравнение с контролем должно давать правильные реакции и имеет важное значение.

Некоторые лаборатории применяют флуоресцеин-конъюгированные антисыворотки в ходе использования прямой реакции имуннофлуоресценции (ПИФ). Метод, широко используемый при ПИФ, включает последовательное применение реактивов в цилиндрах из нержавеющей стали, которые помещают в чашки с агаром с оригинальными микоплазмами. Несмотря на то, что данный метод быстр и прост в применении, полученные результаты менее специфичны, чем при использовании непрямого метода, который, вследствие этого, более предпочтителен.

**5.2.1 Непрямой иммунопероксидазный/иммуносвязывающий**

Непрямой ИП-тест проводится по тому же принципу, что и НМФА тест, за исключением того, что связывание специфических антител с колониями in situ определяется путем добавления антирабитового иммуноглобулина, конъюгированного с ферментом пероксидазой. Затем положительную реакцию развивают посредством добавления соответствующего субстрата, который при окислении производит цветные колонии. Можно также использовать процедуру иммунного связывания, в ходе которой исследуемые колонии блоттируются на нитроцеллюлозе [15], а затем реагируют аналогичным образом. Как и в случае с НМФА, для серотипирования изолятов методом ИП следует использовать поликлональные сыворотки. Преимущество иммунопероксидазного метода перед иммунофлуоресценцией заключается в том, что иммунопероксидазный метод не требует использования дорогого флуоресцентного микроскопа.

**5.2.2. Реакция подавления роста**

В ходе применения теста на подавление роста, рост микоплазм подавляется посредством специфических антисывороток, которые позволяют идентифицировать вид. Данный метод относительно нечувствителен, и сыворотки должны иметь высокий титр, и они должны быть моноспецифические и полученные на хозяевах-млекопитающих, например, сыворотки домашней птицы не всегда эффективно подавляют рост микоплазмы. Исследуемый организм должен быть чистой культурой (клон) и следует исследовать несколько разведений; оптимальна концентрация 104 колониеобразующие единицы (КОЕ/мл). Скорость роста организма может оказывать влияние на подавление роста, и рекомендуется изначально замедлить рост посредством инкубирования, при температуре 27 °C в течение 24 часов с последующим инкубированием при температуре 37 °C. Подробности теста и его интерпретация опубликованы в другом источнике [16].

**5.3 Методы распознавания нуклеиновых кислот**

ПЦР-анализы регулярно используются во многих лабораториях и характеризуются хорошей чувствительностью. Эти методы представляют собой хорошую альтернативу культуре микоплазм in-vitro, поскольку они основаны на обнаружении специфических последовательностей ДНК возбудителя, непосредственно на клинических образцах или изолятах, выращенных in vitro. ДНК MG или MS амплифицируются методом ПЦР с использованием видоспецифичных праймеров. ПЦР в реальном времени, с флуоресцентными мечеными зондами находит все большее применение, сокращая время обнаружения по сравнению с обычной ПЦР. Необходимо проявлять большую осторожность, чтобы избежать загрязнения образцов ДНК MG или MS из соседних кабинетов некропсии, лабораторий по культивированию микоплазм или из предыдущих ПЦР [17]; [18]. Доступно несколько коммерческих наборов для ПЦР и ПЦР в реальном времени как для MG, так и для MS, а также опубликовано несколько собственных процедур [19]; [20].

Ниже описаны обычная ПЦР и ПЦР в реальном времени для MG и MS. В рамках методов, основанных на ПЦР, для идентификации большинства птичьих микоплазм, включая MG и MS, можно использовать метод денатурирующего градиентного гель-электрофореза (DGGE), но этот тест валидирован только на изолятах из культуры микоплазм.

Методы генотипирования, основанные на анализе генов mgc2, pvpA и vlhA, в настоящее время широко применяются для классификации изолятов MG [21]; [22] и MS, соответственно [23]. Кроме того, опубликована схема мультилокусное секвенирование (МЛС) основного генома для M. gallisepticum и две схемы MLST для M. synoviae [24]; [25]; [26], которые, вероятно, станут глобально применяемыми эпидемиологическими инструментами.

Описанный анализ представляет собой проверенную ПЦР для обнаружения MG и MS, основанную на амплификации фрагмента 16S рРНК [27]. Сообщается еще об одном широко используемом методе, основанном на гене *mgc*2 для выявления MG [22]. Следует помнить, что несвязанные штаммы могут иногда обмениваются последовательностями ДНК и дают полосы амплификации ДНК в различных лабораторных условиях. Все новые ПЦР требуют валидации с использованием критериев [28]. Принципы и методы валидации диагностических анализов для инфекционных заболеваний и [29]. Разработка и оптимизация анализов для обнаружения нуклеиновых кислот. Обычная ПЦР для MS, о которой сообщалось в этой главе, также может выявлять ДНК M. bovirhinis.

**5.3.1 Выделение ДНК**

ДНК выделяется из образцов мазков (можно объединить до 10 мазков), взвешенных в ФБР для ПЦР в пробирке Эппендорф объемом 1,5 мл с защелкивающейся крышкой. Доступно несколько коммерческих наборов для экстракции на основе спин-колонки для выделения ДНК из мазков, тканей и т.д. Автоматическое выделение ДНК микоплазмы возможно с помощью специальных коммерческих наборов. Необходимо выбрать соответствующий набор для этого типа образца и следовать протоколу производителя для выделения ДНК.

**5.3.2 Праймеры**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Метод ПЦР | Последовательности праймеров для ПЦР | Ожидаемый ампликон |
| 16s рРНК для MG | MG-14F: 5'-GAG-CTA-ATC-TGT-AAA-GTT-GGT-C-3' | 183 bp |
|  | MG-13R: 5'-GCT-TCC-TTG-CGG-TTA-GCA-AC-3 |  |
| *mgc*2 для MG | MG-1: 5'-CGC-AAT-TTG-GTC-CTN-ATC-CCC-AAC-A-3 | 236-302 bp |
|  | MG-2: 5'-TAA-ACC-CRC-CTC-CAG-CTT-TAT-TTC-C-3' |  |
| 16S rRNA для MS | MS-F:5'-GAG-AAG-CAA-AAT-AGT-GAT-ATC-A-3' | 211 bp |
|  | MS-R:5'-CAG-TCG-TCT-CCG-AAG-TTA-ACA-A-3' |  |

**5.3.3 Полимеразная цепная реакция**

1. Реакционная смесь должна быть приготовлена в соответствии с инструкцией производителя, в отдельной чистой зоне с использованием набора специальных пипеток. Для каждого образца внесите в пробирку для ПЦР 45 мкл смеси, содержащей 0,4 мкМ каждого праймера для 16S рРНК MS и *mgc*2 MG или 0,2 мкМ для 16S рРНК MG. Внутренний контроль амплификации (ВКА) может быть включен в качестве коммерческого набора для экзогенов или с использованием разработанных праймеров для эндогенной последовательности (например, 18S рРНК для образцов, полученных из эукариот), амплифицируемых при тех же условиях ПЦР. На реакционную смесь следует нанести несколько капель легкого минерального масла, если термоцистерна не оснащена крышкой с подогревом. Пробирки переносят в другую чистую зону, где в каждую пробирку добавляют соответствующий извлеченный образец ДНК (5 мкл). Положительный и отрицательный контроль ДНК должен проводиться в каждом анализе. Затем пробирки помещают в термоциклер для следующих циклов: 40 циклов: 94 °C в течение 30 секунд, 55 °C в течение 30 секунд, 72 °C в течение 60 секунд, 1 цикл (окончательное расширение): 72 °C в течение 5 минут и замачивание при 4 °C.
2. Для амплификации 16s рРНК MS и *mgc2* MG, с использованием Taq-полимеразы с горячим стартом запустите термоциклер при следующем профиле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Активация полимеразы | 95 °C | 10 минут |  |
| 40 циклов | 95 °C | 45 секунд |  |
|  | 54 °C | 60 секунд |  |
|  | 72 °C | 60 секунд |  |
| 1 цикл (окончательное продление) | 72 °C | 7 минут | замачивать при температуре 4 °C |

**5.4. Электрофорез**

Продукты ПЦР-амплификации выявляются с помощью обычного гель-электрофореза, включающего соответствующие маркеры размера. Окрашенные продукты визуализируются под УФ-светом или с помощью нитрата серебра под вытяжкой для опасных химических веществ. В качестве альтернативы, амплифицированный продукт можно прогнать в аппарате для капиллярного электрофореза, загруженного маркерами соответствующего размера. Размерность пар оснований амплифицированных фрагментов может статистически отличаться примерно на 10 % от ожидаемой, при использовании этого метода. Исследование продуктов ПЦР должно проводиться в лабораторной зоне, хорошо отделенной от мест, где выполняются другие этапы процедуры ПЦР.

**5.4.1 16s-рДНК-ПЦР и денатурирующий градиентный гель-электрофорез**

Метод 16s-рДНК-ПЦР-ДГГЭ - это метод, который может применяться для идентификации изолятов микоплазм [30], включая птичьи микоплазмы из культивируемых бульонов или агаровых колоний. Он также может быть использован для получения экстрактов ДНК из клинических образцов. Генетической мишенью является область V3 гена 16s, которая амплифицируется комбинацией специфического для микоплазма праймера (обратный праймер) и универсального бактериального праймера (прямой праймер), содержащего GC-зажим (40 повторяющихся GC).

Метод основан на миграции фрагментов ДНК после разделения нитей, вызванного химическими денатуратами в геле. Он способен обнаруживать одноосновные мутации в ДНК.

После переноса на денатурирующий гель, рисунок полосы (полос), образованной неизвестными образцами, сравнивается с положительными птичьими контролями, которые проводятся параллельно.

Этот метод способен выявлять отдельные виды Mycoplasma spp., инфекций и коинфекций у птиц, в одном образце [31]; [32].

i) Праймеры

Используются следующие праймеры:

|  |
| --- |
| R543: 5' -ACC-TAT-GTA-TTA-CCG-CG-3 |
| GC 341 F: 5'-CGC-CCG-CCG-CGC-GCG-GCG-GGC-GGG-GCG-GGG-GCA-CGG- |
| GGG-GCC-TAC-GGG-AGG-CAG-CAG-3' |

ii) Полимеразная цепная реакция

Реакционную смесь для ПЦР следует готовить в отдельном чистом помещении следующим образом (конечный объем: 25 мкл):

H2O Сверхчистая 12,5 мкл

5 × ПЦР буфер 5,00 мкл

dNTP (l0 мМ) 1,00 мкл

F праймер (50 мкм) 0,25 мкл

R праймер (50 мкм) 0,25 мкл

Taq (5 Ед/мкл) 0,25 мкл

DMSO (1%) 0,25 мкл

MgCl2 (25 мМ) 4,00 мкл

В пробирки разливают 23,5 мкл мастер-микс и затем добавляют 1,5 мкл не содержащей нуклеаз воды/образца/контрольной ДНК.

Затем пробирки помещаются в термоциклер следующего профиля:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 95 °C | 5 минут |  |
| 35 циклов: | 95 °C | 1 минута |  |
|  | 58 °C | 45 секунд |  |
|  | 72 °C | 60 секунд |  |
| 1 цикл (окончательное продление) | 72 °C | 20 минут | замачивать при температуре 4 °C |

iii) Электрофорез

20 мкл каждого продукта ПЦР загружают в 10 % полиакриламид/бис (37,5:1) гели с градиентом денатурации от 30 до 60 % (где 100 % соответствует 7 М мочевине и 40 % (объем/объем) деионизированного формамида) в 1 × Буфер ТАЕ. Электрофорез проводится при напряжении 100 В, 300 мА при температуре 60 °C в течение 18 часов, время выполнения может изменяться в зависимости от устройства ДГГЭ и размера геля. Затем гели окрашивают подходящим красителем ДНК в течение 30 минут (5 мкл на 50 мл буфера 1× TAE) и визуализируют при ультрафиолетовом освещении.

**5.5 ПЦР в реальном времени**

Видоспецифические ПЦР в реальном времени были разработаны для увеличения пропускной способности диагностических образцов [20]. В этом методе используются специфические флуоресцентные зонды, которые увеличивают стоимость специфического анализа, но позволяют избежать потенциального загрязнения после амплификации. Амплификация гена MG направлена на ген *mgc*2, а амплификация MS - на 16S-23S ISR. Анализ проводится в виде дуплексной амплификации, которая включает в себя внутренний контроль амплификации (ВКА). Предел обнаружения составляет 10 копий MS ДНК на реакцию и 1 копию MG ДНК.

1. Праймеры

|  |  |
| --- | --- |
| Для | Праймеры и зонды |
| MG | MGFrt F 5'-TTG-GGT-TTA-GGG-ATT-GGG-ATT-3' |
|  | MGRrtr 5'-CCA-AGG-GAT-TCA-ACC-ATC-3' |
|  | MGPrt 5'-Texas Red-TGA-TGA-TCC-AAG-AAC-GTG-AAG-AAC-ACC-BHQ1-3' |
| MS | MSFrt 5'-CCT-CCT-TTC-TTA-CGG-AGT-ACA-3' |
|  | MSRrt 5'-CTA-AAT-ACA-ATA-GCC-CAA-GGC-AA-3' |
|  | MSPrt 5'-FAM-ATT-CTA-AAA-GCG-GTT-GTG-TAT-CGC-T-BHQ1-3 |

Для снижения вероятности получения ложноотрицательных результатов, в состав смеси для амплификации можно включить коммерческий набор для определения ДНК ВКА.

ii) Полимеразная цепная реакция

Амплификация проводится в 96-луночном термоциклере реального времени. Реакция в пробирке готовится для каждого образца, подлежащего тестированию на MG или MS. Каждая реакция содержит в общей сложности 25 мкл, включая 5 мкл   
ДНК-мишени, 12,5 мкл 2× универсального мастер-микса для ПЦР в реальном времени,   
5 мкМ каждого конечного праймера и 0,2 мкМ конечного зонда. Реагент ВКА может быть добавлен в каждую реакцию, в соответствии с инструкциями производителя.

Используется общий протокол амплификации:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 1 цикл | 95 °C | 10 минут | (один этап денатурации) |
| 45 циклов: | 95 °C | 15 секунд |  |
| 60 °C | 30 секунд |  |

Сигнал флуоресценции для конкретного зонда Mycoplasma и ВКА приобретается, в соответствующем канале детектора на этапе расширения.

Следует использовать пороговое значение цикла (Ct = Cq цикл количественного определения), автоматически рассчитанное программным обеспечением. Значения   
Cq 35 или ниже считаются положительными, ВКА должен усиливаться в отрицательных образцах с Cq от 30 до 40, в противном случае он может быть установлен как ингибированный.

**5.6 Молекулярное типирование**

Различные молекулярные методы также доступны для дифференциации штаммов MG и MS, но их использование, как правило, в настоящее время ограничивается специализированными лабораториями. Для выявления циркулирующих штаммов были разработаны основанные на последовательности методы, позволяющие лучше понять эпидемиологию микоплазмы и поддержать меры контроля. Штаммы MS могут быть идентифицированы и классифицированы с помощью таких методов, как МЛС [24]; [25], секвенирование *vlhA* 5' и количество повторов, богатых пролином [23], дифференцировка MS-H с мутациями *obg* и *oppF*-1 [33]; [34]. Вакцинные штаммы можно дифференцировать с помощью анализа DIVA (обнаружение инфекции у вакцинированных животных) [19]. Штаммы MG и MS можно различать с помощью МЛС основного генома [26]; [35]. Новые подходы, такие как МВТМ (многолокусный вариабельный тандемный массив; [36]) и АМНА (анализ мутации с несовпадением амплификации), очень многообещающи для различения полевых изолятов от вакцинных штаммов, но еще не получили широкого распространения.

Эти новые методы быстро заменяют другие методы молекулярного типирования, такие как рестрикционный эндонуклеазный анализ, гель-электрофорез в пульсирующем поле, полиморфизм длины амплифицированных фрагментов и анализ случайной амплификации полиморфной ДНК, поскольку они слишком трудоемки и дорогостоящи для крупномасштабного типирования. Благодаря высокой скорости совершенствования новых аналитических методов, а также большей доступности все более сложного оборудования существующие в настоящее время методы могут быть заменены в короткие сроки. Кроме того, номенклатура штаммов птичьих микоплазм должна быть пересмотрена в ближайшем будущем для более удобной классификации циркулирующих штаммов микоплазм и более эффективной политики контроля заболеваний.

**6.** **Серологические тесты**

Используемые серологические тесты не обладают достаточной специфичностью и/или чувствительностью. Настоятельно рекомендуется ограничить их использование мониторингом стада, а не тестированием отдельных птиц. Диагностам, желающим использовать такие тесты, рекомендуется установить чувствительность и специфичность теста [28], в их собственных лабораторных условиях. Следует также отметить, что эти тесты не были проверены для использования с сыворотками однодневных птиц или диких птиц [37].

Наиболее часто используемыми тестами являются РСА, ИФА и РТГ. Описано несколько других методов, таких как радиоиммуноанализ, микроиммунофлуоресценция, иммуноблоттинг [38], и ИП-анализ, но они используются редко. Количество сывороток, подлежащих тестированию в пределах стада, зависит от уровня обнаружения и требуемых доверительных пределов. Минимальные требования, включая частоту тестирования для международной торговли в пределах Европейского Союза, были описаны, например, для MG в Директиве Совета 2009/158/EC. Минимальные требования и утвержденные тесты, также установлены для членов Национального плана совершенствования птицеводства (NPIP) США.

Птицеводческие компании, использующие ИФА для скрининга большого количества сывороток на антитела к вирусу, могут счесть этот тип анализа удобным также для тестирования на микоплазму. Здесь не будет подробно описан ИФА, поскольку в продаже имеется несколько наборов для MG и MS. Вместо этого приводятся подробности теста на РТГ, поскольку реагенты, необходимые для этого теста, не являются широкодоступными в продаже.

**6.1 Быстрая реакция сывороточной агглютинации**

Сыворотки отбираются из образца стада и, если их не протестировать немедленно, хранятся при температуре 4 °C и не замораживаются. Тест следует проводить при комнатной температуре (20 - 25 °C) в течение 72 часов после сбора сыворотки с использованием реагентов, хранящихся при комнатной температуре. Предварительное центрифугирование сывороток уменьшит количество неспецифических реакций. Антигены РСА доступны на коммерческой основе, но они могут отличаться по специфичности и чувствительности у разных производителей и от партии к партии. Они должны храниться в соответствии с инструкциями производителя. Подходящие антигены, окрашенные РСА, также могут быть приготовлены «на месте» с использованием методов культивирования, затем их окрашивают кристаллическим фиолетовым красителем. Стандарты контроля качества для антигенов микоплазмы для серологических тестов описаны ниже.

**6.1.1 Процедура тестирования [41]**

1. Один объем сыворотки (около 0,02 мл) наносят каплей на чистую белую плитку или стеклянный планшет, затем наносят один объем антигена MG или MS. Не позволяйте сыворотке высохнуть до нанесения антигена. Важно энергично и часто встряхивать флакон с антигеном во время использования, чтобы поддерживать нужное количество антигена в суспензии.
2. Для распределения смеси на окружности около 1,5 см в диаметре используют палочку для перемешивания. Плитку или планшет встряхивают в течение 2 минут. На наличие агглютинации указывает появление флоккуации антигена в течение 2 минут.
3. В исследование включают известные положительные и отрицательные контроли.
4. Проводят повторное тестирование серийных разведений всех сывороток, которые агглютинируют после нагревания при температуре 56 °C в течение 30 минут. Если они продолжают интенсивно реагировать, они считаются положительными при разведении (1/4 или выше).

В США положительные по MG и MS сыворотки можно получить в лабораториях национальных ветеринарных служб USDA (NVSL), а в Европе – в AFSSA Ploufragan[[2]](#footnote-2), Франция. MG и MS, а также контрольные сыворотки получают на курах и индейках, их можно приобрести в различных титрах. Наборы антисывороток можно также приобрести в отделении ветеринарии птиц Университета Джорджии, если они есть в наличии.

Отсутствуют международные стандарты для интерпретации результатов этих тестов, но большой процент положительных сывороток в стаде (10 % или более) указывает на инфекцию MG, особенно если результат подтвержден посредством РТГ или ИФА. Для дальнейшего подтверждения стадо необходимо повторно исследовать в течение месяца. Неубедительные результаты могут вызвать необходимость попытаться выделить организм или продемонстрировать наличие его ДНК. Сомнительные результаты тестирования на MG или MS следует исследовать с использованием тестов с антигеном MS (и наоборот), т.к. инфицирование данными организмами иногда вызывает перекрестные реакции.

Тесты можно проводить на желтке, а также на сыворотках, хотя желток необходимо сначала развести или экстрагировать.

**6.2 Реакция торможения гемагглютинации**

MG и MS могут гемагглютинировать красные кровяные тельца (ККТ), а специфические антитела вызывают ингибирование. Следует выбирать штамм, который хорошо растет и гарантированно гемагглютинирует. Для проведения РТГ требуется удовлетворительно гемагглютинирующий антиген MG и MS, отмытые свежие ККТ кур или индеек, в зависимости от ситуации, а также тестовые сыворотки. В качестве антигена может выступать, как свежая культура в бульоне, так и концентрированная отмытая суспензия клеток микоплазмы в ФБР. Возможно, сложно поддерживать поставку выскотитрованного антигена бульонной культуры; однако применение концентрированного антигена (содержащего обычно 25 – 50 % глицерина и хранящегося при температуре –70 °C) повышает вероятность неспецифических реакций. В США гемагглютинирующий (ГА) антиген MG и MS можно приобрести в NVSL.

Тест РТГ проводится по хорошо известным процедурам [39]. ГА титр антигена впервые определяют в двукратных разведениях, единицу ГА определяют как наименьшее количество антигена, дающее полную гемагглютинацию при использовании тест-системы Тест РТГ следует проводить с использованием 4 единиц ГА следующим методом или методом, обладающим эквивалентной чувствительностью, определенной в тестах с известными положительными сыворотками.

Все титрования ГА и РТГ лучше всего проводить на многолуночных пластиковых планшетах с лунками в форме V, используя постоянные объемы 50 мкл. В каждый тест включают положительную и отрицательную контрольную сыворотку. Для исследования каждой сыворотки необходимо использовать один ряд из восьми лунок.

**6.2.1 Процедура тестирования**

1. В первую лунку каждого ряда добавляют 50 мкл ФБР.
2. В каждую вторую лунку каждого ряда добавляют 8 ГА единиц антигена в объеме 50 мкл, и в каждую лунку с 3 по 8 в каждом ряду добавляют 4 ГА единицы антигена в объеме 50 мкл.
3. 50 мкл 1/5 разведения исследуемой сыворотки добавляют в первую лунку, перемешивают и переносят 50 мкл во вторую лунку и так далее, 50 мкл удаляют из последней лунки. Первая лунка – лунка с сывороточным контролем.
4. Для контроля антигена необходимо шесть лунок. В лунки со 2 по 6 добавляют по 50 мкл ФБР, и 50 мкл с 8 ГА единицами антигена добавляют в лунки 1 и 2. Содержимое лунки 2 перемешивают и переносят 50 мкл в лунку 3, перемешивают, повторяют для лунки 6 и удаляют 50 мкл.
5. Для контроля ККТ необходимо две лунки. В каждую из них добавляют 50 мкл ФБР.
6. Добавляют во все лунки по 50 мл 0,5 % суспензии ККТ (куриные клетки для куриной сыворотки и индюшачьи для индюшачьей сыворотки).
7. Планшет слегка встряхивают для обеспечения тщательного перемешивания содержимого лунок, результаты считывают после выдерживания в течение около   
   50 минут при комнатной температуре, или когда титрация антигена достигает 4 ГА единиц. Для считывания планшет следует наклонить, и только те лунки, в которых ККТ «стекают» одновременно с ККТ в контрольных лунках, считаются ингибированными. Сывороточный контроль должен демонстрировать четкий сгусток ККТ, а положительные и отрицательные контроли должны реагировать, как ожидалось. Титр РТГА – наибольшее разведение сыворотки, демонстрирующее полнее ингибирование ГА.

Сыворотки, демонстрирующие неспецифическую гемагглютинацию, следует адсорбировать для удаления неспецифических гемагглютининов, чтобы получить четкий сгусток в контрольной лунке без гемагглютинирующего антигена. Адсорбцию проводят посредством инкубирования 1 мл разведения сыворотки с 6-8 каплями упакованных ККТ кур или индеек. Клетки удаляют после инкубирования при температуре 37 °C в течение   
10 минут, а супернатант тестируют на гемагглютинирующую активность.

Не существует общепризнанного определения положительных и отрицательных результатов для международной торговли.

**6.3 Иммуноферментный анализ**

На рынке представлено несколько коммерческих наборов для ИФА антител к MG и MS, которые широко используются в диагностических лабораториях. Эти ИФА используют различные отсечки и математические формулы для преобразования результата ИФА в значение титра. Это означает, что каждый ИФА имеет свою собственную интерпретацию, и результаты титрования разных ИФА на одной и той же сыворотке могут отличаться.

**6.4. Контроль качества антигенов Mycoplasma gallisepticum и M. Synoviae**

**6.4.1 Антигены Mycoplasma gallisepticum**

Антигены обычно готовят из штамма S6 или из штамма A5969 MG. При необходимости можно также использовать антигены, приготовленные из других штаммов.

1. Антиген MG для теста РСА

Описанные ниже методы контроля качества применяются только для суспензий MG, окрашенных соответствующим красителем и содержащих консервант, а также предназначенных для использования в быстрой реакции агглютинации с сывороткой. Такие антигены имеются в продаже.

При микроскопическом исследовании, антиген должен выглядеть как гомогенная суспензия без хлопьев или преципитатов, а в суспендирующей жидкости должны отсутствовать остатки красителя. Он должен быть стерильным с рН от 6,5 до 7,0 и храниться при температуре 5 ± 3 °C. Перед использованием его необходимо подогреть до комнатной температуры.

Чувствительность и специфичность антигена определяется по его реакции с известными положительными сыворотками с высоким и низким титром и известными отрицательными сыворотками. Положительную реакцию распознают по образованию окрашенных хлопьев и просветлению суспендирующей среды. Критерии, описанные выше, применимы до истечения срока годности, указанного производителем.

1. Антиген MG для РТГ

Тест предпочтительно проводить на живых, фактически растущих культурах. Антиген должен быть свободен от контаминации бактериями и грибами.

1. Антиген MG для ИФА

Может быть сложно подготовить удовлетворительный антиген для использования в непрямом ИФА без значительных предварительных экспериментов и подтверждения чувствительности и специфичности. Использование надежного коммерческого тест-набора, вероятно, является наилучшим вариантом для диагностических лабораторий.

**6.4.2 Антигены Mycoplasma synoviae**

Следует использовать антигены, полученные из штамма WVU 1853 или других подходящих штаммов.

1. Антиген MS для теста РСА

Технические требования применимы к антигену MG для теста РСА.

1. Антиген MS для теста РТГ

Применяются те же требования, что и к антигену MG для теста РТГ.

**6.4.3 Дополнительные комментарии**

Сыворотки, дающие неспецифическую реакцию в тесте РСА, обычно не дают положительной реакции в тесте РТГ с использованием живого антигена ГА. Положительные реакции РСА можно подтвердить посредством РТГ с сыворотками, отобранными через 2 - 3 недели после инфицирования (время, необходимое для выработки антител для РТГ). Однако, РТГ обычно штамм-специфична [40], и следовательно, может быть недостаточно чувствительной. Полезной альтернативой может быть ИФА.

Перед применением в РСА, образцы сыворотки не следует замораживать. Во избежание неспецифических реакций у них должен отсутствовать гемолиз и контаминация. Применение инактивированных вакцин против других болезней может привести к появлению неспецифических реакций. Образцы следует исследовать, как можно скорее (в течение 72 часов), т.к. при хранении качество антител к микоплазмам снижается. Сыворотки могут быть инактивированы на водяной бане при температуре   
56 °C в течение 30 минут.

**7. Требования к вакцинам и диагностическим биологическим препаратам**

Предпочтительным методом контроля является содержание стад, свободных от MG и MS, повышение мер биобезопасности и предотвращение или ограничение производства микоплазм инфицированными группами селекционеров, сдерживая распространение этих патогенов посредством вертикальной передачи [41]. Вакцинацию следует рассматривать только в тех ситуациях, когда контакт в полевых условиях неизбежен, например, в условиях содержания птиц разного возраста. Следует также учитывать потенциальный контакт с соседними стадами домашней птицы.

Для борьбы с MG и MS доступны два типа вакцин, живые и убитые: живые штаммы MG или MS от легкой до авирулентной формы и инактивированные масляно-эмульсионные бактерины. По этому вопросу было опубликовано несколько научных работ, в которых приводятся доказательства влияния вакцинации на снижение падения яйценоскости, на ограничение респираторных признаков, пневмосаккулита, а также на снижение передачи яиц.

Хотя среди штаммов MG или MS присутствует антигенная вариабельность, считается, что вакцинации одним штаммом MG или MS достаточно для достижения хорошего уровня защиты от гомологичных видов. Живые вакцины можно считать хорошим и эффективным инструментом для управления и сдерживания микоплазмозов. Однако до недавнего времени было нелегко отличить вакцинный штамм от диких штаммов с помощью имеющихся тестов [32]. Однако новейшие биомолекулярные методы, хотя и не являются простыми и легкими, были проверены для дифференциации штаммов [19]; [42], хотя они обычно основаны на одноточечных мутациях.

Рекомендации по производству ветеринарных вакцин приведены в [43]. Принципы производства ветеринарных вакцин. Рекомендации, приведенные здесь и в [43], носят общий характер и могут быть дополнены национальными и региональными требованиями.

Вакцины на основе бактеринов используются для подготовки иммунной системы к воздействию болезни, чтобы уменьшить клинические признаки, такие как снижение яйценоскости, которые возникают как следствие инфекции MG у несушек. В настоящее время их использование ограничено в основном MG.

Использование живых вакцин эквивалентно «контролируемому воздействию».   
Цель - заразить стадо мягким, иммуногенным штаммом MG или MS в возрасте, когда значительных повреждений практически не происходит. Такое воздействие приводит к сопротивляемости к контрольному заражению позже, например, в местах содержания разновозрастной птицы. Успешно вакцинированная птица резистентна к респираторному заболеванию, аэросаккулиту и снижению яйценоскости, вызываемым MG или MS. Вакцинация также имеет результатом снижение уровня передачи патогена с яйцами у племенной птицы.

**8.** Схема производства и минимальные требования к вакцинам

8.1 Характеристики посева

8.1.1 Живая вакцина

Вакцинный штамм должен быть иммуногенным, легко колонизировать верхние дыхательные пути и вызывать минимальное повреждение дыхательной системы. Сильная реакция антител не обязательно коррелирует с иммунитетом.

Посевная культура должна быть очищена от всех посторонних веществ. Культура должна быть клонирована для обеспечения чистоты. При желании, чтобы убедиться в идентичности и чистоте штамма, можно провести анализ ДНК микоплазмы с помощью эндонуклеазы рестрикции или других методов, таких как 16s ПЦР ДГГЭ.

Посевная культура должна быть стабильной, без тенденции к возврату вирулентности. Это может быть подтверждено десятью обратными пассажами у восприимчивых цыплят. Контактных цыплят можно вводить с интервалом в неделю. При необходимости, у зараженных цыплят можно взять трахейные мазки, которые затем можно ввести в трахею интактных цыплят. Передача микроорганизма должна быть доказана. Полученный изолят можно затем использовать для заражения восприимчивых цыплят.

**8.1.2 Убитая вакцина**

В случае убитой вакцины наиболее важными характеристиками являются высокий выход и хорошая антигенность. Считается, но не доказано, что вирулентные штаммы предпочтительнее. Посевная культура должна быть свободной от посторонних возбудителей.

**8.2 Метод культивирования**

Посевную культуру можно размножать в среде, аналогичной описанной выше для живых вакцин, но бульонную культуру лиофилизируют или замораживают при температуре –70 °C или ниже. Для бактеринов, культура должна быть сконцентрирована и ресуспендирована в небольшом объеме физиологического раствора или ФБР перед приготовлением эмульсии.

**8.3 Валидация вакцины**

Данные об эффективности должны быть получены до начала массового производства вакцины. Вакцину цыплятам следует водить тем же способом, что и полевых условиях. Вакцинированных цыплят следует подвергать контрольному заражению, и защиту следует определять по респираторным признакам, выделениям из носа и/ или аэросаккулиту. В идеале, следует оценить защиту от потерь при производстве яиц, но такие испытания являются дорогостоящими и громоздкими.

Исследования эффективности: Группы из 20 цыплят, свободных от специфических патогенов (СПФ) или, по крайней мере, цыплят, свободных от микоплазмы, в возрасте 2 недель и старше вакцинируют глазными каплями или другим способом введения одной полевой дозой живой вакцины или подкожно или внутримышечно одной дозой (обычно 0,5 мл) бактерина. Аналогичная группа невакцинированных цыплят содержится отдельно в качестве контроля. Всех цыплят следует подвергнуть 24 - часовой бульонной культуре вирулентного штамма MG через   
2 - 3 недели после вакцинации. Простой метод исследования заключается в инокуляции 0,1 мл культуры для исследования в заднегрудной воздушный мешок. Всех птиц вскрывают через 7 - 10 дней после заражения, и оценивают повреждения воздушных мешочков. Альтернативные методы включают контрольное заражение посредством введения 0,1 мл в инфраорбитальный синус и исследование птиц на предмет выделений из носа в период с 7 по 14 день после контрольного заражения, или контрольное заражение посредством аэрозольного распыления или измерение толщины слизистой оболочки в трахее на гистологических срезах в 4 - 6 предварительно определенных точках [44].

**8.4 Метод производства**

**8.4.1 Процедура**

Вакцина должна изготавливаться в подходящей чистой и безопасной среде, хорошо отделенной от диагностических лабораторий или коммерческой домашней птицы. Особое внимание должно уделяться предотвращению контаминации MG от других продуктов, изготавливаемых на том же производственном объекте.

Производство вакцины должно быть основано на системе посевных материалов с использованием подходящего штамма MG установленного происхождения, истории пассажей и чистоты. Питательная среда аналогична описанной выше. Сыворотку, используемую в питательной среде, следует инактивировать при температуре 56 °C в течение 1 часа в целях предотвращения контаминации микоплазмами, которые могут присутствовать, и их следует стерилизовать посредством фильтрации. Желательно использовать источник СПФ сыворотки.

Бульонную среду с быстро растущим инокулятом вводят в объеме около 5 % (объем/объем). Инкубация проводится при температуре 37 °C. Вакцину можно производить партиями с использованием больших сосудов или в ферментере. В серийных культурах, урожай собирают приблизительно через 24 часа после инокуляции. Живые вакцины консервируют посредством сублимирования или замораживания при температуре –70 °C, в жидком азоте или на сухом льду.

В случае производства бактерина антиген следует концентрировать, обычно посредством центрифугирования, обработки ультрафиолетом или другим подходящим методом. Бактерины готовят в эмульсии вода-масло, обычно состоящей из 80 % минерального масла, 20 % воды и подходящих эмульгаторов.

**8.4.2 Требования к ингредиентам**

Смотрите [43], с особым акцентом на продукты биологического происхождения, происходящие из страны с незначительным риском трансмиссивных губчатых энцефалопатий.

**8.4.3 Производственный контроль**

i) Содержание антигена

При сборе урожая, титр должен составлять от 108 до 109 КОЕ/мл. Концентрацию антигена в бактерине сложно стандартизировать, но она может быть основана на объеме клеточного осадка, который обычно составляет 1 % (объем/объем) клеточного осадка в готовом продукте.

ii) Инактивация убитых вакцин

Инактивацию зачастую проводят посредством бета-пропиолактона или формальдегида. В условиях производства вакцины необходимо подтвердить, что инактивирующий агент и процедура инактивации обеспечивают инактивацию вакцинного организма и потенциальных контаминантов.

Перед инактивацией следует убедиться, что гомогенная суспензия свободна от частиц, в которые не может проникнуть инактивирующий агент. Исследование инактивации следует проводить посредством культивирования на культуре для выращивания микоплазм для каждой партии как основанного объема после инактивации, так и готового продукта. Признаков роста микоплазм наблюдаться не должно.

iii) Стерильность убитых вакцин

Масло, используемое в вакцине, должно стерилизоваться при температуре 160 °C в течение 1 часа или посредством фильтрации, и необходимо подтвердить эффективность данной процедуры. Испытания масляных эмульсионных вакцин следует проводить для каждой партии готовой вакцины, как описано, например, в Британской Фармакопее (Ветеринария) 1985.

**8.4.4 Контроль партий**

i) Стерильность

Тесты на стерильность и отсутствие загрязнения биологических материалов, предназначенных для ветеринарного использования, приведены в [18].

ii) Безопасность

a) Испытание живой вакцины на безопасность

Птиц, вакцинированных в ходе испытания эффективности, описанного выше, можно использовать для оценки безопасности вакцины.

b) Испытание убитой вакцины на безопасность

Птиц, вакцинированных в ходе испытания эффективности, описанного выше, можно наблюдать на предмет местных или системных нежелательных явлений.

iii) Иммуногенность

Испытания иммуногенности как живой, так и убитой вакцины можно проводить с использованием процедур, описанных выше для испытания эффективности. Титр живой вакцины должен быть достаточным, чтобы вызвать инфекцию по пути, рекомендованному производителями, в расчете на одну дозу на птицу, чтобы хватило до истечения срока годности.

iv) Стабильность

Доказательства следует получать при исследовании трех партий вакцины, демонстрирующих, что вакцина выдерживает испытания на иммуногенность через 3 месяца по истечении срока хранения.

**8.5 Требования для получения разрешения регулирующих органов**

**8.5.1 Процесс производства**

Для утверждения вакцины в Органы должны быть представлены все соответствующие детали, касающиеся производства вакцины и тестирования контроля качества. Информация должна предоставляться по трем последовательным партиям вакцин, чтобы продемонстрировать последовательность производства.

**8.5.2 Требования безопасности**

i) Меры предосторожности (опасности).

Масляные эмульсионные вакцины вызывают серьезные поражения у лиц, проводящих вакцинацию при случайном введении вакцины в руку или в другие ткани. В случае такого несчастного случая человек должен немедленно обратиться в больницу, взяв с собой упаковку с вакциной. На каждом флаконе с вакциной и на ее упаковке должна быть четкая маркировка с указанием серьезности последствий при случайном введении вакцины. Обработку таких ран должен проводить доктор отделения интенсивной терапии согласно процедурам для лечения травм от смазочного шприца.

Персонал, вакцинирующий птиц живыми вирусными вакцинами методом аэрозольного распыления, должен носить защитную одежду и маски.

**8.5.3 Требования к эффективности**

Для регистрации коммерческой вакцины, партия или серии произведенные по стандартной методике и содержащие минимальное количество антигена или значение активности, должны доказать свою эффективность (защиту); каждая будущая коммерческая партия должна быть проверена перед выпуском, чтобы убедиться, что она имеет такое же значение активности, как и партия(-и), использованная(-ые) для испытания(-ий) эффективности. Каждая партия живой вакцины должна содержать достаточное количество живых микоплазм в расчете на дозу на птицу, чтобы их хватило до истечения срока годности.

Эффективность вакцины (защита) следует оценивать непосредственно у вакцинированных животных путем оценки их устойчивости к заражению.

**Библиография**

[1] RAVIV Z. & LEY D.H. (2013). Mycoplasma gallisepticum infection. In: Diseases of Poultry, 13th Edition, Swayne David E., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Suarez D.L. & Nair V.L., eds. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA and Oxford, UK, 877–893 (Равив З. и Лей Д.Х. (2013). Инфекция Mycoplasma gallisepticum. В: Болезни домашней птицы, 13-е издание, Суэйн Дэвид Э., Глиссон Дж.Р., Макдугалд Л.Р., Нолан Л.К., Суарес Д.Л. и Наир В.Л., ред. Уайли-Блэквелл, Эймс, Айова, США и Оксфорд, Великобритания, 877-893)

[2] ABOLNIK C. & GOUWS J. (2014). Extended survival times of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae on kanekalon synthetic hair fibres. Poult. Sci., 93, 8–11 (doi: 10.3382/ps.2013-03457) (Абольник С. и Гоувс Дж. (2014). Увеличение времени выживания Mycoplasma gallisepticum и Mycoplasma synoviae на канекалоновых синтетических волосяных волокнах. Журнал Птицеводство, **93,** 8-11 (doi: 10.3382/ps.2013-03457))

[3] FERGUSON-NOEL N. & NOORMOHAMMADI A.H. (2013). Mycoplasma synoviae infection. In: Diseases of Poultry, 13th Edition, Swayne David E., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Suarez D.L. & Nair V.L., eds. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA and Oxford, UK, 900–906 (Фергюсон-Ноэль Н. и Нурмохаммади А.Х. (2013). Инфекция Mycoplasma synoviae. В: Болезни домашней птицы, 13-е издание, Суэйн Дэвид Э., Глиссон Дж.Р., Макдугалд Л.Р., Нолан Л.К., Суарес Д.Л. и Наир В.Л., ред. Уайли-Блэквелл, Эймс, Айова, США и Оксфорд, Великобритания, 900-906))

[4] CATANIA S., GOBBO F., BILATO D., GAGLIAZZO L., MORONATO M.L., TERREGINO C., BRADBURY J.M. & RAMÍREZ A.S. (2016a). Two strains of Mycoplasma synoviae from chicken flocks on the same layer farm differ in their ability to produce eggshell apex abnormality. Vet. Microbiol., 193, 60–66 (doi: 10.1016/j.vetmic.2016.08.007) (Катания С., Гоббо Ф., Билато Д., Гальяццо Л., Моронато М.Л., Террегино С., Брэдбери Дж.М. и Рамирес А.С. (2016a). Два штамма Mycoplasma synoviae из куриных стад одной и той же птицефермы различаются по способности вызывать аномалии верхушки скорлупы яиц. Ветеринарная микробиология, 193, 60-66 (doi: 10.1016/j.vetmic.2016.08.007))

[5] LANDMAN W.J. (2014). Is Mycoplasma synoviae outrunning Mycoplasma gallisepticum? A viewpoint from the Netherlands. Avian Pathol., 43, 2–8 (doi: 10.1080/03079457.2014.881049) (Лэндман У.Дж. (2014). Опережает ли Mycoplasma synoviae Mycoplasma gallisepticum? Точка зрения из Нидерландов. Патология птиц, 43, 2-8 (doi: 10.1080/03079457.2014.881049))

[6] LANDMAN W.J.M. & FEBERWEE A. (2004). Aerosol-induced Mycoplasma synoviae arthritis: the synergistic effect of infectious bronchitis virus infection. Avian Pathol., 33, 591–598 (Ландман У.Дж.М. и Феберви А. (2004). Аэрозоль-индуцированный артрит Mycoplasma synoviae: синергетический эффект инфекции вируса инфекционного бронхита. Патология птиц, 33, 591-598)

[7] CATANIA S., BILATO D., GOBBO F., GRANATO A., TERREGINO C., IOB L. & NICHOLAS R.A. (2010). Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by Mycoplasma synoviae infection. Avian Dis., 54, 961–964 (Катания С., Билато Д., Гоббо Ф., Гранато А., Террегино С., Иоб Л. и Николас Р.А. (2010). Лечение аномалий скорлупы и снижения яйценоскости, вызванных инфекцией Mycoplasma synoviae. Болезни птиц, 54, 961-964)

[8] FEBERWEE A., MORROW C.J., GHORASHI S.A., NOORMOHAMMADI A.H. & LANDMAN W.J. (2009a) Effect of a live Mycoplasma synoviae vaccine on the production of eggshell apex abnormalities induced by an M. synoviae infection preceded by an infection with infectious bronchitis virus D1466. Avian Pathol., 38, 333–340 (doi: 10.1080/03079450903183652) (Феверви А., Морроу С.Дж., Гораши С.А., Нурмохаммади А.Х. и Ландман В.Дж. (2009a) Влияние живой вакцины Mycoplasma synoviae на развитие аномалий верхушки скорлупы яиц, вызванных инфекцией M. synoviae, которой предшествовала инфекция вирусом инфекционного бронхита D1466. Патология птиц, 38, 333-340 (doi: 10.1080/03079450903183652))

[9] FEBERWEE A., DE WIT J.J. & LANDMAN W.J.M. (2009b). Induction of eggshell apex abnormalities by Mycoplasma synoviae: field and experimental studies. Avian Pathol., 38, 77–85 (Феверви А., де Вит Дж.Дж. и Лэндман У.Дж.М. (2009b). Индукция аномалий апекса скорлупы яиц Mycoplasma synoviae: полевые и экспериментальные исследования. Патология птиц, 38, 77-85))

[10] Chapter 3.3.14 Newcastle disease (infection with Newcastle disease virus) (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022) (Глава 3.3.14 Ньюкаслская болезнь (заражение вирусом Ньюкаслской болезни) (Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных 2022))

[11] Chapter 3.3.2 Avian infectious bronchitis (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022) (Глава 3.3.2 Инфекционный бронхит птиц (Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных, 2022))

[12] Chapter 3.3.1 Avian chlamydiosis (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022) (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022) ( Глава 3.3.1 Птичий хламидиоз (Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных 2022) (Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных 2022))

[13] FREY M.L., HANSON R.P. & ANDERSON D.P. (1968). A medium for the isolation of avian Mycoplasmas. Am. J. Vet. Res., 29, 2163–2171 (Фрей М.Л., Хэнсон Р.П. и Андерсон Д.П. (1968). Среда для выделения птичьих микоплазм. Американский журнал ветеринарных исследований, 29, 2163-2171))

[14] ROSENDAL S. & BLACK F.T. (1972). Direct and indirect immunoflurescence of unfixed and fixed mycoplasma colonies. Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B], 80, 615–622 (Розендал С. и Блэк Ф.Т. (1972). Прямая и непрямая иммунофлюоресценция нефиксированных и фиксированных колоний микоплазм. Архивы Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica [B], 80, 615-622)

[15] KOTANI H. & MCGARRITY G.J. (1985). Rapid and simple identification of Mycoplasmas by immunobinding. J. Immunol. Methods, 85, 257–267 (Котани Х. и Макгаррити Дж.Дж. (1985). Быстрая и простая идентификация микоплазм с помощью иммуносвязывания. Журнал иммунологических методов, 85, 257-267)

[16] CLYDE W.A., JR. (1983). Growth inhibition tests. In: Methods in Mycoplasmology, Vol. 1, Razin S. & Tully J.G., eds. Academic Press, New York, USA, and London, UK, 405–410 (Клайд У.А. младший (1983). Тесты на ингибирование роста. В: Методы в микоплазмологии, том 1, Разин С. И Талли Дж.Г., ред. Academic Press, Нью-Йорк, США, и Лондон, Великобритания, 405-410))

[17] Chapter 2.1.2 Biotechnology advances in the diagnosis of infectious diseases (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022) (Глава 2.1.2 Достижения биотехнологии в диагностике инфекционных заболеваний (Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных, 2022))

[18] Chapter 1.1.9 Tests for sterility and freedom from contamination of biological materials intended for veterinary use (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022) (Глава 1.1.9 Тесты на стерильность и отсутствие загрязнения биологических материалов, предназначенных для использования в ветеринарии (Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных, 2022))

[19] DIJKMAN R., FEBERWEE A. & LANDMAN W.J.M. (2017). Development, validation and field evaluation of a quantitative real-time PCR able to differentiate between field Mycoplasma synoviae and the MS-H-live vaccine strain. Avian Pathol., 46, 403–415 (doi: 10.1080/03079457.2017.1296105) (Дейкман Р., Феберви А. и Лэндман У.Дж.М. (2017). Разработка, валидация и полевая оценка количественной ПЦР в реальном времени, способной дифференцировать полевую Mycoplasma synoviae и вакцинный штамм MS-H-live. Патология птиц, 46, 403-415 (doi: 10.1080/03079457.2017.1296105))

[20] RAVIV Z. & KLEVEN S.H. (2009). The development of diagnostic real-time TaqMan PCRs for the four pathogenic avian mycoplasmas. Avian Dis., 53, 103–107 (Равив З. и Клевен С.Х. (2009). Разработка диагностических ПЦР TaqMan в реальном времени для четырех патогенных микоплазм птиц. Болезни птиц, 53, 103-107)

[21] ARMOUR N.K. & FERGUSON-NOEL N. (2015). Evaluation of the egg transmission and pathogenicity of Mycoplasma gallisepticum isolates genotyped as ts-11. Avian Pathol., 44, 296–304 (doi: 10.1080/03079457.2015.1044890) (Армор Н.К. и Фергюсон-Ноэль Н. (2015). Оценка передачи яиц и патогенности изолятов Mycoplasma gallisepticum, генотипированных, как ts-11. Патология птиц., 44, 296-304 (doi: 10.1080/03079457.2015.1044890))

[22] GARCÍA M., IKUTA N., LEVISOHN S. & KLEVEN S.H. (2005). Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of Mycoplasma gallisepticum infection in chickens. Avian Dis., 49, 125–132 (Гарсия М., Икута Н., Левисон С. и Клевен С.Х. (2005). Оценка и сравнение различных методов ПЦР для выявления инфекции Mycoplasma gallisepticum у цыплят. Болезни птиц, 49, 125-132))

[23] HAMMOND P.P., RAMÍREZ A.S., MORROW C.J. & BRADBURY J.M. (2008). Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for Mycoplasma synoviae using primers located in the haemagglutinin encoding gene vlhA and its value for strain typing. Vet. Microbiol., 136, 61–68 (doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.011) (Хаммонд П.П., Рамирес А.С., Морроу К.Дж. и Брэдбери Дж.М. (2008). Разработка и оценка улучшенной диагностической ПЦР для Mycoplasma synoviae с использованием праймеров, расположенных в гене гемагглютинина, кодирующего vlhA, и ее значение для типирования штаммов. Ветеринарная микробиология, 136, 61-68 (doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.011))

[24] DIJKMAN R., FEBERWEE A. & LANDMAN W.J. (2016). Development and evaluation of a multi-locus sequence typing scheme for Mycoplasma synoviae. Avian Pathol., 45, 426–442 (doi: 10.1080/03079457.2016.1154135) (Дейкман Р., Феберви А. и Ландман У.Дж. (2016). Разработка и оценка схемы мультилокусного типирования последовательности для Mycoplasma synoviae. Патология птиц, 45, 426-442 (doi: 10.1080/03079457.2016.1154135))

[25] EL-GAZZAR M., GHANEM M., MCDONALD K., FERGUSON-NOEL N., RAVIV Z. & SLEMONS R.D. (2017). Development of Multilocus Sequence Typing (MLST) for Mycoplasma synoviae. Avian Dis., 61, 25–32 (doi: 10.1637/11417-040516-Reg) (Эль-Газзар М., Ганем М., Макдональд К., Фергюсон-Ноэль Н., Равив З. и Шлемонс Р.Д. (2017).Разработка мультилокусного секвенс-типирования (MLST) для Mycoplasma synoviae. Болезни птиц, 61, 25-32 (doi: 10.1637/11417-040516-Reg))

[26] GHANEM M., WANG L., ZHANG Y., EDWARDS S., LU A., LEY D. & EL-GAZZAR M. (2017). Core Genome Multilocus Sequence Typing: a Standardized Approach for Molecular Typing of Mycoplasma gallisepticum. J. Clin. Microbiol., 56, e01145-17 (doi: 10.1128/JCM.01145-17) (Ганем М., Ван Л., Чжан Ю., Эдвардс С., Лу А., Лей Д. и Эль-Газзар М. (2017). Мультилокусное типирование последовательностей основного генома: стандартизированный подход к молекулярному типированию Mycoplasma gallisepticum. Журнал клинической микробиологии, 56, e01145-17 (doi: 10.1128/JCM.01145-17))

[27] LAUERMAN L.H. (1998). Mycoplasma PCR Assays. In: Nucleic Amplification Assays for Diagnosis of Animal Diseases, Lauerman L.H., ed. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Auburn, AL, USA, 41–52 (Лауэрман Л.Х. (1998). Анализы методом ПЦР на микоплазму. В: Анализы нуклеиновой амплификации для диагностики болезней животных, Лауэрман Л.Х., ред. Американская ассоциация ветеринарных лабораторных диагностов, Оберн, Алабама, США, 41 -52)

[28] Chapter 1.1.6 Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022) (Глава 1.1.6 Принципы и методы валидации диагностических тестов на инфекционные заболевания (Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных, 2022))

[29] Chapter 2.2.3 Development and optimisation of nucleic acid detection assays (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022) (Глава 2.2.3 Разработка и оптимизация методов определения нуклеиновых кислот (Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных, 2022))

[30] MCAULIFFE L., ELLIS R., LAWES J., AYLING R.D. & NICHOLAS R.A.J (2005). 16S rDNA and DGGE: a single generic test for detecting and differentiating Mycoplasma species. J. Med. Microbiol., 54, 731–739 (Маколифф Л., Эллис Р., Лоус Дж., Айлинг Р.Д. и Николас Р.А.Джей (2005). 16S рДНК и DGGE: единый универсальный тест для выявления и дифференциации видов микоплазм. Журнал медицинской микробиологии, 54, 731-739)

[31] CATANIA S., GOBBO F., RODIO S., QUALTIERI K., SANTONE C. & NICHOLAS R.A. (2014). First isolation of Mycoplasma iowae in grey partridge flocks. Avian Dis., 58, 323–325 (Катания С., Гоббо Ф., Родио С., Квалтьери К., Сантоне С. и Николас Р.А. (2014). Первое выделение Mycoplasma iowae в стаях серых куропаток. Болезни птиц, 58, 323-325))

[32] CATANIA S., GOBBO F., RAMIREZ A.S., GUADAGNINI D., BALDASSO E., MORONATO M.L. & NICHOLAS R.A. (2016b). Laboratory investigations into the origin of Mycoplasma synoviae isolated from a lesser flamingo (Phoeniconaias minor). BMC Vet. Res., 12, 52 (doi: 10.1186/s12917-016-0680-1) (Катания С., Гоббо Ф., Рамирес А.С., Гваданьини Д., Бальдассо Э., Моронато М.Л. и Николас Р.А. (2016b). Лабораторные исследования происхождения Mycoplasma synoviae, выделенной от малого фламинго (Phoeniconaias minor). Ветеринарные исследования BMC, 12, 52 (doi: 10.1186/s12917-016-0680-1)

[33] SHAHID M.A., MARKHAM P.F., MARKHAM J.F., MARENDA M.S. & NOORMOHAMMADI A.H. (2013). Mutations in GTP binding protein Obg of Mycoplasma synoviae vaccine strain MS-H: implications in temperature-sensitivity phenotype. PLoS One, 8(9), e73954 (doi: 10.1371/journal.pone.0073954) (Шахид М.А., Маркхэм П.Ф., Маркхэм Дж.Ф., Маренда М.С. и Нурмохаммади А.Х. (2013). Мутации в GTP-связывающем белке Obg вакцинного штамма Mycoplasma synoviae MS-H: влияние на фенотип температурной чувствительности. PLoS One, 8(9), e73954 (doi: 10.1371/journal.pone.0073954))

[34] ZHU L., KONSAK B.M., OLAOGUN O.M., AGNEW-CRUMPTONA R., KANCI A., MARENDA M.S., BROWNING G.F. & NOORMOHAMMADI A.H. (2017). Identification of a new genetic marker in Mycoplasma synoviae vaccine strain MS-H and development of a strategy using polymerase chain reaction and high-resolution melting curve analysis for differentiating MS-H from field strains. Vet. Microbiol., 210, 49–55. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.08.021. Epub 2017 Sep 1 (Чжу Л., Консак Б.М., Олаогун О.М., Агню-Крамптона Р., Канчи А., Маренда М.С., Браунинг Г.Ф. и Нурмохаммади А.Х. (2017).Идентификация нового генетического маркера в вакцинном штамме Mycoplasma synoviae MS-H и разработка стратегии с использованием полимеразной цепной реакции и анализа кривой плавления высокого разрешения для дифференциации MS-H от полевых штаммов. Ветеринарная микробиология , 210, 49-55. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.08.021. Epub, 1 сентября 2017 года.)

[35] GHANEM M. & EL-GAZZAR M. (2018) Development of Mycoplasma synoviae (MS) core genome multilocus sequence typing (cgMLST) scheme. Vet. Microbiol., 218, 84–89 (doi: 10.1016/j.vetmic.2018.03.021) (Ганем М. и Эль-Газзар М. (2018) Разработка схемы мультилокусного типирования последовательности основного генома Mycoplasma synoviae (MS) (cgMLST). Ветеринарная микробиология, 218, 84-89 (doi: 10.1016/j.vetmic.2018.03.021))

[36] KREIZINGER Z., SULYOK K. M, BEKŐ K., KOVÁCS Á. B., GRÓZNER D., FELDE O., MARTON S., BÁNYAI K., CATANIA S., BENČINA D. & GYURANECZ M. (2018). Genotyping Mycoplasma synoviae: Development of a multi-locus variable number of tandem-repeats analysis and comparison with current molecular typing methods. Vet. Microbiol., 226, 41–41 (Крайзингер З., Сулек К. М., Беко К., Ковач А. Б., Грознер Д., Фелде О., Мартон С., Баняй К., Катания С., Бенчина Д. и Гюранеч М. (2018). Генотипирование Mycoplasma synoviae: Разработка мультилокусного анализа с переменным числом тандемных повторов и сравнение с современными методами молекулярного типирования. Ветеринарная микробиология, 226, 41 -41)

[37] BRADBURY J.M. (2005). Workshop of European Mycoplasma Specialists. World Poult. Sci. J., 61, 355–357 (Брэдбери Дж.М. (2005). Семинар европейских специалистов по микоплазме. Всемирный научный журнал по птицеводству, 61, 355-357)

[38] WELCHMAN D. DE B., AINSWORTH H L. JENSEN T.K., BOYE M., KING S.A. KOYLASS M.S. WHATMORE A.M., MANVELL R.J., AYLING R.D. & DALTON J.R. (2013). Demonstration of Ornithobacterium rhinotracheale in pheasants (Phasianus colchicus) with pneumonia and airsacculitis. Avian Pathol., 42, 171–178 (Уэлчман Д. де Б., Эйнсворт Х. Л., Дженсен Т.К., Бойе М., Кинг С.А., Койласс М.С., Уотмор А.М., Манвелл Р.Дж., Айлинг Р.Д. и Далтон Дж.Р. (2013). Демонстрация Ornithobacterium rhinotracheale у фазанов (Phasianus colchicus) с пневмонией и аэроаккулитом. Патология птиц, 42, 171-178.)

[39] ALLAN W.H. & GOUGH R.E. (1974). A standard haemagglutination test for Newcastle disease. 1. A comparison of macro and micro methods. Vet. Rec., 95, 120–123 (Аллан У.Х. и Гоф Р.Э. (1974). Стандартный тест на гемагглютинацию при болезни Ньюкасла. 1. Сравнение макро- и микро-методов. Ветеринарная микробиология, 95, 120-123)

[40] KLEVEN S.H., MORROW C.J. & WHITHEAR K.G. (1988). Comparison of Mycoplasma gallisepticum strains by hemagglutination-inhibition and restriction endonuclease analysis. Avian Dis., 32, 731–741 (Клевен С.Х., Морроу К.Дж. и Уитхир К.Г. (1988). Сравнение штаммов Mycoplasma gallisepticum методом ингибирования гемагглютинации и анализа эндонуклеазы рестрикции. Болезни птиц, 32, 731-741)

[41] KLEVEN S.H. (2008). Control of avian mycoplasma infections in commercial poultry. Avian Dis., 52, 367–374 (Клевен С.Х. (2008). Борьба с инфекциями микоплазмы птиц у коммерческой птицы. Болезни птиц, 52, 367-374)

[42] KREIZINGER Z., SULYOK K.M., GRÓZNER D., BEKŐ K., DÁN Á., SZABÓ Z. & GYURANECZ M. (2017). Development of mismatch amplification mutation assays for the differentiation of MS1 vaccine strain from wild-type Mycoplasma synoviae and MS-H vaccine strains. PLoS One., 12, e0175969 (doi: 10.1371/journal.pone.0175969) (Крайзингер З., Сулек К.М., Грознер Д., Беко К., Дан А., Сабо З. и Гюранеч М. (2017). Разработка анализа мутаций с амплификацией несоответствия для дифференциации вакцинного штамма MS1 от вакцинных штаммов Mycoplasma synoviae дикого типа и MS-H. PLoS One.,12, e0175969 (doi: 10.1371/journal.pone.0175969))

[43] Chapter 1.1.8 Principles of veterinary vaccine production (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022) (Глава 1.1.8 Принципы производства ветеринарных вакцин (Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных, 2022))

[44] WHITHEAR K.G. (1996). Control of avian mycoplasmoses by vaccination. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 15, 1527–1553 (Уитхир К.Г. (1996). Борьба с микоплазмозами птиц путем вакцинации. Научно-технический обзор 15,1527-1553.)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  | **МКС 11.220** |
| **Ключевые слова:** Инфекция MG и MS, электрофорез, молекулярное типирование, метод культивирования, валидация вакцины | | |

|  |  |
| --- | --- |
|  | **МКС 11.220** |
| **Ключевые слова:** Инфекция MG и MS, электрофорез, молекулярное типирование, метод культивирования, валидация вакцины | |

**Разработчик:**

Республиканское государственное предприятие «Казахстанский институт стандартизации и метрологии» Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

**Заместитель**

**Генерального директора Е. Амираханова**

**Руководитель**

**Департамента разработки НТД А. Сопбеков**

**Специалист Департамента разработки НТД А. Берік**

1. Рекомендуется сочетание методов идентификации возбудителя, применяемых к одному и тому же клиническому образцу. [↑](#footnote-ref-1)
2. Национальное агентство по санитарной безопасности питания, окружающей среды и труда (Anses) Плуфраган, Микоплазмологическое бактериологическое отделение, 22440 Плуфраган, Франция. [↑](#footnote-ref-2)