

УДК 619:579.887.111:636.5

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *M. HYOPNEUMONIAE* НА РАЗВИВАЮЩИХСЯ КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ

М. М. Мистейко

*Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышесского НАН Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь*

*The purpose of our research was to carry out the experiment on adaptation *M. hyopneumoniae* to the developing chicken embryos. In the experiment *Mycoplasma hyopneumoniae* strain brought up on a broth was used. Its adaptation was carried out on seven and eleven day time developing chicken embryos. Before infection an egg-shell above a place of introduction of a material processed spirit, burnt, then processed a weak solution of iodine and again burnt.*

В последние годы среди болезней инфекционной патологии широкое распространение получил микоплазмоз свиней. Исследованиями, проведенными в нашей стране и за рубежом, установлено, что основным возбудителем этой болезни является *M. hyopneumoniae* [1].

Возбудитель болезни энзоотической пневмонии свиней отличается медленной репликацией (8–20 дней) и высокой требовательностью к питательным средам. Будучи факультативными паразитами, микоплазмы зависят от хозяина по широкому спектру питательных веществ, поэтому растут на комплексной среде, в которой роль большинства компонентов определить сложно.

Для культивирования *Mycoplasma hyopneumoniae* обычно используются жидкие питательные среды (ППЛЮ бульон, среда Friis, среда Мартена, гидролизат сердечной мышцы КРС). Применяемый метод культивирования обеспечивает медленное получение биомассы антигена микоплазм, необходимого для приготовления вакцины. Поэтому возникает необходимость изыскания нового метода культивирования микоплазм, который обеспечит максимально быстрое накопление биомассы.

Новый метод получения вакцины против микоплазмоза свиней на основе штамма *M. hyopneumoniae*, выращиваемого на развивающихся куриных эмбрионах, был предложен исследователями из Китая. Протективные свойства определяли на 111 свиньях. Авторами было отмечено, что 81,8% свиней спустя 60 дней после иммунизации оказались устойчивыми к заражению. У контрольных не привитых животных на вскрытии были типичные для *M. hyopneumoniae* повреждения легкого. Производственное испытание показало, что вакцина была безопасна и эффективна для профилактики респираторного микоплазмоза свиней [2].

Цель нашего исследования – адаптировать штамм *M. hyopneumoniae* к культивированию на развивающихся куриных эмбрионах.

Материалы и методы исследования. В работе использовали штамм *Mycoplasma hyopneumoniae*, выращенный на среде Мартена. Перед заражением скорлупу яйца над местом введения материала обрабатывали спиртом, обжигали, затем обрабатывали слабым раствором йода и вновь обжигали.

Первым экспериментальным способом заражения был в амниотическую полость. Для заражения использовали 6- и 10-дневные эмбрионы. Отбирали такие эмбрионы, у которых зародыш был близко расположен к воздушному пространству. Для введения материала в амнион в центре воздушной камеры производили прокол скорлупы. Через образовавшееся отверстие иглу шприца вводили на 0,8–1,2 см ниже границы воздушной камеры. Под легким давлением иглу вводили в амниотическую полость, куда инъецировали микоплазмодержащий материал в дозе 0,1–0,3 мл, содержащий 1×10^9 КОЕ/мл. После заражения отверстие в скорлупе заливали стерильным парафином.

Во втором опыте использовали способ заражения в аллантаисную полость. Возраст куриных эмбрионов был 11 суток. Для введения микоплазмосодержащего материала делали прокол в скорлупе над центром воздушной камеры. Через отверстие шприцем с короткой иглой, который держали в вертикальном положении, вводили микоплазмосодержащий материал в дозе 0,1–0,5 мл, содержащий 109 КОЕ/мл микоплазм на 2–3 мм ниже границы воздушной камеры. Затем отверстие в скорлупе заливали стерильным парафином.

Третьим экспериментальным способом заражения был на хорион-аллантаисную оболочку. Для этой цели использовали 11–14-дневные РКЭ. В центре воздушной камеры снимали часть скорлупы и в результате обнажали подскорлупную оболочку. Ее приподнимали и удаляли – обнажалась прозрачная, блестящая, красная, пронизанная кровеносными сосудами хорион-аллантаисная оболочка. На ее пипеткой наносили микоплазмосодержащий материал в дозе 0,1–0,2 мл, содержащий 1×10^9 КОЕ/мл. После этого окошечко в скорлупе закрывали стерильным покровным стеклом, края заливали стерильным парафином.

Куриные эмбрионы выдерживали в термостате. Перед вскрытием их на 2–3 ч помещали в холодильник при 4–6 °С. При охлаждении кровеносные сосуды сокращались, что предупреждало кровотечение в процессе вскрытия эмбрионов.

Для получения аллантаисной и амниотической жидкости удаляли скорлупу, оставшуюся подскорлупную оболочку и через прокол в хорион-аллантаисной оболочке пастеровской пипеткой, избегая повреждения сосудов, отсасывали 6–10 мл прозрачной аллантаисной жидкости. После этого пинцетом захватывали эмбрион, пастеровской пипеткой прокалывали амниотическую оболочку и отсасывали амниотическую жидкость (0,5–1,5 мл).

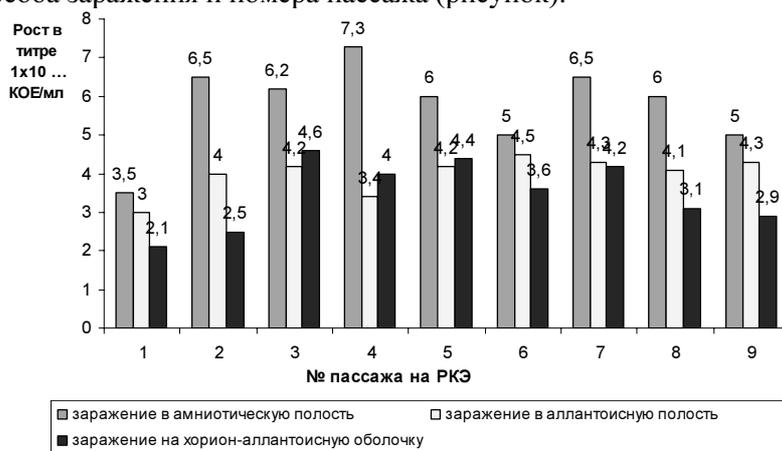
Хорион-аллантаисную оболочку помещали в стерильную чашку Петри, тщательно расправляли и макроскопически исследовали на темном фоне. Затем отделяли эмбрион, разрезали оболочку желточного мешка, освобождали ее от желтка, промывали физиологическим раствором и также помещали в отдельную чашку Петри.

Материал, взятый из куриных эмбрионов, обязательно проверяли на присутствие бактерий на МПА, МПБ, среде Китт-Тароцци и агаре Сабуро.

Контроль накопления *M. hyopneumoniae* в аллантаисной и амниотической жидкости проводили путем посева на агар Мартена. Культивирование производили в CO₂ – инкубаторе при 37°С в течении 5–9 суток.

Результаты и их обсуждение. В процессе опыта при макроскопическом исследовании куриных эмбрионов наблюдались кровоизлияния на теле и оболочках желточного мешка куриных эмбрионов. Отставаний в росте, отечности, застойных явлений в сосудах лапок и крыльев не было выявлено.

Установлено, что культивирование штамма *M. hyopneumoniae* возможно проводить на РКЭ при заражении их на хорион-аллантаисную оболочку, в амниотическую и аллантаисную полость. При этом микоплазмы накапливаются в аллантаисной и амниотической жидкости. В процессе проведения последовательных пересевов количество колоний постоянно изменялось в зависимости от способа заражения и номера пассажа (рисунок).



Рост *M. hyopneumoniae* на РКЭ при заражении разными способами

Низкий рост наблюдался при первичном заражении эмбрионов всеми способами. Так, при заражении в амниотическую полость с первого по четвертый пассаж наблюдалось увеличение титра до $10^{7.3}$ КОЕ/мл, а средний показатель составил $10^{5.7}$ КОЕ/мл.

Заражение в аллантоисную полость и на хорион-аллантоисную оболочку показало более низкий рост микоплазмы. Он составил в среднем 10^4 КОЕ/мл при заражении в аллантоисную полость и $10^{3.5}$ КОЕ/мл при заражении на хорион-аллантоисную оболочку.

Выводы

Результаты проведенных исследований показали, что из всех способов заражения наилучшее накопление биомассы происходит в аллантоисной жидкости при заражении в амниотическую полость и составил в среднем $10^{5.7}$ КОЕ/мл.

Литература

1. Андросик Н. Н., Тяпша Ю. И., Аксенов А. М. Особенности инфекционного процесса при микоплазмозе свиней // Ветеринарная медицина Беларуси. – 2002. – № 4. – С. 14–16.
2. Wang G. M, Ding Q. Y, Li J. G et al. Studies on an attenuated vaccine against mycoplasmal pneumonia of swine// China National Control Institute of Veterinary Bioproducts and Pharmaceuticals, Beijing, China. Scientia-Agricultura-Sinica. 1990. – P. 1–8.