Как искать болезни?

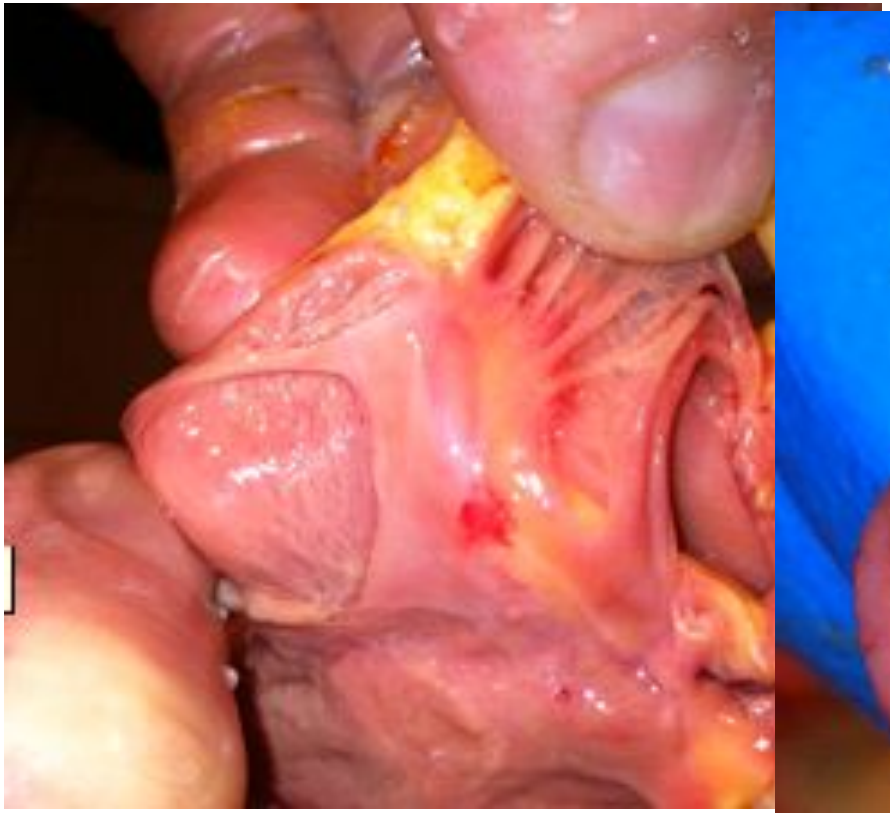
Докладчик: Афонюшкин Василий
Сектор молекулярной биологии Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН, лаборатория фармакогеномики Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

E-mail lisocim@mail.ru
С.т. 89231176461

Осмотр и вскрытие

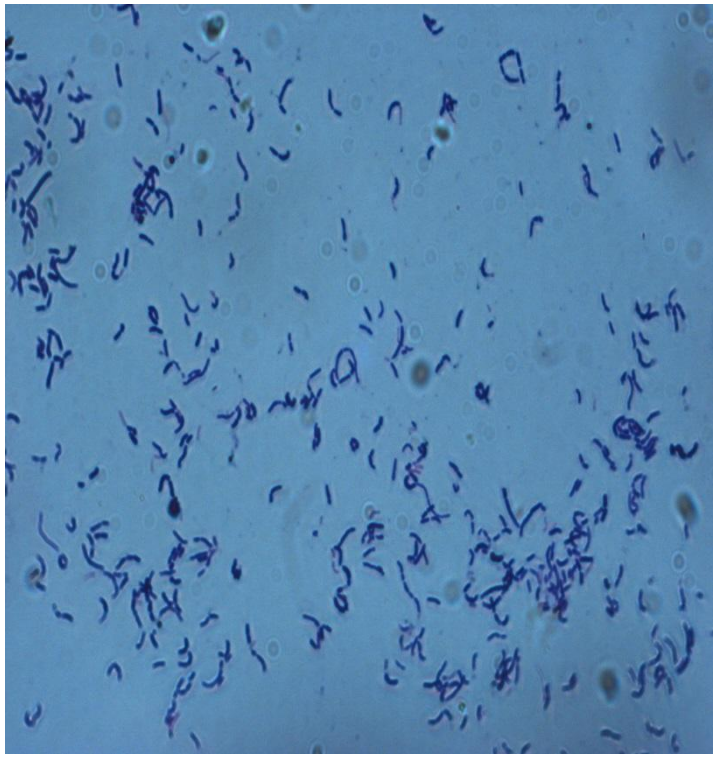
Бактериальный эндокардит

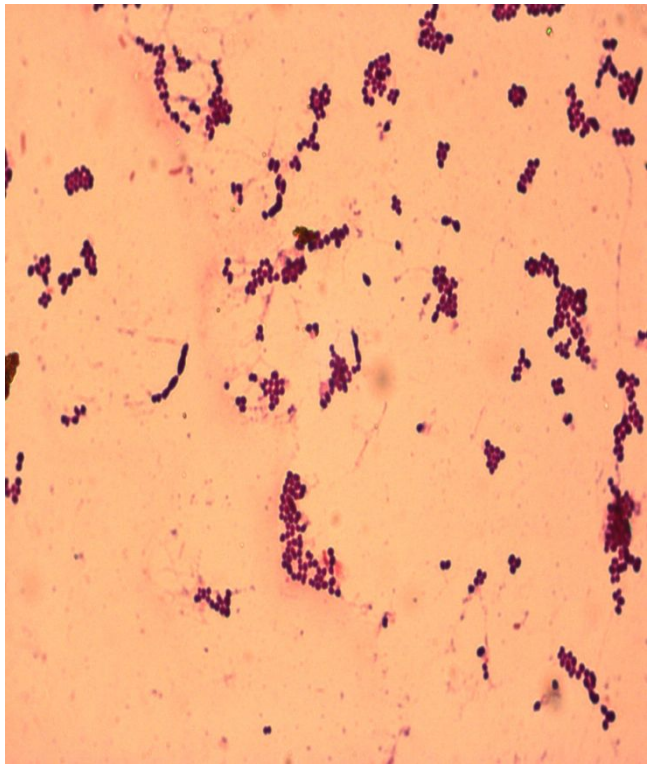
- Ассоциируемость «бактериальных эндокардитов» с гибелью птиц на птицефабриках



- Кровоизлияния (петехии и экхимозы) на эндокарде, образование тромбов на клапанах

Смотрим мазки отпечатки из органов чтобы потом сопоставить с мазками из культур

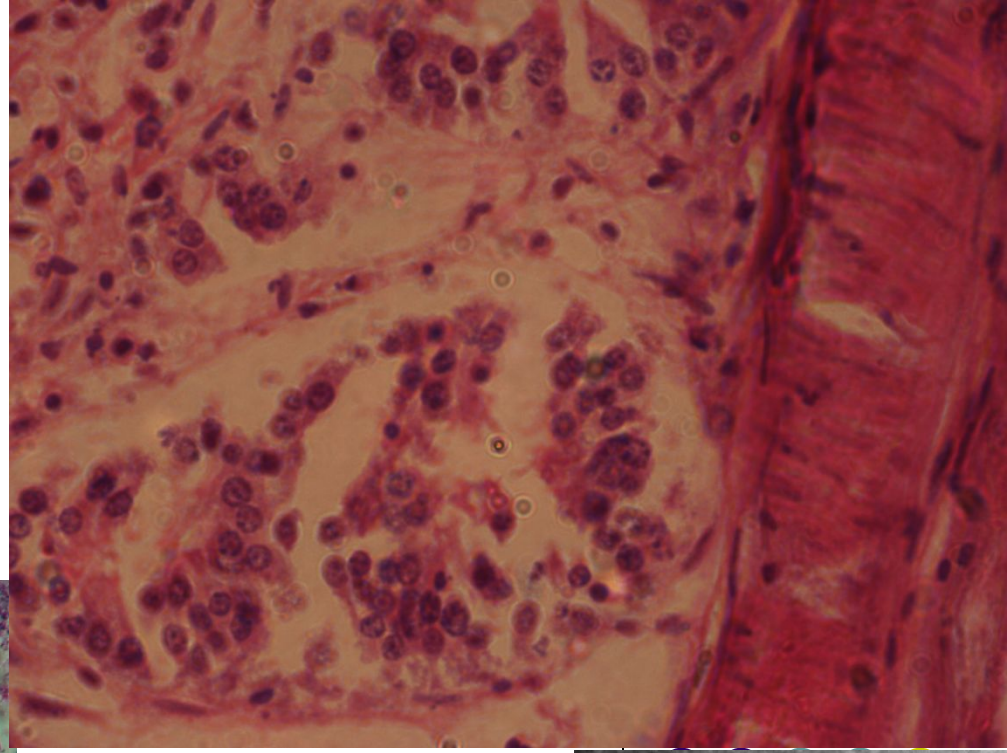


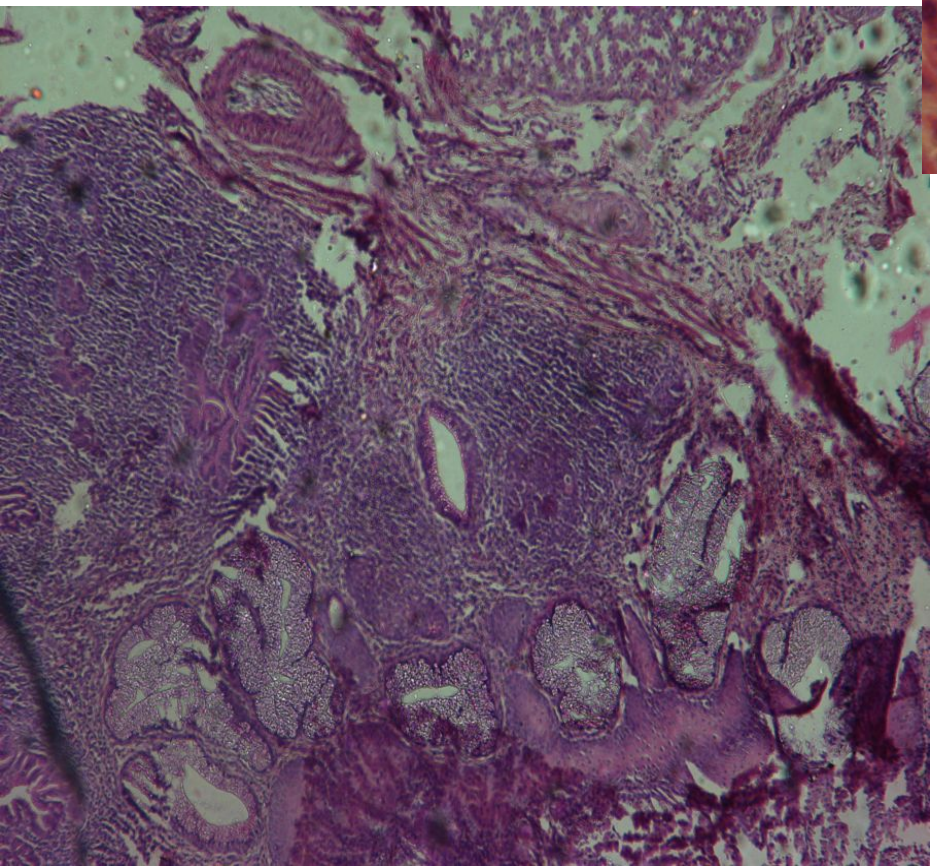


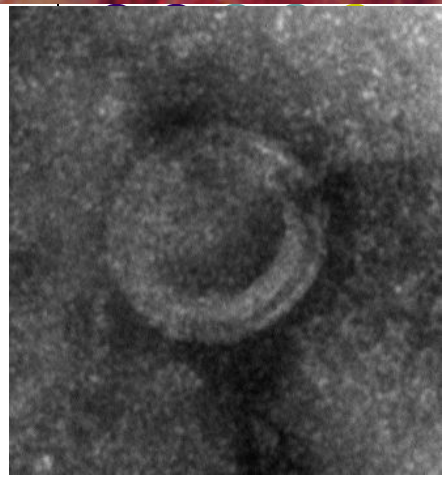
- Полиморфные грамположительные бактерии (неоднородно окрашиваются по грамму) форма бактерий варьирует от цепочек кокков до длинных нитей. Палочки часто искривлены, имеют неравную толщину.

Гистология и электронная микроскопия

Поражение крипт в слизистой тощей кишки, образование синцитиев







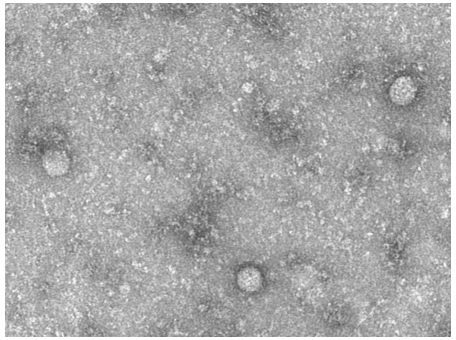
Хроническое интерстициальное воспаление железистого желудка

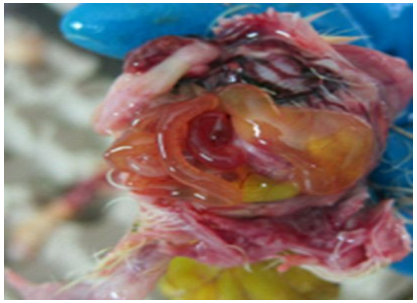
Как их искать? Поражения желудка и кишечника вирусной этиологии: флавивирусная инфекция. Статистика по часто встречающимся однотипным случаям

- Рубцовая деформация поджелудочной железы после переболевания панкреатитом

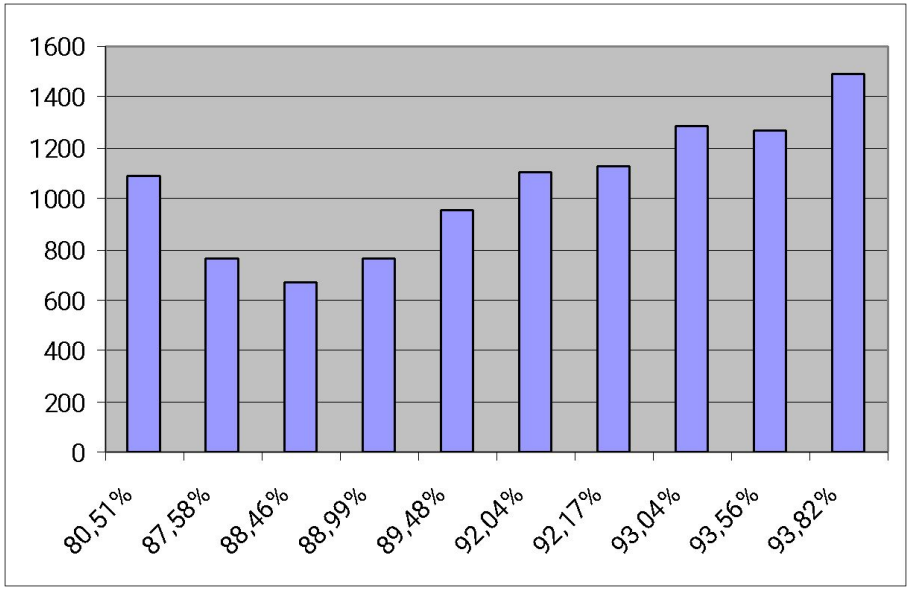
- Язвенные поражения кутикулы мышечного желудка

- Патология ассоциируется с обнаружением в кишечном содержимом вирусных частиц с одинаковой морфологией





- Прозрачное содержимое в просвете толстого отдела кишечника накапливается в связи с поражением кровеносных сосудов в подслизистом слое толстого отдела кишечника



Различия уровней антител (igM) к вирусу МПВИ в птичниках с разным уровнем смертности

Разные варианты статистического анализа

Параметр	Низкая сохранность	Высокая сохранность
М сохранность	87,00%	92,93%
М титры	849,6	1254,2
Р (титры)=	0,0044128	
корреляция (по Пирсону)	0,491737	
корреляция (по Спирмену)	0.85	
Odds ratio (отношение шансов)	33.0000	P = 0.0460

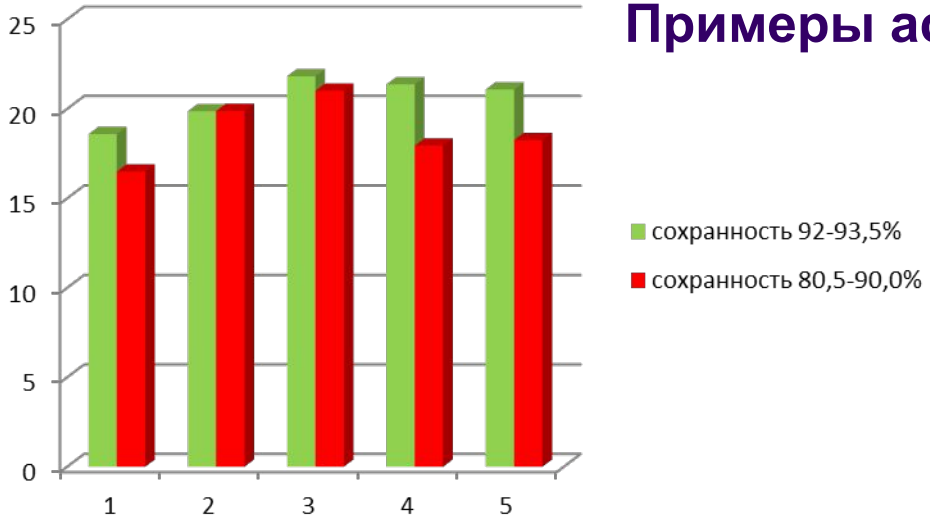
Odds ratio (отношение шансов) можно рассчитать на этом сайте https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php Корреляцию по Спирмену можно рассчитать на этом сайте http://math.semestr.ru/corel/spirmen.php

Так как метапневмовирусная инфекция проявляется у бройлеров незадолго до убоя, то обнаружение антител класса igY(G) представляется проблематичным а их уровни в большей степени зависят не от вирусной нагрузки, а от времени контакта птицы с возбудителем

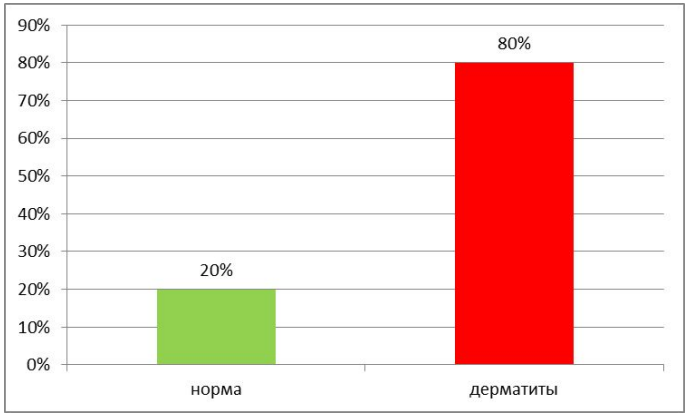
Большое количество птичников, в сочетании с отсутствием возможности пресекать циркуляцию инфекционных агентов методом пусто-занято, обеспечивают хорошую воспроизводимость инфекционных процессов, что позволяет экстраполировать данные с нескольких птичников на все остальное поголовье.
Эта же проблема позволяет одновременно отбирать образцы из птичников с разными показателями (сохранность, продуктивность) и сравнивать их по результатам лабораторных исследований.

- Таким образом, следует разделять серологические исследования (а также ПЦР и биохимии) на мониторинговые, скрининговые и ассоциативные.

Примеры ассоциативных исследований

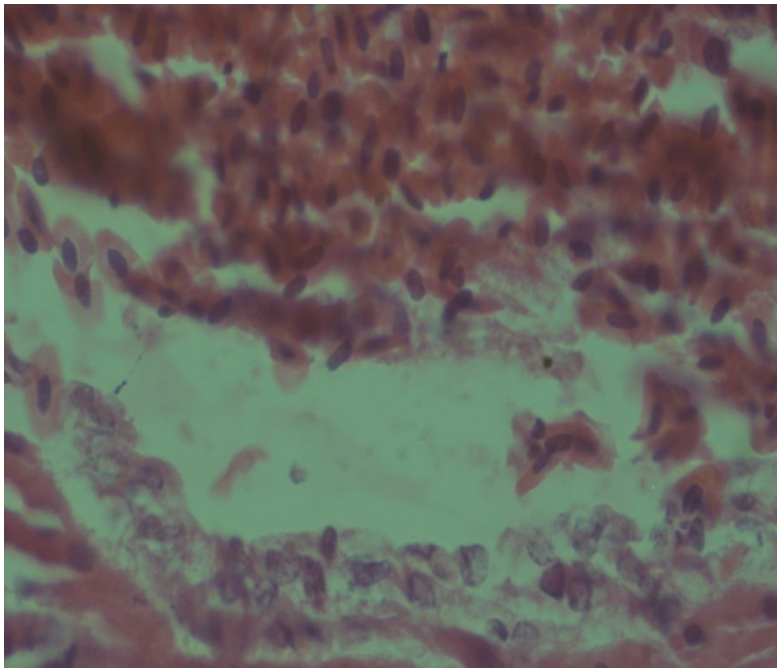


- Рис. 1 Уровни альбумина в крови в двух группах птичников с наибольшей и наименьшей сохранностью. На фоне астровирусного нефрита цыплят



- Рис. 2. Инфицированность селезенки ВБМ у цыплят с дерматитами и без дерматитов

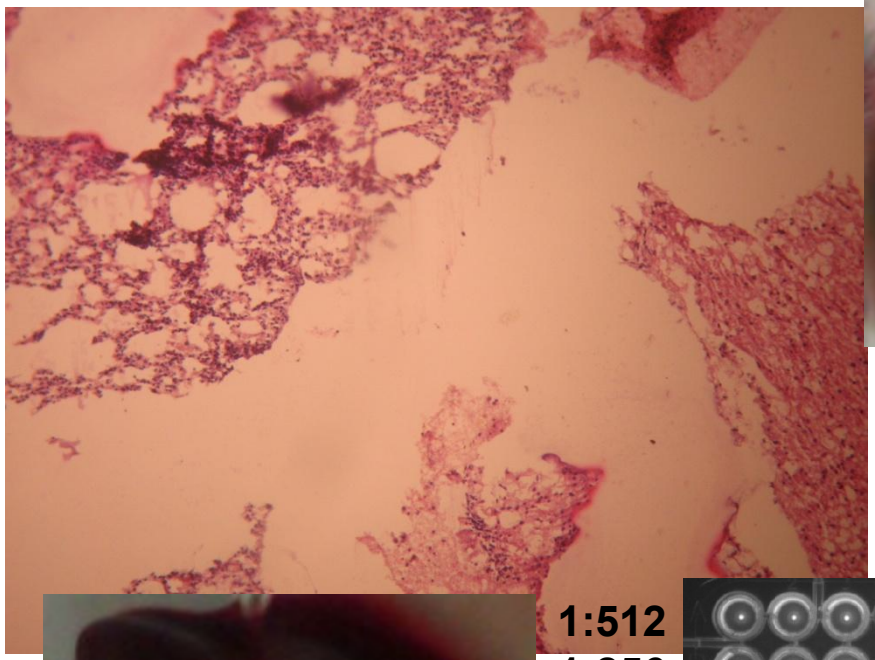
Понимание механизма гибели – разработка метода лечения



- Единичная бактерия на стенке кровеносного сосуда в легком

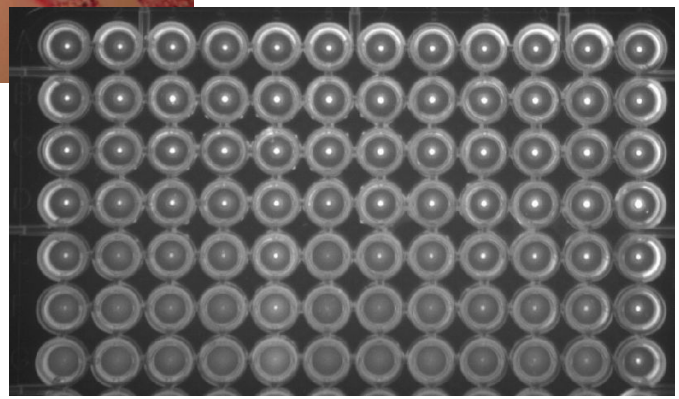
- Очаговая пневмония – крайне не характерное у птиц явление. Причина – васкулит и гиперемия обслуживаемого данным сосудом участка легких

Воспроизведение на восприимчивых животных, обнаружение антител

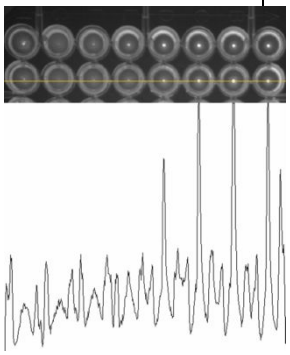


Изменения в легких и селез
инфицированных мышей

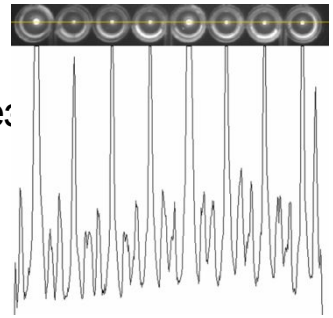
1:512
1:256
1:128
1:64
1:32
1:16
1:8



- ОПЫТ
- КОНТРОЛЬ



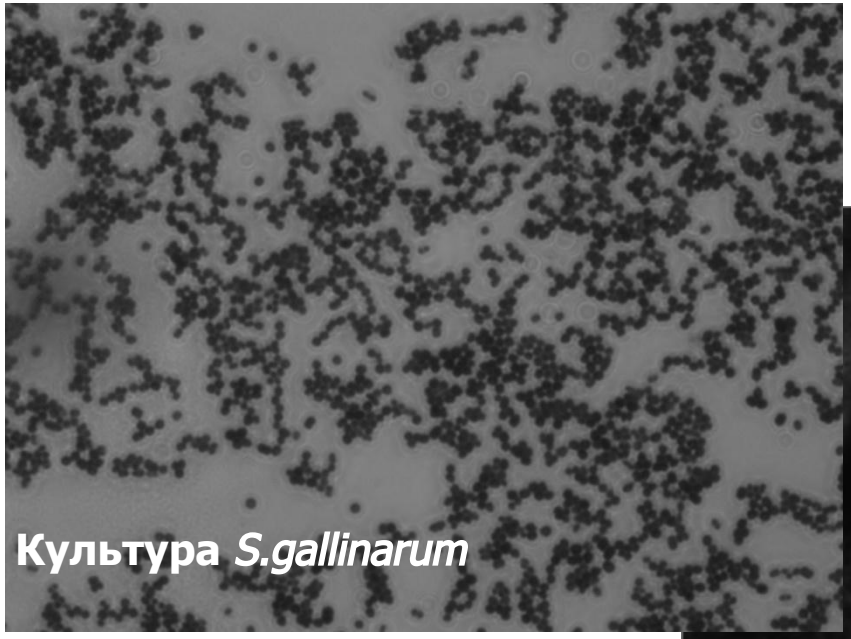
- -



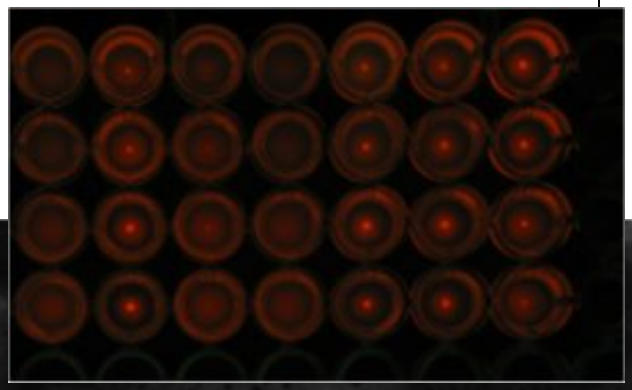
- +

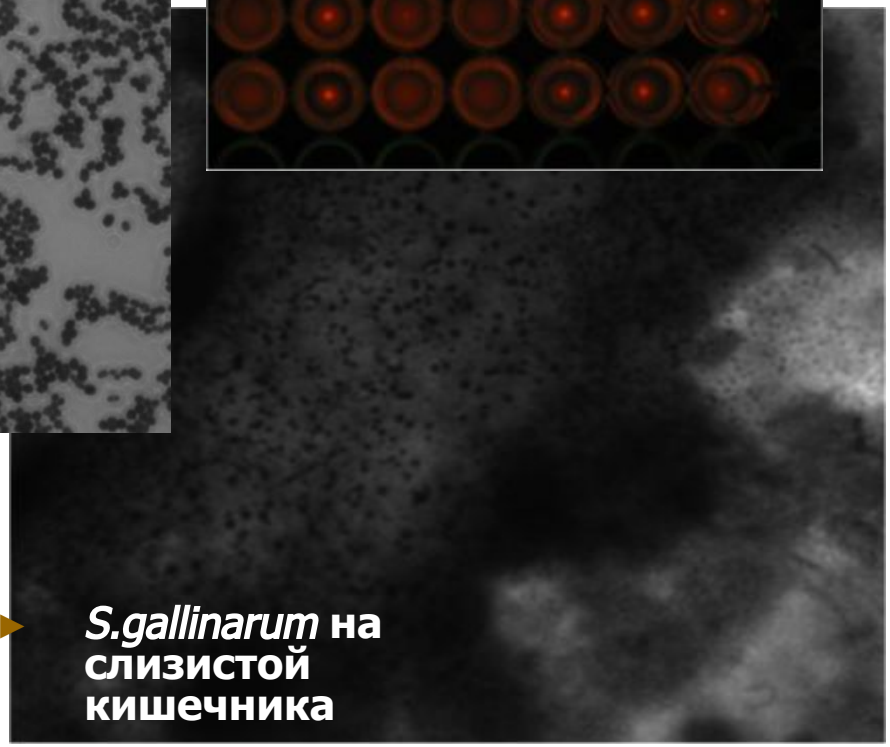
Появление специфических антител в иммунофлюоресцентном варианте РА

Массовые эпизоотии в Сибири вызванные *S.gallinarum в 2010г.*



- **Культура *S.gallinarum***





- ***S.gallinarum* на слизистой кишечника**

Принципы отбора проб на ПЦР

- Необходимо избежать перекрестной контаминации – ДНК очень стабильна и разрушается сильным нагреванием выше 100 градусов – нужно тщательно обжигать ножницы и пинцеты. Птицу желательно разрывать не касаясь мест отбора проб руками. Пробы нужно помещать в одноразовые пробирки или пользоваться одноразовыми тампонами
- РНК намного менее стабильна и быстро разрушается поэтому ее нужно хранить в замороженном состоянии (-20°C) или используя специальные консерванты (РНК вирусы: ИБК, МПВИ, ИББ, НБ, гриппа, флавивирусы).
- Для проверки генетической структуры поголовья мы рекомендуем в присутствии представителя компании поставщика отобрать 200 проб крови и хранить в морозилке до наступления проблем (снижения продуктивности, расслоения стада по фенотипу) после этого следует комиссионно отобрать еще 200 проб крови и сравнить генетическую структуру и однородность стад – они не должны существенно различаться.

Оценка авидности антител для диагностики болезни Гамборо в ИФА

Таблица 1.Авидность антител в стадах благополучных и неблагополучных по Гамборо

№п/п	Авидность%	группа
1	17,91	Неблагополучная группа по некротическому провентрикулиту, убой
2	19,89	
3	12,57	
4	18,32	
5	28,36	
6	13,81	
7	19,69	
8	16,45	
9	15,91	
10	24,38	
11	37,48	Благополучный птичник, провакцинированный
12	43,84	
13	44,62	
14	30,87	
15	34,53	
16	45,6	
17	52,99	
18	40,07	
19	50,39	
20	43,25	

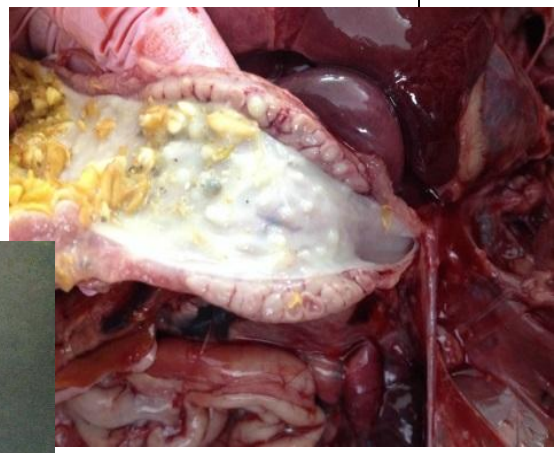
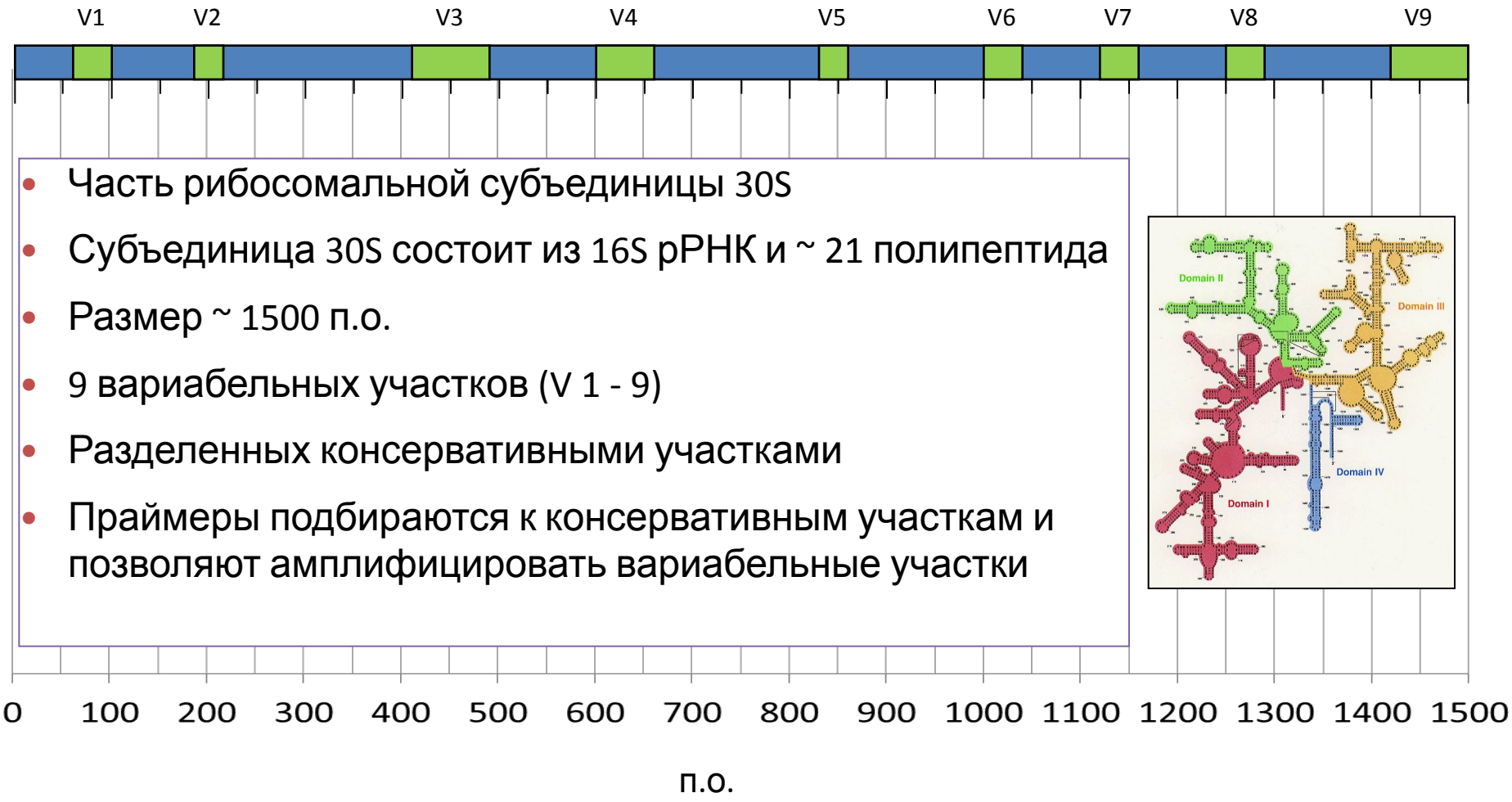


Рис. 3, 4 Гамборо ассоциирующееся с провентрикулитом и снижением массы тушки (некротический провентрикулит).

Что такое дифференциальная диагностика? Например, дифференциальная диагностика при поражениях бурсы Фабрициуса

Признаки заболевания	Гамборо	Афлатоксикоз	Некротический провентрикулит	Аденовирусные инфекции	Флавивирусная инфекция
Атрофия бурсы	+	+	+	+	+
Воспаление бурсы Фабрициуса	+	-	+	+	+
Кровоизлияния на мышцах	+	-	-	-	-
Провентрикулит с утолщением стенки желудка	+-	-	+	+	-
Ураты в почках	+	-	-	-	-

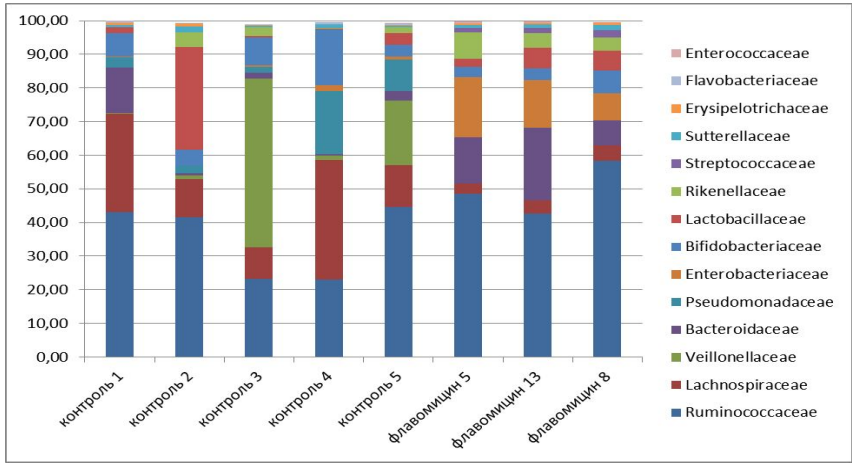
Структура16S рДНК
Консервативные и вариабельные участки

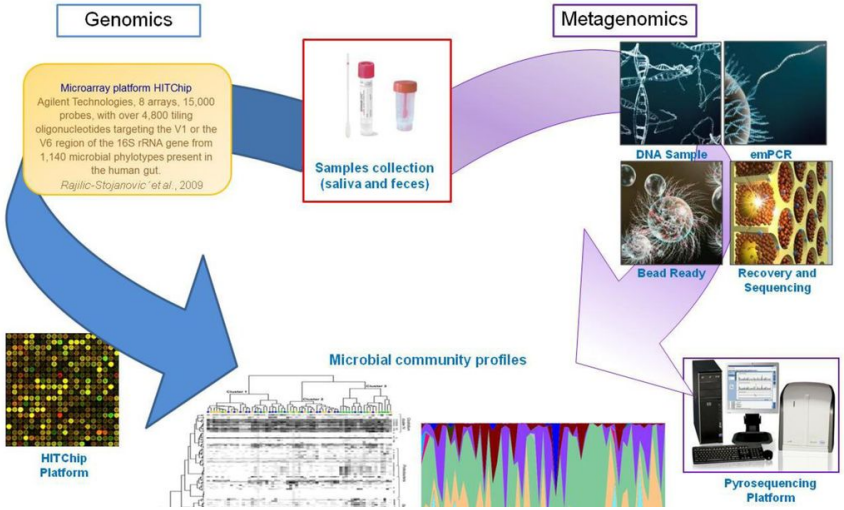


- Часть рибосомальной субъединицы 30S
- Субъединица 30S состоит из 16S рРНК и ~ 21 полипептида
- Размер ~ 1500 п.о.
- 9 вариабельных участков (V 1 - 9)
- Разделенных консервативными участками
- Праймеры подбираются к консервативным участкам и позволяют амплифицировать вариабельные участки

Изучение кишечного микробиоценоза молекулярными методами – NGS 16S rRNA

	контроль					Кормовой антибиотик		
	контроль 1	контроль 2	контроль 3	контроль 4	контроль 5			
Ruminococcaceae	43,17	41,57	23,18	23,11	44,53	48,48	42,67	58,45
Lachnospiraceae	29,21	11,41	9,32	35,38	12,53	3,22	3,82	4,41
Veillonellaceae	0,09	1,10	50,30	1,35	19,20	0,00	0,00	0,00
Bacteroidaceae	13,56	0,59	1,66	0,51	2,72	13,67	21,65	7,56
Pseudomonadaceae	3,15	2,11	1,78	18,78	9,38	0,00	0,00	0,00
Enterobacteriaceae	0,10	0,15	0,48	1,80	1,04	17,83	14,24	8,03
Bifidobacteriaceae	7,07	4,76	8,34	16,48	3,53	3,17	3,40	6,78
Lactobacillaceae	1,64	30,51	0,42	0,23	3,42	2,31	6,07	5,88
Rikenellaceae	0,02	4,44	2,64	0,31	1,74	7,90	4,44	3,99
Streptococcaceae	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	1,17	1,65	2,18
Sutterellaceae	0,68	1,73	0,44	0,98	0,43	0,88	0,90	1,33
Erysipelotrichaceae	0,78	0,86	0,21	0,05	0,24	0,52	0,57	0,71
Flavobacteriaceae	0,25	0,15	0,08	0,65	0,43	0,00	0,00	0,00
Enterococcaceae	0,01	0,00	0,00	0,00	0,02	0,61	0,29	0,04
Campylobacteraceae	0,00	0,00	0,07	0,07	0,37	0,00	0,00	0,00
Porphyromonadaceae	0,00	0,11	0,75	0,08	0,05	0,01	0,03	0,07
Desulfovibrionaceae	0,00	0,28	0,25	0,03	0,20	0,05	0,07	0,04
Anaeroplasmataceae	0,00	0,06	0,00	0,00	0,07	0,04	0,05	0,22
Coriobacteriaceae	0,15	0,06	0,02	0,10	0,07	0,10	0,05	0,10
SAR11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06
Peptostreptococcaceae	0,02	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,03	0,08
Eubacteriaceae	0,03	0,11	0,01	0,03	0,03	0,02	0,03	0,06
Xanthomonadaceae	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
Phylobacteriaceae	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
Corynebacteriaceae	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01
Moraxellaceae	0,03	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
Alcaligenaceae	0,01	0,00	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
Microbacteriaceae	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
Family II	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bacillaceae 2	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Burkholderiaceae	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00



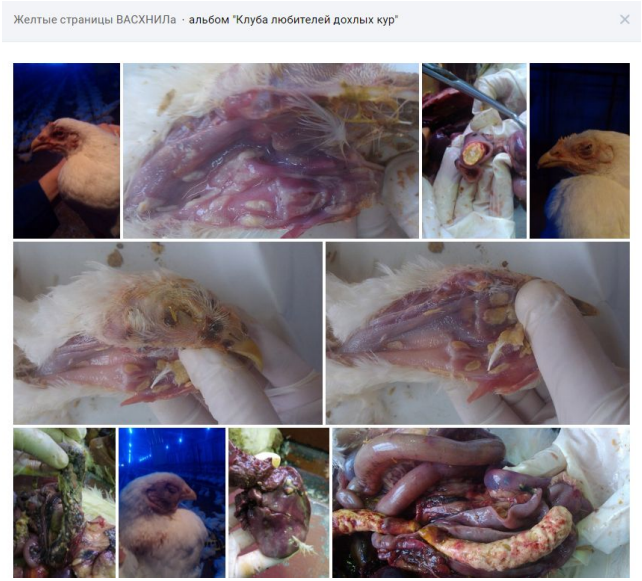


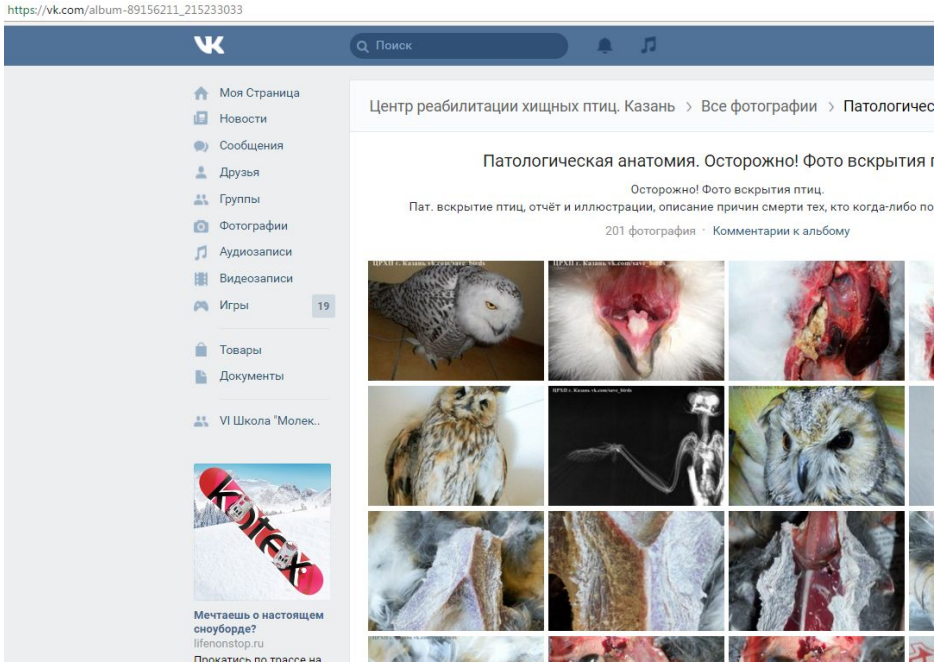
Основной тезис – нууу, эээ красивенько в общем. В принципе есть и некоторые данные…

Но всего нужнее понять какие нужны антибиотики

Прижизненная диагностика редко бывает эффективна. Лучше сеять из свежего трупа. Желательно из органов где бактерии, в норме, встречаются редко. Сердце, печень, селезенка.

Надежнее всего накопление данных по клинической эффективности. Точный диагноз + интернет=излечение

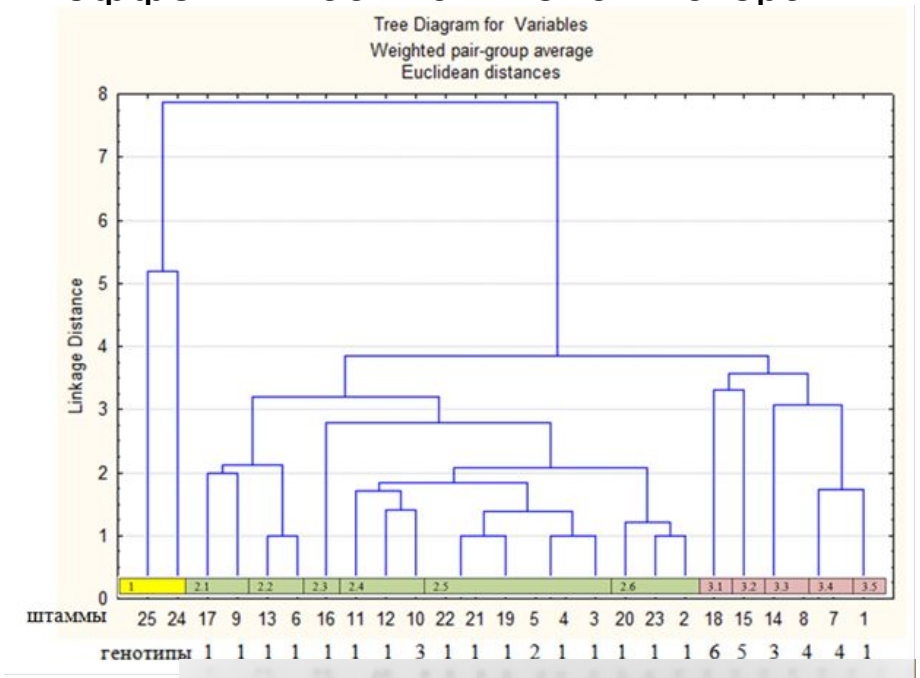


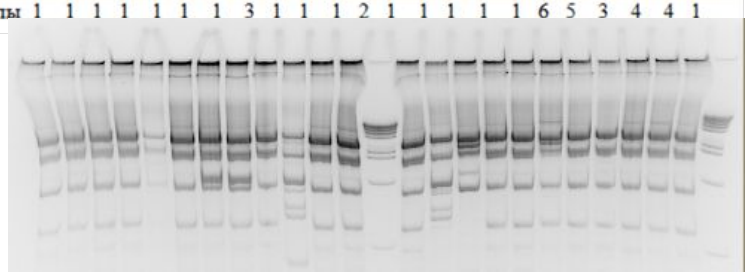


Зачем нужна молекулярная эпидемиология ? Какое имеет она отношение к эффективности антибиотикотерапии?

Антибиотикограмма 7 изолятов E.coli, мм

	Антибиотик	1	2	3	4	5	6	7
1	Тиамулин	0	0	0	0	0	0	0
2	Тилозин	13	14	14	0	0	13	14
3	Флорфеникол	24	20	28	32	30	20	21
4	Дитрим	0	0	0	0	0	0	0
5	Доксициклин	12	12	14	15	12	11	10
6	Окситетрациклин	0	0	0	0	0	0	0
7	Энрофлоксацин	0	0	0	0	0	0	0
8	Тилмикозин	0	0	0	0	0	0	0
9	Гентамицин	12	12	0	0	0	12	13
10	Норфлоксацин	0	0	0	0	0	0	0
11	Амоксициклин	0	0	0	0	0	0	0
12	Колистин	16	16	16	15	15	14	17



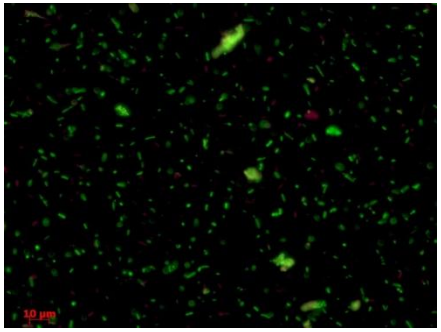


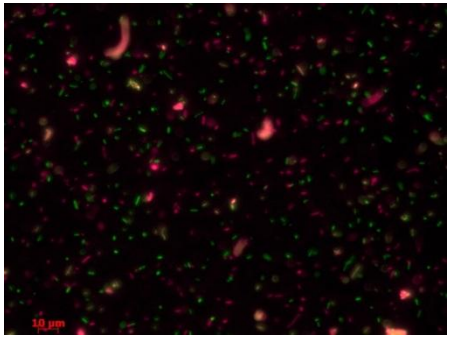
В кишечнике много биоваров E.coli – если при сходных патологиях выделяется преимущественно один биовар то, скорее всего, он имеет эпизоотическое/эпидемическое значение

Сопоставление изолятов кишечной палочки по профилю антибиотикорезистентности, мм

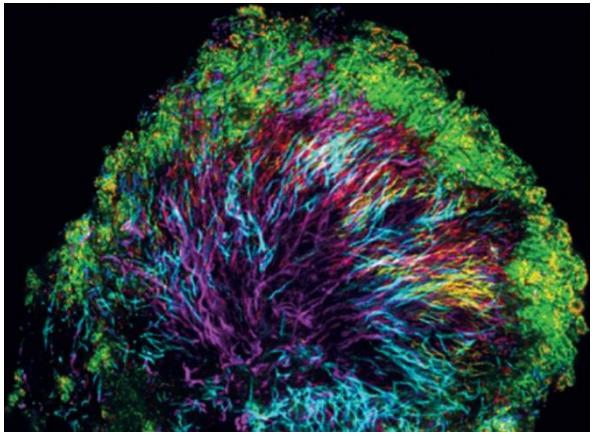
Основной тезис – очень часто микробиологи выделяют «не ту бактерию» и тогда врачи назначают «не тот антибиотик». Выявление эпидемически значимых штаммов позволяет сформировать группу антибиотиков первого выбора для определенной территории

Оценка устойчивости микробиоценозов к антибактериальным препаратам



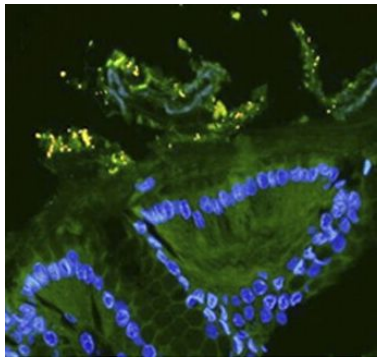


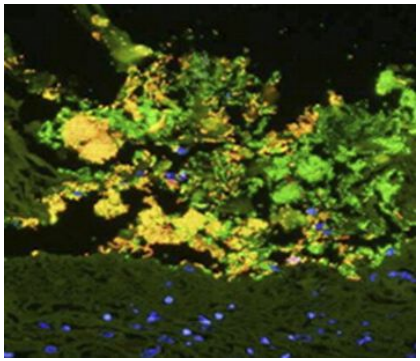
- **Кишечное содержимое до выпойки антибактериального препарата**
- **Кишечное содержимое после выпойки антибактериального препарата**



Microbial consortium in human dental plaque. Image courtesy of G. G. Borisy and dx.doi.org/10.1073/pnas.1522149113 (2016) J. L. Mark Welch, The Forsyth Institute, Cambridge, Massachusetts, USA.

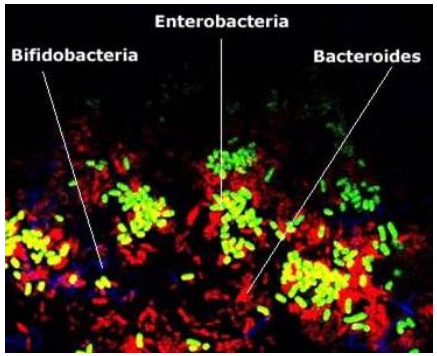
FISH





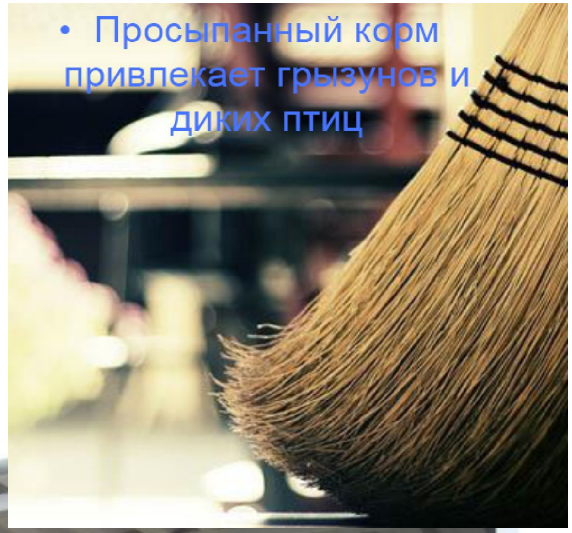
FISH shows abundant bacteria in close apposition to the equine gastric mucosa. Histologic sections from the glandular, and ulcerated mucosa were examined using labeled oligonucleotide probes directed against bacteria in general (EUB-338, 6-FAM, green) in combination with probes directed against *Streptococcus* spp. (Cy-3).

- Appl. Environ. Microbiol. **April 2012** vol. 78 no. 8 **2522-2532**



Выявление кишечных бактерий отдельных родов в искусственной среде, моделирующей кишечную микробиоту. Применен метод FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) – гибридизация тестовой ДНК непосредственно в пробе с окрашиванием различными флюоресцентными метками (заимствовано с сайта University of Dundee, Scottland)

И еще виноваты во всем..



- Уничтожить насекомых [и грызунов]/ инсектицид
- Убрать пыль/ вода под низким давлением
- Разобрать оборудование
- Убрать подстилку/убрать помет/ накрыть транспортное средство
- Мокрая чистка/моющие средства/ горячая вода/ высокое давление

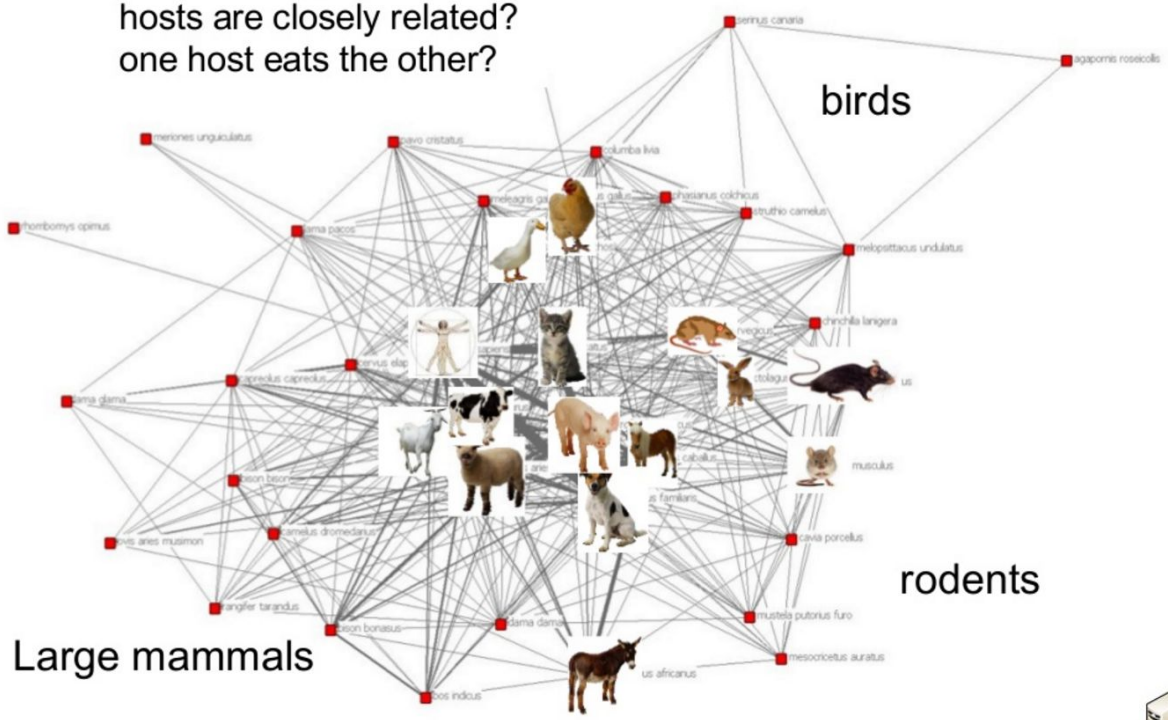
1. ***Дезинфекция по грязному***
2. ***Мойка***
3. ***Заключительная дезинфекция***
4. ***Биопауза (иногда удаление дезинфектанта повторной мойкой)***
5. ***Дезинфекция в присутствии птицы, санация системы водопоения в присутствии птицы***

Санация линий кормораздачи в птичниках и санация норий и шнеков на ко мбикормовых заводах

Добавление споровых пробиотиков в моющие средства

Why are pathogens shared?

Are pathogens shared because:
- hosts live together?
- hosts are closely related?
- one host eats the other?

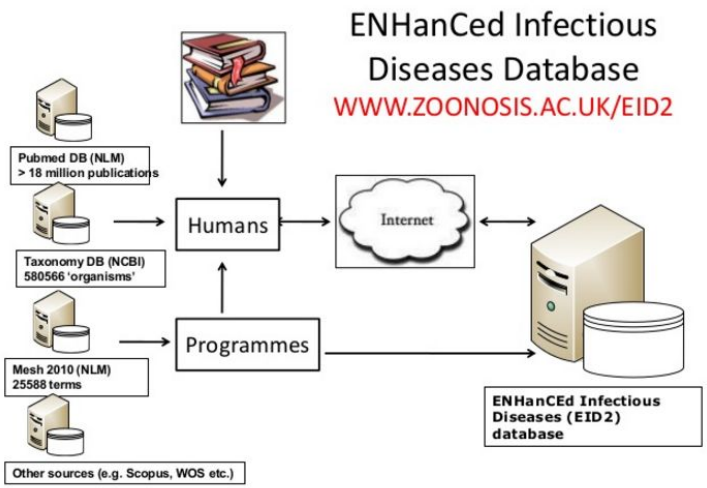


Хищные птицы заражаются широким спектром инфекционных агентов от своих жертв

Хищных птиц мало и они относительно редко общаются друг с другом

Основной источник «пища»?

Выживаемость популяции при определяется обеспечивается совокупностью всех иммунных систем всех особей.
Значит у хищных животных иммунная система способна распознавать большее количество вирусов и бактерий?



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ