

*На правах рукописи*

**Абед Алхуссен Мохаммад**

**МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ  
МИКОПЛАЗМОЗОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

**4.2.3 «Инфекционные болезни и иммунология животных»**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата ветеринарных наук

Владимир – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

**Научный руководитель:** **Спрыгин Александр Владимирович,**  
доктор биологических наук

**Официальные оппоненты:** **Сухинин Александр Александрович,**  
доктор биологических наук, ФГБОУ ВО  
«Санкт-Петербургский государственный  
университет ветеринарной медицины»,  
заведующий кафедрой микробиологии,  
вирусологии и иммунологии, профессор,  
г. Санкт-Петербург;

**Безбородова Наталья Александровна,**  
кандидат ветеринарных наук, ФГБНУ  
«Уральский федеральный аграрный научно-  
исследовательский центр» УрО РАН, старший  
научный сотрудник отдела геномных  
исследований и селекции животных,  
г. Екатеринбург

**Ведущая организация:** ФГБОУ ВО «Московская государственная  
академия ветеринарной медицины и  
биотехнологии – МВА имени К.И.  
Скрябина», г. Москва

Защита состоится 30 июня 2023 года в 10 часов на заседании диссертационного совета 36.1.002.01 при ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), по адресу: г. Владимир, мкр. Юрьеvec, ФГБУ «ВНИИЗЖ».

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), [www.arriah.ru](http://www.arriah.ru)

Автореферат разослан 17 мая 2023 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Жбанова Татьяна Валентиновна

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**1.1 Актуальность темы исследования.** Представители бактерий рода *Mycoplasma* способны вызывать у крупного рогатого скота (КРС) тяжелые респираторные и репродуктивные заболевания, требующие быстрого и точного выявления для эффективной борьбы с ними. Мастит, пневмония, проблемы с фертильностью, вызываемые микоплазмами, являются наиболее частыми клиническими признаками заболевших животных, что приводит к значительным экономическим и производственным потерям в мясном и молочном животноводстве. Среди микоплазмозов КРС наиболее экономически значимыми и подлежащими контролю являются *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC* (*Mmm SC*), *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*), *Mycoplasma bovis genitalium* (*M. bovis genitalium*), *Mycoplasma dispar* (*M. dispar*) [Dudek A. et al., 2020; Parker A. et al., 2018]. Помимо моноинфекций, *M. bovis*, например, вызывает сочетанные инфекции с такими вирусными и бактериальными патогенами КРС, как *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Histophilus somni*, респираторно-синцитиальный вирус КРС (BRSV), вирус герпеса КРС 1 (BHV-1), вирус вирусной диареи КРС (BVDV), вирус парагриппа 3, значительно повышая заболеваемость и смертность, особенно среди молодняка [Xu Q. et al., 2022]. *Mycoplasma bovis genitalium* связана с репродуктивными нарушениями у КРС. Экономический ущерб при поражении *M. bovis genitalium* связан с бесплодием и снижением репродуктивной способности животных [Macêdo A. et al., 2018]. *M. dispar* является одним из возбудителей респираторных заболеваний КРС, которые имеют повсеместное распространение и характеризуются воспалением слизистых оболочек верхних дыхательных путей и поражением легких, при этом распространенность *M. dispar* подтверждает их роль в патогенезе респираторных заболеваний КРС [Chen S. et al., 2019]. Наиболее опасный микоплазмоз КРС - контагиозная плевропневмония КРС (КПП) представляет собой контагиозное респираторное заболевание жвачных животных (родов *Bos* и *Bubalus*, т.е. в основном КРС, зебу, яков (*Bos grunniens*) и буйволов (*Bubalus bubalis*), вызываемое бактерией *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC* (*Mmm SC*). Заболевание оказывает серьезное воздействие на животноводство в связи с возможностью его быстрого распространения. В результате страны, где регистрируется КПП, исключаются из международной торговли живыми животными, что приводит к значительным

потерям производительности в животноводстве из-за высокого уровня смертности и заболеваемости [Teodoro di G. et al., 2020]. В целом, при неблагоприятных условиях микоплазмы самостоятельно или в комбинации с другими инфекционными агентами могут вызывать серьезные респираторные заболевания, тем самым обуславливая экономические потери в крупных животноводческих хозяйствах с высокой концентрацией животных. Для борьбы с микоплазмозом КРС используют антибиотики, однако микоплазмы невосприимчивы к ряду противомикробных препаратов, что не позволяет эффективно контролировать лечение заболевания антибиотиками [Ammar A. et al., 2022].

Одним из ключевых составляющих компонентов борьбы с микоплазмами КРС является своевременная диагностика. Лабораторное подтверждение микоплазмоза КРС, вызванное *M. bovis*, *M. bovis genitalium* и *M. dispar*, имеет важное значение, поскольку эти формы микоплазмоза имеют глобальное распространение, что существенно влияет на благополучие животноводческой отрасли. Классическим способом идентификации микоплазм КРС является выделение чистой культуры на жидких и твердых питательных средах, что имеет приоритетное значение, так как в этом случае можно получить наиболее полную информацию о культурально-морфологических и биологических свойствах возбудителя. Кроме того, у данного метода имеется дополнительное преимущество, заключающееся в возможности создания банка клинических изолятов, которые в дальнейшем возможно использовать для разработки и совершенствования стратегий профилактики, контроля и искоренения микоплазмозов, а также выявления резистентности микоплазм к антибактериальным препаратам. Следует также отметить, что данный способ трудоемок и требует 7-10 дней для постановки диагноза [Parker A. et al., 2018]. В современных условиях оперативность диагностики может быть достигнута за счет ПЦР в режиме реального времени, которая обеспечивает быструю и точную идентификацию генома микоплазм в пробах биологического материала. Наличие инструментов молекулярной идентификации генома *M. bovis* позволяет контролировать не только эпизоотологическую ситуацию в отечественных хозяйствах, но и проводить контроль, как при ввозе спермы, так и при использовании ее в производственных целях. На территории РФ комплексная и систематическая лабораторная диагностика микоплазмозов КРС, вызванных

*M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. dispar* к сожалению, не проводится и в отечественной литературе отсутствуют актуальные данные о распространении *M. bovis*, *M. bovis genitalium* и *M. dispar* среди российского поголовья на фоне активного завоза племенного скота из неблагополучных стран Европы [Шибаетов М.А., Прохвятилова Л.Б., 2009], поэтому борьба с микоплазмозом на территории РФ осложняется.

Исходя из вышеизложенного, усовершенствование отечественных методов выявления геномов *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. dispar*, *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC* в пробах патологического материала, а также оптимизация компонентов питательных сред для культивирования *M. bovis* (выделение на питательных средах) и изучение полученных изолятов *M. bovis* является актуальной задачей для современной ветеринарии с целью внедрения в лабораторную практику методов идентификации и изучения микоплазм.

**1.2 Степень разработанности проблемы.** Изучению этиологической роли микроорганизмов: *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. dispar* и *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC* при атипичных пневмониях, инфекционных маститах и репродуктивных нарушениях у КРС посвящены работы как отечественных, так и зарубежных исследователей [Борхсениус С.Н. и др., 2002; Красиков А.П., Рудаков Н.В., 2016; Doig, 1981; Perez-Casal et al., 2017]. В рутинной работе ветеринарных лабораторий чаще проводят идентификацию этих возбудителей до рода, что связано со сложностью их выделения [Parker A. et al., 2018]. В то же время видовая идентификация условно-патогенных возбудителей важна при проведении мониторинговых исследований, оценке этиологического значения инфекционного агента, выборе антимикробного препарата, при изучении механизмов резистентности с целью рациональной фармакотерапии животных [Борхсениус С.Н. и др., 2002; Красиков А.П., Рудаков Н.В., 2016]. В разных странах мира для диагностики микоплазмозов КРС используют ИФА, ПЦР, бактериологические исследования и др. Наибольшее распространение имеют такие методы диагностики как ПЦР-РВ, ИФА и выделение возбудителя на питательных средах [Alhaji N. et al., 2020; Dudek A. et al., 2020]. На настоящий момент различными авторами разработано несколько тест-систем, основанных на иммунофлюоресцентных, иммуногистохимических методах [Hermeyer K. et al., 2012] и на различных модификациях ПЦР, позволяющих выявлять ДНК *M. bovis* и *M. bovis genitalium* в пробах биологического материала [Lai J. et al., 2022;

Neder, Amadio, Calvino, 2022]. Также за рубежом осуществляют серодиагностику микоплазменной инфекции с использованием реакций агглютинации, связывания комплемента и ИФА в различных вариантах [Andersson A. et al., 2019]. Кроме того, применяют множество жидких, полужидких и твердых питательных сред для выделения микоплазм КРС: среда Фрея, среда WJB, среда Хейфлика, Мартена, Эдварда, ВИЭВ, УНИЭВ и их модификации и др. [Cook V. et al., 2016]. Существующие трудности выделения микоплазм КРС на питательных средах обусловлены их биологическими особенностями [Parker A. et al., 2018].

В настоящее время во многих диагностических лабораториях для диагностики микоплазмоза КРС методом ПЦР-РВ используют «Тест-систему для выявления ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) «МИК-КОМ» (ООО «ИнтерЛабСервис», г. Москва), а также набор реагентов для выявления ДНК возбудителей микоплазмоза (*Mycoplasma spp.*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ООО «ВЕТ ФАКТОР», г. Москва).

В Российской Федерации, Шибяев М.А., Прохватилова Л.Б., Макавчик С.А., Безбородова Н.А. и другие исследователи указывали на эффективность идентификации и выявления *M. bovis* и *M. bovis genitalium* с использованием ПЦР в режиме реального времени. Также, А.А. Сухинин использовал бактериологический и молекулярно-генетический методы для выделения и идентификации *M. bovis* у КРС. В 2021г. появился коммерческий набор фирмы «ИДС» для выявления *M. bovis*, *M. bovis genitalium*. В ФГБУ «ВГНКИ» разработаны методики на основе ПЦР-РВ для идентификации и дифференциации патогенных микоплазм (*M. bovis*, *M. californicum*, *M. bovis genitalium*). На сегодняшний день в РФ отсутствуют тест-системы ПЦР-РВ отечественного производства, выявляющие ДНК *M. mycoides subsp. Mycoides SC* (*Mmm SC*), в связи с чем разработка современных методов молекулярной диагностики *Mmm SC*, с целью недопущения заноса возбудителя при импорте КРС на территорию РФ, является актуальной задачей.

Учитывая немногочисленные исследования в отечественной литературе, видовая идентификация, включая микробиологическое подтверждение с последующим анализом антибиотикоустойчивости микоплазм, изолированных

от КРС, в условиях ветеринарных лабораторий не проводится, затрудняя усилия по оздоровлению российского скота от этих патогенов.

Сложности выделения и культивирования возбудителя микоплазмоза КРС на питательных средах, а также трудности получения достаточного количества бактериального материала с высокой биологической активностью, обусловили актуальность цели и задач данной диссертационной работы.

**1.3 Цель и задачи исследования.** Целью диссертационной работы являлась разработка комплекса средств лабораторной диагностики микоплазмоза КРС, вызванного *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. dispar* и *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (*Mmm* SC), и изучение выявляемости микоплазм КРС среди крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах на территории Российской Федерации.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Разработать методику выявления ДНК *M. bovis* и *M. bovis genitalium* в пробах патологического материала КРС с помощью ПЦР-РВ.
2. Разработать методику по выявлению ДНК *M. dispar* методом ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле.
3. Разработать методику для выявления ДНК *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC в пробах патологического материала КРС с помощью ПЦР-РВ.
4. С использованием разработанных методик исследовать пробы биоматериала, отобранные из различных хозяйств Российской Федерации на наличие ДНК *M. bovis*, *M. bovis genitalium* и *M. dispar*.
5. Усовершенствовать состав питательной среды для повышения эффективности выделения бактерии *M. bovis* из проб биологического материала, отобранных от инфицированного крупного рогатого скота.
6. Определить антимикробную резистентность изолята *M. bovis* «Калуга 2020».

#### **1.4 Научная новизна результатов исследований.**

Впервые показана широкая выявляемость ДНК возбудителей *M. bovis*, *M. bovis genitalium* и *M. dispar* в животноводческих хозяйствах на территории Российской Федерации.

Выделен изолят *M. bovis* «Калуга 2020», изучены его культуральные свойства и антимикробная резистентность.

Изучены стадии роста изолята *M. bovis* «Калуга 2020» и определен оптимальный состав питательных сред для культивирования.

На основе генетического анализа коровых генов генома установлено, что изолят *M. bovis* «Калуга 2020» генетически наиболее близок в кластере изолятов *M. bovis* из Бельгии и Франции.

### **1.5 Теоретическая и практическая значимость исследования.**

Разработаны, одобрены Ученым советом, утверждены директором ФГБУ «ВНИИЗЖ» и используются в лабораторной практике следующие методические рекомендации:

- «Методические рекомендации по выявлению ДНК патогенной *Mycoplasma bovis* с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени» (2021 г.);
- «Методические рекомендации по выделению *Mycoplasma bovis* на жидких и твердых питательных средах» (2021 г.);
- «Методические рекомендации по выявлению ДНК *Mycoplasma dispar* методом полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле» (2022 г.);
- «Методические рекомендации по выявлению ДНК *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides SC* (*Mmm SC*) с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени» (2022 г.);
- «Методические рекомендации по выявлению ДНК *Mycoplasma bovis genitalium* с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени» (2023 г.).

Практическая значимость работы состоит в том, что полученные диссертантом результаты послужили основой для разработки и валидации:

- тест-систем на основе ПЦР в режиме реального времени для выявления ДНК *M. bovis* и *M. bovis genitalium* в пробах биологического материала КРС;
- ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле для выявления ДНК *M. dispar* в пробах биологического материала КРС;
- ПЦР в режиме реального времени для выявления ДНК *M. mycoides* subsp. *mycoides SC* в пробах биологического материала КРС.

**1.6 Методология и методы исследования.** В работе использовали классические методы исследования: бактериологические (выделение, культивирование и титрование патогена), молекулярно-биологические (ПЦР-РВ и секвенирование), а также физико-химические (приготовление химических



растворов, питательных сред, антигенных смесей, центрифугирование и др.) и статистические.

### **1.7 Положения, выносимые на защиту.**

1. Методики на основе ПЦР и ПЦР-РВ по выявлению генома возбудителей *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. dispar*, *M. mycoides* subsp. *Mycoides SC* (*Mmm SC*), обладающие высокой чувствительностью, специфичностью, эффективностью и воспроизводимостью, для проведения диагностических исследований.

2. Выявление ДНК *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. dispar* в животноводческих хозяйствах различных регионов Российской Федерации в период с 2020 по 2022 гг.

3. Усовершенствованный состав питательной среды путем подбора концентрации дрожжевого экстракта и сыворотки крови лошади и разработка методики выделения полевых изолятов *M. bovis* позволили получить накопление изолята «Калуга 2020» *M. bovis* в 9,60 lg КОЕ/мл, а также определить его резистентность к антибиотикам разных групп.

**1.8 Личный вклад соискателя.** Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Консультативную и методическую помощь при выполнении отдельных этапов работы оказывали: д.б.н., профессор Прунтова О.В., вед. ветврач Брянцева М.С., к.б.н. Бьядовская О.П., к.в.н. Нестеров А.А., д.в.н. Кононов А.В., к.в.н. Щербинин С.В., к.б.н. Мазлум Али, д.в.н, профессор Колбасов Д.В., за что автор выражает им глубокую признательность.

**1.9 Степень достоверности и апробация результатов.** Результаты исследований по теме диссертации доложены и обсуждены на заседаниях методической комиссии и учёного совета ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2018-2022 гг. Результаты исследований опубликованы: в материалах Международной научно-практической конференции «Современные пути профилактики наиболее распространенных инфекционных и инвазионных болезней сельскохозяйственных животных» (Таджикистан, 2021 г.); в Сборнике статей LXXV международной научно-практической конференции «Инновационные подходы в современной науке» (г. Москва, 2020 г.); в Сборнике статей XXXII международной научно-практической конференции «Advances in Science and Technology» (г. Москва, 2020 г.). Достоверность результатов исследований подтверждена обработкой их статистическими методами и комиссионными испытаниями.

**1.10 Публикации.** По материалам диссертации опубликовано четыре научные работы, из них три в рецензируемых изданиях, рекомендованных для опубликования основных научных результатов диссертации.

**1.11 Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 194 страницах компьютерного текста, содержит разделы: Обзор литературы, собственные исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение. Список использованной литературы включает 282 источника. Работа иллюстрирована 28 рисунками и 36 таблицами. В приложении представлены копии титульных листов документов, подтверждающих достоверность результатов работы, ее научную и практическую значимость.

Исследования выполнены в период с 2018 по 2022 гг. в рамках тематики НИР ФГБУ «ВНИИЗЖ» "Разработка комплексной системы контроля инфекционных болезней животных и совершенствование методов исследования остатков запрещенных и вредных веществ в организме животных, кормах и продуктах животного происхождения" («Ветеринарное благополучие»).

## 2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Материалы и методы

**Штаммы вирусов, микоплазм и других бактерий.** В работе использовали референтные штаммы бактерий из коллекции АТСС: *M. bovis* (№25523), *M. bovis genitalium* (№19852), *M. dispar* (№27140); ДНК *Mycoplasma mycoides subsp. Mycoides SC* (Ммм SC) штамма «Madugri-8» (ФГБНУ ФИЦВиМ), а также изолят «Калуга 2020» *M. bovis*, выделенный в 2020 г. из проб биологического материала, отобранных от телят с клиническими признаками респираторной патологии. Для оценки специфичности разработанных методов ПЦР и ПЦР-РВ использовали другие бактериальные и вирусные патогены, инфицирующие КРС: *E. coli* (EC-21), Вирусная диарея КРС (NADL, ВНИИЗЖ), *Mannheimia haemolytica* (№1412), *Pasteurella multocida* (№1414), *Mycoplasma gallisepticum* (изолят), *Mycoplasma synoviae* (изолят), Респираторно-синцитиальный вирус КРС (Вологда/2020), Вирус парагриппа-3 (ВГНКИ-4), *Bovine Herpesvirus 1* (ВНИИЗЖ).

**Материал для исследования.** Материалом для исследования служили пробы биологического материала, отобранные от крупного рогатого скота разных возрастных групп (сыворотка крови, стабилизированная кровь, назальные и трахеальные смывы, фрагменты лёгких и трахеи, молоко, смывы с

препуция и вагинальные смывы, ткани суставов, абортированные и мертворожденные плоды, а также образцы спермы).

**Наборы реактивов.** Суммарную ДНК выделяли с помощью коммерческого набора «Ампли Прайм РИБО-сорб» («ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора»), согласно инструкции производителя, также использовали реактивы фирм «Promega», «Fermentas», «Acros Organics», «Sigma», «Biotium» и отечественные реактивы марки «о.с.ч.».

**Питательные среды, растворы, буферные смеси.** Модифицированная среда Хейфлика; 0,01 М фосфатный буфер; зеленый реакционный буфер 5X или буфер 5X для ПЦР с дальнейшим окрашиванием проб 0,25% раствором бромфенол синего в глицерине; Маркер для электрофореза ДНК «Ready-to-Use 100 bp DNA Ladder, 1,5 мл, Biotium»; 0,9% NaCl; буфер для ПЦР «5x Colorless Go Taq Flexi Buffer»; 25мМ раствор хлорида магния; 10 мМ раствор дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ); деионизованная вода; 96% этиловый спирт; солевой раствор Хенкса; феноловый красный (0.5% раствор); ацетат таллия (10% раствор); бромистый этидий, 10 мкг/мл.

**ПЦР в режиме реального времени для выявления генома *M. bovis*, *M. bovis genitalium* и *M. mycoides subsp. Mycoides SC*.** Постановку ПЦР-РВ проводили с использованием отдельных ферментов Taq-ДНК-полимеразы, олигонуклеотидных праймеров и зонда, в программируемом амплификаторе «Rotor-Gene Q» (Qiagen, Германия). Интерпретацию результатов проводили с использованием программного обеспечения амплификатора.

**ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле для выявления генома *M. dispar*.** Реакцию проводили в программируемых амплификаторах «BioRad» и «Mini Cycler» (MJ Research, США). Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 1% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

**Культивирование *M. bovis* на жидких и твердых питательных средах.** В качестве основы для приготовления жидкой и твердой питательной среды использовали модифицированную среду Хейфлика [Chanock, Hayflick, Barile, 1962; Kirchhoff, Rosengarten, 1984].

**Определение активности изолята *M. bovis*.** Для определения биологической активности микоплазм использовали методы измерения

цветоизменяющих единиц (ЦИЕ) и культуральный с подсчетом числа колониеобразующих единиц в мл (КОЕ/мл) [Assunção P. et al., 2006].

**Антимикробная резистентность изолята *M. bovis*.** Чувствительность изолята «Калуга 2020» *M. bovis* к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом в чашках Петри с использованием VBL агара, минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) антибиотиков определяли с помощью метода микроразбавления бульона [Sweeney M. et al., 2018]. Значения МИК определяли как наименьшую концентрацию того или иного противомикробного агента, полностью подавляющую рост *M. bovis*, что визуально характеризуется сохранением исходного цвета питательной среды.

**Генетическая характеристика изолята «Калуга 2020» *M. bovis*.** Для изучения генетического родства изолята «Калуга 2020» *M. bovis* проведено полногеномное секвенирование на платформе DNBSEQ-G50 (MGB, Китай). Для подготовки библиотеки секвенирования использовали бактериальную суспензию с концентрацией 8,2 КОЕ/мл. Полученные прочтения подвергали de novo сборке в контиги с помощью SPAdes. Аннотацию контигов проводили с помощью Prokka. Коровый анализ генома проводили с помощью Roary. Для анализа использовали 63 коровых гена (общая длина 63000 п.н.), которые выравнивали с помощью алгоритма MAFFT. Филогенетическое древо строили с помощью MEGA v.11.

**Статистическая обработка.** Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием программы «STATISTICA» (версия 10). Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## 2.2 Результаты собственных исследований

**Разработка методики выявления ДНК *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovisgenitalium* и *Mycoplasma mycoides subsp. Mycoides SC* с помощью ПЦР-РВ.** Первым этапом нашей работы была разработка подходов для идентификации ДНК микоплазм, для чего был проведен анализ генетических баз данных, в результате которого был выбран локус *FusA* для *M. bovis*, для *M. bovisgenitalium* выбран локус 16S-23S рРНК, а для *MmmSC* выбран локус *IppQ*. Для повышения чувствительности и специфичности ПЦР-РВ для выявления ДНК *M. bovis*, *M. bovisgenitalium* и *MmmSC* были оптимизированы концентрации компонентов (хлорид магния, дезоксинуклеозидтрифосфаты, праймеры, флуоресцентный зонд) и температурно-временной режим реакций.

В результате разработки тест-систем получены минимальные отклонения значения  $C_t$ , и амплификация проходила наиболее эффективно при добавлении 5,5, 6 и 3,5 мкл раствора  $MgCl_2$ , и 0,75, 0,5 и 0,5 мкл раствора дНТФ для *M. bovis*, *M. bovisgenitalium* и *MmmSC*, соответственно. В результате проведенных исследований установлено, что наименьшие значения пороговых циклов получены в реакциях, где добавляли к смеси 1, 0,75 и 1 мкл каждого из праймеров, и 0,5, 1,5 и 1 мкл зонда для *M. bovis*, *M. bovisgenitalium* и *MmmSC*, соответственно, кроме того, при добавлении указанного объема компонента на графике реакции визуально заметно изменение максимальных значений уровня флуоресценции положительных проб.

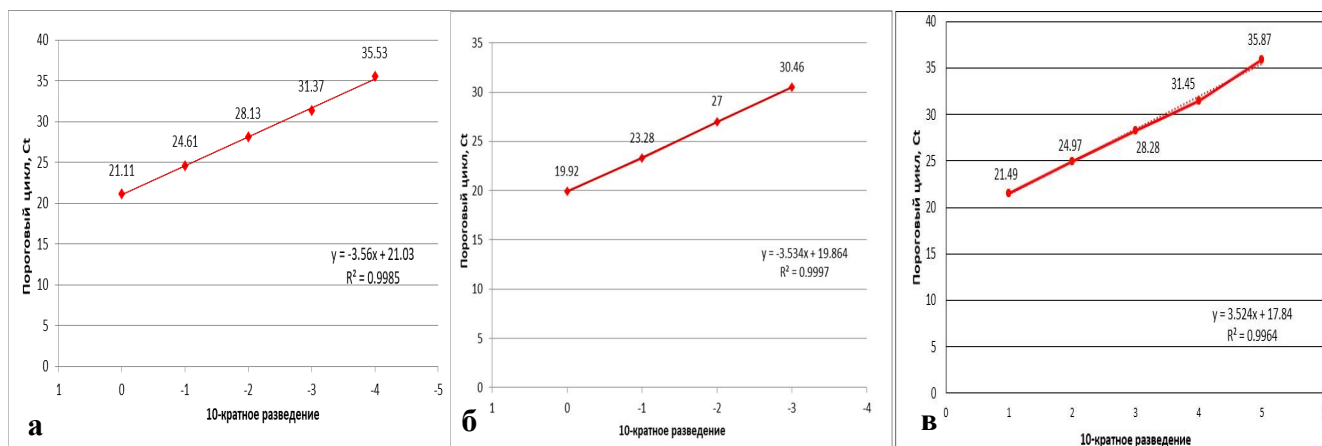
На основании выбранных в процессе опытов параметров времени и температуры для всех стадий амплификации в оптимизированном варианте для постановки ПЦР-РВ для *M. bovis* и *M. bovisgenitalium* использовали следующие температурно-временные параметры: 10 мин при 95°C (прогрев реакционной смеси), далее 40 циклов ПЦР, состоящие из денатурации ДНК в течение 10 секунд при 95°C, отжига праймеров и элонгации кДНК – 60 секунд при 60°C. Для *MmmSC*: 5 мин при 95°C (прогрев реакционной смеси), далее 40 циклов (15 секунд при 95°C, и 60 секунд при 60°C).

Для определения специфичности, с применением разработанных методик выявления, были протестированы референтные штаммы *M. bovis* и *M. bovisgenitalium* и *MmmSC* и гетерологичные пробы бактериальных и вирусных агентов, способных вызвать аналогичную патологию у КРС. Проведенные испытания показали, что разработанные методики не дают ложноположительных или ложноотрицательных результатов.

Для оценки эффективности амплификации было проведено 3 повторных эксперимента с 10-кратными разведениями, полученные средние значения  $C_t$  для каждого разведения использовали для вычисления эффективности реакции. На основании полученных результатов была построена линейная регрессия, которая показала, что значение эффективности амплификации (E) составило 90,94% для *M. bovis*, 91,85% для *M. bovisgenitalium* и 92,2% для *MmmSC* (Рис.1).

Воспроизводимость (CV%) методики определяли с помощью величины стандартного отклонения (SD) для каждой серии разведений, используя полученные значения  $C_t$ . SD на протяжении 10-кратных разведений варьировали от 0,21 до 0,58 для *M. bovis*, от 0,07 до 0,10 для *M. bovisgenitalium*, и от 0,28 до 0,62

для *MmmSC*. Коэффициент детерминированности ( $r^2$ ) при этом составил 0,9985 для *M. bovis*, 0,9997 для *M. bovis genitalium*, и 0,9964 для *MmmSC* (Рис. 1).



**Рисунок 1 - Линейная зависимость результатов ПЦР-РВ при 10-кратных разведениях. (а) ДНК *M. bovis*, (б) ДНК *M. bovis genitalium*, (в) ДНК *MmmSC***

Предел обнаружения (аналитическая чувствительность) ДНК *M. bovis*, *M. bovis genitalium* и *MmmSC* разработанных ПЦР определяли с использованием ДНК возбудителей, выделенных из ряда десятикратных последовательных разведений культурального материала, с исходными концентрациями  $2,5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^5$  и  $4 \times 10^5$  КОЕ/мл для *M. bovis*, *M. bovis genitalium* и *MmmSC*, соответственно.

В результате эксперимента было показано, что для разработанных тест-систем предел обнаружения ДНК *M. bovis* составил 25 КОЕ/мл, ДНК *M. bovis genitalium* составил 50 КОЕ/мл, и ДНК *MmmSC* составил 40 КОЕ/мл.

Таким образом, проведенные исследования показали, что разработанные методики выявления ДНК *M. bovis*, *M. bovis genitalium* и *MmmSC* в ПЦР-РВ обладают высокой чувствительностью и специфичностью и могут быть использованы при проведении диагностических исследований на *M. bovis*, *M. bovis genitalium* и *MmmSC*.

**Разработка методики выявления ДНК *Mycoplasma dispar* в ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле.** Для разработки методики выявления ДНК *M. dispar* выбран ген 16S рРНК, затем было необходимо подобрать оптимальный состав реакционной смеси и оптимизировать условия постановки реакции. В результате проведенных исследований был подобран оптимальный состав реакционной смеси, которую (в расчете на одну реакцию) готовили следующим образом: вода свободная от нуклеаз - 8,75 мкл; зеленый реакционный буфер 5X для ПЦР - 5,00 мкл; 25 мМ водный раствор  $MgCl_2$  - 3,50 мкл; смесь дНТФ - 0,50 мкл; Таq ДНК-полимераза

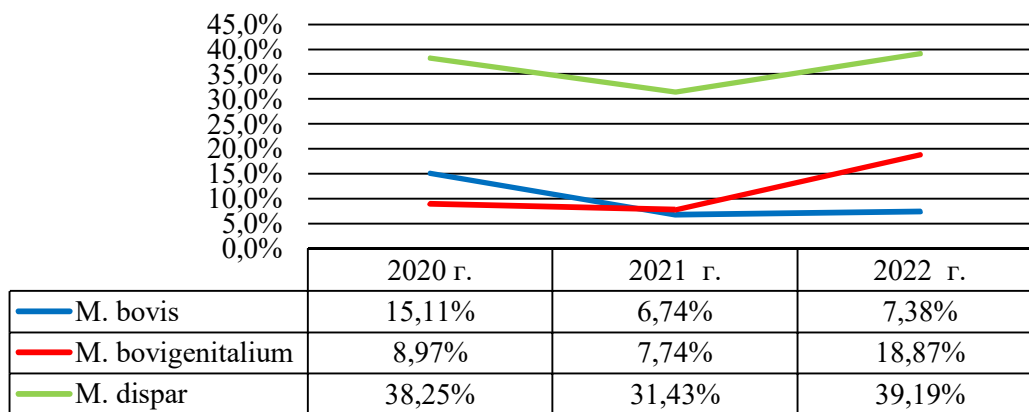
- 0,25 мкл; прямой праймер (10 пмоль/мкл)-1,00 мкл; обратный праймер (10 пмоль/мкл) - 1,00 мкл. На основании выбранных в процессе опытов параметров времени и температуры для всех стадий амплификации в оптимизированном варианте для постановки ПЦР для *M. dispar* использовали следующие температурно-временные параметры: удержание температуры (5 минут при температуре 94°C), циклирование (35 циклов: 60 секунд при температуре 94°C; 60 секунд при температуре 53,6°C; 60 секунд при 72°C), удержание температуры (5 минут при температуре 72°C). После постановки ПЦР проводили анализ продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле. Учет результатов проводили визуально с помощью УФ-трансиллюминатора или системы гель-документирования.

Для определения специфичности методики были протестированы пробы биологического материала, содержащие ДНК представителей рода *Mycoplasma* (за исключением *M. dispar*), вирусных и бактериальных агентов. Проведённые испытания подтвердили специфичность методики (ложноположительные отсутствуют).

Предел обнаружения (аналитическая чувствительность) ДНК *M. dispar* с помощью разработанной методики определяли с использованием ДНК *M. dispar*, выделенную из серии десятикратных последовательных разведений культурального материала, с исходной активностью  $6,3 \times 10^5$  КОЕ/мл. Каждое разведение исследовали в пяти повторностях. Проведённые исследования показали, что для разработанной методики предел обнаружения ДНК *M. dispar* составляет 63 КОЕ/мл.

Оценку повторяемости методики проводили с образцами биологического материала, содержащими и не содержащими ДНК *M. dispar*. Каждый образец тестировали на наличие ДНК *M. dispar* в 15 повторностях. Полученные результаты показали, что повторяемость методики составляет 100%.

**Выявление ДНК микоплазм в пробах биологического материала в 2020–2022 гг.** С помощью разработанных нами тест-систем в период с 2020 по 2022 гг. было исследовано 1342 проб биоматериала от КРС, полученного из 32 субъектов Российской Федерации, в результате процент выявления ДНК *M. bovis* составил - 10,37%, *M. bovis genitalium* – 11,08%, а *M. dispar* – 36,62% (рис. 2).



**Рисунок – 2 Выявление ДНК микоплазм методом ПЦР в пробах биологического материала в 2020–2022 гг.**

Следует отметить, что наибольшее количество положительных проб возбудителя *M. bovis* было выявлено в хозяйствах Нижегородской области в 2021 г., *M. bovis genitalium* – в хозяйствах Орловской области в 2022 г., *M. dispar* – в Кировской области в 2020 г., и хозяйствах Нижегородской области в 2021 г.

Общеизвестно, что одним из основных способов передачи микоплазм является искусственное осеменение КРС контаминированной спермой. Поскольку микоплазмы являются внутриклеточными облигатными патогенами и способны впадать в некультивируемое состояние, выделение микоплазм в окружающую среду носит непостоянный характер, и это влияет на результаты ПЦР и последующие ветеринарно-санитарные мероприятия. В связи с этим для изучения динамики выявления генома *M. bovis* и *M. bovis genitalium* в образцах спермы от 4 быков-производителей проводили исследования образцов из хранилища спермы одного племенного хозяйства из Сибирского ФО за период 2020 по 2022 г. Всего было исследовано 23 образца спермы 4 серий. Результаты частично представлены в табл. 1.

Из результатов, представленных в таблице 1, видно, что в пробах спермы быков-производителей выявлялся геном только *M. bovis genitalium*, причем детекция генома от одного и того же быка была несистематической. Следует отметить, что геном *M. bovis genitalium* выявляли в период с 2020 по 2021 г., тогда как пробы, отобранные от этих же быков-производителей в 2022 г., показали отрицательные результаты. Данные результаты показывают, что необходимо анализировать не менее трех партий спермы в разное время от одного и того же быка, чтобы достоверно установить статус животного по микоплазмозу в случае подозрения.



**Таблица 1 - Исследования спермы быков на наличие генома *M. bovis* и *M. bovisgenitalium***

№ образца	Номер животного	Дата отбора проб	Результат исследования	
			<i>M. bovis</i>	<i>M. bovisgenitalium</i>
1	1	23.11.20	геном не выявлен	<b>геном выявлен</b>
2		03.04.21	геном не выявлен	<b>геном выявлен</b>
3		15.05.22	геном не выявлен	геном не выявлен
4	2	06.06.20	геном не выявлен	<b>геном выявлен</b>
5		22.05.21	геном не выявлен	геном не выявлен
6		08.04.22	геном не выявлен	геном не выявлен
7	3	14.02.20	геном не выявлен	<b>геном выявлен</b>
8		12.03.21	геном не выявлен	<b>геном выявлен</b>
9		26.04.22	геном не выявлен	геном не выявлен
10	4	10.07.20	геном не выявлен	геном не выявлен
11		18.03.21	геном не выявлен	геном не выявлен
12		13.05.22	геном не выявлен	геном не выявлен

**Разработка методики выделения полевых изолятов *M. bovis* на жидких и плотных питательных средах.** При инкубации изолята «Калуга 2020» *M. bovis* на жидкой модифицированной среде Хейфлика [Chanock, Hayflick, Barile, 1962; Kirchhoff, Rosengarten, 1984], в течение 3-4 суток наблюдали изменение цвета среды в пробирках в сторону желтого спектра. После этого производили высев на плотную питательную среду, где на 3-4-й день инкубации формировались колонии, имеющие под микроскопом характерный для микоплазм вид «яичницы» (рис. 3).

Для определения специфичности методики выделения *M. bovis*, были протестированы образцы, не содержащие *M. bovis* (плотная питательная среда Хейфлика с 3% агаром служила контролем), а для определения чувствительности методики, были протестированы образцы с различным содержанием *M. bovis* (плотная питательная среда Хейфлика с 3% агаром служила контролем). Проведенные испытания показали, что разработанная методика не дает ложноположительных результатов, что подтверждает ее специфичность (100%) и чувствительность (100%).

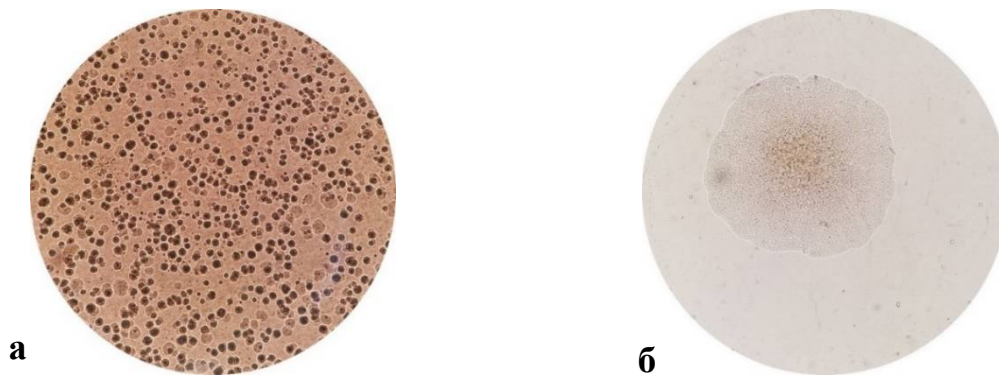


Рисунок 3 – Колонии *M. bovis*: (а) 3-суточная культура-увеличение 100х, (б) 4-суточная культура-увеличение 400х

**Определение фаз роста и времени максимального накопления изолята «Калуга 2020» *M. bovis* при культивировании в модифицированной среде Хейфлика.** Результаты исследования показали, что для изолята «Калуга 2020» *M. bovis* логарифмическая фаза роста наступает после 24 часов культивирования и максимальный уровень накопления биомассы микоплазм регистрируется к 72 часам, после чего наступает фаза спада со снижением биологической активности культивируемого материала (рис. 4).

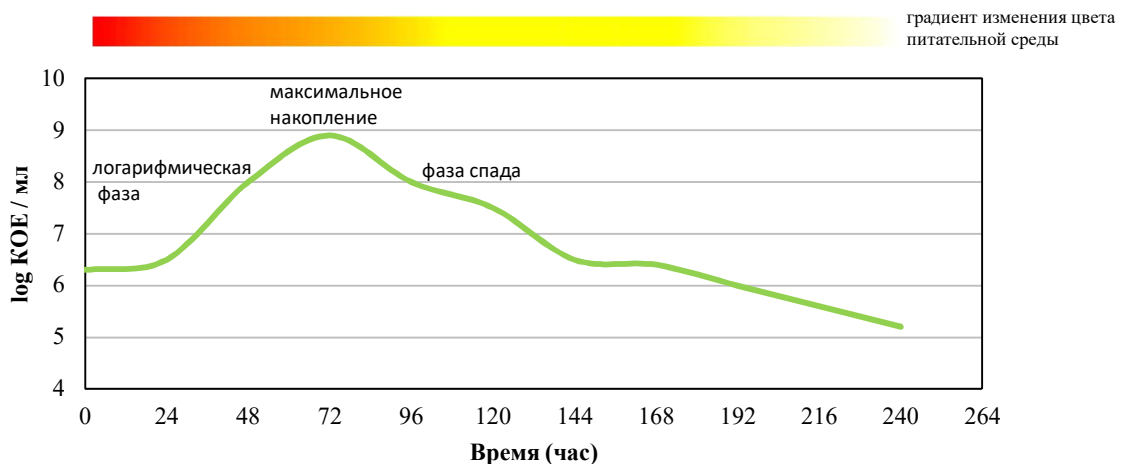


Рисунок 4 - Фазы роста и накопление изолята «Калуга 2020» *M. bovis* при культивировании в модифицированной среде Хейфлика

Анализ полученных результатов показал, что максимальное накопление изолята наблюдалось на 72-й ч культивирования (8,9 lg КОЕ/мл). Указанное значение концентрации микоплазм соответствовало значению цвета питательной среды (10,0 lg ЦИЕ/мл) ( $p < 0,05$ ), что эквивалентно рН 7,2. При более длительном культивировании регистрировали снижение накопления изолята до 6,4 lg КОЕ/мл, что было сопоставимо со значением 4,0 lg ЦИЕ/мл.

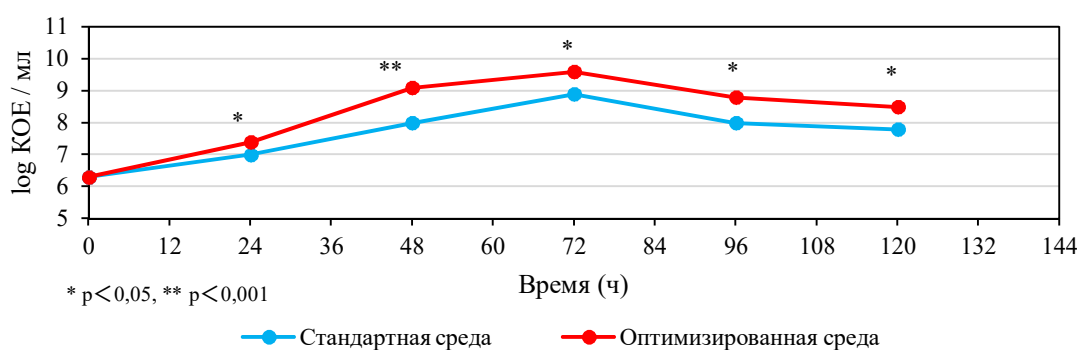
**Определение оптимального состава питательной среды для культивирования изолята «Калуга 2020» *M. bovis*.** Бактериальная культура микоплазм с высоким титром биологической активности необходима для получения антигена микоплазм, который в дальнейшем будет использован для разработки диагностических наборов. Полученные результаты показали, что наибольшее влияние на накопление *M. bovis* имеет содержание в питательной среде двух факторов роста: свежего дрожжевого экстракта и сыворотки крови лошади, в то время как глюкоза не оказывает значительного влияния. Выявив наиболее значимые факторы роста питательной среды, необходимо было определить их оптимальное соотношение, для этого провели испытания 25 экспериментальных питательных сред с различным количеством указанных компонентов. Уровень накопления *M. bovis* определяли методом титрования и выражали в lg КОЕ/мл (табл. 2).

**Таблица 2 - Влияние состава питательных сред на накопление изолята «Калуга 2020» *M. bovis* (n=3)**

Номер эксперимента	Содержание исследуемых переменных		lg КОЕ /мл
	свежий дрожжевой экстракт, %	сыворотка крови лошади, %	
1	5,0	10	7,80±0,16
2	7,5	10	7,90±0,15
3	10,0	10	8,00±0,20
4	12,5	10	8,20±0,23
5	15,0	10	7,90±0,18
6	5,0	15	7,70±0,07
7	7,5	15	7,90±0,16
8	10,0	15	8,00±0,22
9	12,5	15	8,20±0,10
10	15,0	15	7,80±0,18
11	5,0	20	7,70±0,23
12	7,5	20	7,90±0,17
13	10,0	20	8,10±0,15
14	12,5	20	8,00±0,09
15	15,0	20	7,80±0,25
16	5,0	25	8,10±0,23
17	7,5	25	7,90±0,17
18	10,0	25	8,00±0,15
19	<b>12,5</b>	<b>25</b>	<b>9,60±0,06*</b>
20	15,0	25	7,79±0,18
21	5,0	30	7,50±0,12
22	7,5	30	7,85±0,21
23	10,0	30	8,00±0,05
24	12,5	30	7,80±0,16
25	15,0	30	7,60±0,25

Примечание: \* -  $p < 0,05$

Согласно данным таблицы 2, максимальное накопление изолята *M. bovis* ( $9,60 \text{ lg КОЕ/мл}$ ) наблюдается при культивировании в питательной среде, содержащей 12,5% свежего дрожжевого экстракта и 25% сыворотки крови лошади. Полученные результаты подтверждаются данными изменения максимального накопления изолята «Калуга 2020» *M. bovis*, а именно: при культивировании в оптимизированной среде в среднем составило  $3,98 \times 10^9$  КОЕ/мл, что в 5 раз больше, чем при культивировании в стандартной питательной среде Хейфлика ( $0,79 \times 10^9$  КОЕ/мл) (рис. 5).



**Рисунок 5 - Накопление изолята «Калуга 2020» *M. bovis* при культивировании в стандартной и оптимизированной среде Хейфлика**

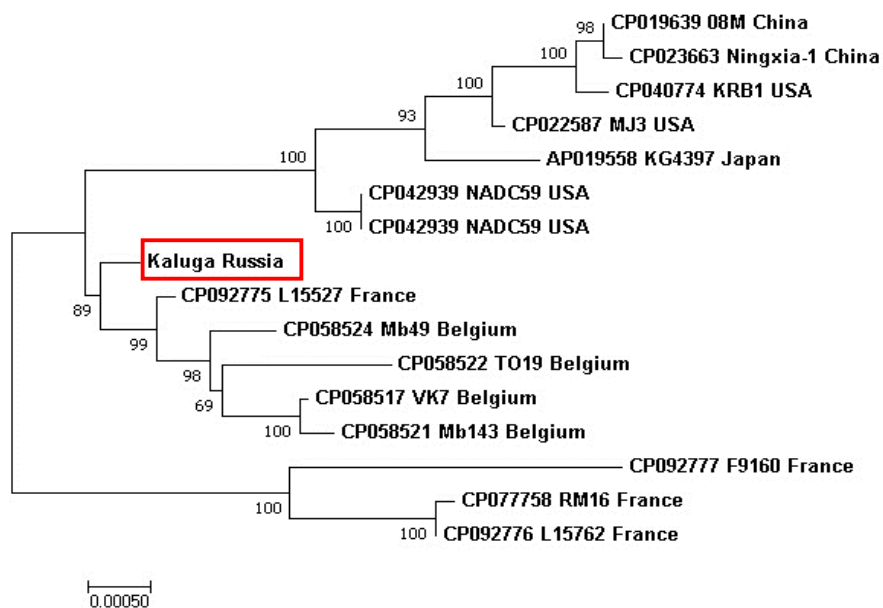
**Антимикробная резистентность изолята «Калуга 2020» *M. bovis*.** Полученные результаты оценки резистентности, определенные методом микроразбавления бульона и дисковой диффузии, показали, что изолят «Калуга 2020» *M. bovis* устойчив к тилмикозину; умеренно устойчив к гентамицину, хлортетрациклину и флорфениколу; и чувствителен к доксициклину и энрофлоксацину (табл. 3).

**Таблица 3 - Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) антимикробных препаратов изолята «Калуга 2020» *M. bovis***

Антибиотик	Группа	Диапазон МИК	МИК (мкг/мл)	Уровень устойчивости (методом дисковой диффузии)
Хлортетрациклин	Тетрациклин	0.25-256.00	4.00	±
Доксициклин	Тетрациклин	≤0.03-1.00	0.50	+
Энрофлоксацин	Фторхинолоны	0,025>32.000	0.25	+
Флорфеникол	Феникол	0,06-64.00	4.00	±
Гентамицин	Аминогликозиды	2.00->64.00	4.00	±
Тилмикозин	Макролиды	≤0,50>512.00	64.00	-

Примечание: + – чувствительный; ± – среднеустойчивый; - – устойчивый.

**Генетическая характеристика изолята «Калуга 2020» *M. bovis*.**  
 Полногеномный анализ российского изолята «Калуга 2020» *M. bovis* на основе 63 коровых генов представлен на (рис. 6).



**Рисунок 6 – Филогенетический анализ изолята «Калуга 2020» *M. bovis* на основе 63 коровых гена длиной 63000 п.н.**

Как представлено на рисунке 6, изолят «Калуга 2020» *M. bovis* имеет высокий уровень гомологии с изолятами из Европы, выделенными во Франции и Бельгии, что может быть объяснено закупкой племенного скота из ЕС в РФ.

### 3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

#### 3.1 Выводы:

1. Разработаны и валидированы специфические и воспроизводимые методики выявления ДНК *M. bovis*, *M. bovis genitalium* и *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC в пробах биологического материала с помощью ПЦР-РВ, аналитическая чувствительность которых составила 25 КОЕ/мл, 50 КОЕ/мл и 40 КОЕ/мл, а эффективность амплификации 90,94%, 91,85% и 92,2% для *M. bovis*, *M. bovis genitalium* и *M. mycoides* subsp. *Mycoides* SC, соответственно.

2. На основе ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле разработана методика выявления ДНК *M. dispar* в пробах биологического материала, аналитическая чувствительность которой составила 63 КОЕ/мл.

3. С использованием разработанных тест-систем ПЦР при исследовании 1342 проб биоматериала, поступившего в период с 2020 по 2022 гг. из 32 регионов

Российской Федерации, была определена следующая выявляемость ДНК микоплазм: *M. bovis* – в 10,37% проб, *M. bovis genitalium* – в 11,08% проб, а *M. dispar* – в 36,62% исследованных проб.

4. Выделен полевой изолят «Калуга 2020» *M. bovis* на жидкой и плотной питательных средах, активность роста которого через 72 часа культивирования достигала максимального уровня накопления – 8,9 lg КОЕ/мл, а также определен оптимальный состав и концентрация основных компонентов для культивирования *M. bovis*, а именно: 12,5% дрожжевой экстракт и 25% сыворотка крови лошади, применение которых обеспечивало получение культуры *M. bovis* с максимальной биологической активностью 9,60 lg КОЕ/мл, (по сравнению со значением  $0,79 \times 10^9$  КОЕ/мл при культивировании в стандартной питательной среде Хейфлика).

5. Проведена оценка резистентности *M. bovis* к антимикробным препаратам и установлено, что изолят «Калуга 2020» *M. bovis* устойчив к тилмикозину, умеренно устойчив к гентамицину, хлортетрациклину и флорфениколу, при этом изолят показал высокую чувствительность к доксициклину и энрофлоксацину.

6. Анализ российского изолята «Калуга 2020» *M. bovis* на основе 63 коровых генов показал высокий уровень гомологии с изолятами *M. bovis* из Бельгии и Франции, что свидетельствует об общности их происхождения.

**3.2 Практические предложения.** В ходе выполнения научно-исследовательских работ по теме диссертации разработаны, валидированы, комиссионно проверены, утверждены директором ФГБУ «ВНИИЗЖ» и используются в лабораторной практике следующие методические рекомендации: «Методические рекомендации по выявлению ДНК патогенной *Mycoplasma bovis* с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени», «Методические рекомендации по выявлению ДНК *Mycoplasma bovis genitalium* с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени», «Методические рекомендации по выявлению ДНК *Mycoplasma dispar* методом полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле», «Методические рекомендации по выявлению ДНК *Mycoplasma mycoides subsp. Mycoides SC (Mmm SC)* с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени», «Методические

рекомендации по выделению *Mycoplasma bovis* на жидких и твердых питательных средах».

#### 4. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Оптимизация состава питательной среды и изучение стадий роста изолята «Калуга 2020» *Mycoplasma bovis*/ М. Абед Алхуссен, А.А. Нестеров, А.В. Спрыгин, И. Н. Шумилова, М.С. Брянцева, О.П. Бьядовская // Ветеринария сегодня. - 2022. - № 3(11). - С. 262-267.

2. Патогенные микоплазмы крупного рогатого скота *Mycoplasma bovis*, *M. bovigenitalium* и *M. dispar*: краткая характеристика возбудителей (обзор) / М. Абед Алхуссен, В.В. Кирпиченко, С.П. Яцентюк, А.А. Нестеров, О.П. Бьядовская, Т.В. Жбанова, А.В. Спрыгин // Сельскохозяйственная биология. - 2021. - № 2(56). - С. 245-260.

3. Распространение микоплазмозов крупного рогатого скота на животноводческих фермах в Российской Федерации в период с 2015 по 2018 год / М. Абед Алхуссен, А.А. Нестеров, В.В. Кирпиченко, С.П. Яцентюк, А.В. Спрыгин, О.П. Бьядовская, А.В. Кононов // Ветеринария сегодня. - 2020. - № 2(33). - С. 102-108.

4. Чувствительность изолята *Mycoplasma bovis* «Калуга 2020» к антибактериальным препаратам/ М. Абед Алхуссен, А.А. Нестеров, А.В. Спрыгин, О.П. Бьядовская // «Современные пути профилактики наиболее распространенных инфекционных и инвазионных болезней сельскохозяйственных животных», посвященной 30-летию государственной независимости Республики Таджикистан: сб. материалов Междунар. науч.-практ. конф.-2021. - С. 100-105.

---

Подписано в печать 28.04.2023 г.

Формат 60×90 1/16. Усл. печ. л.1.

Тираж экз

Отпечатано на полиграфической базе ФГБУ  
«Федеральный центр охраны здоровья животных»