

Идентификация и диагностика возбудителей микоплазменных маститов коров при помощи бактериологических и молекулярно-генетических методов

Э.Д.Шнейдер, С.А.Макавчик

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Цель исследования. Применение бактериологических и молекулярно-генетических методов для исследования маститного молока коров на наличие микоплазменных возбудителей.

Материалы и методы. Были отобраны пробы маститного молока для выявления возбудителей рода *Mycoplasma* и идентификации их до вида. Для транспортировки, выделения и первичной дифференциации микоплазм по биохимическим свойствам использовалась готовая питательная среда «Mycoplasma-50». В ходе работы для диагностики и идентификации возбудителя были применены два вида полимеразной цепной реакции (ПЦР): ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации и ПЦР в микрочиповом формате с лиофилизированными тест-системами.

Результаты. Испытуемые пробы не дали положительного результата на среде «Mycoplasma-50». Результаты электрофоретической детекции в режиме реального времени показывают наличие генетического материала бактерий *Mycoplasma spp.* График регистрации результатов ПЦР в микрочиповом формате с лиофилизированными тест-системами говорит об обнаружении генетического материала *Mycoplasma bovis* в исследуемых пробах маститного молока.

Выводы. Использование культурального и молекулярно-генетического метода (ПЦР) позволяет выделить и идентифицировать *Mycoplasma spp.*, благодаря чему возможно своевременное выявление болезни и назначение оптимального лечения.

Ключевые слова: бактериология, «Микоплазма-50», культивирование, полимеразная цепная реакция, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma spp.*, видовая идентификация, микрочиповый формат

Для цитирования: Шнейдер Э.Д., Макавчик С.А. Идентификация и диагностика возбудителей микоплазменных маститов коров при помощи бактериологических и молекулярно-генетических методов. Бактериология. 2018; 3(1): 22–25. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-22-25

Identification and diagnostics of pathogens of bovine mycoplasma mastitis by bacteriological and molecular genetic methods

E.D.Shneyder, S.A.Makavchik

St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Purpose. The usage of bacteriological and molecular methods for the investigation of mastic milk for the presence of mycoplasma excitors.

Materials and methods. The probes of mastic milk were chosen to detect the excitors of *Mycoplasma* genus and to identify them as species. There were used such the before prepared nutritiou environment as "Mycoplasma-50" for transportation and for liberation and for primary differentiation of mycoplasmas due to biochemical internals. During the research were used two kinds of polymerase chain reactions (PCR) for diagnostics and identification of excitors: PCR with electrophoretic detection of products of amplification with the use of test systems and PCR in microchip form with lyophilized test systems.

Results. The testes probes didn't give Any positive results in prepared environment "Mycoplasma-50". The results of electrophoresis detection in real time mode show the presence of genetic material of *Mycoplasma spp.* bacteria. The schedule of PCR results in microchip form with lyophilized test systems registration informs about the detection of genetic materials of *Mycoplasma bovis* in researched probes of mastic milk.

Conclusion. The usage of cultural of molecular-biological methods (PCR) lets exactly distinguish *Mycoplasma hominis bovis* that helps to discover the disease in good time and make the optimal treatment.

Keywords: bacteriology, «Mycoplasma-50», cultivation, polymerase chain reaction, the species identification, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma spp.*, microchip format, polymerase chain reaction, species identification

For citation: Shneyder E.D., Makavchik S.A. Identification and diagnostics of pathogens of bovine mycoplasma mastitis by bacteriological and molecular genetic methods. Bacteriology. 2018; 3(1): 22–25. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-22-25

Для корреспонденции:

Шнейдер Эвелин Дмитриевна, студентка ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины»

Адрес: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5

Телефон: (812) 387-5144

E-mail: linevelin21@mail.com

Статья поступила 17.01.2018 г., принята к печати 30.03.2018 г.

For correspondence:

Evelin D. Shneyder, student of the St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine

Address: 5 Chernigovskaya str., St. Petersburg, 196084, Russian Federation

Phone: (812) 387-5144

E-mail: linevelin21@mail.com

The article was received 17.01.2018, accepted for publication 30.03.2018

Воспаление вымени коров и телок в зависимости от вида и вирулентности микоплазм протекает чаще бессимптомно, без заметного увеличения клеточных элементов в молоке, или же клинически выражено – отек, уплотнение и болезненность пораженных долей вымени, секрет становится водянистым с примесью небольшого количества хлопьев казеина. Возбудителями микоплазменных маститов являются *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovigenitalium*, *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma bovis* [1].

Микоплазмы растут только на многокомпонентных средах, включающих витамины, аминокислоты, углеводы, неорганические соли. Для их дифференциации нужны специальные сложные питательные среды, содержащие аргинин и глюкозу. Приготовление питательных сред для микоплазм в диагностической лаборатории длительно и трудоемко. Использование готовых наборов питательных сред для культивирования микоплазм облегчает и ускоряет процесс выделения и идентификации микоплазм [2].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является одним из ведущих методов современной лабораторной диагностики в ветеринарной медицине. Метод ПЦР особенно эффективен для диагностики трудно культивируемых форм микроорганизмов при острых и хронических инфекциях [3].

Цель данной работы – исследования маститного молока коров на наличие микоплазменных возбудителей бактериологическими и молекулярно-генетическими методами.

Материалы и методы

В хозяйствах Северо-Западного региона у маститных коров были отобраны пробы молока для выявления возбудителей рода *Mycoplasma* и идентификации их до вида.

Для транспортировки проб, первичного посева и дифференциации микроорганизмов применяли питательную среду «*Mycoplasma-50*» (НИИЭМ им. Пастера). Для контроля использовали плотную среду для урогенитальных микоплазм – модифицированную среду Хейфлика, содержащую дрожжевой экстракт, сыворотку крови лошади, теллурид калия (лаборатория микробиологии НИИ АГиР им. Д.О. Отта). Среды подготавливали согласно инструкции по применению. Посевы на жидкой среде в пробирках Эппендорфа культивировали в термостате при температуре 37–38°C 72 ч, просматривая ежедневно. Посевы на плотной среде культивировали при тех же режимах в атмосфере избыточного количества CO₂ (в эксикаторе) до 7 сут. Положительным контролем служили пробирки и чашки с посевами на тех же средах культур *M. hominis* (аргининферментирующая микоплазма).

В ходе работы применили два вида ПЦР: ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации с использованием тест-систем (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора), а также ПЦР в микрочиповом формате с лиофилизированными тест-системами (ООО «Люмэкс-маркетинг», Россия).

Для идентификации *Mycoplasma spp.* проводили постановку ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации. Выделение ДНК из отобранных образцов проводили с использованием оптимизированного коммер-

ческого набора «РИБО-преп» («ИнтерЛабСервис», Россия). Для процесса амплификации ПЦР с электрофоретической детекцией использовали прибор «Терцик» (ООО «ДНК Технология», Москва). Для проведения электрофоретической детекции использовали камеру для электрофоретических разделений ПЦР-продуктов в агарозном геле.

Для видовой идентификации использовали ПЦР в реальном времени с набором микрочипов с лиофилизированными тест-системами. Для проведения амплификации применяли микрочиповый ПЦР-РВ амплификатор «АриаДНА» (ООО «Люмэкс-маркетинг», Россия).

Результаты и обсуждение

Положительный результат на среде «*Mycoplasma hominis-50*» – это четкий визуальный переход окраски рН-индикатора от зеленого до фиолетового цвета. Ни одна из испытуемых проб не дала положительного результата – изменения цвета в пробирках не обнаружено. Но через 72 ч после посева на плотной среде для урогенитальных микоплазм при просмотре с увеличением ×40 был отмечен рост характерных для микоплазм мелких колоний неправильной округлой формы, с зернистой поверхностью. Произвели пересев с жидкой питательной среды на плотную среду и через 3 сут увидели рост характерных для микоплазм колоний (рис. 1).

Таким образом, в исследуемых пробах была обнаружена группа «неферментирующих» глюкозу и аргинин микоплазм, к которой относятся *Mycoplasma bovis* и *Mycoplasma bovigenitalium*. При снижении иммунного статуса данные микроорганизмы самостоятельно или вместе с другими микроорганизмами способны вызывать маститы, вульвовагиниты и бесплодие у коров, а также пневмонии и артриты у телят.

Анализ электрофореграмм проводили с помощью фотосистемы (рис. 2).

Полосы электрофореграммы четкие, что свидетельствует о содержании нужных копий ДНК в отобранных образцах. Следовательно, результат можно признать положительным. В качестве «положительного контроля» использовали стандарт ДНК искомого микроорганизма. «Положительный контроль» позволяет удостовериться, что все компоненты, входящие в состав реакционной смеси, обеспечивают нормальное прохождение реакции. Отрицательные контроли (в качестве пробы буферные растворы наборов для растворения выделенных ДНК – соответственно наборам).

Амплификатор «АриаДНА» осуществляет ПЦР-РВ анализ с использованием двухканального флуоресцентного детектора. Чип с иммобилизованными в микрореакторах компонентами ПЦР-смеси позволяет сократить время подготовки к проведению эксперимента, упростить и ускорить процедуру анализа, а также делает возможным скрининг большого числа проб за короткое время (рис. 3).

По окончании ПЦР-анализа происходит автоматическая генерация отчетов с информацией о наличии или отсутствии искомого возбудителя (наличии или отсутствии свечения) посредством построения графика анализа результатов амплификации специфических участков ДНК (рис. 4).



Рис. 1. Результат учета исследуемых проб на среде «Mycoplasma hominis-50» на четвертые сутки.

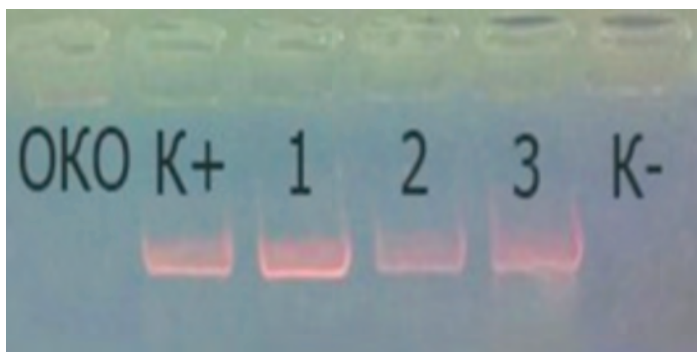


Рис. 2. Учет результатов детекции продуктов амплификации в агарозном геле.

Используемая в медицине готовая жидкая питательная среда «Mycoplasma-50», предназначенная для выделения, идентификации аргининферментирующих и глюкозоферментирующих микоплазм человека, может использоваться для выделения, первичной дифференциации урогенитальных микоплазм крупного рогатого скота, с параллельным использованием плотной модифицированной среды Хейфлика в качестве контроля. *Mycoplasma bovis* и *Mycoplasma bovirhinis* росли на данных средах, но не изменяли цвет индикатора, что затрудняло оценку теста. Но, учитывая трудности изготовления сложных специальных питательных сред, применение питательных сред «Mycoplasma bovis» в ветеринарной микробиологии является целесообразным.

Результаты электрофоретической детекции в режиме реального времени показывают наличие генетического мате-

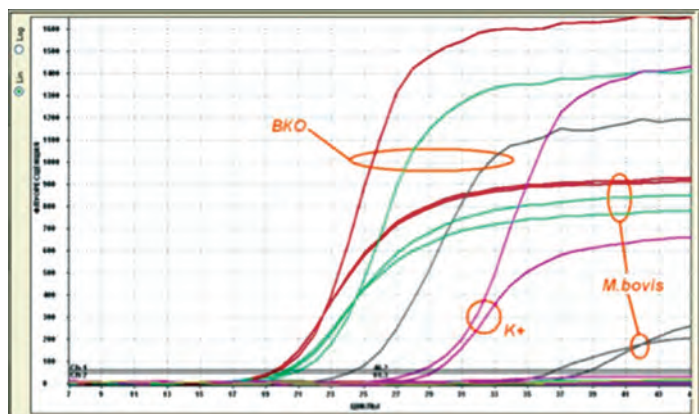


Рис. 4. График регистрации результатов ПЦР в режиме реального времени с использованием лиофилизованных тест-систем на микрочипе: ВКО – внутренний контрольный образец; K+ – положительный контроль; *M. bovis* – ДНК в пробах маститного молока.



Рис. 3. Микрочиповый ПЦР-РВ амплификатор «АриаДНА», ООО «Люмекс-маркетинг».

риала бактерий *Mycoplasma spp.* Результаты ПЦР в микрочиповом формате с лиофилизованными тест-системами свидетельствуют об обнаружении генетического материала *Mycoplasma bovis*.

Заключение

Использование готовой питательной среды «Mycoplasma-50» производства «Отдела новых технологий НИИЭМ им. Пастера» для обнаружения и идентификации микоплазм в образцах от крупного рогатого скота является более простым и удобным способом, так как приготовление специальных питательных сред для микоплазм в диагностической лаборатории – более трудоемкий и длительный процесс.

В ветеринарной лабораторной практике все большее применение находят различные виды ПЦР с целью быстрой идентификации возбудителей, культивирование которых слишком длительно и трудоемко или затруднено.

Литература

1. Раковская ИВ, Горина ЛГ, Зигангирова НА, Гончарова СА, Гамова НА. Механизмы персистенции урогенитальных микоплазм и методы их выявления. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2000;4: 47-52.
2. Митрофанов ПМ. Патоморфология и патогенез микоплазменных инфекций крупного рогатого скота вызванных *M. bovirhinis* и *M. bovirhinis*. Научно-технический бюллетень. 1981;33:16-22.
3. Смирнова ЛИ, Макавчик СА, Белкина ИВ, Приходько ЕИ. Применение культурального метода и полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выделения и идентификации *Mycoplasma synoviae* птиц. Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2015;4:61-4.

References

1. Rakovskaya IV, Gorina LG, Zigangirova NA, Goncharova SA, Gamova NA. Mekhanizmy persistentsii urogenital'nykh mikoplazm i metody ikh vyavleniya. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2000;4:47-52. (In Russian).
2. Mitrofanov PM. Patomorfologiya i patogenez mikoplazmennyykh infektsii krupnogo rogatogo skota vyzvannykh *M. bovirhinis* i *M. bovis genitalium*. *Nauchno tekhnicheskii byulleten'*. 1981;33:16-22. (In Russian).
3. Smirnova LI, Makavchik SA, Blokhin IV, Prikhodko EI. Application of cultural method and polymerase chain reaction (PCR) for isolation and identification of *Mycoplasma synoviae* poultry. *Issues of Legal Regulation in Veterinary Medicine*. 2015;4:61-4. (In Russian).

Информация о соавторе:

Макавчик Светлана Анатольевна, кандидат ветеринарных наук, доцент ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины»
Адрес: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5
Телефон: (812) 387-5144
E-mail: groza81@mail.ru

Information about co-authors:

Svetlana A. Makavchik, candidate of veterinary sciences, associate professor of the St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine
Address: 5 Chernigovskaya str., St. Petersburg, 196084, Russian Federation
Phone: (812) 387-5144
E-mail: groza81@mail.ru

МЕЖДУНАРОДНАЯ МЕДИЦИНСКАЯ ПЕЧАТЬ

Новый метод может быстро и точно выявлять инфекции

В новом исследовании описывается метод, который может быстро и точно показать, заражен ли человек вредными бактериями или другими патогенами. Кроме того, этот новый метод показывает точную степень тяжести инфекции у человека.

Наиболее распространенным методом тестирования на инфекцию в медицинских учреждениях в настоящее время являются полоски, приобретающие определенный цвет при контакте с зараженными жидкостями. Недостоверности анализа, полученного этим методом, возникают из-за субъективной оценки цвета и в случае цветных жидкостей (моча, кровь).

Микробиологические методы или исследование образцов жидкости организма под микроскопом и подсчет лейкоцитов, которые являются показателем инфекции, являются более медленными процессами и требуют более высококвалифицированного персонала.

Авторы исследования решили проверить электрохимический подход и создали молекулы, которые связываются с ферментами лейкоцитов и производят электрический ток, сигнализируя о наличии инфекции. Молекулы размещены на тест-полоске. После контакта с инфицированными жидкостями полоска подключается к компьютерному монитору, который отображает четкий диапазон электрохимических ответов, демонстрирующих тяжесть инфекции.

Метод может быть особенно полезен для пациентов, которые только что подверглись хирургическому вмешательству, поскольку он может окончательно определить, есть ли у них инфекция от процедуры до того, как она ухудшится.

Подана заявка на патент на изобретение, опубликованы два документа и планируются дальнейшие работы по оптимизации метода.

Hanson D, Menard T, Blazek T, McHardy S, Gorski W.

Synthesis and Characterization of Pyridine Compounds for Amperometric Measurements of Leukocyte Esterase. ChemBiochem. 2018 Apr 20. doi: 10.1002/cbic.201800164.

Использование бактерий для сокращения молочных отходов

Процесс изготовления молочных продуктов создает много отходов в виде кислой сыворотки, но команда ученых из Университета Корнелла, США и Тюбингенского университета в Германии открыла способ превратить эти отходы в полезные соединения с использованием бактерий. Кислотная сыворотка в основном состоит из сахаров и кислоты, но она слишком кислая, чтобы ею можно было кормить скот. Исследователи обнаружили, что в реакторных емкостях, заполненных бактериями, обнаруженными в кишечных микробных сообществах, кислотная сыворотка может быть превращена в более полезные вещества, такие как капроновая и каприловая кислота, которые являются естественными противомикробными средствами и могут использоваться в кормах для скота. В качестве альтернативы дальнейшая обработка может превратить производственные отходы в соединения, которые могут быть дополнительно очищены до биотоплива.

Xu J, Hao J, Guzman JLL, Spirito CM, Harroff LA, Angenent LT.

Temperature-Phased Conversion of Acid Whey Waste Into Medium-Chain Carboxylic Acids via Lactic Acid: No External e-Donor. Joule 2, 280–295. <https://doi.org/10.1016/j.joule.2017.11.008>