

Ваганова Анастасия Николаевна

Разработка методики выявления генетических маркеров *Ureaplasma diversum* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени

03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

03.02.03 - микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2019

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научные руководители:

кандидат биологических наук

доктор биологических наук

Фрейлихман Ольга Александровна

Сусский Евгений Владимирович

Официальные оппоненты:

Сухинин Александр Александрович – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, первый проректор (проректор по учебно-воспитательной работе), кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии, заведующий кафедрой

Раковская Ирина Валентиновна – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория микоплазм и Л-форм бактерий, руководитель лаборатории

Ведущая организация:

Федеральное Государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 2019 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, <http://www.gabrich.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2019 года

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук, доцент

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Ureaplasma diversum является возбудителем заболеваний респираторной и репродуктивной систем крупного рогатого скота. Носительство этих уреаплазм широко распространено, например в странах Западной Европы доля носителей в популяции крупного рогатого скота может составлять 36–40% (León B.A., 1995; Petit T., 2008). В Финляндии *U. diversum* в настоящее время является ведущей причиной абортов у крупного рогатого скота (Syrjälä, P., 2007). У телят *U. diversum* выделяется при гнойной и казеозной бронхопневмониях (ter Laak E.A., 1993; Gagea M.I., 2006), а при колонизации репродуктивной системы быков уреаплазмы данного вида могут приводить к воспалительным заболеваниям и снижению качества спермы (Lingwood C.A., 1990; Marques L.M., 2009).

Методика выявления микоплазм у крупного рогатого скота, применяемая в РФ, описана в МУК 4.2.2123-06 “Контроль сыворотки крови крупного рогатого скота на присутствие посторонних вирусов и микоплазм” и включает этапы бактериологического и цитохимического выявления микоплазм. Внедрение современных методов идентификации микроорганизмов позволяет сократить время на проведения исследования, снизить трудозатраты и повысить его точность (Клюкина В.И., 2012; Люлькова Л.С., 2014; Денисов А.А., 2014; Самуйленко А.Я., 2015). В связи с этим, разработка новых, более чувствительных методов выявления микоплазм, в частности *U. diversum*, является актуальной задачей.

Уреаплазмы отличаются способностью к длительной персистенции на слизистых оболочках хозяина. Хотя носительство уреаплазм в респираторном тракте молодняка крупного рогатого скота часто протекает бессимптомно, отмечено, что они значительно чаще выявляются у телят с симптомами респираторных заболеваний (Autio T., 2007). Патологический процесс, развивающийся при заражении *U. diversum* у коров, характеризуется развитием гранулярного вульвовагинита, сопровождающегося пустулёзной сыпью. В отдельных случаях возможно развитие воспалительных процессов в области шейки матки и внутриматочных инфекций (Santos T.M., 2011). Бессимптомное носительство *U. diversum* в репродуктивном тракте коров приводит к снижению эффективности оплодотворения, абортam и осложнениям стельности.

Разработка методов выявления бессимптомного носительства *U. diversum* и диагностики ассоциированных с ней заболеваний позволит своевременно выявлять присутствие данного инфекционного агента среди поголовья крупного рогатого скота и принимать меры по ограничению его распространения и снижению ущерба, связанного с его носительством.

Степень разработанности темы исследования

Для выявления *U. diversum* в клиническом и биологическом материале используют культуральные и молекулярно-биологические методы.

Производимые в России среды для выявления уреоплазм производства НПО "Питательные среды" (Махачкала), ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург) (Рока В.В., 2003; Заручейнова О.В., 2015), а также импортируемая среда производства Биомерье (Франция) (D'Inzeo T., 2017) разработаны для диагностики уреоплазмоза человека и не были апробированы для обследования крупного рогатого скота.

В настоящее время получили распространение молекулярно-биологические методы выявления *U. diversum* – ПЦР и ПЦР в реальном времени. Их преимуществом является более высокая чувствительность и специфичность по сравнению с культуральными методами (Stellrecht К.А., 2004; Marques L.M., 2013; Kishimoto M., 2017).

Для диагностики уреоплазмоза крупного рогатого скота в РФ доступны две диагностические тест-системы на основе ПЦР в реальном времени:

1. “Уреоплазмоз (*Ureaplasma* sp.)” (ООО “Фрактал Био”)
2. Тест-система на основе микрочипов (ГК “Люмекс”).

Производимая компанией ГК “Люмэкс” тест-система может быть использована только на приборе АриаДНА, что ограничивает возможности её применения. Система “Уреоплазмоз (*Ureaplasma* sp.)” ООО “Фрактал Био” не позволяет проводить видовую идентификацию возбудителя заболевания. Кроме того, обе указанные тест-системы не позволяют осуществлять идентификацию вида животного, от которого был получен исследуемый материал. В случае диагностической тест-системы на основе ПЦР в реальном времени, производимой за рубежом *UreDiv dtc-qPCR Test* (производство GPS, Испания), также отсутствует возможность видовой идентификации обследуемого животного.

Цель исследования – разработка и апробация методики ПЦР в реальном времени для выявления *U. diversum* и оценка возможности её применения для контроля за распространением *U. diversum* среди разновозрастного поголовья крупного рогатого скота.

Задачи исследования:

1. Изучить геномные последовательности бактерий *U. diversum* с целью выявления видоспецифических последовательностей, позволяющих проводить видовую идентификацию данного вида.
2. Разработать и оптимизировать композиционный состав реакционной смеси для выявления ДНК *U. diversum* в материале от крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

3. Провести исследования с целью выбора оптимальной локализации и метода забора биологического материала для проведения диагностических исследований на предмет присутствия ДНК *U. diversum*.

4. Оценить пригодность разработанной методики для использования в лабораторных и производственных условиях для выявления *U. diversum* в материале от крупного рогатого скота.

5. Изучить с использованием разработанной методики распространённость *U. diversum* среди разновозрастных групп крупного рогатого скота.

6. Оценить значимость *U. diversum* как этиологического агента при патологиях урогенитального и респираторного тракта у крупного рогатого скота.

Научная новизна работы

Впервые разработана диагностическая тест-система, позволяющая выявлять в биологическом материале от крупного рогатого скота ДНК *U. diversum*, с использованием в качестве мишени последовательности 16S рРНК метилтрансферазы, с одновременной идентификацией ДНК крупного рогатого скота, обеспечивающая достоверность результатов диагностического исследования за счёт исключения ложноотрицательных результатов, обусловленных деградацией ДНК в исследуемом материале (получена приоритетная справка, принято решение о выдаче патента по заявке на регистрацию изобретения № 2018120414 от 05.06.2018).

Исследована распространённость носительства *U. diversum* в респираторной системе взрослого рогатого скота, при этом установлено, что в носовой полости 33% обследованных животных выявляется ДНК *U. diversum*, и её присутствие в носовой полости ассоциировано с колонизацией репродуктивной системы.

Впервые проведена сравнительная оценка распространённости носительства *U. diversum* в репродуктивном тракте разновозрастных коров, в результате которой была установлена выраженная обратная связь ($r=0,83$, $p<0,01$) между числом случаев носительства *U. diversum* и количеством отёлов у коров в оцениваемой группе, при этом у коров до первого отёла и после первого отёла носительство выявляется в 75% и 83% случаев, а у коров после третьего отёла — в 36% случаев.

Выявлено, что частота носительства *U. diversum* среди нетелей, коров-первотёлок, и коров после второго отёла значительно выше, чем среди коров старших групп. Снижение частоты носительства *U. diversum* может быть следствием того, что первичное заражение животных, которое сопровождается выраженными патологическими проявлениями, происходит в младшем возрасте, затем инфекция переходит в хроническое бессимптомное носительство с последующей элиминацией в старшем возрасте.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты проведённой работы по разработке и апробации методики выявления генетического материала *U. diversum* в биологическом материале от крупного рогатого скота методом ПЦР в реальном времени обосновывают целесообразность применения современных молекулярно-биологических методов для контроля за распространением данного оппортунистического патогена среди поголовья крупного рогатого скота и выявления случаев ассоциированных с ней заболеваний.

В ходе проведённого исследования показано, что ген 16S рРНК-метилтрансферазы *U. diversum* содержит последовательность, уникальную по своей первичной структуре, имеющую нуклеотидный состав, специфический для уреоплазм данного вида и пригодную для идентификации ДНК *U. diversum* в биологическом материале от крупного рогатого скота.

Установлено, что у взрослого крупного рогатого скота возможна колонизация *U. diversum* органов как репродуктивной, так и респираторной систем, однако носительство в репродуктивной системе является более распространённым явлением, которое приводит к снижению репродуктивных качеств и замедлению воспроизводства поголовья крупного рогатого скота.

Разработанная в процессе исследования и апробированная в производственных условиях методика была использована при создании диагностической тест-системы “*Ureaplasma diversum* Amp”, выпущены три серии наборов указанной тест-системы. Соответствие наборов “*Ureaplasma diversum* Amp” выпущенных серий требованиям, предъявляемым к диагностическим препаратам (НД №13-5-2/1062 “Ветеринарные препараты. Показатели качества. Требования и нормы” (утв. Минсельхозпродом России 17.10.1997)) подтверждено декларацией соответствия, выданной ФГБУ “Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов” (регистрационный номер декларации: РОСС RU Д-RU.CC07.B.00018/18 / врРФ(ЕП).CC07.00021/18).

При апробации тест-системы “*Ureaplasma diversum* Amp” было установлено, что тест-система обладает аналитической чувствительностью не ниже 10 геномных эквивалентов на аликвоту исследуемого препарата ДНК, обеспечивает амплификацию целевых последовательностей генома *U. diversum* с эффективностью не менее 98% и пригодна для выявления ДНК в мазках из носовой полости, влагалища и преддверия влагалища крупного рогатого скота, а также в патологическом материале, в том числе тканях, подвергнутых фиксации в формалине.

Полученные в ходе исследования данные указывают на важность внедрения и совершенствования методов оценки и контроля носительства *U. diversum* среди поголовья крупного рогатого скота. Показанное негативное влияние *U. diversum* на способность коров к оплодотворению позволяет рекомендовать разработанную методику для выявления случаев носительства *U. diversum* и назначения антибиотикотерапии животным при падении эффективности осеменения.

При проведении исследований было показано, что при распространении среди поголовья молодняка крупного рогатого скота случаев бронхопневмонии, ассоциированной с *U. diversum*, целесообразно проведение антибиотикопрофилактики с использованием препаратов ряда макролидов, в частности, азитромицина. Предложенная схема проведения мероприятий по антибиотикопрофилактике подразумевает однократное внутримышечное введение азитромицина в виде водной эмульсии телятам в первый день жизни. На основании результатов, полученных при обследовании животных в ОАО «Партизан», проведены указанные мероприятия по профилактике заболеваний телят, приведшие к повышению сохранности телят до 1,5 месячного возраста на 10% (акт внедрения от 19.04.2018 г.).

Материалы диссертации используются в работе кафедры биотехнологии биотехнологического факультета Лужского института (филиала) ГАОУ ВО ЛО "Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина" в учебном процессе по дисциплинам «Основы биохимии и молекулярной биологии», «Прикладная биотехнология» и «Основы животноводства (акт внедрения от 20.09.2018 г.).

Методология и методы исследования

Методология диссертационного исследования спланирована в соответствии с поставленной целью. Предметом исследования является разработка методики выявления ДНК *U. diversum* на основе ПЦР в реальном времени. Проведённый анализ научной литературы, посвящённой методам выявления *U. diversum* и значимости данного условно-патогенного микроорганизма, как возбудителя заболеваний респираторной и репродуктивной систем крупного рогатого скота, был основан на формально-логических методах. Планирование и проведение исследований осуществлялось на основе как общенаучных, так и специфических методов, в том числе микробиологических, молекулярно-генетических и биоинформационных, а также методов статистической обработки результатов. Протокол данного исследования был рассмотрен и одобрен Этическим комитетом ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (№ 45 от 07.11.2018 г.).

Изоляты микроорганизмов. В работе использовали два изолята *U. diversum*, выделенные из патологического материала крупного рогатого скота, идентифицированные на основе биологических свойств и определения структуры 16S рРНК, 30 изолятов *Mycoplasma hominis*, 7 изолятов *U. parvum* и 7 изолятов *U. urealyticum* из рабочей коллекции Отдела новых технологий ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург). Также была использована ДНК, выделенная из вакцин “Вакцина против хламидиоза свиней культуральная инактивированная” (ООО “Иммуновак”), “Вакцина против хламидиоза крупного рогатого скота культуральная инактивированная” (ООО “Иммуновак”), инактивированная комбинированная вакцина Комбовак-А против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота-, коронавирусной болезней и аденовирусной инфекции крупного рогатого скота (ООО «Ветбиохим», г. Москва).

Образцы клинического и патологического материала. В исследование был включён биологический материал от разновозрастного клинически здорового крупного рогатого скота, в том числе мазки из носовой полости (83 образца), ротовой полости (12 образцов), преддверия влагалища (90 образцов), влагалища (33 образца), образцы венозной крови (12 образцов), а также образцы здоровой и патологически изменённой ткани лёгкого от погибших от бронхопневмонии животных и абортированных плодов (материал от 8 животных). Все животные содержались в животноводческих предприятиях Ленинградской области.

Микробиологические методы исследования. Выявление и идентификацию бактерий вида *U. diversum* проводили путём посева исследуемого материала на питательную среду для выявления уреоплазм “УРЕАПЛАЗМА-среда” (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург). Инкубация проводилась в течение 12 часов при +37° С. Визуальный контроль изменения цвета культуральной среды, свидетельствующего о росте *U. diversum*, проводился через 5 часов после посева, повторный контроль изменения цвета проводился через каждые последующие 2 часа до момента перехода оранжевого цвета в малиновый с последующей остановкой роста уреоплазм за счёт снижения температуры до +4° С°.

Молекулярно-генетические методы исследования

Выделение ДНК из культуральной жидкости и биологического материала при подготовке образцов культуры *U. diversum* и образцов клинического материала использовали набор для выделения ДНК «ДНК–сорб Б» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). При выделении ДНК из патологического материала применяли набор для выделения геномной ДНК “ДНК-Экстран 2” (ООО “Синтол”, Москва).

ПЦР в реальном времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации проводили на амплификаторе с детекцией в режиме реального времени CFX 96, (Bio-Rad, США).

Накопление фрагментов 16S рибосомной ДНК для секвенирования проводили путём стандартной ПЦР на термоциклере Verity (Applied biosystems, США) с последующим проведением секвенирования с использованием автоматической капиллярной системы MegaBACE 1000 DNA Analysis System (GE Healthcare, Германия).

Конструирование рекомбинантной плазмиды для положительного контроля реакции ПЦР в реальном времени проводилось на основе плазмиды pAL2-T (ООО “Евроген”, Москва). С помощью набора Quick-TA kit (ООО “Евроген”, Москва) в плазмиду были встроены ампликоны, полученные при проведении реакции с разработанной тест-системой на матрице ДНК *U. diversum*.

Биоинформационные и статистические методы исследования. Подбор праймеров проводился с использованием программы Primer-BLAST. Контроль температуры плавления олигонуклеотидов проводился с использованием программы OligoCalc. Предварительную проверку специфичности праймеров выполняли с помощью программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для оценки качества и анализа результатов секвенирования, полученных в формате хроматограмм, использовались программа Bio-Edit (Ibis Therapeutics, США) и BLASTn.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Excel (Microsoft Inc., США) и STATISTICA 10 (Dell Technologies Inc.). Статистическая значимость различий признаков, описываемых с помощью ранговых величин, в независимых сравниваемых группах оценивалась с помощью критерия Манна-Уитни. Статистическая значимость различий количественных признаков в независимых сравниваемых группах оценивалась при помощи критерия Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки взаимосвязи двух количественных величин применялся расчёт линейного коэффициента корреляции Пирсона.

Личное участие автора в получении результатов

Автором разработан дизайн научного исследования, проведен аналитический обзор литературы, выбор мишеней в составе геномов *U. diversum* и *Bos taurus* для создания видоспецифических систем праймеров и зондов, оптимизация состава реакционной смеси и весь объём молекулярно-генетических исследований. Отбор клинического и патологического материала проводился совместно с с.н.с. лаборатории иммунохимических технологий ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера к.в.н. Борисенко С.В.;

бактериологические исследования проводились совместно с с.н.с. лаборатории иммунохимических технологий ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, к.б.н. Рока В.В. Апробацию разработанного метода выявления *U. diversum* в биологическом материале от крупного рогатого скота проводили в ФГБУ «Ленинградская МВЛ». Автор самостоятельно провел статистическую обработку и анализ полученных данных, сформулировал выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Разработана и оптимизирована методика на основе ПЦР в реальном времени для выявления *U. diversum* в биологическом материале от крупного рогатого скота.

2. Применение разработанной методики позволило установить, что распространённость колонизации слизистых оболочек репродуктивной системы *U. diversum* среди поголовья взрослого крупного рогатого скота составляет 58,3%, значительно чаще встречается у коров до третьего отёла и приводит к существенному снижению репродуктивных качеств, выражающемуся в падении эффективности оплодотворения.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

О достоверности полученных результатов свидетельствует достаточный объем выборки обследованного крупного рогатого скота. Обследовано 121 голова разновозрастного взрослого крупного рогатого скота, а также 52 головы разновозрастного молодняка крупного рогатого скота из поголовья трёх животноводческих предприятий.

В работе были использованы современные методы исследования, такие как ПЦР в реальном времени и секвенирование по Сенгеру. Исследования проводились с использованием сертифицированного и поверенного оборудования. Применявшиеся в работе методы характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью, формат данных, в котором представляются результаты исследования, поддерживается программным обеспечением, позволяющим проводить биоинформационный и статистический анализ данных.

Достоверность полученных результатов подтверждена комиссионными испытаниями. Акты комиссионных испытаний утверждены директором ФГБУ «Ленинградская межобластная ветеринарная лаборатория» от 10 августа 2018 г.

Диссертация апробирована на заседании Ученого Совета ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол №9 от 26 сентября 2018 г.).

Материалы диссертационной работы доложены и представлены на 4 научных конференциях: Конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2018 г.); Международной научной конференции «VI Лужские научные чтения. Современное научное знание: теория и практика» (Луга, 2018 г.), заседании отделения «Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов» (ВНПОЭМП) в Санкт-Петербурге и Ленинградской области (Санкт-Петербург, 2018 г.), Международной выставке-конкурсе “Биоиндустрия 2018” (Санкт-Петербург, 2018 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых изданиях, 6 – в других изданиях, 5 тезисов в материалах конференций.

Объем и структура диссертации.

Материалы диссертационной работы изложены на 163 страницах машинописного текста и иллюстрированы 14 таблицами, 11 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 7 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 217 источников, из которых 22 – отечественных, 195 – зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Для выявления и анализа видоспецифических участков генома *U. diversum* была взята последовательность генома референтного штамма *U. diversum* Howard and Gourlay. На основании оценки видоспецифичности, содержания ГЦ и сведений о биологическом значении кодируемых белков, было выбрано три мишени для выявления *U. diversum*: ген 16S рРНК метилтрансферазы, ген сериновой киназы и гемолизина. К этим последовательностям были подобраны системы праймеров и зондов.

В качестве видоспецифичных мишеней в составе генома *B. taurus* были выбраны гены бета-микроглобулина (B2M), глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH) и бета-актина (ACTB). Системы праймеров и зондов были подобраны к участкам, расположенным в областях, включающих границы между интронами и экзонами в составе данных генов.

Разработанные системы праймеров были проверены на предмет специфичности к ДНК *U. diversum* и *B. taurus* путём анализа с использованием программы BLAST. Выявленные перекрёстные совпадения структуры праймеров и

зондов с ДНК других организмов были фрагментарны, что исключало неспецифическое взаимодействие.

При подборе сочетаний систем праймеров и зондов к ДНК *U. diversum* и ДНК *B. taurus* было установлено, что оптимальным для одновременного выявления ДНК *U. diversum* и ДНК крупного рогатого скота является сочетание включавшее систему праймеров и зондов, комплементарных гену 16S рРНК метилтрансферазы *U. diversum* и систему праймеров и зондов, комплементарных к гену GAPDH *B. taurus*.

При оптимизации состава реакционной смеси было установлено, что максимальной чувствительностью обладает ПЦР в реальном времени при использовании смеси, содержащей 15 пмоль каждого из компонентов системы для выявления ДНК *U. diversum*, 5 пмоль праймеров и зондов для выявления ДНК *B. taurus*, 5 ммоль $MgCl_2$ и 5 мкл смеси ПЦР qPCRmix-HS (ООО “Евроген”, Москва). ПЦР проводили в объеме 25 мкл. Программа амплификации представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Программа ПЦР в реальном времени

Стадия	Температура	Длительность, секунды	Число циклов
Первичная денатурация	95°C	300	1
Денатурация	95°C	15	50
Отжиг праймеров	60°C	30	
Элонгация	72°C	30	

Аналитической чувствительностью является наивысшее разведение пробы, при котором наблюдается положительный результат. Данный параметр определяли путем постановки реакции с ДНК, выделенной из бактериальной суспензии бактерий *U. diversum*. Аналитическая чувствительность тест-системы “*Ureaplasma diversum* Amp” составила 10 ГЭ на аликвоту исследуемого материала или 1000 ГЭ на мл исследуемого препарата ДНК, что соответствует 50 клеткам *U. diversum* на мазок, 300 клеткам *U. diversum* на 1 мл крови, 250 клеток *U. diversum* на 1 г ткани органа.

Значение эффективности амплификации проводили в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения CFX-Manager.

Эффективность амплификации составила 98%, что является высоким показателем для диагностических тест-систем (Рисунок 1) (Dorak T., 2006).

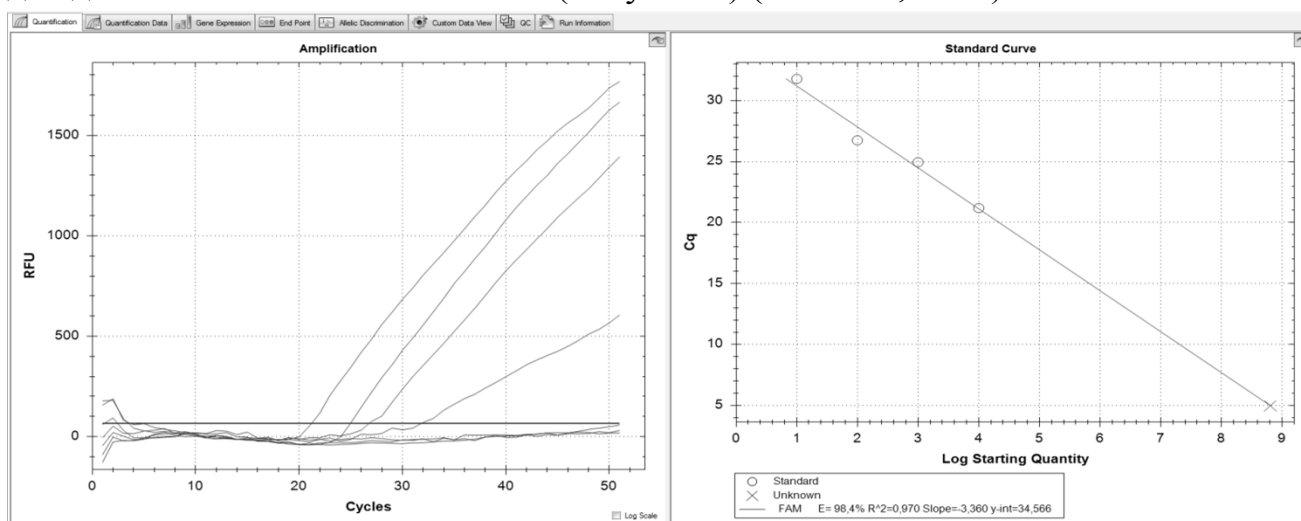


Рисунок 1 – Расчёт эффективности ПЦР в реальном времени с праймерами к *U. diversum* в программе CFX Manager

Примечание: Под калибровочным графиком “Standard Curve” представлен результат расчёта показателя эффективности $E = 98,4\%$

С целью контроля аналитической специфичности тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp” была проведена постановка ПЦР в реальном времени с использованием в качестве матриц образцов гетерологичной ДНК. Выбор образцов для определения специфичности тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp” был обусловлен следующим:

1. *M. hominis*, *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *U. parvum*, *U. urealyticum* являются бактериями, относящимися к одному семейству с *U. diversum*.
2. *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, а также хламидии вида *C. psittaci*, входящие в состав вакцин от хламидиоза крупного рогатого скота и свиней, герпесвирус 1 крупного рогатого скота способны вызывать заболевания, сходные по симптоматике с заболеваниями, вызываемыми *U. diversum*.

В ходе контроля специфичности тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp” было подтверждено отсутствие неспецифического взаимодействия компонентов системы с ДНК вышеуказанных бактерий и вирусов.

Для контроля стабильности тест-системы были проведены троекратные повторные постановки ПЦР в реальном времени на матрице 10 случайным образом выбранных образцов ДНК, выделенной из мазков с поверхности слизистой оболочки преддверия влагалища коров. В результате проведённой ПЦР в реальном времени накопление флуоресцентного продукта деградации зонда по каналу FAM, свидетельствующее о присутствии в образце ДНК *U. diversum*, отмечалось в 8 образцах во всех трех повторях. Во всех образцах отмечалось накопление флуоресцентного продукта, детектируемое по каналу JOE, что свидетельствовало о

присутствии в исследуемом материале ДНК крупного рогатого скота. Значения коэффициента вариации V между тремя повторами не превышали 1% при детекции по каналу FAM и 1,77% по каналу JOE, что свидетельствует о высокой воспроизводимости результата исследования с использованием тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp”.

Для дальнейшего исследования тест-системы “*Ureaplasma diversum* Amp” и её испытаний была проведена наработка трёх опытных серий. Каждая серия включала три набора, рассчитанных на постановку 100 реакций ПЦР в реальном времени каждый, включая положительные и отрицательные контрольные образцы. Состав наборов “*Ureaplasma diversum*-Amp” представлен в таблице 2.

Схема проведения ПЦР-исследования с помощью тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp” представлена на рисунке 2.

С целью выбора оптимального способа забора биологического материала у коров было проведено исследование группы, включавшей 32 животных. Для исследования у 32 животных из поголовья хозяйства А были отобраны мазки из носовой полости и влагалища, у 27 животных были отобраны также мазки из преддверия влагалища. Дополнительно был проведён отбор образцов венозной крови у 12 животных.

Таблица 2 – Состав компонентов набора “*Ureaplasma diversum*-Amp”

Наименование компонента	Состав компонента	Назначение	Объём
Реактив Amp 1	Taq ДНК-полимераза, глицерин и $MgCl_2$	Осуществление реакции ПЦР	500 мкл
Реактив Amp 2	$MgCl_2$, праймеры и зонды к ДНК <i>U. diversum</i> и крупного рогатого скота в виде водного раствора	Обеспечение специфичности реакции ПЦР	1000 мкл
ПКО	Рекомбинантная плазмида, включающая последовательность ДНК <i>U. diversum</i> , и ДНК из крови крупного рогатого скота.	Положительный контрольный образец	100 мкл
ОКО	Вода дистиллированная деионизированная	Отрицательный контрольный образец	100 мкл

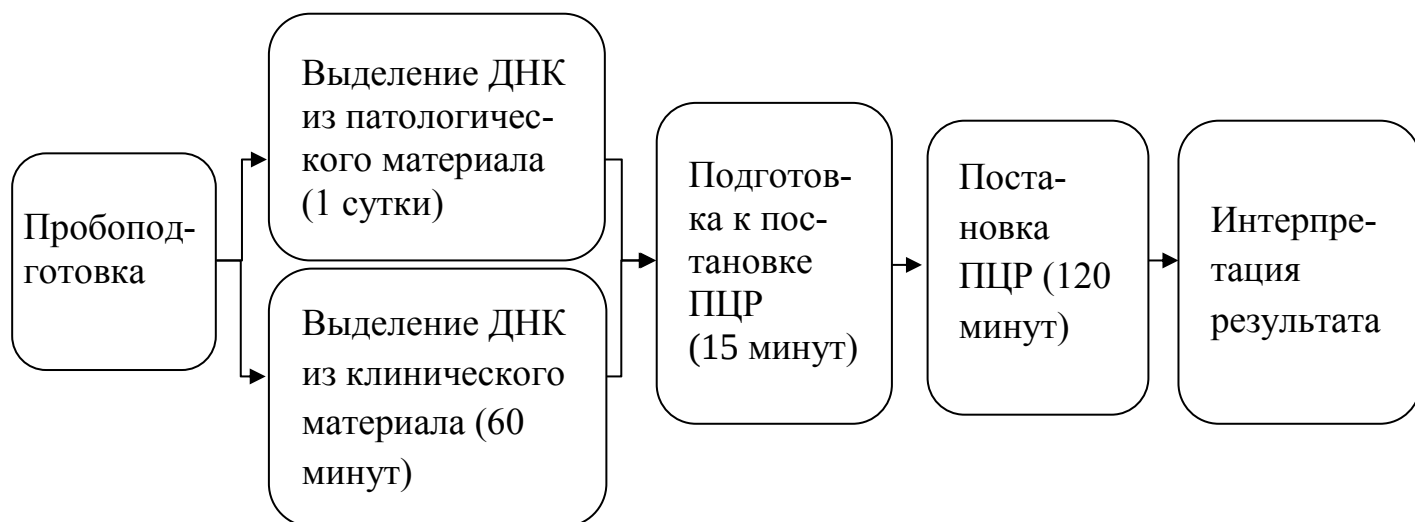


Рисунок 2 – Схема постановки ПЦР в реальном времени помощью тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp”

При оценке распространённости носительства уреаплазм в исследуемой группе было установлено, что число животных, в носовой полости которых выявлялась ДНК *U. diversum*, составило 9 из 32 (28,1%), в то же время ДНК *U. diversum* была выявлена в 13 из 27 образцов (48%), а частота выявления *U. diversum* в мазках из влагалища составила 11 случаев из 32 образцов (34%). Из 12 исследованных образцов крови в 3 (25%) была обнаружена ДНК *U. diversum*. У всех животных, в крови которых была обнаружена ДНК уреаплазм, отмечалась колонизация слизистых оболочек.

Было установлено, что колонизация носовой полости ассоциирована с колонизацией половой системы ($U_{\text{эмп}} = 48$, $p \leq 0.05$), в частности преддверия влагалища ($U_{\text{эмп}} = 27$, $p \leq 0.05$), однако статистически значимой связи между колонизацией носовой полости и колонизацией влагалища установлено не было ($U_{\text{эмп}} = 46$, $p > 0.05$). Колонизация респираторного тракта достоверно чаще наблюдается у животных, являющихся носителями уреаплазм в половой системе ($U_{\text{эмп}} = 28$, $p \leq 0.05$). При этом носительство уреаплазм в преддверии влагалища было ассоциировано с колонизацией влагалища ($U_{\text{эмп}} = 32.5$, $p \leq 0.01$), но не колонизацией с респираторного тракта ($U_{\text{эмп}} = 71.5$, $p > 0.05$).

Таким образом, при исследовании образцов, полученных из различных отделов половой системы и респираторного тракта, было установлено, что носительство в преддверии влагалища более распространено, чем носительство во влагалище и носовой полости. Исследование образцов с поверхности слизистых оболочек преддверия влагалища является наиболее информативным при выявлении носительства *U. diversum*.

Для оценки применимости разработанной системы для выявления *U. diversum* в патологическом материале было проведено исследование образцов

тканей, полученных при патологоанатомическом исследовании абортированных плодов и трупов молодняка и взрослых особей крупного рогатого скота, погибших от бронхопневмонии. При патологоанатомическом исследовании плодов отмечалось воспаление плодных оболочек, характеризующееся отёчностью. При патологоанатомическом исследовании телят и коровы было отмечено очаговое поражение лёгких, сопровождавшееся формированием абсцессов с гнойным содержимым, переходящим в творожистую массу, наиболее выраженное в области сердечных и верхушечных долей лёгких (Рисунок 3). С использованием тест-системы “*Ureaplasma diversum* Amp” было показано присутствие *U. diversum* в материале, полученном от двух абортированных плодов, четырёх телят и коровы.

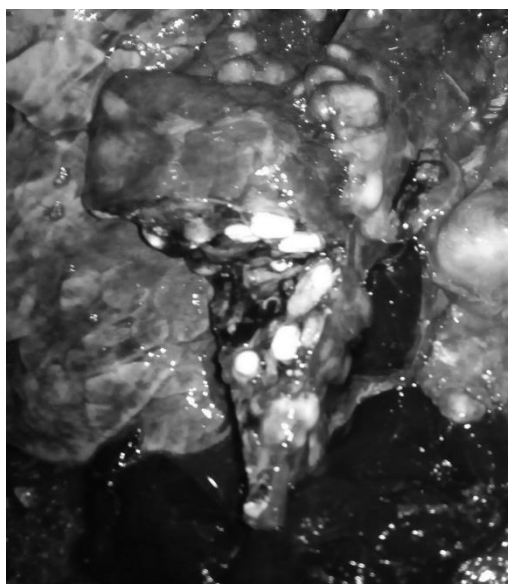


Рисунок 3 – Абсцессы шаровидной формы в лёгких телёнка

С целью оценки влияния формалиновой фиксации тканей на их пригодность для исследования на предмет содержания ДНК *U. diversum* предложенным методом, было проведено определение ДНК *U. diversum* в материале от двух телят, погибших от бронхопневмонии. Для исследования были взяты 9 образцов тканей лёгких от каждого животного. 5 образцов от каждого животного было помещено в нейтральный забуференный 10% формалин (ООО “БиоВитрум”, Санкт-Петербург), 4 образца от каждого животного были помещены в пустые пластиковые пробирки и заморожены при температуре $-20^{\circ}\pm 5^{\circ}$ С. В трёх из восьми замороженных образцов при проведении ПЦР в реальном времени была обнаружена деградация ДНК (отсутствие ДНК крупного рогатого скота). Таким образом, фиксация тканей животных в формалине с целью стабилизации их структуры не препятствует сохранению присутствующей в образце ДНК.

Для оценки влияния колонизации половой системы коров *U. diversum* на их репродуктивные качества было проведено исследование 32 коров и 20 нетелей, содержащихся в животноводческом хозяйстве Б. Для исследования отбирался

мазок из преддверия влагалища. Забор материала у коров проводился в первые две недели после отёла, в то время как у нетелей отбор образцов осуществлялся через 7–9 месяцев после оплодотворения. При отборе материала отмечалось наличие сыпи в области наружных половых органов. Материал от 10 коров был получен после первой стельности, от 22 коров — после 2 и более стельностей. В результате статистической обработки полученных данных было отмечено, что присутствие ДНК *U. diversum* у коров в мазке из преддверия влагалища ассоциировано с более длительным периодом от отёла до следующего оплодотворения, а также сниженной эффективностью оплодотворения перед предшествовавшей стельностью (отёл в 2017 году, $p < 0,05$). Отмечалось также снижение у инфицированных коров эффективности последнего оплодотворения в 2017 году, однако показатели различия не достигали уровня статистической значимости. При этом было отмечено статистически значимое снижение эффективности оплодотворения среди нетелей, являвшихся носителями *U. diversum* ($F_{\text{эмп}} = 24,55$, $p < 0,01$), что указывает на негативное влияние носительства *U. diversum* на эффективность оплодотворения. Таким образом, целесообразно проводить обследование поголовья на предмет носительства *U. diversum* с целью профилактики связанных с ней заболеваний и повышения репродуктивных качеств крупного рогатого скота (Таблица 3).

Таблица 3 – Влияние носительства *U. diversum* на репродуктивные качества коровы

Показатель	Средние значения		Достоверность различий		
	Носители <i>U. diversum</i>	Отсутствие <i>U. diversum</i>	$F_{\text{эмп}}$	$F_{\text{крит}}$	P
№ осеменения, приведшего к стельности в 2017 г.	1,73	1,69	2,11	2,6	>0.05
№ осеменения, приведшего к стельности в 2016 г.	1,9	1,76	5,67	4,1	<0.01
Перерыв между отёлом в 2017 г. и стельностью	142 дней	126 дней	3,10	2,91	<0.05
№ осеменения, приведшего к стельности у нетелей в 2017 г.	1,6	1,2	9	5,35	<0.01

Для оценки распространённости *U. diversum* среди поголовья взрослого крупного рогатого скота в трёх животноводческих хозяйствах Северо-западного региона РФ были отобраны мазки из преддверия влагалища взрослых коров. В

хозяйстве А было отобрано 32 мазка от коров, а в хозяйстве Б 33 мазка от коров и 20 мазков от нетелей, в хозяйстве В — 30 мазков от коров.

На основании проведённого исследования было установлено, что частота носительства *U. diversum* среди коров во всех хозяйствах была сходной и составляла 53-54% Б. В то же время доля инфицированных нетелей была выше и составляла 75%.

При сравнении частоты носительства *U. diversum* в группах коров, разделённых по показателю числа отёлов (от 0 до 7) было установлено, что между числом случаев носительства *U. diversum* и количеством отёлов у коров в оцениваемой группе существует выраженная обратная связь ($r=0,83$, $p<0,01$), таким образом носительство более распространено в младших возрастных группах крупного рогатого скота (Таблица 4).

Таблица 4 – Распространение носительства *U. diversum* среди коров различных возрастных групп

Число отёлов	Количество животных	Частота носительства <i>U. diversum</i>
0 (нетели)	20	75%
1	8	87 %
2	13	53,8 %
≥3	11	36%

С целью оценки распространённости носительства *U. diversum* в респираторном тракте у молодняка крупного рогатого скота было проведено исследование мазков из носовой полости от 53 телят из поголовья хозяйства Б. У двух телят в мазках из носовой полости была обнаружена ДНК *U. diversum*. Ни у одного из исследованных телят не было выявлено симптомов респираторных заболеваний. Частота носительства *U. diversum* среди молодняка, содержащегося в хозяйстве Б, составила 4% из числа исследованных особей.

С учётом сведений о путях распространения *U. diversum* среди поголовья крупного рогатого скота, патогенезе вызываемых её заболеваний и данных проведённой работы, целесообразным представляется организация обследования поголовья крупного рогатого скота на предмет носительства *U. diversum* при росте случаев бронхопневмонии у телят, особенно при развитии заболевания в первые дни жизни, а также при снижении репродуктивных качеств животных, росте числа случаев неэффективного осеменения, яловости, аборт, рождения ослабленного потомства. В силу особенностей локализации носительства и течения инфекции у взрослого крупного рогатого скота и молодняка схемы организации обследования в

этих группах различны. Схема проведения мероприятий по контролю за распространением *U. diversum* среди поголовья крупного рогатого скота и ассоциированными с ней заболеваниями представлена на рисунке 4.



Рисунок 4 – Схема проведения мероприятий по выявлению носительства *U. diversum* среди поголовья крупного рогатого скота и профилактики ассоциированных с ним заболеваний.

На основании результатов, полученных при исследовании поголовья хозяйства А, было предложено проведение антибиотикопрофилактики заболевания молодняка пневмонией, ассоциированной с *U. diversum*. В качестве препарата для введения телятам был выбран азитромицин, выпускающийся в инъекционной форме под маркой “Азитронит” (ООО “Нита-Фарм”, Россия) для применения животным в предусмотренной инструкцией дозировкой 40 мг. Результатом мероприятий по антибиотикопрофилактике стало повышение сохранности молодняка до 1,5-месячного возраста на 10%.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены видоспецифические генетические мишени для разработки диагностической тест-системы на основе ПЦР в реальном времени, предназначенной для выявления ДНК *U. diversum* в материале от крупного рогатого скота, в том числе последовательность гена 16 S рНК метилтрансферазы для выявления *U. diversum* и гена GAPDH для выявления ДНК крупного рогатого скота в качестве внутреннего контроля реакции ПЦР.

2. Разработан и оптимизирован композиционный состав реакционной смеси для выявления ДНК *U. diversum* в материале от крупного рогатого скота методом

ПЦР в реальном времени, позволяющий осуществлять выявления ДНК данных уреоплазм с аналитической чувствительностью до 10 геномных эквивалентов на аликвоту исследуемого материала.

3. На основании исследования клинического, патологического и биологического материала от крупного рогатого скота установлено, что при использовании ПЦР для выявления *U. diversum* наиболее диагностически значимыми являются результаты исследования мазков из преддверия влагалища у коров, при этом диагностическая значимость составляет 87%.

4. Разработанная методика на основе ПЦР в реальном времени пригодна для использования в лабораторных условиях с целью выявления ДНК *U. diversum* в биологическом материале, полученном от крупного рогатого скота, и позволяет оценить персистенцию *U. diversum* у крупного рогатого скота, распространённость которого среди обследованного поголовья составила 58%.

5. Носительство *U. diversum* более распространено среди нетелей, чем среди взрослых коров. Инфицированность в данной группе может достигать 75%, при этом среди коров носительство чаще всего выявляется у первотёлок, среди которых этот показатель может достигать 87%. В то же время у коров более старшего возраста этот показатель находится на уровне 36 – 54% от числа обследованных животных.

6. В условиях животноводческих хозяйств, расположенных на территории СЗФО Российской Федерации, *U. diversum* может рассматриваться в качестве причины обуславливающей снижение репродуктивных качеств коров, а также в качестве этиологического агента бронхопневмонии у телят, которая может приводить к гибели молодняка крупного рогатого скота.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При проведении мероприятий по этиологической диагностике бронхопневмоний молодняка крупного рогатого скота, а также заболеваний, ведущих к снижению репродуктивных качеств крупного рогатого скота, целесообразно проводить оценку распространённости *U. diversum* среди обследуемого поголовья.

Использование ПЦР в реальном времени позволит выявлять *U. diversum* как в клиническом, так и в биологическом материале от животных, и может применяться при обследованиях крупного рогатого скота. С целью выявления случаев ложноотрицательных результатов обследования, связанных деградацией ДНК в биологическом материале в результате нарушений правил отбора и условий транспортировки, целесообразно использовать тест-системы на основе ПЦР в реальном времени, включающие внутренний контроль на основе амплификации ДНК крупного рогатого скота.

Проведение обследования поголовья на предмет носительства *U. diversum* целесообразно проводить при росте случаев бронхопневмонии у телят, особенно при развитии заболевания в первые дни жизни, снижении репродуктивных качеств, росте числа случаев неэффективного осеменения, яловости, абортот, рождения ослабленного потомства. В силу особенностей локализации носительства и течения инфекции у взрослого крупного рогатого скота и молодняка схемы организации обследования в этих группах различны.

Поскольку при рождении телёнка от коровы, являющейся носителем *U. diversum*, высок риск контактно-аэрозольного заражения телёнка при родах, при выявлении высокого числа случаев носительства *U. diversum* среди взрослого крупного рогатого скота и случаев бронхопневмонии телят, развивающейся в первые дни жизни и ассоциированной с *U. diversum*, целесообразно проводить мероприятия по профилактике заболевания молодняка с целью повышения его сохранности.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Основным направлением работы является дальнейшая организация промышленного производства тест-системы “*Ureaplasma diversum* Amp” и внедрение её в работу практических лабораторий.

Планируется получение с использованием разработанной системы новых данных о распространении *U. diversum* среди популяций крупного рогатого скота и особенностях патогенеза различных форм заболеваний, вызываемых ею. Кроме того, планируется разработка системы мероприятий по профилактике уреоплазмоза в популяции крупного рогатого скота на территории Северо-западного региона Российской Федерации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ваганова, А.Н. Гистотехнические решения для повышения качества препаратов нуклеиновых кислот, выделенных из парафиновых блоков / А.Н. Ваганова // Гены и клетки. – 2014. – т. 9. - № 2. – С. 96-101.

2. Ваганова, А.Н. Молекулярные основы устойчивости патогенных для человека микоплазм к фторхинолонам / А.Н. Ваганова // Инфекция и иммунитет. – 2017. — т. 7. - № 3. – С. 231-244.

3. Ваганова, А.Н. Выявление *Ureaplasma diversum* в тканях лёгких крупного рогатого скота методом ПЦР в реальном времени / А.Н. Ваганова, О.А. Фрейлихман, С.В. Борисенко, В.В. Рока, В.Н. Вербов // В сборнике: «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии»: 18-я Всероссийская конференция молодых учёных. – Москва, 2018. — С. 216-217.

4. Ваганова, А.Н. *Ureaplasma diversum* и особенности уреоплазмоза крупного рогатого скота / А.Н. Ваганова, В.Б. Сбойчаков // В сборнике: VI Лужские научные чтения. Современное научное знание: теория и практика.

Материалы международной научной конференции. — Санкт-Петербург, 2018. — С. 33-36.

5. **Ваганова, А.Н.** Распространённость носительства *Ureaplasma diversum* в различных возрастных группах крупного рогатого скота / **А.Н. Ваганова**, О.А. Фрейлихман, С.В. Борисенко, В.В. Рока, В.Н. Вербов // Международный вестник ветеринарии. — 2018. — № 3. — С. 17-21.

6. **Ваганова, А.Н.** Оценка колонизации *Ureaplasma diversum* репродуктивной и респираторной систем коров / **А.Н. Ваганова**, О.А. Фрейлихман, С.В. Борисенко, В.В. Рока, В.Н. Вербов // Международный вестник ветеринарии. — 2018. — № 3. — С. 22-27.

7. **Ваганова, А.Н.** Оценка метода ПЦР в реальном времени для индикации *Ureaplasma diversum* в клиническом и патологическом материале от крупного рогатого скота / **А.Н. Ваганова**, О.А. Фрейлихман, С.В. Борисенко, В.В. Рока, В.Н. Вербов // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. — 2018. — № 3 — С. 37-40.

8. **Ваганова, А.Н.** Распространённость носительства *Ureaplasma diversum* в различных возрастных группах крупного рогатого скота / **А.Н. Ваганова**, О.А. Фрейлихман, С.В. Борисенко, В.В. Рока, В.Н. Вербов // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. — 2018. — № 3. — С. 30-33.

9. **Ваганова, А.Н.** Случаи выявления ДНК *Ureaplasma diversum* в венозной крови крупного рогатого скота / **А.Н. Ваганова**, О.А. Фрейлихман, С.В. Борисенко, В.В. Рока, В.Н. Вербов // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. — 2018. — № 9. — С. 22-28.

10. **Ваганова, А.Н.** Выявление *Ureaplasma diversum* в клиническом материале от крупного рогатого скота с использованием тест-системы «*Ureaplasma diversum*-Amp» / **А.Н. Ваганова**, С.В. Борисенко, О.А. Фрейлихман, В.В. Рока, В.Н. Вербов // Материалы международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика – 2018». — Минск, 2018 — С. 507-508.

11. **Ваганова, А.Н.** Выявление ДНК *Ureaplasma diversum* методом ПЦР в реальном времени в патологическом материале после фиксации в формалине / **А.Н. Ваганова**, Е.В. Суцкий // В сборнике: «Наука в современном обществе: закономерности и тенденции развития». Сборник статей международной научно-практической конференции. — Магнитогорск, 2018. — С. 266-268.

12. **Vaganova, A.N.** Fertilization failure in heifers infected by *Ureaplasma diversum* / **A.N. Vaganova**, S.V. Borisenko, O.A. Freilikchman, V.V. Roca, V.N. Verbov // Материалы международной конференции «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций». — Санкт-Петербург, 2018. — С. 612.

13. Ваганова, А.Н. Снижение репродуктивных качеств у коров, являющихся носителями *Ureaplasma diversum* / А.Н. Ваганова, О.А. Фрейлихман, С.В. Борисенко, В.В. Рока, В.Н. Вербов // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2018. – № 4. – С. 34-37.

14. Ваганова, А.Н. Ген 16S рРНК метилтрансферазы как мишень для выявления *Ureaplasma diversum* в биологическом материале / А.Н. Ваганова // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета). – 2018. – № 47. – С. 73-77.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГЦ — содержание гуанина и цитозина

ГЭ — геномный эквивалент

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

мг — миллиграмм

мкл — микролитр

мл — миллилитр

ПЦР — полимеразная цепная реакция

рРНК — рибосомная РНК

АКТВ — бета-актин

В2М — бета-микроглобулин

BLAST — Basic Local Alignment Search Tool

F_{эмп} — эмпирическое значение критерия Фишера

F_{крит} — критическое значение критерия Фишера

GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы

U_{эмп} — эмпирическое значение критерия Манна-Уитни