

Федеральное бюджетное учреждение науки  
«Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и  
микробиологии им. Пастера»  
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и  
благополучия человека

На правах рукописи

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

диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научные руководители:

кандидат биологических наук,  
Фрейлихман Ольга Александровна  
доктор биологических наук,  
Сусский Евгений Владимирович

Санкт-Петербург – 2019

## СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	7
Актуальность темы исследования.....	7
Степень разработанности темы исследования.....	8
Цель исследования.....	10
Задачи исследования.....	10
Научная новизна работы.....	10
Теоретическая и практическая значимость работы.....	12
Методология и методы исследования.....	14
Изоляты <i>U. diversum</i> .....	14
Биологический материал от крупного рогатого скота.....	15
Контрольные образцы ДНК.....	18
Микробиологические методы исследования.....	19
Молекулярно-генетические методы исследования.....	19
Биоинформационные методы исследования.....	23
Статистические методы исследования.....	23
Личное участие автора в получении результатов.....	26
Основные положения диссертации, выносимые на защиту.....	27
Степень достоверности и апробация результатов исследования.....	27
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	29
1.1 Систематическое положение и биология <i>Ureaplasma diversum</i> .....	29

1.1.1 Современные представления о систематике уреоплазм млекопитающих	29
1.1.2 Морфологические и физиологические особенности <i>U. diversum</i>	31
1.1.3 Геном <i>U. diversum</i> и его особенности	36
1.2 Распространённость уреоплазм среди млекопитающих и человека	38
1.3 <i>U. diversum</i> как этиологический агент заболеваний урогенитального и респираторного трактов крупного рогатого скота	42
1.3.1 Основы патогенности <i>U. diversum</i>	42
1.3.2 Патологии урогенитального тракта, вызываемые <i>U. diversum</i>	48
1.3.3 Патологии плода и плодных оболочек, вызываемые <i>U. diversum</i>	51
1.3.4 Патологии респираторного тракта, вызываемые <i>U. diversum</i>	52
1.4 Методы диагностики уреоплазмоза крупного рогатого скота	53
1.4.1. Культуральные методы выявления <i>U. diversum</i>	54
1.4.2 Молекулярно-биологические методы выявления <i>U. diversum</i>	56
1.5 Особенности иммунного ответа при уреоплазмозе крупного рогатого скота	57
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	60
ГЛАВА 2. Анализ генома и разработка праймеров для видоспецифического выявления ДНК <i>U. diversum</i> и <i>B. taurus</i>	60
2. 1. Поиск видоспецифичных генетических мишеней <i>U. diversum</i>	60
2.2. Подбор систем праймеров и зондов к выбранным участкам генома <i>U. diversum</i>	62
2. 3. Выбор видоспецифичных генетических мишеней <i>B. taurus</i>	67
2.4. Подбор систем праймеров и зондов к выбранным участкам генома <i>B. taurus</i>	69

ГЛАВА 3. Разработка и наработка опытных образцов диагностической тест-системы.....	72
3.1. Оптимизация качественного состава специфических компонентов реакционной смеси.....	72
3.2. Оптимизация количественного состава специфических компонентов реакционной смеси.....	75
3.3 Конструирование положительного контроля тест-системы и отрицательный контроль.....	78
ГЛАВА 4. Результаты испытания разработанной тест-системы.....	81
4.1. Аналитическая чувствительность системы “ <i>Ureaplasma diversum</i> -Amp”.....	81
4.2. Аналитическая специфичность системы “ <i>Ureaplasma diversum</i> -Amp”....	81
4.3. Стабильность тест-системы “ <i>Ureaplasma diversum</i> -Amp” .....	83
4.4 Нарработка опытных образцов тест-системы “ <i>Ureaplasma diversum</i> -Amp” .....	86
4.4.1 Состав наборов “ <i>Ureaplasma diversum</i> -Amp”.....	86
4.4.2 Реактивы для изготовления наборов “ <i>Ureaplasma diversum</i> -Amp” и процедура подготовки компонентов набора.....	87
ГЛАВА 5. Оценка разработанной тест-системы в условиях диагностической лаборатории.....	91
5.1. Выбор способа забора материала, обеспечивающего информативное исследование взрослого крупного рогатого скота на предмет носительства <i>U. diversum</i> .....	91
5.1.1 Выявление <i>U. diversum</i> в мазках из носовой полости и ротовой полости, отобранных у крупного рогатого скота.....	91
5.1.2 Выявление <i>U. diversum</i> в образцах различных типов, отобранных из репродуктивного тракта крупного рогатого скота.....	92

5.1.3 Выявление <i>U. diversum</i> в образцах крови.....	92
5.1.4 Показатели содержания ДНК <i>U. diversum</i> в образцах из полового и респираторного трактов.....	93
5.1.5 Оценка колонизации органов половой системы при носительстве уреоплазм в респираторном тракте.....	93
5.1.6 Оценка вероятности колонизации респираторного тракта при носительстве уреоплазм в половой системе.....	94
5.2. Оценка колонизации <i>U. diversum</i> абортированных плодов и внутренних органов животных, погибших от бронхопневмонии.....	97
5.3. Влияние фиксации патологического материала в формалине на результат исследования на предмет присутствия ДНК <i>U. diversum</i> .....	99
5.4. Информативность выявления <i>U. diversum</i> методом ПЦР в реальном времени с помощью тест-системы “ <i>Ureaplasma diversum</i> -Amp” в сравнении с культуральными методами. Оценка чувствительности и специфичности....	101
5.5. Влияние колонизации репродуктивной системы <i>U. diversum</i> на репродуктивные качества крупного рогатого скота.....	104
ГЛАВА 6. Распространённость <i>U. diversum</i> среди поголовья крупного рогатого скота.....	108
6.1 Распространённость <i>U. diversum</i> среди поголовья взрослого крупного рогатого скота.....	108
6.2. Распространённость <i>U. diversum</i> среди молодняка крупного рогатого скота.....	111
ГЛАВА 7. Алгоритм проведения диагностического исследования на предмет выявления носительства <i>U. diversum</i> и ассоциированных с ней заболеваний крупного рогатого скота, мероприятия по профилактике уреоплазмоза крупного рогатого скота.....	114

7.1 Алгоритм проведения диагностического исследования на предмет носительства <i>U. diversum</i> и ассоциированных с ней заболеваний у взрослого крупного рогатого скота.....	114
7.2 Алгоритм проведения диагностического исследования на предмет носительства <i>U. diversum</i> и ассоциированных с ней заболеваний у молодняка крупного рогатого скота.....	115
7.3 Профилактика заболеваний, ассоциированных с <i>U. diversum</i> среди молодняка крупного рогатого скота.....	116
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	119
ВЫВОДЫ.....	128
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	130
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	132
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	133
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	134
Приложение 1.....	163

## ВВЕДЕНИЕ

### 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% [120, 155]. В Финляндии *U. diversum* в настоящее время является ведущей причиной абортос у крупного рогатого скота [193]. У телят *U. diversum* выделяется при гнойной и казеозной бронхопневмониях [66, 196], а при колонизации репродуктивной системы быков уреаплазмы данного вида могут приводить к воспалительным заболеваниям и снижению качества спермы [122, 131].

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». Методические указания включают этапы бактериологического и цитохимического выявления микоплазм. Происходящее сегодня внедрение современных методов идентификации микроорганизмов позволяет сократить время на проведение исследования, снизить трудозатраты и повысить его точность [16]. Поэтому 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 телят часто может протекать бессимптомно, отмечено, что они значительно чаще выявляются у телят с симптомами респираторных заболеваний [26], особенно в случаях, когда заболевание характеризуется рецидивирующим течением [203]. 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 [178], сальпингитов, оваритов, метритов и задержанию последа [32, 209]. Бессимптомное носительство *U. diversum* в репродуктивном тракте коров приводит как к снижению эффективности оплодотворения, так и к абортam и осложнениям стельности.

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

### **Степень разработанности темы исследования**

Для выявления уреаплазм, в частности *U. diversum*, в клиническом и биологическом материале используют культуральные и молекулярно-биологические методы диагностики. Селективное выделение культур уреаплазм основано на их метаболических особенностях, таких как потребность в мочеvine, и невосприимчивость к воздействию антибиотиков бета-лактаминового ряда. При росте уреаплазм отмечается увеличение рН в щелочном диапазоне, поэтому об их росте судят по изменению рН, оцениваемому с помощью индикаторов. Производимые в России среды для выявления уреаплазм производства НПО "Питательные среды" (Махачкала) [10], ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург) [11], а также импортируемая среда производства Биомерье (Франция) [135] разработаны для диагностики уреаплазмоза человека и не предназначены для использования в ветеринарии.

В настоящее время получили распространение молекулярно-биологические методы выявления *U. diversum*, ПЦР и ПЦР в реальном времени. Их преимуществом является высокая чувствительность и специфичность. Описано успешное применение тест-систем на основе ПЦР

для выявления *U. diversum* в мазках из репродуктивного тракта крупного рогатого скота, образцах спермы и материале из респираторного тракта крупного рогатого скота, который *U. diversum* также способна колонизировать.

Преимуществами ПЦР в реальном времени является снижение риска контаминации образцов и рабочего пространства лаборатории, связанное с исключением этапа электрофоретического разделения продуктов ПЦР, а также снижение затрат времени на проведение исследования. На основе ПЦР в реальном времени разработано несколько тест-систем для выявления *U. diversum* в биологическом материале от крупного рогатого скота, производящихся как в России, так и за рубежом. Для молекулярно-биологической диагностики уреоплазмоза крупного рогатого скота в РФ доступны две диагностические тест-системы: “Уреоплазмоз (*Ureaplasma* sp.)” (производство ООО “Фрактал Био”) [21]; тест-система на основе микрочипов, производимая ГК “Люмэкс” [7].

Производимая компанией ГК “Люмэкс” тест-система может быть использована только на приборе АриаДНА в формате микрочипов, что значительно ограничивает возможности её применения. Система “Уреоплазмоз (*Ureaplasma* sp.)” ООО “Фрактал Био” не позволяет проводить видовую идентификацию возбудителя заболевания. Кроме того, ни одна из указанных тест-систем не дает возможности определить вид животного, от которого был получен исследуемый материал. В связи с этим, остаётся востребованным создание тест-системы на основе ПЦР в реальном времени, которая обладала бы высокой аналитической чувствительностью и специфичностью, была бы совместима с оборудованием для ПЦР в реальном времени различных моделей и позволяла бы осуществлять видовую идентификацию как *U. diversum*, так и животного, от которого был получен исследуемый образец.

**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 уrogenитального 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 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.СC07.В.00018/18 / вРФ(ЕП).СC07.00021/18).

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 проведения 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% (акты 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 методов, 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)".

### **Изоляты *U. diversum***

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 болезнью и аденовирусной инфекции крупного рогатого скота (ООО «Ветбиохим», г. Москва).

Для культивирования *U. diversum* была использована среда “УРЕАПЛАЗМА-Среда”. Проводился посев гомогената образца исследуемой ткани объёмом около 2 мм<sup>2</sup> в пробирку типа эппендорф со средой. 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 уреаплазм за счёт снижения температуры до +4° С°.

### **Биологический материал от крупного рогатого скота**

В качестве исследуемого материала в процессе выполнения работы использовали биологический материал от крупного рогатого скота, в том числе мазки из носовой полости, ротовой полости, преддверия влагалища, влагалища, образцы венозной крови, образцы здоровой и патологически изменённой ткани лёгкого.

Мазки из респираторного и репродуктивного трактов отбирались у взрослых коров без симптоматики эндометрита и респираторных заболеваний. Мазки из носа отбирались у клинически здоровых телят и телят с симптомами бронхопневмонии молодняка (кашлем). При отборе материала (мазков) были использованы зонды для отбора и обработки биологических

проб для лабораторных исследований стерильные: зонд тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб в комплекте с пробиркой, представленные на рисунке 1 (Далиан РонгбангМедикал Хелси Девайсез Ко Лтд. Китай), среда для хранения и транспортировки “УРЕАПЛАЗМА-Среда” (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, патент №2568062 “Лиофилизированная питательная среда для визуального выявления *Ureaplasma urealyticum*”).

Отбор крови производился в вакуумные системы забора крови с антикоагулянтом ЭДТА S-Monovette (Sarstedt, Германия). Фрагменты органов весом 2-3 г помещались в пробирки эппендорф 1,5 мл (Axygene Ltd., США).

Отбор мазков проводился с помощью зондов тампонов в комплекте с пробиркой с предварительно внесёнными 2 мл среды “УРЕАПЛАЗМА-Среда” (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера). У взрослых коров отбирались мазки из носовой полости, ротовой полости, преддверия влагалища, влагалища, у телят отбирались мазки из носовой полости.

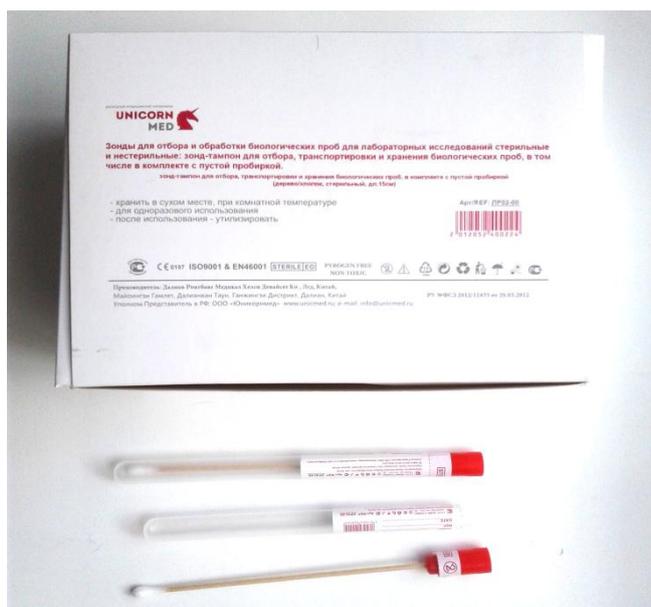


Рисунок 1 – Зонды для отбора биологических проб

Мазок из ротовой полости отбирался с поверхности эпителия дёсен в области угла губ.

Мазок из влагалища отбирался с верхнего и нижнего свода влагалища и боковых поверхностей.

Мазок из преддверия влагалища отбирался из нижнего свода влагалища с захватом области ямки клитора и областей локализации патологических изменений при их наличии.

Мазок из носовой полости телят проводился путём введения зонда-тампона в дорсальный носовой канал через носовой ход на максимальную глубину (примерно 14 см), что соответствует передней части дорсальной ноздри.

Мазок из носовой полости взрослого крупного рогатого скота отбирался из дорсального носового канала путём введения через носовой ход на максимальную глубину.

Отбор патологического материала проводился от трупов павших животных с клиникой, характерной для заболевания катаральной бронхопневмонией, а также от абортированных плодов. При проведении патологоанатомического вскрытия материал для тестирования отбирался на границе здоровой и поражённой ткани.

Фиксация патологического материала проводилась в нейтральном забуференном 10% формалине (фиксатор “Гистофор” ООО “БиоВитрум”, Санкт-Петербург). Материал погружался в раствор непосредственно после отбора, с соблюдением объёмного соотношения образца и фиксатора 1:10-15.

Транспортировка и хранение отобранного материала осуществлялось при температуре  $-15^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ . Транспортировка материала, зафиксированного в формалине, осуществлялась при температуре окружающей среды.

Для подготовки к выделению ДНК материал предварительно размораживался. При подготовке мазков к выделению ДНК транспортная среда перемешивалась зондом и переносилась в пробирку-эппендорф в полном объёме. После концентрирования среды путём центрифугирования в объёме 1,5 см<sup>3</sup> при 12 000 g в течение 5 минут проводилось выделение ДНК из полученного осадка.

При работе с кровью проводилось концентрирование форменных элементов путём центрифугирования в объёме 1,5 см<sup>3</sup> при 12 000 g в течение 5 минут. Выделение ДНК проводилось из полученного осадка.

Подготовка образцов ткани к выделению ДНК проводилась путём механической гомогенизации.

Выделение проводили с использованием набора “ДНК-сорб-В” (ООО “Интерлабсервис”), в соответствии с инструкцией.

Образцы, предназначенные для сравнения разрабатываемой тест системы с культуральными методами по параметрам чувствительности и специфичности, отбирались в двух повторах. Из одного образца проводилось выделение ДНК, второй помещался в термостат на температуру +37° С.

Температурный режим транспортирования и хранения при –20° С был осуществлён с помощью аккумуляторов холода и пенопластового термоконтейнера, обеспечившего температурный режим –15° С +/-5° С в течение 24 часов, в соответствии с инструкцией по применению.

### **Контрольные образцы ДНК**

Для контроля аналитической специфичности разработанной тест-системы были использованы образцы ДНК, выделенные из культур изолятов, находящихся в коллекции Отдела новых технологий ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера *Mycoplasma hominis* (15 изолятов), *U. parvum* (4 изолята), *U. urealyticum* (4 изолята). Помимо ДНК, выделенной из культур указанных микоплазм, для контроля аналитической

специфичности разрабатываемой тест-системы были взяты образцы ДНК, выделенной из биологического материала от крупного рогатого скота, в которых методом ПЦР в реальном времени было установлено присутствие *M. bovis* (2 образца) и *M. bovis genitalium* (3 образца). 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”), “Вакцина против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота”.

### **Микробиологические методы исследования**

Выделение и идентификация микроорганизмов вида *U. diversum* с использованием культурального метода. Для выделения изолятов *U. diversum* был проведён посев биологического материала, полученного из очага, локализованного в верхушечной доли лёгкого трупа телёнка 14-дневного возраста чёрно-пёстрой породы из хозяйства А. Для культивирования была использована среда “УРЕАПЛАЗМА-Среда” (производство ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера).

После 5 часов культивирования при первом просмотре было отмечено изменение цвета культуральной среды с оранжевого на розовый, свидетельствующее о росте уреоплазм.

Для изготовления микропрепаратов использовались предметные стёкла, набор для окраски по Граму (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера). Микроскопическое исследование проводилось с использованием микроскопа Viola mc20 i (Micros Austria, Австрия) при увеличении x1000, с масляной иммерсией.

### **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).

Выделение ДНК из образцов венозной крови и мазков с поверхности слизистых оболочек осуществлялось с использованием набора ДНК-сорб-В (ООО «Интерлабсервис»). В качестве материала для выделения ДНК отбирались образцы клеточной фракции из 1,5 мл цельной венозной крови, ресуспендированные в 100 мкл сыворотки крови. При исследовании мазков отбирались осадки, полученные путём центрифугирования транспортной среды, ресуспендированные в 100 мкл супернатанта.

Выделение ДНК из образцов тканей проводилось с использованием набора «ДНК-Экстран 2» (ООО «Синтол»). С целью выделения ДНК отбирались образцы гомогенатов органов весом 2-3 г.

Выделение ДНК проводилось в ламинарном боксе биологической безопасности I класса защиты БАВ-"Ламинар-С"-1,5, оснащённом центрифугой MiniSpin (Eppendorff, Германия), твердотельным термостатом «Термит» («ДНК-технология»), вортексом V-1 plus (Biosan, Латвия) и комплектом дозаторов BioHit Proline, 5-50 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл (BioHit Oyj., Финляндия), в обособленном боксе с предбоксовым помещением.

Видовая идентификация *U. diversum* с использованием генотипического метода. Видовая идентификация изолята была проведена путём секвенирования 16S рРНК. Для проведения секвенирования было подобрано 5 пар праймеров, позволяющих амплифицировать последовательность 16S рРНК и фланкирующие её участки, и секвенировать полученные ампликоны. Для предотвращения информационного разрыва исследуемой последовательности, связанного с трудностью считывания

генетических последовательностей в области посадки праймера, применённые для секвенирования праймеры были подобраны таким образом, чтобы обеспечить частичное перекрытие считываемых с них последовательностей (Приложение 1). Это повышало достоверность считывания анализируемых последовательностей.

Для накопления ампликонов и последующего секвенирования была проведена ПЦР в стандартном режиме с подобранными праймерами. С целью очистки полученных ампликонов от неспецифических продуктов реакции было проведено разделение реакционной смеси методом электрофореза в 2% агарозном геле. Участки геля, содержащие специфические ампликоны были вырезаны из пластины геля. Фрагменты геля были лизированы раствором NaI, ампликоны были выделены из лизата с помощью набора «Диатом» (ООО «Изоген», Россия).

Секвенирование очищенных ампликонов по Сенгеру было проведено ООО «Бигль» на основании договора о возмездном оказании услуг. Для секвенирования была использована автоматическая капиллярная система MegaBACE 1000 DNA Analysis System (GE Healthcare, Германия). Результаты секвенирования были переданы ООО «Бигль» в файлах в формате .ab1. Хроматографические кривые были проанализированы с целью контроля качества с помощью программы Bioedit. Перевод данных в формат .fasta для дальнейшего исследования был также осуществлён с использованием программы Bioedit.

Сопоставление полученных последовательностей с генетическими последовательностями, представленными в базе данных GenBank, было проведено с использованием алгоритма nBLAST ([blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)). На основании проведённого анализа было установлено, что уровень сходства между полученными последовательностями и последовательностями 16S рРНК *U. diversum* составляет 98%, что свидетельствует о принадлежности

изолята к виду *U. diversum*, поскольку различие данной последовательности на внутривидовом уровне, как правило, не превышает 97% [211].

Постановка стандартной ПЦР проводилась с использованием HS Taq ДНК-полимеразы с буфером (ООО “Евроген”), раствора  $MgCl_2$ , 25 ммоль (ООО “Синтол”), олигонуклеотидных праймеров (синтезированы ООО “Бигль” на основании договора оказания услуг). Контроль температурного режима реакции осуществлялся в термоциклере Verity (Applied Biosystems, США).

Приготовление реакционных смесей для ПЦР в реальном времени осуществлялось на основе готовой реакционной смеси qPCRMix-HS (ООО “Евроген”) с добавлением раствора  $MgCl_2$ , 25 ммоль (ООО “Синтол”), олигонуклеотидных праймеров (синтезированы ООО “Бигль” на основании договора оказания услуг). Контроль температурного режима реакции и детекция накопления флуоресцентного сигнала в ходе реакции ПЦР в реальном времени осуществлялись в термоциклере реального времени CFX 96 (Bio-Rad, США).

Подготовка реакционных смесей для ПЦР и ПЦР в реальном времени проводилось в ламинарном боксе биологической безопасности I класса защиты БАВ-"Ламинар-С"-1,2, оснащённом вортексом V-1 plus (Biosan, Латвия) и комплектом дозаторов BioHit Proline, 5-50 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл (BioHit Oyj., Финляндия), в обособленном боксе с предбоксовым помещением.

Приготовление реакционных смесей проводилось в соответствии с инструкциями к их компонентам. Особенности состава реакционных смесей при постановке ПЦР в ходе оптимизации соотношения компонентов реакционной смеси приведены в главе “Результаты”.

Состав реакционной смеси для ПЦР в реальном времени при проведении диагностических исследований соответствовал проекту

инструкции по применению разработанной диагностической системы для выявления *U. diversum* “*Ureaplasma diversum* Amp”.

Для проведения ПЦР в реальном времени был использован температурный режим, представленный на рисунке 2. Данный температурный режим применялся при всех постановках ПЦР.

### **Биоинформационные методы исследования**

Подбор праймеров проводился с использованием программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Контроль температуры плавления разработанных олигонуклеотидов проводился с использованием программы OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>).

Оценка результатов секвенирования. Для оценки качества и анализа результатов секвенирования исследованных последовательностей ДНК использовались программа Bio-Edit (Ibis Therapeutics, США). Анализ данных секвенирования путём сравнения с данными базы GenBank осуществлялся с использованием алгоритма поиска основного локального выравнивания нуклеотидных последовательностей nucleotide BLAST (BLASTn, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### **Статистические методы исследования**

Математическая обработка результатов ПЦР в реальном времени и статистическая обработка данных проводились с использованием программы Excel (Microsoft Inc., США).

#### Описательные статистические показатели

В качестве описательных статистических показателей использовались следующие значения:

Среднее арифметическое значение  $\bar{x}$  рассчитываемое по формуле:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

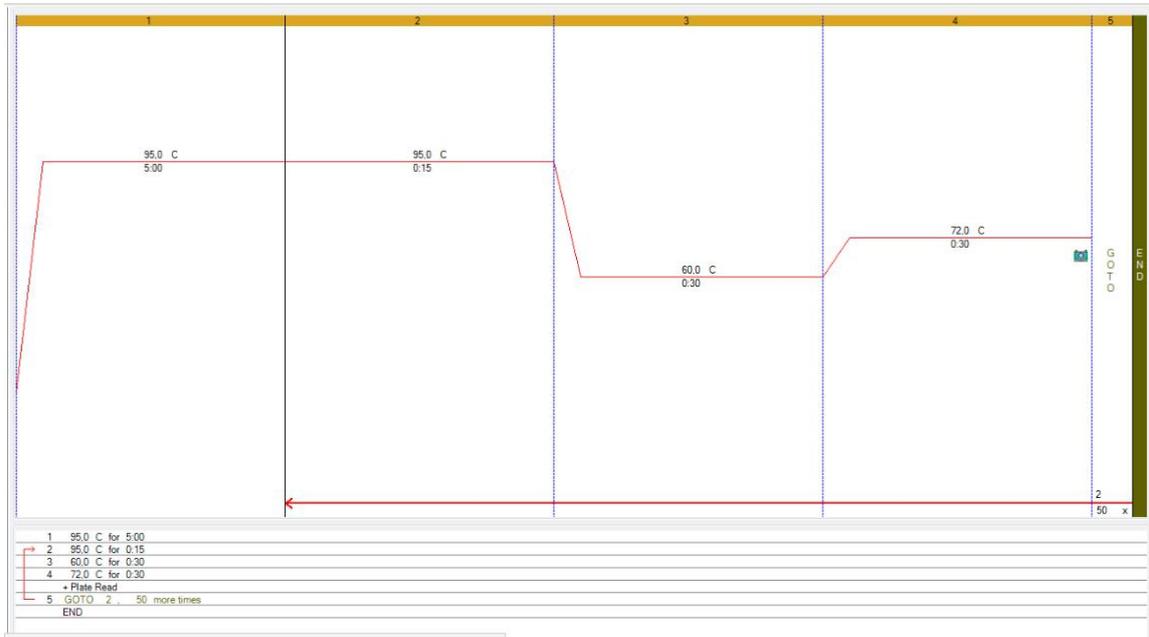


Рисунок 2 – Схема температурного режима реакции в программе CFX Manager

Где

$x_i$  — значения описываемого показателя

$n$  — число значений

Среднее квадратическое отклонение  $\sigma$ , рассчитываемое по формуле:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

Коэффициент вариации  $V$ , рассчитываемый по формуле:

$$V = \frac{\sigma}{\bar{x}} * 100$$

Дисперсия  $\sigma^2$ , рассчитываемая по формуле:

$$\sigma^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n};$$

U-критерий Уилкоксона – Манна – Уитни

U-критерий использовался в качестве непараметрического критерия для оценки различий исследуемых групп по показателям частоты встречаемости *U. diversum* и наличия симптоматики. Расчёт U-критерия проводился по следующей схеме:

1. Все варианты сравниваемых совокупностей были ранжированы в общем ряду, после чего каждому варианту был присвоен ранг. При повторяющихся вариантах присваивался общий ранг для всех случаев, за значение которого принималось среднее значение рангов.
2. Ранги, присвоенные значениям внутри каждой выборки, были просуммированы.
3. Было рассчитано значение U-критерия по формуле:

$$U = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_x \cdot (n_x + 1)}{2} - T_x$$

Где:

$n_1$  - количество элементов в первой выборке,

$n_2$  - количество элементов во второй выборке,

$n_x$  - количество элементов выборки, которой соответствует наибольшая сумма рангов,

$T_x$  - наибольшая сумма рангов.

4. Проводилось сравнение полученного значения эмпирического U-критерия ( $U_{\text{эмп}}$ ) с критическими значениями U-критерия ( $U_{\text{крит}}$ ), определяемыми по таблице с учётом объёма выборок, для уровня значимости  $P < 0,05$ . В случаях, когда  $U_{\text{эмп}} > U_{\text{крит}}$  принималась нулевая гипотеза ( $H_0$ ) о том, что различия между исследуемыми выборками отсутствуют. Если же  $U_{\text{эмп}} \leq U_{\text{крит}}$ , то принималась альтернативная гипотеза о том, что между выборками существуют статистически значимые различия по исследуемому параметру.

F - критерий Фишера

F - критерий Фишера применялся в качестве параметрического статистического критерия при сравнении выборок по показателям инфекционной нагрузки, эффективности оплодотворения, длительности временного интервала между отёлом и последующей стельностью и другим показателям, пригодным для исследования с использованием параметрических критериев.

Оценку F-критерия проводился по следующей схеме:

1. Эмпирическое значение критерия рассчитывалось по формуле:

$$F = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2}$$

где:

$\sigma_1^2$  — большая дисперсия для рассматриваемых вариационных рядов,  
 $\sigma_2^2$  — меньшая дисперсия для рассматриваемых вариационных рядов.

Проводили сравнение вычисленного значения F-критерия ( $F_{\text{эмп}}$ ) и критического значения F-критерия ( $F_{\text{крит}}$ ), определяемыми по таблице с учётом объёма выборок, для уровней значимости  $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ . В случаях, когда  $F_{\text{эмп}} < F_{\text{крит}}$  принималась нулевая гипотеза ( $H_0$ ) о том, что различия между исследуемыми выборками отсутствуют. Если же  $F_{\text{эмп}} \geq F_{\text{крит}}$ , то принималась альтернативная гипотеза о том, что между выборками существуют статистически значимые различия по исследуемому параметру.

### **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 снижении 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 проверенного

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 с использованием специализированного программного обеспечения.

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.).

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Систематическое положение и биология *Ureaplasma diversum*

Уреаплазмы вида *U. diversum* — условно-патогенные бактерии, колонизирующие слизистые оболочки респираторного тракта и мочеполовой системы крупного рогатого скота [89]. Они были выделены из различных отделов мужской и женской репродуктивной системы крупного рогатого скота, из лёгких телят и крупного рогатого скота при бронхопневмонии, а также со слизистой оболочки глаз при кератоконъюнктивитах [174].

Обнаруженные у крупного рогатого скота уреаплазмы, были включены в состав вида *U. diversum* и отделены от единственного описанного на тот момент вида уреаплазм *U. urealyticum* в 1982 году на основании серологических особенностей, содержания ГЦ в геноме и белкового состава, определённого методом электрофореза в полиакриламидном геле [90]. Дальнейшие исследования, проведённые с использованием молекулярно-биологических методов, в первую очередь секвенирования 16 S рРНК, подтвердили, что данные уреаплазмы формируют группу, отличную от уреаплазм человека, *U. urealyticum* и описанной позже родственной ему *U. parvum* [80, 169].

#### 1.1.1 Современные представления о систематике уреаплазм

##### млекопитающих

Род *Ureaplasma* входит в состав семейства *Mycoplasmataceae* порядка *Mycoplasmatales*, класса *Mollicutes*. В первом издании “Руководства по систематике бактерий Берджи” 1986 года данный класс рассматривался в составе отдела XIV *Firmicutes*, однако во втором издании он был включён в состав нового отдела XVI *Tenericutes* [116, 183].

Семейство *Mycoplasmataceae*, Микоплазмы, объединяет род *Ureaplasma* с другим, более крупным и не таким однородным по составу

родом *Mycoplasma*. Оба рода характеризуются рядом общих свойств. Это мелкие, плеоморфные, грамотрицательные микроорганизмы, лишённые клеточной стенки, склонные к персистенции на мембране клеток организма хозяина, отличающиеся малым размером и высокой изменчивостью генома, изменчивым фенотипом, ограниченностью метаболических путей и слабой иммуногенностью [1, 5]. Основным признаком, отличающим род *Ureaplasma* от рода *Mycoplasma*, является способность к гидролизу мочевины с выделением CO<sub>2</sub> и аммиака [165].

Род *Ureaplasma* объединяет неподвижные бактерии имеющие форму кокков и коккобацилл, реже — нитчатую форму, размером порядка 500 нм в диаметре. В настоящее время он включает виды *U. urealyticum*, *U. parvum*, *U. gallorale*, *U. cati*, *U. felinum*, *U. canigenitalium* и *U. diversum* [116]. Не смотря на некоторые морфологические различия между представителями данных видов, основным критерием при их идентификации является источник, из которого был получен изолят. Это связано с высокой гостальной специфичностью, присущей уреаплазмам. Все виды уреаплазм ассоциированы с одним или несколькими видами хозяев. Представители вида *U. gallorale* выделяются только из материала, полученного от птиц [110]. *U. cati* и *U. felinum*, несмотря на выраженные различия между ними, колонизируют ротовую полость кошек [80]. *U. canigenitalium* выявляется в репродуктивном тракте собак [82]. *U. diversum* выявляется только у парнокопытных, в том числе у крупного рогатого скота [116], включая не только быка домашнего (*Bos taurus*), но и другие виды, в частности, азиатского буйвола (*Bubalus bubalis*) [150], и, реже, у коз, овец [52], свиней [38] и верблюдов [85]. При этом изоляты, выделенные у крупного рогатого скота, и изоляты от коз и овец, вероятно, относятся к различным подгруппам в составе вида *U. diversum* [94, 148]. У человека выявлено два вида условно-патогенных уреаплазм, различающихся по структуре генома, способности к

росту на питательных средах и патогенному потенциалу, *U. urealyticum* и *U. parvum* [185, 129].

Исследование молекулярной филогении современных уреаплазм указывает на существование общего предка уреаплазм, колонизирующих организм млекопитающих, по крайней мере, 100 000 000 лет назад, в Меловой период, что совпадает по времени с дивергенцией ветвей эволюционного древа млекопитающих, к которым относятся современные семейства Псовых и Кошачьих, подотряд Жвачных и отряд Приматов. По-видимому, дивергенция уреаплазм была следствием дивергенции их хозяев и сопровождалась адаптацией к физиологическим особенностям соответствующих групп млекопитающих, что выражается в отмеченной высокой гостальной специфичности видов, существующих сегодня [28, 80, 81].

### **1.1.2 Морфологические и физиологические особенности *U. diversum***

Название *U. diversum*, которое можно перевести как “отличающаяся”, было присвоено виду как из-за того, что он был отделён от единственного на тот момент вида уреаплазм *U. urealyticum* на основании выявленных отличий, так и из-за отмеченной у него высокой антигенной изменчивости, присущей данному виду [116]. Уреаплазмы вида *U. diversum* представляют собой кокки и коккобациллы диаметром до 500 нм [116]. Клетки *U. diversum* окружены тонкой полисахаридной капсулой [131]. При этом отмечено, что толщина капсулы значительно меньше, чем у *U. urealyticum*, штаммы которой отличается более выраженной капсулой, значительно варьирующей по толщине [172].

Исследование морфологической изменчивости близкородственной уреаплазмы *U. urealyticum* показало, что эти уреаплазмы могут существовать в трёх морфологических формах. Были выявлены малые клетки (120–150 нм) с гомогенной цитоплазмой и множеством рибосом, клетки среднего размера

(500–750 нм) с рибосомами по периферии и большие клетки с оптически более плотной негомогенной цитоплазмой и выраженным нуклеоидом [3].

При окраске по Граму уреаплазмы окрашиваются отрицательно, однако из-за слабого связывания с красителями для их визуализации предпочтительно окрашивать препарат только кристаллическим фиолетовым, без осуществления дальнейших этапов окраски по Граму, или применять окраску по Гимзе [116].

В природе уреаплазмы и микоплазмы существуют в ассоциации с мембранами клеток хозяина, однако многие виды способны к росту в аксеничной культуре на питательных средах [12]. На плотных питательных средах *U. diversum* формирует колонии диаметром порядка 100-170 мкм росинчатого вида, которые при исследовании под стереомикроскопом могут иметь вид “яичницы” [116]. Рост уреаплазм характеризуется короткой логарифмической фазой, из-за чего их накопление в жидких питательных средах не превышает  $10^4$ - $10^6$  КОЕ/мл [18]. При этом стационарная фаза роста достигается у большинства уреаплазм за 16-18 часов [3], но у *U. diversum* наступление стационарной фазы может наступать позже, через 24-48 часов с момента посева [198]. Оптимум pH ростовой среды для уреаплазм ниже, чем для большинства микоплазм, и составляет 6,0–6,5. На плотной среде уреаплазм предпочтительно культивировать в атмосфере газовой смеси, состоящей из 95% N<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>, либо 5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> и 85% N<sub>2</sub>. В то же время как на жидких средах оптимальные условия роста достигаются за счёт погружения в культуральную жидкость и максимально эффективного роста на глубине, где содержание кислорода соответствует оптимальному [3].

Как и все микоплазмы, *U. diversum* обладает малым объёмом генома, в результате чего она не способна к самостоятельному синтезу большинства жизненно важных молекул, а также имеет крайне ограниченные возможности энергетического метаболизма [60, 77, 158]. Основным путём получения

энергии *U. diversum* является гидролиз мочевины до аммиака и углекислого газа, сопровождающийся возникновением ионного потенциала на цитоплазматической мембране. О важности этого процесса свидетельствует тот факт, что применение химических ингибиторов уреазы останавливает рост уреоплазм [101]. При гидролизе мочевины выделяется аммиак, обладающий цитотоксическим эффектом, который частично утилизируется уреоплазмами в качестве акцептора водорода. Образующийся при гидролизе мочевины аммиак может восстанавливаться с формированием иона аммония  $\text{NH}_4^+$ , что сопровождается появлением градиента заряда на мембране. На следующем этапе энергетического метаболизма градиент заряда преобразуется в энергию химических связей путём синтеза АТФ с участием фермента АТФ-азы [140, 151, 214]. Кроме аммония, накапливающегося при гидролизе мочевины, уреоплазмы используют транспортёры, осуществляющие импорт аммония извне [151], однако этот процесс возможен только в слабокислой среде [20]. Следует отметить, что в отличие от *U. urealyticum*, у *U. diversum* отсутствуют транспортёры мочевины, осуществляющие активный импорт этого соединения в клетку [75, 132].

Ферментативный аппарат, осуществляющий процесс гидролиза мочевины, сходен у уреоплазм различных видов и детально описан на примере типового вида рода *Ureaplasma*, *U. urealyticum*. Реакция гидролиза мочевины осуществляется ферментом с уреазной активностью, уреазой. В состав этого фермента входят три субъединицы, кроме того, для работы уреазы необходимо связывание белковой молекулы с атомами никеля [189, 202, 215]. Уреаза локализована в цитоплазме уреоплазм, где она является одним из основных белковых компонентов, и, по-видимому, может присутствовать в нескольких изоформах, различающихся по субъединичному составу [34, 55, 133].

В оперон, кодирующий уреазу, помимо трёх структурных генов, продуктами которых являются субъединицы фермента, входят четыре гена, *ureE*, *ureF*, *ureG* и *ureD*, продукты которых, вероятно, имеют регуляторную функцию, в частности, продукт гена *ureD* необходим для экспрессии структурных генов уреазы [143]. По структуре уреазы уреоплазм сходны с уреазой грамотрицательных бактерий гидролизующих мочевины [33].

Следует отметить, что активность уреазы обеспечивает потребность уреоплазм в получении АТФ, но не даёт защитного эффекта при повышении концентраций мочевины в среде. Как и микоплазмы, лишённые уреазной активности, уреоплазмы гибнут при превышении концентрации мочевины 0,25 моль [133]. Также уреазная активность фермента подавляется в присутствии тяжёлых металлов [192]. Оптимальное значение pH для работы уреазы лежит в слабощелочной области, составляя порядка 7,5. При защелачивании среды до pH 9 фермент инактивируется [35].

Кроме пути получения энергии за счёт уреазной активности, уреоплазмы, по-видимому, способны к использованию иных путей катаболизма, однако на их долю приходится не более 5% получаемой этими бактериями энергии. Исследования генома показали, что уреоплазмы способны использовать глюкозу или фруктозу в качестве субстрата энергетического метаболизма [153]. В частности, были найдены ферменты, участвующие в гликолизе [146], однако они не обеспечивают полноценного функционирования данного катаболического пути. Таким образом, гликолиз у уреоплазм не обеспечивает получения молекул АТФ, а служит источником субстрата для пентозофосфатного метаболического пути [130]. Возможно также функционирование других путей катаболизма углеводов, осуществляемое за счёт двойной активности ферментов иных метаболических путей, что характерно для многих ферментов уреоплазм и затрудняет идентификацию этих путей получения энергии в виде химических

связей в молекуле АТФ [159, 161]. Ферментов, задействованных в утилизации аргинина, распространённых среди микоплазм, у уреаплазм обнаружено не было [146].

Возможности биосинтеза необходимых для поддержания жизнедеятельности биомолекул у уреаплазм ограничены. Будучи ауксотрофными бактериями, уреаплазмы зависят от поступления питательных веществ извне. У них обнаружена пептидазная активность [146] и системы импорта олигопептидов в клетку [151], в то же время системы биосинтеза аминокислот у этих бактерий полностью отсутствуют [131]. Таким образом, потребность в аминокислотах полностью покрывается за счёт их импорта, в том числе в составе пептидов. Также у уреаплазм отмечено наличие ферментов, участвующих в рециклизации пуринов [43, 146]. К синтезу нуклеиновых оснований *de novo* они не способны и нуждаются в получении этих соединений извне [14]. Уреаплазмы выделяют ферменты, осуществляющие внеклеточное дефосфорилирование нуклеотидов, транспорт нуклеотидных оснований, и, возможно, рибонуклеотидов или дезоксирибонуклеотидов, системы дерибозилирования, дедезоксирибозилирования и фосфорилирования нуклеотидов [159]. В качестве источника фосфора уреаплазмы способны использовать неорганический фосфор, преобразуя его в усвояемый фосфат [53]. Уреаплазмы отличаются от других микоплазм способностью синтезировать как насыщенные, так и ненасыщенные жирные кислоты [3].

Отсутствие у микоплазм, и, в частности, у уреаплазм, клеточной стенки определяет их природную устойчивость к бета-лактамам, гликопептидам и фосфомицину. Для лечения инфекций, вызванных патогенами данной группы, применяют макролиды, тетрациклины и фторхинолоны [30]. Однако у этих бактерий описаны системы множественной лекарственной резистентности, участвующие в защите от антибиотиков и противомикробных соединений

[153, 200]. Антибиотики, используемые при консервации семени, не приводят к гибели контаминирующих его уреоплазм [97].

Уреоплазмы неустойчивы к окислительному стрессу, у них отсутствуют необходимые для защиты от него ферменты [146]. В окружающей среде *U. diversum* способна сохраняться не более суток, однако она сохраняет вирулентные качества и может колонизировать организм крупного рогатого скота, в первую очередь, быков [145].

Представители рода *Ureaplasma* хорошо сохраняются в лиофилизированных и замороженных культурах. Срок хранения такого материала может составлять несколько лет. Следует отметить, что *U. diversum* лучше переносит хранение в подобных условиях, чем уреоплазмы, колонизирующие организм человека [64].

### **1.1.3 Геном *U. diversum* и его особенности**

Геном *U. diversum*, как и всех представителей семейства микоплазм, отличается малым объёмом и высокой вариабельностью [158]. Его размер составляет порядка 0,97-1,17 млн. п.н., что сопоставимо с размером уреоплазм видов *U. felinum* и *U. urealyticum*, колонизирующих слизистые оболочки кошек и человека соответственно, но почти в два раза превышает размер генома уреоплазм, выделенных из материала от птиц, *U. gallorale* и колонизирующих мочеполовую систему человека уреоплазм *U. parvum* [75, 99, 131, 151, 217].

В структурном плане геном *U. diversum* представлен единственной кольцевой хромосомой. Содержание гуанина и цитозина (ГЦ) составляет порядка 28%, что несколько выше, чем у других уреоплазм (25-27%). При исследовании единственного на сегодняшний день полностью секвенированного генома *U. diversum* было выявлено 646 кодирующих последовательностей (CDSs), 6 генов рРНК и 22 последовательности,

кодирующих тРНК. Биоинформатический анализ позволил идентифицировать функцию 374 кодирующих последовательностей [130].

Отличительной особенностью генома *U. diversum*, выявленной и у других микоплазм, является использование последовательности ТГА в качестве кодона, соответствующего аминокислоте триптофану, в то время как у большинства живых организмов эта последовательность является стоп-кодоном. Это отличие механизмов считывания генетической информации затрудняет функциональные исследования генетических последовательностей *U. diversum* путём переноса их в клетки модельных объектов, например *E. coli* [4, 130, 180].

Накопление мутаций происходит у микоплазм быстрее, чем у большинства микроорганизмов, из-за утраты 3'-5' экзонуклеазной активности их ДНК-полимеразы [29]. Исследование генома *U. diversum* путём обработки тотальной ДНК рестриктазами и последующего пульс-электрофореза показало его высокую изменчивость. Выявленные особенности генома позволяли идентифицировать штаммы, ассоциированные со вспышками уреоплазмоза на отдельных хозяйствах. Однако найденные особенности структуры генома не позволяли дифференцировать изоляты с высоким и низким патогенным потенциалом [39]. Применение метода оценки полиморфизма длины амплифицированных фрагментов рестрикции, обладающего более высоким разрешением также позволило выявить высокую генетическую гетерогенность *U. diversum*, но не решило проблемы поиска генетических маркеров патогенного потенциала возбудителя [40].

Высокая мутационная изменчивость, отмеченная у *U. diversum* затрагивает, в том числе консервативные, важные для поддержания жизнедеятельности организма последовательности, такие как 16 S рРНК. При исследовании данной последовательности у 36 штаммов и изолятов *U.*

*diversum*, в её последовательности было выявлено 44 однонуклеотидных полиморфизма [127].

Дополнительным источником генетической изменчивости *U. diversum* может быть обмен генами с другими видами микоплазм, происходящий путём горизонтального переноса генов. В геноме этих уреаплазм были найдены гены, кодирующие компоненты аппарата конъюгации, характерные для хромосомных элементов, способных к интеграции в геном и переноса путём конъюгации, описанных у микоплазм [49]. В состав генома микоплазм и уреаплазм входят также транспозоны и инсерционные элементы, которые могут участвовать в переносе генов между разными бактериями, что обуславливает возможность генетического обмена микоплазм с неродственными бактериями [15].

## **1.2 Распространённость уреаплазм среди млекопитающих и человека**

Уреаплазмы являются оппортунистическими патогенами, отличающимися строгой гостальной специфичностью и способностью к длительной персистенции на слизистых оболочках хозяина. Все виды уреаплазм достаточно широко распространены в популяциях своих хозяев, это касается и *U. diversum*. В Бразилии инфицированность коров уреаплазмами составляет в различных регионах 13%-52,9% [121, 142, 177, 210]. В Австрии распространённость носительства *U. diversum* несколько ниже и составляет 36% [155], во Франции — 40% [120]. При исследованиях в Ленинградской области было установлено, что показатель инфицированности *U. diversum* взрослых коров ниже, и составляет 21%-25,42% [17, 21].

Связи колонизации репродуктивной системы коров *U. diversum* с наличием выраженной симптоматики в исследованиях, проведённых в России и Бразилии, обнаружено не было [17, 126]. В то же время при исследовании, проведённом в США, отмечалось более высокая частота

выявления *U. diversum* у коров и нетелей с симптоматикой заболеваний репродуктивной системы, чем у здоровых животных (62.5%-69.7% и 30.3%-37.5% соответственно) [140]. При оценке факторов риска колонизации половой системы коров *U. diversum* было также отмечено, что чаще уреоплазмы выявляются у животных с сопутствующим носительством микоплазм других видов, высокой молочной продуктивностью, в хозяйствах с плохими санитарными условиями в доильных помещениях, а также в хозяйствах, где происходит пополнение поголовья путём приобретения животных [142]. Использование устройств для пролонгированного вагинального введения прогестерона также оказалось ассоциированным с повышенным риском колонизации репродуктивной системы коров *U. diversum* [64].

Существуют данные, позволяющие предположить, что различные породы крупного рогатого скота в разной мере восприимчивы к заражению *U. diversum*. При исследовании, проведённом в Коста-Рике, было установлено, что носительство *U. diversum* более распространено среди коров джерсейской породы (64%), чем среди коров голштинской породы (27%) [121].

Среди быков также часто отмечается колонизация репродуктивной системы *U. diversum*. Частота выявления уреоплазм в замороженных образцах спермы в Бразилии в 2009 году достигала 48,6% [128]. Сопоставимый показатель был получен в исследовании, проведённом в 1985 году в Канаде, где инфицированность образцов семени, предназначенного для искусственного осеменения, составила 42,2% [61]. В 1995 году в Швеции и 2015 году в Австралии этот же показатель составлял 31 % [78, 88]. Значительно ниже были показатели инфицированности семени, полученные в Австрии в 2009 году. В различных районах страны доля заражённых образцов составляла 0-18,2% [154]. Максимальные значения по данному

показателю были получены во Франции, где инфицированность быков достигала 75% [120].

Следует отметить, что хотя носительство уреоплазм в дистальных отделах репродуктивной системы быка ассоциировано с контаминацией спермы уреоплазмами, эти бактерии не всегда обнаруживаются в образцах спермы от быков, являющихся носителями. Исследование, проведённое в Бразилии, показало, что у 72,9% быков в мазках из урогенитального тракта присутствует *U. diversum*, в то время как контаминация семени уреоплазмами отмечается в 56,6% случаях [42]. Контаминация спермы уреоплазмами отмечена также у баранов, среди которых доля инфицированных животных может достигать 12% [76].

Носительство уреоплазм в репродуктивном тракте крупного рогатого скота часто сопровождается носительством микоплазм других видов, в частности *Mycoplasma bovis genitalium* [118].

Для молодняка крупного рогатого скота характерно носительство уреоплазм в респираторном тракте. Как правило, носительство *U. diversum* среди молодняка менее распространено, чем среди взрослого крупного рогатого скота. В Бразилии этот показатель составляет 20,2%, при этом, если учитывать только телят без симптоматики заболеваний респираторной системы, распространённость носительства уреоплазм будет значительно ниже, и составит 8,2% [129]. Сопоставимый показатель распространённости носительства *U. diversum* в носовой полости у здоровых телят был получен в Нидерландах, в данном случае он составил 9% [198].

Для выявления носительства у телят часто используется исследование мазков из носовой полости. Однако исследование лёгочных лаважей телят показало, что уреоплазмы выявляются в данном материале чаще, чем в мазках с поверхности слизистых оболочек носовой полости, поэтому данные о носительстве среди молодняка могут быть заниженными [199]. Сурфактант,

продуцируемый эндотелием лёгких, обладает бактерицидной активностью в отношении уреоплазм, что может быть одним из факторов, сдерживающих развитие инфекционного процесса при колонизации лёгких *U. diversum* [147].

У молодняка крупного рогатого скота, также как и у взрослых животных, возможна колонизация органов репродуктивной системы. При исследовании бычков и тёлочек в Австралии носительство в репродуктивной системе отмечалось у 35% животных независимо от пола [181].

При исследовании животноводческих хозяйств в Канаде было отмечено, что в хозяйствах, где воспроизведение происходит путём бесконтрольного скрещивания, инфицированность *U. diversum* поголовья, включая молодняк, может достигать 100% [167].

Организм человека колонизируют уреоплазмы двух видов, *U. urealyticum* и *U. parvum*. Они различаются по размерам, объёму генома и патогенному потенциалу. Чаще выявляемая при заболеваниях мочеполовой системы *U. urealyticum* характеризуется более крупными размерами клетки и большим геномом. Частота обнаружения уреоплазм широко варьирует в разных популяционных группах, составляя от 10 до 50% (в группах пациентов с симптоматикой заболеваний репродуктивной системы до 70-80%) [6, 8]. Как правило, у взрослых пациентов уреоплазмы выделяются из органов мочеполовой системы, но у новорожденных детей возможна колонизация респираторного тракта.

У беременных пациенток без симптоматики заболеваний репродуктивной системы частота носительства уреоплазм составляет 11,4%, при этом в том же исследовании было отмечено, что у 58,6% пациенток, являющихся носителями уреоплазм, роды были преждевременными [70]. В то же время у недоношенных детей частота выявления уреоплазм в аспирате трахеи может превышать 50% [46], а у детей с бронхолёгочной дисплазией — в 34% [51].

Доля случаев выявления уреоплазм *U. urealyticum* и *U. parvum* от общего числа случаев носительства составляет 14% и 86% соответственно. При этом носительство уреоплазм различных видов одновременно является редким событием [54, 109].

В отличие от уреоплазм человека и крупного рогатого скота, уреоплазмы кошек, *U. felinum* и *U. cati*, колонизируют, в первую очередь, ротовую полость. Персистенция в ротовой полости отмечается у здоровых животных [116]. При колонизации органов половой системы возможно развитие заболеваний, сопровождающихся выраженной симптоматикой, бесплодие, аборт и рождение ослабленного потомства [134]. Данных о распространённости этих уреоплазм в популяции их хозяев нет.

Уреоплазмы собак *U. canigenitalium* способны к колонизации ротовой полости и различных отделов дыхательной и мочеполовой систем [9]. Порядка 50% собак является носителями уреоплазм. Носительство может протекать бессимптомно или вести к развитию заболеваний, связанных с поражением органов, подвергшихся колонизации. При этом носительство в органах репродуктивной системы более распространено у сук, среди которых оно протекает бессимптомно, и только в отдельных случаях ассоциировано с нарушениями репродуктивной функции. В то же время у кобелей носительство *U. canigenitalium* ассоциировано с бесплодием [13, 20, 44, 57].

### **1.3 *U. diversum* как этиологический агент заболеваний урогенитального и респираторного трактов крупного рогатого скота**

#### **1.3.1 Основы патогенности *U. diversum***

*U. diversum* обладает более высоким патогенным потенциалом, чем типовой представитель рода уреоплазм, *U. urealyticum*, в который входят уреоплазмы, колонизирующие организм человека [44]. Патогенность штамма и особенности развития заболевания могут зависеть от пути проникновения патогена в организм, индивидуальных особенностей животного, а также, по-

видимому, свойств конкретного штамма [68]. Также штаммы могут различаться по способности к колонизации эндометрия и маточных труб [59]. В качестве факторов патогенности *U. diversum* можно рассматривать цитотоксическое воздействие на клетки, клеточную адгезию, влияние на внутриклеточные процессы, активность систем защиты от иммунного ответа хозяина.

### **Цитотоксическая активность**

Основным фактором патогенности уреоплазм, обуславливающим их цитотоксическое воздействие является способность к гидролизу мочевины с последующим образованием таких токсичных продуктов как CO<sub>2</sub> и аммиак, выделяющийся в ткани в виде иона аммония. Повышенные концентрации аммиака в областях, где происходит активный рост уреоплазм, приводит к гибели клеток и образованию очаговых поражений [108, 122].

Кроме воздействия аммиака цитотоксическое воздействие *U. diversum* может быть обусловлено эффектом белковых токсинов, в частности, в геноме *U. diversum* был выявлен ген, продуктом которого является цитотоксический белок гемолизин [130]. Выявленные у *U. diversum* термостабильные молекулы, по-видимому, являющиеся аналогами липогликанов микоплазм, также обладают цитотоксическим эффектом [48].

В культуре клеток рака гортани было показано, что внутриклеточная инвазия *U. diversum* приводит к их гибели путём апоптоза, при этом выраженный апоптоз происходит только в первые 24 часа после заражения культуры и не приводит к гибели всех клеток в ней [24]. В организме апоптоз клеток, в частности клеток эпителия лёгких, при заражении уреоплазмами, может быть вызван воздействием провоспалительного цитокина ФНО-альфа, выделяемого макрофагами [122].

Цитотоксическое воздействие уреоплазм, как правило, не приводит к массовой гибели клеток или выраженным морфологическим изменениям, но

стимулирует нарушения целостности мембран и биохимические изменения, как было показано при заражении эксплантатов яйцеводов крупного рогатого скота *U. diversum* in vitro. В инфицированных эксплантах наблюдалось снижение подвижности ресничек и повышение продукции кальмодулина [182, 187].

### **Адгезия**

Адгезия к мембранам эукариотических клеток важна для колонизации организма хозяина микоплазмами различных видов. Прочное связывание уреаплазм с мембранами эпителиальных клеток обеспечивает их устойчивость как к механическим воздействиям, связанным с потоками биологических жидкостей и движением ресничек мерцательного эпителия, так и к воздействию антител и комплемента [12].

Сульфатированные гликолипиды, присутствующие в мембранах сперматозоидов и участвующие в их взаимодействии с яйцеклетками, являются рецепторами адгезии *U. diversum*. Это может быть дополнительной причиной снижения эффективности осеменения при использовании семени от быков, инфицированных уреаплазмами [125, 131]. Адгезия *U. diversum* к сперматозоидам ведёт к их дальнейшей внутриклеточной колонизации [41]. Также описана адгезия уреаплазм данного вида к клеткам эндометрия [136].

При исследованиях in vitro была выявлена адгезия *U. diversum* к фибробластам мыши [112], а *U. urealyticum* — к эритроцитам морских свинок, таким образом, способность уреаплазм к адгезии, по-видимому, не всегда связана с гостальной специфичностью [168].

### **Фосфолипазная активность**

Активность фосфолипаз, ферментов, осуществляющих гидролиз фосфолипидов, является одним из факторов патогенности уреаплазм. Основная часть фосфолипаз локализована на мембране уреаплазм, однако фосфолипазная активность отмечается и в цитоплазме [56], причём

фосфолипазы являются стабильными белками и остаются активными после гибели уреоплазм [103].

У уреоплазм присутствуют фосфолипазы классов А и С, которые были описаны у *U. urealyticum*. Класс А объединяет ферменты, осуществляющие лизис ацильной цепи фосфолипида с выделением жирных кислот, а класс С — фосфолипазы, гидролизующие и фосфодиэфирную связь между глицериновым остатком фосфолипида и полярной фосфатной группой. В единственном секвенированном геноме *U. diversum* не найдено гомологов фосфолипаз *U. urealyticum*, но обнаружена отсутствующая у других уреоплазм фосфолипаза класса D, осуществляющая гидролиз фосфодиэфирной связи остатка фосфатидной кислоты фосфолипида и головной группы его полярной части. Тем не менее, предполагается, что у *U. diversum* могут присутствовать ферменты с активностью фосфолипаз классов А и С [131].

При заражении культур эпителиальных клеток *U. diversum* отмечалось снижение продукции простагландинов, в частности, простагландина E2. Подобные нарушения могут влиять на процесс имплантации эмбриона. В качестве возможных причин нарушения синтеза простагландинов рассматривается активность фосфолипаз A2, за счёт которой при лизисе фосфолипидов образуются молекулы арахидоновой кислоты, предшественника простагландинов. Избыточные концентрации арахидоновой кислоты приводят к нарушению регуляции процессов синтеза этих молекул [103].

В культуре клеток рака гортани показана способность *U. diversum* проникать в клетки, в которых она локализуется в цитоплазме, в перинуклеарной области [132]. Процессы внутриклеточной инвазии *U. diversum* также могут быть связаны с активностью фосфолипаз, в частности фосфолипазы С, поскольку в результате катализируемой ею реакции

выделяются продукты, влияющие на организацию цитоскелета клеток и облегчающие проникновение патогена в цитоплазму. Подобные механизмы внутриклеточной инвазии описаны и у других бактерий, в том числе, микоплазм [132].

### **Стимуляция выделения провоспалительных цитокинов**

В ходе наблюдений *in vitro* было отмечено, что *U. diversum* способна стимулировать выделение ИЛ-1 и ФНО, а также NO мононуклеарами периферической крови. ИЛ-1 и ФНО обладают провоспалительным эффектом [47]. При исследованиях на лабораторных животных было показано, что заражение мышей *U. diversum* приводит к развитию воспаления, опосредованного ИФНγ и ФНО. Воспалительная реакция протекала локально и не приводила к сдвигам формулы крови [179]. Однако в очаге воспаления при заражении *U. diversum* отмечается высокая концентрация лейкоцитов и нейтрофилов [163].

Помимо воспалительных процессов как таковых, воздействие ИЛ-1 и ФНО на эмбрион на стадии бластоцисты может приводить к активации продукции тау-интерферона, регуляторной молекулы, участвующей в развитии плода. Нарушение нормальных уровней продукции тау-интерферона и его повышенная секреция могут подавлять развитие эмбрионов [47]. На более поздних сроках стельности воздействие провоспалительных цитокинов ведёт к абортам [108].

Провоспалительный эффект *U. diversum* определяется путями, не связанными с распознаванием липополисахарида как патоген-ассоциированного паттерна, однако молекулы, стимулирующие воспаление, также являются термостабильными. По-видимому, эти же молекулы способны оказывать бластогенный эффект на лимфоциты [48]. Предполагается, что в развитии стимуляции воспалительной реакции могут также принимать участие липопротеины [166].

Способность стимулировать выделение провоспалительных молекул и подавлять синтез противовоспалительных цитокинов моноцитами была показана также для уреаплазм, патогенных для человека, *U. urealyticum* и *U. parvum*. В присутствии уреаплазм в культуре моноцитов происходило выделение провоспалительных цитокинов, хемокинов, медиаторов воспаления, а также матриксной металлопротеиназы-9, задействованной в воспалительных процессах [72, 73, 75]. На поверхности моноцитов возрастало количество адгезинов, что также отражает состояние воспалительного процесса [74]. При развитии инфекции плода во время беременности отмечался рост содержания провоспалительных цитокинов в амниотической жидкости [98], а на эксплантах плодных оболочек — активация их продукции в присутствии *U. parvum* [162].

#### **Защита *U. diversum* от воздействия иммунной системы**

Для уреаплазм, в том числе для *U. diversum*, характерна протеолитическая активность против иммуноглобулинов класса А. Как правило, протеолитическая активность направлена на иммуноглобулины основных хозяев уреаплазм определённого вида, что является одной из биологических основ гостальной специфичности уреаплазм [100]. Однако было отмечено, что представители вида *U. diversum* способны к расщеплению IgA крупного рогатого скота и человека [102]. Протеолитической активности против иммуноглобулинов других классов у уреаплазм не отмечалось. Способность к протеолитическому расщеплению IgA выявлена и у колонизирующих организм человека уреаплазм *U. urealyticum* [170].

Протеазы уреаплазм вносят разрывы в цепи иммуноглобулинов, в результате которых происходит разделение антигенсвязывающих и консервативных доменов в их составе. Ферменты приводят к разрушению химических связей между пролином и треонином в составе

иммуноглобулинов. Сходной активностью против антител обладают только ферменты, найденные у *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis* и *Haemophilus influenzae*, для других бактерий характерны иные механизмы инактивации иммуноглобулинов [185].

В геноме *U. urealyticum* и *U. parvum* найдены гомологи генов систем, осуществляющих разрушение IgG, однако протеолитической активности против иммуноглобулинов данной группы у *U. diversum* не описано [24]. Помимо расщепления иммуноглобулинов, у уреаплазм показана способность к подавлению продукции противомикробных белков DEFB1, DEFA5, DEFA6, CAMP, ACP6, CAT и MPO. Данные белки в культуре обладают бактерицидным эффектом в отношении уреаплазм. Подавление их продукции в присутствии уреаплазм происходит на эпигенетическом уровне путём модификации гистонов. Данный механизм способствует инактивации врождённого иммунитета и развитию хронической инфекции [217].

### **1.3.2 Патологии урогенитального тракта, вызываемые *U. diversum***

Заболевания репродуктивной системы, ассоциированные с *U. diversum*, сопровождающиеся выраженной симптоматикой, чаще развиваются у быков, чем у коров. Данные заболевания сопровождаются более интенсивным выделением уреаплазм из органов репродуктивной системы, чем бессимптомное носительство [157].

#### **Патологии урогенитального тракта, вызываемые *U. diversum* у коров**

Патологический процесс, развивающийся при заражении коров *U. diversum*, характеризуется поражением слизистой оболочки преддверия влагалища в виде гранулярного вульвовагинита, сопровождающегося пустулёзной сыпью и гиперемией слизистой оболочки. Подобная симптоматика является наиболее распространённой формой клинических проявлений инфекции *U. diversum* [79]. В отдельных случаях возможно развитие воспалительных процессов в области шейки матки и

внутриматочных инфекций, приводящих к развитию эндометритов, в том числе в послеродовом периоде [178], сальпингитов, оофоритов, метритов и задержанию последа [32, 209]. При этом более 90% случаев приходится на поражения, локализованные на слизистой преддверия влагалища [32, 209].

Симптоматика гранулярного вульвовагинита не является специфичной для колонизации слизистых оболочек преддверия влагалища *U. diversum*, она может быть связана и с другими заболеваниями, однако отмечается ассоциация данного заболевания с носительством уреоплазм. Гранулярный вульвовагинит при уреоплазмозе сопровождается появлением болезненной сыпи на слизистых оболочках [35, 184]. Как правило, заболевание не сказывается на общем состоянии и поведении животного [157]. При экспериментальном заражении нетелей симптоматика гранулярного вульвовагинита и персистенция уреоплазм может отмечаться на протяжении длительного периода, иногда достигающего 7 месяцев [193].

При исследовании, проведённом в Канаде, было установлено, что у животных без патологических изменений слизистой оболочки влагалища уреоплазмы выделялись в 23.5% случаев, в то время как среди коров вульвовагинитом частота носительства составляла 74%, а среди животных, у которых вульвовагинит сопровождался выделениями из половых органов — 100% [65, 173]. В то же время уреоплазмы не выделяются при тяжёлых формах вагинита, сопровождающихся локальным некрозом [69, 149].

Цервицит, развивающийся при колонизации *U. diversum* шейки матки, сопровождается выделением экссудата, а также, в некоторых случаях, изъязвлениями слизистой оболочки и инфильтрацией нейтрофилами. Нейтрофилы могут выявляться в просвете шейки матки. В экссудате отмечаются эпителиальные клетки и лимфоциты. Эндометрит характеризуется сходными изменениями, инфильтрация нейтрофилами наблюдается в перигландулярной и субэпителиальной областях. Сальпингит

сопровождается формированием выраженных клеточных инфильтратов в собственной пластинке под ворсинками маточных труб с преобладанием эозинофилов [59].

При лабораторном заражении коров было отмечено, что особенности проявления инфекции зависят от того, каким путём *U. diversum* проникает в половую систему. При внутриматочном заражении гранулярный вульвовагинит не развивается [68]. Инфекция сопровождается воспалительными реакциями в первые дни после инокуляции, исчезающими через 1-2 недели. При этом при внутриматочной инокуляции уреаплазмы элиминируются в матке, но распространяются во влагалище и преддверие влагалища, где развивается персистенция [59].

Напротив, при заражении путём нанесения культуры уреаплазм на поверхность слизистых оболочек наружных половых органов коровы, отмечалось развитие вульвовагинита с последующей длительной персистенцией уреаплазм на слизистой оболочке преддверия влагалища. При этом колонизации других отделов репродуктивного тракта не происходило [58]. Внутриматочное заражение коров в экспериментальных условиях значительно снижало эффективность искусственного осеменения [115].

Наиболее подвержены заболеваниям, вызываемым *U. diversum* молодые особи, поскольку у коров старшего возраста после перенесённой инфекции может присутствовать специфический иммунитет против этих уреаплазм [207].

### **Патологии урогенитального тракта, вызываемые *U. diversum* у быков**

Как и у коров, у быков уреаплазмы колонизируют в первую очередь дистальные отделы мочеполового тракта. Проникновение инфекции в другие отделы может приводить к развитию таких заболеваний, как гранулярный баланопостит и везикулит, что может вести к изменению морфологии сперматозоидов и снижению качества спермы [152].

Колонизация дистальных отделов репродуктивной системы быков, как таковая, не во всех случаях приводит к снижению качества семени [186], но является фактором распространения патогена при осеменении, что сопровождается повышенным риском развития эндометритов, цервицитов и сальпингитов у коров [71, 201].

### **1.3.3 Патологии плода и плодных оболочек, вызываемые *U. diversum***

Колонизация половой системы коровы *U. diversum* приводит как снижению эффективности оплодотворения, так и к абортam и осложнениям стельности. Внутриматочное заражение коровы при осеменении может привести к эндометриту, сопровождающемуся гнойными выделениями в полость матки на ранних сроках стельности. Роль инфекций *U. diversum* в общей структуре спонтанных абортов у крупного рогатого скота значительна, например многолетнее исследование, проведённое в Финляндии, показало, что уреapлазмоз крупного рогатого скота — одна из ведущих причин абортов в этой стране [194].

*U. diversum* способна к адгезии к бластоцистам и морулам, при этом её связь с поверхностью эмбрионов устойчива к многократной отмывке путём переноса в стерильную среду. Это повышает риск распространения инфекции при переносе эмбрионов [36]. При адгезии к морулам *U. diversum* не проникает через *zona pellucida* и не вызывает морфологических изменений морулы в первые 16 часов после инокуляции. Возможная причина отсутствия морфологических изменений морулы при адгезии к ней уреapлазм — высокая устойчивость blastомеров к патогенам. Однако эмбрион может быть колонизирован *U. diversum* на более поздних стадиях развития [37].

При экспериментальном заражении плодов в ходе стельности наблюдались патологические изменения плаценты и амниона, характеризующиеся истончением, фиброзом. Отмечались очаги

минерализации и некроза, инфильтрация макрофагами. В лёгких отмечался альвеолит, инфильтрация макрофагами и нейтрофилами [114, 137].

При абортах, связанных с *U. diversum* при исследовании плодных оболочек выявляется плацентит, характеризующийся отёчностью, воспалением, фиброзом, очаговым некрозом. Уреаплазмы выделяются из патологически изменённых лёгких, а также, в отдельных случаях, из печени, сердца [175] и содержимого желудка абортированных плодов [27]. При заражении *U. diversum* возможно поражение суставов плода, сопровождающееся деформацией, воспалением, фиброзом и истончением суставного хряща [85]. Кроме того, при абортах, связанных с *U. diversum*, отмечается генерализованная инфильтрация тканей плода мононуклеарными клетками [141].

Патогномичным для инфекций плода, вызванных *U. diversum*, является иммунокомплексное поражение века и конъюнктивы, которые сопровождаются псевдостратификацией эпителия, появлением бокаловидных клеток, гиперплазией и воспалительными инфильтратами [50].

Абортам предшествует длительная персистенция уреаплазм в амниотической жидкости. Как правило, они происходят на средних (3,5 месяцев) и поздних (7,5-8,5 месяцев) сроках стельности. Однако в некоторых хозяйствах, где среди поголовья распространено носительство уреаплазм, отмечается рост абортотворности на ранних сроках стельности [193]. В случае, когда носительство приводит к аборту, *U. diversum* выявляется в слизи, выделяющейся из влагалища на момент аборта и спустя две недели после него [27, 113].

#### **1.3.4 Патологии респираторного тракта, вызываемые *U. diversum***

*U. diversum* выделяется лёгких телят, при пневмонии, часто в ассоциации с другими бактериями, в том числе микоплазмами, а также с вирусами [67, 107, 117, 119]. Подобные смешанные инфекции

характеризуются более тяжёлым течением [190]. Уреаплазм выделяют как при фибринозной, так и при гнойной и казеозной пневмониях, при этом частота выделения в обоих случаях составляет порядка 40% [66, 196]. Хотя носительство в респираторном тракте может протекать бессимптомно, отмечено, что уреаплазмы чаще выявляются в трахеобронхиальном лаваже телят с симптомами респираторных заболеваний [26], особенно в случаях, когда заболевание характеризуется рецидивирующим течением [204].

В качестве единственного этиологического агента *U. diversum* может выступать при гнойной пневмонии [119], гнойная пневмония также развивается при микст-инфекции, вызванной *U. diversum* и респираторно-синцитиальным бычьим вирусом [119].

Эндобронхиальное заражение гнотобиотических телят в экспериментальных условиях приводило к развитию пневмонии, поражающей 2-10% объёма лёгких. Отмечалась инфильтрация мононуклеарными клетками, перибронхиолярная лимфоретикулярная гиперплазия, катаральный бронхиолит и ателектаз [92]. Также в экспериментальных условиях у телят, заражённых *U. diversum*, отмечалось развитие катаральной бронхопневмонии, бронхиолита, ателектаза и гипертрофии альвеолярных перегородок. Отмечались множественные очаговые поражения в правой и левой апикальной и сердечной долях, а также в диафрагмальных долях. Вне зависимости от тяжести течения инфекции наблюдалось формирование зародышевых центров в лимфатических узлах, дренирующих лёгкие [196].

#### **1.4 Методы диагностики уреаплазмоза крупного рогатого скота**

Большинство форм уреаплазмоза крупного рогатого скота характеризуются неспецифической симптоматикой, поэтому для его диагностики необходимым условием является выявление *U. diversum* в клиническом, патологическом или биологическом материале от животных

[136]. Применение серологических методов диагностики уреоплазмоза крупного рогатого скота нецелесообразно, поскольку при инфекции вырабатываются преимущественно секреторные иммуноглобулины класса IgA, выделяющиеся в очаге поражения [136].

#### **1.4.1. Культуральные методы выявления *U. diversum***

В зависимости от формы заболевания, для исследования культуральным методом отбираются биологические жидкости, мазки с поверхности слизистых оболочек или фрагменты органов животных. Материал до исследования должен быть помещён в транспортную среду и заморожен для сохранения жизнеспособности уреоплазм. В качестве транспортных сред применяются такие среды как среда Эймса или среда Стюарта, а также коммерческие среды, предназначенные для транспортировки материала для исследования на предмет наличия уреоплазм [136].

Для культивирования *U. diversum* используются питательные среды, обогащённые ростовыми добавками, обеспечивающими её жизнеспособность, а также мочевиной, являющейся единственным источником энергии для данного вида бактерий. В качестве основы может использоваться, например, среда для микоплазм PPL0 на основе сердечного экстракта, пептона и хлорида натрия, обогащённая лошадиной сывороткой и мочевиной [195]. Для обогащения могут применяться и другие добавки, например сыворотка свиней [172, 191]. Кроме того в состав питательных сред для культивирования уреоплазм вводят антибиотики бета-лактаминового ряда, к которым уреоплазмы обладают природной устойчивостью благодаря отсутствию клеточной стенки. Присутствие антибиотиков блокирует рост неустойчивых к ним бактерий. Среда также обогащают антимикотиками для предотвращения роста грибов. Культивирование проводится при +37° С [117].

На плотных средах *U. diversum* образует прозрачные колонии диаметром порядка 100 мкм вида, при исследовании под стереомикроскопом колонии имеют вид “яичницы”. Предпочтительным методом культивирования в диагностической лаборатории является посев на жидкие среды. Использование растворённого в среде индикатора pH, позволяющего выявить защелачивание среды в результате ферментативного расщепления мочевины за счёт контрастного изменения цвета, позволяет идентифицировать рост уреаплазм [62, 116].

В случае исследования абортированных плодов для посева отбирают свежие или замороженные образцы плодных оболочек и лёгких. Благодаря наличию патогномических изменений при поражении плода, при диагностике аборт, ассоциированных с уреаплазмозом, целесообразно также проводить гистологические исследования зафиксированных в формалине образцов лёгких, плодных оболочек, конъюнктивы и век с использованием обзорной окраски гематоксилином и эозином [213]. При исследовании плода важно учитывать, что контаминация *U. diversum* может происходить в нижних отделах влагалища. В этом случае уреаплазмы не являются причиной аборта. Поэтому важно выявлять *U. diversum* именно во внутренних органах плода, в том числе в лёгких и желудке, а также учитывать наблюдаемые патологические изменения [145].

В России для выявления *U. diversum* в мазках из верхнего свода влагалища коров в исследовательских целях применялась среда “УРЕАПЛАЗМА-Среда” (ФГУН НИИЭМ им. Пастера) [17]. Следует отметить, что данный продукт предназначен для выявления уреаплазм вида *U. urealyticum* в клиническом материале от человека.

Выделение культуры *U. diversum* является необходимым условием определения антибиотикочувствительности патогена в тех случаях, когда это необходимо. Для проведения тестирования методом серийных разведений,

который используется для определения минимальных ингибирующих концентраций антибиотиков при исследовании микоплазм и уреоплазм, необходимо не менее 10 мл культуры патогена [84]. Метод оценки антибиотикочувствительности с помощью дисков с противомикробными препаратами может применяться для оценки минимальных ингибирующих концентраций у микоплазм, однако его применения приводят к получению завышенных значений данного показателя [63].

#### **1.4.2 Молекулярно-биологические методы выявления *U. diversum***

В качестве альтернативы культуральным методам выявления *U. diversum*, для выявления этих бактерий могут применяться молекулярно-биологические методы, ПЦР и ПЦР в реальном времени. Их отличает более высокая чувствительность и специфичность. Использование данных методов позволяет с высокой диагностической чувствительностью (до 100%) установить наличие *U. diversum* в клиническом материале от больных и подозрительных на заболевание животных [188]. В случае использования молекулярно-биологических методов диагностики уреоплазмоза крупного рогатого скота исследованию подлежит тот же материал, что и в случае применения для диагностического исследования культурального метода [19, 126].

Как мишень для ПЦР выявления ДНК *U. diversum* в материале от крупного рогатого скота используются, как правило, последовательности 16S рРНК [105, 121, 177, 204, 205]. Описано также применение в качестве мишени для ПЦР, направленной на выявление *U. diversum*, участка межгенного спейсера 16S-23S рРНК. Однако в данном случае дальнейшая идентификация патогена подразумевала постановку гнёздной ПЦР с использованием в качестве матрицы полученных ампликонов [212] или секвенирование накопленных в ходе ПЦР фрагментов ДНК для окончательной идентификации возбудителя [183].

При постановке ПЦР для повышения достоверности результата используются внутренние контроли реакции [95]. Одной из разновидностей внутреннего контроля является плазмидная структура, вносимая в материал перед выделением ДНК, и содержащая последовательность, отличающуюся от целевой по структуре, но фланкируемую участками, комплементарными праймерам. При анализе результатов учитывается накопление двух типов ампликонов, идентификация которых проводится либо по размеру фрагмента в электрофорезе, либо по накоплению флуоресценции в результате лизиса специфических зондов к целевой и контрольной последовательности. Данный тип внутреннего контроля носит название конкурирующего, поскольку контрольная последовательность конкурирует с целевой за связывание праймеров. Это может сказываться на чувствительности диагностики [96, 175].

Другим подходом к внутреннему контролю диагностической ПЦР является одновременное проведение двух независимых реакций ПЦР, в ходе которых происходит амплификация целевой ДНК выявляемого патогена и консервативной последовательности в геноме животного, от которого был получен материал. Обе реакции проводятся в одной реакционной смеси. Описаны системы для выявления *U. diversum* в исследовательских целях, основанные на применении в качестве внутреннего контроля амплификации генов бета-актина [106, 209] и GAPDH [204].

### **1.5 Особенности иммунного ответа при уреоплазмозе крупного рогатого скота**

Иммунный ответ на уреоплазм опосредован, в первую очередь, выделением секреторных специфических иммуноглобулинов класса А. С другой стороны, циркулирующие иммуноглобулины могут оказывать протективный эффект против первичной инфекции и распространения уреоплазм в организме [86]. Активация белков каскада комплемента в

присутствии уреоплазм может определяться как опсонизацией уреоплазм антителами, так и связыванием на поверхности капсулы уреоплазм маннозосвязывающего лектина [31].

При бронхопневмонии основным источником антител в очаге развития инфекции являются лимфоциты на слизистой оболочке лёгких и в лимфатических узлах, дренирующих поражённые ткани [164].

Поскольку у уреоплазм отсутствуют клеточные стенки и ЛПС, их основными антигенными структурами являются различные белковые молекулы [124]. Антигенная структура представителей вида *U. diversum* неоднородна и характеризуется выраженными различиями между штаммами [86, 92], выделяют три серогруппы (А, В и С) и 11 серовариантов. Выявляются также штаммы, способные реагировать с сыворотками против уреоплазм двух разных групп одновременно [104]. Отмечена ассоциация серогруппы В с инфекциями лёгких, а серогруппы С — с заболеваниями репродуктивной системы быков [90], однако существенных различий по патогенетическому потенциалу уреоплазм различных серогрупп при инфекциях репродуктивной системы коров отмечено не было [23].

Антигенные различия между серовариантами и серогруппами обусловлены, по-видимому, надмембранными гликолипидными структурами в составе капсулы уреоплазм [163]. Помимо этих переменных компонентов, антигенная структура уреоплазм включает консервативные элементы, присутствующие у уреоплазм различных видов. Была отмечена перекрёстная реактивность сывороток, полученных при иммунизации кроликов *U. urealyticum* и уреоплазмами, выделенными от овец [111]. С другой стороны, антитела, вырабатываемые при инфекциях крупного рогатого скота, вызываемых *U. diversum*, не оказывают подавляющего действия на уреоплазм данного вида в культуре [164].

Подкожная иммунизация экспериментальной вакциной, содержащей убитую культуру *U. diversum* и неполный адъювант Фрейнда, а также экспериментальной вакциной, содержащей фракционированные клеточные мембраны *U. diversum* и адъювант Фрейнда приводит к выработке антител классов IgG1 и IgG2, содержащихся как в сыворотке, так и в цервикальной слизи. При этом содержание антител класса IgM остаётся низким, а антитела класса IgA, играющие основную роль в специфическом иммунном ответе на *U. diversum*, не вырабатываются. Введение подобных вакцин под слизистую оболочку влагалища также не дало желаемого результата [138, 139].

В настоящее время вакцин, рекомендованных для профилактики уреоплазмоза крупного рогатого скота, не существует [35]. Разработанная в США ДНК-вакцина стимулировала выработку антител к многополосному мембранному антигену МВА, обладающих бактерицидным эффектом как против уреоплазм человека, так и против *U. diversum* у мышей в доклинических исследованиях, однако для применения этого препарата в практическом здравоохранении и ветеринарии он должен пройти ряд дополнительных исследований [208, 209].

Отсутствие вакцинопрофилактики заболеваний крупного рогатого скота, ассоциированных с *U. diversum* представляется целесообразной разработкой методик контроля распространения этих бактерий. Важное значение для решения данной задачи имеют разработка диагностических систем для идентификации *U. diversum* с помощью ПЦР в реальном времени и исследования её распространённости в популяции крупного рогатого скота, а также рисков, связанных с её распространением среди поголовья животноводческих хозяйств.

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### ГЛАВА 2. Анализ генома и разработка праймеров для видоспецифического выявления ДНК *U. diversum* и *B. taurus*

#### 2. 1. Поиск видоспецифичных генетических мишеней *U. diversum*

Для выявления и анализа консервативных участков генома *U. diversum* была взята последовательность генома штамма *U. diversum* Howard and Gourlay, депонированная в базе данных GenBank под номером CP009770.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/CP009770>). Данный штамм представляет собой референтный штамм вида *U. diversum* и хранится в коллекции American Type Culture Collection (Американская коллекция типовых культур) под номером ATCC 49782. На момент разработки системы генетическая последовательность, представленная в базе данных GenBank под номером CP009770.1, являлась единственной полностью секвенированной последовательностью генома *U. diversum*.

При выборе участков генома для последующего использования в качестве мишеней с целью создания специфической системы учитывались как данные о структуре последовательности, так и сведения, позволяющие сделать вывод о её стабильности. Среднее содержание ГЦ в геноме *U. diversum*, как и у других микоплазм, невелико, и составляет 28,1 %. С точки зрения разработки тест-систем на основе ПЦР и ПЦР в реальном времени учёт содержания ГЦ имеет существенное значение, поскольку, чем выше содержание ГЦ в областях, к которым подобраны праймеры, тем более специфичной будет проводимая с их использованием реакция. В то же время оценка содержания ГЦ также имеет значение с точки зрения биологической роли гена, поскольку у микоплазм гены с более высоким содержанием ГЦ зачастую оказываются более стабильными и более значимыми для поддержания жизнедеятельности бактерии. Таким образом, предпочтение

отдавалось последовательностям с содержанием ГЦ выше среднего показателя для генома, то есть более 28,1%.

На основании данных критериев подбора было выбрано три потенциальных видоспецифичных генетических мишени для выявления *U. diversum*.

1. Локус JM47\_01780, 443177-444109 п.н.

Данный участок генома содержит ген 16S рРНК метилтрансферазы, фермента, который участвует в процессе синтеза белка, отвечая за взаимодействия между компонентами рибосом. 16S рРНК метилтрансферазы являются консервативными жизненно-важными белками. Длина гена составляет 705 п.н.

Структура выбранного гена у *U. diversum* характеризуется содержанием ГЦ 29%, что превышает среднее содержание этих нуклеотидов в геноме данного вида. Это делает выбранный участок более пригодным для подбора специфических праймеров и зондов, чем большая часть геномных последовательностей *U. diversum*, и, кроме того, также косвенно свидетельствует о том, что выбранный ген является жизненно важным для этого вида уреаплазм.

2. Локус JM47\_01700, 422359-423285 п.н.

Локус JM47\_01700 содержит ген сериновой киназы. Сериновые киназы являются обширным семейством регуляторных белков, участвующих в контроле жизненно-важных процессов в клетке. Длина гена составляет 927 п.н. Как и в предыдущем случае было отмечено содержание ГЦ в последовательности гена выше среднего содержания ГЦ в геноме *U. diversum*, для локуса JM47\_01700 этот показатель составлял 28,8%. На основании этих данных было сделано предположение о том, что данная последовательность является консервативной, и она была отобрана для последующей работы.

3. Локус CP009770, 94436-95785 п.н.

В данном локусе расположен ген гемолизина. Гемолизины имеют существенное значение для развития заболеваний, вызываемых уреоплазмами. Длина гена составляет 1350 п.н. Содержание ГЦ в его структуре составляет 28,3%, что выше среднего содержания GC в геноме *U. diversum*. Данный ген был выбран, поскольку его продукт может иметь значение для колонизации поверхности слизистых оболочек крупного рогатого скота и, вероятно, является стабильным по своей структуре.

## **2.2. Подбор систем праймеров и зондов к выбранным участкам генома *U. diversum***

К трём выбранным последовательностям были подобраны системы, каждая из которых включала пару праймеров (праймер F и праймер R) и зонд, комплементарный участку последовательности ампликона, синтез которого происходил при постановке ПЦР с праймером F и праймером R соответствующей системы. Подбор праймеров проводился с использованием программы Primer BLAST, подбор специфических зондов проводился на основании оценки температуры плавления подбираемых олигонуклеотидов.

В соответствии с температурным режимом, установленным для разрабатываемой тест-системы, рассчитанным на отжиг праймеров при температуре +60° С, подбор компонентов системы вёлся с учётом их температуры плавления. Для эффективного прохождения ПЦР при данной температуре отжига необходимо использовать праймеры с температурой плавления близкой к +60° С. При этом температура плавления зондов должна быть выше температуры плавления праймеров на 2°-3° С. Температура отжига праймера F и праймера R рассчитывалась одновременно с их подбором в программе Primer-BLAST, температура плавления зонда оценивалась с помощью программы Oligo Calc. Температуры плавления подобранных праймеров и зондов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Содержание ГЦ и температура плавления компонентов разработанных видоспецифичных систем для выявления *U. diversum*

Мишень	Компонент системы	%ГЦ	Температура плавления °С
Ген 16S рРНК метил-трансферазы	Праймер F	45	60,1
	Праймер R	50	58,5
	Зонд	37	63,7
Ген сериновой фосфатазы	Праймер F	45	60,1
	Праймер R	50	61,2
	Зонд	37	63,7
Ген гемолизина	Праймер F	40	58,5
	Праймер R	55	60,5
	Зонд	41	65,3

Участки генома *U. diversum*, выявляемые с помощью разработанных праймеров и зондов, а также их сравнение с гомологичными участками в геноме патогенных для человека уреоплазм представлены на рисунке 3.

Разработанные системы праймеров были проверены на предмет аналитической специфичности к *U. diversum* путём анализа *in silico* с использованием программы BLAST. Результаты тестирования представлены в таблице 2.

```

          F
          |
          v
U_diversum  TGCATAGTCAATAGCGGCTTGATCTTGATCAAAACAATTAATAAACCAT
U_parvum    TGCAAAATTAATTGCTTCTTGATCTTGATCTAAACAATTAATTTACCTT
U_urealuticum TGCAAAATCAATTGCCTGTTGGTCTTGATCTATACAAATTAATTTACCTT
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          ЗОНД
          |
          v
U_diversum  TGTCATTGAGACGATTTAGGATTTGTTTTGAATGTCCACACCTGCCAA
U_parvum    TTTTTGAGAGTTTTTTTAAGATGAGTTGTGAATGTC-----C
U_urealuticum TTTTTGAAAGTTTTTTTAAGATAAGTTGTGAATGTC-----C
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

1

```

          F
          |
          v
U_diversum  CGTTGATTCTTCTGCACTTCCATATATATTACCACCAATTCTAGTAACATTGATTGCATC
U_parvum    -GTCGAATCTTCAGCTCTTCCATATAGATTACCTCCAATTCTATTAACATAAAATAGCATC
U_urealyticum -GTTGAATCTTCAGCTCTCCGTATAGGTTACCACCAATTCTATTTACTAAAATAGCATC
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          ЗОНД
          |
          v
U_diversum  ATCACCAACAAGATGTGTCTTTCTTAACAAGTTCAATTGCAAGTTCGGACTTACCAAC
U_parvum    ATCACSTACAAAAATATGACCTTTTTTAACATAATTCAATTGCTAACTCAGATTTACCAAC
U_urealyticum ATCGCCAACAATAATGACCTTTTTTAACATAATTCAATCGCTAACTCAGATTTACCTAC
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          R
          |
          v
U_diversum  TCCACTCTCTCCAAC      135
U_parvum    ACC-----
U_urealyticum TCCTGACTCTC----
          * *

```

2

```

          F
          |
          v
U_diversum  GTAGTGCACTAGTTAACACAGCATCATCAACAGTTGCTGGATTACTATTCTCAGGAGTTG
U_urealyticum GTAATACACTAGTAAATACTGCATCATCAACAATTGCTGGTTATTTTTGCAAGGATTG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          ЗОНД
          |
          v
U_diversum  TTCGTTATGTTGGAGCTGGTTCACATGCTG
U_urealyticum TT-----
          * *

```

3

Рисунок 3 – Сравнение последовательностей, выбранных в качестве мишеней для видоспецифической тест-системы в геноме *U. diversum* с гомологичными последовательностями уреоплазм человека

Примечание: 1 — ген 16S рРНК метилтрансферазы, 2 — ген сериновой протеазы, 3 — ген гемолизина.

Выявленные в ходе сравнения с последовательностями ДНК других организмов, представленными в базе данных GenBank, с помощью алгоритма BLAST, перекрёстные совпадения структур паримеров не были связаны с риском неспецифического взаимодействия компонентов системы с ДНК, представленном в клиническом материале от крупного рогатого скота, что

могло бы привести к ложноположительному ответу. Большая часть совпадений структуры отмечалась при сравнении с ДНК рыб, приматов, растений и гельминтов. Микроорганизмы, содержащиеся в геноме участки, с которыми частично перекрывались компоненты разработанной тест-системы, являются компонентами микробиоты ротовой полости человека и различных животных, активного ила и пресноводных водоёмов. Присутствие их в репродуктивной системе крупного рогатого скота маловероятно, и даже в этом случае перекрёстное взаимодействие тест-системы с их ДНК исключается из-за того, что комплементарные участки соответствуют только отдельным фрагментам компонентов разработанной тест-системы и ни в одном случае не установлено полной комплементарности подобранных праймеров и нецелевой ДНК.

Таблица 2 – Перекрёстное взаимодействие разработанных видоспецифичных систем для выявления *U. diversum* с ДНК других организмов

Система	Перекрывание с другими видами	
	Вид	%
Ген 16S рРНК метил-трансферазы	Люцерна усечённая ( <i>Medicago truncatula</i> )	40
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	39
	Американский ламантин ( <i>Trichechus manatus</i> )	46
	<i>Kockovaella imperatae</i>	46
	Тиляпия нильская ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	57
	Чёрный ринопитек ( <i>Rhinopithecus bieti</i> )	36
	Карликовый цепень ( <i>Hymenolepis nana</i> )	39

Продолжение таблицы 2.

Система	Перекрытие с другими видами	
	Вид	%
Ген сериновой фосфатазы	Голубиный горох, Каян ( <i>Cajanus cajan</i> )	42
	Представители семейства Лососёвые	47
	<i>Candidatus Saccharimonas aalborgensis</i>	50
	Представители семейства Кошачьи	35
	<i>Loa loa</i>	38
	<i>Leptotrichia</i> sp. oral taxon 498	38
	Изменчивый карпозубик ( <i>Cyprinodon variegatus</i> )	38
	Атлантический киллифиш ( <i>Fundulus heteroclitus</i> )	41
	Ланцетник ( <i>Branchiostoma floridae</i> )	38
Ген гемолизина	Представители отряда Крокодилы	43
	<i>Haemonchus placei</i>	64
	<i>Prevotella melaninogenica</i>	52
	<i>Prevotella scopos</i>	52
	Тёмный тигровый питон ( <i>Python bivittatus</i> )	37
	Человекообразные обезьяны	38
	Мартышковые	38
	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	31

Продолжение таблицы 2.

Ген гемолизина	<i>Austrofundulus limnaeus</i>	41
	Киви <i>Apteryx mantelli</i>	64
	Белощёкий хохлатый гиббон ( <i>Nomascus leucogenys</i> )	38
	<i>Shewanella amazonensis</i>	38
	Мышь ( <i>Mus musculus</i> )	35
	Человек ( <i>Homo sapiens</i> )	38

### 2. 3. Выбор видоспецифичных генетических мишеней *B. taurus*

В качестве видоспецифичных мишеней в составе генома *B. taurus* были выбраны гены, отличающиеся высокой стабильностью структуры. Они присутствуют в геномах всех млекопитающих, и их последовательности используются в качестве контроля реакции для выявления ДНК хозяина в молекулярно-биологической диагностике различных заболеваний человека и животных. Последовательности выбранных в качестве мишеней генов *B. taurus* были получены из базы данных Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>).

С учётом данных об интрон-экзонной структуре выбранных генов, для подбора видоспецифичных праймеров были выбраны участки последовательностей, расположенные в областях, включающих границы между интронами и экзонами. Использование в качестве мишени подобных последовательностей повышает точность количественной оценки содержания ДНК в материале, поскольку исключает взаимодействие системы с остаточными количествами мРНК в образце за счёт того, что в структуре мРНК присутствуют только последовательности, соответствующие экзонам. В соответствии с этим, в качестве мишеней для выявления ДНК *B. taurus* в биологическом материале были выбраны участки следующих генов:

### 1. Ген бета-микроглобулина (B2M).

Последовательность гена локализована на хромосоме 10. С него считываются различные изоформы белка бета-2-микроглобулина, участвующего в презентации антигенов клеткам иммунной системы. В состав всех изоформ белка входит последовательность, соответствующая экзону, локализованному на участке между 5893 и 6158 нуклеотидами в составе гена. Граница этого участка, соответствующая С-концевому участку белковой последовательности, считывающийся с неё, и последующего интрона была выбрана в качестве мишени для видоспецифической системы для выявления ДНК крупного рогатого скота.

### 2. Ген глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH).

Последовательность данного гена расположена в составе хромосомы 5. Продукт гена является ферментом, задействованным в гликолизе, однако он также выполняет функции, связанные с функционированием микротрубочек, регуляцией транскрипции, транспорта РНК, репликации ДНК и апоптоза. Он представлен единственной изоформой, последовательность которой кодируется 11 экзонами в составе гена. В качестве мишени для видоспецифического выявления ДНК крупного рогатого скота был выбран регион, включающий участок седьмого экзона, соответствующий С-концевому участку белковой последовательности и последующего интрона.

### 3. Ген бета-актина (ACTB)

Ген расположен на хромосоме 28. Его продуктом является белок, синтезирующийся практически во всех клетках организма и отвечающий за их подвижность. Его единственная изоформа считывается с мРНК, содержащей последовательности, комплементарные шести экзонам гена. В качестве мишени был выбран участок на границе пятого экзона, соответствующий С-концевому участку белковой последовательности и последующего интрона.

## 2.4. Подбор систем праймеров и зондов к выбранным участкам генома *B. taurus*

Процедура подбора праймеров к выбранным участком генов крупного рогатого скота проводилась по аналогии с подбором праймеров к видоспецифичным участкам генома *U. diversum*, с учётом тех же требований, с использованием программ Primer BLAST и Oligo Calc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). Температуры плавления подобранных праймеров и зондов представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Содержание ГЦ и температура плавления компонентов разработанных видоспецифичных систем для выявления ДНК крупного рогатого скота

Мишень	Компонент системы	%ГЦ	Температура плавления, °С
B2M	Праймер F	55	60,5
	Праймер R	55	60,5
	Зонд	42	64,6
GAPDH	Праймер F	52	61,2
	Праймер R	52	61,2
	Зонд	62	72,8
ACTB	Праймер F	63	61,6
	Праймер R	63	61,6
	Зонд	50	67,9

С целью более точной оценки содержания геномной ДНК *Bos taurus* в исследуемом материале, праймеры и зонды, специфичные к последовательностям генов B2M, GAPDH и АСТВ были подобраны таким образом, чтобы распознаваемые ими участки располагались на границах экзонов и интронов в составе соответствующих генов. Схема расположения выбранных видоспецифичных участков в составе указанных генов представлена на рисунке 4.

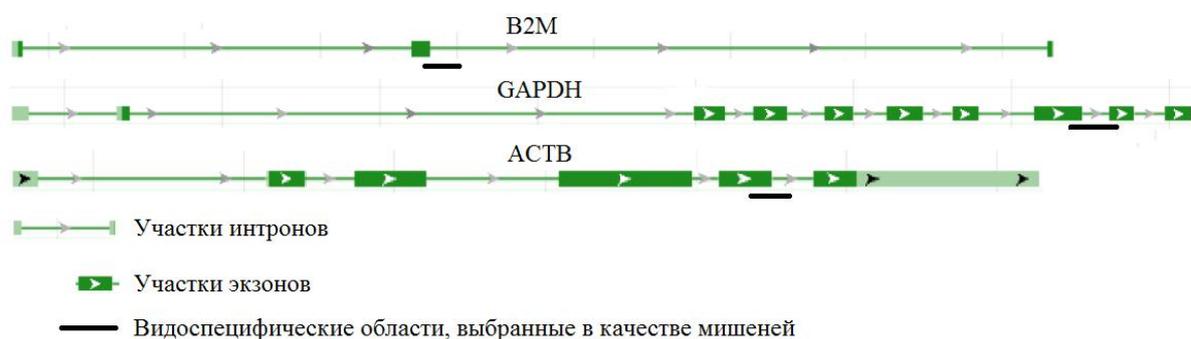


Рисунок 4 – Локализация последовательностей, выбранных в качестве мишеней для видоспецифической тест-системы в геноме крупного рогатого скота

Разработанные системы праймеров были проверены на предмет специфичности к ДНК крупного рогатого скота путём анализа *in silico* с использованием программы BLAST. В результате было установлено, что система, направленная на выявление участка гена АСТВ, имеет участки связывания в геномах биксы аннатовой, гельминтов *Rotylenchulus reniformis* (паразит растений) и *Spirometra erinaceieuropaei* (паразит человека, хищников, грызунов) и патогенной для человека бактерии *Nocardia cyriacigeorgica*, система, подобранная к последовательности гена B2M, может связываться с участками генома черешни, овцы, человека и *Spirometra erinaceieuropaei*, система, подобранная к GAPDH содержит праймер, способный взаимодействовать с ДНК различных животных при

неспецифических условиях протекания реакции. Во всех случаях неспецифическое взаимодействие, приводящее к накоплению продукта реакции ПЦР, было исключено за счёт отсутствия подобных последовательностей в клиническом материале от крупного рогатого скота и неполного перекрытия выявленных участков в геномах указанных организмов разработанной системой праймеров и зондов (30-62%).

Для дальнейшей работы подобранные праймеры и олигонуклеотидные зонды были синтезированы компанией ООО “Бигль”. Для визуализации процесса гидролиза зондов, свидетельствующего о накоплении продукта ПЦР, зонды к ампликонам ДНК *U. diversum* были модифицированы молекулами 6-карбоксилфлюоресцеина (флуоресценция детектируется по каналу FAM), а зонды к ампликонам ДНК крупного рогатого скота — молекулами родамина 6G (флуоресценция детектируется по каналу JOE). Флуоресценция этих молекул подавлялась молекулами Black Hole Quencher-1 путём поглощения, эти молекулы также были включены состав синтезированных зондов. При лизисе зондов, вызванном накоплением продукта ПЦР, к которому они комплементарны с последующим связыванием зонда и его деградацией с участием Taq-полимеразы, происходило освобождение 6-карбоксилфлюоресцеина и родамина 6G, их пространственное разобщение с молекулами Black Hole Quencher-1, и, как следствие, рост флуоресцентного сигнала, считываемого прибором для ПЦР в реальном времени.

## ГЛАВА 3. Разработка и наработка опытных образцов диагностической тест-системы

### 3.1. Оптимизация качественного состава специфических компонентов реакционной смеси

Целью этапа оптимизации композиционного состава было достижение наибольших показателей аналитической чувствительности и аналитической специфичности разрабатываемой системы. При этом учитывались следующие показатели: минимальная конкуренция между двумя реакциями ПЦР, протекающими при использовании разрабатываемой системы, достижение допустимых показателей эффективности ПЦР и значений аналитической чувствительности не менее  $10^3$  ГЭ/мл. Оценка параметра эффективности проводилась в автоматическом режиме с использованием алгоритмов математического анализа, встроенных в программное обеспечение CFX Manager.

На первом этапе оптимизации состава рассматриваемой тест-системы было проведено тестирование эффективности ПЦР в реальном времени с разработанными праймерами и зондами. Учитывалась возможность одновременного выявления ДНК *U. diversum* и *B. taurus* в ходе проведения реакции ПЦР с двумя системами праймеров и зондов в одной пробирке. Для этого все системы были протестированы на образцах, содержащих ДНК, выделенную из венозной крови крупного рогатого скота и ДНК, выделенную из культуры *U. diversum*. Образцы для тестирования были приготовлены таким образом, чтобы соотношение обеих мишеней в них составляло 1:1. Для приготовления реакционной смеси использовались следующие прописи:

1. Буфер qPCR-mixHS — 5 мкл
2. Праймер F (*U. diversum*) — 10 пмоль
3. Праймер R (*U. diversum*) — 10 пмоль

4. Зонд (*U. diversum*) — 10 пмоль
5. Праймер F (*B. taurus*) — 10 пмоль
6. Праймер R (*B. taurus*) — 10 пмоль
7. Зонд (*B. taurus*) — 10 пмоль
8. Вода — 4 мкл
9. В 15 мкл полученной реакционной смеси вносилось 10 мкл образца ДНК.

Было установлено, что система, специфичная к гену гемоллизина *U. diversum* и система, специфичная к гену микроглобулина *B. taurus* непригодны для дальнейшей работы в связи с невозможностью получения достаточного для детекции количества флуоресцентного сигнала деградации зонда. Таким образом, сравнение эффективности ПЦР проводилось между четырьмя вариантами сочетаний систем праймеров и зондов, взятых в соотношении 1:1, по 10 пмоль каждого компонента в общем реакционном объёме (результаты представлены в таблице 4).

На основании проведённого анализа для дальнейшей работы по оптимизации количественного состава реакционной смеси было выбрано сочетание, включавшее систему праймеров и зондов, специфичных к фрагменту гена 16S РНК метилтрансферазы *U. diversum*, и систему праймеров и зондов, специфичных к фрагменту гена GAPDH *B. taurus*.

Из-за отмечающейся интерференции систем было принято решение о внесении в реакционную смесь дополнительного количества ионов  $Mg^{2+}$ . Использование реакционного буфера Буфер qPCR-mixHS обеспечивало присутствие 3,5 ммоль  $Mg^{2+}$  в реакционной смеси, путём добавления водного раствора  $MgCl_2$  было повышено до 5 ммоль. Повышенные концентрации магния в реакционной смеси увеличивает сродство праймеров и зондов к матрице, повышая аналитическую чувствительность и эффективность ПЦР. В данном случае из-за высокого содержания АТ в праймерах и зондах к ДНК

Таблица 4 – Результаты определения конкурентных взаимодействий между системами праймеров и зондов специфичных к ДНК *U. diversum* и *B. taurus*

Ми- шень	16S РНК метилтрансфераза	Сериновая фосфатаза	Гемолизин
GAPDH	ДНК <i>U. diversum</i> выявляется/ДНК <i>B. taurus</i> выявляется при соотношении мишеней 1:1	ДНК <i>U. diversum</i> выявляется/ДНК <i>B. taurus</i> выявляется, снижение интенсивности накопления флуоресцентного продукта по каналу JOE	ДНК <i>U. diversum</i> не выявляется / ДНК <i>B. taurus</i> выявляется
АСТВ	ДНК <i>U. diversum</i> выявляется/ДНК <i>B. taurus</i> выявляется при соотношении мишеней 1:1, подавление накопления флуоресцентного продукта по каналу FAM	ДНК <i>U. diversum</i> выявляется/ДНК <i>B. taurus</i> при соотношении 1:1, подавление накопления флуоресцентного продукта по каналу FAM	ДНК <i>U. diversum</i> не выявляется /ДНК <i>B. taurus</i> выявляется
B2MG	ДНК <i>U. diversum</i> не выявляется/ДНК <i>B. taurus</i> не выявляется	ДНК <i>U. diversum</i> не выявляется/ДНК <i>B. taurus</i> не выявляется	ДНК <i>U. diversum</i> не выявляется /ДНК <i>B. taurus</i> не выявляется

*U. diversum* и их меньшей, по сравнению с праймерами к ДНК крупного рогатого скота, температурой плавления, внесение дополнительных количеств  $Mg^{2+}$  в реакционную смесь позволило снизить интерференцию между системами. Все дальнейшие процедуры по оптимизации ПЦР проводились с использованием реакционных смесей, содержащих 5 ммоль  $MgCl_2$ .

### **3.2. Оптимизация количественного состава специфических компонентов реакционной смеси**

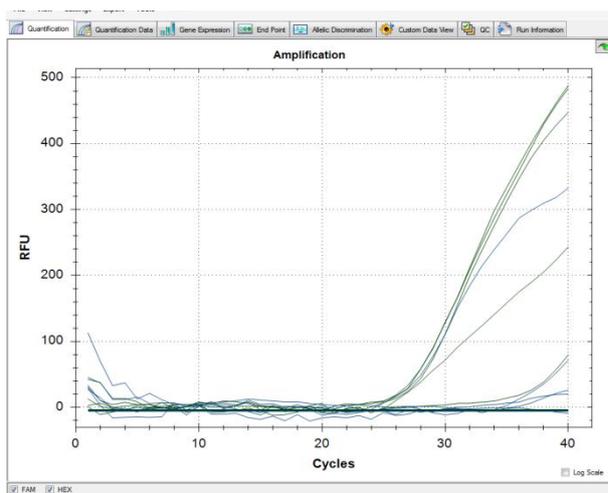
На последующем этапе количественной оптимизации состава рассматриваемой тест-системы был проведён подбор соотношений компонентов системы, специфичных к гену 16S рРНК метилтрансферазы *U. diversum* и к гену GAPDH *Bos taurus*. Целью количественной оптимизации был подбор состава реакционной смеси, при котором накопление ампликонов на матрице ДНК *U. diversum* происходит одновременно с накоплением продукта на матрице ДНК крупного рогатого скота при прохождении двух реакций в одной пробирке вне зависимости от концентрации ДНК *U. diversum*. Полученная в результате пропись реакционной смеси должна была обеспечивать аналитическую чувствительность диагностической системы не менее 10 ГЭ/аликвоту исследуемого препарата ДНК и прохождение реакции с эффективностью в диапазоне от 90% до 110%.

Для проведения данного этапа оптимизации были подготовлены смеси, содержащие ДНК *U. diversum* в концентрации 1000, 100, 10 и 1 ГЭ на мкл, что соответствовало 10000, 1000, 100 и 10 ГЭ на аликвоту объёмом 10 мкл. ДНК *U. diversum* была получена из живой культуры, отобранной после изменения цвета среды, что соответствует содержанию 10 000 клеток на мкл, концентрация ГЭ/мл оценивалась исходя из количества клеток уреоплазм, без учёта потери ДНК при её выделении. Было протестировано 4 варианта

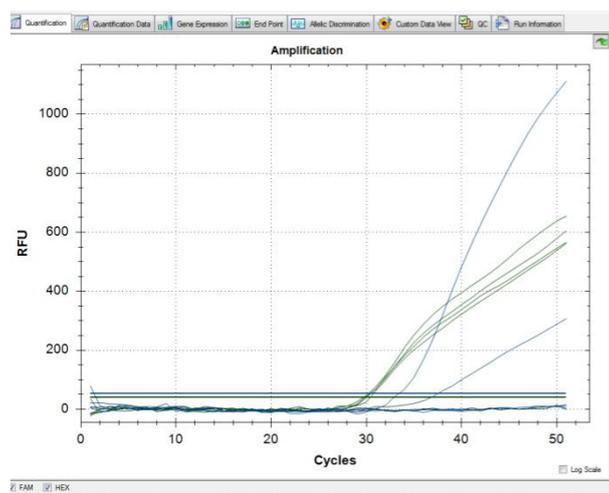
соотношений компонентов системы (№1, №2, №3, №4), специфичных к гену 16S рРНК метилтрансферазы *U. diversum* гену GAPDH *B. taurus*. Значения содержания праймеров и зонда для детекции ДНК *U. diversum* и *B. taurus* в протестированных вариантах реакционной смеси, и результаты тестирования представлены в таблице 5 и на рисунке 5.

Таблица 5 – Определение оптимального соотношения концентраций систем праймеров и зондов, предназначенных для выявления ДНК *U. diversum* и *B. taurus*

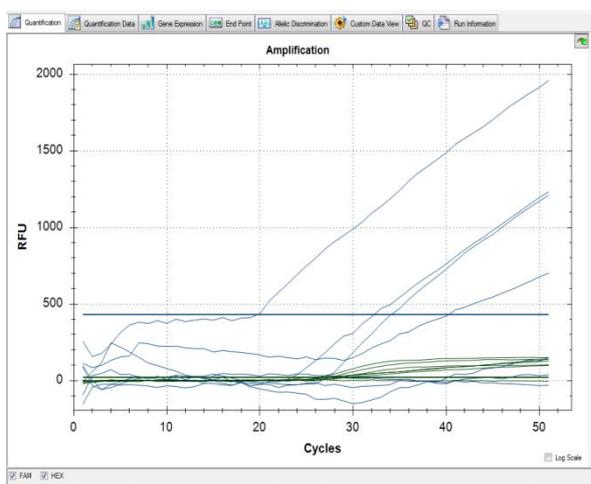
Вариант соотношения	№1	№2	№3	№4
Праймеры и зонд для детекции <i>U. diversum</i>	10 пмоль	10 пмоль	10 пмоль	15 пмоль
Праймеры и зонд для детекции <i>B. taurus</i>	10 пмоль	5 пмоль	3 пмоль	5 пмоль
Аналитическая чувствительность	До 10000 ГЭ/аликвоту	До 1000 ГЭ/аликвоту	До 100 ГЭ/аликвоту	До 10 ГЭ/аликвоту
Интерференция компонентов	Подавление <i>U. diversum</i>	Подавление <i>U. diversum</i>	Подавление <i>Bos taurus</i> , разрушение зондов <i>U. diversum</i>	Не выявлена



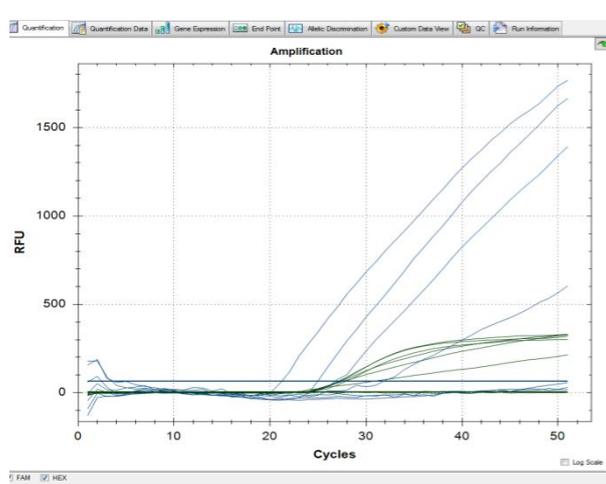
1



2



3



4

Рисунок 5 – Сравнение результатов, полученных в ходе проведения двух реакций ПЦР в одной пробирке при различных соотношениях систем специфичных к ДНК *U. diversum* и ДНК *B. taurus*.

Примечания: 1 — вариант №1, 2 — вариант №2, 3— вариант №3, 4 — вариант №4. Характеристики вариантов №№1 – 4 приведены в таблице 5.

Оценка эффективности ПЦР проводилась с использованием программы CFX Manager на основании анализа кривых накопления продукта ПЦР при различных концентрациях ДНК *U. diversum*. Из-за подавления реакции при низком содержании ДНК *U. diversum*, при использовании вариантов реакционной смеси №1 и №2, и разрушения зонда, специфичного

к ампликонам *U. diversum* при проведении ПЦР в реакционной смеси №3, изменение эффективности ПЦР в данных реакционных смесях не проводилось. При использовании реакционной смеси №4 эффективность накопления флуоресцентного сигнала при проведении ПЦР составила 98% (Рисунок 6). Для дальнейшей работы был выбран состав реакционной смеси №4.

Полученные данные позволили предположить, что разработанная система будет пригодна для диагностики уреоплазмоза крупного рогатого скота и выявления носительства *U. diversum*, в связи с этим ей было присвоено товарное наименование “*Ureaplasma diversum*-Amp”.

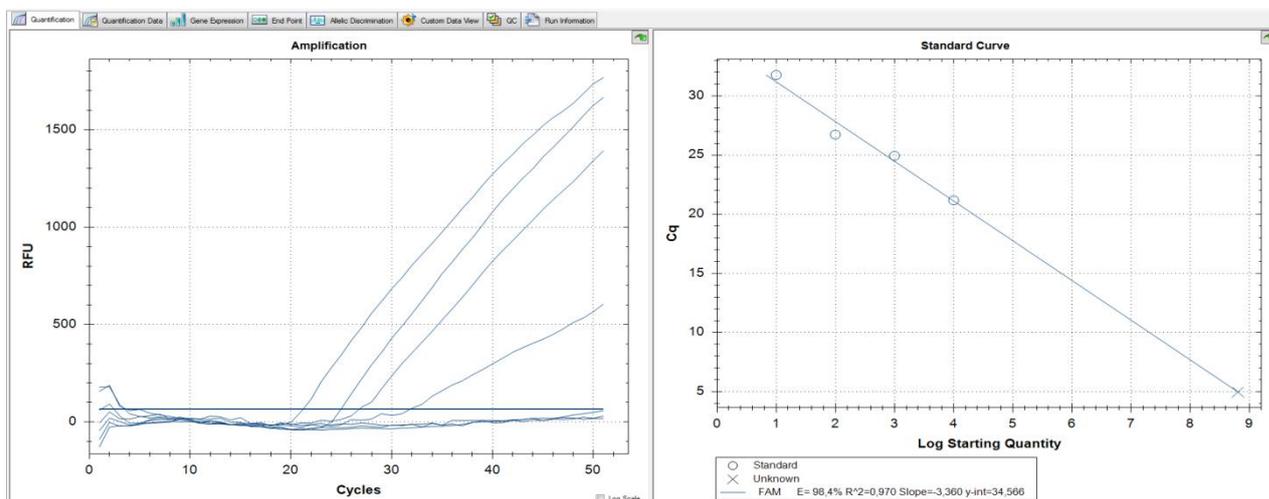


Рисунок 6 – Расчёт эффективности ПЦР в реальном времени с праймерами к *U. diversum* в программе CFX Manager.

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

### 3.3 Конструирование положительного контроля тест-системы и отрицательный контроль

Для положительного контроля реакции ПЦР в реальном времени была использована рекомбинантная плаزمиды, для создания которой была использована плазмиды рAL2-T (ООО “Евроген”, Москва). С помощью набора Quick-TA kit (ООО “Евроген”, Москва) в плазмиду была встроена

последовательность, соответствующая последовательности ампликонов, получаемых с помощью разработанной тест-системы при проведении реакции ПЦР на матрице ДНК *U. diversum*.

Вектор pAL2-T, использованный для создания плазмиды положительного контроля, представляет собой линейаризованную плазмиду с выступающими фосфорилированными 3'-концевыми остатками тимина. Лигирование вектора с ампликонами осуществлялось за счёт присутствующих на концах ампликонов остатков дезоксиаденозина (присутствие этих остатков является общей чертой продуктов ПЦР, поскольку они неспецифически добавляются в ходе реакции). Сшивание вектора и ампликонов обеспечивалось внесением в смесь фермента ДНК-лигазы T4.

С целью лигирования вектора и ампликонов готовили смесь, содержащую 1 мкл реакционного буфера 5X Quick ligation, 1 мкл водного раствора вектора pAL2-T вектор (50 нг/мкл), 1 мкл реактива Quick-TA T4 ДНК и 1 мкл ПЦР-продукта. Объём смеси доводили до 10 мкл дистиллированной деионизированной водой. Инкубацию смеси проводили 16 часов при 14° С.

Плазмида была перенесена в клетки компетентного штамма *E. coli* XL1-Blue (ООО “Евроген”, Москва) методом теплового шока. С этой целью к 10 мкл размороженной суспензии культуры *E. coli* XL1-Blue добавляли 10 мкл смеси, полученной на этапе лигирования вектора с ампликонами. После инкубации реакционной смеси на льду в течение 30 минут, её переносили в водяную баню (42°С) на 30 секунд, затем на лёд на 5 минут. В охлаждённую пробирку добавляли среду SOB до объёма 400 мкл. Пробирки с культурой инкубировали при +37°С в качалке для культивирования, при перемешивании со скоростью 225-250 оборотов в минуту в течение 1 часа. Полученную суспензию клеток переносили на чашки Петри с LB-агаром,

содержащим ампициллин в концентрации (200 мкг/мл) для селекции клонов, содержащих плазмиду, и 1 мМ изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозида и 20 мкг/мл 5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозида для белой голубой селекции. После культивирования 16 ч при +37°C проводилась фенотипическая селекция клонов, белые колонии отбирались для выделения ДНК, контроль вставки ампликона в вектор проводился путём ПЦР с использованием разработанной тест-системы.

Выделенная из клонов, содержащих плазмиду со вставкой ампликона, ДНК применялась в качестве положительных контрольных образцов для разрабатываемой тест-системы.

В качестве отрицательного контроля реакции ПЦР в реальном времени и отрицательного контроля в составе разрабатываемой системы применялась дистиллированная вода согласно ГОСТ Р 56919-2016 (“Организация испытаний ПЦР-наборов, используемых для идентификации целевых таксонов микрофлоры, растений и генетически модифицированных организмов. Требования к качеству, безопасности, транспортированию и хранению”).

## ГЛАВА 4. Результаты испытания разработанной тест-системы

### 4.1. Аналитическая чувствительность системы “*Ureaplasma diversum*-Amp”

Одновременно при проведении процедуры подбора оптимального соотношения концентраций систем праймеров и зондов, предназначенных для выявления ДНК *U. diversum* и *Bos taurus* была определена аналитическая чувствительность тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp”, составившая 10 ГЭ на аликвоту исследуемого материала, или 500 ГЭ на мл исследуемого препарата ДНК, что соответствует 50 клеткам *U. diversum* на мазок, 500 клеток *U. diversum* на мл спермы, 300 клеткам *U. diversum* на 1 мл крови, 250 клеток *U. diversum* на 1 г ткани исследуемого органа.

### 4.2. Аналитическая специфичность системы “*Ureaplasma diversum*-Amp”

С целью контроля аналитической специфичности тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp” была проведена постановка ПЦР в реальном времени с использованием в качестве матриц образцов ДНК, выделенных из культур *M. hominis*, *U. parvum*, *U. urealyticum*, а также из биологического материала от крупного рогатого скота, содержавшего *M. bovis* и *M. bovis genitalium*. Присутствие *M. bovis* и *M. bovis genitalium* в клиническом материале, взятом в качестве контрольных образцов для оценки аналитической специфичности разработанной системы, было установлено путём ПЦР в реальном времени с помощью лабораторных образцов тест-систем “*Mycoplasma bovis*-Amp” и “*Mycoplasma bovis genitalium*-Amp”, разработанных в лаборатории молекулярно-биологических технологий Отдела новых технологий ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Кроме того для контроля аналитической специфичности тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp” была использована ДНК, выделенная из вакцин “Вакцина против хламидиоза свиней культуральная

инактивированная” (ООО “Иммуновак”), “Вакцина против хламидиоза крупного рогатого скота культуральная инактивированная” (ООО “Иммуновак”), “Вакцина против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота”. Вакцины против хламидиоза крупного рогатого скота и свиней содержат патогенные бактерии *Chlamydia psittaci*, вариант *suis* и *C. psittaci*, вариант *bovis* соответственно инактивированные формалином. Применяемые для инактивации концентрации формальдегида позволяют сохранить количество ДНК, достаточное для исследования. Вакцина против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота содержит живой герпес вирус крупного рогатого скота 1.

Выбор образцов для определения аналитической специфичности тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp” был обусловлен следующим:

1. *M. hominis*, *M. bovis*, *M. bovigentialium*, *U. parvum*, *U. urealyticum* являются бактериями, относящимися к одному семейству с *U. diversum*.
2. *M. bovis*, *M. bovigentialium*, содержащиеся в вакцинах от хламидиоза крупного рогатого скота и свиней представители вида *C. psittaci*, герпесвирус крупного рогатого скота 1 способны вызывать заболевания, сходные по симптоматике с заболеваниями, вызываемыми *U. diversum*.

В ходе контроля аналитической специфичности тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp” было подтверждено отсутствие неспецифического взаимодействия компонентов системы с ДНК *M. hominis*, *M. bovis*, *M. bovigentialium*, *U. parvum*, *U. urealyticum*, представителей вида *Chlamydia psittaci*, герпесвируса крупного рогатого скота 1, а также отсутствие неспецифических взаимодействий компонентов системы, предназначенных для выявления *U. diversum*, с ДНК крупного рогатого скота (Таблица 6).

Таблица 6 – Определение аналитической специфичности разработанной системы

Наименование исследуемого образца ДНК	Результат реакции	
	По каналу FAM	По каналу JOE
<i>M. hominis</i>	Отрицательный	Отрицательный
<i>U. parvum</i>	Отрицательный	Отрицательный
<i>U. urealyticum</i>	Отрицательный	Отрицательный
Клинический образец, содержащий <i>M. bovis</i>	Отрицательный	Ct=26,7
Клинический образец, содержащий <i>M. bovis genitalium</i>	Отрицательный	Ct=25,9
Вакцина против хламидиоза свиней культуральная инактивированная	Отрицательный	Отрицательный
Вакцина против хламидиоза крупного рогатого скота культуральная инактивированная	Отрицательный	Отрицательный
Вакцина против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота	Отрицательный	Отрицательный

#### 4.3. Стабильность тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp”

С целью контроля стабильности разработанной тест-системы были проведены тоекратные повторные постановки ПЦР в реальном времени с

использованием тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp” с 10 случайным образом выбранными образцами ДНК, выделенной из мазков с поверхности слизистой оболочки преддверия влагалища коров.

На основании полученных данных было проведено сравнение результата ПЦР в трёх повторах и оценка его воспроизводимости.

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 трёх повторах. В двух образцах накопления флуоресцентного сигнала не происходило. Во всех образцах отмечалось накопление флуоресцентного продукта, детектируемое по каналу JOE, что свидетельствовало о присутствии в исследуемом материале ДНК крупного рогатого скота. Значения пороговых циклов, определяемые при анализе графиков накопления флуоресценции с помощью программного обеспечения CFX Manager, варьировали в диапазоне от 20,1 до 31,1 цикла по каналу FAM и 23,1 до 29,9 цикла по каналу HEX. При этом значения коэффициента вариации  $V$  между тремя повторами не превышали 1% при детекции флуоресценции по каналу FAM и 1,77% по каналу JOE. Следует отметить, что значение  $V > 1\%$  для показателей флуоресценции по каналу JOE было отмечено только в двух образцах, характеризующихся также высокими значениями  $V$  при оценке воспроизводимости данных, полученных при учёте флуоресцентного сигнала по каналу FAM. Вероятно, результаты, полученные при анализе этих двух образцов, связаны с повреждением содержащейся в них ДНК в ходе хранения (Таблица 7).

Полученные данные свидетельствуют о высокой воспроизводимости результата при проведении ПЦР в реальном времени с использованием тест-системы “*Ureaplasma diversum* Amp”. Таким образом, проведённые исследования контроля аналитической чувствительности и аналитической

специфичности системы “*Ureaplasma diversum*-Amp” указывают на её пригодность для использования в ветеринарных диагностических лабораториях с целью выявления носительства *U. diversum* у крупного рогатого скота и диагностики ассоциированных с ней заболеваний. Система позволяет выявлять *U. diversum* при содержании менее 10 ГЭ на аликвоту исследуемого материала, не даёт неспецифических ложноположительных ответов в присутствии ДНК патогенов, вызывающих заболевания со сходной симптоматикой, и позволяет получить воспроизводимый результат исследования.

Таблица 7 – Определение стабильности разработанной системы

№ образца	Канал	$\bar{x}$	V (%)	№ образца	Канал	$\bar{x}$	V (%)
1	FAM	0	-	6	FAM	31,3	0,64
	JOE	26,4	0,64		JOE	28,1	0,36
2	FAM	0	-	7	FAM	24,1	0,9
	JOE	24,5	0,41		JOE	24,0	0,63
3	FAM	24,6	0,62	8	FAM	24,6	0,94
	JOE	24,2	0,24		JOE	23,1	1,32
4	FAM	27,6	0,72	9	FAM	29,9	1
	JOE	24,6	0,84		JOE	27,8	1,77
5	FAM	26,5	0,78	10	FAM	20,1	0,58
	JOE	26,5	0,58		JOE	23,1	0,66

#### 4.4 Нарботка опытных образцов тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp”

Для дальнейшего исследования тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp” и её клинических 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.

##### 4.4.1 Состав наборов “*Ureaplasma diversum*-Amp”

###### 1. Реактив Amp 1.

Реактив Amp 1 представляет собой прозрачную слабо опалесцирующую слабо-вязкую жидкость. В состав реактива входит фермент Taq ДНК-полимераза и MgCl<sub>2</sub>, присутствие которого необходимо для проявления её активности, а также глицерин в качестве стабилизатора. Данный реактив предназначен для осуществления реакции ПЦР. Реактив упакован в пробирку 1,5 мл с коническим дном и завинчивающейся крышкой. Объём реактива составляет 0,5 мл (расход — 5 мкл на реакцию).

###### 2. Реактив Amp 2.

Реактив представляет собой прозрачную жидкость со слабым розоватым оттенком. В его состав входит MgCl<sub>2</sub>, а также праймеры и зонды к ДНК *U. diversum* и крупного рогатого скота. Праймеры и зонды присутствуют в виде водного раствора. Реактив Amp 2 предназначен для обеспечения аналитической специфичности реакции ПЦР. Он является обязательным компонентом тест-системы и не может быть заменён каким-либо компонентом из других тест-систем. Реактив упакован в пробирку-эппендорф 1,5 мл с круглым дном. Объём реактива составляет 1 мл (10 мкл на реакцию).

###### 3. Положительный контрольный образец (ПКО).

ПКО имеет вид прозрачной жидкости. В его состав входит рекомбинантная плазмида, содержащая последовательность, идентичная по структуре амплифицирующейся с помощью разработанных праймеров последовательности ДНК *U. diversum*, изолированная из штамма *E. coli* и ДНК, выделенная из крови крупного рогатого скота. Использование рекомбинантной плазмиды вместо ДНК, выделенной из культуры *U. diversum* даёт ряд преимуществ, связанных с тем, что её получение является менее трудоёмким по сравнению с поддержанием жизнеспособной культуры требовательной к составу среды и атмосферы, сравнительно медленно растущей *U. diversum*. Плазмида и ДНК крупного рогатого скота в составе положительного контроля содержались в составе порядка 100 копий на 1 мкл, что соответствовало пороговому циклу детекции амплификации на не более чем 27 цикле. Соответствующая пометка вносилась в паспорта выпущенных серий наборов.

Положительный контроль был упакован в пробирки эппендорф объёмом 1,5 мкл. Объём положительного контроля составляет 100 мкл. Данный объём рассчитан на постановку 10 реакций ПЦР с использованием тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp”.

#### 4. Отрицательный контрольный образец (ОКО).

В состав ОКО входит дистиллированная деионизированная вода. Отрицательный контроль упакован в пробирку эппендорф объёмом 1,5 мл. Объём ОКО Объём отрицательного контроля составляет 100 мкл. Данный объём рассчитан на постановку 10 реакций ПЦР с использованием тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp”.

#### **4.4.2 Реактивы для изготовления наборов “*Ureaplasma diversum*-Amp” и процедура подготовки компонентов набора**

Для изготовления наборов тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp” использовались те же реактивы, что и в ходе её разработки. Состав

компонентов набора и расход каждого реактива при изготовлении одного набора приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Состав компонентов набора “*Ureaplasma diversum*-Amp”

Наименование компонента	Наименование реактива	Расход на 1 набор, мкл
Реактив Amp 1	Буфер qPCR-mixHS	500
Реактив Amp 2	Праймер F ( <i>U. diversum</i> ), раствор 10 пмоль	150
	Праймер R ( <i>U. diversum</i> ), раствор 10 пмоль	150
	Зонд ( <i>U. diversum</i> ), раствор 10 пмоль	150
	Праймер F ( <i>B. taurus</i> ), раствор 10 пмоль	50
	Праймер R ( <i>B. taurus</i> ), раствор 10 пмоль	50
	Зонд ( <i>B. taurus</i> )	50
	MgCl <sub>2</sub> 25 ммоль, водный раствор	150
	Вода дистиллированная деионизированная	250
ПКО	Препарат рекомбинантной плазмиды	0,1
	Вода дистиллированная деионизированная	99,9
ОКО	Вода дистиллированная деионизированная	100

Приготовление реактива Amp 1, реактива Amp 2, ОКО проводилось в боксовом помещении с предбокеником, обособленном от зон выделения ДНК, приготовления смесей для ПЦР и постановки ПЦР в реальном времени.

Компоненты вносились в пробирки с помощью дозаторов со сменными наконечниками с барьерными фильтрами в ламинарном боксе II класса.

Приготовление ПКО проводилось в боксовом помещении с предбоксом, обособленном от помещения, где проходила подготовка других компонентов набора. Из пробирки, содержащей раствор очищенной рекомбинантной плазмиды, отбирался объём, соответствующий объёму, содержащему 10 000 копий плазмиды.

Концентрация плазмиды предварительно оценивалась с помощью ПЦР в реальном времени с использованием тест-системы “*Ureaplasma diversum* Amp”. Использование данного метода оценки концентрации плазмиды предпочтительно по сравнению с таким методом, как фотометрическое определение концентрации ДНК, поскольку оно даёт представление не об общей концентрации ДНК, в которую вносит вклад хромосомная ДНК *E. coli*, а о концентрации ДНК, амплифицируемой с помощью тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp”, что является более информативным показателем в случае использования образца в качестве положительного контроля данной системы. Для эффективного контроля концентрации амплифицируемого участка в образце целесообразно проводить его контроль непосредственно перед приготовлением наборов, поскольку при длительном хранении возможна частичная дегградация плазмиды.

Интерпретация результата ПЦР в реальном времени проводилась в соответствии с показателями, представленными в таблице 9.

Для имеющегося образца плазмиды был установлен показатель Ct 19, соответственно для изготовления наборов отбиралось 0,1 мкл плазмиды на один контрольный образец. Для снижения ошибок дозирования, связанного с отбором малых объёмов, смесь для ПКО готовилась на всю серию в одной пробирке путём внесения 0,4 мкл образца плазмиды в 499,6 мкл воды с

последующим вортиксированием для тщательного перемешивания раствора и отбором из полученной смеси трёх ПКО по 100 мкл для трех наборов.

Таблица 9 – Значения для полуколичественной оценки содержания целевой последовательности ДНК в исследуемой аликвоте

Сt	Приблизительное содержание мишени в аликвоте/мкл	Сt	Приблизительное содержание мишени в аликвоте/мкл
37	1 копия на аликвоту/0,1 копия на мкл	25	10000 копий/1000 копий
34	10 копий/1 копия	22	100000 копий/10000 копий
31	100 копий/10 копий	19	1000000 копий/100000 копий
28	1000 копий/100 копий	16	10000000 копий/1000000 копий

Компоненты набора выносили из боксов в закрытых пробирках, наклейку этикеток и упаковку наборов осуществляли в обособленном помещении. Упаковка наборов производилась в картонные коробки. Наборы помещались для хранения в морозильную камеру и хранились до использования при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **ГЛАВА 5. Оценка разработанной тест-системы в условиях диагностической лаборатории**

### **5.1. Выбор способа забора материала, обеспечивающего информативное исследование взрослого крупного рогатого скота на предмет носительства *U. diversum***

С целью выбора оптимального способа забора биологического материала у коров было проведено исследование группы, включавшей 32 коровы. Все животные на момент исследования были подвергнуты гормональной стимуляции воспроизводительной функции, в результате чего не было возможности сделать заключение о наличии или отсутствии симптоматики, характерной для уреаплазмоза.

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 мазков из ротовой полости и образцов венозной крови у 12 животных. Из полученного материала была выделена ДНК, использованная в качестве матрицы для постановки ПЦР в реальном времени с помощью набора “*Ureaplasma diversum*-Amp”.

#### **5.1.1 Выявление *U. diversum* в мазках из носовой полости и ротовой полости, отобранных у крупного рогатого скота**

При оценке распространённости носительства уреаплазм в респираторном тракте в исследуемой группе было установлено, что число животных, в носовой полости которых выявлялась ДНК *U. diversum*, составило 9 из 32 (28,1%). При этом в группе из 12 животных, у которых наряду с мазками из носовой полости были исследованы мазки из ротовой полости, было 4 животных, у которых была отмечена колонизация и носовой, и ротовой полости, 1 животное, у которого отмечалась колонизация только

ротовой полости, и 2 животных, у которых отмечалась колонизация только носовой полости. На основании результатов проведённого исследования и литературных данных о колонизации организма взрослого крупного рогатого скота *U. diversum*, исследование мазков из носовой полости было признано более информативным, и дальнейший отбор материала из ротовой полости в исследуемой группе животных не проводился.

### **5.1.2 Выявление *U. diversum* в образцах различных типов, отобранных из репродуктивного тракта крупного рогатого скота**

При исследовании мазков из преддверия влагалища ДНК *U. diversum* была выявлена в 13 из 27 образцов (48%). Частота выявления *U. diversum* в мазках из влагалища была ниже и составила 11 случаев выявления в 32 образцах (34%). При этом у 8 (27%) животных было отмечено присутствие уреоплазм в мазках из обоих отделов полового тракта, у одного животного (4%) носительство было обнаружено только во влагалище, у трёх животных (11%) присутствие уреоплазм было установлено только в преддверии влагалища.

### **5.1.3 Выявление *U. diversum* в образцах крови**

Из 12 исследованных образцов крови в 3 (25%) была обнаружена ДНК *U. diversum*. Все животные, в крови которых была обнаружена ДНК уреоплазм, являлись носителями этих бактерий в респираторном тракте. Также у этих животных ДНК *U. diversum* присутствовала в мазках из преддверия влагалища, но только у одного уреоплазмы присутствовали в мазках из влагалища. Следует отметить, что присутствие ДНК *U. diversum* в кровотоке может свидетельствовать как об активном фагоцитозе, так и о бактериемии.

На основании полученных данных было решено, что исследование образцов венозной крови на предмет носительства *U. diversum* менее информативно, чем исследование мазков с поверхности слизистых оболочек

респираторного и урогенитального тракта крупного рогатого скота. Кроме того, выявление ДНК уреоплазм в крови требует специализированных подходов, направленных на устранение гемоглобина из материала, что обусловлено способностью гемоглобина ингибировать ПЦР. Поскольку находки ДНК *U. diversum* в образцах венозной крови происходили реже, чем в образцах других типов, исследование крови было признано неинформативным для диагностики уреоплазмоза и материал данного типа, требующий особого подхода при работе, был исключён из дальнейшего исследования.

#### **5.1.4 Показатели содержания ДНК *U. diversum* в образцах из полового и респираторного трактов**

Данные о значении порогового цикла ПЦР в реальном времени (Ct) позволяет проводить полуколичественную оценку инфекционной нагрузки. Усреднённые значения Ct для образцов из преддверия влагалища, влагалища и носовой полости составляли 28,4, 31,87 и 30,45 соответственно. При этом достоверных статистических различий данного показателя инфекционной нагрузки между типами образцов установлено не было ( $p > 0.05$ , Рисунок 7). Взаимосвязи между уровнем инфекционной нагрузки в преддверии влагалища и влагалище также установлено не было ( $R = 0,56$ ).

Полученные данные указывают на то, что *U. diversum* содержится в указанных образцах в близких по уровню концентрациях, при этом выше всего содержание ДНК этих уреоплазм в преддверии влагалища, хотя различие не достигает уровня статистической значимости.

#### **5.1.5 Оценка колонизации органов половой системы при носительстве уреоплазм в респираторном тракте**

Количество случаев сочетанной колонизации респираторного и полового тракта составило 8 (30%), в одном случае (3,8%) наблюдалась только колонизация носовой полости, в 8 случаях (30%) колонизация по

крайней мере, одного образца их полового тракта без сопутствующей колонизации респираторного тракта. При сравнении частоты колонизации различных отделов полового тракта между животным с колонизацией респираторного тракта и без колонизации респираторного тракта было установлено, что колонизация носовой полости ассоциирована с колонизацией половой системы ( $U_{Эмп} = 48, p \leq 0.05$ ), в частности преддверия влагалища ( $U_{Эмп} = 27, p \leq 0.05$ ), однако связи между колонизацией носовой полости и колонизацией влагалища установлено не было ( $U_{Эмп} = 46, p > 0.05$ , Таблица 10).

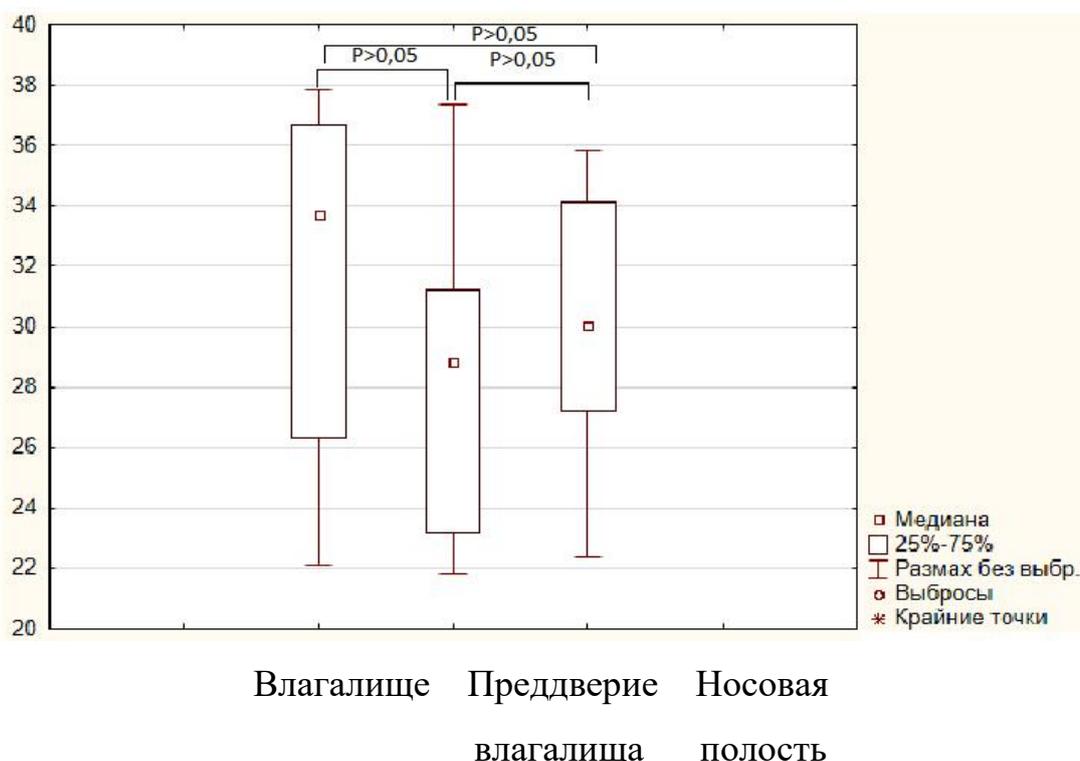


Рисунок 7 – Показатели St в образцах из половых органов и респираторного тракта

### 5.1.6 Оценка вероятности колонизации респираторного тракта при носительстве уреоплазм в половой системе

Оценка различий по частоте инфицированности респираторного тракта между животным с колонизацией любого отдела полового тракта и без

колонизации полового тракта показала, что колонизация респираторного тракта достоверно чаще наблюдается у животных, являющихся носителями уреоплазм в половой системе ( $U_{ЭМП} = 28, p \leq 0.05$ ). При этом носительство уреоплазм в преддверии влагалища было ассоциировано с колонизацией влагалища ( $U_{ЭМП} = 32,5, p \leq 0.01$ ), но не колонизацией с респираторного тракта ( $U_{ЭМП} = 71,5, p > 0.05$ , Таблица 11).

Таблица 10 – Распространённость носительства уреоплазм в половом тракте взрослого крупного рогатого скота при наличии или отсутствии носительства в носовой полости

Наличие носительства уреоплазм		Носители (респираторный тракт) (%)	Без носительства в респираторном тракте (%)	Критерий U
В половых органах	Присутствует	89	44	U=48 $p \leq 0.05$
	Отсутствует	11	56	
В преддверии влагалища	Присутствует	75	16	U=27 $p \leq 0.05$
	Отсутствует	25	36	
Во влагалище	Присутствует	62	37	U=46 $p > 0.05$
	Отсутствует	38	63	

Таким образом, при исследовании образцов, полученных из различных отделов половой системы, было установлено, что носительство в преддверии влагалища более распространено, чем носительство во влагалище. Наиболее вероятным объяснением наблюдаемого распределения уреоплазм в организме хозяина может быть характерная для преддверия влагалища

повышенная концентрация мочевины и аммония, поступающих вместе с мочой. Эти вещества необходимы для осуществления энергетического метаболизма уреоплазм. Данные о более широком распространении носительства в преддверии влагалища по сравнению с носительством во влагалище также описаны в литературе [207].

Таблица 11 – Распространённость носительства уреоплазм во влагалище и респираторном тракте взрослого крупного рогатого скота при наличии или отсутствии носительства в преддверии влагалища

Наличие носительства уреоплазм		Группа с носительством в преддверии влагалища (%)	Группа без носительства в преддверии влагалища (%)	Критерий U
Во влагалище	Присутствует	69	8	U=32,5 p≤0.01
	Отсутствует	31	92	
В респираторном тракте	Присутствует	31	15	U=71,5 p>0.05
	Отсутствует	69	85	

Носительство *U. diversum* в репродуктивном тракте характерно для взрослого крупного рогатого скота, в то время как носительство в респираторном тракте считается более характерным для телят. В ходе данного исследования было установлено, что носительство уреоплазм в верхних отделах респираторного тракта может выявляться и у взрослых животных, при этом оно ассоциировано с носительством в органах репродуктивной системы. У телят носительство уреоплазм в респираторном тракте часто протекает бессимптомно. В исследуемой выборке у взрослых

животных также не отмечалось симптоматики каких-либо заболеваний респираторного тракта.

Согласно полученным данным, персистенция уреаплазм в преддверии влагалища является наиболее частой формой носительства *U. diversum* среди взрослого крупного рогатого скота. Присутствие уреаплазм в преддверии влагалища ассоциировано с их проникновением во влагалище, что связано с риском развития заболеваний репродуктивной системы крупного рогатого скота. Таким образом, исследование образцов данного типа на предмет носительства уреаплазм является наиболее информативным.

Для выявления ДНК *U. diversum* в клиническом материале от взрослого крупного рогатого скота целесообразно использовать мазки из преддверия влагалища. Это обусловлено как простотой получения материала этого типа, так и его преимуществом при использовании амплификационных методов, заключающемся в том, что он не содержит большого количества слизи. Это отличает мазки из преддверия влагалища от мазков из верхних отделов влагалища и шейки матки, и снижает связанный с неполным удалением слизи из препарата ДНК риск ингибирования ПЦР при исследовании образцов данного типа.

## **5.2. Оценка колонизации *U. diversum* абортированных плодов и внутренних органов животных, погибших от бронхопневмонии**

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. Патологоанатомическое вскрытие и отбор биологического материала проводил главный ветеринарный врач хозяйства А и старший научный сотрудник ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, к.в.н. Борисенко С.В. Был

исследован материал от двух абортированных плодов, пяти телят и одной коровы.

При патологоанатомическом исследовании плодов отмечалось воспаление плодных оболочек, характеризующееся отёчностью. Аборты произошли на средних сроках стельности.

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 8).



1

2

Рисунок 8 – Абсцессы в лёгких телёнка

*Примечание:* 1. Шаровидные абсцессы в верхних долях лёгкого. 2. Вид абсцессов на разрезе.

С использованием тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp” было показано присутствие *U. diversum* в материале, полученном от двух

абортированных плодов, четырёх телят и коровы. В дальнейшем в образце, полученном от пятого телёнка с помощью лабораторного опытного образца тест-системы “*Mycoplasma bovis*-Amp”, была выявлена *M. bovis*, которая также способна вызывать бронхопневмонии у телят.

Таким образом, разрабатываемая тест-система “*Ureaplasma diversum*-Amp” может применяться для выявления *U. diversum* в патологическом материале. Посев исследуемого патологического материала на питательную среду “УРЕАПЛАЗМА-Среда” позволил выявить присутствие уреаплазм в одном образце из лёгкого телёнка и в одном образце от абортированного плода.

### **5.3. Влияние фиксации патологического материала в формалине на результат исследования на предмет присутствия ДНК *U. diversum***

Помещение ткани в формалин предотвращает разрушение нуклеиновых кислот, останавливая процессы аутолиза. Однако воздействие формалина также оказывает негативное влияние на качество биомолекул, в частности, на пригодность нуклеиновых кислот для дальнейшего анализа [6]. С целью оценки влияния формалиновой фиксации тканей на их пригодность для ПЦР-исследования на предмет содержания ДНК *U. diversum*, было проведено определение ДНК *U. diversum* в материале от двух телят, погибших от бронхопневмонии с использованием разработанной тест-системы “*Ureaplasma diversum* Amp”.

Для исследования были взяты 9 образцов тканей лёгких от каждого животного. 5 образцов от каждого животного было помещено в нейтральный забуференный 10% формалин “Гистофор” (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 ходе проведённого исследования ДНК *U. diversum* была выявлена в материале от обоих животных. У первого телёнка ДНК *U. diversum* была

обнаружена в одном образце замороженной ткани лёгких и в трёх образцах ткани, зафиксированной в формалине. В случае второго животного, ДНК *U. diversum* была обнаружена также в одном образце замороженной ткани и четырёх образцах ткани, зафиксированной в формалине.

Поскольку тест-система “*Ureaplasma diversum* Amp” позволяет, помимо ДНК *U. diversum*, проводить выявление ДНК крупного рогатого скота, в ходе исследования была произведена оценка сохранности ДНК в зафиксированном в формалине и замороженном патологическом материале. Из 18 исследованных образцов ткани, 15 содержали ДНК крупного рогатого скота. Все образцы, в которых не было выявлено ДНК крупного рогатого скота, также не содержали ДНК *U. diversum*. Они были отобраны от одного животного (телёнок №1) и доставлялись в лабораторию в замороженном состоянии. В данном случае, отрицательный результат ПЦР-исследования на предмет наличия ДНК *U. diversum* следует расценивать как ложноотрицательный. Таким образом, использование тест-системы “*Ureaplasma diversum* Amp” позволило идентифицировать три случая, когда отсутствие ДНК *U. diversum* в исследуемом материале могло быть следствием деградации нуклеиновых кислот в образце.

Применение формалиновой фиксации тканей животных не препятствует проведению их исследования на предмет присутствия ДНК *U. diversum* с использованием тест-системы “*Ureaplasma diversum* Amp”. Наиболее вероятными причинами лучшей сохранности ДНК в материале, отмеченной в данном исследовании является ингибирование присутствующих в патологическом материале ферментов, в частности ДНКаз, остановка аутолитического разрушения тканей и ингибирование формалином роста присутствующей в материале микрофлоры.

#### **5.4. Информативность выявления *U. diversum* методом ПЦР в реальном времени с помощью тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp” в сравнении с культуральными методами. Оценка чувствительности и специфичности**

Параллельно с исследованием мазков из носовой полости, ротовой полости, влагалища и преддверия влагалища, полученных от животных из поголовья хозяйства А, с помощью тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp”, был проведён посев материала на питательную среду “УРЕАПЛАЗМА-среда”. Данная среда предназначена для диагностики *in vitro* и используется с целью выявления *U. urealyticum* и *U. parvum* в материале из мочеполовой системы человека.

При посеве на среду “УРЕАПЛАЗМА-среда” мазков из носовой и ротовой полости крупного рогатого скота изменения внешнего вида среды не происходило. В ходе проведённого ранее исследования (глава 4.4.1.5) было отмечено, что содержание *U. diversum* в образцах из органов половой системы и носовой полости находится приблизительно на одном уровне. Полученные отрицательные результаты посева могут быть связаны со сниженной активностью уреазы у *U. diversum*, колонизирующей верхние отделы респираторного тракта. Снижение продукции уреаз при низком содержании мочевины в окружающей среде отмечено у других видов бактерий, продуцирующих ферменты данного класса. В этом случае получение энергии может осуществляться путём утилизации АТФ погибших клеток хозяина. Подобный механизм получения энергии ранее был описан у микоплазм и является характерным для бактерий данной группы [2]. При посеве на среду мазков из влагалища роста уреоплазм на питательной среде также не отмечалось.

В случае, когда проводился посев на питательную среду мазков, полученных из преддверия влагалища крупного рогатого скота, изменение

цвета среды на 1-2 сутки культивирования было отмечено во всех изученных образцах. При визуальном исследовании пробирок было установлено помутнение питательной среды, сопровождающееся выделением газа и образованием пузырьков диаметром менее 1 мм. Поскольку рост уреоплазм на питательной среде не должен сопровождаться изменением её мутности или формированием пузырей, интерпретация результатов в данном случае была невозможной.

При микроскопическом исследовании изменившей цвет среды при окраске по Граму было установлено присутствие грамположительных кокков, полиморфных палочек и грамотрицательных палочек. Поскольку уреоплазмы не окрашиваются по Граму, было проведено дополнительное микроскопическое исследование мазков культуральной жидкости, при котором проводилось только окраска стекла кристаллическим фиолетовым. Подобное окрашивание позволяет выявить уреоплазмы в материале [10]. Мелких округлых объектов, присутствие которых в культуральной жидкости, окрашенной кристаллическим фиолетовым, можно было бы интерпретировать как положительный результат исследования на предмет присутствия уреоплазм, выявлено не было. В материале присутствовали окрашенные в фиолетовый цвет микроорганизмы различной формы. Микроскопическое исследование подтвердило, что посев материала из преддверия влагалища крупного рогатого скота на среду “УРЕОПЛАЗМА-среда” приводит к росту посторонних микроорганизмов, подавляющих рост уреоплазм.

Таким образом, информативного результата при посеве мазков с поверхности слизистых оболочек репродуктивного и респираторного тракта крупного рогатого скота на питательную среду получить не удалось. Это было связано как с особенностями биологии уреоплазм, так и с присутствием в образцах из преддверия влагалища крупного рогатого скота

контаминирующей антибиотикорезистентной микрофлоры, не характерной для мочеполовой системы человека, на исследование материала из которой рассчитана питательная среда “УРЕАПЛАЗМА-среда”.

Посев гомогенизированных фрагментов органов, полученных при вскрытии павших животных, позволил получить положительный результат в двух случаях из 6. При этом во всех случаях, когда из патологического материала удалось выделить уреаплазмы культуральным методом, результаты, полученные с помощью тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp” указывали на присутствие в материале ДНК *U. diversum*. В трёх случаях, когда уреаплазм выделить не удалось обнаружить путём посева на питательную среду, результат ПЦР был положительным. В одном случае и результат посева, и результат ПЦР в реальном времени указывали на отсутствие уреаплазм в исследуемом образце.

На основании полученных данных чувствительность и специфичность тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp” можно оценить по следующим формулам:

$$\text{Чувствительность} = a/(a+c)$$

$$\text{Специфичность} = d/(b+d)$$

Где:

- a. Носители, выявленные с помощью тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp” (истинно положительные)
- b. Здоровые, имеющие положительный результат теста при исследовании с помощью тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp” (ложноположительные)
- c. Носители, не выявленные с помощью тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp” (ложноотрицательные)
- d. Здоровые, имеющие отрицательный результат при исследовании с помощью тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp” (подлинно отрицательные)

При расчёте с использованием данной формулы, показатель чувствительности тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp” составляет 100%. Значение показателя специфичности также составляет 100%. К полученным показателям следует относиться с определённой осторожностью, поскольку они получены при исследовании выборки малого объёма, однако они указывают на высокую чувствительность и специфичность тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp” и бóльшую достоверность результатов исследования по сравнению с культуральными методами выявления уреаплазм в материале от крупного рогатого скота, по крайней мере, с использованием среды “УРЕАПЛАЗМА-среда”.

Модификация среды “УРЕАПЛАЗМА-среда” путём повышения концентраций антибиотиков и антимикотиков, возможно, сделала бы её пригодной для исследования материала из преддверия влагалища крупного рогатого скота.

#### **5.5. Влияние колонизации репродуктивной системы *U. diversum* на репродуктивные качества крупного рогатого скота**

Для оценки влияния колонизации половой системы коров *U. diversum* на их репродуктивные качества было проведено исследование 32 коров и 19 нетелей, содержащихся в животноводческом хозяйстве Б. Для исследования отбирался мазок из преддверия влагалища. Забор материала у коров проводился в первые две недели после отёла, у нетелей — через 7–9 месяцев после осеменения. 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. Отбор материала проводился в 2018 году.

В результате статистической обработки данных о распространении носительства *U. diversum* в исследованной группе, полученных с использованием тест-системы “*Ureaplasma diversum* Amp”, было отмечено,

что присутствие ДНК данных уреоплазм 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 различие показателей не достигало уровня статистической значимости. При этом было отмечено статистически значимое выраженное снижение эффективности оплодотворения среди нетелей, являвшихся носителями *U. diversum* ( $F_{эмп} = 9$ ,  $p < 0,01$ ) что указывает на негативное влияние носительства *U. diversum* на эффективность оплодотворения. Результаты математической обработки представлены в Таблице 12.

У телёнка одной из коров, в преддверии влагалища которой была обнаружена *U. diversum* было установлено носительство этих бактерий в носовой полости в первые сутки после рождения.

При этом 15% у животных из хозяйства Б было отмечено наличие сыпи на слизистой оболочке преддверия влагалища. Сравнение распространённости носительства между группами животных с сыпью на слизистой преддверия влагалища и группой животных, у которых патологических изменений отмечено не было, показало, что статистически значимого различия по частоте носительства *U. diversum* между ними не выявлено ( $U_{эмп} = 295,5$ ,  $U_{крит} = 213$ ,  $P > 0,05$ ). Также не было отмечено связи с присутствием сыпи в области наружных половых органов и пороговым циклом детекции ДНК *U. diversum* в ДНК, выделенной из мазка ( $F_{эмп} = 1,05$ ,  $P > 0,05$ ), что является показателем, характеризующим инфекционную нагрузку.

Таблица 12 – Влияние носительства *U. diversum* в преддверии влагалища на репродуктивные качества коровы

Показатель	Средние значения показателя		Достоверность различий между группами		
	Носители <i>U. diversum</i>	Отсутствие <i>U. diversum</i>	F <sub>эмп</sub>	F <sub>крит</sub>	P
Номер оплодотворения, приведшего к стельности в 2017 г.	1,73	1,69	2,11	2,6	>0.05
Номер оплодотворения, приведшего к стельности в 2016 г.	1,9	1,76	5,67	4,1	<0.01
Продолжительность периода между отёлом в 2017 году и последующей стельностью	142 дней	126 дней	3,10	2,91	<0.05
Номер оплодотворения, приведшего к стельности у нетелей в 2017 году	1,6	1,2	9	5,35	<0.01

Таким образом, при наличии пустулёзной жёлто-серой сыпи (Рисунок 9) на слизистой оболочке преддверия влагалища необходимо учитывать эпизоотическую ситуацию в хозяйстве по ринотрахеиту, парагриппу 3 типа и Сендай-вирусу и дифференцировать данную патологию, ассоциированную с *U. diversum*, от патологических изменений, вызываемых вышеуказанными возбудителями. В данном случае получение мазков именно из областей

поражения слизистой оболочки пустулёзной сыпью и определение с помощью ПЦР в реальном времени наличия ДНК *U. diversum* даёт основания утверждать, что выявленные патологические изменения могут быть в части случаев обусловлены *U. diversum*. С другой стороны, отмечено, что присутствие *U. diversum* в половой системе коровы может приводить к снижению эффективности оплодотворения и продлению периода между отёлом и последующим оплодотворением. 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.



Рисунок 9 – Сыпь на слизистой оболочке преддверия влагалища коровы

*Примечание:* Поражённые области отмечены стрелками

## **ГЛАВА 6. Распространённость *U. diversum* среди поголовья крупного рогатого скота**

### **6.1 Распространённость *U. diversum* среди поголовья взрослого крупного рогатого скота**

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, в хозяйстве Б 33 мазка от коров и 20 мазков от нетелей, в хозяйстве В — 30 мазков от коров.

При заборе материала производился осмотр слизистой оболочки преддверия влагалища, при котором регистрировалось наличие патологических изменений. Как правило, патологические изменения присутствовали в виде пустулезной сыпи жёлто-серого цвета, равномерно распределённой на поверхности слизистой оболочки преддверия влагалища. В группе коров из хозяйства А учёт патологических изменений не мог быть проведён, поскольку для повышения оплодотворяемости и сокращения временного интервала между отёлом и последующим оплодотворением коровам проводилась гормональная стимуляция, дающая побочный эффект в виде сухости и последующих эрозивных явлений на слизистой оболочке влагалища и преддверия влагалища.

На основании проведённого исследования было установлено, что частота носительства *U. diversum* среди коров во всех хозяйствах была сходной и составляла 53-54%. В то же время доля инфицированных нетелей была выше и составляла 75% (Таблица 13).

При анализе инфицированности коров из поголовья хозяйства Б с учётом возрастной структуры было установлено, что в группе животных,

у которых материал отбирался после первой стельности, частота носительства *U. diversum* составляла 87% (7 из 8 случаев), среди коров, обследованных после второй стельности, частота носительства *U. diversum* отмечалась реже и составила 53,8% (7 из 13 случаев), а в группе коров, обследованных после трёх и более стельностей, составила 36,6% (4 из 11 случаев). Таким образом, отмечалась тенденция к снижению частоты носительства *U. diversum* в исследованных группах коров старшего возраста (Таблица 14).

Таблица 13 – Распространённость *U. diversum* среди различных половозрастных групп взрослого крупного рогатого скота

Хозяйство	Половозрастная группа животных	Количество обследованных	Выявлено положительно реагирующих	
			в абсолютных числах	в процентах (%)
А	Коровы	33	18	54
Б	Нетели	20	15	75
	Коровы	33	18	54
В	Коровы	30	16	53

При сравнении частоты носительства *U. diversum* в группах коров, разделённых по показателю числа стельностей (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 ( $r=0,83$ ,  $p<0,01$ ).

Сопоставление среднего числа стельностей у группы животных, в преддверии влагалища которых была обнаружена *U. diversum*, и группы, в

которой носительства *U. diversum* выявлено не было, также показало, что среднее число стельностей у носителей *U. diversum* значительно ниже (2,2 стельности), чем у коров, не являющихся носителями *U. diversum* (3,2 стельности),  $p < 0,05$ .

Таблица 14 – Распространение носительства *U. diversum* среди коров различных возрастных групп

Число отёлов в группе	Количество обследованных животных	Количество случаев колонизации <i>U. diversum</i>	Частота носительства <i>U. diversum</i> , %
0 (нетели)	20	15	75%
1	8	7	87 %
2	13	7	53,8 %
$\geq 3$	11	4	38%

Распространённость патологических изменений в виде поражения слизистой оболочки преддверия влагалища у нетелей составила 75% что в 1,5 раза выше, чем аналогичный показатель у коров. При этом распространённость носительства *U. diversum* среди нетелей, коров-первотёлок, и коров после второго отёла значительно выше, чем среди коров старших групп. Данный факт заслуживает особого внимания, так как он отражает фазовость процесса, выражающуюся в первичном заражении, которое сопровождается выраженными патологическими проявлениями, затем, переходит в хроническое бессимптомное носительство с последующей элиминацией в старшем возрасте. С другой стороны, как и в случае с коровами, статистически значимой связи между наличием пустулёзной жёлто-серой сыпи на слизистой оболочке преддверия влагалища и

носителем *U. diversum* отмечено не было ( $U_{эмп}$ ,  $U_{крит}$ ,  $P > 0,05$ ). При изучении профилактических вакцинаций нетелей против инфекционных заболеваний комбинированными вакцинами установлено, что они также вакцинированы живой вакциной против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, что, возможно, обусловило наличие выявленной патологии.

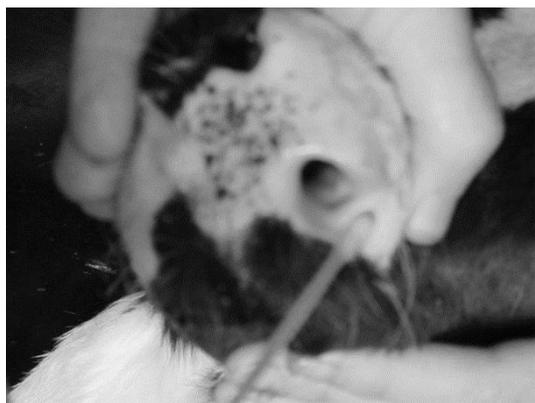
## **6.2. Распространённость *U. diversum* среди молодняка крупного рогатого скота**

С целью исследования распространённости носительства *U. diversum* в респираторном тракте у молодняка крупного рогатого скота было проведено исследование материала, забранного у 53 телят из поголовья хозяйства Б. Было исследовано две группы телят. В первую группу входило 33 телёнка в возрасте до 14 дней, телята содержались в индивидуальных клетках, во вторую группу — 20 телят в возрасте от двух недель до двух месяцев, содержащиеся в общей группе.

Для исследования производился отбор мазков из носовой полости животных с помощью стерильного зонда-тампона. При отборе материала зонд вводился через носовой ход телёнка в дорсальный ход носовой полости на максимальную глубину, что соответствовало передней части дорсальной носовой раковины (Рисунок 10). При заборе материала у телят проводился учёт симптомов респираторных заболеваний.

В ходе исследования, проведённого с использованием тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp”, в группе телят, содержащихся в клетках, у двух телят в мазках из носовой полости была обнаружена ДНК *U. diversum*.

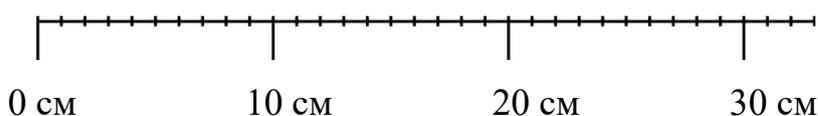
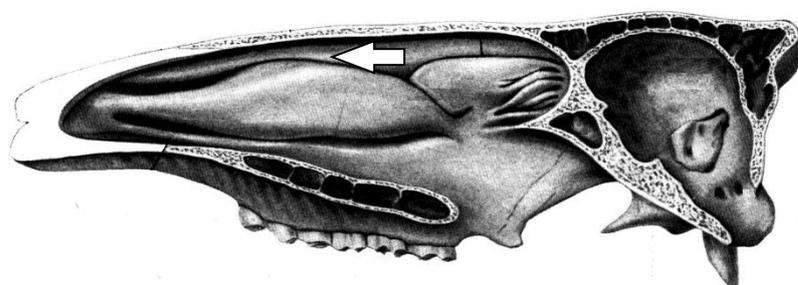
Ни у одного из исследованных телят не было выявлено симптомов респираторных заболеваний.



1



2



3



4

Рисунок 10 – Отбор мазков из носовой полости телёнка

*Примечание:* 1. Зонд-тампон и носовые ходы телёнка. 2. Зонд тампон вводится в ноздрю на максимальную глубину (около 14 см). 3. Строение носовой полости телёнка, область отбора материала отмечена стрелкой. 4. Сопоставление длины зонда-тампона и морды телёнка.

При исследовании мазка из преддверия влагалища матери одного из телят, в носовой полости которого была выявлена *U. diversum*, было установлено носительство *U. diversum* методом ПЦР в реальном времени с использованием тест-системы “*Ureaplasma diversum*-Amp”. В случае второго телёнка, носительство *U. diversum* при обследовании матери установлено не

было, однако нельзя исключать, что в этом случае у коровы произошла колонизация *U. diversum* других отделов репродуктивной системы. Наиболее вероятным путём заражения в обоих случаях представляется контактно-аэрозольное заражение при родах.

У телят, содержащихся в общей группе, *U. diversum* выявлено не было. При этом у 10 телят (50% телят в группе) были отмечены симптомы респираторных заболеваний, в том числе кашель, одышка, снижение двигательной активности и аппетита.

Частота носительства *U. diversum* среди молодняка, содержащегося в хозяйстве Б, составила 9,4%. Основным путём заражения среди молодняка, по-видимому, является контактно-аэрозольный путь заражения. При этом заражение плода *U. diversum* может происходить при родах, во время контакта с колонизированной *U. diversum* слизистой оболочкой влагалища и преддверия влагалища, в результате чего на поверхность тела и в органы дыхательной системы плода поступает материал, содержащий уреоплазмы, которые в дальнейшем способны проникать с воздухом в нижние отделы дыхательной системы, колонизируя её.

**ГЛАВА 7. Алгоритм проведения диагностического исследования на предмет выявления носительства *U. diversum* и ассоциированных с ней заболеваний крупного рогатого скота, мероприятия по профилактике уреаплазмоза крупного рогатого скота**

**7.1 Алгоритм проведения диагностического исследования на предмет носительства *U. diversum* и ассоциированных с ней заболеваний у взрослого крупного рогатого скота**

Исследование поголовья взрослого крупного рогатого скота на предмет заболеваний, вызываемых *U. diversum* целесообразно начинать с анализа эпизоотической ситуации, при этом учитываются:

- Условия содержания, в том числе данные по микроклимату, загазованности, содержанию аммиака в воздухе.
- Оценка кормовой базы и её пороков, случаев использования некачественных кормов (зерновых, силоса).
- Сведения о применении мочевины при силосовании кормов.
- Данные о заболеваниях репродуктивной системы
- Данные по эффективности осеменения за период, охватывающий несколько лет.
- Данные о получении жизнеспособного потомства
- Данные ветеринарно-зоотехнической отчётности, касающиеся аборт, мертворожденности, яловости.
- Выявление быков, при использовании семени которых отмечаются низкие показатели эффективности оплодотворения.

С учётом собранных данных проводятся клинико-лабораторные исследования, в том числе:

- Осмотр коров и нетелей на предмет симптомов гранулярного вульвовагинита.

— Оценка носительства *U. diversum* у коров путём выявления ДНК *U. diversum* в мазках из преддверия влагалища методом ПЦР в реальном времени.

— Оценка инфицированности семени *U. diversum* путём выявления ДНК *U. diversum*.

— Патологоанатомическое исследование абортированных плодов. Оценка инфицированности абортированных плодов *U. diversum* путём посева на питательную среду “УРЕАПЛАЗМА-Среда” гомогенизированных фрагментов ткани лёгких и параллельно проводимого выявления ДНК *U. diversum* в парных образцах ткани лёгких.

## **7.2 Алгоритм проведения диагностического исследования на предмет носительства *U. diversum* и ассоциированных с ней заболеваний у молодняка крупного рогатого скота**

Обследование молодняка на предмет носительства *U. diversum* и ассоциированных с ней заболеваний также начинается со сбора анамнеза. При этом следует учитывать:

— Эпизоотическую обстановку по бронхопневмонии телят, распространённость респираторных заболеваний, особенности их клинических проявлений, частота летальных исходов и выбраковки молодняка в связи с респираторными заболеваниями.

— Данные ранее проводившихся исследований по установлению этиологии респираторных заболеваний молодняка.

— Условия содержания, в том числе данные по микроклимату, загазованности, содержанию аммиака в воздухе.

С учётом собранных данных проводятся клинико-лабораторные исследования, в том числе:

— Оценка клинического состояния телят, выявление телят с симптоматикой респираторных заболеваний (кашлем), оценка доли телят с симптоматикой респираторных заболеваний среди поголовья.

— Отбор клинического материала для уточняющих лабораторных исследований (ПЦР в реальном времени для выявления ДНК *U. diversum*).

— Проведение патологоанатомического вскрытия, отбор материала для уточняющих лабораторных исследований (ПЦР в реальном времени для выявления ДНК *U. diversum*, посев на питательную среду “УРЕАПЛАЗМА-Среда”).

### **7.3 Профилактика заболеваний, ассоциированных с *U. diversum* среди молодняка крупного рогатого скота**

На основании результатов, полученных при исследовании поголовья хозяйства А, было предложено проведение антибиотикофилактики заболевания молодняка пневмонией, ассоциированной с *U. diversum*. В качестве препарата для введения телятам был выбран азитромицин, выпускающийся в инъекционной форме для ветеринарного использования под маркой “Азитронит” (ООО “Нита-Фарм”, Россия) в предусмотренной инструкцией дозировке 40 мг. Выбор препарата определялся следующими характеристиками:

1. Наличие у азитромицина активности против микоплазм.
2. Низкая токсичность препарата, допустимость применения для лечения и профилактики заболеваний молодняка крупного рогатого скота.
3. Данный препарат ранее применялся в хозяйстве А для лечения бронхопневмонии у телят. Препарат назначался после возникновения симптомов заболевания, в той же дозировке 40 мг.

Схема профилактики включала однократную инъекцию, проводимую в первый день жизни телёнка после выпойки молозива. Сроки введения препарата определялись тем, что при рождении телёнка у коровы,

являющейся носителем *U. diversum* высок риск его аэрозольно-контактного заражения при прохождении родовых путей. Введение антибиотика в кратчайшие сроки после заражения максимально снижает риск развития инфекционного процесса.

После перехода от назначения препарата “Азитронит” при развитии симптомов бронхопневмонии к профилактическому назначению препарата отмечалось повышение сохранности молодняка. Если на протяжении января 2018 года сохранность молодняка до 1,5 месяца находилась на уровне 81,25%, то после внедрения предложенной схемы антибиотикопрофилактики, сохранность телят до возраста 1,5 месяца составила 90,82% (за период с 23.02.2018 по 18.05.2018), что указывает на эффективность предложенного метода профилактики бронхопневмонии.

Схема проведения мероприятий по диагностике и профилактике уреаплазмоза крупного рогатого скота представлена на рисунке 11.

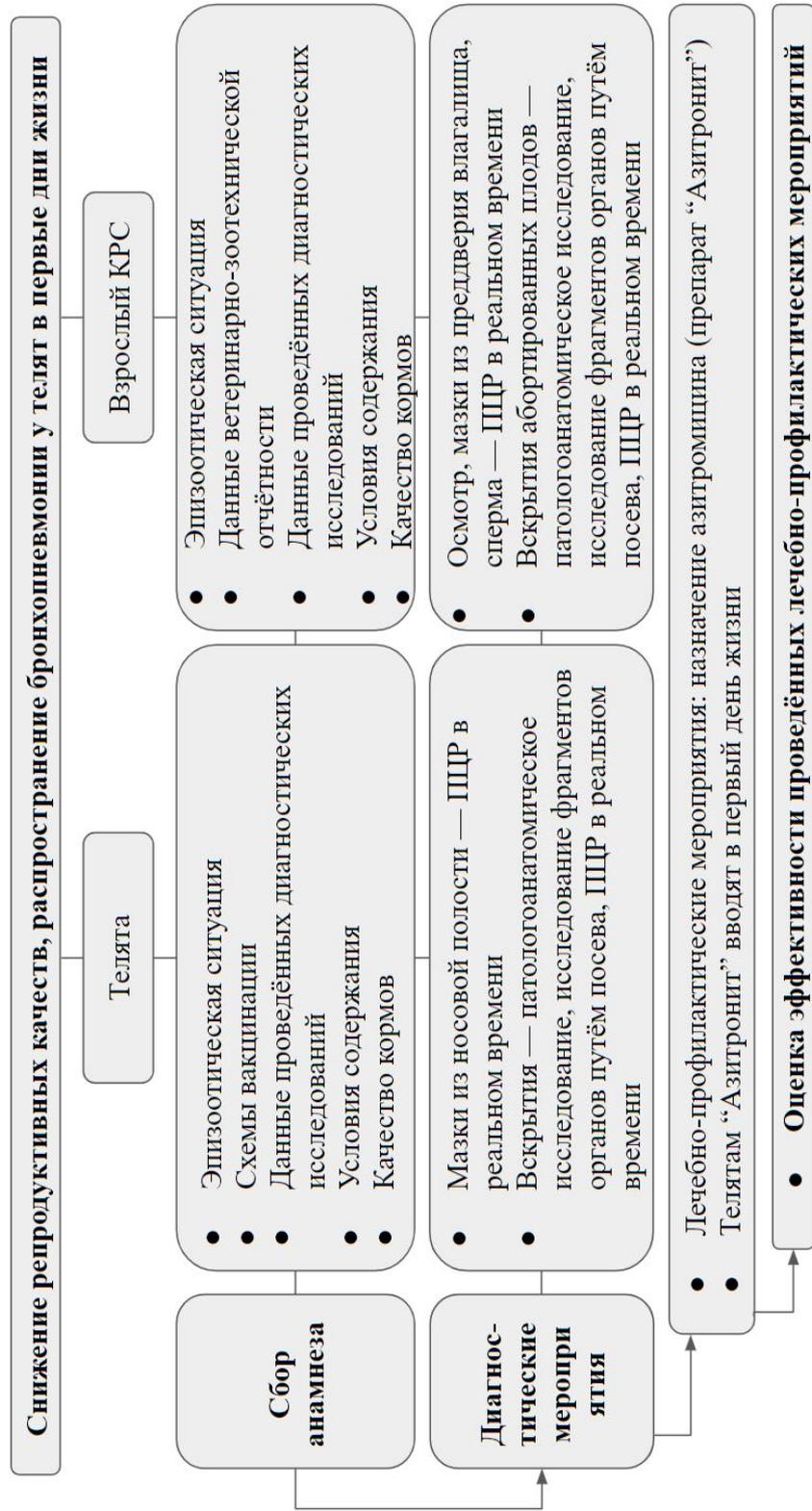


Рисунок 11 – Схема проведения мероприятий по выявлению носительства *U. diversum* среди поголовья крупного рогатого скота и профилактики ассоциированных с ним заболеваний.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отсутствие выраженной симптоматики при носительстве *U. diversum* [16, 124] и неспецифичность симптомов большинства вызываемых ею заболеваний делает лабораторную диагностику наиболее надёжным способом подтверждения этиологической роли *U. diversum* в развитии патологии или снижении репродуктивных качеств крупного рогатого скота [133]. С целью выявления *U. diversum* в образцах от крупного рогатого скота могут применяться культуральные и молекулярно-биологические методы.

Возможности применения культурального метода ограничены тем, что коммерческих сред, рекомендованных для выявления *U. diversum* и доступных для лабораторий в РФ, в настоящее время не существует, а применяемая для диагностики уреаплазмоза человека питательная среда “УРЕАПЛАЗМА-среда” пригодна только для выявления *U. diversum* в патологическом материале. В связи с этим культуральный метод в настоящее время даёт возможность выделить *U. diversum* только от павших животных, но не позволяет получить полное представление об эпизоотической ситуации.

В связи с ограниченными возможностями культурального метода выявления *U. diversum* в материале от крупного рогатого скота, для выявления данных бактерий было предложено несколько тест-систем, основанных на молекулярно-биологических методах. Две из них, система на основе ПЦР в реальном времени в формате микрочипа производства ГК “Люмэкс” и система на основе ПЦР в реальном времени в формате пробирок, производства ООО “Фрактал Био”, доступны в РФ. Однако их применение связано необходимостью оснащения лаборатории дополнительным оборудованием (в случае тест-системы на основе микрочипов ГК “Люмэкс”) [7] или ограничено отсутствием видовой идентификации возбудителя и животного, от которого был получен материал (в случае тест-системы производства ООО “Фрактал Био”) [21]. Отсутствие видовой идентификации

возбудителя может привести к получению ложноположительного заключения о носительстве *U. diversum* при индикации ДНК *Ureaplasma* sp. (в соответствии с инструкцией по применению данной тест-системы) в исследуемом материале от крупного рогатого скота. Отсутствие видовой идентификации животного, от которого был получен материал, делает невозможным проведение арбитражных исследований. В случае диагностической тест-системы на основе ПЦР в реальном времени, производимой за рубежом UreDiv dtcc-qPCR Test (GPS, Испания) [203], также отсутствует возможность видовой идентификации животного, от которого был получен материал [204].

Разработанная тест-система на основе ПЦР в реальном времени “*Ureaplasma diversum*-Amp” адаптирована для проведения исследования с использованием стандартных планшетных амплификаторов. Она позволяет выявлять уреаплазм вида *U. diversum*, но, при этом, не взаимодействует с ДНК уреаплазм других видов, что было установлено в ходе её разработки.

Специфическое взаимодействие тест-системы “*Ureaplasma diversum* Amp” с ДНК *U. diversum* и ДНК крупного рогатого скота позволяет проводить исследование образцов, содержащих материал от животных различных видов, таких как семя крупного рогатого скота, хранившееся с желточным криоконсервантом. Видоспецифическое выявление ДНК *U. diversum* в данном случае также важно, поскольку материал от птицы может содержать ДНК *U. gallorale*.

Использование в качестве внутреннего контроля данной системы амплификации геномных фрагментов *Bos taurus* способствует повышению достоверности получаемых результатов. В случае деградации ДНК в исследуемом образце, обусловленной нарушениями транспортировки образца и его подготовки к исследованию, отсутствие сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта на матрице ДНК крупного

рогатого скота, позволит выявить ложноотрицательные результаты исследования и своевременно принять меры с целью получения достоверного ответа.

Отобранный материал от крупного рогатого скота целесообразно помещать в условия, которые обеспечат сохранность ДНК *U. diversum*, и, в то же время, не будут способствовать росту этих бактерий. В качестве варианта, удовлетворяющего данным условиям, применялась среда “УРЕАПЛАЗМА-Среда”, в которую образцы помещались непосредственно после отбора с последующей заморозкой. Нахождение образца в данной среде сохраняет уреоплазм в жизнеспособном состоянии как благодаря тому, что её состав адаптирован для создания оптимальных условий для поддержания жизнедеятельности этих бактерий. Кроме того, за счёт того, что в состав среды “УРЕАПЛАЗМА-Среда” входит гидролизат миокарда и компоненты сыворотки крови лошади, в частности, альбумин, она оказывает криопротекторный эффект, предотвращая гибель уреоплазм при заморозке. В то же время часто используемый в качестве транспортной среды физиологический раствор не обеспечивает должного криопротекторного эффекта.

В случае патологического материала было показано, что допустимым методом сохранения ДНК является фиксация в 10% нейтральном формалине. При этом за счёт подавления роста микрофлоры и инактивации ферментов происходит стабилизация биомолекул, в том числе ДНК. Возникающие под действием формальдегида сшивки между белками и ДНК разрушаются при выделении ДНК и, в дальнейшем, не препятствуют проведению ПЦР с использованием тест-системы “*Ureaplasma diversum* Amp”. Это позволяет совмещать исследование патологического материала на предмет присутствия ДНК *U. diversum* с гистологическим исследованием.

Проведённые исследования показали, что наиболее целесообразным является отбор образцов из нижнего свода влагалища в области ямки клитора, и, при наличии сыпи, также в области её локализации. Преимущественная колонизация данного отдела репродуктивного тракта коровы обусловлена физиологическими и анатомическими особенностями крупного рогатого скота. В данную анатомическую область поступает слизь, выделяемая железами преддверия влагалища, а также достаточное количество мочевины, выделяемой с мочой, в результате чего там складываются оптимальные условия для роста *U. diversum*. Колонизация преддверия влагалища и ямки клитора является наиболее распространённой формой носительства *U. diversum*. Её присутствие в данном отделе репродуктивного тракта может стать причиной последующего попадания во внутренние органы репродуктивной системы и заражения молодняка.

Носительство *U. diversum* широко распространено среди крупного рогатого скота в различных частях света [118, 153, 207]. Как было показано в исследовании, проведённом на территории СЗФО Российской Федерации, частота носительства этих уреоплазм может достигать 75% и 87% в группах нетелей и первотёлок соответственно, но значительно снижается с возрастом, достигая 36% среди коров после третьей стельности. Колонизация организма крупного рогатого скота уреоплазмами протекает бессимптомно или сопровождается с симптоматикой, сходной с проявлениями других заболеваний, что затрудняет его идентификацию. Тем не менее, присутствие *U. diversum* в органах половой системы коров значимо сказывается на их репродуктивных качествах, в частности, как было показано в данном исследовании, на способности животного к оплодотворению. Это указывает на необходимость своевременного выявления таких животных и проведения мероприятий по профилактике и контролю распространения *U. diversum* среди поголовья крупного рогатого скота.

При исследовании взрослого поголовья крупного рогатого скота в двух животноводческих хозяйствах, расположенных на территории СЗФО, было установлено, что доля носителей *U. diversum* составляет 59%. Это значение превышает показатели, отмеченные в других странах, согласно литературным источникам, составляющие 13%-52,9% [118, 119, 140, 153, 175, 210]. Наиболее вероятным объяснением обнаруженных различий является преобладание за рубежом небольших фермерских хозяйств, в то время хозяйства А, Б и В, на которых был проведён отбор клинического материала, являются крупными животноводческими комплексами. Как правило, продолжительность жизни коров на крупных предприятиях меньше, чем в условиях небольших фермерских хозяйств, поэтому в выборках, отобранных случайным образом, преобладают животные более молодого возраста, нетели и коровы после 1-2 стельностей, то есть группы, в которых носительство *U. diversum* встречается чаще, чем среди коров старшего возраста. Таким образом, различия по возрастной структуре поголовья между предприятиями, где проводился отбор материала для исследования и зарубежными хозяйствами, где проводились исследования, описанные в литературе, могут быть одним из возможных объяснений более высоких показателей частоты носительства *U. diversum* среди поголовья крупного рогатого скота молочных хозяйств Северо-западного федерального округа.

Одной из возможных причин полученных высоких показателей инфицированности также может быть способ отбора материала для исследования. Как правило, в литературных источниках [118, 119, 140, 153, 175, 207] приводятся данные по выявлению *U. diversum* в мазках, взятых из влагалища крупного рогатого скота. В данном исследовании было показано, что более информативным является исследование материала, отобранного из области преддверия влагалища. В связи с этим, данные о распространении носительства *U. diversum* среди взрослого поголовья

крупного рогатого скота в хозяйствах на территории СЗФО, полученные на основании исследования мазков из преддверия влагалища животных, могут быть завышенными относительно данных, полученных в других исследованиях.

Таким образом, полученные в проведённом исследовании показатели распространённости носительства *U. diversum* следует сравнивать с показателями, приведёнными в литературных источниках [118, 119, 140, 153, 175, 207], учётом того, что они получены с использованием способа отбора материала, обеспечивающего большую чувствительность диагностических процедур. С другой стороны, выбранный способ обследования поголовья позволяет более точно оценить эпизоотическую обстановку в животноводческих хозяйствах. Кроме того, обследование поголовья проводилось всего в трёх хозяйствах, в одном из которых отмечалось частое развитие бронхопневмонии у телят в первые дни жизни, и ещё в одном — снижение эффективности оплодотворения. В первом случае было показано, что *U. diversum* является одним из этиологических агентов бронхопневмонии молодняка, а во втором — что носительство *U. diversum* ассоциировано с наблюдаемым снижением репродуктивных качеств.

В то же время распространённость *U. diversum* среди обследованных телят была невелика, и составила 4%, что согласуется со сведениями о распространённости носительства уреоплазм данного вида среди телят, полученными в других странах [127, 196]. В данном случае материал для выявления носительства *U. diversum* у телят отбирался, как и в других исследованиях, из носовой полости, и полученные данные допустимо сравнивать с приведёнными в литературных источниках сведениями.

В отсутствие одобренных для профилактики уреоплазмоза крупного рогатого скота вакцин, в качестве возможных мер профилактики целесообразно использовать антибиотики. Поскольку *U. diversum* относится

к семейству *Mycoplasmatales*, для неё, как и для других микоплазм и уреаплазм, характерна природная устойчивость к антибиотикам бета-лактамного ряда и другим противомикробным препаратам, воздействие которых направлено на системы поддержания стабильности клеточной стенки. Основными группами препаратов, используемыми при лечении уреаплазмозов, являются макролиды, тетрациклины и фторхинолоны.

В целях профилактики заражения *U. diversum* и лечения связанных с ней инфекций в условиях животноводческого предприятия наиболее целесообразным представляется использование макролидов. Антибиотики этой группы воздействуют на процесс синтеза белка и оказывают бактериостатическое воздействие на уреаплазм и микоплазм.

Азитромицин является антибиотиком широкого спектра действия класса макролидов. Его бактериостатическое воздействие имеет необратимый эффект из-за вызываемых им изменений в рибосомах бактерий. Помимо антибактериальной активности, показаны противовоспалительные, иммуномодулирующие и мукоурегулирующие свойства азитромицина. Азитромицин также отличается высокой проникающей способностью, благодаря которой он поступает в ткани лёгких через 30 минут после введения и сохраняется в них в высоких концентрациях в течение 7 дней. По истечении семидневного срока концентрация азитромицина в лёгких начинает постепенно снижаться, достигая исходного уровня к сороковому дню после введения.

Описанные свойства азитромицина делают его пригодным для использования в качестве профилактического средства, позволяющего не только остановить рост уреаплазм в лёгких, в случае если они уже присутствуют в организме телёнка на момент введения препарата, но и предотвратить заражение за счёт длительного сохранения антибиотика в лёгких и активации иммунной системы.

В ветеринарии применяется препарат, действующим веществом в составе которого является азитромицин, выпускающийся под торговой маркой “Азитронит” (ООО “Нита-Фарм”, Россия). Его используют для лечения бактериальных инфекций органов дыхания, пищеварительной и мочеполовой системы, а также инфекций кожи и мягких тканей у крупного рогатого скота. Кроме того, его применяют в целях профилактики респираторных заболеваний у телят при переводе в общую группу.

На основании данных по распространению *U. diversum* среди разных половозрастных групп крупного рогатого скота, в том числе молодняка, и анализа механизмов паразитирования уреаплазм и их чувствительности к антибиотикам и противомикробным соединениям различных групп, было сделано заключение о целесообразном применении азитромицина (препарата “Азитронит”) для предотвращения колонизации организма телят в первые сутки жизни. Это обусловлено, в первую очередь его низкой токсичностью и пролонгированным бактериостатическим эффектом. Кроме того в первые дни жизни иммунная система телёнка является несформированной, и иммунная защита организма осуществляется только за счёт колостральных (молозивных) иммуноглобулинов, поэтому иммуномодулирующий эффект азитромицина в данной ситуации весьма востребован.

Введение азитромицина телятам после возникновения клинических проявлений заболевания респираторной системы, проявляющихся бронхопневмонией, в описанном случае позволяло удерживать сохранность телят до возраста 1,5 месяца на уровне 81,25%. В то же время после применения вышеуказанного препарата в суточном возрасте на всём последующем поголовье родившихся телят, сохранность телят до возраста 1,5 месяца составила 90,82% (за период с 23.02.2018 по 18.05.2018).

Носительство *U. diversum* среди коров и нетелей может вести к выраженному снижению репродуктивной функции животного, следствием

которой является замедление процесса воспроизведения поголовья. Поскольку среди поголовья животноводческих *U. diversum*, доля которых среди поголовья животноводческих предприятий Ленинградской области превышает 50%, убытки, приносимые этим оппортунистическим патогеном сельскому хозяйству, становятся довольно значительными.

На основании проведённой работы получены новые знания и сформулированы практические рекомендации по молекулярно-биологической диагностике уреоплазмоза крупного рогатого скота и выявлению *U. diversum* в материале от различных возрастных групп крупного рогатого скота. Полученные в ходе исследования показатели распространённости носительства *U. diversum* среди поголовья крупного рогатого скота на животноводческих хозяйствах на территории СЗФО Российской Федерации, влияния данного оппортунистического патогена на здоровье и репродуктивные качества крупного рогатого скота, а также эффективность проведённых на основании полученных результатов лечебно-профилактических мероприятий указывают на важность внедрения и совершенствования методов оценки и контроля носительства *U. diversum* среди поголовья крупного рогатого скота.

## 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 рРНК 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 уреаплазм 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

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, 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.

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 уреаплазмоза в популяции крупного рогатого скота на территории Северо-западного региона Российской Федерации.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АТФ — аденозинтрифосфат
- ГЦ — гуанин-цитозин
- ГЭ — геномный эквивалент
- ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИЛ-1 — интерлейкин 1
- ИФНγ — интерферон гамма
- мкл — микролитр
- мл — миллилитр
- мРНК — матричная РНК
- ОКО — отрицательный контрольный образец
- ПКО — положительный контрольный образец
- п.н. — пар нуклеотидов
- ПЦР — полимеразная цепная реакция
- РНК — рибонуклеиновая кислота
- рРНК — рибосомная нуклеиновая кислота
- см — сантиметр
- СЗФО — Северо-западный федеральный округ
- ФНО — фактор некроза опухолей
- АКТВ — бета-актин
- АТСС — American Type Culture Collection
- β2М — бета-микроглобулин
- BLAST — Basic Local Alignment Search Tool
- GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы
- IgA — иммуноглобулин А
- IgG — иммуноглобулин G
- IgM — иммуноглобулин M
- PPLO — Pleuropneumonia-Like Organisms

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борхсениус, С.Н. / Микоплазмы // С.Н. Борхсениус, О.А. Чернова, В.М. Чернов, М.С. Вонский; Отв. ред. С.Н. Борхсениус. – 2002. – Санкт-Петербург, "НАУКА". – 320 с.
2. Борхсениус, С.Н. Микоплазмы. Молекулярная и клеточная биология, патогенность, диагностика / С.Н. Борхсениус, О.А. Чернова // Л.: Наука. – 1989.– 156 с.
3. Гависова, А.А. Современный взгляд на проблему уреоплазменной инфекции / А.А. Гависова, М.А. Твердикова, В.Л. Тютюнник // Эффективная фармакотерапия. – 2013. – № 18. – С. 8-13.
4. Горшков, О.В. Генетический полиморфизм микоплазм: варибельность генов цитоадгезинов у клинических изолятов *Mycoplasma hominis* / О.В. Горшков, В.М. Чернов, О.А. Чернова // Докл. академии Наук. – 2005. – Т. 404.- №2. – С. 1-4.
5. Колесникова, Е. А. Молекулярно-биологическая характеристика бактерий родов *Ureaplasma* и *Mycoplasma*, ассоциированных с заболеваниями урогенитального тракта / Е. А. Колесникова, Н.Ф. Бруснигина, Е.И. Ефимов // МедиАль. – 2017. – Т.2, №20. – С. 57-64.
6. Кубанова, А.А. Урогенитальные инфекционные заболевания, вызванные генитальными микоплазмами. клинические рекомендации / А.А. Кубанова, М.Р. Рахмагулина // Вестник дерматологии и венерологии. – 2009. – № 3. – С. 78-82.
7. Микрочиповый амплификатор нуклеиновых кислот АРИАДНА // <https://www.geo-ndt.ru/pribor-6170-mikrochipovii-amplifikator-nykleinovih-kislot-ariadna.htm>
8. Назарова, В.В. Бактериальные сообщества, формирующие микроэкосистему влагалища в норме и при бактериальном вагинозе /

- В.В. Назарова, Е.В. Шипицына, К.В. Шалепо, А.М. Савичева // Журнал акушерства и женских болезней. – 2017. – Т.LXVI, №6. – С. 52-53.
9. Орлова, С.Т. Респираторные микоплазмозы собак. Часть I. Роль микоплазм в респираторной патологии собак / С.Т. Орлова, А.А. Сидорчук // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. – 2013. – № 6. – С. 36-39.
10. Основа питательной среды для индикации *Ureaplasma urealiticum* сухая // URL: <https://www.microgen.ru/products/pitatelnye-sredy/osnova-pitatelnoy-sredy-dlya-indikatsii-ureaplasma-urealiticum-sukhaya/>.
11. Питательная среда уреоплазма-среда (50 мл) // URL: <http://www.dntpasteur.ru/6-060104.html>
12. Потатуркина-Нестерова, Н.И. Патогенный потенциал микоплазм, эпидемиологически ассоциированных с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта / Н.И. Потатуркина-Нестерова, И.С. Немова, А.М. Магомедова, А.С. Нестеров // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 1, Часть 1. – С. 89-92.
13. Прозоровский, С. В. Медицинская микоплазмология / С. В. Прозоровский, И. В. Раковская, Ю. В. Вульфович // М. : Медицина. — 1995. – 288 с.
14. Рахматулина, М.Р. Современные представления о генетической variability генитальных микоплазм и их роли в развитии воспалительных заболеваний мочеполовой системы / М.Р. Рахматулина, С.В. Кириченко // Вестник дерматологии и венерологии. – 2013. – № 3. – С. 17-25.
15. Руденкова, Т.В. Микробиологические свойства и генетические особенности микоплазм / Т.В. Руденкова, В.В. Дорошевич, С.А. Костюк, Н.Л. Андреева, Н.А. Бадыгина, О.С. Полуян // Медицинские новости. – 2011. – № 8. – С. 13-16.

16. Самуйленко, А.Я. Инновационные биотехнологии в развитии агробиологической промышленности / А.Я. Самуйленко // Сборн. стат. материалы международного агробиотехнологического симпозиума, посвященного 80-летию члена-корреспондента РАН, заслуженного деятеля науки РФ Сочнева В.В. 150 инноваций совершенствования 144 ветеринарного обеспечения сельских и городских территорий ВПО ФГБОУ «Нижегородская ГСХА». – 2016. – С.16-18
17. Смирнова, Л. И. Особенности проявления и диагностики уреоплазменной инфекции крупного рогатого скота в условиях промышленного животноводства / Л. И. Смирнова, Л.В. Темникова // Международный вестник ветеринарии. – 2009. – № 3. – С.6-9.
18. Стегний, Б. Т. Микоплазмы (эволюционное развитие, структура генома, особенности метаболизма) / Б. Т. Стегний, О.В. Обуховская // Міжвідомчий науковий тематичний збірник "Птахівництво" (Матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції по птахівництву 22-25 вересня, 2008 р., м. Судак). – 2007. – В.62. – С.50.
19. Сухинин, А.А. Полимеразная цепная реакция для выявления *Ureaplasma diversum* у крупного рогатого скота / А.А. Сухинин, С.А. Макавчик, Л.И. Смирнова, Е.И. Приходько // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2017. – №1. – С.45-47.
20. Тилли, Л.П. Болезни кошек и собак : перевод с английского // Л. Тилли, Ф. Смит мл.; под ред. Е. П. Копенкина. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 838 с.
21. Уреоплазмоз (*Ureaplasma spp.*) // URL: <http://fractalbio.com/catprod/nabordljaveterinarii/domashniezhivotnye/ureaplazmozureaplasmasp/>.
22. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины». Отчёт о выполнении тематического плана

- научно-исследовательских работ по заказу Минсельхоза России за счёт средств федерального бюджета в 2016 году // Санкт-Петербург. – 2016. – 112 с.
23. Amano, H. A female genital disease in cattle associated with *Ureaplasma diversum* / H. Amano, N. Kajio, M. Shibata, M. Tsuchiya, S. Sano, N. Mori // Journal of the Japan Veterinary Medical Association. – 1990. – V.43, N.4 – P.252-257.
24. Amorim, A.T. Apoptosis in HEp-2 cells infected with *Ureaplasma diversum* / A.T. Amorim, L.M. Marques, A.M. Santos, H.B. Martins, M.S. Barbosa, I.S. Rezende, E.F. Andrade, G.B. Campos, T.N. Lobão, B.A. Cortez, T.A. Monezi, G.M. Machado-Santelli, J. Timenetsky // Biol Res. — 2014. — V.47. — P.38.
25. Arfi, Y. MIB-MIP is a mycoplasma system that captures and cleaves immunoglobulin G / Y. Arfi, L. Minder, C. Di Primo, A. Le Roy, C. Ebel, L. Coquet, S. Claverol, S. Vashee, J. Jores, A. Blanchard, P. Sirand-Pugnet // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2016. – V.113, N.19. – P.5406-5411.
26. Autio, T. Etiology of respiratory disease in non-vaccinated, non-medicated calves in rearing herds / T. Autio, T. Pohjanvirta, R. Holopainen, U. Rikula, J. Pentikäinen, A. Huovilainen, H. Rusanen, T. Soveri, L. Sihvonen, S. Pelkonen // Vet Microbiol. – 2007. – V.119, N.2-4. – P.256-265.
27. Ball, H.J. The isolation of mycoplasma from bovine foetuses and their dams / H.J. Ball, S.D. Neill, W.A. Ellis, J.J. O'Brien, H.W. Ferguson // Br Vet J. — 1978. — V.134, N.6. — P.584-589.
28. Barile, M.F. DNA homologies and serologic relationships among ureaplasmas from various hosts / M.F. Barile // Pediatr Infect Dis. – 1986. – N.5. – P.296-299.
29. Bebear, C.M. Characterization of *Mycoplasma hominis* mutations involved in resistance to fluoroquinolones / C.M. Bebear, J.M. Bové, C. Bebear, J.

- Renaudin // Antimicrob Agents Chemother. – 1997. – V.41, N.2. – P.269-273.
30. Bébéar, C. *Mycoplasma pneumoniae*: susceptibility and resistance to antibiotics / C. Bébéar, S. Pereyre, O. Peuchant // Future Microbiol. – 2011. – V.6, N.4. – P.423-431.
31. Benstein, B.D. *Ureaplasma urealyticum* binds mannose-binding lectin / B.D. Benstein, D.D. Ourth, D.T. Crouse, D.R. Shanklin // Exp Mol Pathol. – 2004. – V.77, N.2. – P.138-144.
32. Bicalho, R.C. Intra-uterine Microbiota of Dairy Cows and the Impact of Trace Minerals / R.C. Bicalho // Materials of Dairy Cattle Reproduction Conference. – 2012.
33. Blanchard, A., Cloning of *Ureaplasma urealyticum* DNA sequences showing genetic homology with urease genes from gram-negative bacteria / A. Blanchard, M.F. Barile // Res Microbiol. – 1989. – V.140, N.4-5. – P. 281-290.
34. Blanchard, A. Characteristics of *Ureaplasma urealyticum* urease / A. Blanchard, S. Razin, G.E. Kenny, M.F. Barile // J Bacteriol. – 1988. – V.170, N.6. – P.2692-2697.
35. Bondurant, R.H. Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control / R.H. Bondurant // Vet Clin North Am Food Anim Pract. – 2005. – V.21, N.2. – P.383-408.
36. Britton, A.P. The recovery of ureaplasmas from bovine embryos following in vitro exposure and ten washes / A.P. Britton, R.B. Miller, H.L. Ruhnke, W.H. Johnson // Theriogenology. – 1988. – V.30, N.5. – P. 997-1003.
37. Britton, A.P. In vitro exposure of bovine morulae to *Ureaplasma diversum* / A.P. Britton, H.L. Ruhnke, R.B. Miller, W.H. Johnson, K.E. Leslie, S/ Rosendal // Can J Vet Res. – 1987. – V.51, N.2. – P.198-203.

38. Burgher, Y. *Ureaplasma diversum* in pneumonic lungs of swine / Y. Burgher, L. Miranda, R. Rodriguez-Roche, A.C. de Almeida Campos, E. Lobo, T. Neves, O. Martínez, J. Timenetsky // *Infect Genet Evol.* – 2014. – P. 486-488.
39. Buzinhani, M. Genotyping of *Ureaplasma diversum* isolates using pulsed-field electrophoresis / M. Buzinhani, M.R. Buim, M. Yamaguti, R.C. Oliveira, E. Mettifogo, J. Timenetsky // *Vet J.* — 2007. — V.173, N.3.— P.688-690.
40. Buzinhani, M. Isolates of *Ureaplasma diversum* genotyped by single-enzyme amplified length polymorphism / M. Buzinhani, E. Mettifogo, M.R. Buim, A.M. Moreno, R. Paixão, J. Timenetsky // *Braz. J. Microbiol.* – 2007. – V.38, N.1. – P.29-32.
41. Buzinhani, M. Invasion of *Ureaplasma diversum* in bovine spermatozooids / M. Buzinhani, M. Yamaguti, R.C. Oliveira, B.A. Cortez, L.M. Marques, G.M. Machado-Santelli, M.E. Assumpção, J. Timenetsky // *BMC Res Notes.* – 2011. – V.4. – P.455.
42. Cardoso, M.V. Doctoral Thesis. *Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium* and *Ureaplasma diversum* in bulls. Comparison of diagnostics procedures, interference in reproductive performance and therapeutic assay / M.V. Cardoso // Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo. — 2003.
43. Carnrot, C. Molecular characterization of thymidine kinase from *Ureaplasma urealyticum*: nucleoside analogues as potent inhibitors of mycoplasma growth / C. Carnrot, R. Wehelie, S. Eriksson, G. Bölske, L. Wang // *Mol Microbiol.* – 2003. – V.50, N.3. – P.771-780.
44. Cassell, G.H. Pathogenesis and significance of urogenital mycoplasmal infections / G.H. Cassell, J.K. Davis, K.B. Waites, P.T. Rudd, D. Talkington, D. Crouse, S.A. Horowitz // *Adv Exp Med Biol.* – 1987. – V.224, N.93. – P.115.

- 45.Chalker, V.J. Canine mycoplasmas / V.J. Chalker // Res Vet Sci. – 2005. – V.79, N.1. – P.1-8.
- 46.Cheah, F.C. / Comparison of the Mycoplasma Duo test with PCR for detection of ureaplasma species in endotracheal aspirates from premature infants / F.C. Cheah, T.P. Anderson, B.A. Darlow, D.R. Murdoch // J Clin Microbiol. – 2005. – V.43, N.1. – P.509-510.
- 47.Chełmońska-Soyta, A. The effect of *Ureaplasma diversum* activated mononuclear leukocytes on the development and interferon-tau production by bovine IVF-derived embryos / A. Chełmońska-Soyta, L. Katska, M. Kurpisz, T. Stefaniak, M. Zimecki // J Reprod Immunol. – 2001. – V.51, N.2. – N.145-158.
- 48.Chelmonska-Soyta, A. / Activation of murine macrophages and lymphocytes by *Ureaplasma diversum* / A. Chelmonska-Soyta, R.B. Miller, L. Ruhnke, S. Rosendal // Can J Vet Res. – 1994. – V.58, N.4. – P.275-280.
- 49.Citti, C. Horizontal Gene Transfers in Mycoplasmas (*Mollicutes*) / C. Citti, E. Dordet-Frisoni, L.X. Nouvel, C.H. Kuo, E. Baranowski // Curr Issues Mol Biol. – 2018. – V.29, N.3 – P.22.
- 50.Cockcroft, P. Bovine Medicine / Cockcroft P. // John Wiley & Sons, Hoboken. — 2015. — 656 p.
- 51.Colaizy, T.T. Detection of ureaplasma DNA in endotracheal samples is associated with bronchopulmonary dysplasia after adjustment for multiple risk factors / T.T. Colaizy, C.D. Morris, J. Lapidus, R.S. Sklar, D.A. Pillers // Pediatr Res. – 2007. – V.61, N. 5. – P.578-583.
- 52.DaMassa, A.J. Mycoplasmas of Goats and Sheep / A.J. DaMassa, P.S. Wakenell, D.L. Brooks // J. Vet. Diagn. Invest. – 1992. – V.4, N.1. – P.101-113.

53. Davis, J.W. Jr. Inorganic pyrophosphatase activity in cell-free extracts of *Ureaplasma urealyticum* / J.W. Davis Jr., I.S. Moses, C. Ndubuka, R. Ortiz // J Gen Microbiol. – 1987. – V.133, N.6. – P.1453-1459.
54. De Francesco, M.A. Detection of *Ureaplasma* biovars and polymerase chain reaction-based subtyping of *Ureaplasma parvum* in women with or without symptoms of genital infections / M.A. De Francesco, R. Negrini, G. Pinsi, L. Peroni, N. Manca // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2009. – V.28, N.6. – P.641-646.
55. Delisle, G.J. Multiple forms of urease in cytoplasmic fractions of *Ureaplasma urealyticum* / G.J. Delisle // J Bacteriol. – 1977. – V.130, N.3. – P. 1390-1392.
56. De Silva, N.S. Localization of endogenous activity of phospholipases A and C in *Ureaplasma urealyticum* / N.S. De Silva, P.A. Quinn // J Clin Microbiol. – 1991. – V.29, N.7. – P.1498-1503.
57. Doig, P.A. The genital *Mycoplasma* and *Ureaplasma* flora of healthy and diseased dogs / P.A. Doig, H.L. Ruhnke, W.T. Bosu // Can J Comp Med. – 1981. – V.45, N.3. – P.233-238.
58. Doig, P.A. Experimental bovine genital ureaplasmosis I. Granular vulvitis following vulvar inoculation / P.A. Doig, H.L. Ruhnke, N.C. Palmer // Can J Comp Med. – 1980. – V.44, N.3. – P.252-258.
59. Doig, P.A. Experimental bovine genital ureaplasmosis. II. Granular vulvitis, endometritis and salpingitis following uterine inoculation / P.A. Doig, H.L. Ruhnke, N.C. Palmer // Can J Comp Med. – 1980. – V.44, N.3. – P.259-266.
60. Dybvig, K. Molecular biology of mycoplasmas / K. Dybvig., L.L. Voelker // Annu Rev Microbiol. – 1996. – V. 50. – P.25-57.
61. Fish, N.A. The distribution of mycoplasmas and ureaplasmas in the genital tract of normal artificial insemination bulls / N.A. Fish, S. Rosendal, R.B. Miller // Can Vet J. – 1985. – V. 26, N.1. – P.13-15.

62. Friberg, J. / Diagnosis of genital *Mycoplasma* and *Ureaplasma* infections / J. Friberg // J Reprod Med. – 1985. – V.30, N.3. – P.258-261.
63. Friis, N.F. Sensitivity of certain porcine and bovine mycoplasmas to antimicrobial agents in a liquid medium test compared to a disc assay / N.F. Friis, J. Szancer // Acta Vet Scand. – 1994. – V.35, N.4. – P.389-394.
64. Furr, P.M. Long-term viability of stored mycoplasmas and ureaplasmas / P.M. Furr, D. Taylor-Robinson // J Med Microbiol. – 1990. – V.31, N.3. – P.203-206.
65. Gaeti, J.G. *Ureaplasma diversum* as a cause of pustular vulvovaginitis in bovine females in Vale Guapore, Mato Grosso State, Brazil / J.G. Gaeti, M.V. Lana, G.S. Silva, L. Lerner, C.G. de Campos, F. Haruni, E.M. Colodel, E.F. Costa, L.G. Corbellini, L. Nakazato, C.A. Pescador // Trop Anim Health Prod. – 2014. – V.46, N.6. – P.1059-1063.
66. Gagea, M.I. Naturally occurring *Mycoplasma bovis*-associated pneumonia and polyarthritis in feedlot beef calves / M.I. Gagea, K.G. Bateman, R.A. Shanahan, T. van Dreumel, B.J. McEwen, S. Carman, M. Archambault, J.L. Caswell // J Vet Diagn Invest. — 2006. — V.18, N.1. — P. 29-40.
67. Gagea, M.I. Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots / M.I. Gagea, K.G. Bateman, T. van Dreumel, B.J. McEwen, S. Carman, M. Archambault, R.A. Shanahan, J.L. Caswell // J Vet Diagn Invest. – 2006. – V.18, N.1. – P.18-28.
68. Gale, S.P. The effects of two *Ureaplasma diversum* strains on early pregnancy in heifers / S.P. Gale // Can J Vet Res. – 1987. – V.51, N.4. – P.536-538.
69. Gambarini, M.L. Granular Vulvovaginitis Syndrome in Nelore pubertal and post pubertal replacement heifers under tropical conditions: role of *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma diversum* and BHV-1 / M.L. Gambarini, T.L.

- Kunz, B.D. Oliveira Filho, R.N. Porto, C.M. Oliveira, W.M. Brito, M.A. Viu // *Trop Anim Health Prod.* – 2009. – V.41, N.7. – P. 1421-1426.
70. Gerber, S. Detection of *Ureaplasma urealyticum* in second-trimester amniotic fluid by polymerase chain reaction correlates with subsequent preterm labor and delivery / S. Gerber, Y. Vial, P. Hohlfeld, S.S. Witkin // *J Infect Dis.* – 2003. – V.187, N.3. – P.518-521.
71. Givens, M.D. Review: Risks of disease transmission through semen in cattle / M.D. Givens // *Animal.* – 2018. – V.12, N.1. – P.165-171.
72. Glaser, K. *Ureaplasma* isolates stimulate pro-inflammatory CC chemokines and matrix metalloproteinase-9 in neonatal and adult monocytes / K. Glaser, C. Silwedel, M. Fehrholz, B. Henrich, A.M. Waaga-Gasser, H. Claus, C.P. Speer // *PLoS One.* – 2018. – V.13, N.3. – e0194514.
73. Glaser, K., *Ureaplasma* Species Differentially Modulate Pro- and Anti-Inflammatory Cytokine Responses in Newborn and Adult Human Monocytes Pushing the State Toward Pro-Inflammation / K. Glaser, C. Silwedel, M. Fehrholz, A.M. Waaga-Gasser, B. Henrich, H. Claus, C.P. Speer // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2017. – V.7. – P. 484.
74. Glaser, K. *Ureaplasma* isolates differentially modulate growth factors and cell adhesion molecules in human neonatal and adult monocytes / K. Glaser, C. Silwedel, A.M. Waaga-Gasser, B. Henrich, M. Fehrholz, H. Claus, C.P. Speer // *Cytokine.* — 2018. — V.105. — P. 45-48.
75. Glass, J.I. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum* / J.I. Glass, E.J. Lefkowitz, J.S. Glass, C.R. Heiner, E.Y. Chen, G.H. Cassell // *Nature.* – 2000. – V.407, N.6805. – P.757-762.
76. Gregory, L. Interference of *Mycoplasma* spp. or *Ureaplasma* spp. in Ovine Semen Quality / L. Gregory, H. Rizzo, N.C. Gaeta, G. Tortorelli, M.V. Cardoso, E. Mettifogo, M. Buzinhani, J. Timenetsky // *Journal of Microbiology Research.* – 2012. – V.2, N.5. – P.118-122.

77. Guimaraes, A.M. Comparative genomics and phylogenomics of hemotrophic mycoplasmas / A.M. Guimaraes, A.P. Santos, N.C. do Nascimento, J. Timenetsky, J.B. Messick // PLoS One. – 2014. – V.9, N.3. – e91445.
78. Gustafsson, H. Vaginitis in dairy cows in south-east Sweden - results of a pilot study / H. Gustafsson, G. Bäckström, G. Bölske, U. Emanuelson // Svensk Veterinärtidning. – 1995. – V.47, N.11. – P.469-473.
79. Gyles, C.L. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals 4th Edition / Gyles C.L., Prescott J.F., Songer J.G., Thoen C.O. // Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey, United States. – 2011. – 664 p.
80. Harasawa, R. Phylogenetic analysis of genes coding for 16S rRNA in mammalian ureaplasmas / R. Harasawa, G.H. Cassell // Int J Syst Bacteriol. – 1996. – V.46, N.3. – P. 827-829.
81. Harasawa, R. *Ureaplasma felinum* sp. nov. and *Ureaplasma cati* sp. nov. Isolated from the Oral Cavities of Cats / R. Harasawa, Y. Imada, M. Ito, I. Koshmisu, G.H. Cassel, M.F. Barrile // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1990. – V. 40. – P. 45-51.
82. Harasawa, R. *Ureaplasma canigenitalium* sp. nov., isolated from dogs / R. Harasawa, Y. Imada, H. Kotani, K. Koshimizu, M.F. Barile // Int J Syst Bacteriol. – 1993. – V.43, N.4. – P.640-644.
83. Harasawa, R. Phylogenetic analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of the genus *Ureaplasma* / R. Harasawa, E.J. Lefkowitz, J.I. Glass, G.H. Cassell // J Vet Med Sci. – 1996. – V.58, N.3. – P.191-195.
84. Hannan, P.C. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. International Research Programme on Comparative Mycoplasmology / P.C. Hannan // Vet Res. – 2000. – V.31, N.4. – P.373-395.

- 85.Hassan, N. I *Mycoplasma* and *Ureaplasma* of the genital tract of camels in Egypt / N. I. Hassan, T.M. Ahmed // Assiut Veterinary Medical Journal. – 1997. – V.38, N.75. – P. 104-118.
- 86.Hentschela, J. *Mycoplasma*, Infection and Immunity / J. Hentschela // Encyclopedia of Immunology. – Elsevier, Berlin. – 1998. – P. 1798-1802.
- 87.Himsworth, C.G. Destructive polyarthropathy in aborted bovine fetuses: a possible association with *Ureaplasma diversum* infection? / C.G. Himsworth, J.E. Hill, Y. Huang, E.H. Waters, G.A. Wobeser // Vet Pathol. – 2009. – V.46, N.2. – P.269-272.
88. Hobson, N. *Ureaplasma diversum* in bull semen in Australia: its detection and potential effects / N. Hobson, K.K. Chousalkar, P.J. Chenoweth // Aust Vet J. – 2013. – V.91, N.11. – P.469-473.
- 89.Howard, C.J. Mycoplasmas and bovine respiratory disease: studies related to pathogenicity and the immune response — a selective review / C.J. Howard // Yale J Biol Med. – 1983. – V.56, N. 5-6 – P. 789-797.
90. Howard, C.J. Identification of ureaplasmas from cattle using antisera prepared in gnotobiotic calves / C.J. Howard // J Gen Microbiol. – 1981. – V.126, N.2. – P.365-369.
- 91.Howard, C.J., Gourlay R.N. Proposal for a second species within the genus *Ureaplasma*, *Ureaplasma diversum* sp. nov. / C.J. Howard, R.N. Gourlay // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1982. – V.32. – P. 446-452.
- 92.Howard, C.J. Serological Comparison Between Twenty-Five Bovine *Ureaplasma* (T-*Mycoplasma*) Strains by Immunofluorescence / C.J. Howard, R.N. Gourlay, J. Collains / International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1975. – V.25. – P.155-159.
- 93.Howard, C.J. Induction of pneumonia in gnotobiotic calves following inoculation of *Mycoplasma dispar* and ureaplasmas (T-mycoplasmas) / C.J.

- Howard, R.N. Gourlay, L.H. Thomas, E.J. Stott // Res Vet Sci. – 1976. – V.21, N.2. – P.227-231.
- 94.Howard, C.J. Comparison of ureaplasmas from sheep and goats with *Ureaplasma diversum* and *U. urealyticum* / C.J. Howard, D.H. Pocock // J Gen Microbiol. – 1983. – V.129, N.10. – P.3197-3202.
- 95.Hoorfar, J. Diagnostic PCR: making internal amplification control mandatory / J. Hoorfar, N. Cook, B. Malorny, M. Wagner, D. De Medici, A. Abdulmawjood, P. Fach // J Appl Microbiol. – 2004. – V.96, N.2. – P.221-222.
- 96.Hoorfar, J. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays / J. Hoorfar, B. Malorny, A. Abdulmawjood, N. Cook, M. Wagner, P. Fach // J Clin Microbiol. – 2004. – V.42, N.5. – P.1863-1868.
- 97.Joya, M.A.P. Infectious agents affecting fertility of bulls, and transmission risk through semen. Retrospective analysis of their sanitary status in Colombia / M.A.P. Joya, A. Góngora, C. Jiménez // Rev Colom Cienc Pecua. – 2011. – V.24, N.4. – P. 634-646.
- 98.Kacerovsky, M. Amniotic fluid protein profiles of intraamniotic inflammatory response to *Ureaplasma* spp. and other bacteria / M. Kacerovsky, P. Celec, B. Vlkova, K. Skogstrand, D.M. Hougaard, T. Cobo, B. Jacobsson // PLoS One. – 2013. – V.8, N.3. – e60399.
- 99.Kakulphimp, J. Genome sizes of mammalian and avian Ureaplasmas / J. Kakulphimp, L.R. Finch, J.A. Robertson // Int J Syst Bacteriol. – 1991. – V.41, N.2. – P.326-327.
100. Kapatais-Zoumbos, K. Survey of immunoglobulin A protease activity among selected species of *Ureaplasma* and *Mycoplasma*: specificity for host immunoglobulin A / K. Kapatais-Zoumbos, D.K. Chandler, M.F. Barile // Infect Immun. – 1985. – V.47, N.3. – P.704-709.

101. Kenny, G.E. Inhibition of the growth of *Ureaplasma urealyticum* by a new urease inhibitor, fluorofamide / Kenny G.E. // Yale J Biol Med. – 1983. – V.56, N.5-6. – P.717-722.
102. Kilian, M. Exclusive occurrence of an extracellular protease capable of cleaving the hinge region of human immunoglobulin A1 in strains of *Ureaplasma urealyticum* / M. Kilian, E.A. Freundt // Isr J Med Sci. – 1984. – V.20, N.10. – P.938-941.
103. Kim, J.J. *Ureaplasma diversum* infection in vitro alters prostaglandin E2 and prostaglandin F2a production by bovine endometrial cells without affecting cell viability / J.J. Kim, P.A. Quinn, M.A. Fortier // Infect Immun. – 1994. – V.62, N.5. – N. 1528-1533.
104. Kirkbride, C.A. *Mycoplasma, Ureaplasma, and Acholeplasma* infections of bovine genitalia / C.A. Kirkbride // Vet Clin North Am Food Anim Pract. – 1987. – V.3, N.3. – P.575-591.
105. Kirkbride, C.A. Etiologic agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths / C.A. Kirkbride // J Vet Diagn Invest. – 1992. – V.4, N.2. – P.175-180.
106. Kishimoto, M. Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with bovine respiratory disease complex / M. Kishimoto, S. Tsuchiaka, S.S. Rahpaya, A. Hasebe, K. Otsu., S. Sugimura, S. Kobayashi, N. Komatsu, M. Nagai, T. Omatsu, Y. Naoi, K. Sano, S. Okazaki-Terashima, M. Oba, Y. Katayama, R. Sato, T. Asai, T. Mizutani // J Vet Med Sci. – 2017. – V.79, N.3. – P.517-523.
107. Knudtson, W.U. Identification of *Mycoplasmatales* in pneumonic calf lungs / W.U. Knudtso, D.E. Ree, G. Daniels // Vet Microbiol. – 1986. – V.11, N.1-2. – P.79-91.
108. Kokkayil, P. *Ureaplasma*: current perspectives / P. Kokkayil, B. Dhawan // Indian J Med Microbiol. – 2015. – V.33, N.2. – P.205-214.

109. Kong, F. Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-based assays / F. Kong, Z. Ma, G. James, S. Gordon, G.L. Gilbert // J Clin Microbiol. – 2000. – V.38, N.3. – P.1175-1179.
110. Koshimizu, K. *Ureaplasma gallorale* sp. nov. from the Oropharynx of Chickens / K. Koshimizu, R. Harasawa, I.-J. Pan, H. Kotani, M. Ogata, E.B. Stephens, M.F. Barile // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1987. – V.37. – P.333-338.
111. Kotani, H. Rapid and simple identification of mycoplasmas by immunobinding / H. Kotani, G.J. McGarrity // J Immunol Methods. – 1985. – V.85, N.2. – P. 257-267.
112. Kotani, H. Ureaplasma infection of cell cultures / H. Kotani, G.J. McGarrity // Infect Immun. — 1986. — V.52, N.2. — P.437-444.
113. Kramer, B.W. Prenatal inflammation and lung development / B.W. Kramer, S. Kallapur, J. Newnham, A.H. Jobe // Semin Fetal Neonatal Med. – 2009. – V.14, N.1. — P.2-7.
114. Kreplin, C.M. Alberta .Abortion due to *Ureaplasma diversum* / C.M. Kreplin, V.F. Maitland // Can Vet J. – 1989. – V.30, N.5. – P.435.
115. Kreplin, C.M. The effect of intrauterine inoculation with *Ureaplasma diversum* on bovine fertility / C.M. Kreplin, H.L. Ruhnke, R.B. Miller, P.A. Doig // Can J Vet Res. – 1987. – V.51, N.4. – P.440-443.
116. Krieg, N.R. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 4. 2nd Edition. / N.R. Krieg, W. Ludwig, W. Whitman, B.P. Hedlund, B.J. Paster, J.T. Staley, N. Ward, D. Brown, A. Parte (Eds.) // NY: Springer-Verlag. – 2011. – 949 p.
117. Kusiluka, L.J. Increasing prevalence of *Mycoplasma bovis* in Danish cattle / L.J. Kusiluka, B. Ojeniyi, N.F. Friis // Acta Vet Scand. – 2000. – V.41, N.2. – P.139-146.

118. Langford, E.V. Mycoplasma species recovered from the reproductive tracts of western Canadian cows / E.V. Langford // Can J Comp Med. – 1975. – V.39, N.2. – P.133-138.
119. Larsen, L.E. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) pneumonia in beef calf herds despite vaccination / L.E. Larsen, C. Tegtmeier, E. Pedersen // Acta Vet Scand. – 2001. – V.42, N.1. – P.113-121.
120. Le Grand, D. Genital *Ureaplasma diversum* infection: investigations in cattle in France / D. Le Grand, F. Poumarat, J.L. Martel // Vet Res. – 1995. – V.26, N.1. – P.11-20.
121. León, B.A. Risk factors for *Ureaplasma diversum* infections in cattle of a tropical environment / B.A. León, E. Campos, H. Bolaños, M. Caballero // Rev Biol Trop. – 1995. – V.43, N.1-3. – P.21-25.
122. Li, Y.H. *Ureaplasma urealyticum* induces apoptosis in human lung epithelial cells and macrophages / Y.H.Li, M. Chen, A. Brauner, C. Zheng, J. Skov Jensen, K. Tullus // Biol Neonate. – 2002. – V.82, N.3. – P. 166-173.
123. Ligon, J.V. Virulence of ureaplasma urease for mice / J.V. Ligon, G.E. Kenny // Infect Immun. – 1991. – V.59, N.3. – P.1170-1171.
124. Lin, J.S. Human mycoplasma infections: serologic observations / J.S. Lin // Rev Infect Dis. – 1985. – V.7, N.2. – P.216-231.
125. Lingwood, C.A. Common sulfoglycolipid receptor for mycoplasmas involved in animal and human infertility / C.A. Lingwood, P.A. Quinn, S. Wilansky, A. Nutikka, H.L. Ruhnke, R.B. Miller // Biol Reprod. – 1990. – V.43, N.4. – P.694-697.
126. Marques, L.M. A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Ureaplasma diversum* / L.M. Marques, A.T. Amorim, H.B. Martins, I.S. Rezende, M.S. Barbosa, T.N. Lobão, G.B. Campos, J. Timenetsky // Vet Microbiol. – 2013. – V.167, N.3-4. – P.670-674.

127. Marques, L.M. Intraspecific sequence variation in 16S rRNA gene of *Ureaplasma diversum* isolates / L.M. Marques, M. Buzinhani, A.M. Guimaraes, R.C. Marques, S.T. Farias, R.L. Neto, M. Yamaguti, R.C. Oliveira, J. Timenetsky // *Vet Microbiol.* – 2011. – V.152, N.1-2. – P.205-211.
128. Marques, L.M. Detection of *Ureaplasma diversum* in bovine semen straws for artificial insemination / L.M. Marques, M. Buzinhani, R.L. Neto, R.C. Oliveira, M. Yamaguti, A.M. Guimarães, J. Timenetsky // *Vet Rec.* – 2009. – V.165, N.19. – P. 572-573.
129. Marques, L.M. Prevalence of mycoplasmas in the respiratory tracts of calves in Brazil / L.M. Marques, M. Buzinhani, R.C. Oliveira, M. Yamaguti, J.B. Ferreira, R.L. Neto, J. Timenetsky // *Vet Rec.* – 2007. – V.161, N.20. – P. 699-700.
130. Marques, L.M. Genome Sequence of *Ureaplasma diversum* Strain ATCC 49782 / L.M. Marques, A.M. Guimarães, H.B. Martins, I.S. Rezende, M.S. Barbosa, G.B. Campos, N.C. do Nascimento, A.P. Dos Santos, A.T. Amorim, V.M. Santos, J.B. Messick, J. Timenetsky // *Genome Announc.* – 2015. – V.3, N.2. – P.314-315.
131. Marques, L.M. *Ureaplasma diversum* Genome Provides New Insights about the Interaction of the Surface Molecules of This Bacterium with the Host / L.M. Marques, I.S. Rezende, M.S. Barbosa, A.M. Guimarães, H.B. Martins, G.B. Campos, N.C. do Nascimento, A.P. Dos Santos, A.T. Amorim, V.M. Santos, S.T. Farias, F.Â. Barrence, L.M. de Souza, M. Buzinhani, V.E. Arana-Chavez, M.E. Zenteno, G.P. Amarante-Mendes, J.B. Messick, J. Timenetsky // *PLoS One.* – 2016. – V.11, N.9. – e0161926.
132. Marques, L.M. Invasion of *Ureaplasma diversum* in Hep-2 cells / L.M. Marques, P.M. Ueno, M. Buzinhani, B.A. Cortez, R.L. Neto, M. Yamaguti, R.C. Oliveira, A.M. Guimarães, T.A. Monezi, A.C. Braga Jr.,

- G.M. Machado-Santelli, J. Timenetsky // BMC Microbiol. – 2010. – V.10, N.83. – URL: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-10-83>.
133. Masover, G.K. Localization of enzymes in *Ureaplasma urealyticum* (T-strain mycoplasma) / G.K. Masover, S. Razin, L. Hayflick // J Bacteriol. – 1977. – V.130, N.1. – P. 297-302.
134. Maxie, G. Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals G. Maxie // St. Louis, Missouri: Elsevier. – 2016. – 2456 p.
135. Mycoplasma IST2 // URL: <https://www.biomerieux-russia.com/клиническая-диагностика/продукт/миcoplasma-ist2>
136. Miller, R. *Ureaplasma diversum* as a cause of reproductive disease in cattle / R. Miller, A. Chelmonska-Soyta, B. Smits, R. Foster, S. Rosendal // Vet Clin North Am Food Anim Pract. – 1994. – V.10, N.3. – P.479-490.
137. Miller, R.B. The effects of *Ureaplasma diversum* inoculated into the amniotic cavity in cows / R.B. Miller, H.L. Ruhnke, P.A. Doig, B.J. Poitras, N.C.Palmer // Theriogenology. – 1983. – V.20, N.3. – P. 367-374.
138. Mulira, G.L. Humoral and secretory antibodies to *Ureaplasma diversum* in heifers following subcutaneous vaccination and vaginal infection / G.L. Mulira, J.R. Saunders // Can J Vet Res. – 1994. – V. 58, N. 2. – P. 104-108.
139. Mulira, G.L. Immune response of heifers to vaginal submucosal or subcutaneous vaccination and intravaginal challenge with *Ureaplasma diversum* / G.L. Mulira, J.R. Saunders // Can J Vet Res. – 1994. – V.58, N.2. – P.109-113.
140. Mulira, G.L. Isolation of *Ureaplasma diversum* and mycoplasmas from genital tracts of beef and dairy cattle in Saskatchewan / G.L. Mulira, J.R. Saunders, A.D. Barth // Can Vet J. – 1992. – V.33, N.1. – P.46-49.

141. Murray, R.D. Concurrent conjunctivitis and placentitis in aborted bovine fetuses / Murray R.D. // Zentralbl Veterinarmed A. – 1991. – V.38, N.9. – P.660-667.
142. Nascimento-Rocha, J.M. Assessment of cow and farm level risk factors associated with *Ureaplasma diversum* in pasture-based dairy systems - A field study / J.M. Nascimento-Rocha, B.D.F. Oliveira, E. Arnhold, R.N.G. Pôrto, S.F. Lima, M.L. Gambarini // An Acad Bras Cienc. – 2017. – V.89, N.3. – P. 1779-1783.
143. Neyrolles, O. Organization of *Ureaplasma urealyticum* urease gene cluster and expression in a suppressor strain of Escherichia coli / O. Neyrolles, S. Ferris, N. Behbahani, L. Montagnier, A. Blanchard // J Bacteriol. – 1996. – V.178, N.3. – P.647-655.
144. Nicholas, R. Mycoplasma Diseases of Ruminants / R. Nicholas, R. Ayling, L. McAuliffe // Wallingford: CABI. – 2008. - 239 p.
145. Njaa, B.L. Kirkbride's Diagnosis of Abortion and Neonatal Loss in Animals / B.L. Njaa // Hoboken: John Wiley & Sons. – 2011. – 248 p.
146. O'Brien, S.J. On the distribution and characteristics of isozyme expression in *Mycoplasma*, *Acholeplasma*, and *Ureaplasma* species / S.J. O'Brien, J.M. Simonson, S. Razin, M.F. Barile / Yale J Biol Med. — 1983. V.56, N.5-6. — P. 701-708.
147. Okogbule-Wonodi, A.C. Surfactant protein-A enhances ureaplasma-cidal activity in vitro / A.C. Okogbule-Wonodi, K.L. Chesko, M.E. Famuyide, R.M. Viscardi // Innate Immun. – 2011. – V.17, N.2. – P.145-151.
148. Oliveira, R.C. Molecular characterization of ureaplasmas isolated from reproductive tract of goats and sheep from Brazil / R.C. Oliveira, M. Yamaguti, L.M. Marques, M. Buzinhani, H. Rizzo, E.B.S. Meira-Junior,

- A.M.S. Guimarães, L. Gregory, J. Timenetsky // Braz J Microbiol. — 2017. — V.48, N.3. — P. 560-565.
149. Oliveira Filho, B.D. Isolamento do *Ureaplasma diversum* em muco vulvovaginal de vacas leiteiras repetidoras de estro no Estado de Alagoas, Brasil / B.D. Oliveira Filho, R.N.G. Porto, M.L. Gambarini, T.L. Kunz, H.T. Ferraz, M.A.O. Viu, D.T. Lopes, A.P.F. Sousa // Archs Vet. Sci. – 2005. – V.10, N.2. – P. 151-156.
150. Onnureddy, K. Metagenomic Analysis of Uterine Microbiota in Postpartum Normal and Endometritic Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*) / K. Onnureddy, Y. Vengalrao, T.K. Mohanty, D. Singh // Journal of Buffalo Science. – 2013. – N.2. – P.124-134.
151. Paralanov, V. Comparative genome analysis of 19 *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* strains / V. Paralanov, J. Lu, L.B. Duffy, D.M. Crabb, S. Shrivastava, B.A. Methé, J. Inman, S. Yooseph, L. Xiao, G.H. Cassell, K.B. Waites, J.I. Glass // BMC Microbiol. – 2012. – V.12, N.88. – URL: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-12-88>.
152. Pena Joya, M.A. Infectious agents affecting fertility of bulls, and transmission risk through semen: Retrospective analysis of their sanitary status in Colombia / M.A. Pena Joya, A. Gongora, C. Jimenes // Rev Colom Cienc Pecua. – 2011. – V.24, N.4. – P.623-633.
153. Pereyre, S. Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas // S. Pereyre, P. Sirand-Pugnet, L. Beven, A. Charron, H. Renaudin, A. Barré, P. Avenaude, D. Jacob, A. Couloux., V. Barbe, A. de Daruvar, A. Blanchard, C. Bébéar // PLoS Genet. – 2009. – V.5, N.10. – e1000677.

154. Petit, T. Examination of semen from bulls at five Austrian artificial insemination centres for chlamydiae and mollicutes / T. Petit, J. Spargser, J. Aurich, R. Rosengarten // *Vet Rec.* – 2008. – V.162, N.24. – P.792-793.
155. Petit, T. Prevalence of *Chlamydiaceae* and *Mollicutes* on the genital mucosa and serological findings in dairy cattle / T. Petit, J. Spargser, J. Aurich, R. Rosengarten // *Vet Microbiol.* – 2008. – V.127, N.3-4. – P. 325-333.
156. Phillip, R. Cattle Medicine / R. Phillip, P.R. Scott, C.D. Penny, A. Macrae // USA: CRC Press. – 2011. – 288 p.
157. Pilaszek, J. Affinity of microorganisms of the genus ureaplasma to the reproductive organs of cattle / J. Pilaszek, M. Truszczyński // *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* – 1988. – V.11, N.3-4. – P. 177-180.
158. Pollack, J.D. Metabolic distinctiveness of ureaplasmas / J.D. Pollack // *Pediatr Infect Dis.* – 1986. – V.5, N.6. – P. 305-307.
159. Pollack, J.D. *Ureaplasma urealyticum*: an opportunity for combinatorial genomics / J.D. Pollack // *Trends Microbiol.* – 2001.– V.9, N.4. – P. 169-175.
160. Pollack, J.D. The necessity of combining genomic and enzymatic data to infer metabolic function and pathways in the smallest bacteria: amino acid, purine and pyrimidine metabolism in *Mollicutes* / J.D. Pollack // *Front Biosci.* – 2002. – N.7. – P.1762-1781.
161. Pollack, J.D. Suspected utility of enzymes with multiple activities in the small genome *Mycoplasma* species: the replacement of the missing "household" nucleoside diphosphate kinase gene and activity by glycolytic kinases / J.D. Pollack, M.A. Myers, T. Dandekar, R. Herrmann // *OMICS.* – 2002. – V.6, N.3. – P.247-258.
162. Potts, L.C. Inflammatory Response of Human Gestational Membranes to *Ureaplasma parvum* Using a Novel Dual / L.C. Potts, L.

- Feng, P.C. Seed, F.L. Jayes, M. Kuchibhatla, B. Antczak, M.K. Nazzal, A.P. Murtha // Biol Reprod. – 2016. – V.94, N.5. – P.119.
163. Quinn, P.A. Serological response to *Ureaplasma urealyticum* in the neonate / P.A. Quinn, H.C. Li, C Th'ng, M Dunn, J. Butany // Clin Infect Dis. – 1993. – V.17, N.1. – P.136-143.
164. Razin, S. The mycoplasmas, volume IV: *Mycoplasma* pathogenicity / Edited by S. Razin and M. F. Barile. // Orlando, Florida: Academic Press Inc., 1985 – 508 p.
165. Razin, S. Urea Hydrolysis / S. Razin // Methods in Mycoplasmaology V1: *Mycoplasma* Characterization — Elsevier, New York. — 2012. — P. 351-352.
166. Rezende, I.S. Master's Dissertation. Response of macrophages and bovine blastocysts after exposure to *Ureaplasma diversum*. / I.S. Rezende // São Paulo : Instituto de Ciências Biomédicas. – 2016. – 248 p.
167. Reid, S.W. Ontario. Ureaplasma vulvovaginitis and infertility in eight southern Ontario dairy herds / S.W. Reid, D.G. Madill, A.H. Vreugdenhil // Can Vet J. – 1989. – V.30, N.3. – P.255.
168. Robertson, J.A. Hemadsorption by colonies of *Ureaplasma urealyticum* / J.A. Robertson, R. Sherburne // Infect Immun. – 1991. – V.59, N.6. – P.2203-2206.
169. Robertson, J.A. Proposal of *Ureaplasma parvum* sp. nov. and emended description of *Ureaplasma urealyticum* / J.A. Robertson, G.W. Stemke, J.W. Jr. Davis, R. Harasawa, D. Thirkell, F. Kong, M.C. Shepard, D.K. Ford // Int J Syst Evol Microbiol. – 2002. – V. 52, N. 2. – P. 587-597.
170. Robertson, J.A. Immunoglobulin A protease activity of *Ureaplasma urealyticum* / J.A. Robertson, M.E. Stemler, G.W. Stemke // J Clin Microbiol. – 1984. – V.19, N.2. – P.255-258.

171. Romano, N. Energy production in *Ureaplasma urealyticum* / N. Romano, R. La Licata, D. Russo Alesi // *Pediatr Infect Dis.* – 1986. – N.5. – P.308-312.
172. Rottem, S. *Mycoplasma Cell Membranes* / S. Rottem, I. Kahane // Springer Science & Business Media, Berlin. – 2012. – 314 p.
173. Ruhnke, H.L. Isolation of *Ureaplasma* from bovine granular vulvitis / H.L. Ruhnke, P.A. Doig, A.L. MacKay, A. Gagnon, M. Kierstead // *Can J Comp Med.* – 1978. – V.42, N.2. – P.151-155.
174. Ruhnke, H.L. Effect of *Ureaplasma diversum* on bovine reproduction: Epidemiological and experimental aspects / H.L. Ruhnke, R.B. Miller // *IOM Letters-Program and abstracts of the 8th International Congress of the IOM.* – Istanbul, Turkey, 1990. – P. 64.
175. Ruhnke, H.L. Bovine abortion and neonatal death associated with *Ureaplasma diversum* / H.L. Ruhnke, N.C. Palmer, P.A. Doig, R.B. Miller // *Theriogenology.* – 1984. – V.21, N.2. – P. 295-301.
176. Sachadyn, P. The construction and use of a PCR internal control / P. Sachadyn, J. Kur // *Mol Cell Probes.* — 1998. — V.12, N.5. — P.259-262.
177. Santos, S.B. Recovery of *Mollicutes* from the reproductive tract of dairy cattle in the state of Pernambuco, Brazil / S.B. Santos, J.W. Pinheiro-Júnior, A.R. Mota, A.S. Santos, B.H.L.S. Alves, J.M.B. Oliveira, L.B.G. Silva, R.A. Mota // *Pesq. Vet. Bras* – 2015. – V.35, N.6 – P. 491-496.
178. Santos, T.M. Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows / T.M. Santos, R.O. Gilbert, R.C. Bicalho // *J Dairy Sci.* – 2011. – V.94, N.1. – P.291-302.
179. Silva, J.R. Intra-uterine experimental infection by *Ureaplasma diversum* induces TNF- $\alpha$  mediated womb inflammation in mice / J.R. Silva, L.F. Ferreira, P.V. Oliveira, I.V. Nunes, Í.S. Pereira, J. Timenetsky, L.M.

- Marques, T.B. Figueiredo, R.A. Silva // An Acad Bras Cienc. – 2016. – V.88. – P.643-652.
180. Smiley, B.K. Enhanced readthrough of opal (UGA) stop codons and production of *Mycoplasma pneumoniae* P1 epitopes in *Escherichia coli* / B.K. Smiley, F.C. Minion // Gene. – 1993. – V.134, N.1. – P.33-40.
181. Smith, A. Polymerase chain reaction for detection of *Ureaplasma diversum* from urogenital swabs in cattle in Australia / A. Smith, K.K. Chousalkar, P.C. Chenoweth // Aust Vet J. – 2012. – V.90, N.7. – P. 275-276.
182. Smits, B. Effects of *Ureaplasma diversum* on bovine oviductal explants: quantitative measurement using a calmodulin assay / B. Smits, S. Rosendal, H.L. Ruhnke, C. Plante, P.J. O'Brien, R.B. Miller // Can J Vet Res. – 1994. – V.58, N.2. – P.114-121.
183. Sneath, P.H.A. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1st ed., vol. 2 / Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. (Eds.) //, – Baltimore: Williams & Wilkins,— 1986.
184. Sosa, C. Identification of species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma diversum* from Argentinian dairy herds / L. Tirante, J. Chaves, M. Pol, A. Ambrogi, J.A. Giraudo, P. Tamiozzo // Rev Argent Microbiol. – 2018. – V.50, N.1. – P.31-35.
185. Spooner, R.K. / Characterization of the immunoglobulin A protease of *Ureaplasma urealyticum* / R.K. Spooner, W.C. Russell, D. Thirkell // Infect Immun. – 1992. – V.60, N.6. – P. 2544-2546.
186. Sprecher, D.J. Relationships among seminal culture, seminal white blood cells, and the percentage of primary sperm abnormalities in bulls evaluated prior to the breeding season / D.J. Sprecher, P.H. Coe, R.D. Walker // Theriogenology. – 1999. – V.51, N.6. – P.1197-1206.

187. Stalheim, O.H. Growth and effects of ureaplasmas (T mycoplasmas) in bovine oviductal organ cultures / Stalheim O.H., Proctor S.J., Gallagher J.E. // *Infect Immun.* – 1976. – V.13, N.3. – P.915-925.
188. Stellrecht, K.A. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas / K.A. Stellrecht, A.M. Woron, N.G. Mishrik, R.A. Venezia // *J Clin Microbiol.* – 2004. – V.42, N.4. – P. 1528-1533.
189. Stemke, G.W. Purification of urease from *Ureaplasma urealyticum* / G.W. Stemke, J.A. Robertson, M. Nhan // *Can J Microbiol.* – 1987. – V.33, N.10. – P.857-862.
190. Stipkovits, L. Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics, Volume 3 / Stipkovits L. // Office of Official Publications of the European Communities. – 1996. – 191 p.
191. Suwimonteerabutr, J. A comparative study on the isolation of *Ureaplasma diversum* from the vulvae of the cattle, using three different culture media / J. Suwimonteerabutr, P. Virakul // *Thai J. Vet. Med.* – 2004. – V.34, N.4. – P. 115-120.
192. Swanberg, S.L. Some characteristics of *Ureaplasma urealyticum*. Urease activity in a simple buffer: effect of metal ions and sulphhydryl inhibitors / S.L. Swanberg, G.K. Masover, L. Hayflick // *J Gen Microbiol.* – 1978. – V.108, N.2. – P.221-225.
193. Swenson, C.E. Animal models of genital Chlamydia and Mycoplasma infections / C.E. Swenson, L.G. Keith, G.S. Berger (eds) / *Uncommon Infections and Special Topics. Infections in Reproductive Health.* — Dordrecht: Springer. – 2015. — P.217-231.
194. Syrjälä, P. Causes of bovine abortion, stillbirth and neonatal death in Finland 1999–2006 / P. Syrjälä, M Anttila., K. Dillard, M. Fossi, K. Collin, M. Nylund, T. Autio // *Acta Vet Scand.* — 2007. — V.49, N.1. — P.3.

195. Taylor-Robinson, D. The isolation and comparative biological and physical characteristics of T-mycoplasmas of cattle / D. Taylor-Robinson, M.H. Williams, D.A. Haig // *J Gen Microbiol.* – 1968. – V.54, N.1. – P.33-46.
196. Tegtmeier, C. Pathological and microbiological studies on pneumonic lungs from Danish calves / C. Tegtmeier, A. Uttenthal, N.F. Friis, N.E. Jensen, H.E. Jensen // *Zentralbl Veterinarmed B.* – 1999. – V.46, N.10. – P. 693-700.
197. ter Laak, E.A. Comparison of pathological signs of disease in specific-pathogen-free calves after inoculation of the respiratory tract with *Ureaplasma diversum* or *Mycoplasma canis* / E.A. ter Laak, J.E. van Dijk, J.H. Noordergraaf // *J Comp Pathol.* – 1993. – V.108, N.2. – P.121-132.
198. ter Laak, E.A. The nasal mycoplasmal flora of healthy calves and cows / ter Laak E.A., Noordergraaf J.H., Boomsluiters E. // *Zentralbl Veterinarmed B.* — 1992. — V.39, N.8. — P.610-616.
199. ter Laak, E.A. Prevalence of mycoplasmas in the respiratory tracts of pneumonic calves / E.A. ter Laak, J.H. Noordergraaf, R.P. Dieltjes // *Zentralbl Veterinarmed B.* – 1992. – V.39, N.8. – P.553-562.
200. ter Laak, E.A. Susceptibilities of *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar*, and *Ureaplasma diversum* strains to antimicrobial agents in vitro / E.A. ter Laak, J.H. Noordergraaf, M.H. Verschure // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1993. – V.37, N.2. – P. 317-321.
201. Thibier, M. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination / M. Thibier, B. Guerin // *Anim Reprod Sci.* – 2000. – V.62, N.1-3. – P.233-251.
202. Thirkell, D. The urease of *Ureaplasma urealyticum* / D. Thirkell, A.D. Myles, B.L. Precious, J.S. Frost, J.C. Woodall, M.G. Burdon, W.C. Russell // *J Gen Microbiol.* – 1989. – V.135, Pt 2. – P.315-323.

203. Thomas, A. Isolation of mycoplasma species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium / A. Thomas, H. Ball, I. Dizier, A. Trolin, C. Bell, J. Mainil, A. Linden // *Vet Rec.* – 2002. – V.151, N.16. – P.472-476.
204. Tramuta, C. Development of a set of multiplex standard polymerase chain reaction assays for the identification of infectious agents from aborted bovine clinical samples / C. Tramuta, D. Lacerenza, S. Zoppi, M. Gorla, A. Dondo, E. Ferroglio, P. Nebbia, S. Rosati // *J Vet Diagn Invest.* – 2011. – V.23, N.4. – P.657-664.
205. Tully, G. J. *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*: Diagnostic Procedures / J.G. Tully, S. Razin // Cambridge: Elsevier. – 1996. – 466 p.
206. *Ureaplasma diversum* (Code: UreDiv) // <http://www.geneticpcr.com/index.php/en/pathogen-r-d-qpcr/ureaplasma-diversum>
207. *Ureaplasma* Vaccine and Antibodies // Patent US20160175418A1, 2012 / Weisman L., Kong L. – URL: <http://www.freepatentsonline.com/y2016/0175418.html>.
208. *Ureaplasma* vaccine and antibody for prevention and treatment of human, animal and cell culture infection // Patent US9241983B2, 2012 / Weisman L., Kong L. – URL: <https://patents.google.com/patent/WO2012149525A2>.
209. Vasconcellos, C.M. Detection of *Ureaplasma diversum* in cattle using a newly developed PCR-based detection assay / C.M. Vasconcellos, A. Blanchard, S. Ferris, R. Verlengia, J. Timenetsky, R.A. Florio Da Cunha // *Vet Microbiol.* – 2000. – V.72, N.3-4. – P. 241-250.
210. Virakul, P. Genital tract lesions and the isolation of *Ureaplasma diversum* from the reproductive tract of normal and repeat breeding dairy

- cows / P. Virakul, K. Hongyantarachai, K. Mahaviroon, S. Ngarmkum, P. Suwannaphirom, V. Krasaesinthugomol, A. Harintharanont, S. Prasithphol, P. Ampawanwong, J. Suwimonteerabutr, // *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. – 2001. – V.31, N.4. – P.33-40.
211. Větrovský, T. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses / T. Větrovský, P. Baldrian // *PLoS One*. – 2013. – V.8, N.2. – e57923.
212. Voltarelli D.C., A nested-PCR strategy for molecular diagnosis of mollicutes in uncultured biological samples from cows with vulvovaginitis / D.C. Voltarelli, B.K. de Alcântara, M. Lunardi, A.F. Alfieri, R. de Arruda Leme, A.A. Alfieri // *Anim Reprod Sci*. – 2018. – V.188. – P. 137-143.
213. Weston, J.F. Clinical Forum - Investigation of Bovine Abortion / J.F. Weston, R. Murray, S. Borsberry // *Livestock (Electronic)*. – 2012. – V. 17, N. 5. – P. 15-24.
214. Williams, L.E. Unprecedented loss of ammonia assimilation capability in a urease-encoding bacterial mutualist / L.E. Williams, J.J. Wernegreen // *BMC Genomics*. – 2010. – V.11, N.687.– URL: : <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-11-687>.
215. Willoughby, J.J. Isolation and detection of urease genes in *Ureaplasma urealyticum* / J.J. Willoughby, W.C. Russell, D. Thirkell, M.G. Burdon // *Infect Immun*. – 1991. – V.59, N.7. – P.2463-2469.
216. Wu, H.N. Complete Genome Sequence of *Ureaplasma parvum* Serovar 3 Strain SV3F4, Isolated in Japan / H.N. Wu, Y. Nakura, D. Motooka, S. Nakamura, F. Nishiumi, S. Ishino, Y. Kawai, T. Tanaka, M. Takeuchi, M. Nakayama, T. Fujita, I. Yanagihara // *Genome Announc*. – 2014. – V.2, N.3. – e00256-14.

217. Xiao, L. Suppression of antimicrobial peptide expression by ureaplasma species / L. Xiao, D.M. Crabb, Y. Dai, Y. Chen, K.B. Waites, T.P. Atkinson // *Infect Immun.* – 2014. – V.82, N.4. – P.1657-1665.

