

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»

на правах рукописи

ОРЛОВА Светлана Тихоновна

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ОБНАРУЖЕНИЯ
МИКОПЛАЗМ У СОБАК И КОШЕК**

06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор ветеринарных наук, профессор
Сидорчук Александр Андреевич

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

1 ВВЕДЕНИЕ.....	4
2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
2.1 Общая характеристика микоплазм.....	11
2.2 Микоплазменные инфекции у собак.....	19
2.2.1 Поражения отдельных органов или систем органов традиционной для микоплазм локализации у собак.....	19
2.2.2 Проникновение микоплазм в нетрадиционные места у собак.....	26
2.3 Микоплазменные инфекции у кошек.....	28
2.3.1 Поражения отдельных органов или систем органов традиционной для микоплазм локализации у кошек.....	29
2.3.2 Проникновение микоплазм в нетрадиционные места у кошек.....	32
2.4 Лечение микоплазменной инфекции у собак и кошек.....	33
2.5 Диагностика и контроль лечения микоплазмозов.....	35
2.5.1 Серологические методы в диагностике микоплазмозов.....	36
2.5.2 Использование ПЦР для диагностики и контроля лечения.....	37
2.5.3 Использование бактериологического исследования для диагностики и контроля лечения.....	38
2.5.4 Особенности культивирования микоплазм.....	39
2.5.5 Типирование полученных клонов (чистых культур) микоплазм.....	41
3 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
3.1 Материалы и методы исследований.....	45
3.1.1 Реактивы и расходные материалы.....	46
3.1.2 Приборы и оборудование.....	48
3.1.3 Приготовление используемых вариантов среды, включая разные модификации среды для взятия образцов биоматериала.....	49
3.1.4 Комбинации (наборы) из разных вариантов питательной среды для посева 1 образца.....	52
3.1.5 Отбор проб.....	52
3.1.6 Проведение посевов и слепых пассажей.....	57

3.1.7 Клонирование и пересев (пассирование) полученных изолятов (смешанных культур) и клонов (чистых культур).....	59
3.1.8 Очистка культур микоплазм от посторонней микрофлоры.....	59
3.1.9 Хранение полученных изолятов и клонов микоплазм.....	60
3.1.10 Проведение ПЦР для смывов со слизистых оболочек и для культур.....	60
3.1.11 Молекулярно-генетическая идентификация клонов.....	60
3.1.12 Рутинная ПЦР для выявления микроорганизмов рода <i>Ureaplasma</i>	62
3.2 Результаты исследований.....	63
3.2.1 Оптимизация и стандартизация состава культуральных сред.....	63
3.2.2 Отбор наиболее удобных для работы вариантов среды. Снижение числа ПЕ для посева 1 образца до 10,5 (включая слепые пассажи).....	65
3.2.3 Выбор оптимального места взятия проб из верхнего респираторного тракта у кошек и собак.....	76
3.2.4 Подбор оптимальной схемы посева патологического материала от собак и кошек для выявления микоплазм.....	77
3.2.5 Подбор оптимальной комбинации антибиотиков в составе среды для взятия образцов биоматериала у собак и кошек.....	83
3.2.6 Оптимизация взятия патологического материала у собак и кошек для выявления микоплазм.....	90
3.2.7 Оптимизация клонирования и молекулярно-генетического типирования микоплазм собак и кошек.....	92
3.2.8 Исследование способности микоплазм собак и кошек адаптироваться к используемым питательным средам в серии последовательных пассажей.....	98
3.2.9 Оптимизация хранения микоплазм собак и кошек.....	102
3.3 Обсуждение результатов.....	104
4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	114
5 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	117
6 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	118
7 ПРИЛОЖЕНИЯ.....	139

1 ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Микоплазменная инфекция долгие годы привлекает пристальное внимание ветеринарных врачей. Регулярно появляющиеся в периодической печати статьи и обзоры свидетельствуют о том, что для большинства видов животных, так же как и для человека, в этой области остается много неясных или даже спорных вопросов [2, 3, 50, 62; 97, 111, 114, 133, 141, 162, 171, 180, 194, 205].

Одна из главных причин заключается в том, что большинство микоплазм причисляют к комменсалам, то есть нормальным обитателям слизистых оболочек. Соответственно, большинство болезней, которые вызывают микоплазмы, — факторно-инфекционные или просто факториальные. Диагностика микоплазмозов и контроль их лечения осложнены присутствием возбудителя на слизистых оболочках не только у больных, но и у значительной части здоровых особей.

Другой важной причиной является сложность выявления и типирования микоплазм. Среди лабораторных методов для диагностики микоплазмозов собак и кошек используют серологическое исследование крови на наличие антител к микоплазмам, ПЦР для обнаружения ДНК микоплазм в смывах со слизистых оболочек либо в различных органах и тканях, а также бактериологическое исследование. Использование серологических тестов затруднено большим числом видов микоплазм, паразитирующих на слизистых оболочках, а также отсутствием четкого понимания, какие из этих видов следует считать «более патогенными». ПЦР-диагностика получила широкое применение в последние годы, однако она не позволяет оценить жизнеспособность микроба, что может быть особенно важно для контроля лечения. Бактериологическое исследование, напротив, позволяет выявлять только жизнеспособные микоплазмы, обладая при этом и другими преимуществами. Оно позволяет сконцентрировать генетический материал микоплазм для молекулярно-генетических исследований за счет их роста на селективных питательных средах, клонировать изоляты при смешанном микоплазменном носительстве для дальнейшего определения видовой

принадлежности отдельных полученных клонов (чистых культур), а также определять чувствительность выделенных культур к антибиотикам.

Перспективным является совместное применение культивирования и молекулярно-генетических методов. Такая тактика постепенно приобретает популярность в гуманной медицине, при этом показано, что одновременное использование культивирования и ПЦР позволяет идентифицировать этиологический агент у бóльшего количества пациентов [89, 204]. Упрощение техники культивирования микоплазм и разработка комбинированных методик их обнаружения, базирующихся на достижениях нескольких отраслей лабораторной диагностики, являются актуальными задачами ветеринарной инфектологии.

Степень разработанности темы исследования. Известны способы изоляции и культивирования микоплазм животных на искусственных питательных средах. Большинство питательных сред содержит 3 базовых компонента: питательную основу (мясные отвары или ферментативные перевары животных тканей), сыворотку крови, а также дрожжевой экстракт. Кроме них среды обычно включают небольшие количества разнообразных добавок.

Примерами сред для выделения микоплазм от различных животных и человека являются питательная среда Эдвардса (на основе экстракта сердечной мышцы крупного рогатого скота и пептона с лошадиной сывороткой крови и дрожжевым экстрактом); питательная среда УНИИЭВ (из триптического гидролизата); питательная среда Мортонна (на основе экстракта бычьего сердца и бактопептона); среда Хейфлика (являющаяся модификацией среды Мортонна посредством добавления лошадиной сыворотки и дрожжевого экстракта) [12, 21].

Первую методику культивирования микоплазм собак, получившую широкую известность, разработал S. Rosendal в 1973 году [182]. Предложенные им варианты среды также содержали в качестве базовых компонентов сердечный или сердечно-мозговой экстракт, сыворотку крови лошади и дрожжевой экстракт. В качестве энергетической добавки S. Rosendal использовал только глюкозу. Модификация методики S. Rosendal была предложена M. Ogata [163]. Она предусматривает выделение и идентификацию микоплазм с конъюнктивы, из респираторного и

урогенитального трактов не только собак, но и кошек. Разные варианты среды на основе сердечного экстракта или бульона для PPL0 с добавлением сыворотки крови лошади и дрожжевого экстракта включают у М. Ogata одну из 3 энергетических добавок – кроме глюкозы он использовал аргинин и мочевины.

Недостатками этих методик являются трудность стандартизации питательного состава; сложность учёта результатов из-за отсутствия свойственного только микоплазмам характера роста на применяемых жидких средах или полужидких средах с низким содержанием агара (0,07-0,08 %); использование большого количества посевов для каждого образца; необходимость многократных пересевов и слепых пассажей. Кроме того, селективность описанных сред снизилась, так как многие бактерии приобрели устойчивость к входящему в их состав антибиотику бензилпенициллину.

Целью диссертационной работы стала разработка комплексного метода выявления микоплазм в образцах биоматериала от собак и кошек путём сочетания бактериологических и молекулярно-генетических методов. Для достижения цели были поставлены **задачи**:

1. Упростить методику культивирования микоплазм собак и кошек с целью снижения трудоемкости при сохранении приемлемой чувствительности. Для этого стандартизировать состав нескольких вариантов среды и подобрать их оптимальную комбинацию, пригодную для роста большинства видов микоплазм. Выбрать более современные антибиотики для повышения селективности методики.

2. Дополнить полученную методику культивирования избирательным ПЦР-анализом для подтверждения наличия или отсутствия роста микоплазм на разных вариантах среды в сомнительных случаях.

3. Провести сравнительную оценку чувствительности и специфичности отдельного использования культивирования и ПЦР-анализа и их совместного применения в виде комплексного метода.

4. Оптимизировать остальные этапы культуральных работ с микоплазмами – пробоотбор, клонирование, идентификацию клонов, адаптацию выделенных изолятов и клонов путем пассирования и их хранение.

5. Провести выборочную видовую идентификацию выделенных из полевого материала микоплазм с использованием молекулярно-генетических методов для формирования их базовой коллекции.

Научная новизна исследований. Разработана надежная методика изоляции, обеспечивающая оптимальные условия для роста микоплазм разных родов и видов. Её ключевым элементом является посев каждого образца на набор из 5 вариантов среды. Установлено, что «подращивание» микоплазм перед проведением посева в среде для взятия образцов биоматериала, содержащей современные бактерицидные антибиотики амоксилав и/или цефепим, повышает селективность методики. Показано, что дополнение полученной методики избирательным ПЦР-анализом для подтверждения наличия или отсутствия роста микоплазм на отдельных вариантах среды (в сомнительных случаях) повышает её чувствительность.

Впервые предложен способ деконтаминации культур микоплазм непосредственно в процессе клонирования. С использованием метода ПЦР показано, что однократного клонирования бывает достаточно для разделения микоплазм разных видов и их дальнейшей идентификации посредством секвенирования. С помощью молекулярно-генетических методов установлено, что рост «ферментирующих» и «неферментирующих» видов микоплазм на той или иной среде определяется в большей степени её рН, чем содержащейся в среде энергетической добавкой.

Установлено, что при хранении в условиях умеренно отрицательных температур (–18 °С) часть жизнеспособных клеток микоплазм, выделенных от собак и кошек, сохраняется значительно дольше 12 месяцев.

Из респираторного тракта собак и кошек, а также из глаз кошек изолированы, клонированы, идентифицированы молекулярно-генетическими методами и частично биохимически охарактеризованы микоплазмы видов *Mycoplasma arginini*, *M. canis*, *M. felis*, *M. gateae*, *M. edwardii*, *M. maculosum*, *M. spumans*, *Ureaplasma*

felinum. Полученную коллекцию можно использовать для проведения дальнейших микробиологических и молекулярно-генетических исследований.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Усовершенствованная микробиологическая методика работы с микоплазмами и разработанный комплексный метод выявления микоплазм собак и кошек, который объединяет бактериологический посев и ПЦР-анализ, создают доступные условия для лабораторного исследования образцов биоматериала от собак и кошек на наличие микоплазм с научными или прикладными целями и могут успешно применяться в исследовательских и диагностических ветеринарных лабораториях. В настоящее время разработанные подходы применяются при исследовании поступающего биологического материала, а также при выполнении научно-исследовательской работы в ФГБУ «ВГНКИ».

На основании результатов исследований разработаны и утверждены Научно-методическим советом при ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина» (11.12.2018) Методические рекомендации «Пробоотбор и культивирование микоплазм, обитающих на конъюнктиве и слизистых оболочках верхнего респираторного тракта собак и кошек. Сравнительный анализ чувствительности бактериологического метода и метода ПЦР». Подана заявка на патент РФ на изобретение «Набор сред для визуального выявления представителей класса Mollicutes в образцах с конъюнктивы и из респираторного тракта собак и кошек, способ изоляции и культивирования микоплазм, ахлеплазм и уреаплазм от собак и кошек» (номер заявки 2019110925, дата поступления 11.04.2019). Результаты используются при проведении занятий по дисциплинам «микробиология», «эпизоотология и инфекционные болезни», а также в рамках программ повышения квалификации ветеринарных специалистов.

Методология и методы исследования. Методологическим подходом в достижении цели и решении поставленных задач явилось системное изучение объектов исследования, анализ и обобщение литературных данных и полученных собственных результатов. Объектами исследования были избраны микоплазмы собак и кошек – представители класса Mollicutes разных родов и видов. Предметом

исследования стало усовершенствование способов их индикации и идентификации, включающих пробоотбор, культивирование, клонирование, секвенирование и хранение.

Отбор образцов биоматериала для бактериологических и молекулярно-генетических исследований проводили у собак и кошек разных пород, возрастных групп и клинического статуса. При выполнении диссертационной работы использовали эпизоотологические, клинические, микробиологические, молекулярно-генетические и статистические методы исследований.

Степень достоверности и апробация результатов исследований. Достоверность исследований подтверждается сопоставимостью результатов, полученных микробиологическими и молекулярно-генетическими методами, использованными в параллельном режиме, проведением экспериментов на достаточном количестве животных, статистической обработкой данных. Выводы и рекомендации логически вытекают из результатов. Поставленные цели и задачи полностью реализованы.

Результаты выполненной работы вошли в ежегодные отчеты по НИР кафедры эпизоотологии и организации ветдела за 2015-2018 гг. Они доложены на семинаре «Визуальная диагностика и терапия мелких домашних животных» и в рамках курса лекций «Общая терапия МДЖ» (Клиника экспериментальной терапии НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н. Блохина» РАМН, Ветеринарная клиника ООО «Биоконтроль»; Москва, 2012 и 2016 гг.); на международной учебно-методической и научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии и биотехнологии», посвященной 100-летию со дня основания ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина» (Москва, 2019 г.).

По теме диссертации опубликовано 8 научных статей, из них 7 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ; изданы 1 методические рекомендации; подана 1 заявка на патент РФ на изобретение.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований, заключение, список сокращений, список литературы и приложения. Она иллюстрирована 12 таблицами и 19 рисунками. Список использованной литературы включает 246 источников, в том числе 23 – отечественных и 223 – иностранных авторов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Стандартизированный состав 9 вариантов среды для культивирования микоплазм собак и кошек.
2. Комбинация (набор) из 5 вариантов среды, оптимальная для роста большинства видов микоплазм, выделяемых с конъюнктивы и из респираторного тракта собак и кошек.
3. Модификация среды для взятия образцов биоматериала посредством введения в её состав современных бактерицидных антибиотиков амоксиклава и/или цефепима.
4. Методика изоляции и культивирования микоплазм собак и кошек с использованием предложенной комбинации (набора) из 5 вариантов среды и модифицированной среды для взятия образцов биоматериала.
5. Комплексный метод выявления микоплазм, объединяющий бактериологические и молекулярно-генетические методы.
6. Оптимизация отбора проб из респираторного тракта и с конъюнктивы собак и кошек.
7. Оптимизация клонирования выделенных изолятов и секвенирования полученных клонов. Использование промежуточного ПЦР-контроля для того чтобы определить, какое из повторений в серии последовательных клонирований является достаточным.
8. Оптимизация сохранения полученных изолятов и клонов.

2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 Общая характеристика микоплазм

О микоплазмах принято говорить как о самых маленьких способных к самовоспроизведению бактериях [38]. Основной отличительной чертой микоплазм является отсутствие клеточной стенки: их клетка окружена только плазматической мембраной. Маленький размер и отсутствие клеточной стенки делают микоплазмы настолько пластичными, что они способны проходить через бактериальные фильтры. По этой причине, впервые столкнувшись с микоплазмами при попытке выяснить природу контагиозной плевропневмонии крупного рогатого скота в конце XIX века, исследователи приняли их за вирусы. Но когда выяснилось, что микоплазмы (в отличие от вирусов) могут расти на обогащенных бесклеточных питательных средах, содержащих сыворотку крови, их причислили к бактериям. Некоторое время спустя установили, что большинство бактерий под воздействием определённых физических, химических или биологических факторов могут терять клеточную стенку полностью или частично. Так влияет на бактерии действие некоторых ферментов (например, лизоцима) или β -лактамных антибиотиков (таких, как пенициллины). После восстановления благоприятных условий восстанавливается обычно и их клеточная стенка. Английская исследовательница Эмми Кляйнебергер-Нобель, сделавшая это открытие в 1935 году, назвала бактерии, утратившие клеточную стенку из-за неблагоприятных условий, L-формами бактерий в честь Листеровского института в Лондоне, где она работала. Поскольку L-формы бактерий также способны проходить через бактериальные фильтры, микоплазм причислили к ним. И лишь серьёзное изучение структуры ДНК окончательно подтвердило их самостоятельный таксономический статус. Выяснилось, что у микоплазм в геноме нет генов, отвечающих за синтез клеточной стенки, поэтому они не могут ею обзавестись ни при каких условиях [1].

Открытие новых и новых представителей этой группы бактерий побудило к усложнению их систематики и разделению первоначального рода. Форма клетки микоплазм из-за отсутствия клеточной стенки может быть разной, поэтому оказалось практически невозможно использовать морфологический критерий при

распределении по родам. Одни только спироплазмы были выделены в самостоятельный таксон по спиралевидной форме их клетки.

В основном имеющаяся классификация базируется на биохимических свойствах: у ахолеплазм отсутствует потребность в холестерине; уреаплазмы способны гидролизовать мочевину; анаэроплазмы являются анаэробами. Весь же таксон получил название класс Mollicutes (от лат. *mollis* – мягкий и *cutis* – кожа). Такая классическая микробиологическая классификация одобрена Таксономическим комитетом при Международной организации микоплазмологов. Согласно ней, в классе Mollicutes сейчас насчитывается 9 родов: *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*, *Haloplasma* (таблица 1) [1, 29, 30, 168, 215]. Всех молликут до сих пор принято при этом называть просто «микоплазмами» по названию сохранившегося в классе изначального рода *Mycoplasma*, что вносит некоторую путаницу. Для млекопитающих (включая человека) имеют значение 3 из 9 родов – *Mycoplasma*, *Ureaplasma* и *Acholeplasma*, которые выделены в таблице 1 жирным шрифтом. Их основное место обитания – слизистые оболочки респираторного и урогенитального трактов, эпителий глаз, пищеварительного тракта, молочных желез и суставов.

Таблица 1 – Таксономия микоплазм

Источник: Борхсениус С.Н. и др., 2002 [1], с дополнениями автора.

Класс	Порядок	Семейство	Род
Mollicutes	Acholeplasmatales	Acholeplasmataceae	Acholeplasma
	Mycoplasmatales	Mycoplasmataceae	Mycoplasma Ureaplasma
	Entomoplasmatales	Entomoplasmataceae	Entomoplasma Mesoplasma
		Spiroplasmataceae	Spiroplasma
	Anaeroplasmatales	Anaeroplasmataceae	Anaeroplasma Asteroplasma
	Haloplasmatales	Haloplasmataceae	Haloplasma ¹

¹ Добавлено по [29, 30, 168].

Более современным средством для распределения по родам является филогенетический подход, то есть установление родства между организмами на основании наименьших расхождений в первичной структуре их геномов. Современная молекулярная систематика живых организмов основана на строении (первичной структуре) генов, кодирующих рРНК [1]. Обоснованием такого выбора послужили присутствие и высокий консерватизм структуры молекул рРНК во всех видах микроорганизмов, митохондриях и хлоропластах, а также легкость в определении нуклеотидных последовательностей этой области даже у некультивируемых бактерий [238]. Горизонтальный перенос генов рРНК считается маловероятным, поэтому эволюция рРНК должна соответствовать истории видообразования [165]. По решению Таксономического комитета при Международной организации микоплазмалогов основным критерием для описания новых видов Mollicutes среди генов, кодирующих рРНК, стала нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК [113]. Нуклеотидную последовательность межгенного пространства 16S/23S рРНК (которую называют также интергенным районом 16S/23S рРНК или спейсерными участками между генами 16S и 23S рРНК) тоже можно использовать для этой цели [203].

Основанная на филогенетическом подходе классификация микоплазм хотя и более современна, но менее удобна, поэтому не является общепризнанной. По ней всех микоплазм делят на 5 основных групп: Anaeroplasma, Asteroplasma, Hominis, Pneumoniae, Spiroplasma; а группу Hominis в свою очередь делят на 8 кластеров: *Mycoplasma bovis*, *M. equigenitalium*, *M. hominis*, *M. lipophilum*, *M. neurolyticum*, *M. pulmonis*, *M. sualvi*, *M. synoviae* [65, 118].

В настоящее время благодаря филогенетическому анализу к микоплазмам отнесли риккетсии родов *Haemobartonella* и *Eperythrozoon*, которые иногда становятся причиной инфекционных анемий у разных видов млекопитающих. Они имеют с традиционными микоплазмами много сходных черт, хотя паразитируют на эритроцитах, а не на клетках эпителия. Поэтому для них создали отдельный таксон «Гемотрофные микоплазмы» [6, 150, 158-161, 178, 231], а традиционных микоплазм стали называть «Негемотрофными микоплазмами». На рисунках 1 и 2

изображены типичные представители негемотрофных и гемоторофных микоплазм при сканирующей электронной микроскопии – это негемотрофная *Mycoplasma hyopneumoniae* на ресничках эпителия трахеи поросят и гемотрофная *Mycoplasma ovis comb. nov.* (ранее *Eperythrozoon ovis*) на эритроците овцы. Как видно из приведенного примера, название вида гемотрофных микоплазм, к сожалению, не всегда содержит указание на их принадлежность к таксону в виде приставки *haemo-* (как например, у *Mycoplasma haemofelis* или *Mycoplasma haemocanis*), и это тоже делает систематику микоплазм немного запутанной.

В настоящее время открыли более 200 представителей класса Mollicutes, причем считается, что это только меньшая его часть [1, 228], и сообщения о новых видах продолжают регулярно появляться в печати. Так, первый задокументированный случай выделения микоплазм у собак описан в 1934 году [202]. С тех пор прошло более 80 лет и опубликовано свыше 100 работ, посвящённых этой тематике. Однако даже у этих достаточно подробно изученных животных до сих пор продолжают выделять новые виды микоплазм [207]. Тем более это касается диких и экзотических видов животных [28, 52-56, 76, 88, 106, 123, 144, 154, 210, 226, 243, 244].

подавляющее большинство молликут – факультативные паразиты или комменсалы животных или растений. Однако в зависимости от вида разные представители родов *Mycoplasma* и *Acholeplasma* всё-таки сохранили способность выживать в окружающей среде от недели до нескольких месяцев [156].

Микоплазмы широко представлены в природе и паразитируют на всевозможных объектах – растениях, насекомых, моллюсках, рыбах, земноводных, рептилиях, птицах, млекопитающих (включая человека) [18, 19, 73, 114]. Масштабы их распространения доказывает факт, что с представителями класса Mollicutes связаны более 600 известных заболеваний растений 96 семейств [1].

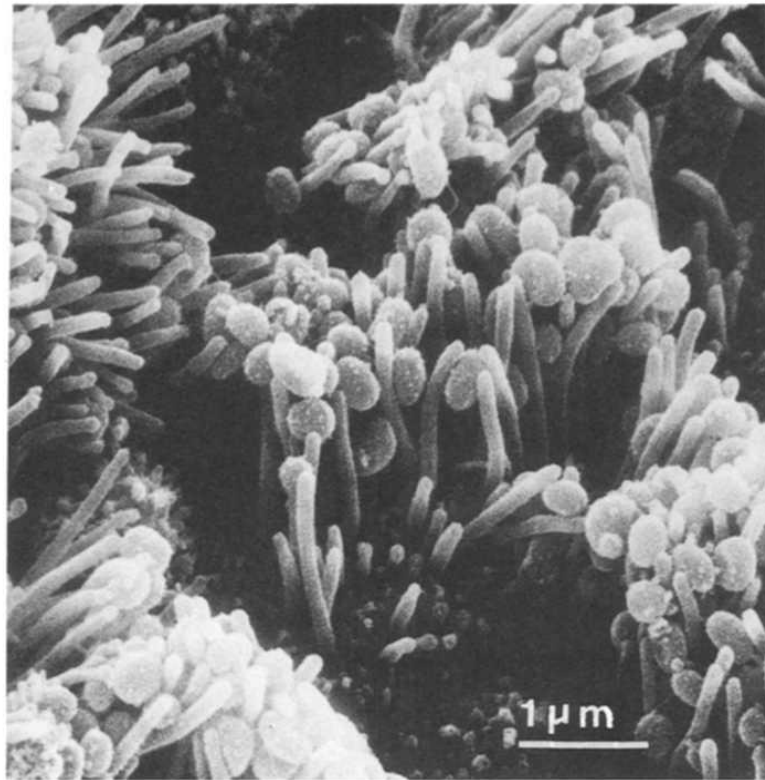


Рисунок 1 – Сканирующая электронная микроскопия трахеи поросят через 2 недели после инокуляции *Mycoplasma hyorhynchiae*. В данном случае микоплазмы тесно связаны с верхней частью ресничек, но некоторые виды могут крепиться к ресничкам около их основания, 1 μм.
 Источник: Blanchard B. et al., 1992 [48]

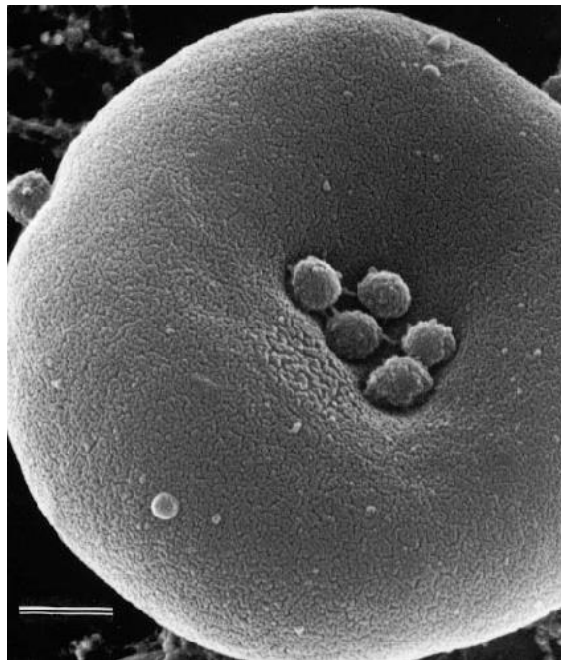


Рисунок 2 – *Mycoplasma ovis* на эритроцитах естественно инфицированной овцы (сканирующая электронная микроскопия), 0,5 μм. Источник: Neimark H. et al., 2004 [161]

Обычным местом обитания микоплазм является поверхность клеток организма-хозяина (это не внутриклеточные паразиты). Поверхностные мембраны клетки микоплазмы и клетки организма-хозяина устроены почти одинаково, благодаря чему между ними возможен очень тесный мембранный контакт: мембраны практически сливаются или «растворяются» друг в друге. Это облегчает транспорт необходимых для клетки микоплазмы соединений из цитоплазмы клетки хозяина, и ей не нужно самой их синтезировать. Благодаря такой тесной связи мембран микоплазм иногда называют «мембранными паразитами» [1].

Способность обитать внутри клетки бесспорно доказана для представителей рода *Spiroplasma*. Представителей рода *Mycoplasma* поначалу обнаруживали при электронной микроскопии ультратонких срезов тканей млекопитающих только внутри клеток, обладающих фагоцитарной активностью, поэтому их внутриклеточную локализацию долгое время связывали с фагоцитозом. Сейчас достоверно установлено, что несколько видов рода *Mycoplasma* тоже могут проникать внутрь клетки: *Mycoplasma fermentans* обнаружили в различных клетках, не являющихся фагоцитами, у больных СПИДом людей; у *M. penetrans* открыли и детально изучили специальный аппарат инвазии, благодаря которому она способна проникать в человеческие клетки различных типов; установили, что *M. genitalium* и *M. pneumoniae* проникают внутрь культивируемых клеток человека *in vitro*. Но оставалось неясным, размножаются ли представители этих 4 видов микоплазм внутри клетки-хозяина [1]. Позднее были описаны внутриклеточные рост и репликация *in vitro* для *M. pneumoniae*, однако характер течения этих процессов во время естественного инфицирования человека данной микоплазмой так и не был достоверно установлен [228]. Полногеномное секвенирование *M. pneumoniae* косвенно подтверждает соответствие её генома жизненному циклу внутриклеточного организма [148]. Данная черта, присутствующая у отдельных видов микоплазм человека, автоматически переносится в некоторых ветеринарных публикациях на всех представителей рода *Mycoplasma* [177]. Трудно сказать, насколько это обоснованно.

Исходя из имеющихся на сегодняшний день данных можно предположить, что микоплазмы занимают уникальную эволюционную нишу, фактически являясь промежуточной формой между внеклеточными и внутриклеточными бактериями. Они почти лишились способности жить без клетки-хозяина, из которой получают многие необходимые им вещества в готовом виде [38]. Благодаря длительному паразитированию геном микоплазм редуцировался, и они утратили способность синтезировать эти вещества самостоятельно.

Только для нескольких видов микоплазм были получены доказательства патогенности на основе постулатов Генле-Коха, однако примерно 1/3 в той или иной степени патогенна для своих хозяев в естественных и экспериментальных условиях [1]. Как правило, при нормальном иммунном ответе хозяина такие микоплазмы ведут себя как комменсалы. Но при возникновении у него иммуносупрессии они могут перейти к массовому размножению и вызвать развитие патологических процессов, становясь причиной так называемой оппортунистической инфекции. Нередко провоцирующим фактором становится другое бактериальное или вирусное заражение.

Имея сродство к эпителиальным тканям, широко распространенным в организме (слизистые оболочки респираторного и урогенитального трактов, эпителий глаз, пищеварительного тракта, молочных желез и суставов), микоплазмы могут населять многие органы. Поэтому спектр возможных патологий широк: это респираторные и урогенитальные микоплазмозы, микоплазменные конъюнктивиты (в более глубоких поражениях глаз микоплазмы замечены не были), маститы и артриты. Если же микоплазмы попадают в кровь (обычно вследствие глубокого повреждения слизистых оболочек), они могут обсеменять любые внутренние органы вплоть до головного мозга [44, 112].

Чуть меньше половины известных микоплазм выделяется обычно от 1 хозяина, примерно столько же – от нескольких (2-5), и лишь отдельным видам присущ широкий спектр хозяев [1]. В целом у большинства видов домашних животных (как и у человека) имеется по 15-20 видов микоплазм, выделяемых как от больных, так и от здоровых представителей вида и, по-видимому, являющихся

частью нормофлоры слизистых оболочек. Кошки и собаки не являются исключением. На их слизистых оболочках встречается по 16 видов из класса Mollicutes (в основном, представители рода *Mycoplasma*), 8 из которых – общие. Видами, которые были хотя бы однократно обнаружены у кошек, являются: *Acholeplasma laidlawii*; *Mycoplasma arginini*; *M. arthritidis*; *M. canadense*; *M. canis*; *M. cynos*; *M. feliminutum*; *M. felis*; *M. gallisepticum*; *M. gateae*; *M. hyopharyngis*; *M. lipophilum*; *M. pulmonis*; *M. spumans*; *Ureaplasma cati*; *U. felinum* [95]. Для собак на сегодняшний день подтверждено выделение: *Acholeplasma laidlawii*; *Mycoplasma arginini*; *M. bovis genitalium*; *M. canis*; *M. cynos*; *M. edwardii*; *M. feliminutum*; *M. felis*; *M. gateae*; *M. maculosum*; *M. molare*; *M. opalescens*; *M. spumans*; *Mycoplasma* sp. HRC 689; *Mycoplasma* sp. VJC 358; *Ureaplasma canigenitalium* [67]. Скорее всего, этот список неполный, так как при обнаружении у кошки или собаки представителей класса Mollicutes видовая идентификация проводилась далеко не всегда из-за сложности их типирования (см. пункт 2.5.5).

Чаще всего каждое индивидуальное животное является носителем нескольких видов микоплазм. Поэтому при развитии оппортунистической инфекции бывает трудно определить, какие виды микоплазм следует считать «более патогенными» для данного вида животных. Но даже если «более патогенные» виды известны, их обнаружение при отсутствии клинических признаков болезни ни о чем не говорит. Для респираторного тракта собак на сегодняшний день принято считать более патогенной *M. cynos*, а для их урогенитального тракта – *M. canis*. *M. felis* часто выделяют с конъюнктивы кошек, больных конъюнктивитом, и из респираторного тракта здоровых кошек [163], поэтому её связывают с конъюнктивитами кошек [100] и говорят, что она, возможно, принимает у них участие и в развитии болезней респираторного тракта.

Подтверждением большей патогенности 3 перечисленных выше видов микоплазм явилось развитие клинических признаков болезни и/или патологоанатомических изменений соответствующих органов хотя бы у части экспериментально зараженных животных [95, 100, 187, 188, 190]. Иногда к кошачьим патогенам причисляют *M. gateae*, но обоснованием этого является

развитие у кошек артрита и теносиновита после её внутривенного введения [153]. Такой способ заражения не является естественным для микоплазм – обитателей слизистых оболочек. Когда микоплазмы оказываются по какой-либо причине в крови, практически все они могут расселяться по организму и обсеменять внутренние органы, вызывая у животного проблемы со здоровьем атипичной для них локализации. Поэтому распространять результаты внутривенного экспериментального заражения микоплазмами на респираторный тракт и конъюнктиву кошек не очень корректно.

Остаются малоизученными эффекты, возникающие при смешанном инфицировании разными видами микоплазм. Предполагают, что синергизм 2-3 их видов приводит к увеличению патогенных свойств. Например, в медицине человека установлено, что уреоплазма *U. urealyticum* в сочетании с микоплазмой *M. genitalium* оказывается гораздо более сильным инфекционным агентом, чем при моноинфекции урогенитального тракта [214]. Частота встречаемости комбинаций различных видов микоплазм у здоровых и больных собак и кошек пока не изучалась, поэтому влияние отдельных видов микоплазм друг на друга неизвестно.

2.2 Микоплазменные инфекции у собак

У собак микоплазмы связывают с респираторными болезнями, возможна также их причастность к болезням мочеполовой системы и желудочно-кишечного тракта. В редких случаях они могут вызывать болезни опорно-двигательного аппарата и нервной системы. В отличие от кошек, у собак микоплазмы не принято рассматривать в качестве причины абсцессов или болезней глаз [22, 95].

2.2.1 Поражения отдельных органов или систем органов традиционной для микоплазм локализации у собак

Респираторные болезни (болезни верхних дыхательных путей, трахеобронхит, бронхопневмония, пневмония, плеврит).

Микоплазмы привлекли внимание как возможные возбудители респираторных болезней у собак в связи с их способностью поражать респираторный тракт у широкого круга других животных и человека [96, 188].

Респираторные микоплазмы большинства видов животных протекают в мягкой форме, если только не осложняются более серьёзной вторичной инфекцией (а микоплазмы способны модулировать восприимчивость хозяина ко вторичной инфекции, воздействуя на его иммунную систему [124, 216]) или не отягощают смешанную инфекцию в качестве вторичного патогена сами [27, 71, 72, 216].

Поскольку у собак много инфекционных агентов, вызывающих респираторные болезни, и смешанное инфицирование обнаруживается достаточно часто, нелегко бывает достоверно установить, какие из них способны играть первичную роль. Могут ли микоплазмы быть первичным патогеном, пока до конца не ясно. Ситуация осложняется тем, что даже если именно микоплазмы инициировали болезнь, к моменту взятия патологического материала, то есть по прошествии некоторого времени после начала воспалительного процесса, они могут быть вытеснены вторичной бактериальной флорой [187]. Подтверждением этого являются статистические данные, согласно которым из верхнего респираторного тракта больных животных микоплазмы выделяли реже, чем от здоровых, примерно на 16 %, а из нижнего – на 4 % [173].

К сожалению, в большинстве ранних работ, посвящённых вовлечённости микоплазм в респираторные болезни собак, не определяли вид выделенных микоплазм, и зачастую не отслеживали присутствие других возможных возбудителей болезни [68, 115, 127, 232]. Первое всестороннее исследование присутствия у собак с респираторными болезнями *индивидуальных видов* микоплазм появилось 2004 году [66]. С этого момента видовая идентификация выделенных микоплазм проводилась уже достаточно часто. Тем не менее, даже на сегодняшний день опубликовано лишь несколько статей, в которых проведено как определение видов выделенных микоплазм, так и полное бактериологическое и вирусологическое обследование больных животных для выявления всех остальных возможных возбудителей болезни. А ведь для установления первичной или вторичной роли микоплазм необходимы именно такие исследования.

Из множества паразитирующих на слизистых оболочках собак видов микоплазм особое значение для собачьего респираторного тракта принято

придавать виду *M. cynos*. Причастность *M. cynos* к развитию у собак респираторных болезней была отмечена ещё в самых ранних статьях [181, 187, 188, 190] – даже типовой штамм *M. cynos* был выделен в 1971 году в Дании именно от собаки с пневмонией [183]. Публикации последних лет в целом подтверждают эти данные, но всё же не предоставляют однозначных доказательств её бóльшего патогенного потенциала [66, 109, 143, 191, 197].

Среди болезней верхнего респираторного тракта микоплазмы, вне всякого сомнения, могут участвовать в развитии инфекционного респираторного синдрома (ИРС), который раньше называли синдромом питомникового кашля или просто питомниковым кашлем. Старым своим названием болезнь обязана тому факту, что от неё страдает около 60 % собак, попавших на время отпуска владельцев в питомник или на постоянное проживание в приют [191].

Обычно ИРС рассматривают как смешанную инфекцию. Контрольное заражение вирусными и бактериальными агентами с синергетическим действием ведёт к развитию клинических признаков [128, 227]. Вирусными агентами могут быть вирус парагриппа собак (canine parainfluenza virus, **CPiV**), аденовирус собак типа 2 (canine adenovirus Type 2, **CAV-2**), вирус чумы собак (canine distemper virus, **CDV**) и герпесвирус собак (canine herpesvirus) [217]. Недавно к этому списку добавили также респираторный коронавирус собак (canine respiratory coronavirus, **CRCoV**) [81, 170]. Из этих вирусов наибольшую опасность представляет CDV, поскольку он может воздействовать на респираторный тракт не только напрямую, но и косвенно – вызывая иммуносупрессию и открывая путь вторичной бактериальной инфекции [78, 79, 136, 241].

Наиболее часто выделяемой при ИРС бактерией является *Bordetella bronchiseptica* [46, 145, 217]. Однако и саму бактерию, и антитела к ней обнаруживают не у всех собак с ИРС [63, 64, 221]. Иногда от больных ИРС собак выделяют β -гемолитические стрептококки (*Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*) [64]. Кроме того, некоторые исследователи подозревают в причастности к патогенезу ИРС бактерий рода *Bartonella*, поскольку *Bartonella vinsonii* связывается с возникновением у собак гранулематозного ринита [167], а сам род *Bartonella* – с

развитием у собак эпистаксиса [107]. Микоплазмы, и, в частности, *Mycoplasma cynos*, тоже значатся в списке возможных бактериальных возбудителей ИРС. Ряд исследований был нацелен на то, чтобы выяснить, играют ли микоплазмы роль первичного патогена или только осложняют болезнь, вызванную другими возбудителями, но окончательная ясность в данном вопросе не достигнута.

Пытаясь найти причину различных идиопатических болезней, требовательным при культивировании и трудно идентифицируемым микоплазмам стали уделять больше внимания в последние годы. Среди таких болезней верхнего респираторного тракта оказался идиопатический лимфоплазмоцитарный ринит (ЛПР) – хронический воспалительный ринит, который характеризуется лимфоплазмоцитарной инфильтрацией (пропитыванием лимфоцитами и плазматическими клетками) слизистой оболочки носовой полости при отсутствии явных этиологических причин [233, 234]. Проведённые исследования пока не позволяют прийти к окончательному заключению о том, играют ли микоплазмы какую-либо роль в патогенезе ЛПР [235].

Среди болезней нижнего респираторного тракта микоплазмы могут быть причастны к развитию у собак трахеобронхита, бронхопневмонии, пневмонии и плеврита. Из них наибольшее число публикаций посвящено микоплазменным пневмониям. О выделении микоплазм от собак со спонтанной пневмонией сообщали ещё во времена, когда изоляты микоплазм не были полностью охарактеризованы и их разделение на виды только начиналось [31, 32, 181].

Для человека и разных видов животных характерными признаками микоплазменных пневмоний являются периваскулярные и перибронхиальные лимфоидные инфильтраты, часто – инфильтраты в виде гранул, наличие интербронхиального лейкоцитарного экссудата, тромбоза сосудов или других расстройств кровообращения [9, 10, 16]. У собак патогномоничными изменениями при микоплазменной пневмонии считают перибронхиолярную лимфоидную гиперплазию и интерстициальное уплотнение [109]. Иногда у собак наблюдается небольшое повышение количества плевральной жидкости и увеличение средостенных лимфатических узлов [246], которые в 22 % случаев встречаются и у

детей с микоплазменной пневмонией [98]. *M. cynos* ответственна за некротическую составляющую пневмонии – она обычно обнаруживается в очагах некроза [70, 246].

По данным массовых статистических исследований микоплазмы оказывались единственным обнаруженным бактериальным патогеном примерно у 7-9 % собак с пневмонией [68, 115, 121, 173]. К сожалению, виды микоплазм в этих работах не идентифицировали, возможную вирусную составляющую инфекции не искали, и приём перед пробоотбором антибиотиков, способных устранить другую бактериальную флору, не отслеживали.

Среди описанных в литературе отдельных клинических случаев естественной пневмонии, фактически, имеется только один, когда микоплазмы достоверно были единственным обнаруженным патогеном, поскольку скрупулёзно проведённая диагностика позволила исключить смешанную инфекцию. Их типирование также было осуществлено и показало принадлежность выделенных микоплазм к виду *M. cynos* [246]. Этот случай доказывает, что *M. cynos* действительно может быть первичным патогеном при развитии пневмонии у собак. Единственным недостатком данной работы является проведение антибиотикотерапии амоксициллином перед отбором проб для бактериологического посева. Амоксициллин не действует на микоплазм, но мог исказить результаты бактериологического выявления других бактерий и замаскировать их присутствие. В другом описанном клиническом случае *M. cynos* выделили вместе с CDV и CAV-2, и установить, какой из этих патогенов был первичен при развитии пневмонии, оказалось невозможно [70].

Способность выступать в качестве вторичного патогена в развитии болезней нижнего респираторного тракта для микоплазм не оспаривается. Считается, что при снижении легочного клиренса за счёт другой вирусной или бактериальной инфекции микоплазмы, являющиеся частью нормофлоры, могут выходить за пределы верхнего респираторного тракта и инфицировать лёгкие или плевральную полость как вторичный оппортунистический патоген [95]. При этом подтверждено, что у собак с первичной цилиарной дискинезией (синдромом неподвижных ресничек) наблюдается хронический легочной микоплазмоз [47].

Болезни мочеполовой системы (бесплодие у кобелей, эпидидимоорхит, простатит, баланопостит, эндометрит, вагинит, нефрит, цистит, уретрит).

Положение дел в микоплазменной патологии урогенитального тракта и у человека, и у животных лучше всего описывается несколько претенциозным названием одной из публикаций: «Микоплазмы и бесплодие. Немного фактов, немного вымысла и масса неизвестного» [80].

Носительство микоплазм и уреаплазм у женщины во время беременности иногда предрасполагает к возникновению проблем со здоровьем ребёнка. С инфицированием микоплазмами и уреаплазмами при прохождении через колонизированный родовой канал матери или с эмбриональным инфицированием у неё в утробе связывают редкие случаи менингитов у новорожденных [105]. Если происходит колонизация нижних дыхательных путей плода уреаплазмой вида *Ureaplasma urealyticum*, возможны также мертворождение или развитие хронического заболевания легких у новорожденных детей очень малого веса [60]. Однако по последним данным рутинно обследовать на наличие микоплазм и уреаплазм и лечить выявленных взрослых людей-носителей, не имеющих клинических признаков со стороны урогенитального тракта, не следует [111]. Бессимптомное носительство этих бактерий является распространенным явлением, и у большинства людей они не вызывают никаких заболеваний в течение всей жизни. Вероятно, у собак дело обстоит примерно также.

Более вирулентной для мочеполового тракта собак принято считать *M. canis*. Этот вид микоплазм выделяли от собак с эндометритом, а экспериментальное заражение *M. canis* приводило к развитию хронических уретритов и эпидидимитов у 50 % самцов, а также к увеличению матки и эндометритам у самок [190]. Описаны единичные случаи выделения *M. canis* из предстательной железы, придатков семенников и стенок мочевого пузыря с хроническим воспалением [130]. Для выяснения роли *M. canis* в развитии половых инфекций и бесплодия нужны дальнейшие исследования. Особенно сложно установить её значение при инфицировании совместно с другими бактериями. Строгие доказательства того, что какие-либо другие виды микоплазм и уреаплазм причиняют вред этой системе

органов у собак, отсутствуют. Однако им принято приписывать участие в большом количестве патологий – бесплодии у кобелей, эпидидимоорхите, простатите, баланопостите, эндометрите, вагините, нефрите, цистите и уретрите [22].

У собак с бесплодием микоплазм нередко находят в смывах со слизистых оболочек влагалища или препуция, а также в сперме, но значение этих результатов неясно, поскольку у здоровых и плодовитых животных обоих полов присутствие микоплазм на препуции и во влагалище тоже встречается часто – до 67 % случаев [57, 129]. В массовом исследовании, проведённом на здоровых фертильных собаках и собаках с бесплодием или признаками генитальных болезней, статистически значимая разница в выявлении микоплазм и уреаплазм была получена только для бесплодных кобелей [77]. В другой похожей работе значимой разницы в наличии *Mycoplasma spp.* у бесплодных и здоровых собак не обнаружили [80].

Микоплазм, особенно *M. canis*, выделяли из полученной цистоцентезом мочи собак с инфекциями мочевыводящих путей [116, 222]. Источником микоплазм в мочевыводящих путях является обильная микрофлора нижнего мочевого тракта. Обструкция и застой мочи в мочеиспускательном канале способствуют восходящему инфицированию мочевыделительной системы. Причины, предрасполагающие к другим бактериальным инфекциям (опухоли, камни), могут предрасполагать и к оппортунистическим микоплазменным инфекциям.

Болезни желудочно-кишечного тракта (колит).

Предполагалось участие микоплазм вида *Mycoplasma sp. HRC 689* в развитии такой идиопатической болезни собак породы боксёр, как гранулематозный колит, но исследование с экспериментальным заражением этого не подтвердило. Введённый при заражении штамм микоплазм *Mycoplasma sp. HRC 689* вызывал изменения толстой кишки, характеризующиеся лимфоцитарной инфильтрацией слизистой оболочки, лимфоцитарным подслизистым периваскулитом и увеличением лимфоидных узелков толстой кишки, но клинические симптомы гранулематозного колита не развивались [51].

2.2.2 Проникновение микоплазм в нетрадиционные места у собак

Бактерии, входящие в состав нормальной микрофлоры, регулярно преодолевают защитный барьер слизистых оболочек, но блокируются силами врождённого иммунитета. То же самое происходит при инфицировании микоплазмами через укусы. У иммуносупрессивных особей иммунная система может не справиться с защитой, и микоплазмы выделяются в таких случаях из нетипичных мест – крови, суставов, паренхиматозных органов и даже головного мозга. В медицине человека после лечения иммунодепрессантами и при синдроме приобретённого иммунодефицита у людей из крови иногда выделяют микоплазмы и уреаплазмы, колонизирующие обычно уrogenитальный тракт. При гипогаммоглобулинемии уrogenитальные микоплазмы могут забрасываться в респираторный тракт и суставы, вызывая локальные и системные заболевания [90].

В ветеринарной практике тоже имеются подобные случаи. Первое сообщение о септицемии у щенков, вызванной «микроорганизмами с характеристиками микоплазм» опубликовано в 1964 году [59]. Обнаружить микоплазм в крови собак удаётся достаточно редко, но случаи их выделения из печени, селезёнки и почек указывают на гематогенное распространение [189].

Болезни опорно-двигательного аппарата (полиартрит).

В одной из относительно недавних статей описано выделение изолятов *Mycoplasma spp.* из образцов крови и из образца синовиальной жидкости 12-летней собаки через 6 дней после удаления двусторонней опухоли надпочечников [208]. Анализ ДНК выделенных изолятов позволил идентифицировать их как *Mycoplasma edwardii*. Источник микоплазменных септицемии и полиартрита у данной собаки не был установлен. Возможно, что диссеминация микоплазм в этом случае могла быть связана с профузными рвотой и поносом (острое воспаление стенки кишечника привело к увеличению её проницаемости и, как следствие, к бактериальной транслокации). Вероятно, развитию септического процесса способствовал также вызванный опухолью надпочечников гипернадпочечниковый синдром. Известно, что гипернадпочечниковый синдром приводит к иммуносупрессии из-за повышения содержания в крови стероидных гормонов, поэтому после

двусторонней адреналэктомии сепсис является возможным осложнением и описан, например, у кошек [82]. Другие редкие сообщения о выделении микоплазм *из синовиальной жидкости* собак тоже встречаются в литературе [37, 189].

Болезни нервной системы (менингоэнцефалит).

У человека род *Mycoplasma* связывают с развитием абсцессов головного мозга и менингитов у новорожденных [43, 74, 105, 169]. Хотя колонизация микроорганизмами рода *Mycoplasma* обычна для новорожденных, инвазивные болезни – редкость [105]. Менингиты связывают с инфицированием *Mycoplasma hominis* или *Ureaplasma urealyticum* при прохождении через колонизированный родовой канал или с эмбриональным инфицированием [60, 105].

У взрослых людей описаны такие нереспираторные проявления заражения *M. pneumoniae*, как менингит и поражения периферического отдела нервной системы, например, черепно-мозговых нервов. *M. pneumoniae* может осложнять течение менингитов, вызванных другими патогенами (стафилококками, вирусами), или являться самостоятельным агентом, приводящим к воспалению мозговых оболочек. При инфекции, вызванной *M. pneumoniae*, частота поражений нервной системы колеблется от 0,1 до 7 % [11].

У животных случаи поражения ЦНС микоплазмами тоже встречаются [180]. *Mycoplasma agalactiae* может быть ответственна за негнойный энцефалит у овец и коз, а также за атаксию у молодых животных [137]. *M. bovis* способна вызывать ряд гистопатологических повреждений в мозге телят и взрослых особей крупного рогатого скота, включая абсцессы и фибринозный менингит [34, 139, 140, 209]. *M. gallisepticum* и *M. synoviae* были выделены из мозга домашней птицы с энцефалитом и менингеальным васкулитом [61, 69, 155, 242]. В последние десятилетия микоплазмы часто выделяли из мозга морских млекопитающих, умирающих в большом количестве в Северном море, но их роль может быть вторичной по отношению к основному вызывающему болезнь вирусу [93]. Наконец, были получены свидетельства того, что некоторые представители рода *Spiroplasma* могут участвовать в развитии трансмиссивных губкообразных энцефалопатий [39-42]. Точный механизм проникновения микоплазм в мозг не

установлен, но многие из заболевших животных страдали перед поражением ЦНС отитами [140, 180]. Возможно, повреждение среднего и внутреннего уха приводит к проникновению микоплазм в мозг по черепным нервам [131].

Что касается собак, для них пока описан единственный случай гнойного и гистиоцитарного менингоэнцефалита, при котором из тканей мозга и мозговых оболочек были выделены микроорганизмы рода *Mycoplasma*, идентифицированные как вид *Mycoplasma edwardii* [112].

До конца не выяснено, причастны ли микоплазмы к развитию двух болезней ЦНС собак неизвестной этиологии – гранулематозного менингоэнцефаломиелита (ГМЭ) и некротизирующего менингоэнцефалита (НМЭ). Авторы посвящённого этой проблеме исследования тестировали ткани головного мозга собак, в том числе погибших от ГМЭ или НМЭ, на наличие большого количества вирусов методом ПЦР, а так же на наличие микоплазм методами ПЦР и бактериологического посева [36]. Хотя по данным бактериологического посева частота встречаемости *M. canis* в тканях головного мозга собак с ГМЭ (80 %) и НМЭ (50 %) оказалась выше, чем у собак контрольной группы (22 %), эти результаты не имели статистической значимости. По клиническим параметрам собаки, в тканях мозга которых обнаружили *M. canis* и/или другие виды микоплазм, тоже не отличались от остальных. Однако в целом проведённая экспериментальная работа показала удивительно частое выявление микоплазм (*M. canis*; *M. edwardii*; *M. spumans*) в головном мозге собак. Исследования в этом направлении продолжаются [152].

2.3 Микоплазменные инфекции у кошек

У кошек микоплазмы связывают с болезнями глаз и респираторными болезнями. В редких случаях они могут вызывать болезни опорно-двигательного аппарата и нервной системы, а также абсцессы кожи. Причастность микоплазм к болезням мочеполовой системы у кошек сомнительна [95].

2.3.1 Поражения отдельных органов или систем органов традиционной для микоплазм локализации у кошек

Респираторные болезни (ИРС, гнойный бронхит, бронхопневмония, пневмония, пиоторакс, абсцесс лёгкого).

Список возбудителей, связанных с острыми инфекционными респираторными болезнями кошек, не так широк, как у собак. Вирусными агентами могут быть герпесвирус кошек-1 (feline herpesvirus-1, **FHV-1**) и калицивирус кошек (feline calicivirus, **FCV**). Среди бактерий основными являются *Bordetella bronchiseptica*, *Chlamydia felis* (по старой систематике – *Chlamydophila felis* [192]), а также *Mycoplasma* spp. [175]. При этом у кошек ИРС тоже часто протекает с инфицированием сразу несколькими из этих патогенов.

Хотя исследования по выявлению частоты встречаемости микоплазм (наряду с другими возбудителями) у больных и здоровых кошек проводились неоднократно [35, 58, 83, 108, 224], они не дали однозначного ответа на вопрос могут ли микоплазмы быть первичным патогеном для кошачьего респираторного тракта. В настоящее время принято считать, что *Mycoplasma* spp. являются «потенциальным» первичным патогеном в заболеваниях дыхательных путей у этих животных [177]. По имеющимся на сегодняшний день данным, частота встречаемости микоплазм в верхнем респираторном тракте у здоровых кошек существенно ниже, чем у здоровых собак – носителями микоплазм являются не более 35 % кошек (тогда как среди собак число носителей близко к 100 %) [172, 173, 197]. В норме в нижнем респираторном тракте кошек микоплазм быть не должно (а у здоровых собак их выявляют вплоть до 25 % случаев) [66, 166, 172, 173]. У кошек же с респираторными болезнями частота встречаемости микоплазм повышается до 81 % в верхнем и 21 % в нижнем респираторном тракте [172, 224]. Поэтому обнаружение микоплазм в мазках из кошачьего респираторного тракта может иметь клиническое и диагностическое значение [95].

Не исключено, что участие микоплазм в развитии болезней нижнего респираторного тракта у кошек сильно недооценено, как до некоторого времени было и у человека, поскольку на обычных культуральных средах они растут редко

и для их выявления требуется дополнительная специфическая диагностика [228]. В одном из опубликованных сообщений более тщательное проведение лабораторного анализа позволило выявить микоплазм в образцах не у 21 % (как описано выше), а у 62 % кошек с инфекциями нижних дыхательных путей [85].

Как и у собак, при наличии способствующих этому факторов микоплазмы могут опускаться в нижние отделы респираторного тракта, вызывая гнойный бронхит или бронхопневмонию [49, 84, 219], но болезнь при этом обычно протекает тяжелее. Само это явление рассматривается как редкое. Кроме того, у кошек описаны единичные случаи участия микоплазм в развитии гнойного плеврита (пиоторакса) [99, 142, 239], а также один случай выделения микоплазм из абсцесса лёгкого, образовавшегося после получения животным ран в кошачьей драке [75]. Присутствие вирусов в респираторном тракте животных с этими патологиями не отслеживалось и типирование выделенных микоплазм не проводилось.

Кроме острых инфекционных респираторных болезней у кошек обсуждается причастность микоплазм к хроническим ринитам и риносинуситам, а также их участие в развитии астмы и хронического бронхита. Роль микоплазм в течении идиопатических ринитов и риносинуситов пока до конца не выяснена [120, 176]. О возможном участии в патогенезе астмы у человека инфекционных агентов, включая *M. pneumoniae*, говорят уже более 30 лет, и эта теория имеет в наши дни множество поклонников [13, 33, 122, 146, 230]. Но до сих пор до конца не ясно, может ли инфекция выступать в качестве пускового механизма, или она только осложняет течение уже возникшей болезни. Поскольку аллергическая сенсibilизация лёгких снижает легочной клиренс бактерий, она способствует хронической колонизации дыхательных путей *M. pneumoniae*, которая в свою очередь приводит к увеличению гиперреактивности дыхательных путей, замыкая патологический круг [228, 240].

Для кошек пока начаты только пионерские исследования в этой области и, вероятно, пройдет немало времени, прежде чем точно будет установлена роль микоплазм (в частности, *M. felis*) в патогенезе астмы и хронического бронхита у этого вида животных [86, 87, 134, 196].

Болезни глаз (конъюнктивиты).

Большая часть возбудителей, вызывающих у кошек болезни респираторного тракта, причастна и к развитию у них инфекционных конъюнктивитов – FHV-1, FCV, *C. felis*, а также *Mycoplasma* spp., в особенности *M. felis* [91, 92, 177, 201]. Поэтому ИРС и конъюнктивит у кошек часто сопутствуют друг другу. Считается, что при одновременном поражении глаз и респираторного тракта присутствие микоплазм может приводить к более тяжёлому течению болезни [35, 58]. Также от кошек с конъюнктивитом иногда выделяют β -гемолитические стрептококки [201].

Микоплазмы относительно редко выявляются в глазах здоровых кошек (не более, чем у 20 % животных) [83]. У кошек с конъюнктивитом они встречаются чаще (до 49 % случаев) со статистически значимой разницей [100, 104, 83, 138, 193].

Для кошачьих глаз среди разных видов микоплазм особое значение имеет *M. felis* – считается, что эта микоплазма может быть первичным агентом в развитии конъюнктивитов [95]. Частота её выделения у здоровых кошек и у кошек с конъюнктивитами заметно различается [83, 100].

Без лечения кошки с микоплазменным конъюнктивитом могут болеть достаточно долго (до 60 дней), но повреждения роговицы при этом не происходит. Однако от кошек со стромально-язвенным кератитом или кератомалацией иногда выделяли *M. felis* и *M. gateae*. Хотя микоплазмы не были первичным патогеном в этом случае, улучшение состояния наступило только после курса антимиоплазменного антибиотика [94].

Болезни мочеполовой системы.

Хотя участие микоплазм и уреоплазм в урогенитальных болезнях кошек предполагалось на начальных этапах их изучения [212], на сегодняшний день оно кажется сомнительным. *M. felis* и *M. gateae* не выживают при осмотических условиях кошачьей мочи, что делает представителей рода *Mycoplasma* маловероятной причиной болезней мочевыводящих путей у кошек. *Ureaplasma* spp. более устойчивы в этой среде, поэтому они более вероятные кандидаты. Однако выяснено, что и уреоплазмы не играют никакой роли в патогенезе цистита – в моче, взятой цистоцентезом у кошек с болезнями мочевыделительной системы и у

здоровых кошек группы контроля, микоплазм не было, а уреоплазмы встречались лишь у 2-3 % животных обеих групп [26, 199]. Доказательств причастности молликут к другим патологиям мочеполовой системы кошек тоже нет.

2.3.2 Проникновение микоплазм в нетрадиционные места у кошек

Даже безвредные для здоровых индивидуумов условно-патогенные микроорганизмы (в том числе микоплазмы) при попадании в органы и ткани, где их существование обычно исключено, могут вызывать эндогенные или экзогенные инфекции, причём иногда не только у пациентов с иммунодефицитом, но и у здоровых особей [1]. У кошек основным способом такого заброса микоплазм вглубь тканей являются укусы других кошек или собак [75, 229].

Абсцессы после укусов.

Согласно данным пилотного исследования, микоплазм выделяют из кошачьих абсцессов в 15 % случаев. Иногда для выздоровления таких животных требуется специфическая атимикоплазменная антибиотикотерапия [125, 218, 229].

Болезни опорно-двигательного аппарата (артрит/полиартрит, фиброзно-гнойный теносиновит).

Развитие артритов и полиартритов у кошек тоже нередко рассматривают как следствие укусов. Описаны 2 случая развития моноартрита с участием той же *M. felis* [135]. Другим изолированным из воспалённых суставов при микоплазменных полиартритах агентом является *M. gateae*. Артрит с участием *M. gateae* в 2 известных на сегодняшний день случаях носил эрозивный характер, и, кроме того, в одном из них сопровождался теносиновитом [153, 245]. Внутривенное введение выделенной от одной из больных кошек культуры микоплазмы *M. gateae* здоровым кошкам привело к развитию у всех заражённых животных хромоты [153].

Единственный случай развития микоплазменного полиартрита, не связанного с укусами, имел место у кошки с тяжёлой иммунной недостаточностью. Выделенный при этом вид микоплазм тоже был идентифицирован как *M. felis* [110].

Болезни нервной системы (гнойный менингоэнцефаломиелит).

Единственным описанным в литературе случаем является развитие менингоэнцефаломиелита у молодой кошки после отита [44]. Других бактериальных возбудителей болезни выявлено не было.

К вышесказанному следует добавить, что, кроме обычной для микоплазм лимфоцитарной или лимфоплазмоцитарной инфильтрации, у собак и кошек частыми гистологическими находками являются некротизация поражённых органов и тканей, а также гнойный или фибринозно-гнойный характер воспалительных процессов (особенно у кошек).

2.4 Лечение микоплазменной инфекции у собак и кошек

В связи с отсутствием у микоплазм клеточной стенки на них не действуют антибиотики, нарушающие синтез компонентов клеточной стенки бактерий. Соответственно, микоплазмы нечувствительны к антибиотикам, имеющим β -лактамное кольцо, таким как пенициллины и цефалоспорины, и к антибиотикам группы гликопептидов. Неактивны в отношении микоплазм и сульфаниламиды, которые угнетают образование нуклеиновых кислот у бактерий, подавляя синтез пиримидиновых и пуриновых оснований [1, 15, 25].

На практике даже деконтаминировать от микоплазм клеточные культуры только с помощью применения очень высоких доз и различных сочетаний антибиотиков часто оказывается невозможно [195]. Тем более сложно бороться с микоплазмами в живом организме. Применение антибиотиков для лечения микоплазмозов человека часто не даёт желаемого эффекта. Микоплазмы быстрее других бактерий приобретают устойчивость к ним благодаря высокому уровню нестабильности генома [179, 236, 237]. Длительное наблюдение за пациентами (в течение 4-6 месяцев) выявило устойчивость инфекции к использованному антибиотику и высокий процент осложнений – дисбактериозов и грибковых заболеваний. Обычно лечение антибиотиками в адекватных дозах приводит к исчезновению симптомов и прекращению выделения возбудителя во внешнюю среду, но не к полному освобождению от него [1]. Основным депо микоплазм в

организме животных и человека является костный мозг [17]. Микоплазмы могут снова активироваться при действии факторов, ослабляющих иммунитет, давая рецидивы болезни.

Для лечения микоплазмозов человека чаще всего используют антибиотики тетрациклинового ряда, комбинацию антибиотиков групп макролид-линкозамид-стрептограмин (МЛС) и фторхинолоны [45]. Эти противомикробные препараты позволяют подавлять и микоплазмозы животных [1].

К сожалению, при применении тетрациклинов происходит уничтожение всей естественной микрофлоры желудочно-кишечного, урогенитального и респираторного трактов, за которым часто следует развитие общего, системного дисбиоза организма. Комбинация антибиотиков групп МЛС применяется у человека главным образом для лечения респираторных заболеваний или в случаях, когда тетрациклины противопоказаны, например, для новорожденных. По механизму действия эти препараты сходны с тетрациклинами, они связываются с рибосомами, ингибируя синтез белка в бактериальной клетке [1].

Последствия инфицирования микоплазмами у собак и кошек сильно варьируют и назначение препаратов должно быть тщательно продумано исходя из особенностей каждого отдельного клинического случая. Подходы к борьбе с болезнями, вызываемыми этими микроорганизмами, должны быть адаптированы к индивидуальным потребностям животного. Вероятность успеха увеличивается при улучшении гигиенических условий и усилении активного иммунитета [47].

Для собак и кошек против микоплазм обычно рекомендуют использовать антибиотики доксициклин и тетрациклин (группа тетрациклинов); эритромицин (макролиды) и азитромицин (макролиды, подгруппа азалидов); хлорамфеникол (амфениколы или левомицетины); клиндамицин (линкозамиды); а также антибактериальные препараты энрофлоксацин и прадофлоксацин (фторхинолоны) [95, 175]. Известно, что к макролидам у большинства бактерий быстро развивается устойчивость, поэтому у человека их относят к антибиотикам резерва и используют, когда пенициллины неэффективны [23]. Использование фторхинолонов также приводит к образованию устойчивых штаммов.

Чрезвычайно интересно, что устойчивость микоплазм к фторхинолонам в присутствии живых клеток животных или человека может быть в 10 раз выше, чем на бесклеточных средах. Возможно, определение устойчивости к антибиотикам стандартными микробиологическими методами теряет свою значимость в случае микоплазменных инфекций. Механизмы формирования устойчивости к антибиотикам у микоплазмы в культуре и у микоплазмы в сочетании с эукариотной клеткой (то есть в естественном тандеме «клетка паразита – клетка хозяина») могут существенно различаться [5]. Развитие устойчивости к фторхинолонам у некоторых штаммов микоплазм собак и кошек *in vivo* подтверждается отсутствием улучшения состояния получавших эти препараты больных животных в отдельных описанных в литературе клинических случаях [44, 49].

Требуемая продолжительность антибиотикотерапии неизвестна. Сообщалось, что у кошек с инфекциями верхних дыхательных путей или конъюнктивитами микоплазмы элиминировались при приёме доксицилина или прадофлораксина только через 42 дня [103]. Исходя из этой информации, при микоплазменных инфекциях нижнего респираторного тракта предлагают также продолжать лечение не менее 6 недель [87].

2.5 Диагностика и контроль лечения микоплазмозов

Диагностика микоплазменных инфекций представляет значительные трудности, тем более что чаще всего они развиваются в ассоциации с другими бактериальными и вирусными заражениями. Кроме того, диагностика осложнена присутствием микоплазм на слизистых оболочках не только у больных, но и у значительной части здоровых особей.

Наглядным примером сложности выявления микоплазм является факт, что доля регистрируемых пневмоний человека, связанных с инфицированием *M. pneumoniae*, по оценкам разных авторов колеблется от 5 до 30 % от общего числа и такой значительный разброс объясняют несовершенством методов диагностики [1, 147]. В ветеринарии дело обстоит приблизительно также и результаты диагностики в значительной степени зависят от используемых в каждой конкретной лаборатории методик. Показательна работа канадских авторов,

которые сравнили частоту выявления *Mycoplasma spp.* методом ПЦР в двух разных коммерческих лабораториях. По результатам, полученным для одних и тех же кошек с заболеваниями глаз, распространенность *Mycoplasma spp.* составила 11 и 27 % [193]. Эти результаты лишний раз подтверждают, что методики выявления микоплазм требуют дальнейшего совершенствования и их улучшение является весьма актуальной задачей.

Среди лабораторных методов диагностики используют серологическое исследование крови на наличие антител к микоплазмам, ПЦР для обнаружения ДНК микоплазм в смывах со слизистых оболочек либо в различных органах и тканях, а также бактериологическое исследование с последующими микроскопией и изучением биохимических свойств [18].

2.5.1 Серологические методы в диагностике микоплазмозов

Выявлять микоплазменные инфекции путем измерения уровня специфических антител довольно сложно, поскольку серологические тесты с использованием реакции непрямой гемагглютинации и реакции связывания комплемента продемонстрировали присутствие антител к большинству собачьих микоплазм в сыворотке крови многих здоровых собак [163]. Одно из недавних исследований здоровых собак в Словении показало присутствие антител против *M. cynos* у 74 % и антител к *M. canis* у 71 % животных [198]. Почти все кошки также имеют специфические антитела к *M. felis*, а небольшое число здоровых и больных кошек имеет антитела к *A. laidlawii*, *M. arginini* и *M. gateae* [163]. Поэтому применение серологических методов в случае микоплазм однозначно требует проведения ретроспективных исследований. Считается, что титр антител к микоплазмам должен увеличиться в пробах, взятых с 3-недельным интервалом, не менее чем в 2 раза [191].

Кроме широкой распространённости антител к разным видам микоплазм в популяции собак и кошек использование серологических тестов затрудняется большим числом видов микоплазм, паразитирующих на их слизистых оболочках, отсутствием четкого понимания, какие из этих видов следует считать «более патогенными», и возможностью перекрёстных реакций [66]. К тому же, при

хроническом течении невозможно датировать начало заболевания и, соответственно, отследить, произошло ли требуемое увеличение титров [18].

2.5.2 Использование ПЦР для диагностики и контроля лечения

ПЦР-диагностика получила широкое применение в последние десятилетия. Но для микоплазм здесь тоже есть ряд нюансов. Чаще всего проводят анализ на наличие представителей рода *Mycoplasma*, но такое носительство чрезвычайно распространено и у здоровых животных. Отдельные лаборатории стали проводить диагностику на *M. cynos* и *M. canis* для собак, а также на *M. felis* и *M. gateae* для кошек. Результат анализа чаще всего выдается в виде «Обнаружены» или «Отсутствуют» без дифференцировки двух видов. Он не имеет большой диагностической ценности – обнаружение в респираторном тракте собак довольно распространенной в популяции и обычно не вызывающей развития респираторной симптоматики *M. canis* малоинформативно, как и обнаружение *M. cynos* у них в урогенитальном тракте. Ещё сложнее извлечь полезную информацию из обнаружения на конъюнктиве или в респираторном тракте кошки *M. gateae* (этот вид микоплазм был пока уличен лишь в причастности к развитию полиартритов).

Кроме того, с помощью ПЦР невозможно оценить жизнеспособность микроба, что может быть особенно важно для контроля лечения. Из-за тесного мембранного контакта с клетками, на которых они паразитируют, даже погибшие микоплазмы будут оставаться на поверхности клеток эпителия и детектироваться посредством ПЦР вплоть до его слущивания (в течение как минимум нескольких недель). Так, было показано, что в организме человека может долго обнаруживаться ДНК погибших клеток *M. hominis* [18]. Но при отсутствии жизнеспособных микоплазм продолжение лечения антибиотиками не имеет смысла, тем более что большинство эффективных в отношении микоплазм противомикробных препаратов имеет серьёзные противопоказания и побочные эффекты. Тетрациклины могут приводить к развитию у кошек стриктуры пищевода. Кроме того, следует избегать применения тетрациклинов для беременных животных и молодняка первых месяцев жизни – они способны образовывать хелатные комплексы с кальцием в костях и зубах, и это чревато

общей задержкой роста и обесцвечиванием зубов у щенков и котят. Фторхинолоны могут неблагоприятно воздействовать на хрящевую ткань, так же приводя к нарушению роста, поэтому их тоже не рекомендуют назначать животным первого года жизни. Кроме того, многие фторхинолоны, например, энрофлоксацин, могут вызывать у кошек дегенеративные изменения сетчатки [103, 149]. Чтобы избежать бесполезной длительной и агрессивной антибиотикотерапии, требуются диагностические методы, по возможности быстро выявляющие только жизнеспособных микоплазм в процессе лечения.

2.5.3 Использование бактериологического исследования для диагностики и контроля лечения

Бактериологическое исследование, в отличие от двух предыдущих методов, позволяет выявлять именно жизнеспособные микоплазмы [67]. На его достоверность может повлиять способность микоплазм (как и других неспорообразующих бактерий) переходить в некультивируемое состояние при неблагоприятствующих их росту условиях [20]. Кроме того, существуют виды микоплазм, которые при любых условиях плохо растут или вообще не растут на известных бесклеточных средах (так называемые «некультивируемые» микоплазмы). Поэтому отсутствие роста в посевах на бесклеточные среды не всегда означает отсутствие микоплазм в тестируемом образце [1]. «Некультивируемые» микоплазмы (а иногда и «культивируемые» на первом этапе выделения из клинических образцов) можно было бы растить на клеточных линиях [117], однако контаминация клеточных культур микоплазмами настолько широко распространена, что использование их для первичной изоляции микоплазм следует считать нецелесообразным [14]. Для видов, которые растут на правильно подобранных бесклеточных питательных средах, выявление микробиологическим методом является очень чувствительным, так как теоретически оно позволяет обнаружить даже единственную живую клетку микоплазмы, попавшую в культуральную среду. Поэтому в Европе есть лаборатории, специализирующиеся исключительно на микробиологических работах, связанных с микоплазмами [7].

Следует отметить, что во многих странах для диагностики микоплазмозов все три лабораторных метода (серологический, бактериологический и ПЦР) часто применяют одновременно (особенно в медицине человека) и они прекрасно дополняют друг друга [18, 228].

2.5.4 Особенности культивирования микоплазм

Микоплазмы, безусловно, являются довольно требовательными микробами. В естественных условиях они имеют очень тесный контакт с клеткой организма-хозяина, и это облегчает транспорт из её цитоплазмы многих необходимых микоплазмам соединений в готовом виде. Получая такие соединения напрямую от клетки-хозяина, микоплазмы утратили необходимые для их синтеза гены в процессе регрессивной эволюции [1]. Поэтому бесклеточные питательные среды для выращивания микоплазм должны содержать все те соединения, которые они уже не могут синтезировать сами. Такие среды имеют сложный состав и включают большое количество разнообразных питательных добавок.

Белковой основой среды для выращивания микоплазм обычно является вытяжка из бычьего сердца и пептон, реже – мясной экстракт и панкреатический гидролизат казеина. В неё добавляют большое количество дрожжевого экстракта в качестве ростового фактора. Лошадиная сыворотка крови служит источником стеролов; ее тоже требуется довольно много. Для получения энергии, как известно, разные виды микоплазм используют либо гликолиз (ферментативное расщепление глюкозы), либо гидролиз аргинина или мочевины, и в среды для их культивирования добавляется одна из этих трех (глюкоза, аргинин или мочевина) «энергетических добавок». В процессе расщепления микоплазмами «энергетических добавок» меняется рН среды, что можно видеть по изменению цвета среды, если она содержит индикатор. Для обеспечения селективности этих чрезвычайно питательных сред в них обычно вносят β-лактамы (как правило, пенициллины), механизм действия которых связан с нарушением синтеза бактериальной клеточной стенки. У микоплазм нет клеточной стенки, поэтому они не чувствительны к данной группе антибиотиков и благополучно растут на средах

с их добавкой. Для получения сред разной плотности в них добавляется нужное количество агара.

Отношение микоплазм к кислороду зависит от места их паразитирования в организме: респираторным не противопоказана аэрация, урогенитальные обычно являются микроаэрофилами (при их культивировании рекомендуется использование газовой смеси 95 % N₂ + 5 % CO₂), обитатели кишечника требуют строгих анаэробных условий [1].

Понятно, что при современном уровне развития промышленного производства приготовление сред, каким бы сложным составом они не обладали, не представляет серьезной проблемы. Готовую сухую основу среды и готовые лиофилизированные добавки к ней выпускает большинство компаний, которые занимаются производством реактивов для микробиологии. Восстановить их по инструкции производителя не составляет большого труда.

А вот классические методики работы с микоплазмами, большая часть которых разработана десятки лет назад, достаточно трудоемки и сложны [14, 151]. Это в значительной степени связано с тем, что на большинстве сред микоплазмы имеют нежный, едва различимый глазом рост. Подтверждение наличия роста с помощью микроскопии затруднительно из-за чрезвычайно мелкого размера клеток и их полиморфизма. Поэтому если экспериментатор не увидел явных признаков роста микоплазм на жидких средах, ему рекомендуют сделать несколько последовательных слепых пассажей. Кроме того, для жидких сред с каждой из энергетических добавок (глюкозой, аргинином и мочевиной) обычно советуют изначально сделать серию десятикратных разведений до 10⁻⁵, что необходимо в основном для полуколичественной оценки содержания микоплазм в пробе.

Если рассмотреть в качестве примера предложенную М. Ogata методику работы для образцов от собак и кошек, то схема первичного посева каждого образца включает посев на две чашки Петри с твердыми средами (одна без энергетических добавок, вторая – с мочевиной), три пробирки с жидкими средами (с глюкозой, аргинином или мочевиной) и по пять пробирок жидких сред каждого из трех вариантов (с глюкозой, аргинином или мочевиной) в серии десятикратных

разведений до 10^{-5} [163]. Общее число пробирок и чашек Петри, используемых для посева одного образца, составляет 20 штук (рисунок 3). Для удобства изложения пробирки и чашки Петри, используемые для первичного посева одного образца, далее будут называться **«посевными единицами» (ПЕ)**. С учетом рекомендуемых дальнейших пересевов с жидких и твердых сред, а также возможных слепых пассажей, число ПЕ, засеянных одним образцом, может достигать 40-50 штук.

Для всех полученных в ходе работы изолятов, которые, из-за большой распространённости одновременного носительства нескольких видов микоплазм у животных и человека, как правило, представляют собой смешанные культуры, классическая методика М. Ogata предлагает их последующую дополнительную очистку путём клонирования с предварительным фильтрованием, а затем изучение биохимических свойств полученных в результате проведённой очистки клонов (чистых культур) и их типирование с помощью серологических методов.

Работавшие с микоплазмами отечественные ученые выделяли их в основном от продуктивных, а не от мелких домашних животных [12, 14, 21]. Но если распространить на собак и кошек их рекомендации по культуральным работам с микоплазмами от других животных, то результат окажется ничуть не проще. Например, в случае отсутствия явных признаков роста рекомендуется сделать для каждой из засеянных сред до 8 последовательных слепых пассажей с интервалом 5 суток. Это в несколько раз увеличивает не только число задействованных ПЕ, но и время проведения исследования.

2.5.5 Типирование полученных клонов (чистых культур) микоплазм

Традиционно идентификация микоплазм проводилась серологическими методами с использованием специфических антисывороток к каждому виду [186]. Разделение микоплазм на подгруппы по биохимическим свойствам ограничивало число антисывороток, необходимых для идентификации [14, 24, 67, 151, 184, 189]. Но с увеличением числа известных видов микоплазм серологическая идентификация становится всё более сложной задачей. При этом антисыворотки к микоплазмам не являются широкодоступными даже в Европе [67].

Добавка Плотность	—	Г	Г $\times 10^{-1}$	Г $\times 10^{-2}$	Г $\times 10^{-3}$	Г $\times 10^{-4}$	Г $\times 10^{-5}$	А	А $\times 10^{-1}$	А $\times 10^{-2}$	А $\times 10^{-3}$	А $\times 10^{-4}$	А $\times 10^{-5}$	М	М $\times 10^{-1}$	М $\times 10^{-2}$	М $\times 10^{-3}$	М $\times 10^{-4}$	М $\times 10^{-5}$
ж		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
т	●													●					

Рисунок 3 – Схема посева одного кошачьего или собачьего образца по методике Ogata M. (1983).

ж – жидкая среда; *т* – твёрдая среда; «—» – среда без энергетических добавок; *Г* – среда с добавлением глюкозы; *А* – среда с добавлением аргинина; *М* – среда с добавлением мочевины; ● – на этот тип среды производится посев («посевная единица»)

Использование для определения вида микоплазм молекулярно-генетических методов, напротив, не требует наличия редких реактивов и становится массово доступным. Как уже отмечалось выше (см. пункт 2.1) Таксономический комитет при Международной организации микоплазмологов рекомендовал для описания новых видов класса Mollicutes нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК, межгенного пространства 16S/23S рРНК и некоторые другие [1]. Секвенирование этих участков у полученных при культуральных работах клонов с последующей идентификацией вида по банку данных GenBank – один из самых надёжных и универсальных способов типирования микоплазм на сегодняшний день. В литературе для микоплазм описано несколько наборов праймеров, работающих в области гена 16S рРНК или межгенного пространства 16S/23S рРНК, которыми можно воспользоваться [101, 102, 132, 157, 164, 200, 211, 213, 223]. Часть из них уже была апробирована на образцах от собак [206, 207]. В работе V.J. Chalker & J. Brownlie (2004) приведена методика секвенирования микоплазм, разработанная специально для собачьих образцов [65]. Для идентификации большинства микоплазм кошек она тоже может быть использована. Авторы сконструировали две пары «родовых» праймеров для амплификации частичной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и одну пару – для амплификации полной нуклеотидной последовательности межгенного пространства 16S/23S рРНК.

Другой подход, являющийся менее универсальным, – разработка индивидуальных («видовых») праймеров для отдельных видов микоплазм, имеющих научный или клинический интерес. Примером использования этого подхода является работа V.J. Chalker et al. (2004), в которой представлены «видовые» праймеры для определения посредством рутинной ПЦР 11 видов микоплазм, наиболее часто выделяемых от собак [66]. Среди них есть и 3 наиболее значимых в инфекционной патологии собак и кошек вида – *M. cynos*, *M. canis* и *M. felis* (см. пункт 2.1). Преимуществом данного подхода является бóльшая его простота и дешевизна по сравнению с секвенированием. Он может успешно применяться для определения частоты встречаемости определённых видов микоплазм у какого-либо вида животных или у человека.



Таким образом, усовершенствование различных этапов микробиологических работ с микоплазмами остаётся актуальной задачей. Необходимо добиться упрощения сложных схем их культивирования. Использование вариантов среды, на которых рост микоплазм будет иметь больше типичных особенностей, и создание из них оптимальной комбинации (набора) для посева каждого образца, будут этому способствовать. Другим путём к достижению этой цели является замена многочисленных последовательных слепых пассажей при отсутствии ярких признаков роста микоплазм на ПЦР-анализ сомнительных культур.

3 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Материалы и методы исследований

Работа выполнялась в 2013-2019 гг. на кафедре эпизоотологии и ветеринарного дела ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», а также на базе лаборатории молекулярной диагностики подразделения Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России в порядке научного сотрудничества.

Материал для исследований (мазки и смывы) собирали в ветеринарной клинике «Доктор Друг» (посёлок Нахабино Московской области), а также в ветеринарном центре «Северное сияние» и частном приюте для кошек «Муркоша» (город Москва). Пробы для бактериологических и молекулярно-генетических исследований были взяты в общей сложности у 138 собак (120 здоровых и 18 больных) и 62 кошек (26 здоровых и 36 больных). Под больными здесь и далее подразумеваются животные с респираторным синдромом. У некоторых кошек наблюдались также клинические признаки конъюнктивита, включая истечения из глаз серозного или серозно-гнойного характера. Кошки были преимущественно беспородными, их возраст составлял от 2,5 месяцев до 16 лет; собаки – преимущественно разных пород (среди которых чаще встречались йоркширский терьер, лабрадор-ретривер, чихуахуа, немецкий шпиц, русский той-терьер, немецкая овчарка, гладкошерстная такса, джек-рассел-терьер, сибирский хаски, мопс, далматинец) в возрасте от 2,5 месяцев до 19 лет.

Образцы отбирали с конъюнктивы или со слизистых оболочек верхнего респираторного тракта. При оптимизации методики изоляции микоплазм для каждого образца использовали схему исследования, приведённую на рисунке 4. В общей сложности при проведении работы было исследовано 267 образцов.



Рисунок 4 – Схема исследования образца, взятого с конъюнктивы или со слизистых оболочек верхнего респираторного тракта собаки либо кошки при оптимизации методики изоляции микоплазм

3.1.1 Реактивы и расходные материалы

Готовые лекарственные препараты.

Бензилпенициллина натриевая соль (порошок для приготовления раствора для внутримышечного и подкожного введения) 1 млн. ЕД («Синтез АКОМП», Россия); Амоксиклав (порошок для приготовления раствора для внутривенного введения) 600 мг («Лек д.д.», Словения); Цефепим (порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения) 1 г («Фортун Оверсиз Компани», Индия).

Готовые компоненты культуральных сред.

«Основа бульона для Mycoplasma (Основа бульона PPLO) BBL» («Becton, Dickinson and Company (BBL)», США); «Дрожжевой экстракт Bacto» («Becton, Dickinson and Company», США); «Агар бактериологический Bacto» («Becton, Dickinson and Company», США); «Сыворотка крови лошадиная стерильная для культивирования микоплазм» («Биолот», Россия).

Готовые наборы реагентов для молекулярно-генетических работ.

Набор реагентов для выделения ДНК «АмплиПрайм ДНК-сорб-В вариант 100» («НекстБио», Россия); тест-система для выявления ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma* методом рутинной ПЦР «МИК-КОМ» («ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора», Россия); готовые буфер для ПЦР, смесь dNTPs, ферменты Taq-полимераза и HS-Taq ДНК-полимераза («Ветбиохим», Россия); готовая реакционная смесь для проведения ПЦР «Экстра-микс для ПЦР HS-Taq PCR» («Диаэм», Россия); пятидесятикратный Трис-ацетатный электродный буфер (ТАЕ-буфер); ДНК-маркеры «Thermo Scientific O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus, ready-to-use» («Fermentas», Литва) и «100 bp Ladder DNA Marker (100 bp-3000 bp)» («Axygen Biosciences», Китай); наборы для выделения ДНК с агарозного геля «Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit» («Fermentas», Литва) и «Monarch DNA Gel Extraction Kit» («New England Biolabs», США); набор для секвенирования ПЦР-продуктов по методу Сэнгера «Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit» («Applied Biosystems», США).

Расходные материалы для культуральных работ.

Стерильная фильтрующая насадка Millex с мембраной Durapore (PVDF) 33 мм/0,22 мкм («Merck/Millipore», США); стерильная фильтр-насадка на шприц с мембраной из ацетата целлюлозы 26 мм/0,22 мкм («Corning», США); одноразовые стерильные пластиковые пробирки для отбора, транспортировки и хранения биологических проб в комплекте со стерильным зондом-тампоном из пластика и вискозы («Nuova Aptaca», Италия); стерильные зонды-тампоны из полипропилена и вискозы («Nuova Aptaca», Италия); микроцентрифужные пробирки градуированные объемом 2,0 мл Maximum Recovery («Corning/Axygen», США); микроцентрифужные пробирки градуированные объемом 2,0 мл стерильные («Corning/Axygen», США); микропробирки градуированные с крышкой объёмом 1,5 мл («Nuova Aptaca», Италия); пипетки Пастеровские стерильные градуированные на 1,5 мл («Nuova Aptaca», Италия); стерильные одноразовые шприцы 5, 10, 20 и 50 мл с иглами разного диаметра; индикаторная бумага («Главздрав», Россия).

Расходные материалы для молекулярно-генетических работ.

Микронаконечники на 0,5-10 и 1-200 мкл желтые и желтые с фаской («Greiner», Австрия); наконечники на 100-1000 мкл голубые («Greiner», Австрия); микронаконечники с фильтром на 1-20, 1-200 и 100-1000 мкл («QSP», США); пробирки объемом 0,2 и 0,6 мл тонкостенные для ПЦР («QSP», США); микроцентрифужные пробирки с градуировкой на 1,5 мл и 2 мл («Eppendorf», Германия); пластиковые пробирки типа Falcon с закручивающейся крышкой на 15 и 50 мл («Eppendorf», Германия).

3.1.2 Приборы и оборудование

Приборы и оборудование для культуральных работ.

Термостат суховоздушный «ТС 1/80» («Смоленское СКТБ СПУ», Россия); термостат водяной «ТВ3-25» («Медлабортехника», Украина); весы электронные аналитические «JW-1» («Асом», Корея); микроскоп «Биомед 6» с цифровой насадкой («Биомед Сервис», Россия); дозатор пипеточный электронный 1-100 мл «Proline Midi Plus» («Biohit», Финляндия); анаэроостат «АЭ-01» («Ники МЛТ-Поволжье», Россия); газовые горелки.

Приборы и оборудование для молекулярно-генетических работ.

Амплификаторы «Терцик» («ДНК-Технология», Россия); настольные микроцентрифуги «Eppendorf centrifuge 5415D» («Eppendorf», Германия); смеситель Vortex «WhirliMixer» («Fisons», Великобритания); твердотельный термостат «Гном» («ДНК-Технология», Россия); вакуумные насосы «ОМ-1» («Утёс», Россия); камера для проведения горизонтального электрофореза «Sub-Cell GT» («Bio-Rad», США) с источником питания «Эльф-4» («ДНК-Технология», Россия); трансиллюминатор «ETX-F36.M» («Vilber Lourmat», Франция); аквадистиллятор «ДЭ-10М» («ЭМО», Россия); система для очистки воды «Milli Q» («Millipore», США); электронные настольные весы «VI-1mg» («AccuLab», США); механические пипетки переменного объема «Eppendorf Research» («Eppendorf», Германия), секвенатор «3130 Genetic Analyzer» («Hitachi/Applied Biosystems», Япония).

3.1.3 Приготовление используемых вариантов среды, включая разные модификации среды для взятия образцов биоматериала

Для приготовления всех разновидностей среды пользовались основой среды и обогащающими добавками промышленного производства: «Основа бульона для Mycoplasma (Основа бульона PPLO) BBL» («Becton, Dickinson and Company (BBL)», США); «Дрожжевой экстракт Bacto» («Becton, Dickinson and Company», США); «Сыворотка крови лошадиная стерильная для культивирования микоплазм» («Биолот», Россия); «Агар бактериологический Bacto» («Becton, Dickinson and Company», США). Используемые для разных этапов культуральных работ варианты питательной среды, которые различались по плотности или содержанию энергетических добавок, перечислены в таблице 2. Среда для взятия образцов биоматериала, по существу, также являлась одним из вариантов среды. Она готовилась с использованием той же основы, но не содержала энергетических добавок, включала 0,1 % агара и имела 4 собственных модификации, которые отличались входящими в их состав антибиотиками (таблица 3).

Таблица 2 – Стандартизированные варианты питательной среды

Обозначение	Плотность	Энергетическая добавка
жГ	жидкая	глюкоза
жА	жидкая	аргинин
жМ	жидкая	мочевина
пГ	полужидкая (0,3 % агара)	глюкоза
пА	полужидкая (0,3 % агара)	аргинин
пГА	полужидкая (0,3 % агара)	глюкоза и аргинин
тГ	твердая (1,5 % агара)	глюкоза
тА	твердая (1,5 % агара)	аргинин
тГАМ	твердая (1,5 % агара)	глюкоза, аргинин и мочевина

Таблица 3 – Стандартизированные модификации среды для взятия образцов биоматериала

Обозначение	Антибиотики
«Old»	бензилпенициллин
«AK»	бензилпенициллин + амоксиклав
«С»	бензилпенициллин + цефепим
«AK+С»	амоксиклав + цефепим

Приготовление основы среды.

Для приготовления одной порции основы среды смешивали и автоклавировали:

- 80-85 мл дистиллированной воды (с учётом упаривания);
- 1,4 г сухой основы среды для PPLO (BBL);
- 2,5 г порошка дрожжевого экстракта;
- 0,75 мл 0,4 % раствора индикатора фенолового красного;
- агар – в зависимости от требуемой плотности среды:
 - в *жидкую* не добавляли;
 - в *среду для взятия образцов биоматериала* 0,1 г;
 - в *полужидкую* 0,3 г;
 - в *твёрдую* 1,5 г.

Приготовление добавок к среде.

1 М раствор соляной кислоты: 190 мл дистиллированной воды стерилизовали автоклавированием и смешивали с 20 мл концентрированной соляной кислоты.

1 М раствор гидроксида натрия: 210 мл дистиллированной воды стерилизовали автоклавированием и растворяли в ней 10 г порошка NaOH.

0,4 % раствор фенолового красного: растворяли 0,4 г порошка водорастворимого фенолового красного в 100 мл дистиллированной воды, тщательно перемешали, отфильтровывали нерастворившиеся примеси через бумажный фильтр и стерилизовали полученный раствор автоклавированием.

30 % раствор гидрохлорида L-аргинина: добавляли 15 г порошка L-аргинина в смесь 42,5 мл дистиллированной воды и 7,5 мл концентрированной соляной кислоты, перемешивали, стерилизовали фильтрованием через бактериальный фильтр (диаметр пор 0,22 мкм).

10 % раствор мочевины: добавляли 5 г порошка мочевины в 50 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивали. Стерилизовали фильтрованием через бактериальный фильтр (диаметр пор 0,22 мкм).

Приготовление готовых вариантов среды (из расчета на 100 мл).

В стерильных условиях (при температуре не выше 55 °С) смешивали:

- 1 порцию основы среды необходимой плотности (75-80 мл);
- 20 мл лошадиной сыворотки крови;
- 100.000 МЕ бензилпенициллина (в виде раствора 100.000 МЕ/мл в дистиллированной воде);
- питательную добавку в зависимости от типа среды:
 - *среда с глюкозой* (Г) – 2,5 мл 40 % раствора глюкозы;
 - *среда с аргинином* (А) – 3,0 мл 30 % раствора гидрохлорида L-аргинина;
 - *среда с мочевиной* (М) – 1,0 мл 10 % раствора мочевины;
 - *двойная среда* (ГА) – 1,25 мл 40 % раствора глюкозы и 1,5 мл 30 % раствора гидрохлорида L-аргинина;
 - *тройная среда* (ГАМ) – 1,25 мл 40 % раствора глюкозы, 1,5 мл 30 % раствора гидрохлорида L-аргинина и 0,5 мл 10 % раствора мочевины;
- 1 М раствор NaOH или 1 М раствор HCl для стабилизации pH:
 - *среда с глюкозой* (Г) – до pH = 8,0;
 - *среда с аргинином* (А) – до pH = 7,0;
 - *среда с мочевиной* (М) – до pH = 6,0;
 - *двойная среда* (ГА) – до pH = 7,5;
 - *тройная среда* (ГАМ) – до pH = 7,5.

Готовые *жидкие и полужидкие среды* стерильно разливали по 2,5 мл в стеклянные пробирки (диаметр 1,5 см) с резиновыми пробками, а *твёрдые среды* – по 15 мл (в горячем виде) в стеклянные чашки Петри (диаметр 10 см).

Модификации среды для взятия образцов биоматериала.

Модификации среды для взятия образцов биоматериала, различающиеся входящими в их состав антибиотиками, получали из основы, содержащей 0,1 % агара, смешивая в стерильных условиях (из расчета на 100 мл):

- 1 порцию основы среды, содержащей 0,1 % агара (75-80 мл);
- 20 мл лошадиной сыворотки крови;

- антибиотики:

- для варианта «**Old**» – 100.000 МЕ бензилпенициллина (в виде раствора 100.000 МЕ/мл в дистиллированной воде);
- для варианта «**AK**» – 100.000 МЕ бензилпенициллина (в виде раствора 100.000 МЕ/мл в дистиллированной воде) и 60 мг амоксиклава (в виде раствора 60 мг/мл в дистиллированной воде);
- для варианта «**C**» – 100.000 МЕ бензилпенициллина (в виде раствора 100.000 МЕ/мл в дистиллированной воде) и 100 мг цефепима (в виде раствора 100 мг/мл в стерильном физиологическом растворе);
- для варианта «**AK+C**» – 60 мг амоксиклава (в виде раствора 60 мг/мл в дистиллированной воде) и 100 мг цефепима (в виде раствора 100 мг/мл в стерильном физиологическом растворе).

Готовую *среду для взятия образцов биоматериала* стерильно разливали по 2 мл в одноразовые стерильные пластиковые пробирки для отбора, транспортировки и хранения биологических проб в комплекте с зондом-тампоном из пластика и вискозы («Nuova Aptaca», Италия).

3.1.4 Комбинации (наборы) из разных вариантов питательной среды для посева 1 образца

Используемые 9 вариантов среды (таблица 2) комбинировали в наборы для посева 1 образца 3 составов (рисунок 5).

3.1.5 Отбор проб

Отбор *мазков* осуществляли, твердо проводя по слизистой оболочке зондом-тампоном, смоченным средой для взятия образцов биоматериала собственного приготовления. Взятые образцы при необходимости хранились при температуре 4-8 °С, после чего доставлялись в лабораторию на льду. Посев производился не позднее, чем в течение суток после пробоотбора.

	Г	А	М	ГАМ
Ж	●	●	●	
П	●	●		
Т	○	○		

ИЛИ

	Г	А	М	ГАМ
Ж	●	●	●	
П	●	●		
Т				○



А. Посев на 6-7 «посевных единиц» (полный набор).

	Г	А	М
Ж			●
Т	●	●	



Б. Посев на 3 «посевные единицы» (минимальный набор).

	Г	А	ГА	М	ГАМ
Ж				●	
П	●	●	●		
Т	○				

ИЛИ

	Г	А	ГА	М	ГАМ
Ж				●	
П	●	●	●		
Т					○



В. Посев на 5 «посевных единиц» (набор промежуточного размера, состоящий преимущественно из полужидких сред).

Рисунок 5 – Апробированные схемы посева одного образца. *ж* – жидкая среда; *п* – полужидкая среда; *т* – твёрдая среда; *Г* – среда с добавлением глюкозы; *А* – среда с добавлением аргинина; *ГА* – среда с добавлением глюкозы и аргинина; *М* – среда с добавлением мочевины; *ГАМ* – среда с добавлением глюкозы, аргинина и мочевины; ● или ○ – на этот тип среды производится посев (○ – когда использовали 2 разновидности одной и той же схемы, выборочно заменяя твёрдые среды с отдельными энергетическими добавками *тГ* и *тА* на твёрдую среду с их смесью *тГАМ*)

Одновременно (для проведения исследований в соответствии со схемой на рисунке 4) с тех же слизистых оболочек стерильным тампоном брали **смывы** для анализа на наличие микоплазм методом ПЦР. Для взятия смывов использовали эппендорфы объемом 1,5 мл, заполненные 0,75 мл стерильного физиологического раствора. Смывы сразу замораживались и доставлялись в лабораторию на льду. Анализ проводили не позднее, чем в течение 1 недели после пробоотбора.

Для выполнения разных этапов исследования случайным образом были сформированы 5 групп животных (таблица 4).

Таблица 4 – Группы животных, сформированные для выполнения разных этапов исследования

Группа	Число животных	Этапы исследования
Группа 1	4	• <i>Снижение числа ПЕ в наборе до 7;</i> • <i>Проверка специфичности набора из 5 ПЕ;</i> • <i>Проверка возможности замораживания мазка перед посевом</i>
Группа 2	17	• <i>Снижение числа ПЕ в наборе до 5</i>
Группа 3	114	• <i>Оценка эффективности разных комбинаций антибиотиков в составе среды для взятия образцов при работе с образцами от собак</i>
Группа 4	56	• <i>Оценка эффективности разных комбинаций антибиотиков в составе среды для взятия образцов при работе с образцами от кошек</i>
Группа 5	9	• <i>Проверка возможности использования для пробоотбора физиологического раствора</i>

Группу 1 составили 4 животных – 2 кошки (здоровая и больная) и 2 собаки (здоровая и больная). Мазки отбирались с конъюнктивы и из зева для всех, а также из носовых ходов – для 2 из 4 (кошка и собака). Таким образом, всего было взято и посеяно 10 образцов. Посев каждого образца производился на набор сред из 7 ПЕ (жГ, жА, жМ, пГ, пА, тГ и тА; рисунок 5А). Такое же количество смывов, взятых с тех же анатомических мест одновременно с мазками, было исследовано на наличие микоплазм методом ПЦР (в соответствии со схемой исследования на рисунке 4).

После инкубирования кроме проведения визуальной оценки посевов содержимое всех пробирок было микроскопировано. Если рост микоплазм

отмечался на чашке Петри, мазки с 1-2 отдельных колоний тоже микроскопировали. После проведения культуральных работ результат (наличие или отсутствие роста) для каждой пробирки проверялся методом ПЦР (рисунок 4).

Группа 2 включала 17 животных – 4 кошки (больных) и 13 собак (4 здоровых и 9 больных). Взятые у них 17 мазков из зева были посеяны на наборы сред следующих составов:

- **6-7 ПЕ** (рисунок 5А) – для 3 животных;
- **3 ПЕ** (рисунок 5Б) – для 2 животных;
- **5 ПЕ** (рисунок 5В) – для 12 животных.

Такое же количество смывов с зева, взятых одновременно с мазками, было исследовано на наличие микоплазм методом ПЦР.

Таким образом, *при выборе оптимальной комбинации из разных вариантов питательной среды*, проведённом на животных **групп 1 и 2** на набор сред из **6-7 ПЕ** (*полный набор*: жГ, жА, жМ, пГ, пА, а также тГ и тА либо тГАМ; рисунок 5А) были в общей сложности посеяны 13 образцов; на набор сред из **3 ПЕ** (*минимальный набор*: жМ, тГ, тА; рисунок 5Б) были посеяны 2 образца; на набор сред из **5 ПЕ** (*набор промежуточного размера*: пГ, пА, пГА, жМ, а также тГ либо тГАМ; рисунок 5В) были посеяны 12 образцов.

Проверку специфичности набора из 5 ПЕ (пГ, пА, пГА, жМ, а также тГ или тГАМ), признанного оптимальным, провели на 2 здоровых животных (кошке и собаке) из **группы 1**, для которых суммарные результаты бактериального посева мазков из глаз в предшествующем эксперименте были признаны ложноположительными при соотнесении с результатами ПЦР смывов (в соответствии со схемой, приведённой на рисунке 4). Для кошки повторный отбор проб как из зева, так и с конъюнктивы был произведён однократно, для собаки пробы из зева были взяты один раз, а с конъюнктивы его повторили четыре раза в течение 1 недели (с интервалом в 1-2 дня). Таким образом, суммарно было взято и посеяно 7 образцов. Посев каждого из них производили на набор сред из **5 ПЕ** (пГ, пА, пГА, жМ и тГ; рисунок 5В). Для всех пробирок результаты посева

подтверждались ПЦР-анализом культур (в соответствии со схемой исследования на рисунке 4). Методом ПЦР было исследовано на наличие микоплазм такое же количество смывов.

Для проверки возможности замораживания взятого мазка до посева у здоровой собаки из **группы 1** были одновременно взяты 2 мазка из зева. Один их них посеяли сразу, а второй заморозили и хранили при температуре -18°C (в морозильной камере бытового холодильника). Его разморозили и произвели посев на питательные среды через 10 суток. Оба образца высевали на минимальный набор сред из **3 ПЕ** (жМ, тГ и тА; рисунок 5Б).

Группа 3 для оценки эффективности разных комбинаций антибиотиков в составе среды для взятия образцов биоматериала при работе с образцами от собак состояла из 114 животных (106 здоровых собак и 8 больных). Мазки отбирали из зева. Апробировали следующие модификации среды для взятия образцов биоматериала:

- «**Old**» – для 51 образца;
- «**AK**» – для 14 образцов;
- «**C**» – для 49 образцов.

Собранный на соответствующую модификацию среды патологический материал «подращивали» в термостате в течение 2-4 часов перед разнесением по всем «посевным единицам» набора сред. Посев каждого образца производили на признанный оптимальным набор сред из **5 ПЕ** (рисунок 5В). Столько же смывов с зева, взятых одновременно с мазками, было исследовано на наличие микоплазм методом ПЦР (в соответствии со схемой на рисунке 4).

Группа 4 для оценки эффективности разных комбинаций антибиотиков в составе среды для взятия образцов биоматериала при работе с образцами от кошек состояла из 56 животных (25 здоровых кошек и 31 больная). В отличие от предыдущих групп, кроме животных, принадлежащих частным владельцам (30 кошек, у которых брали образцы в ветеринарной клинике), в группу 4 включили животных из кошачьего приюта (26 кошек). Мазки отбирали у каждой кошки либо из зева и с конъюнктивы, либо только из зева (в единичных случаях). Всего

исследовано 108 мазков. Апробировали модификации среды для взятия образцов:

- «*Old*» – для 26 образцов (конъюнктивы и зев);
- «*AK*» – для 41 образца (только с конъюнктивы);
- «*AK+C*» – для 41 образца (только из зева).

Собранный на соответствующую модификацию среды патологический материал «подращивали» в термостате в течение 2-4 часов перед разнесением по всем «посевным единицам» набора сред. Посев каждого образца производили на признанный оптимальным набор сред из **5 ПЕ** (рисунок 5В). Одновременно со взятием каждого мазка с того же анатомического места отбирали смывы для исследования на наличие микоплазм методом ПЦР (в соответствии со схемой исследования на рисунке 4).

Группа 5 для проверки возможности использования для пробоотбора физиологического раствора состояла из 9 здоровых собак. Мазки из зева брали у них стерильными зондами-тампонами в эппендорфы с физиологическим раствором, предназначенные для взятия смывов на ПЦР. Посев каждого образца производили на набор сред из **5 ПЕ** (пГ, пА, пГА, жМ и тГ; рисунок 5В). Такое же количество смывов с зева, взятых одновременно с мазками, было исследовано на наличие микоплазм методом ПЦР.

3.1.6 Проведение посевов и слепых пассажей

При первичном посеве сначала засеивали зондом-тампоном твёрдые среды, потом отбирали мерной пипеткой среду для взятия образцов биоматериала из пластиковой пробирки для пробоотбора и разносили её в равном объеме по пробиркам с жидкими и полужидкими вариантами среды. Слепой пассаж выборочно проводили через 1 неделю.

Для слепого пассажа отбирали 0,2 мл недельной культуры и переносили на аналогичный вариант среды. Кроме того, делали пересев на твёрдую среду с такой же энергетической добавкой, распределяя на ней покачиванием 100 мкл перенесённой микропипеткой недельной культуры.

Инкубирование.

Посевы инкубировали при 37 °С: пробирки – до появления явных признаков роста или вплоть до 28 суток (при его отсутствии), чашки Петри (во влажной камере аэробно или микроаэрофильно) – до появления явных признаков роста или 2-3 недели (при его отсутствии).

Оценка результатов.

Осмотр пробирок и чашек Петри проводился через 1, 3 и 7 суток после посева, далее – не реже, чем еженедельно. О наличии роста *на жидких средах* судили по изменению цвета среды и/или образованию осадка. *Для полужидких сред* визуальными признаками роста считали изменение цвета и/или помутнение либо образование типичных микоплазменных крошковатых колоний (в форме «штришков», «кометок» или «шариков»). Чашки просматривали при небольшом увеличении светового микроскопа (объектив 4 × окуляр 16 = 64). *На твёрдой среде* типичный рост микоплазм представляет собой так называемые «колонии-яичницы» или «медузы».

После проведения культуральных работ результат (наличие или отсутствие роста) для посевов на жидкие и полужидкие варианты среды выборочно подтверждали *методом ПЦР*. Кроме того, в конце каждого эксперимента содержимое пробирок избирательно *микроскопировали*, окрашивая мазки по Граму и/или Романовскому-Гимзе. При наличии роста на твёрдых средах для 1-2 отдельных колоний с каждой чашки тоже иногда делались мазки. Результаты визуальной оценки (осмотра), микроскопии и ПЦР соотносили друг с другом, а также с результатом «референтного» ПЦР-анализа соответствующего мазку смыва (в соответствии со схемой исследования на рисунке 4).

Образец в целом считался положительным, если рост микоплазм отмечался хотя бы в одной из засеянных им ПЕ (включая слепые пассажи).

3.1.7 Клонирование и пересев (пассирование) полученных изолятов (смешанных культур) и клонов (чистых культур)

При необходимости поддержания изолятов и клонов в пассажах в течение какого-то периода времени для каждого пересева отбирали 0,2-0,4 мл культуры на жидкой или полужидкой среде и переносили в пробирку с таким же вариантом среды. Если при появлении явных признаков роста в процессе инкубирования культуры не отправляли в следующий пассаж сразу, они хранились при температуре 4-8 °C (в обычном бытовом холодильнике).

Клонирование по возможности производили со всех твёрдых сред (тГ, тА, тГАМ) с первичными посевами, на которых был зафиксирован рост микоплазм. С каждой чашки Петри отсевали, как правило, по 5 колоний. Единичные колонии переносили с твёрдой среды бактериологической петлёй в индивидуальные пробирки с жидкой или полужидкой средой (обычно с идентичной энергетической добавкой) и инкубировали стандартно (аэробно или микроаэрофильно). Если для полученных клонов клонирование требовалось провести *повторно*, их сначала пересевали с жидких и полужидких сред на твёрдые обильно смоченным культурой стерильным зондом-тампоном, а затем, при обнаружении роста микоплазм в процессе инкубирования, так же отсевали отдельные колонии бактериологической петлёй в индивидуальные пробирки. Таким же образом осуществляли клонирование отдельных изолятов с жидких и полужидких сред.

3.1.8 Очистка культур микоплазм от посторонней микрофлоры

При контаминации культур посторонней микрофлорой их очистка осуществлялась посредством фильтрования через стерильную фильтрующую насадку Millex с мембраной Durapore (PVDF) 33 мм/0,22 мкм («Merck/Millipore», США). Полученный фильтрат в объёме 0,5 мл добавляли в пробирку с тем же вариантом среды и инкубировали. Кроме того, для деконтаминации таких культур использовали пассажи на питательные среды того же состава, но с добавкой 100 мг цефепима на 100 мл среды или 1250 мкг (ЕД) амфотерицина В на 100 мл среды.

3.1.9 Хранение полученных изолятов и клонов микоплазм

Для длительного хранения культуры изолятов и клонов на жидких или полужидких средах разливали по 0,5-1,0 мл в стерильные микроцентрифужные пробирки объемом 2,0 мл («Corning/Axygen», США) и замораживали. Хранили при температуре -18°C .

Методика посева культур из замороженного состояния.

Микроцентрифужные пробирки с замороженными культурами выдерживали 2-3 часа при $4-8^{\circ}\text{C}$ (в бытовом холодильнике), а затем высевали их содержимое в объёме 0,25-0,5 мл на тот же вариант среды, на котором микоплазмы были заморожены. Инкубировали стандартным образом.

3.1.10 Проведение ПЦР для смывов со слизистых оболочек и для культур

ПЦР-анализ смывов использовали в качестве «референтного метода» для оценки общего количества положительных образцов (рисунок 4). Так же методом ПЦР выборочно подтверждали наличие или отсутствие роста на жидких и полужидких средах.

Выделение ДНК из исследуемого материала проводили с помощью готового коммерческого набора реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-В вариант 100» («НекстБио», Россия). Выявление ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma* производили методом рутинной ПЦР с использованием готовой коммерческой тест-системы «МИК-КОМ» («ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора», Россия) по инструкции производителя. Амплифицированные фрагменты ДНК анализировались методом горизонтального электрофореза в 2 % агарозном геле.

3.1.11 Молекулярно-генетическая идентификация клонов

Для видовой идентификации клонов (чистых культур) микоплазм амплифицировали полную нуклеотидную последовательность межгенного пространства 16S/23S рРНК методом рутинной ПЦР, используя праймеры *Myc1* (прямой; 5'-CACCGCCCGTCACACCA-3') и *Myc2* (обратный; 5'-CAAGGCATCC-ACCAAAААСТСТ-3'), сконструированные V.J. Chalker и J. Brownlie [65]. Реакцию проводили в конечном объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала 5 мкл ДНК-

матрицы; по 10 пмоль прямого и обратного праймеров; 5 ед. Taq-полимеразы или HS-Taq ДНК-полимеразы; 0,25 мМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата (deoxynucleoside triphosphates, **dNTPs**); 10 мМ Трис-HCl (pH = 9,0); 50 мМ KCl; 0,1 % тритона X-100; 1,5 мМ MgCl₂.

Буфер для ПЦР, смесь dNTPs и фермент полимеразу брали в виде готовых растворов промышленного производства («Ветбиохим», Россия) и смешивали в объёме 15,25; 2,5 и 0,25 мкл соответственно. К полученной реакционной смеси добавляли по 1,0 мкл прямого и обратного праймеров в концентрации 10 пмоль/мкл и 5 мкл ДНК-матрицы.

Для проведения реакции использовали следующие температурно-временные режимы: 5 минут при 95 °С; 35 циклов: 20 секунд при 95 °С, 20 секунд при 54 °С, 30 секунд при 72 °С; 5 минут при 72 °С.

Аmplified фрагменты ДНК анализировались методом горизонтального электрофореза в 2 % агарозном геле. Размеры амплифицированных фрагментов оценивали в сравнении с ДНК-маркером. Для проведения секвенирования амплифицированные фрагменты вырезали из агарозного геля при просмотре на трансиллюминаторе и выделяли ДНК, используя готовые коммерческие наборы по методике производителя. Для секвенирования ДНК по двум цепям использовали те же прямой и обратный праймеры Мус1 и Мус2, что и для проведения ПЦР, в концентрации 3,2 пмоль/мкл. Нуклеотидную последовательность определяли при помощи секвенирования ПЦР-продукта по методу Сэнгера с использованием набора «Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit» («Applied Biosystems», США) согласно инструкции изготовителя.

Для анализа полученных нуклеотидных последовательностей пользовались пакетом программ «BioEdit» (version 7.0.0. Copyright © 1997-2004; «Ibis Biosciences», США) и программой «SeqMan» из пакета программ «Lasergene» (version 7.1.0. (44) Copyright © 1993-2006; «DNASTAR», США). Сравнительный компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программы «BLAST» (Basic Local Alignment Search Tool) [8].

3.1.12 Рутинная ПЦР для выявления микроорганизмов рода *Ureaplasma*

ПЦР для выявления микроорганизмов рода *Ureaplasma* проводилась с использованием описанных в литературе праймеров – прямого: 5'-GGGTGCGAC-GTATCAGATAGTTG-3' и обратного: 5'-TGTGGCTGTTCTACCTCTCAGTACA-3' [26]. Прямому праймеру было присвоено название Urea1, а обратному – Urea2, поскольку авторы публикации не дали им собственных обозначений. Для проведения реакции использовали готовую реакционную смесь «Экстра-микс для ПЦР HS-Taq PCR» («Диаэм», Россия). Реакцию проводили в конечном объеме 25 мкл (5 мкл ДНК-матрицы и по 1 мкл прямого и обратного праймеров в концентрации 10 пмоль/мкл добавляли к 18 мкл готовой реакционной смеси) при температурно-временных режимах: 5 минут при 95 °С (добавлены к режиму авторов для активации HS-Taq ДНК-полимеразы, входящей в состав готовой реакционной смеси); 40 циклов: 15 секунд при 95 °С, 8 секунд при 65 °С, 8 секунд при 72 °С; 5 минут при 72 °С. Амплифицированные фрагменты ДНК, наработанные методом рутинной ПЦР, анализировались методом горизонтального электрофореза в 2 % агарозном геле. Размер специфического продукта амплификации – 84 п.о.

В качестве положительного контроля реакции использовали ДНК одного из кошачьих изолятов, давшего в реакции специфический продукт ожидаемого размера. Секвенирование этого ПЦР-продукта выполнено в компании «Евроген». Сравнительный компьютерный анализ полученных нуклеотидных последовательностей, проведённый с помощью программы «BLAST», показал наибольшую идентичность с *Ureaplasma felinum*.

Автор выражает искреннюю благодарность: заведующей лаборатории микоплазм и L-форм бактерий ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России профессору, д.б.н. И.В. Раковской – за предоставление материалов по культивированию микоплазм и консультацию по организации проведения культуральных работ; сотрудникам лаборатории молекулярной диагностики подразделения Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, в особенности к.б.н. А.Г. Южакову (старший научный сотрудник) и член-корреспонденту РАН, профессору, д.б.н.

Т.В. Гребенниковой (руководитель лаборатории) – за консультации и за помощь в области молекулярной биологии; сотрудникам отдела генодиагностики инфекционных болезней животных Отделения биотехнологии Испытательного центра ФГБУ «ВГНКИ», в особенности Е.А. Лазаревой (заместитель заведующей отделом) и к.б.н. С.П. Яцентюк (заведующая отделом) – за проведение ПЦР-анализа отдельных проб; заведующему терапевтическим отделением ветеринарного центра «Северное сияние» и ветеринарному врачу частного приюта для кошек «Муркоша» В.А. Скороходову, а также ветеринарному врачу – индивидуальному предпринимателю В.В. Григоровой – за содействие при сборе образцов биоматериала.

3.2 Результаты исследований

3.2.1 Оптимизация и стандартизация состава культуральных сред

Многообразие видов микоплазм, способных паразитировать на слизистых оболочках собак и кошек, требует подбора универсальной среды, пригодной для роста каждого из них, что трудно осуществимо в одной пробирке – главным образом, по причине различия оптимальной рН для разных родов и видов. Посев каждого образца на комбинацию (набор) из нескольких вариантов среды помогает решить эту задачу. Мы использовали 9 вариантов среды, различающихся по плотности или содержанию энергетических добавок (таблица 2). В состав сред, предложенный М. Ogata [163], были внесены следующие изменения:

1) В классической методике М. Ogata все варианты среды готовятся из жидкой основы среды, которая названа *жидкой средой В* [163, 185]. Также взяв за основу *жидкую среду В*, мы исключили из её состава ацетат таллия, так как его присутствие обычно приводит к небольшой задержке роста уреоплазм [1]. Из неё стандартно получали *жидкую среду с глюкозой (жГ)*, *жидкую среду с аргинином (жА)* и *жидкую среду с мочевиной (жМ)*.

2) Кроме жидких и твёрдых сред нами были добавлены к числу использующихся полужидкие среды, содержащие 0,3 % агара. Их нередко применяют для выращивания микоплазм и ахолеплазм, рост которых на полужидкой среде с таким содержанием агара замечен лучше, чем на жидкой, и

имеет своеобразный, свойственный только микоплазмам вид [14, 19]. Они содержали глюкозу или аргинин, называясь соответственно *полужидкой средой с глюкозой* (пГ) или *полужидкой средой с аргинином* (пА).

3) Вместо *твёрдой среды В* для выращивания микоплазм и ахолеплазм, содержащей 1,2 % агара и не включающей ни одну из трёх энергетических добавок, мы использовали 2 твёрдых среды – *твёрдую среду с глюкозой* (тГ) и *твёрдую среду с аргинином* (тА), в которые входили 1,5 % агара и соответствующая энергетическая добавка. *Твёрдую среду с мочевиной*, наоборот, исключили – колонии уреаплазм на твёрдых и полужидких средах очень мелкие, их сложно бывает заметить, даже используя микроскоп [14, 19]. Для обнаружения уреаплазм у нас, таким образом, осталась только одна среда жМ.

4) Используемые М. Ogata варианты среды с отдельными энергетическими добавками были дополнены 2 новыми, содержащими их смеси. Им были присвоены названия *полужидкая двойная среда* (пГА, содержащая глюкозу и аргинин) и *твёрдая тройная среда* (тГАМ, содержащая глюкозу, аргинин и мочевины). Количество энергетических добавок в новых смешанных средах было снижено в два раза по сравнению со средами, где их использовали порознь. Добавление вариантов пГА и тГАМ позволило получить более плавный переход рН в разных вариантах среды:

Добавка:	М	А	ГА, ГАМ	Г
рН:	6	7	7,5	8

5) По М. Ogata мазки можно брать непосредственно в *жидкую среду В*. При необходимости транспортировки образцов к жидкой основе среды следует добавить 0,1 % агара. В качестве *среды для взятия образцов биоматериала* мы использовали *жидкую среду В* (без ацетата таллия) с 0,1 % агара, которой было присвоено название среда «Old». Для повышения селективности методики использовали также собственные модификации среды для взятия образцов с амоксиклавом и/или цефепимом совместно с бензилпенициллином или вместо него. Они получили названия «АК», «С» и «АК+С» (таблица 3).

Следует отметить, что наиболее значимые изменения в составе сред заключались в добавлении к жидким и твёрдым средам полужидких сред с 0,3 % агара, на которых рост микоплазм имеет своеобразный, отличный от других бактерий вид, а также в получении плавного перехода pH в разных вариантах среды за счёт добавления вариантов пГА и тГАМ. Для стандартизации состава при приготовлении сред пользовались имеющими постоянный стабильный состав компонентами промышленного производства.

3.2.2 Отбор наиболее удобных для работы вариантов среды.

Снижение числа ПЕ для посева 1 образца до 10,5

(включая слепые пассажи)

Для усовершенствования методики изоляции микоплазм требовалось подобрать оптимальную комбинацию (набор) для посева 1 образца из полученных вариантов среды, имеющих разную плотность (жидкие, полужидкие, твердые) и содержащих 3 необходимые различным родам и видам микоплазм энергетические добавки (глюкозу, аргинин, мочевины). Предложенные нами 9 вариантов среды (таблица 2) позволяют составить множество комбинаций. Для создания оптимального набора необходимо было отобрать и включить в него варианты среды, дающие наиболее чёткие и наглядные результаты при работе с ними и обладающие наилучшими чувствительностью и специфичностью. Максимально возможные простота и удобство методики рассматривались как необходимая составляющая для её дальнейшего использования в ветеринарных лабораториях.

Анализ каждого образца проводился в соответствии со схемой, приведённой на рисунке 4. Для посева были взяты 10 мазков с конъюнктивы, из зева и из носовых ходов у животных *группы 1*. ПЦР-анализ 10 смывов, взятых одновременно с мазками с тех же анатомических мест, позволил оценить общее количество положительных образцов (как «референтный» метод). Визуальная оценка наличия или отсутствия роста на жидких и полужидких средах проверялась методом ПЦР для всех засеянных пробирок. Кроме того, содержимое всех пробирок было микроскопировано. С каждой из чашек Петри, на которых был зафиксирован рост микоплазм, так же микроскопировали 1-2 мазка с отдельных колоний.

В первой (пробной) вариации методики изоляции микоплазм для посева каждого образца использовали 7 вариантов среды (то есть ПЕ), различающихся по плотности или содержащейся энергетической добавке: жГ, жА, жМ, пГ, пА, а также тГ и тА (рисунок 5А). В отличие от М. Ogata, при посеве не делали серию десятикратных разведений для засеянных жидких или полужидких сред. От пересевов с серией десятикратных разведений при изменении цвета какой-либо из засеянных сред в процессе инкубирования тоже отказались. Через 1 неделю после посева выборочно сделали слепой пассаж для пробирок, в которых не наблюдалось роста, но микоплазмы были обнаружены методом ПЦР в смывах с того же анатомического места. Среднее количество ПЕ для одного образца, включая первичный посев и слепые пассажи, составило:

$$105 \text{ (69 засеянных пробирок и 36 чашек Петри) : 10 (образцов) } = \\ = 10,5 \text{ «посевных единиц»}.$$

Поскольку для проверки правильности визуальной оценки наличия или отсутствия роста микоплазм на жидких и полужидких средах был использован ПЦР-анализ, потребовалось отработать способ выделения генетического материала (общей ДНК) из культур микоплазм. В дальнейшем он же был использован при типировании микоплазм молекулярно-генетическими методами. Методики, прилагающиеся к стандартным наборам для выделения ДНК, разработаны для анализа различных биологических жидкостей (цельная кровь, её плазма или сыворотка, сперма, истечения и другие) или смывов со слизистых оболочек. Мы же имели дело с культуральной средой сложного состава, отдельные составляющие которой могут ингибировать ПЦР, если не будут полностью отделены от ДНК в процессе пробоподготовки.

Было апробировано несколько способов введения культуры в пробоподготовку: культуральную среду полностью убирали в виде надосадка после осаждения клеток микоплазм центрифугированием и ресуспендировали оставшиеся клетки в физиологическом растворе; разбавляли культуральную среду физиологическим раствором в разных пропорциях; и, наконец, просто запускали её в пробоподготовку в необработанном виде, ресуспендировав клетки в среде

встряхиванием на вортексе. Результаты ПЦР для всех испытанных способов оказались соизмеримы. Полученные пробы содержали большое количество ДНК микоплазм – они были положительными в ПЦР с использованием тест-системы «МИК-КОМ» вплоть до разведений в один миллион раз ($\times 10^{-6}$). Оптимальным для работы оказалось разведение в 10.000 раз ($\times 10^{-4}$) – интенсивность свечения в электрофореze была для него примерно такой же, как у положительного контроля реакции (рисунок 6).

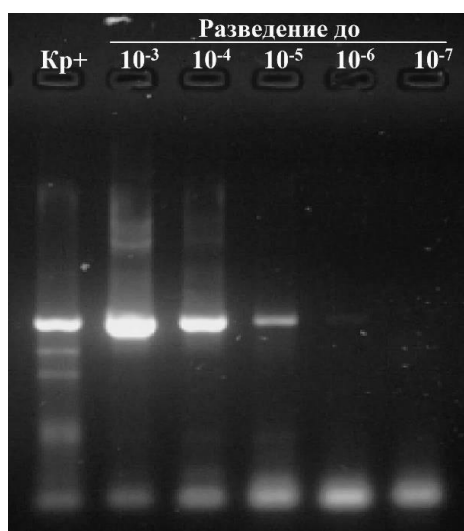


Рисунок 6 – Электрофореграмма продуктов рутинной ПЦР для культуры, которую ресуспендировали перед пробоподготовкой.

Серия десятикратных разведений, разведения от $\times 10^{-3}$ до $\times 10^{-7}$.

Kp⁺ – положительный контроль реакции

Фактически, с помощью культивирования на селективной среде мы концентрировали ДНК микоплазм, одновременно минимизируя количество примесной ДНК (из нормофлоры слизистых оболочек и эпителиальных клеток хозяина), что ещё больше увеличивает чувствительность реакции и снижает риск образования неспецифических продуктов.

Поскольку разные способы введения культуры в пробоподготовку оказались эквивалентными, можно использовать самый простой из них – ресуспендировать клетки в культуральной среде. Способ показал хорошие результаты как для жидких, так и для полужидких сред.

Проводя визуальную оценку (простой осмотр) полужидких сред, считали положительным результатом не только типичный для микоплазм рост (в форме «штришков», «кометок» или «шариков»), но и выраженное помутнение, которое могло сопровождаться либо не сопровождаться изменением цвета. Для жидких сред за положительный результат засчитывали образование осадка или помутнение, а также явное изменение цвета. Как для жидких, так и для полужидких сред результат расценивали как слабopоложительный ($\pm$), если признаки роста были выражены не явно (едва заметное изменение цвета и/или помутнение).

При ПЦР-анализе содержимого пробирок результат расценивали как слабopоложительный ($\pm$), если в электрофорезе наблюдалась плохоразличимая полоса. Это не является общепринятой практикой, но было сделано нами, поскольку культуры с выраженным ростом дают полосы очень высокой интенсивности свечения (см. рисунок 6). Такое разделение результатов культивирования и ПЦР на положительные (+) и слабopоложительные ($\pm$) является немного субъективным, но было необходимо для сравнения этих методов и примерной оценки чувствительности и специфичности первой вариации методики.

Результаты визуальной оценки наличия роста для всех вариантов среды и ПЦР-анализа культур для всех жидких и полужидких вариантов среды данного посева приведены в таблице 5. Если для рассматриваемого варианта среды результаты визуального осмотра и ПЦР-анализа культуры совпадали (+ и +; $\pm$ и $\pm$; – и –), в ячейке таблицы 5 нет никаких дополнительных пометок. Если же они различались, ячейка таблицы выделена цветом (красным при «завышенном» визуальном результате и зелёным – при «заниженном»). В последнем столбце таблицы 5 дополнительно приведены результаты исследования методом ПЦР смывов, взятых с того же анатомического места, что и мазок (конъюнктивы, слизистые оболочки носовых ходов или зев) в соответствии со схемой, приведённой на рисунке 4.

Таблица 5 – Сопоставление результатов визуальной оценки наличия роста на различных вариантах среды пробного посева с результатами ПЦР-анализа культур

Место отбора пробы	Осмотр посевов / ПЦР культур					Осмотр посевов		ПЦР смывов
	Варианты среды					Варианты среды		
	жГ	жА	жМ	пГ	пА	тГ	тА	
Больная кошка								
Глаза	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+	+	+
Нос	+ / ±	+ / ±	+ / ±	± / -	± / -	-	-	+
Зев	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+	+	+
Здоровая кошка								
Глаза	+ / -	- / -	- / -	- / -	+ / -	-	-	-
Зев	- / -	+ / -	- / -	- / ±	± / -	-	-	±
Больная собака								
Глаза	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	-	-	-
Зев	± / +	+ / +	± / +	+ / +	± / +	-	-	±
Здоровая собака								
Глаза	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	-	-	-
Нос	+ / +	+ / +	+ / +	+ / -	+ / +	-	-	+
Зев	+ / +	+ / +	+ / -	+ / +	+ / +	-	-	+

Оказалось, что среди 50 пробирок посева с жидкими и полужидкими вариантами среды при визуальной оценке:

- ✓ результат при осмотре был «завышен» по сравнению с ПЦР-анализом культуры, то есть признан положительным (+) против слабоположительного (±) в ПЦР или слабоположительным (±) против отрицательного (-) в ПЦР – **в 16 случаях (32,0 % от общего числа);**
- ✓ результат при осмотре был «занижен» по сравнению с ПЦР-анализом культуры, то есть признан отрицательным (-) против слабоположительного (±) в ПЦР или слабоположительным (±) против положительного (+) в ПЦР –

в 4 случаях (8,0 %). В одном из них (2,0 %) реально не увидели роста (культура была оценена визуально как отрицательная, а по ПЦР она оказалась слабоположительной).

Таким образом, «завышение» результатов наблюдали при использованных критериях оценки значительно чаще, чем «занижение», особенно для жидких вариантов среды.

Образец в целом считали положительным по бактериологическому посеву, если рост микоплазм отмечался хотя бы на одной из засеянных им ПЕ. Обобщённые результаты посева для 10 образцов данного эксперимента приведены в таблице 6. При визуальной оценке положительными были признаны 9 из 10 исследованных образцов. По результату «референтной» оценки методом ПЦР идентичных смывов (в соответствии со схемой на рисунке 4) общее число положительных образцов составило 7 из 10 (таблица 6). Единственный образец, оцененный как отрицательный при культивировании, был отрицательным и по ПЦР соответствующих ему смывов. 2 образца оказались оцененными как положительные при визуальном осмотре посевов и отрицательными при исследовании методом ПЦР идентичных им смывов. ПЦР-анализ культур также не подтвердил истинного наличия роста микоплазм в засеянных этими 2 образцами жидких и полужидких вариантах среды, поэтому их признали ложноположительными по результатам самостоятельного использования первой (пробной) вариации методики бактериологического посева.

Таким образом, по суммарному результату бактериологического посева и ПЦР-анализа культур и смывов положительными признаны 7 из 10 образцов. Простой осмотр посевов (их визуальная оценка) дал 2 *ложноположительных* результата (ложноположительные по посеву образцы выделены в таблице 6 красным цветом и символом ↑). Из этого вытекает, что специфичность первой (пробной) вариации методики составляет всего 33,3 %. «Занижения» обобщённого результата посева при визуальной оценке не наблюдалось ни разу – *ложноотрицательных образцов не было*. Следовательно, чувствительность такой вариации методики близка к 100 %.

Таблица 6 – Суммарные результаты пробного посева на 10,5 ПЕ

Происхождение образца	Бактериологический посев		ПЦР смывов
	Осмотр посевов	ПЦР культур	
Кошки			
Больная, глаза	+	+	+
Больная, нос	+	±	+
Больная, зев	+	+	+
↑Здоровая, глаза	+	—	—
Здоровая, зев	±	±	±
Собаки			
Больная, глаза	—	—	—
Больная, зев	+	+	±
↑Здоровая, глаза	+	—	—
Здоровая, нос	+	+	+
Здоровая, зев	+	+	+

Обозначения в таблице:

Графа «Осмотр посевов» – обобщённый результат самостоятельного использования бактериологического посева образца (без дополнения методом ПЦР, только по визуальной оценке);

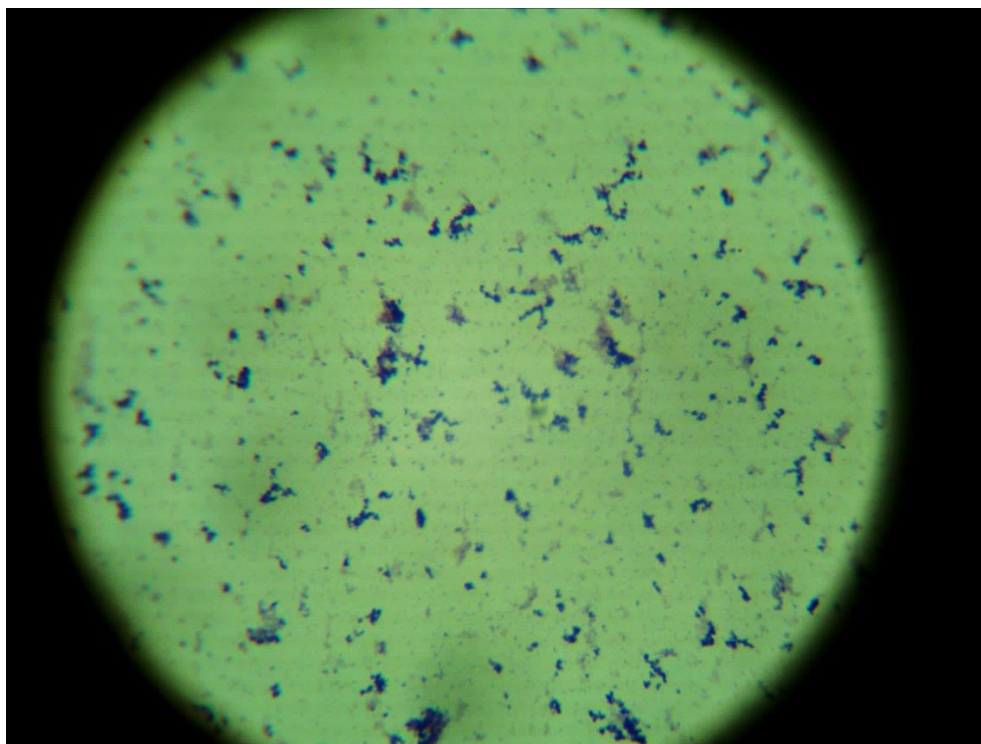
Графа «ПЦР культур» – обобщённый результат исследования методом ПЦР на наличие микоплазм содержимого всех пробирок с посевом образца;

Графа «ПЦР смывов» – контроль методом ПЦР смывов, одновременно взятых со слизистой оболочки того же анатомического места;

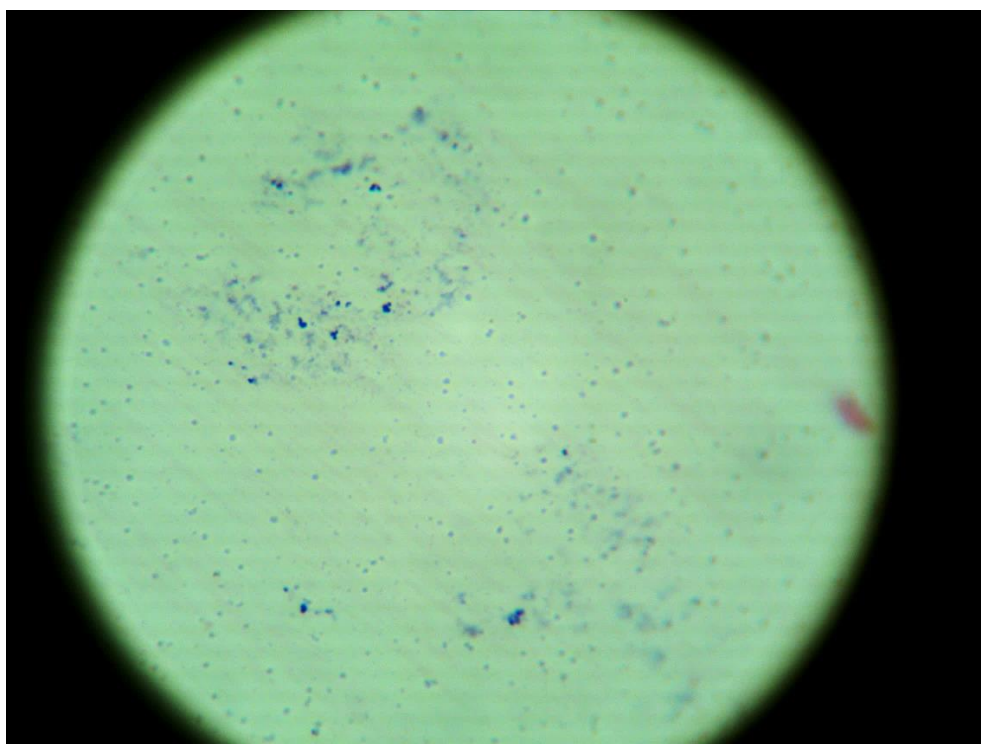
↑ – для образца обобщённый результат самостоятельного использования первой (пробной) вариации методики бактериологического посева «завышен» по сравнению с оценкой наличия роста на засеянных им вариантах среды методом ПЦР (*ложноположительные по бактериологическому посеву результаты*).

Вероятно, иногда причиной «завышения» результатов при осмотре пробирок являлась устойчивая к бензилпенициллину примесная микрофлора, принятая за микоплазмы с неспецифическим характером роста.

Микроскопия. Микоплазмы можно окрашивать по Граму (они окрашиваются грамотрицательно – красные) или по Романовскому-Гимзе (светло-фиолетовые, рисунок 7); окраска по Романовскому-Гимзе считается более информативной [4].



А



Б

Рисунок 7 – Типичный вид мазка при микроскопии культур микоплазм (окрашивание по Романовскому-Гимзе, увеличение светового микроскопа в 1600 раз).

А – обильное количество микоплазм в поле зрения; Б – более обычная картина из нескольких клеток или скоплений клеток в поле зрения

Согласно схеме, приведённой на рисунке 4, подвергли микроскопической оценке содержимое всех без исключения засеянных пробирок этого пробного эксперимента (как первичный посев, так и слепые пассажи), используя оба способа окрашивания. Результат микроскопии содержимого каждой пробирки тоже сравнивали с результатом её культивирования и ПЦР-анализа культуры. Со всех чашек Петри, на которых был отмечен рост, также микроскопировали мазки для 1-2 отдельных колоний. Всего было микроскопически исследовано содержимое 74 пробирок и чашек Петри после культивирования, из них:

- ✓ результат был «завышен» *в 14 случаях (18,9 % от общего числа подвергнутых микроскопическому исследованию ПЕ)*, когда посчитали, что нашли микоплазм в мазках из отрицательных по культивированию и ПЦР-анализу пробирок;
- ✓ результат был «занижен» *в 10 случаях (13,5 %)*. При этом в 9 из них (12,2 %) при хорошем росте, подтверждённом методом ПЦР, в мазке было очень мало микоплазм, и *в 1 случае (1,4 %)* их совсем не удалось обнаружить (причём мазок был получен с колонии на твёрдой среде).

Поскольку при проведении микроскопии получено *большое количество ложноположительных результатов*, она практически непригодна для проверки наличия или отсутствия роста в случае с микоплазмами. Вероятно, из-за отсутствия типичной формы клетки и её чрезвычайно мелких размеров за микоплазмы при увеличении светового микроскопа в 1600 раз (объектив 100 × окуляр 16) часто принимались различные артефакты, например, прилипшие к стеклу крошечные частички краски. Распознать микоплазмы в образцах с примесной микрофлорой оказалось особенно сложно.

Выбор наиболее удобных для работы вариантов среды. При разработке сред для микоплазм с добавкой бензилпенициллина предполагалось, что такие среды будут селективными. Но с 1983 года многие бактерии приобрели резистентность к этому антибиотику, поэтому селективность сред в наши дни стала условной. Так, несмотря на наличие в составе всех сред бензилпенициллина, при микроскопии посевов первой (пробной) вариации методики в них иногда обнаруживались

немикоплазменные примеси – палочки, кокки и дрожжеподобные микроорганизмы (в составе нормофлоры содержится немало разных микробов). В результате снижения селективности среды разной плотности (жидкие, полужидкие и твёрдые) стали различаться по специфичности при выращивании микоплазм – в зависимости от наличия или отсутствия свойственного только микоплазмам характера роста на них. По результатам тестирования пробной методики были сделаны следующие выводы относительно специфичности и чувствительности вариантов среды с используемым содержанием агара:

1) На твёрдых средах рост микоплазм исключительно характерен – колонии похожи на «яичницу-глазунью» или «медузу» (рисунок 8А). Такой рост не требует какого-либо дополнительного подтверждения или проверки, и специфичность твёрдых сред очень высока. Однако, по полученным в ходе этого эксперимента данным, на твёрдых средах микоплазмы растут менее охотно, чем на жидких и полужидких. Рост наблюдали только на 4 из 14 чашек Петри с посевом 7 оказавшихся положительными образцов – всего в 28,6 % случаев (см. таблицу 5). Таким образом, чувствительность посева на твёрдые среды низкая.

2) На полужидких средах с 0,3 % агара микоплазмы обычно тоже дают достаточно характерный рост – различные разновидности крошковатых колоний в виде «штришков», «кометок» или «шариков», равномерно взвешенных в среде (рисунок 8Б). Рост примесной микрофлоры на полужидких средах резко отличался – он был более обильным и лишённым чётких форм. Правда, иногда на полужидкой среде вырастают слишком мелкие колонии микоплазм, которые дают только её помутнение. Такую форму роста трудно как распознать, так и отличить от роста других бактерий. Приняв помутнение за рост микоплазм без дополнительного подтверждения другими методами, можно получить ложноположительный результат, поэтому такой способ учёта результатов снижает специфичность полужидких сред по сравнению с твёрдыми. Если пренебречь при учёте результатов ростом без образования типичных микоплазменных крошковатых колоний, полужидкие среды займут по специфичности и чувствительности среднее положение между твёрдыми и жидкими.

3) На жидких питательных средах рост микоплазм не имеет ярко выраженных, свойственных только микоплазмам, особенностей – обычно это образование мелкого светлого осадка, оседающего на дно пробирки. Образование осадка не всегда сопровождается изменением цвета среды. В отдельных случаях на жидких средах тоже наблюдали образование маленьких «шариков» (рисунок 8В), однако оно скорее является исключением. Помутнение, образование осадка и/или изменение цвета среды (связанное с её закислением или защелачиванием) может быть вызвано и ростом посторонней микрофлоры. Нежный микоплазменный осадок трудно бывает отличить и от осадка, образующегося при оседании белков из содержащейся в средах сыворотки крови. В результате жидкие среды имеют самую низкую специфичность среди использованных.

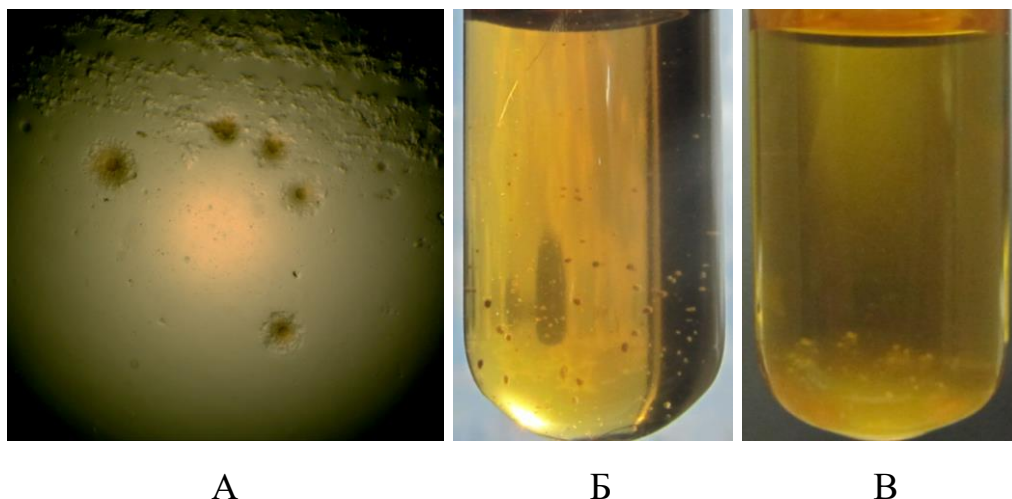


Рисунок 8 – Особенности микоплазменного роста на средах разной плотности:
А – «колонии-яичницы» на твёрдой среде при увеличении светового микроскопа в 64 раза; Б – колонии-«шарики» на полужидкой среде;
В – «шарики» на жидкой среде (редко)

Полученные результаты показали, что апробированная первая (пробная) вариация методики не до конца удовлетворяет современным условиям и требует дальнейшей доработки в следующих трёх направлениях:

1. Если рост отмечался в пробирке со слепым пассажем, он проявлялся и в пробирке, из которой тот был сделан, в ходе её дальнейшего инкубирования. Поэтому решено было исключить неинформативные слепые пассажи, используя, таким образом, для посева 1 образца не более 7 пробирок и чашек Петри вместо 20-50, как предлагается у М. Ogata (см. пункт 2.5.4). Это сокращает число ПЕ в 5-7 раз.

2. Считывать результаты роста на твёрдых и полужидких средах использованной плотности оказалось намного проще и надёжнее, чем на жидких. Решено было продолжить снижение числа ПЕ для высева одного образца за счёт пробирок с жидкой средой, при этом на оставшихся полужидких и твёрдых вариантах среды положительными считать только посевы, в которых наблюдается типичный микоплазменный рост. На полужидких средах это различные разновидности крошковатых колоний – в виде «штришков», «кометок» и «шариков», на твёрдой среде это «колонии-яичницы» или «медузы».

Поскольку колонии уреаплазм даже на полужидких и твёрдых средах очень мелкие, их посевы на эти среды не имеют особенного, свойственного исключительно им вида. Поэтому для индикации уреаплазм в наборе сред оставили только одну среду – жидкую с мочевиной. О наличии в образце уреаплазм должно говорить соответствующее используемому индикатору изменение цвета среды (при расщеплении уреаплазмами мочевины рН меняется в щелочную сторону, и среда с феноловым красным меняет цвет с жёлтого на розовый).

3. Иногда типичные колонии микоплазм на полужидких и твёрдых средах удавалось различить на фоне роста примесной микрофлоры, но в общем он препятствует считыванию результатов. Поэтому необходимо подобрать более современные антибиотики или их комбинации и повысить таким образом селективность среды, что увеличит и общую специфичность методики.

3.2.3 Выбор оптимального места взятия проб из верхнего респираторного тракта у кошек и собак

Проведённое нами исследование образцов от животных *группы 1* (пункт 3.2.2) предсказуемо показало, что при наличии у животного микоплазм в носовых ходах, они обнаруживаются у него и на слизистой оболочке зева, а на конъюнктиве глаз их при этом может не быть (таблица 6). Для больной кошки рост в посевах мазка из зева был чище и интенсивнее, чем в посевах мазка из носа. Это подтвердило и ПЦР-исследование содержимого пробирок после культивирования – для мазка из носа количество ДНК микоплазм в культурах на всех вариантах среды было существенно ниже, чем для мазка из зева (рисунок 9). Смывы с зева

тоже содержали больше ДНК микоплазм, чем смывы из носа. Это довольно легко объяснимо – сложно проникнуть стандартным зондом-тампоном в носовые ходы кошек и мелких собак достаточно глубоко, чтобы взять у сопротивляющегося животного образец на анализ твёрдым мазком. Кроме того, получаемый из носовых ходов материал обычно загрязнён катаральным или катарально-гнойным отделяемым, а также обитающей на коже и шерсти микрофлорой.

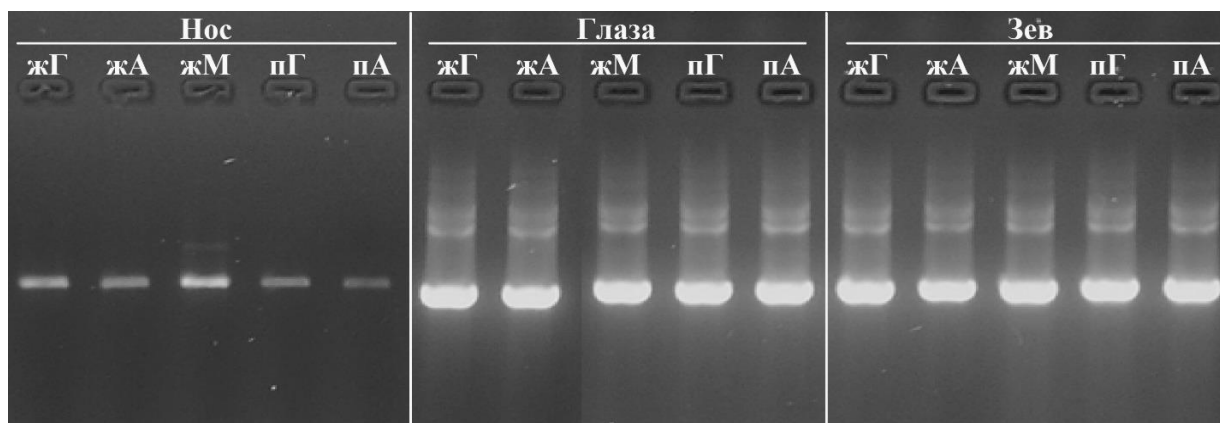


Рисунок 9 – Электрофореграмма продуктов рутинной ПЦР для культур, полученных при посеве мазков из носа, с конъюнктивы и из зева кошки (различные варианты жидких и полужидких сред)

Таким образом, было установлено, что предпочтительнее выбрать для взятия мазков из верхнего отдела респираторного тракта с целью выявления микоплазм у кошек не носовые ходы, а зев. Для собак такие мазки, вероятно, тоже будут более информативными.

3.2.4 Подбор оптимальной схемы посева патологического материала от собак и кошек для выявления микоплазм

Для того, чтобы подобрать оптимальный состав набора сред для посева 1 образца биологического материала, работу продолжили только с образцами из верхнего респираторного тракта, поскольку в нём микоплазмы встречаются у собак и кошек существенно чаще, чем на конъюнктиве [91, 138, 172, 173, 182]. У животных *группы 2* отбирали пробы из зева, так как было установлено, что для верхнего респираторного тракта зев предпочтительнее носовых ходов (пункт 3.2.3).

Основываясь на полученных предварительных результатах (пункт 3.2.2), при продолжении подбора оптимальной комбинации из разных вариантов среды для

посева 1 образца были выбраны 3 схемы: из 6-7 ПЕ, из 5 ПЕ и из 3 ПЕ (рисунок 5). Для 3 образцов повторили посев на набор сред из 6-7 ПЕ (рисунок 5А, вариативность числа ПЕ в рамках этой схемы связана с использованием либо двух твёрдых сред с отдельными энергетическими добавками – тГ и тА, либо одной твёрдой среды с их смесью – тГАМ). Посев 12 образцов произвели на набор сред из 5 ПЕ (рисунок 5В), в котором из жидких вариантов среды была оставлена только среда жМ для детекции уреаплазм, а остальные среды были полужидкими или твёрдыми. Оставшиеся 2 образца посеяли на набор сред минимального состава, включающий только 2 твёрдых среды (тГ и тА) и жидкую среду с мочевиной (жМ) для детекции уреаплазм (рисунок 5Б).

От проведения слепых пассажей полностью отказались. При учёте результатов для полужидких и твёрдых вариантов среды положительными считали только посевы, в которых наблюдался типичный микоплазменный рост (крошковатые колонии в виде «штришков», «кометок» и «шариков» или «колонии-яичницы», соответственно). Для среды жМ отслеживали лишь изменение цвета, свидетельствующее о наличии в образце уреаплазм. Обобщённый результат бактериологического посева мазка сравнивали с результатом ПЦР смыва, одновременно взятого с зева того же животного.

Оба метода (бактериологический посев мазков и анализ смывов методом ПЦР) выявили микоплазм в зеве всех 17 животных *группы 2*, поэтому оценить частоту получения *ложноположительных* результатов (характеризующую специфичность набора) при посеве на наборы сред этих 3 составов в данном эксперименте оказалось невозможно. *Ложноотрицательных* результатов (являющихся показателем низкой чувствительности набора) не было получено ни для одной из апробированных схем, несмотря на сокращение числа ПЕ и ужесточение способа учёта результатов.

Среди засеянных этими положительными образцами чашек Петри из 6 со смешанной твёрдой тройной средой тГАМ рост наблюдали в 4 (66,7 %), из 13 со средой тГ – в 9 (69,2 %), а из 6 со средой тА – только в 2 (33,3 %). Таким образом, среды тГ и тГАМ оказались примерно сопоставимы между собой и, вероятно, они

более предпочтительны для использования, чем среда тА. В целом предварительный вывод о том, что хотя рост микоплазм собак и кошек на твёрдых средах имеет очень характерный вид, он наблюдается реже, чем на полужидких или жидких средах, сделанный после завершения пробного эксперимента (пункт 3.2.2), подтвердился. Поэтому **минимальный набор сред**, состоящий из **3 ПЕ** (1 жидкой среды – жМ, и 2 твёрдых сред – тГ и тА; рисунок 5Б), имея высокую специфичность, будет обладать меньшей чувствительностью, чем наборы, включающие полужидкие или другие жидкие среды. Этим набором можно воспользоваться, если важно избежать ложноположительных результатов.

Полный набор сред из **6-7 ПЕ** (3 жидких среды – жГ, жА, жМ, 2 полужидких среды – пГ и пА, а также 2 либо 1 твёрдых среды – тГ и тА либо тГАМ; рисунок 5А) будет иметь низкую специфичность за счёт сложности учёта результатов на жидких средах. Он может быть полезен в случаях, когда особое значение имеет не пропустить ни одного положительного образца.

Набор промежуточного размера, состоящий преимущественно из полужидких сред и включающий **5 ПЕ** (1 жидкую среду – жМ, 3 полужидких среды – пГ, пА и пГА, и 1 твёрдую среду – тГ либо тГАМ; рисунок 5В), признан **оптимальным** среди апробированных как по предполагаемым (исходя из свойств включённых в него вариантов среды) чувствительности и специфичности, так и по удобству использования.

Если при визуальной оценке посевов не пренебрегать помутнением полужидких сред, а засчитывать его за сомнительный результат ($\pm$) и дополнительно проверять методом ПЦР – например, с помощью хорошо зарекомендовавшей себя тест-системы «МИК-КОМ», чувствительность набора предположительно станет выше. Схема исследования мазка по такому комплексному методу, где посев на признанный оптимальным набор сред из 5 ПЕ дополнен избирательным ПЦР-анализом культур, представлена на рисунке 10. Обнаружение признаков роста уреоплазм на среде жМ тоже можно проверять методом ПЦР, исследовав полученную культуру в реакции для обнаружения представителей рода *Ureaplasma* (см. пункт 3.1.12).



Рисунок 10 – Схема комплексного метода исследования образца, взятого с конъюнктивы или со слизистых оболочек верхнего респираторного тракта собаки либо кошки

Проверка специфичности выбранной схемы посева на 5 ПЕ. Сравнение её чувствительности с чувствительностью ПЦР. Поскольку все 17 образцов от животных *группы 2* оказались положительными, сочли целесообразным провести предварительную проверку специфичности выбранного набора сред из 5 ПЕ на образцах, взятых повторно у двух животных *группы 1* (здоровых кошки и собаке), для которых обобщённые результаты бактериального посева мазков из глаз в ходе первого (пробного) эксперимента (пункт 3.2.2) были признаны ложноположительными при соотнесении с результатами анализа смывов из их глаз методом ПЦР (таблица 6). У них были повторно взяты и исследованы образцы из глаз и зева. Исследование каждого образца проводили комплексным методом в соответствии со схемой на рисунке 10.

Для собаки мазки и смывы из глаз были взяты четырежды в течение одной недели. Рост на твёрдых средах не был зафиксирован ни для одной из засеянных чашек Петри, а в большинстве пробирок с полужидкими средами вместо типичного роста в виде крошковатых колоний наблюдали лишь помутнение и небольшое изменение цвета – такой результат был оценен как слабopоложительный или сомнительный ($\pm$). Проверка содержимого засеянных пробирок на наличие

микоплазм методом ПЦР подтвердила наличие слабого роста. По обобщённым результатам посева 2 мазка были оценены как отрицательные, один – как слабоположительный, и один – как положительный. Из 4 смывов, исследованных методом ПЦР, 2 также оказались отрицательными, один – слабоположительным, и один – положительным (рисунок 11). Таким образом, наличие микоплазм удалось подтвердить только в 2 из 4 проанализированных проб для обоих методов, то есть микоплазмы выявлялись лишь в половине случаев (таблица 7).

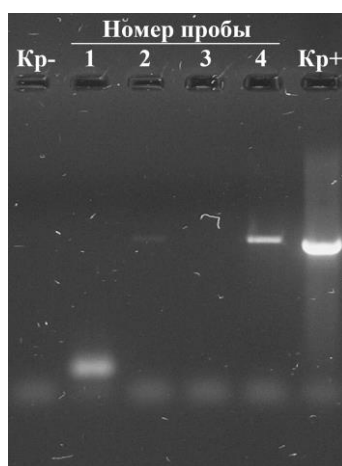


Рисунок 11 – Электрофореграмма продуктов рутинной ПЦР (тест-система «МИК-КОМ») для смывов с конъюнктивы здоровой собаки, отобранных четырежды в течение одной недели.

Проба № 4 положительная; проба № 2 – слабоположительная.

Кр⁻ и Кр⁺ – отрицательный и положительный контроли реакции

Таблица 7 – Результаты исследования методами бактериологического посева и ПЦР образцов с конъюнктивы здоровой собаки, отобранных четырежды в течение одной недели

№ пробы	Бактериологический посев		ПЦР смывов
	Осмотр посевов	ПЦР культур	
1	–	–	–
2	–	–	±
3	+	+	–
4	±	±	+

Мазки и смывы из зева здоровой собаки, а также из глаз и зева здоровой кошки, отбирались при предварительной проверке специфичности набора сред из 5 ПЕ однократно. Результаты, полученные для всех образцов от этих двух животных, обобщены в таблице 8. Строки с номером 2 соответствуют данному

(повторному) исследованию. Для глаз собаки представлен усреднённый результат четырёх проб, обозначенный как $\pm$ для обоих методов (поскольку было получено равное количество положительных и отрицательных результатов – см. таблицу 7). Результаты для тех же животных в рамках первого исследования (таблица 6 пункта 3.2.2), приведены для сравнения, им соответствуют строки с номером 1.

Таблица 8 – Объединённые результаты двукратного исследования образцов из глаз и зева здоровых собаки и кошки

Место взятия	Номер исследования	Бактериологический посев		ПЦР смывов
		Осмотр посевов	ПЦР культур	
Собака				
Глаза	1	+	—	—
	2	±	±	±
Зев	1	+	+	+
	2	+	+	+
Кошка				
Глаза	1	+	—	—
	2	±	±	+
Зев	1	±	±	±
	2	±	±	—

Из таблиц 7 и 8 видно, что визуальная оценка роста при использовании оптимального набора сред из 5 ПЕ хорошо совпадает с анализом культур методом ПЦР – ложноположительных результатов больше нет, то есть специфичность методики повысилась. Однако в целом, за исключением однозначно положительных проб из зева собаки, результаты бактериологического исследования мазков и результаты изучения смывов методом ПЦР не всегда соответствуют друг другу, а кроме того, результаты исследования чередуются, обнаруживая микоплазм в одном и том же анатомическом месте одного и того же животного через раз. Вероятно, это объясняется тем, что в глазах данной собаки, так же как в глазах и зеве данной кошки, обитает очень небольшое количество микоплазм, находящееся на границе чувствительности обоих методов. Исходя из полученных результатов можно сделать вывод, что чувствительность рекомендуемой нами вариации методики посева на 5 ПЕ соизмерима с чувствительностью ПЦР при использовании тест-системы «МИК-КОМ».

Таким образом, продолжение оптимизации набора сред позволило снизить число ПЕ для каждого исследуемого образца с 20-50 у М. Ogata до 10,5 в первой (пробной) вариации методики и до 5 в окончательном её варианте. Окончательный вариант разработанной нами бактериологической методики предполагает посев каждого образца на набор из **5 ПЕ**, включающий среды пГ, пА, пГА, жМ (для детекции уреазы) и любую из двух твёрдых сред – тГАМ или тГ (рисунок 5В). При учёте результатов предлагается пренебречь ростом без образования типичных микоплазменных колоний на полужидких и твёрдых средах, а для среды жМ отслеживать лишь изменение цвета, свидетельствующее о наличии в образце уреазы. Дополнение такой методики избирательным ПЦР-анализом для полужидких вариантов среды с сомнительным результатом роста ($\pm$) формирует инновационный комплексный метод (см. рисунок 10), объединяющий бактериологические и молекулярно-генетические методы.

Для тщательной проверки разработанной бактериологической методики и оценки целесообразности её дополнения избирательным ПЦР-анализом требовалось исследовать большее количество образцов и подсчитать чувствительность и специфичность предложенной бактериологической методики отдельно и в составе комплексного метода. Эту задачу решено было совместить с подбором более современных антибиотиков или их комбинаций (см. пункт 3.2.2).

3.2.5 Подбор оптимальной комбинации антибиотиков в составе среды для взятия образцов биоматериала у собак и кошек

В состав селективных сред для культивирования микоплазм собак и кошек, предложенных М. Ogata в 1983 году, входит антибиотик бензилпенициллин. Со времени разработки этой классической методики многие бактерии приобрели к нему резистентность. В результате при проведении экспериментов нам нередко приходилось наблюдать, что в посевах на эти чрезвычайно питательные среды начинался активный рост других микробов, который не позволял обнаружить нежный рост микоплазм. Поэтому было решено подобрать антибиотики, в большей степени соответствующие нынешним условиям.

Подбор антибиотиков в составе среды для взятия образцов биоматериала из зева собак. Проверка чувствительности и специфичности бактериологической методики и комплексного метода при выявлении микоплазм в собачьих образцах. Для образцов от собак апробировали 2 новых модификации среды для взятия образцов. Первая содержала смесь бензилпенициллина с амоксиклавом (её называли «*АК*»), вторая – смесь бензилпенициллина с цефепимом (она была названа «*С*»). Классической среде для взятия образцов с бензилпенициллином было присвоено название «*Old*».

Мазки из зева были взяты у 114 собак *группы 3*. Из них 51 мазок отбирали с использованием среды «*Old*», 14 – среды «*АК*» и 49 – среды «*С*». Посев каждой пробы производили на признанный оптимальным набор сред из **5 ПЕ** (рисунок 5В). Обобщённый результат культивирования мазка сравнивали с результатом ПЦР смыва, одновременно взятого с зева того же животного. Результаты приведены в таблицах 9 и 10.

Среды для взятия образцов биоматериала «*Old*» и «*АК*» показали практически идентичные результаты – рост примесной микрофлоры обнаруживался в 33,7 и 32,9 % засеянных с них пробирок и чашек Петри соответственно (рисунок 12). Ложноотрицательных образцов не было, то есть чувствительность предложенного варианта бактериологической методики при отборе образцов на среды «*Old*» и «*АК*» оказалась близка к 100 %.

Для среды «*С*» число проростов сократилось до 11,4 % (практически в 3 раза), но при этом и чувствительность самостоятельно используемой методики бактериологического посева (без дополнения ПЦР-анализом), снизилась до 89,8 % при сравнении с «референтными» результатами, полученными методом ПЦР для смывов. Использование методики в рамках комплексного метода, подразумевающего дополнительную проверку с помощью ПЦР слабоположительных и сомнительных культур ($\pm$) на полужидких вариантах среды, повысило чувствительность до 98,0 %.

Таблица 9 – Частота выявления в посевах микоплазм и сопутствующей примесной микрофлоры при отборе проб в разные модификации среды для взятия образцов биоматериала или в физиологический раствор

Среда для взятия образцов	Получено положительных образцов			Общее число ПЕ	Рост посторонней микрофлоры, число ПЕ (%)
	По ПЦР смывов	Среди выявленных методом ПЦР оказались положительными			
		по бакпосеву: только осмотр посевов	по бакпосеву: с дополнительной ПЦР культур ²		
Собаки					
«Old»	51 из 51	51 (100 %)	—	255	86 (33,7 %)
«AK»	14 из 14	14 (100 %)	—	70	23 (32,9 %)
«C»	49 из 49	44 (89,8 %)	48 (98,0 %)	245	28 (11,4 %)
Физ. раствор	8 из 9	3 (37,5 %)	6 (75 %)	45	17 (37,8 %)
Кошки					
«Old»	15 из 26	12 (80,0 %)	14 (93,3 %)	130	38 (29,2 %)
«AK»	7 из 41	5 (71,4 %)	6 (85,7 %)	205	34 (16,6 %)
«AK+C»	29 из 41	20 (69,0 %)	23 (79,3 %)	205	35 (17,1 %)

Таблица 10 – Сравнение чувствительности предложенной методики бактериологического посева при самостоятельном использовании и в виде включающего её в свой состав комплексного метода

Среда для взятия образцов		Чувствительность, %		Число проростов, %
		Методика бактериологического посева (без дополнения ПЦР)	Комплексный метод	
«Old»	собаки	100	100	33,7
	кошки	80,0	93,3	29,2
«AK»	собаки	100	100	32,9
	кошки	71,4	85,7	16,6
«C»	собаки	89,8	98,0	11,4
«AK+C»	кошки	69,0	79,3	17,1

Поскольку среди исследованных образцов снова не было отрицательных (ПЦР-анализ выявил микоплазмы в смывах с зева всех испытуемых собак), провести оценку специфичности предложенного варианта бактериологической методики и комплексного метода выявления микоплазм на образцах от собак оказалось невозможным.

² Проведена избирательно для сомнительных образцов (пробирки с полужидкими средами, оцененные как $\pm$, то есть не имеющие типичного микоплазменного роста).

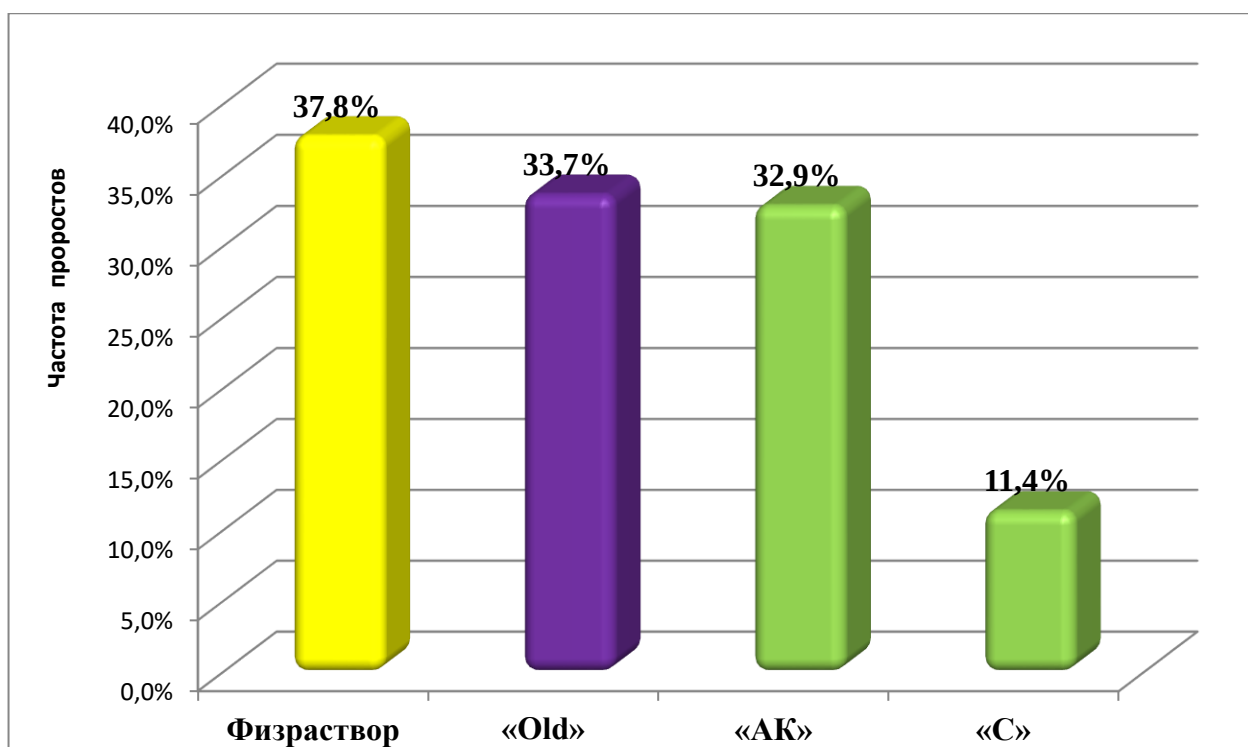


Рисунок 12 – Частота роста примесной микрофлоры в посевах образцов от собак при использовании разных модификаций среды для взятия образцов биоматериала: «Old» – с бензилпенициллином; «AK» – с бензилпенициллином и амоксиклавом или «C» – с бензилпенициллином и цефепимом

Подбор антибиотиков в составе среды для взятия мазков из зева и с конъюнктивы кошек. Проверка чувствительности и специфичности бактериологической методики и комплексного метода при выявлении микоплазм в кошачьих образцах. Для кошек были апробированы 2 новые модификации среды для взятия образцов. Первой из них была среда «AK» с бензилпенициллином и амоксиклавом, которую уже испытали на собаках. Её использовали для пробоотбора с конъюнктивы. Вторая содержала смесь амоксиклава и цефепима (ей было присвоено название «AK+C»). На среду «AK+C» брали мазки из зева. Классической средой «Old» пользовались при отборе мазков как из зева, так и с конъюнктивы.

Мазки (либо из зева и с конъюнктивы, либо – в единичных случаях – только из зева) были взяты у 56 кошек *группы 4*. Для ужесточения условий тестирования предложенного варианта методики с использованием собственных модификаций среды для взятия образцов в группу 4 кроме кошек, проживающих у частных владельцев, включили кошек из приюта (количество тех и других животных было

приблизительно одинаковым). Всего исследовано 108 мазков. Из них 26 мазков (и из зева, и с конъюнктивы) брали с использованием среды «*Old*», 41 (только с конъюнктивы) – среды «*AK*» и 41 (только из зева) – среды «*AK+C*». Посев каждой пробы производили на признанный оптимальным набор сред из 5 ПЕ (рисунок 5В). Обобщённый результат культивирования мазка сравнивали с результатом ПЦР смыва, одновременно взятого у той же кошки с того же анатомического места. Результаты приведены в таблицах 9 и 10.

У кошек обе новых модификации среды для взятия образцов биоматериала «*AK*» и «*AK+C*» снижали число проростов в посевах почти в 2 раза по сравнению со средой «*Old*» – с 29,2 до 16,6 и 17,1 % соответственно (рисунок 13).

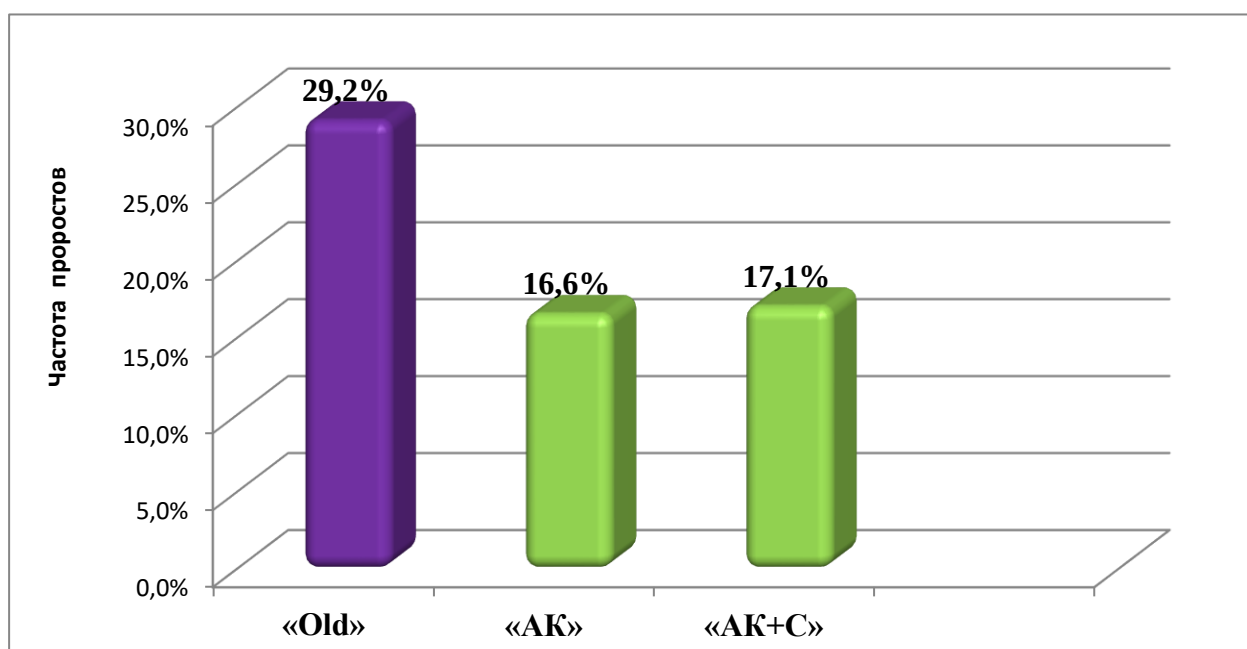


Рисунок 13 – Частота роста примесной микрофлоры в посевах образцов от кошек при использовании разных модификаций среды для взятия образцов биоматериала: «Old» – с бензилпенициллином; «AK» – с бензилпенициллином и амоксиклавом или «AK+C» – с амоксиклавом и цефепимом

Однако чувствительность методики при взятии проб на любую из апробированных модификаций среды, включая классическую среду «*Old*», оказалась ниже, чем у собак. Методика бактериологического посева при её самостоятельном использовании (без дополнения визуальной оценки посевов ПЦР-анализом сомнительных культур) показала чувствительность 80 % для среды «*Old*», 71,4 % для среды «*AK*» и 69,0 % для среды «*AK+C*» (таблица 10). В рамках

предложенного комплексного метода чувствительность повысилась до 93,3 % для среды «*Old*», до 85,7 % для среды «*AK*» и до 79,3 % для среды «*AK+C*», но всё равно была ниже, чем при применении комплексного метода с использованием аналогичных модификаций среды для взятия образцов у собак (таблица 10).

В образцах от проживающих в приюте кошек резистентная примесная микрофлора, как и ожидали, встречалась чаще, чем у кошек частных владельцев. При посеве взятых с использованием среды «*Old*» мазков от 12 животных из приюта рост примесной микрофлоры наблюдался в 45,7 % случаев (в 28 ПЕ из 60 засеянных). Новые антибиотики хорошо зарекомендовали себя и для приютских животных. Для каждой из 2 новых модификаций среды, апробированных на кошках, по 20 мазков были взяты у кошек из приюта. Их использование также снизило число проростов в посевах по сравнению со средой «*Old*» почти в 2 раза: для среды «*AK*» проросты выявили в 27,0 % случаев (в 27 из 100 засеянных ПЕ), а для среды «*AK+C*» – в 23,0 % случаев (в 23 из 100 засеянных ПЕ).

Среди 108 кошачьих смывов, исследованных методом ПЦР, микоплазм не выявили в 57. При посеве 54 из соответствующих этим смывам мазков результат культивирования был отрицательным. Оставшиеся 3 мазка из 57 (все на среде «*AK+C*») были оценены как положительные, поскольку на некоторых из засеянных ими вариантов среды наблюдался типичный микоплазменный рост. Правильность интерпретации наличия роста на этих вариантах среды подтвердилась при исследовании культур методом ПЦР, поэтому правильнее считать данные 3 образца не ложноположительными, а **дополнительно выявленными положительными образцами**. Из этого следует, что специфичность предложенного варианта методики бактериологического посева и комплексного метода выявления микоплазм в образцах от собак и кошек близка к 100 %.

Общее количество выявленных обоими методами положительных образцов у кошек составило, таким образом, 54 штуки (51 выявили при проведении ПЦР смывов и 3 – дополнительно выявили с помощью комплексного метода). Исходя из этих данных, в рамках используемой техники проведения работ чувствительность метода ПЦР при его применении в монорежиме можно оценить в 94,4 %.

Таким образом, тщательная проверка усовершенствованной бактериологической методики на 222 образцах от собак и кошек показала хорошие результаты в отношении её селективности, чувствительности и специфичности. В сочетании с «подращиванием» на разработанных модификациях среды для взятия образцов биоматериала, содержащих современные бактерицидные антибиотики, методика вполне пригодна для самостоятельного использования, особенно при исследовании образцов от собак. Однако, если есть возможность, целесообразно дополнить предложенную бактериологическую методику избирательным ПЦР-анализом полученных культур, поскольку чувствительность сформированного таким способом комплексного метода выше, чем чувствительность самостоятельного использования бактериологической методики. На рисунке 14 изображена итоговая схема комплексного метода исследования 1 собачьего или кошачьего образца, включающая «подращивание» биоматериала, взятого с использованием авторских модификаций среды для взятия образцов.



Рисунок 14 – Схема комплексного метода исследования образца с «подращиванием» на авторских модификациях среды для взятия биоматериала перед проведением посева

3.2.6 Оптимизация взятия патологического материала у собак и кошек для выявления микоплазм

Оценка возможности использования физиологического раствора для взятия образцов биоматериала. Одной из возможных проблем при пробоотборе в полевых условиях является отсутствие контейнеров со специальной средой для взятия образцов биоматериала. Следуя рекомендациям некоторых руководств [14], мы проверили возможность отбора проб в стерильный физиологический раствор. При этом пользовались стерильными ватными зондами-тампонами и обычными нестерильными эппендорфами, заполненными стерильным физиологическим раствором промышленного производства, как это делают обычно в клиниках при взятии проб на ПЦР-анализ. Поскольку среды для посева задуманы как селективные и содержат антибиотик бензилпенициллин, было выдвинуто предположение, что такой способ пробоотбора окажется приемлемым.

Мазки были взяты из зева 9 здоровых собак *группы 5* и посеяны на признанный оптимальным набор сред из **5 ПЕ** (рисунок 5В). Смывы с зева стандартно отбирались и анализировались методом ПЦР. Согласно ПЦР 8 из 9 смывов оказались положительными. Самостоятельное использование разработанной методики бактериологического посева при таком способе пробоотбора позволило выявить лишь 3 из этих 8 положительных образцов, то есть её чувствительность составила 37,5 %, существенно уступая результатам всех предшествующих экспериментов. При этом рост посторонней микрофлоры наблюдался в 17 из 45 засеянных ПЕ, что составляет 37,8 % и превышает все остальные полученные для этого показателя результаты (таблицы 9 и 10).

Хотя число проростов при отборе проб в физиологический раствор увеличилось умеренно (оно всего на 4-5 процентов выше, чем для модификаций среды для взятия образцов «*Old*» и «*AK*» у собак, таблица 9), чувствительность методики значительно снизилась. По-видимому, выживаемость микоплазм при таком способе их хранения перед посевом существенно снижается по сравнению с хранением в контейнерах со специальной средой для взятия образцов.

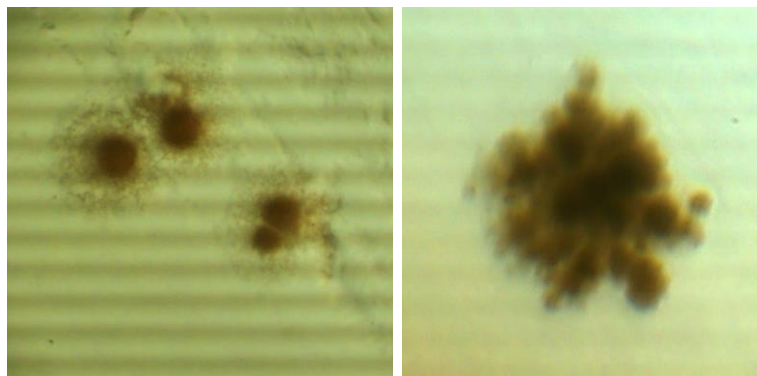
Дополнительная проверка методом ПЦР сомнительных ($\pm$) культур на полужидких средах (тех, в которых характерный крошковатый микоплазменный рост отсутствовал, но были хотя бы незначительные изменения цвета или мутности по сравнению с незасеянным контролем) позволила выявить ещё 3 положительных образца, повысив чувствительность до 75 %. Но это увеличило затраты времени (ПЦР-анализ культур потребовался для большинства засеянных полужидких вариантов среды), и работа с такими образцами оказалась более трудоёмкой.

Оценка возможности замораживания взятого мазка до проведения посева. Для моделирования ситуации, когда невозможно доставить взятый в полевых условиях мазок в лабораторию в течение суток, провели оценку возможности его хранения в замороженном состоянии до проведения посева.

Для пробоотбора выбрали здоровую собаку *из группы 1*, для которой носительство микоплазм в респираторном тракте уже было дважды подтверждено (таблица 8). Пользуясь средой «*Old*», у неё одновременно взяли два мазка из зева. Первый из них посеяли сразу, а второй – после хранения в замороженном виде (при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 10 суток. Для создания более жёстких условий посев произвели на имеющий самую низкую чувствительность среди апробированных минимальный набор сред из **3 ПЕ** – тГ, тА и жМ. Результат оказался положительным для обоих мазков (рост оба раза наблюдался только на среде тГ). Характер роста микоплазм после заморозки немного изменился – при небольшом увеличении микроскопа их колонии напоминали не «яичницу», а, скорее, «ягоду ежевики», поскольку имели не один, а несколько выросших центров (рисунок 15).

Таким образом, было установлено, что применять для взятия проб вместо контейнеров со специальной средой для взятия образцов биоматериала подручные материалы, например, эппендорфы с физиологическим раствором, обычно используемые в ветеринарных клиниках для взятия смывов на ПЦР-анализ, нецелесообразно из-за увеличения роста посторонних микроорганизмов в посевах (несмотря на наличие в культуральных средах бензилпенициллина) и снижения чувствительности методики почти в 3 раза.

Замораживание отобранных с использованием специальной среды для взятия образцов биоматериала мазков на несколько суток с последующей отправкой в лабораторию на лёду можно считать допустимым в случаях, когда быстрые доставка и посев по какой-то причине невозможны.



А

Б

Рисунок 15 – Колонии микоплазм на твёрдой среде с глюкозой, посев мазков от собаки (увеличение светового микроскопа в 64 раза):
А – без предварительной заморозки; Б – после хранения мазка в замороженном виде в течение 10 суток

3.2.7 Оптимизация клонирования и молекулярно-генетического типирования микоплазм собак и кошек

Эффективность клонирования с твёрдых сред. Для большинства животных характерно одновременное носительство нескольких видов микоплазм [1]. Смешанная микоплазменная флора неразличима в образцах морфологически, но осложняет биохимическое, серологическое или молекулярно-генетическое типирование. Поэтому для проведения видовой идентификации все выделенные изоляты, представляющие, как правило, смешанные культуры, должны быть клонированы с целью получения чистых культур, причём хорошей практикой считается получение и идентификация нескольких клонов из каждого образца.

Как и в остальных бактериологических процедурах, в получении чистых культур микоплазм существует ряд отличительных особенностей. Микоплазмы разных видов, содержащиеся в изоляте, склонны объединяться в небольшие конгломераты, в результате чего при пересеве жидкой культуры на более плотные среды выросшие отдельные колонии не всегда однородны (являются потомками одной клетки). Поэтому однократный перенос отдельной колонии с содержащей

агар питательной среды (полужидкой, плотной или твёрдой) на свежую жидкую среду часто не приводит к получению чистой культуры. С целью разрушения конгломератов и снижения концентрации микоплазм методики их клонирования нередко включают предварительное разбавление исходной жидкой культуры в серии десятикратных разведений или её фильтрование (иногда – последовательное) через бактериальные фильтры с диаметром пор от 450 до 220 нм. Все полученные при разведении или фильтровании исходной культуры производные высеваются на твёрдые среды для дальнейшего отбора и пересева отдельных колоний. Саму процедуру такого клонирования повторяют обычно несколько раз [14, 220].

Мы клонировали все изоляты на твёрдых средах, полученные при первичных посевах мазков от животных *групп 1 и 2* в ходе подбора оптимальной схемы посева (пункты 3.2.2 и 3.2.4). Исключение составили чашки Петри с обильным ростом очень мелких колоний, с которых невозможно было отобрать отдельные колонии. Единичные колонии микоплазм захватывали бактериологической петлёй вместе с небольшим фрагментом твёрдой среды. Одинаково удобным оказалось делать пересев таких колоний как на жидкие, так и на полужидкие среды с той же энергетической добавкой. При этом полужидкие среды пробовали засевать либо «уколом» («столбиком»), либо внесением колонии с последующим взбалтыванием содержимого. При взбалтывании считывать результат было проще.

Из отобранных с 17 чашек Петри 78 отдельных колоний рост на жидких или полужидких средах был зафиксирован для 59 клонов (75,6 %), а для оставшихся 19 (24,4 %) он отсутствовал. Для отдельных клонов (условно-чистых культур) была проведена процедура переноса с жидкой или полужидкой среды обратно на твёрдую (без разведения или фильтрования) с последующим повторением процедуры клонирования 1-2 раза. Полученные клоны избирательно проверили на видовую гомогенность и пригодность для дальнейшего молекулярно-генетического типирования.

Молекулярно-генетическое типирование клонов. Для работы в этом направлении нами использовалась методика секвенирования микоплазм, разработанная для образцов от собак (пункт 2.5.5) [65]. Мы выбрали «родовые» праймеры Мус1 и Мус2, предназначенные для амплификации полной нуклеотидной последовательности межгенного пространства 16S/23S рРНК представителей рода *Mycoplasma* [65], поскольку оно демонстрирует у представителей класса Mollicutes большее разнообразие, чем ген 16S рРНК [225]. Анализ имеющихся в GenBank последовательностей межгенного пространства 16S/23S рРНК для эталонных штаммов показал, что продукты реакции с использованием праймеров Мус1 и Мус2 для основных видов микоплазм собак и кошек будут иметь длину от 357 п.о. до 483 п.о. (таблица 11).

Таблица 11 – Ожидаемая длина продуктов рутинной ПЦР с «родовыми» праймерами Мус1 и Мус2 для основных видов микоплазм собак и кошек согласно анализу нуклеотидных последовательностей эталонных штаммов (из банка данных GenBank)

Вид микоплазм	Длина фрагмента, п.о.	Источник получения энергии (по Хоулт Дж. и др., 1997 [24])
<i>M. gateae</i>	357	А
<i>M. canadense</i>	359	А
<i>M. arginini</i>	362	А
<i>M. spumans</i>	370	А
<i>M. arthritidis</i>	400	А
<i>M. cynos</i>	449	Г
<i>M. molare</i>	453	Г
<i>M. lipophilum</i>	468	А
<i>M. pulmonis</i>	469	Г
<i>M. sp. strain VJC 358</i>	469	Г
<i>M. canis</i>	469	Г
<i>M. felis</i>	471	Г
<i>M. hyopharyngis</i>	471	А
<i>M. edwardii</i>	475	Г
<i>M. opalescens</i>	478	А
<i>M. bovis genitalium</i>	478	—
<i>M. sp. strain HRC 689</i>	480	Г
<i>M. maculosum</i>	483	А

Обозначения: А – аргинин, Г – глюкоза. Жирным шрифтом помечены виды, которые выделяли и от собак, и от кошек.

С момента выхода публикации V.J. Chalker & J. Brownlie (2004) прошло более 10 лет, и приборная база существенно улучшилась. Поэтому, сохранив авторские температурные режимы, удалось сократить время денатурации и гибридизации во всех реакциях до 20 секунд, а время элонгации – до 30 секунд, существенно уменьшив общее время реакции. Для проведения такой «родовой» реакции оптимальным оказалось разведение экстрагированной из культур микоплазм ДНК в 100 раз ($\times 10^{-2}$).

Электрофореграмма продуктов рутинной ПЦР с «родовыми» праймерами Мус1 и Мус2 для 5 клонов, полученных однократным клонированием одного из изолятов, приведена на рисунке 16. Оказалось, что для 4 клонов из 5 однократная процедура клонирования позволила достаточно полно разделить 2 присутствующих в образце вида микоплазм (получены чистые культуры), а в одном клоне они остались в виде смеси (культура по-прежнему является смешанной).

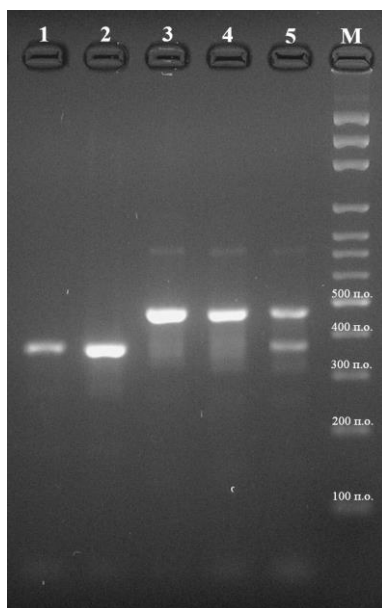


Рисунок 16 – Электрофореграмма продуктов рутинной ПЦР с «родовыми» праймерами Мус1 и Мус2 для 5 клонов, полученных путём однократного клонирования одного из изолятов (со среды тГ на среду пГ).

Все полосы с длиной около 360 п.о. (клоны 1, 2, нижняя полоса клона 5) идентифицированы как M. spumans; а с длиной около 470 п.о. (клоны 3, 4, верхняя полоса клона 5) – как M. canis. М – метчик

Секвенирование по методу Сэнгера нескольких клонов, являющихся продуктами однократно проведённого клонирования, но выглядящих гомогенно на

электрофореграмме (как клоны 1-4 на рисунке 16), позволило получить хроматограммы секвенирования хорошего качества, также указывающие на отсутствие гетерогенности ДНК-матрицы. Сравнительный компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей с помощью программы «BLAST» показал хорошее совпадение с эталонными штаммами микоплазм.

Для неразделённых клонов (как клон 5 на рисунке 16) хорошие результаты дало повторение процедуры клонирования 1-3 раза без приготовления серии разведений или фильтрования посевного материала, рекомендуемых в литературе [14, 220]. Промежуточный ПЦР-контроль позволяет определить, какое из повторений процедуры клонирования является достаточным.

В результате проделанной работы несколько клонов (чистых культур) были успешно идентифицированы с помощью программы «BLAST» как микоплазмы, принадлежащие к видам *Mycoplasma arginini*, *M. canis*, *M. felis*, *M. gateae*, *M. edwardii*, *M. maculosum*, *M. spumans*, *Ureaplasma felinum*.

Клонирование изолятов, в которых была выявлена сопутствующая посторонняя микрофлора, устойчивая к бензилпенициллину. Решено было использовать при деконтаминации два уникальных свойства микоплазм – отсутствие чувствительности к антибиотикам, нарушающим синтез клеточной стенки (которой у микоплазм нет) и способность проходить через бактериальные фильтры диаметром от 450 до 220 нм (в зависимости от вида) [220]. Для разработки методики выбрали 2 изолята от больных кошек, в которых кроме микоплазм при микроскопии были выявлены кокки и дрожжеподобные грибы.

Чтобы избавиться от чужеродных бактерий, изоляты пересеяли на среды, в которые добавили цефепим – антибиотик группы цефалоспоринов IV поколения. После этого для уничтожения дрожжеподобных грибов их пересеяли на среды с добавкой амфотерицина В – противогрибкового антибиотика из группы полиенов. Добавление в среды цефепима приводило к задержке роста по сравнению с предыдущими пассажами на обычных средах (с 3-6 до 8 суток), а амфотерицина В – не только к заметной задержке роста (до 11 суток), но и к значительному снижению его интенсивности.

После высева полученных культур на обычную твёрдую среду, по 2 выросших колонии каждого из изолятов были отсеяны в индивидуальные пробирки с целью клонирования. При этом колонии первого изолята отсеивали на жидкую, а второго – на полужидкую среду. Отказавшись от фильтрования через бактериальные фильтры перед рутинным клонированием, его решили использовать для окончательной доочистки полученных клонов (из-за возможности существования микрофлоры, устойчивой к обоим использованным противомикробным препаратам). Поэтому все 4 клон были отфильтрованы через бактериальные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Процесс фильтрования культур на жидкой и полужидкой среде не имел существенных различий. Культивирование полученных фильтратов на свежих средах показало наличие чистого роста микоплазм умеренной интенсивности. При дальнейшем проверочном пассировании одного из клонов чистый рост микоплазм без признаков наличия какой-либо примесной микрофлоры сохранился в 12 последовательно проведённых пересевах. После этого клон был заморожен.

Таким образом, установлено, что однократного повторения процедуры клонирования (без предварительного разведения культур или их фильтрования через бактериальные фильтры) часто бывает достаточно для относительно чистого разделения видов и их дальнейшей идентификации посредством секвенирования. Если разделение на чистые культуры не было достигнуто с первого раза, процедуру клонирования следует повторить, используя для контроля результата метод ПЦР.

Для изолятов, содержащих устойчивую к бензилпенициллину постороннюю микрофлору, предложен способ деконтаминации в процессе клонирования. Способ включает последовательные пересевы на среду с добавкой антибиотика цефепима и среду с добавкой антимикотика амфотерицина В, за которыми следует доочистка полученных культур путём фильтрования через бактериальные фильтры перед пересевом на обычные варианты питательной среды. Установлено, что добавление цефепима приводит к небольшой задержке роста микоплазм.

3.2.8 Исследование способности микоплазм собак и кошек адаптироваться к используемым питательным средам в серии последовательных пассажей

Исследование способности адаптироваться к используемым питательным средам было избирательно проведено как для некоторых клонов (чистых культур), так и для отдельных изолятов (смешанных культур). Согласно литературным данным, культуры выделенных от животных и птиц микоплазм, ахолеплазм и уреаплазм на жидких и полужидких питательных средах следует хранить в условиях холодильника (+4 °С) не более **25-30 суток** [14]. При попытке делать пересевы с таким интервалом мы наблюдали замедление и снижение интенсивности роста полученных **клонов** (чистых культур) микоплазм вплоть до полного его прекращения через 2-3 пассажа. Наглядная иллюстрация этого явления представлена на рисунке 17: для одного из клонов, идентифицированного как *M. felis*, чётко видно снижение количества ДНК микоплазм в 3 последовательных пассажах при исследовании культур методом ПЦР.

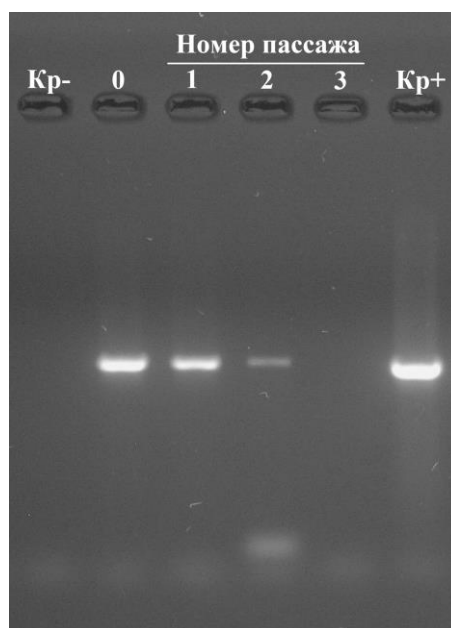


Рисунок 17 – Электрофореграмма продуктов рутинной ПЦР (тест-система «МИК-КОМ») для 3 последовательных пассажей (на среде жГ) клона, идентифицированного как *M. felis*.

0 – культура после клонирования; 1, 2, 3 – номера последующих пассажей. В третьем пассаже ДНК микоплазм не обнаружена.

Kp^- и Kp^+ – отрицательный и положительный контроли реакции

При уменьшении интервала между пересевами для отдельных клонов удалось поддерживать рост в последовательных пассажах в течение достаточного длительного времени. Наилучший результат был получен для клона, также идентифицированного как *M. felis*. Он сохранялся в пересевах 252 дня (8,3 месяца) с момента клонирования, выдержав 21 пассаж со средним интервалом между пересевами **12 суток**, после чего, не утратив явных признаков роста, был заморожен.

Хорошей практикой оказалось вести 2 параллельных линии пассажей для одних и тех же культур. Такой способ проведения пересевов особенно показателен для установления оптимального интервала между ними. Для двух таких параллельных линий после предварительной адаптации нескольких клонов в 9 пассажах мы попытались увеличить интервал между дальнейшими пересевами до 20 суток. Линия, в которой средний интервал между изначальными 9 пассажами был около **9 суток**, перенесла его расширение лучше, чем линия, в которой средний интервал между изначальными 9 пассажами был порядка **11 суток**. Лучше всего сохранялись линии пассажей, где между пересевами проходило **4-7 суток** (то есть клоны пересевали сразу после появления явных признаков роста без промежуточного хранения в холодильнике). Вообще же большинство клонов плохо адаптировалось к используемым питательным средам – рост от пассажа к пассажиу ухудшался, особенно для клонов на средах с аргинином.

Что касается **изолятов** (смешанных культур) первый пассаж, проведённый через 1,5-2 месяца после первичного посева (с промежуточным хранением выросших культур в холодильнике), давал результаты, соизмеримые с первичным посевом. Но в последующем картина была немногим лучше, чем для клонов – от пассажа к пассажиу рост становился менее выраженным, постепенно угасая.

Интересным было наблюдение, что при пересеве культуры из одной пробирки в две идентичные результат не всегда получается одинаковым. Рост может наблюдаться в одной из двух свежесеянных пробирок и отсутствовать в другой или может сопровождаться изменением цвета, соответствующим в одной –

подкислению, а во второй – защелачиванию среды (пожелтение и покраснение соответственно для сред с используемым индикатором феноловым красным).

Было также замечено, что иногда в первичных посевах типичный микоплазменный рост сопровождается изменением цвета среды, противоположным ожидаемому при расходовании микоплазмами имеющейся в среде энергетической добавки – среды с глюкозой могли краснеть, а среды с аргинином или мочевиной – желтеть. Молекулярно-генетическими методами выборочно было подтверждено, что вид выросших микоплазм в таких случаях действительно не соответствует энергетической добавке среды. Так, со среды с мочевиной была клонирована и идентифицирована ферментирующая глюкозу микоплазма вида *M. edwardii*, а со среды с глюкозой – гидролизующая аргинин *M. spumans*. Используя рутинную ПЦР с описанными в литературе праймерами для выявления микроорганизмов рода *Ureaplasma* [26], подтвердили, что при наличии в образце уреаплазм они растут не только на среде с мочевиной, но и на большинстве других используемых нами вариантов среды (рисунок 18).

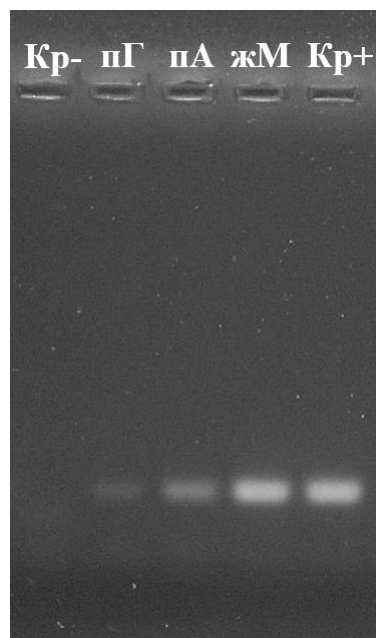


Рисунок 18 – Электрофореграмма продуктов рутинной ПЦР для выявления микроорганизмов рода *Ureaplasma* (с праймерами Urea1 и Urea2).

Посев образца от здоровой собаки на разные варианты среды (пГ, пА и жМ). Специфическая полоса большей или меньшей интенсивности присутствует во всех испытываемых пробах

Рост отдельных видов микоплазм, присутствующих в изоляте, при последовательных пассажах на средах с несоответствующей их потребностям энергетической добавкой мог как затухать, так и усиливаться. На рисунке 19 видно, как в последовательно пересеваемом изоляте за 2 пассажа на среде с глюкозой вид *M. maculosum* (относящийся к «неферментирующим», то есть гидролизующим аргинин) полностью заместился видом *M. spumans* (который тоже относится к гидролизующим аргинин). В первичном посеве этого изолята *M. spumans* присутствовала лишь в следовых количествах (нижняя полоса для лунки, обозначенной на рисунке 19 цифрой «0»).

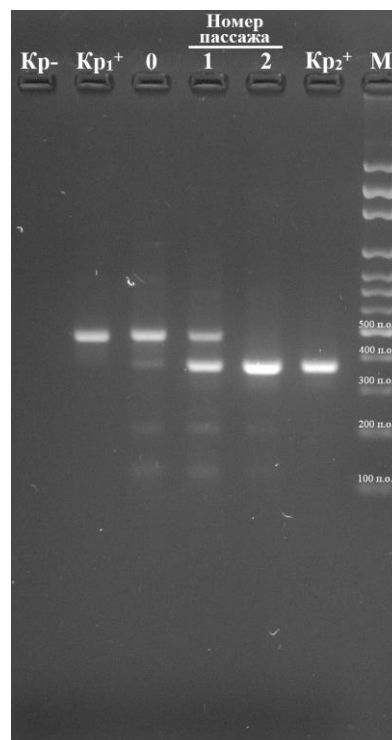


Рисунок 19 – Электрофореграмма продуктов рутинной ПЦР с «родовыми» праймерами Mus1 и Mus2 для последовательных пассажей изолята от здоровой собаки (на среде пГ). 0 – первичный посев; 1, 2 – номер пассажа. Все полосы с длиной около 360 п.о. (для 0, 1 и 2) – идентифицированы как *M. spumans*; а полосы с длиной около 470 п.о. (для 0 и 1) – как *M. maculosum*. Ко второму пассажу основной вид микоплазм в изоляте практически полностью вытеснен изначально присутствующим в следовых количествах видом. Kp_1^+ и Kp_2^+ – положительные контроли реакции (клоны, идентифицированные ранее как *M. maculosum* и *M. spumans* соответственно). Kp^- – отрицательный контроль реакции. М – метчик

Таким образом, общей нашей рекомендацией при необходимости поддержания микоплазм собак и кошек в жизнеспособном состоянии до замораживания или лиофилизации является пассировать культуры не реже, чем каждые 12 суток (в идеале – сразу после появления явных признаков роста). Кроме того, время от времени одновременно с пересевом желательно отбирать и замораживать небольшие (0,5-1,0 мл) порции выросших в очередном пассаже культур (при утрате или очень сильном снижении интенсивности роста какого-то из клонов или изолятов можно будет использовать для его восстановления этот замороженный материал), а также вести параллельно 2 линии пересевов одних и тех же клонов или изолятов (например, одну линию на жидкой, другую – на полужидкой среде), чтобы можно было восполнить переставшие расти в одной линии культуры из другой линии. Хотя нам удавалось достаточно длительно (более 8 месяцев) поддерживать отдельные клоны в пассажах, полной их адаптации к используемым питательным средам не происходило и интенсивность роста от пассажа к пассажиу чаще всего снижалась.

В связи с отсутствием подлинной адаптации к бесклеточным средам и возможностью замены в пересевах преобладающего вида на минорный вне зависимости от энергетической добавки в среде, используемой для пересевов, делать большое количество пассажей представляется нецелесообразным. Если это всё-таки необходимо, вероятно, следует время от времени проводить контроль культур с помощью молекулярно-генетических методов.

3.2.9 Оптимизация хранения микоплазм собак и кошек

Идеальными условиями для хранения штаммов микоплазм считаются хранение в лиофилизированном состоянии (обычно штаммы сохраняют при этом свои свойства в течение 3-5 лет) или в замороженном виде при температуре порядка -65°C (описано хранение штаммов в таких условиях без потери свойств в течение 12 месяцев) [126]. Считается, что выдерживание при температуре -26°C через 10 месяцев приводит к потере жизнеспособности у отдельных штаммов.

Оборудованием для лиофилизации или хранения при очень низких (от -60 до -70°C) температурах располагают не все лаборатории. Поэтому решено было

исследовать возможность хранения изолятов и клонов, полученных от собак и кошек, в условиях умеренно отрицательных температур (-18°C). Для замораживания культуры разливали (по возможности – сразу после появления признаков роста) в стерильные эппендорфы.

Результат возрождения **клонов** (чистых культур) которые хранились в замороженном состоянии **3 и 9 месяцев**, получился практически одинаковым (таблица 12) – в обоих случаях удалось восстановить все клоны, но при этом 10-20 % показали слабый рост (были оценены как $\pm$) и угасли через 2-4 пассажа после разморозки (все на средах с аргинином). Вероятно, сам процесс замораживания-оттаивания оказал на микоплазмы более пагубное воздействие, чем хранение в течение дополнительных 6 месяцев.

Размораживание **изолятов** (смешанных культур) провели через 9, 21 и 35 месяцев (таблица 12). Как и для клонов, после **9 месяцев** в замороженном состоянии удалось восстановить 100 % изолятов. При этом в большинстве изолятов хорошо воспроизводился наблюдавшийся до заморозки типичный микоплазменный рост (в виде «штришков», «кометок», «шариков») на полужидких средах, и только в 20 % наблюдалось их помутнение, засчитываемое нами за сомнительный результат ($\pm$, тоже на средах с аргинином). При разморозке через **21 и 35 месяцев** признаки роста были обнаружены в посевах 80-90 % изолятов. Но типичного роста уже не отмечалось ни в одном из них – все культуры были оценены как сомнительные ($\pm$) и наличие роста пришлось дополнительно подтверждать методом ПЦР. При этом после 35 месяцев (почти 3 года) в заморозке признаки роста были ещё более стёртыми, чем после 21 месяца (более 1,5 лет) – если через 21 месяц визуальная оценка культур и их проверка методом ПЦР полностью совпали, то через 35 месяцев половина положительных по ПЦР культур была оценена как отрицательные визуально (при простом осмотре пробирок). Тем не менее, оказалось, что, хотя длительное хранение в условиях умеренно отрицательных температур снижает интенсивность роста после размораживания, в большинстве изолятов даже через 3 года сохранилось небольшое количество жизнеспособных клеток микоплазм.

Таблица 12 – Результаты восстановления культур после длительного хранения в замороженном состоянии (при –18 °С)

Время хранения, месяцы	Число клонов или изолятов	Результат культивирования после разморозки ³		
		положительный (+)	слабо-положительный (±)	отрицательный (–)
Клоны				
6	10	8 (80 %)	2 (20 %)	–
9	9	8 (88,9 %)	1 (11,1 %)	–
Изоляты				
9	5	4 (80 %)	1 (20 %)	–
21	10	–	8 (80 %)	2 (20 %)
35	17	–	16 (94,1 %)	1 (5,9 %)

Таким образом, было установлено, что при хранении микоплазм собак и кошек в условиях умеренно отрицательных температур (в морозильной камере бытового холодильника при –18 °С) небольшая доля жизнеспособных организмов сохраняется значительно дольше 12 месяцев, как предполагалось ранее. По нашим наблюдениям, изоляты и клоны микоплазм из респираторного тракта и с конъюнктивы собак и кошек на средах с аргинином менее устойчивы как при пассировании, так и при хранении в замороженном виде.

3.3 Обсуждение результатов

Выявления жизнеспособных микоплазм (представителей класса Mollicutes) в патологическом материале, полученном от животных или человека, является актуальной диагностической и научной задачей. Такое положение дел во многом связано с необходимостью дальнейших исследований по выяснению этиологической роли этих необычных бактерии в развитии широкого спектра заболеваний не только у продуктивных или мелких домашних животных, но также и у человека. В периодической печати регулярно появляются статьи и обзоры, свидетельствуют о большой актуальности этой темы [2, 3, 33, 50, 62; 97, 111, 114, 133, 134, 141, 162, 171, 180, 194, 205].

Проведённое исследование было направлено на упрощение микробиологического выявления микоплазм в образцах с конъюнктивы и из

³ Для слабоположительных и отрицательных образцов – по совокупности визуальной оценки и ПЦР культур (то есть с использованием комплексного метода).

респираторного тракта собак и кошек. Большое количество видов, паразитирующих на слизистых оболочках собак и кошек, не позволяет создать одну универсальную среду, пригодную для роста каждого из них. Поэтому для посева каждого образца принято использовать набор из нескольких вариантов среды. В качестве прототипа нами была выбрана методика, разработанная М. Ogata в 1983 году [163] (которая и сама является модификацией методики, предложенной S. Rosendal в 1973 году [182]). М. Ogata предлагает использовать для первичного посева каждого образца 20 пробирок и чашек Петри (рисунок 3). С учетом рекомендуемых дальнейших пересевов с жидких и твердых сред, а также возможных слепых пассажей, число ПЕ, засеянных одним образцом, может достигать при работе по М. Ogata 40-50 штук. Выявление микоплазм таким способом является дорогостоящим (за счёт высокой цены расходующихся в большом количестве сред сложного состава), длительным и трудоёмким. Основные внесённые нами в методику М. Ogata изменения заключаются в следующем:

1) Предложенный нами набор для первичного посева 1 образца состоит всего из 5 ПЕ и включает варианты среды разной плотности (жидкая, полужидкие, твердая), содержащие 3 необходимые различным родам и видам молликут энергетические добавки (глюкозу, аргинин, мочевины) по отдельности или совместно в разных комбинациях и образующие плавный ряд рН от 6,0 до 8,0. На составляющих основу набора полужидких вариантах среды у микоплазм имеется характерный рост, отличающийся от роста других микроорганизмов, поскольку содержание агара увеличено в них по сравнению с классическими методиками [163, 182] с 0,07-0,08 до 0,3 %. К стандартному набору вариантов среды М. Ogata с отдельными энергетическими добавками (глюкоза, аргинин и мочевина) нами добавлены варианты с их смесью в виде сред полужидкая двойная пГА (с глюкозой и аргинином) и твердая тройная тГАМ (с глюкозой, аргинином и мочевиной). Кроме того, нами расширен диапазон рН в наборе за счёт повышения рН для среды с глюкозой с 7,8 до 8,0 и понижения рН для среды с аргинином с 7,3 до 7,0, а также получен более плавный переход рН в разных вариантах среды за счёт стабилизации рН для сред пГА и тГАМ на уровне 7,5.

Поскольку колонии уреаплазм даже на полужидких и твердых средах очень мелкие и особенного «микоплазменного» характера роста у уреаплазм на этих средах нет, для индикации уреаплазм в наборе сред для посева 1 образца оставлена только жидкая среда с мочевиной – жМ.

2) Предложена следующая система учёта результатов посева:

✓ Положительными для полужидких и твёрдых сред считаются только посевы, в которых наблюдается типичный микоплазменный рост. На полужидких средах с таким содержанием агара это различные разновидности крошковатых колоний – в виде «кометок», «штришков» и «шариков» (рисунок 8А). На твердой среде это «колонии-яичницы» или «медузы» (рисунок 8Б).

✓ Образец в целом считается положительным по бактериологическому посеву, если типичный микоплазменный рост отмечается хотя бы в одном из засеянных им вариантов среды.

✓ В случае отсутствия на всех вариантах среды типичного роста, но наличия слабовыраженных изменений (помутнение и/или изменение цвета) для какой-либо из полужидких сред результат засчитывается для неё за сомнительный ($\pm$) и проверяется методом ПЦР. Выявление микоплазм в такой культуре с помощью ПЦР-анализа засчитывается за положительный результат для всего образца.

✓ О наличии уреаплазм говорит соответствующее их росту изменение цвета среды жМ (с желтого на розовый при используемом индикаторе феноловом красном, поскольку рН меняется при расщеплении уреаплазмами мочевины в щелочную сторону). При получении положительного результата на среде жМ его также можно дополнительно подтвердить с помощью ПЦР, исследовав полученную культуру в реакции для определения представителей рода *Ureaplasma*.

3) Слепые пассажи, которые были выборочно проведены в процессе экспериментов по подбору оптимального состава диагностического набора, не выявили преимуществ при бактериологическом исследовании на микоплазмы у собак и кошек и значительно увеличивали сроки исследований. В окончательном варианте методики слепые пассажи полностью исключены как не дающие существенной дополнительной информации, поскольку вместо них при

сомнительном результате культивирования нами используется исследование культур методом ПЦР, позволяющее получить быстрый и надёжный результат.

Использование разработанного нами набора с предлагаемыми критериями оценки результатов формирует новый инновационный комплексный метод, объединяющий бактериологический посев и ПЦР-анализ. Метод обеспечивает быстрое и надежное выявление молликут разных родов и видов. Общее число «посевных единиц» для посева каждого образца в ходе рутинного лабораторного исследования сокращено в нём в 4-10 раз по сравнению с методикой-прототипом.

Для обеспечения селективности методики М. Ogata добавлял в состав сред для культивирования микоплазм собак и кошек антибиотик бензилпенициллин. Со времени разработки этой классической методики многие бактерии приобрели к нему резистентность. В результате при проведении экспериментов нам нередко приходилось наблюдать, что в посевах на эти чрезвычайно питательные среды начинался активный рост других микробов, который часто не позволял увидеть нежный рост микоплазм. Поэтому было решено подобрать антибиотики, в бóльшей степени соответствующие нынешним условиям.

Основной целью при подборе антибиотика было выбрать такой, который не подавляет рост микоплазм, но эффективно работает против других бактерий. Поэтому препаратами выбора стали антибиотики групп пенициллинов и цефалоспоринов. Также нужен был антибиотик, который имеет лекарственную форму, позволяющую получать истинный раствор, поскольку суспензии сделают среду мутной и затруднят учёт результата. При этом антибиотик должен долгое время оставаться стабильным в растворе, поскольку образцы выдерживаются в термостате до 28 суток. Большая же часть антибиотиков указанных групп после растворения довольно нестабильна. Как правило, они выпускаются в виде стерильного порошка во флаконе, а в инструкции к ним содержится рекомендация растворять порошок непосредственно перед внутривенным или внутримышечным введением. Лишь для немногих в качестве особых указаний приводится информация, что приготовленный раствор может храниться в холодильнике несколько часов, дней или недель.

Исходя из вышесказанного наш выбор пал на амоксиклав и цефепим. Амоксиклав – это смесь амоксициллина (антибиотика группы пенициллинов) с клавулановой кислотой (ингибитором β -латамаз, предотвращающим инактивацию амоксициллина и расширяющим спектр его активности). Он оказывает бактерицидное действие на широкий спектр бактерий. Цефепим – это цефалоспорин IV поколения. Этот препарат тоже обладает бактерицидным действием. Оба антибиотика доступны в форме порошка для приготовления раствора для внутривенного введения (истинного раствора). Согласно инструкции к препаратам, раствор амоксиклава может храниться в холодильнике не менее 8 часов, раствор цефепима – не менее 1 недели.

Новые антибиотики не стали добавлять в жидкие, полужидкие или твёрдые варианты среды, используемые для посева, поскольку заметили, что введение в состав культуральных сред цефепима всё же замедляет рост микоплазм (см. пункт 3.2.7). Ограничились их внесением в состав среды для взятия образцов биоматериала. Собранный в неё патологический материал «подращивали» в термостате в течение 2-4 часов перед разнесением по всем «посевным единицам» используемого набора сред. Таким образом, основной контакт биоматериала с новыми антибиотиками длился около 3-4 часов с момента взятия образца до доставки в лабораторию и ещё 2-4 часа во время термостатирования. Далее они оказывались в пробирках с посевами в разбавленном в 6 раз виде (при использовании оптимизированного набора из 5 ПЕ во время посева в каждую пробирку с 2,5 мл жидкой или полужидкой среды вносили 0,4 мл среды с отобранным биоматериалом). Поскольку оба антибиотика имеют бактерицидное, а не бактериостатическое действие, этого времени воздействия, по нашей оценке, должно было быть достаточно для повышения селективности всей методики. Общая схема исследования, в которой использование разработанного нами комплексного метода выявления микоплазм дополнено «подращиванием» на какой-либо из авторских модификаций среды для взятия образцов (содержащей амоксиклав и/или цефепим) перед проведением посева, приведена на рисунке 14.

Среди апробированных авторских модификаций среды для взятия образцов биоматериала (таблица 3) лучшие результаты по подавлению роста примесной микрофлоры для мазков из зева собак показала среда с цефепимом («С»), для мазков из кошачьих глаз – среда с амоксиклавом («АК»), и для мазков из зева кошек – среда со смесью амоксиклава и цефепима («АК+С») (таблица 9).

Поскольку микоплазмы очень чувствительны к малейшим изменениям в составе среды для их культивирования, внесение в неё любого кажущегося безвредным для них дополнительного компонента, например, β -лактамного антибиотика, может неожиданно привести к угнетению или задержке их роста. Поэтому проверку чувствительности и специфичности предложенной бактериологической методики отдельно и в составе комплексного метода решено было проводить для каждой из модификаций среды для взятия биоматериала самостоятельно. Для образцов от собак присутствие амоксиклава не сказывалось на высеваемости микоплазм, а присутствие цефепима немного её понижало. Для кошек высеваемость микоплазм умеренно снижали и амоксилав, и цефепим. При этом для кошек чувствительность разработанной бактериологической методики при взятии проб на любую из апробированных модификаций среды, включая классическую транспортную среду с бензилпенициллином (которую мы назвали «*Old*»), оказалась ниже, чем у собак. Вероятно, это связано с тем, что методика S. Rosendal, лежащая в основе методики M. Ogata, была изначально предназначена для анализа собачьих образцов, и для выявления микоплазм у кошек она подходит в меньшей степени. Но в целом полученные результаты показали высокие чувствительность и специфичность предложенной методики бактериологического посева как при самостоятельном её использовании, так и при использовании в виде включающего её в свой состав комплексного метода.

Использование ПЦР-анализа смывов в качестве «референтного метода» вызывало у нас некоторые сомнения. Как уже отмечалось выше, в отличие от бактериологического посева ПЦР позволяет выявлять только не только живые, но и погибшие клетки микоплазм, а кроме того, существуют так называемые «некультивируемые» виды микоплазм, которые тоже будут детектироваться

методом ПЦР, но не могут быть выявлены при посеве на бесклеточные питательные среды. Отсутствие роста в посевах при положительном результате ПЦР-анализа может быть следствием этих двух причин. С другой стороны, используемая для проведения ПЦР-анализа «родовая» тест-система тоже имеет свои ограничения – количество видов микоплазм достаточно велико, и какие-то из них могут не обнаруживаться с помощью используемых «родовых» праймеров. В этом случае мы должны были увидеть не подтверждающийся методом ПЦР рост на средах при культивировании. Однако наши опасения не оправдались и в целом полученные нами результаты ПЦР и бактериологического посева хорошо коррелируют друг с другом.

Литературные данные по сравнению чувствительности бактериологического метода и метода ПЦР достаточно противоречивы. Как правило, эти два метода выявляют примерно одинаковое количество положительных образцов в рамках каждого исследования [119, 197], но положительные образцы, выявленные с помощью бактериологического посева и ПЦР-анализа, не всегда совпадают. Так, в работе V.J. Chalker (2005) 15 % образцов, положительных по ПЦР, оказались отрицательными по данным культивирования, и 20 % образцов – наоборот [67]. Однако в некоторых публикациях сообщают о гораздо меньшей чувствительности культивирования в сравнении с ПЦР [134, 174, 218, 196]. Результаты сравнения зависят от конкретных применяемых техник работы, что ещё раз свидетельствует о важности улучшения бактериологической методики изоляции микоплазм.

Согласно литературным данным, частота выявления разных возбудителей (мазки и/или смывы исследовали на наличие FHV-1, FCV, *Bordetella bronchiseptica*, *Chlamydia felis*, микроорганизмов рода *Mycoplasma*) в патологическом материале, взятом из зева, и в патологическом материале, взятом из носовых ходов одних и тех же животных, обычно сопоставима [224]. Однако мы показали, что у кошек предпочтительнее выбрать для взятия мазков из верхнего отдела респираторного тракта с целью выявления микоплазм не носовые ходы, а зев. Вероятно, для собак такие мазки тоже будут более информативными.

При оптимизации отбора проб установлено также, что в отсутствие возможности доставить мазки в лабораторию в течение суток, можно (в случае необходимости) хранить их в замороженном виде до 10 дней с последующей отправкой в лабораторию на льду.

Применять для взятия проб вместо контейнеров со специальной транспортной средой подручные материалы, например, эппендорфы с физиологическим раствором, обычно используемые в ветеринарных клиниках для взятия смывов на ПЦР-анализ (как рекомендуется в некоторых отечественных руководствах [14]), оказалось неприемлемым из-за увеличения роста посторонних микроорганизмов в посевах (несмотря на наличие во всех используемых для посева средах бензилпенициллина) и критического снижения чувствительности методики.

Анализ полученных клонов методом ПЦР показал, что однократно проведённого клонирования без предварительных разведения клонируемых культур или их фильтрования через бактериальные фильтры (которые советуют делать в большинстве классических методик [14, 220]), часто бывает достаточно для относительно чистого разделения видов и их дальнейшей идентификации посредством секвенирования.

Для изолятов, содержащих постороннюю микрофлору, устойчивую к бензилпенициллину, был предложен способ деконтаминации в процессе клонирования, включающий последовательные пересевы на среду с добавкой цефепима и среду с добавкой амфотерицина В, а также последующую дополнительную доочистку полученных культур путём фильтрования через бактериальные фильтры. Возможность введения в питательные среды для культивирования микоплазм раствора цефепима и фильтрования культур на жидких или полужидких средах через бактериальные фильтры для удаления из них остаточной антибиотикорезистентной микрофлоры была показана впервые.

Молекулярно-генетическими методами было подтверждено, что рост «ферментирующих» и «неферментирующих» видов микоплазм на той или иной среде определяется в большей степени её рН, чем содержащейся в среде энергетической добавкой. Так, со среды с мочевиной была клонирована и

идентифицирована ферментирующая глюкозу микоплазма вида *M. edwardii*, со среды с глюкозой – гидролизующая аргинин микоплазма вида *M. spumans*. Также был зафиксирован рост уреоплазм (при их наличии в образце) не только на жидкой среде с мочевиной, но и на большинстве используемых для первичного посева полужидких сред с другими энергетическими добавками (см. пункт 3.2.8). Вероятно, микоплазмам многих видов хватает тех количеств глюкозы, аргинина и мочевины, которые содержатся в добавляемой к средам лошадиной сыворотке крови даже без искусственного введения этих добавок в состав среды. Для роста того или иного вида микоплазм более важным, скорее, является рН среды. Поэтому можно предположить, что сделанное нами дополнение сред с отдельными энергетическими добавками двумя средами с их смесями, которое позволило получить более плавный ряд рН (см. пункт 3.2.1), оказалось удачным для улучшения методики изоляции микоплазм.

Исследование способности собачьих и кошачьих микоплазм адаптироваться в последовательных пассажах к используемым нами питательным средам показало, что интервал между пересевами для поддержания изолятов и клонов в жизнеспособном состоянии должен составлять не более 12 суток. В идеале же собачьи и кошачьи микоплазмы лучше пассировать сразу после появления явных признаков роста. Хотя нам удавалось достаточно длительно (более 8 месяцев) поддерживать отдельные клоны в пассажах, полной их адаптации к используемым питательным средам не происходило и интенсивность роста от пассажа к пассажу снижалась. Из-за возможности замены в пересевах изолятов (смешанных культур) преобладающего вида на минорный вне зависимости от энергетической добавки в используемой для пересевов среде, при длительном пассировании необходимо время от времени проводить контроль культур с помощью молекулярно-генетических методов.

Установлено, что даже при умеренном охлаждении (до -18°C в морозильной камере бытового холодильника) небольшая доля жизнеспособных организмов сохраняется у собачьих и кошачьих микоплазм значительно дольше 12 месяцев, как

предполагалось ранее [126]. По нашим наблюдениям, выделенные из респираторного тракта и с конъюнктивы собак и кошек изоляты и клоны микоплазм менее устойчивы на средах с аргинином как при пассировании, так и при хранении в замороженном виде.

Поскольку в России нет ветеринарной коллекции штаммов микоплазм, полученные нами клоны (чистые культуры) *Mycoplasma arginini*, *M. canis*, *M. felis*, *M. gateae*, *M. edwardii*, *M. maculosum*, *M. spumans*, *Ureaplasma felinum* можно использовать для проведения дальнейших исследований. В частности, они могут быть полезны для создания или отработки соответствующих «видовых» реакций. Тогда для сбора статистических данных по частоте встречаемости микоплазм разных видов у собак и кошек (с целью выяснения их этиологической роли в разного рода патологических состояниях этих животных) можно будет заменить относительно дорогостоящее и более трудоёмкое секвенирование рутинными «видовыми» ПЦР (например, с использованием разработанных для 11 основных видов микоплазм собак «видовых» пар праймеров [220]).

4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведённой работы были сделаны следующие **выводы**:

1) Стандартизирован состав 9 вариантов среды, удовлетворяющих энергетические потребности различных родов и видов микоплазм собак и кошек. Для культивирования микоплазм предложена методика с использованием комбинации (набора) из 5 вариантов среды, что сокращает трудоемкость лабораторных микробиологических исследований по выявлению микоплазм в образцах биоматериала от собак и кошек в 4-10 раз по сравнению с ранее использовавшимися методами.

2) Предложена модификация среды для взятия образцов биоматериала с добавлением бактерицидных антибиотиков амоксиклава и/или цефепима. «Подращивание» в ней собранного биоматериала перед посевом достаточно эффективно подавляет рост других бактерий практически без потери высеваемости микоплазм.

3) Показано, что комбинирование бактериологического посева на предложенный набор сред с избирательным ПЦР-анализом полученных культур повышает чувствительность и специфичность методики по сравнению с отдельным использованием методов культивирования и ПЦР.

4) Оптимизированы остальные этапы культуральных работ с микоплазмами – пробоотбор, клонирование, идентификация клонов, адаптация выделенных изолятов и клонов путем пассирования и их хранение.

5) Изолированы (из респираторного тракта собак и кошек, а также из глаз кошек), клонированы, идентифицированы молекулярно-генетическими методами и частично биохимически охарактеризованы микоплазмы видов *Mycoplasma arginini*, *M. canis*, *M. felis*, *M. gateae*, *M. edwardii*, *M. maculosum*, *M. sputans*, *Ureaplasma felinum*.

Таким образом, поставленные цели и задачи полностью реализованы.

Усовершенствованная микробиологическая методика изоляции и культивирования микоплазм создаёт доступные условия для их лабораторного выявления у собак и кошек. Быстрое и надежное выявление микоплазм разных родов и видов осуществляется благодаря использованию при посеве каждого образца универсальной комбинации (набора) из 5 вариантов питательной среды, которые отличаются по плотности (жидкая, полужидкие, твердая) и содержащейся энергетической добавке (глюкоза, аргинин, мочевины по отдельности или совместно в разных комбинациях), а также образуют плавный ряд pH от 6,0 до 8,0. В предложенном составе вариантов питательной среды представлено оптимальное количественное соотношение компонентов, подобраны оптимальные значения pH для каждой из энергетических добавок и оптимальное количество агара для облегчения визуальной оценки наличия или отсутствия роста. Предложенные модификации среды для взятия образцов содержат современные антибиотики амоксилав и/или цефепим. «Подраживание» отобранных в них образцов в течение 2-4 часов при 37 °C перед посевом на рекомендуемый набор сред делает предложенную методику изоляции и культивирования более селективной, практически не снижая скорости и интенсивности роста микоплазм в посевах.

Внедрение указанной микробиологической методики в практику позволит повысить точность и сократить сроки выявления микоплазм в клиническом материале за счет сокращения общего числа «посевных единиц» на каждый образец, упразднения «слепых пассажей», учета в качестве положительных только образцов с типичным микоплазменным ростом для полужидких и твердых сред. Она проста в постановке, не требует специального оборудования и позволяет проводить не только выявление микоплазм, но и их подготовку к дальнейшему бактериологическому и молекулярно-генетическому изучению.

Разработанный комплексный метод выявления микоплазм собак и кошек, в котором микробиологическая методика дополняется по необходимости ПЦР-анализом, соответствует самым современным тенденциям гуманной медицины и позволяет увеличить частоту выявления возбудителя в патологическом материале без снижения специфичности исследования. Метод может быть использован как с

научными, так и с прикладными целями. Благодаря его простоте он пригоден для широкого применения не только в исследовательских, но и в обычных диагностических ветеринарных лабораториях. В перспективе это позволит рутинно проводить первичную диагностику микоплазменной инфекции у собак и кошек, а также оценивать эффективность проводимого лечения.

Полное описание предложенных технических приёмов вошло в изданные Методические рекомендации «Пробоотбор и культивирование микоплазм, обитающих на конъюнктиве и слизистых оболочках верхнего респираторного тракта собак и кошек. Сравнительный анализ чувствительности бактериологического метода и метода ПЦР» (приложение 1) и заявку на патент «Набор сред для визуального выявления представителей класса Mollicutes в образцах с конъюнктивы и из респираторного тракта собак и кошек, способ изоляции и культивирования микоплазм, ахлеплазм и уреаплазм от собак и кошек» (приложение 2).

Результаты исследований используются при проведении занятий по дисциплинам «микробиология», «эпизоотология и инфекционные болезни», «болезни мелких домашних животных», а также в рамках программ повышения квалификации ветеринарных специалистов (приложение 3).

В настоящее время материалы, изложенные в диссертационной работе, уже применяются при проведении исследований поступающего биологического материала, а также при выполнении научно-исследовательской работы в ФГБУ «ВГНКИ» (приложение 4).

5 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ГМЭ** – гранулематозный менингоэнцефаломиелит;
- ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- жА** – жидкая среда с аргинином;
- жГ** – жидкая среда с глюкозой;
- жМ** – жидкая среда с мочевиной;
- ИРС** – инфекционный респираторный синдром;
- ЛПР** – лимфоплазмочитарный ринит;
- МЛС** – комбинация антибиотиков групп макролид-линкозамид-стрептограмин;
- НМЭ** – некротизирующий менингоэнцефалит;
- пА** – полужидкая среда с аргинином;
- пГ** – полужидкая среда с глюкозой;
- пГА** – полужидкая среда, содержащая смесь глюкозы и аргинина;
- ПЕ** – «посевная единица» (пробирки и чашки Петри, используемые для первичного посева одного образца);
- ПЦР** – полимеразная цепная реакция;
- рРНК** – рибосомная рибонуклеиновая кислота;
- тА** – твёрдая среда с аргинином;
- тГ** – твёрдая среда с глюкозой;
- тГАМ** – твёрдая среда, содержащая смесь глюкозы, аргинина и мочевины;
- CAV-2** (canine adenovirus Type 2) – аденовирус собак типа 2;
- CDV** (canine distemper virus) – вирус чумы собак;
- CPIV** (canine parainfluenza virus) – вирус парагриппа собак;
- CRCoV** (canine respiratory coronavirus) – респираторный коронавирус собак;
- dNTPs** (deoxynucleoside triphosphates) – смесь четырёх отдельных дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, составляющих последовательность ДНК;
- FCV** (feline calicivirus) – калицивирус кошек;
- FHV-1** (feline herpesvirus-1) – герпесвирус кошек-1;
- PPLO** (pleuropneumonia-like organisms) – так называли микоплазм (всех молликут) их первооткрыватели.

6 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борхсениус, С.Н. Микоплазмы: молекулярная и клеточная биология, взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика / С.Н. Борхсениус, О.А. Чернова, В.М. Чернов и др. — СПб: Наука, 2002. — 319 с.
2. Борхсениус, С.Н. Микоплазмы в биологии и медицине начала XXI века / С.Н. Борхсениус, О.А. Чернова, В.М. Чернов и др. — СПб: Наука, 2016. — 333 с.
3. Борхсениус, С.Н. Роль микоплазменной инфекции в хроническом воспалении и канцерогенезе / С.Н. Борхсениус, А.А. Дакс, О.А. Федорова и др. // Цитология. — 2018. — № 60 (9). — С. 663–678.
4. Глушков, А.А. Микоплазмы и микоплазмозы сельскохозяйственных животных: учебное пособие / А.А. Глушков, А.А. Сидорчук — М.: МГАВМиБ им. К.И. Скрябина, 2004. — 235 с.
5. Говорун, В.М. Молекулярные механизмы формирования резистентности к тетрациклинам и фторхинолонам у молликут: диссертация ... доктора биологических наук: 03.00.04, 03.00.03. / Говорун Вадим Маркович. — М., 2000. — 287 с.
6. Демкин, В.В. Гемотропные микоплазмозы (гемоплазмы, гемобартонеллы) кошек и собак / В.В. Демкин // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. — 2014. — № 4. — С. 23–28.
7. Интернет-сайт компании Mycoplasma Experience Limited (Великобритания) [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.mycoplasma-exp.com/>.
8. Интернет-сайт Национального центра биотехнологической информации («National Center for Biotechnology Information», США) [Электронный ресурс]. — <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>.
9. Каган, Г.Я. Микоплазмология – новая отрасль микробиологии / Г.Я. Каган // Микробиологический журнал. — 1981а. — № 43 (3). — С. 393–404.
10. Каган, Г.Я. *Mycoplasma pneumoniae* и респираторные микоплазмозы / Г.Я. Каган // В: Микоплазмы в патологии человека. — Под редакцией Каган Г.Я. — М.: ВНИИМИ, 1981б. — С. 3–24.
11. Кононенко, В.В. Роль микоплазмы пневмонии при менингитах и менингоэнцефалитах / В.В. Кононенко, А.А. Руденко, В.Т. Кругликов и др. // Врачебное дело. — 1987. — №3. — С. 108–111.
12. Коромыслов, Г.Ф. Микоплазмы в патологии животных / Г.Ф. Коромыслов, Я. Месалош, Л. Штипкович и др. — Под редакцией Коромысова Г.Ф. — М.: Агропромиздат, 1987. — 256 с.

13. Крылова, Н.А. Возможности улучшения методов диагностики микоплазменной инфекции при бронхиальной астме у детей / Н.А. Крылова, Н.А. Геппе, И.В. Раковская и др. // Доктор.ру. — 2013. — № 9 (87). — С. 7–10.
14. Методические рекомендации по выделению, культивированию и идентификации микоплазм, ахлеплазм и уреоплазм. — М.: ВАСХНИЛ – ВИЭВ, 1982. — 47 с.
15. Падейская, Е.Н. Антимикробные препараты группы фторхинолонов в клинической практике / Е.Н. Падейская, В.П. Яковлев — М.: Логата, 1998. — 205 с.
16. Прозоровский, С.В. Микоплазма пневмонии – инфекция / С.В. Прозоровский, В.И. Покровский, В.И. Васильева — М.: Медицина, 1978. — 167 с.
17. Прозоровский, С.В. Медицинская микоплазмология / С.В. Прозоровский, И.В. Раковская, Ю.В. Вульфович — М.: Медицина, 1995. — 288 с.
18. Раковская, И.В. Микоплазмы и микоплазменные инфекции / И.В. Раковская // Вестник дерматологии и венерологии. — 2008. — № 5. — С. 60–65.
19. Раковская, И.В. Микоплазмы. Микоплазменные инфекции / И.В. Раковская // В: Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований. — Под редакцией Лабинской А.С., Блинковой Л.П., Ешиной А.С. — СПб–М–Краснодар: Лань, 2017. — С. 449–466.
20. Романова, Ю.М. Есть ли сходство в механизмах образования «некультивируемых форм» у грамотрицательных бактерий и спор у бацилл? / Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Молекулярная генетика, вирусология и микробиология. — 1993. — № 6. — С.34–37.
21. Сидоров, М.А. Микоплазмозы животных / М.А. Сидоров, Э.А. Шегидевич, И.А. Яблонская. — Под редакцией Коваленко Я.Р. — М.: Колос, 1976. — 304 с.
22. Тилли, Л. Болезни собак и кошек / Л. Тилли, Ф. Смит — М.: Гэотар-Медиа, 2010. — С. 545–547.
23. Харкевич, Д.А. Фармакология: учебник, 10-е издание / Д.А. Харкевич — М.: Гэотар-Медиа, 2008. — С. 588.
24. Хоулт, Дж. Определитель бактерий Берджи / Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит — М.: Мир, 1997. — С. 710–722.
25. Яковлев, С.В. Клиническая химиотерапия бактериальных инфекций / С.В. Яковлев — М.: Ньюдиамед, 1996. — 255 с.
26. Abou, N. PCR-based detection reveals no causative role for Mycoplasma and Ureaplasma in feline lower urinary tract disease / N. Abou, D.J. Houwers, A.M. van Dongen // Veterinary microbiology. — 2006. — No. 116 (1–3). — P. 246–247.

27. Amass, S.F. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* infections in swine / S.F. Amass, L.K. Clark, W.G. van Alstine et al. // Journal of the American Veterinary Medical Association. — 1994. — No. 204 (1), — P. 102–107.
28. Ambroset, C. Identification and characterization of *Mycoplasma feriruminatoris* sp. nov. strains isolated from Alpine ibex: a 4th species in the *Mycoplasma mycoides* cluster hosted by non-domesticated ruminants? / C. Ambroset, C. Pau-Roblot, Y. Game et al. // Frontiers in microbiology. — 2017. — No. 8. — P. 939.
29. Antunes, A. A new lineage of halophilic, wall-less, contractile bacteria from a brine-filled deep of the Red Sea / A. Antunes, F.A. Rainey, G. Wanner et al. // Journal of bacteriology. — 2008. — No. 190 (10). — P. 3580–3587.
30. Antunes, A. Genome sequence of *Haloplasma contractile*, an unusual contractile bacterium from a deep-sea anoxic brine lake / A. Antunes, I. Alam, H. El Dorry et al. // Journal of bacteriology. — 2011. — No. 193 (17). — P. 4551–4552.
31. Armstrong, D. Canine pneumonia associated with mycoplasma infection / D. Armstrong, V. Morton, M.H. Friedman et al. // American Journal of Veterinary Research. — 1972. — No. 33 (7). — P. 1471–1478.
32. Armstrong, D. Previously uncharacterized *Mycoplasma* isolates from an investigation of canine pneumonia / D. Armstrong, J.G. Tully, B. Yu et al. // Infection and Immunity. — 1970. — No. 1 (1). — P. 1–7.
33. Atkinson, T.P. Is asthma an infectious disease? New evidence / T.P. Atkinson // Current allergy and asthma reports. — 2013. — No. 13 (6). — P. 702–709.
34. Ayling, R. *Mycoplasma bovis* isolated from brain tissue of calves / R. Ayling, R. Nicholas, R. Hogg et al. // The Veterinary record. — 2005. — No. 156 (12). — P. 391–392.
35. Bannasch, M.J. Epidemiologic evaluation of multiple respiratory pathogens in cats in animal shelters / M.J. Bannasch, J.E. Foley // Journal of feline medicine and surgery. — 2005. — No. 7 (2). — P. 109–119.
36. Barber, R.M. Broadly reactive polymerase chain reaction for pathogen detection in canine granulomatous meningoencephalomyelitis and necrotizing meningoencephalitis / R.M. Barber, B.F. Porter, Q. Li et al. // Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine. — 2012. — No. 26 (4). — P. 962–968.
37. Barton, M.D. Isolation of *Mycoplasma spumans* from polyarthritis in a greyhound / M.D. Barton, L. Ireland, J.L. Kirschner et al. // Australian Veterinary Journal. — 1985. — No. 62 (6). — P. 206–207.
38. Baseman, J.B. Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety / J.B. Baseman, J.G. Tully // Emerging infectious diseases. — 1997. — No. 3 (1). — P. 21–32.

39. Bastian, F.O. Neuropathology of spiroplasma infection in the rat brain / F.O. Bastian, D.M. Purnell, J.G. Tully // The American journal of pathology. — 1984. — No. 114 (3). — P. 496–514.
40. Bastian, F.O. Creutzfeldt-Jakob and other transmissible spongiform encephalopathies / F.O. Bastian. — St Louis: Mosby Year Book, 1991. — 256 p.
41. Bastian, F.O. Spiroplasma spp. from transmissible spongiform encephalopathy brains or ticks induce spongiform encephalopathy in ruminants / F.O. Bastian, D.E. Sanders, W.A. Forbes et al. // Journal of medical microbiology. — 2007. — No. 56 (Pt. 9). — P. 1235–1242.
42. Bastian, F.O. The case for involvement of spiroplasma in the pathogenesis of transmissible spongiform encephalopathies / F.O. Bastian // Journal of neuropathology and experimental neurology. — 2014. — No. 73 (2). — P. 104–114.
43. Bauer, D.F. Mycoplasma meningitis resulting in increased production of cerebrospinal fluid: case report and review of the literature / D.F. Bauer, R.S. Tubbs, L. Acakpo-Satchivi // Child's nervous system: ChNS: official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery. — 2008. — No. 24 (7). — P. 859–862.
44. Beauchamp, D.J. *Mycoplasma felis*-associated meningoencephalomyelitis in a cat / D.J. Beauchamp, R.C. da Costa, C. Premanandan et al. // Journal of Feline Medicine and Surgery. — 2011. — No. 13 (2). — P. 139–143.
45. Bebear, C.M. Cloning and nucleotide sequence of the DNA gyrase (gyrA) gene from *Mycoplasma hominis* and characterization of quinolone-resistant mutants selected in vitro with trovafloxacin / C.M. Bebear, O. Grau, A. Charron et al. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. — 2000. — No. 44 (10). — P. 2719–2727.
46. Bemis, D.A. Naturally occurring respiratory disease in a kennel caused by *Bordetella bronchiseptica* / D.A. Bemis, L.E. Carmichael, M.J. Appel // The Cornell Veterinarian. — 1977. — No. 67 (2). — P. 282–293.
47. Bemis, D.A. Bordetella and Mycoplasma respiratory infections in dogs and cats / D.A. Bemis // The Veterinary clinics of North America. Small animal practice. — 1992. — No. 22 (5). — P. 1173–1186.
48. Blanchard, B. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae* / B. Blanchard, M.M. Vena, A. Cavalier et al. // Veterinary microbiology. — 1992. — No. 30 (4). — P. 329–341.
49. Bongrand, Y. Atypical pneumonia associated with a Mycoplasma isolate in a kitten / Y. Bongrand, M.C. Blais, K. Alexander // The Canadian veterinary journal. — 2012. — No. 53 (10). — P. 1109–1113.
50. Borchsenius, S.N. Effects of mycoplasma infection on the host organism response via p53/NF-κB signaling / S.N. Borchsenius, A. Daks, O. Fedorova et al. // Journal of cellular physiology. — 2018. — No. 234 (1). — P. 171–180.

51. Bowe, P.S. Attempts to produce granulomatous colitis in Boxer dogs with a mycoplasma / P.S. Bowe, H.J. Van Kruiningen, S. Rosendal // Canadian journal of comparative medicine: Revue canadienne de médecine comparée. — 1982. — No. 46 (4). — P. 430–433.
52. Brown, D.R. *Mycoplasma microti* sp. nov., isolated from the respiratory tract of prairie voles (*Microtus ochrogaster*) / D.R. Brown, D.F. Talkington, W.L. Thacker et al. // International journal of systematic and evolutionary microbiology. — 2001a. — No. 51 (Pt. 2). — P. 409–412.
53. Brown, D.R. *Mycoplasma alligatoris* sp. nov., from American alligators / D.R. Brown, J.M. Farley, L.A. Zacher et al. // International journal of systematic and evolutionary microbiology. — 2001b. — No. 51 (Pt. 2). — P. 419–424.
54. Brown, D.R. *Mycoplasma testudineum* sp. nov., from a desert tortoise (*Gopherus agassizii*) with upper respiratory tract disease / D.R. Brown, J.L. Merritt, E.R. Jacobson et al. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. — 2004. — No. 54 (Pt. 5). — P. 1527–1529.
55. Brown, D.R. *Mycoplasma iguanae* sp. nov., from a green iguana (*Iguana iguana*) with vertebral disease / D.R. Brown, D.L. Demcovitz, D.R. Plourde et al. // International journal of systematic and evolutionary microbiology. — 2006. — No. 56 (Pt. 4). — P. 761–764.
56. Brown, M.B. *Mycoplasma agassizii* sp. nov., isolated from the upper respiratory tract of the desert tortoise (*Gopherus agassizii*) and the gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*) / M.B. Brown, D.R. Brown, P.A. Klein et al. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. — 2001. — No. 51 (Pt. 2). — P. 413–418.
57. Bruchim, A. Isolation of mycoplasmas from the canine genital tract: a survey of 108 healthy dogs / A. Bruchim, I. Lutsky, S. Rosendal // Research in Veterinary Science. — 1978. — No. 25 (2). — P. 243–245.
58. Burns, R.E. Histologic and molecular correlation in shelter cats with acute upper respiratory infection / R.E. Burns, D.C. Wagner, C.M. Leutenegger et al. // Journal of clinical microbiology. — 2011. — No. 49 (7). — P. 2454–2460.
59. Carmichael, L.E. A fatal septicemic disease of infant puppies caused by cytopathogenic organisms with characteristics of mycoplasma / L.E. Carmichael, J. Fabricant, R.A. Squire // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. — 1964. — No. 117. — P. 826–833.
60. Cassell, G.H. *Ureaplasma urealyticum* role in prematurity and disease in newborns / G.H. Cassell, K.B. Waits, H.L. Watson et al. // Clinical microbiology reviews. — 1993. — No. 6 (1). — P. 69–87.

61. Catania, S. Two strains of *Mycoplasma synoviae* from chicken flocks on the same layer farm differ in their ability to produce eggshell apex abnormality // S. Catania, F. Gobbo, D. Bilato et al. // Veterinary microbiology. — 2016. — No. 193. — P. 60–66.
62. Chae, Ch. Porcine respiratory disease complex: Interaction of vaccination and porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and *Mycoplasma hyopneumoniae* / Ch. Chae // The veterinary journal. — 2016. — No. 212. — P. 1–6.
63. Chalker, V.J. Respiratory disease in kennelled dogs: serological responses to *Bordetella bronchiseptica* lipopolysaccharide do not correlate with bacterial isolation or clinical respiratory symptoms / V.J. Chalker, C. Toomey, S. Opperman et al. // Clinical and diagnostic laboratory immunology. — 2003a. — No. 10 (3). — P. 352–356.
64. Chalker, V.J. The association of *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* with canine infectious respiratory disease / V.J. Chalker, H.W. Brooks, J. Brownlie // Veterinary Microbiology. — 2003b. — No. 95 (1–2). — P. 149–156.
65. Chalker, V.J. Taxonomy of the canine Mollicutes by 16S rRNA gene and 16S/23S rRNA intergenic spacer region sequence comparison / V.J. Chalker, J. Brownlie // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. — 2004a. — No. 54 (2). — P. 537–542.
66. Chalker, V.J. Mycoplasmas associated with canine infectious respiratory disease / V.J. Chalker, W.M.A. Owen, C. Paterson et al. // Microbiology. — 2004b. — No. 150 (10). — P. 3491–3497.
67. Chalker, V.J. Canine mycoplasmas / V.J. Chalker // Research in Veterinary Science. — 2005. — No. 79 (1). — P. 1–8.
68. Chandler, J.C. Mycoplasmal respiratory infections in small animals: 17 cases (1988–1999) / J.C. Chandler, M.R. Lappin // Journal of the American Animal Hospital Association. — 2002. — No. 38 (2). — P. 111–119.
69. Chin, R.P. Isolation of *Mycoplasma synoviae* from the brains of commercial meat turkeys with meningeal vasculitis // R.P. Chin, C.U. Meteyer, R. Yamamoto et al. // Avian diseases. — 1991. — No. 35 (3). — P. 631–637.
70. Chvala, S. Simultaneous canine distemper virus, canine adenovirus type 2, and *Mycoplasma cynos* infection in a dog with pneumonia / S. Chvala, V. Benetka, K. Mostl et al. // Veterinary Pathology. — 2007. — No. 44 (4). — P. 508–512.
71. Ciprian, A. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia / A. Ciprian, C. Pijoan, T. Cruz et al. // Canadian journal of veterinary research. — 1988. — No. 52 (4). — P. 434–438.
72. Ciprian, A. *Mycoplasma hyopneumoniae*: interaction with other agents in pigs, and evaluation of immunogens / A. Ciprian, T.A. Cruz, M. de la Garza // Archives of medical research. — 1994. — No. 25 (2). — P. 235–239.

73. Clark, T.B. Pathogenicity of Mollicutes for insects: possible use in biological control / T.B. Clark, R.F. Whitcomb // *Annales de microbiologie (Paris)*. — 1984. — No. 135A (1). — P. 141–150.
74. Cohen, M. *Mycoplasma hominis* meningitis complicating head trauma: case report and review / M. Cohen, B. Kubak // *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. — 1997. — No. 24 (2). — P. 272–273.
75. Crisp, M.S. Pulmonary abscess caused by a *Mycoplasma* sp. in a cat / M.S. Crisp, S.J. Birchard, A.E. Lawrence et al. // *Journal of the American Veterinary Medical Association*. — 1987. — No. 191 (3). — P. 340–342.
76. Crossland, N.A. Pneumonia in a captive central bearded dragon with concurrent detection of helodermatid adenovirus 2 and a novel *Mycoplasma* species / N.A. Crossland, P.M. DiGeronimo, Y. Sokolova et al. // *Veterinary pathology*. — 2018. — No. 55 (6). — P. 900–904.
77. Doig, P.A. The genital *Mycoplasma* and *Ureaplasma* flora of healthy and diseased dogs / P.A. Doig, H.L. Ruhnke, W.T. Bosu // *Canadian Journal of Comparative Medicine*. — 1981. — No. 45 (3). — P. 233–238.
78. Ducatelle, R. Dual adenovirus and distemper virus pneumonia in a dog / R. Ducatelle, D. Maenhout, W. Coussement et al. // *The Veterinary quarterly*. — 1982. — No. 4 (2) — P. 84–88.
79. Dungworth, D.L. The respiratory system / D.L. Dungworth // In: *Pathology of Domestic Animals*, 4th edition. — Edited by Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. — London: Academic Press, 1993. — P. 539–698.
80. Ellington, J.E. *Mycoplasma* and infertility. A little fact, a little fiction and a lot of unknown / J.E. Ellington // *AKC Gazette*. — 1993. — No. 110. — P. 75–78.
81. Erles, K. Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease / K. Erles, C. Toomey, H.W. Brooks et al. // *Virology*. — 2003. — No. 310 (2). — P. 216–223.
82. Feldman, E.C. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, 3rd edition / E.C. Feldman, R.W. Nelson. — St. Louis: Saunders, 2004. — P. 386–387.
83. Fernandez, M. Prevalence of feline herpesvirus-1, feline calicivirus, *Chlamydophila felis* and *Mycoplasma felis* DNA and associated risk factors in cats in Spain with upper respiratory tract disease, conjunctivitis and/or gingivostomatitis / M. Fernandez, E.G. Manzanilla, A. Lloret et al. // *Journal of feline medicine and surgery*. — 2017. — No. 19 (4). — P. 461–469.
84. Foster, S.F. Pneumonia associated with *Mycoplasma* spp. in three cats / S.F. Foster, V.R. Barrs, P. Martin et al. // *Australian Veterinary Journal*. — 1998. — No. 76 (7). — P. 460–464.

85. Foster, S.F. Lower respiratory tract infections in cats: 21 cases (1995-2000) / S.F. Foster, P. Martin, G.S. Allan et al. // Journal of feline medicine and surgery. — 2004a. — No. 6 (3). — P. 167–180.
86. Foster, S.F. A retrospective analysis of feline bronchoalveolar lavage cytology and microbiology (1995-2000) / S.F. Foster, P. Martin, J.A. Braddock et al. // Journal of feline medicine and surgery. — 2004b. — No. 6 (3). — P. 189–198.
87. Foster, S.F. Lower respiratory tract infections in cats: reaching beyond empirical therapy / S.F. Foster, P. Martin // Journal of feline medicine and surgery. — 2011. — No. 13 (5). — P. 313–332.
88. Frasca, S. Jr. Isolation and characterization of *Mycoplasma sphenisci* sp. nov. from the choana of an aquarium-reared jackass penguin (*Spheniscus demersus*) / S. Jr. Frasca, E.S. Weber, H. Urquhart et al. // Journal of clinical microbiology. — 2005. — No. 43 (6). — P. 2976–2979.
89. Fursted, K. Broad-range PCR as a supplement to culture for detection of bacterial pathogens in patients with a clinically diagnosed spinal infection / K. Fursted, M. Arpi, B.E. Lindblad et al. // Scandinavian journal of infectious diseases. — 2008. — No. 40 (10). — P. 772–777.
90. Gass, R. Donor-to host transmission of *Mycoplasma hominis* in lung allograft recipient / R. Gass, J. Fisher, D. Badesch et al. // Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. — 1996. — No. 22 (3). — P. 567–568.
91. Gerding, P.A. Jr. Microbiology of the canine and feline eye / P.A. Jr. Gerding, I. Kakoma // The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice. — 1990. — No. 20 (3). — P. 615–625.
92. Gerriets, W. Feline calicivirus: a neglected cause of feline ocular surface infections? / W. Gerriets, N. Joy, J. Huebner-Guthardt et al. // Veterinary ophthalmology. — 2012. — No. 15 (3). — P. 172–179.
93. Giebel, J. *Mycoplasma phocarhinis* sp. nov. and *Mycoplasma phocacerebrale* sp. nov., two new species from harbor seals (*Phoca vitulina* L.) / J. Giebel, J. Meier, A. Binder et al. // International journal of systematic bacteriology. — 1991. — No. 41 (1). — P. 39–44.
94. Gray, L.D. Clinical use of 16S rRNA gene sequencing to identify *Mycoplasma felis* and *M. gateae* associated with feline ulcerative keratitis / L.D. Gray, K.L. Ketrang, Y.W. Tang // Journal of clinical microbiology. — 2005. — No. 43 (7). — P. 3431–3434.
95. Greene, C.E. Nonhemotropic Mycoplasmal, Ureaplasmal, and L-Form Infections / C.E. Greene, V.J. Chalker // In: Infectious Diseases of the Dog and Cat, 4th edition. — Edited by Greene C.E. — USA: Elsevier Inc., 2012. — P. 319–325.

96. Greig, A.S. The significance of a pleuropneumonia-like organism in kennel cough / A.S. Greig // Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science. — 1954. — No. 18 (8). — P. 275–279.
97. Grissett, G.P. Structured literature review of responses of cattle to viral and bacterial pathogens causing bovine respiratory disease complex / G.P. Grissett, B.J. White, R.L. Larson // Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine. — 2015. — No. 29 (3). — P. 770–780.
98. Guckel, C. Mycoplasmal pneumonias in childhood: roentgen features, differential diagnosis, and review of the literature / C. Guckel, C. Benz-Bohm, B. Widemann // Pediatric Radiology. — 1989. — No. 19 (8). — P. 499–503.
99. Gulbahar, M.Y. Pyothorax associated with a *Mycoplasma* sp. and *Arcanobacterium pyogenes* in a kitten / M.Y. Gulbahar, K. Gurturk // Australian Veterinary Journal. — 2002. — No. 80 (6). — P. 344–345.
100. Haesebrouck, F. Incidence and significance of isolation of *Mycoplasma felis* from conjunctival swabs of cats / F. Haesebrouck, L.A. Devriese, B. van Rijssen et al. // Veterinary Microbiology. — 1991. — No. 26 (1–2). — P. 95–101.
101. Harasawa, R. Detection and tentative identification of dominant mycoplasma species in cell cultures by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions / R. Harasawa, H. Mizusawa, K. Nozawa et al. // Research in microbiology. — 1993. — No. 144 (6). — P. 489–493.
102. Harasawa, R. A putative transposase gene in the 16S-23S rRNA intergenic spacer region of *Mycoplasma imitans* / R. Harasawa, D.G. Pitcher, A.S. Ramirez et al. // Microbiology. — 2004. — No. 150 (Pt. 4). — P. 1023–1029.
103. Hartmann, A.D. Efficacy of pradofloxacin in cats with feline upper respiratory tract disease due to *Chlamydophila felis* or *Mycoplasma* infections / A.D. Hartmann, C.R. Helps, M.R. Lappin et al. // Journal of Veterinary Internal Medicine. — 2008. — No. 22 (1). — P. 44–52.
104. Hartmann, A.D. Detection of bacterial and viral organisms from the conjunctiva of cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease / A.D. Hartmann, J. Hawley, C. Werckenthin et al. // Journal of feline medicine and surgery. — 2010. — No. 12 (10). — P. 775–782.
105. Hata, A. *Mycoplasma hominis* meningitis in a neonate: case report and review / A. Hata, Y. Honda, K. Asada et al. // The Journal of infection. — 2008. — No. 57 (4). — P. 338–343.
106. Haulena, M. Lesions associated with a novel *Mycoplasma* sp. in California sea lions (*Zalophus californianus*) undergoing rehabilitation / M. Haulena, F.M. Gulland, J.A. Lawrence et al. // Journal of wildlife diseases. — 2006. — No. 42 (1). — P. 40–45.

107. Henn, J.B. Seroprevalence of antibodies against *Bartonella* species and evaluation of risk factors and clinical signs associated with seropositivity in dogs / J.B. Henn, C.H. Liu, R.W. Kasten et al. // American journal of veterinary research. — 2005. — No. 66 (4). — P. 688–694.
108. Holst, B.S. Infectious causes for feline upper respiratory tract disease – a case-control study / B.S. Holst, S. Hanas, L.T. Berndtsson et al. // Journal of Feline Medicine and Surgery. — 2010. — No. 12 (10). — P. 783–789.
109. Hong, S. Molecular identification of *Mycoplasma cynos* from laboratory beagle dogs with respiratory disease / S. Hong, O. Kim // Laboratory Animal Research. — 2012. — No. 28 (1). — P. 61–66.
110. Hooper, P.T. Mycoplasma polyarthritis in a cat with probable severe immune deficiency / P.T. Hooper, L.A. Ireland, A. Carter // Australian Veterinary Journal. — 1985. — No. 62 (10). — P. 352.
111. Horner, P. Should we be testing for urogenital *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* and *U. urealyticum* in men and women? — Position Statement from the European STI Guidelines Editorial Board / P. Horner, G. Donders, M. Cusini et al. // Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV. — 2018. — No. 32 (11). — P. 1845–1851.
112. Ilha, M.R. Meningoencephalitis caused by *Mycoplasma edwardii* in a dog / M.R. Ilha, S. Rajeev, C. Watson et al. // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. — 2010. — No. 22 (5). — P. 805–808.
113. International Committee on Systematic Bacteriology – Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes. Minutes of the Interim Meeting // International Journal of Systematic Bacteriology. — 1997. — No. 47 (3). — P. 911–914.
114. Jacobson, E.R. Mycoplasmosis and upper respiratory tract disease of tortoises: a review and update / E.R. Jacobson, M.B. Brown, L.D. Wendland // The veterinary journal. — 2014. — No. 201 (3). — P. 257–264.
115. Jameson, P.H. Comparison of clinical signs, diagnostic findings, organisms isolated, and clinical outcome in dogs with bacterial pneumonia: 93 cases (1986–1991) / P.H. Jameson, L.A. King, M.R. Lappin et al. // Journal of the American Veterinary Medical Association. — 1995. — No. 206 (2). — P. 206–209.
116. Jang, S.S. Mycoplasma as a cause of canine urinary tract infection / S.S. Jang, G.V. Ling, R. Yamamoto et al. // Journal of the American Veterinary Medical Association. — 1984. — No. 185 (1). — P. 45–47.
117. Jensen, J.S. Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra / J.S. Jensen, H.T. Hansen, K. Lind // Journal of clinical microbiology. — 1996. — No. 34 (2) — P. 286–291.

118. Johansson, K.-E. Taxonomy of Mollicutes / K.-E. Johansson, B. Pettersson // In: Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. — Edited by Razin S. & Herrmann R. — NY: Kluwer, 2002. — P. 1–27.
119. Johnson, L.R. A comparison of routine culture with polymerase chain reaction technology for the detection of Mycoplasma species in feline nasal samples / L.R. Johnson, N.L. Drazenovich, J.E. Foley // Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. — 2004. — No. 16 (4). — P. 347–351.
120. Johnson, L.R. Assessment of infectious organisms associated with chronic rhinosinusitis in cats / L.R. Johnson, J.E. Foley, H.E. De Cock et al. // Journal of the American Veterinary Medical Association. — 2005. — No. 227 (4). — P. 579–585.
121. Johnson, L.R. Microbiologic and cytologic assessment of bronchoalveolar lavage fluid from dogs with lower respiratory tract infection: 105 cases (2001–2011) / L.R. Johnson, E.V. Queen, W. Vernau et al. // Journal of Veterinary Internal Medicine. — 2013. — No. 27 (2). — P. 259–267.
122. Johnston, S.L. Chlamydophila pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae: a role in asthma pathogenesis? / S.L. Johnston, R.J. Martin // American journal of respiratory and critical care medicine. — 2005. — No. 172 (9). — P. 1078–1089.
123. Jores, J. *Mycoplasma feriruminatoris* sp. nov., a fast growing Mycoplasma species isolated from wild Caprinae / J. Jores, A. Fischer, P. Sirand-Pugnet et al. // Systematic and applied microbiology. — 2013. — No. 36 (8). — P. 533–538.
124. Kaklamanis, E. The immunosuppressive effect of mycoplasma infection. I. Effect on the humoral and cellular response / E. Kaklamanis, M. Pavlatos // Immunology. — 1972. — No. 22 (4). — P. 695–702.
125. Keane, D.P. Chronic abscesses in cats associated with an organism resembling Mycoplasma / D.P. Keane // The Canadian veterinary journal. — 1983. — No. 24 (9). — P. 289–291.
126. Kelton, W.H. Storage of Mycoplasma Strains / W.H. Kelton // Journal of bacteriology. — 1964. — No. 87 (3). — P. 588–592.
127. Kirchner, B.K. Spontaneous bronchopneumonia in laboratory dogs infected with untyped Mycoplasma spp. / B.K. Kirchner, C.D. Port, T.J. Magoc et al. // Laboratory Animal Science. — 1990. — No. 40 (6). — P. 625–628.
128. Kontor, E.J. Canine infectious tracheobronchitis: effects of an intranasal live canine parainfluenza – *Bordetella bronchiseptica* vaccine on viral shedding and clinical tracheobronchitis (kennel cough) / E.J. Kontor, R.J. Wegrzyn, R.A. Goodnow // American journal of veterinary research. — 1981. — No. 42 (10). — P. 1694–1698.

129. Koshimizu, K. Characterization and differentiation of mycoplasmas of canine origin / K. Koshimizu, M. Ogata // *Nihon juigaku zasshi. The Japanese journal of veterinary science.* — 1974. — No. 36 (5). — P. 391–406.
130. L'Abée-Lund, T.M. *Mycoplasma canis* and urogenital disease in dogs in Norway / T.M. L'Abée-Lund, R. Heiene, N.F. Friis et al. // *The Veterinary Record.* — 2003. — No. 153 (8). — P. 231–235.
131. Lamm, C.G. *Mycoplasma otitis* in California calves / C.G. Lamm, L. Munson, M.C. Thurmond et al. // *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians.* — 2004. — No. 16 (5). — P. 397–402.
132. Lane, D.J. 16S/23S rRNA sequencing / D.J. Lane // In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics.* — Edited by Stackebrandt E. & Goodfellow M. — Chichester: Wiley, 1991. — P. 115–175.
133. Le Boedec, K. A systematic review and meta-analysis of the association between *Mycoplasma* spp. and upper and lower respiratory tract disease in cats / K. Le Boedec // *Journal of the American Veterinary Medical Association.* — 2017. — No. 250 (4). — P. 397–407.
134. Lee-Fowler, T. Feline respiratory disease: what is the role of *Mycoplasma* species? / T. Lee-Fowler // *Journal of feline medicine and surgery.* — 2014. — No. 16 (7). — P. 563–571.
135. Liehmann, L. *Mycoplasma felis* arthritis in two cats / L. Liehmann, B. Degasperi, J. Spargser et al. // *The Journal of Small Animal Practice.* — 2006. — No. 47 (8). — P. 476–479.
136. López, A. Respiratory system, thoracic cavity, and pleura / A. López // In: *Thompson's Special Veterinary Pathology*, 3rd edition. — Edited by McGavin D.M., Carlton W.W. & Zachary J.F. — St. Louis: Mosby, 2001. — P. 125–195.
137. Loria, G.R. *Mycoplasma agalactiae* in sheep brains: a new site of infection? / G.R. Loria, C. Casalone, L. Sparacino et al. // *Large Animal Review.* — 2007. — No. 13 (2). — P. 65–68.
138. Low, H.C. Prevalence of feline herpesvirus 1, *Chlamydomphila felis*, and *Mycoplasma* spp. DNA in conjunctival cells collected from cats with and without conjunctivitis / H.C. Low, C.C. Powell, J.K. Veir et al. // *American Journal of Veterinary Research.* — 2007. — No. 68 (6). — P. 643–648.
139. Machado, M. Infection by *Mycoplasma bovis* in calves. Its isolation from a case of meningitis / M. Machado, M.M. Monteiro, V. Atalaia // *Repositório de Trabalhos do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária.* — 1987. — No. 19. — P. 67–74.

140. Maeda, T. *Mycoplasma bovis*-associated suppurative otitis media and pneumonia in bull calves / T. Maeda, T. Shibahara, K. Kimura et al. // Journal of comparative pathology. — 2003. — No. 129 (2–3). — P. 100–110.
141. Maksimović, Z. Genital mycoplasmas of healthy bitches / Z. Maksimović, A. Maksimović, A. Halilbašić et al. // Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. — 2018. — No. 30 (4). — P. 651–653.
142. Malik, R. Pyothorax associated with a *Mycoplasma* species in a kitten / R. Malik, D.N. Love, G.B. Hunt et al. // Journal of Small Animal Practice. — 1991. — No. 32 (1). — P. 31–34.
143. Mannering, S.A. Strain typing of *Mycoplasma cynos* isolates from dogs with respiratory disease / S.A. Mannering, L. McAuliffe, J.R. Lawes et al. // Veterinary Microbiology. — 2009. — No. 135 (3–4). — P. 292–296.
144. May, M. *Mycoplasma insons* sp. nov., a twisted mycoplasma from green iguanas (*Iguana iguana*) / M. May, G.J. Ortiz, L.D. Wendland et al. // FEMS microbiology letters. — 2007. — No. 274 (2). — P. 298–303.
145. McCandlish, I.A. A study of dogs with kennel cough / I.A. McCandlish, H. Thompson, H.J. Cornwell et al. // Veterinary Record. — 1978. — No. 102 (14). — P. 293–301.
146. MacDowell, A.L. Infectious triggers of asthma / A.L. MacDowell, L.B. Bacharier // Immunology and allergy clinics of North America. — 2005. — No. 25 (1). — P. 45–66.
147. McHenry, M.C. The infectious pneumonias / M.C. McHenry // Hospital practice. — 1980. — No. 15 (12). — P. 41–52.
148. Meseguer, M.A. *Mycoplasma pneumoniae*: a reduced-genome intracellular bacterial pathogen / M.A. Meseguer, A. Alvarez, M.T. Rejas et al. // Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. — 2003. — No. 3 (1). — P. 47–55.
149. Messias, A. Retinal safety of a new fluoroquinolone, pradofloxacin, in cats: assessment with electroretinography / A. Messias, F. Gekeler, A. Wegener et al. // Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology. — 2008. — No. 116 (3). — P. 177–191.
150. Messick, J.B. Hemotropic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis) / J.B. Messick, J.W. Harvey // In: Infectious Diseases of the Dog and Cat, 4th edition. — Edited by Greene C.E. — USA: Elsevier Inc., 2012. — P. 310–319.
151. Methods in Mycoplasmaology. Volume II: Diagnostic Mycoplasmaology. — Edited by Tully J.G. & Razin S. — NY: Academic Press, 1983. — 440 p.

152. Michaels, D.L. Cellular Microbiology of *Mycoplasma canis* / D.L. Michaels, J.A. Leibowitz, M.T. Azaiza et al. // Infection and immunity. — 2016. — No. 84 (6). — P. 1785–1795.
153. Moise, N.S. *Mycoplasma gateae* arthritis and tenosynovitis in cats: case report and experimental reproduction of the disease / N.S. Moise, J.W. Crissman, J.F. Fairbrother et al. // American Journal of Veterinary Research. — 1983. — No. 44 (1). — P. 16–21.
154. Möller Palau-Ribes, F. Description and prevalence of *Mycoplasma ciconiae* sp. nov. isolated from white stork nestlings (*Ciconia ciconia*) / F. Möller Palau-Ribes, D. Enderlein, N. Hagen et al. // International journal of systematic and evolutionary microbiology. — 2016. — No. 66 (9). — P. 3477–3484.
155. Much, P. *Mycoplasma gallisepticum*: Influence of cell invasiveness on the outcome of experimental infection in chickens / P. Much, F. Winner, L. Stipkovits et al. // FEMS immunology and medical microbiology. — 2002. — No. 34 (3). — P. 181–186.
156. Nagatomo, H. Comparative studies of the persistence of animal mycoplasmas under different environmental conditions / H. Nagatomo, Y. Takegahara, T. Sonoda et al. // Veterinary Microbiology. — 2001. — No. 82 (3). — P. 223–232.
157. Nakagawa, T. *Acholeplasma laidlawii* has tRNA genes in the 16S-23S spacer of the rRNA operon / T. Nakagawa, T. Uemori, K. Asada et al. // Journal of bacteriology. — 1992. — No. 174 (24). — P. 8163–8165.
158. Neimark, H.C. The cell wall-less rickettsia *Eperythrozoon wenyonii* is a Mycoplasma / H.C. Neimark, K.M. Kocan // FEMS microbiology letters. — 1997. — No. 156 (2). — P. 287–291.
159. Neimark, H. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of *Candidatus Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemomuris*, *Candidatus Mycoplasma haemosuis* and *Candidatus Mycoplasma wenyonii* / H. Neimark, K.E. Johansson, Y. Rikihisa et al. // International journal of systematic and evolutionary microbiology. — 2001. — No. 51 (Pt. 3). — P. 891–899.
160. Neimark, H. Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names / H. Neimark, K.E. Johansson, Y. Rikihisa et al. // International journal of systematic and evolutionary microbiology. — 2002. — No. 52 (Pt. 2). — P. 683.
161. Neimark, H. *Mycoplasma ovis* comb. nov. (formerly *Eperythrozoon ovis*), an eperythrocyclic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats / H. Neimark, B. Hoff, M. Ganter // International journal of systematic and evolutionary microbiology. — 2004. — No. 54 (Pt 2). — P. 365–371.
162. Nicholas, R.A.J. *Mycoplasma mastitis* in cattle: To cull or not to cull / R.A.J. Nicholas, L.K. Fox, I. Lysnyansky // The veterinary journal. — 2016. — No. 216. — P. 142–147.

163. Ogata, M. Recovery and identification of canine and feline mycoplasmas / M. Ogata // In: Methods in Mycoplasmaology. Volume II: Diagnostic Mycoplasmaology. — Edited by Tully J. G. & Razin S. — NY: Academic Press, 1983. — P. 105–113.
164. Ossewaarde, J.M. Application of a Mycoplasma group-specific PCR for monitoring decontamination of Mycoplasma-infected Chlamydia sp. strains / J.M. Ossewaarde, A.D. Veris, T. Bestebroes et al. // Applied and environmental microbiology. — 1996. — No. 62 (2). — P. 328–331.
165. Pace, N.R. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent / N.R. Pace, G.J. Olsen, C.R. Woese // Cell. — 1986. — No. 45 (3). — P. 325–326.
166. Padrid, P.A. Cytologic, microbiologic, and biochemical analysis of bronchoalveolar lavage fluid obtained from 24 healthy cats / P.A. Padrid, B.F. Feldman, K. Funk et al. // American journal of veterinary research. — 1991. — No. 52 (8). — P. 1300–1307.
167. Pappalardo, B.L. Granulomatous disease associated with Bartonella infection in 2 dogs / B.L. Pappalardo, T. Brown, J.L. Gookin et al. // Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine. — 2000. — No. 14 (1). — P. 37–42.
168. Parte, A.C. LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on / A.C. Parte // International journal of systematic and evolutionary microbiology. — 2018. — No. 68 (6). — P. 1825–1829.
169. Payan, D.G. Infection of a brain abscess by *Mycoplasma hominis* / D.G. Payan, N. Seigal, S. Madoff // Journal of clinical microbiology. — 1981. — No. 14 (5). — P. 571–573.
170. Priestnall, S.L. Serological prevalence of canine respiratory coronavirus / S.L. Priestnall, J. Brownlie, E.J. Dubovi et al. // Veterinary Microbiology. — 2006. — No. 115 (1–3). — P. 43–53.
171. Priestnall, S.L. New and emerging pathogens in canine infectious respiratory disease / S.L. Priestnall, J.A. Mitchell, C.A. Walker et al. // Veterinary pathology. — 2014. — No. 51 (2). — P. 492–504.
172. Randolph, J.F. Prevalence of mycoplasmal and ureaplasma recovery from tracheobronchial lavages and of mycoplasmal recovery from pharyngeal swab specimens in cats with or without pulmonary disease / J.F. Randolph, N.S. Moise, J.M. Scarlett et al. // American Journal of Veterinary Research. — 1993a. — No. 54 (6). — P. 897–900.
173. Randolph, J.F. Prevalence of mycoplasmal and ureaplasma recovery from tracheobronchial lavages and prevalence of mycoplasmal recovery from pharyngeal swab specimens in dogs with or without pulmonary disease / J.F. Randolph, N.S. Moise, J.M. Scarlett et al. // American Journal of Veterinary Research. — 1993b. — No. 54 (3). — P. 387–391.

174. Reed, N. Mycoplasma species in cats with lower airway disease: improved detection and species identification using a polymerase chain reaction assay / N. Reed, K. Simpson, R. Ayling et al. // Journal of feline medicine and surgery. — 2012a. — No. 14 (12). — P. 833–840.
175. Reed, N. Nasopharyngeal disease in cats: 2. Specific conditions and their management / N. Reed, D. Gunn-Moore // Journal of feline medicine and surgery. — 2012b. — No. 14 (5). — P. 317–326.
176. Reed, N. Chronic rhinitis in the cat / N. Reed // The Veterinary clinics of North America. Small animal practice. — 2014. — No. 44 (1). — P. 33–50.
177. Reed, N. Respiratory and Ocular Mycoplasmal Infections: Significance, Diagnosis, and Management / N. Reed // In: August's Consultations in Feline Internal Medicine, Volume 7. — Edited by Little S.E. — USA: Elsevier Inc., 2016. — P. 23–33.
178. Rikihisa, Y. Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA gene sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis* / Y. Rikihisa, M. Kawahara, B. Wen et al. // Journal of clinical microbiology. — 1997. — No. 35 (4). — P. 823–829.
179. Robertson, B.D. Genetic variation in pathogenic bacteria / B.D. Robertson, T.F. Meyer // Trends in Genetics. — 1992. — No. 8 (12). — P. 422–427.
180. Rosales, R.S. Mycoplasmas: Brain invaders? / R.S. Rosales, R. Puleio, G.R. Loria et al. // Research in veterinary science. — 2017. — No. 113. — P. 56–61.
181. Rosendal, S. Mycoplasmas as a possible cause of enzootic pneumonia in dogs / S. Rosendal // Acta Veterinaria Scandinavica. — 1972. — No. 13 (1). — P. 137–139.
182. Rosendal, S. Canine mycoplasmas. I. Cultivation from conjunctivae, respiratory and genital tracts / S. Rosendal // Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica — Section B, Microbiology and Immunology. — 1973a. — No. 81 (4). — P. 441–445.
183. Rosendal, S. *Mycoplasma cynos*, a new canine Mycoplasma species / S. Rosendal // International journal of systematic bacteriology. — 1973b. — No. 23 (1). — P. 49–54.
184. Rosendal, S. Canine mycoplasmas II: biochemical characterization and serological identification / S. Rosendal // Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica — Section B, Microbiology. — 1974a. — No. 82 (1). — P. 25–32.
185. Rosendal, S. Canine mycoplasmas: cultural and biochemical studies of type and reference strains / S. Rosendal // Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica — Section B, Microbiology. — 1975a. — No. 83 (5). — P. 457–462.
186. Rosendal, S. Canine mycoplasmas: serological studies of type and reference strains, with a proposal for the new species, *Mycoplasma opalescens* / S. Rosendal // Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica — Section B, Microbiology. — 1975b. — No. 83 (5). — P. 463–470.

187. Rosendal, S. Experimental mycoplasmal pneumonia in dogs: electron microscopy of infected tissue / S. Rosendal, O. Vinther // *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* — Section B, Microbiology. — 1977. — No. 85B. — P. 462–465.
188. Rosendal, S. Canine mycoplasmas: pathogenicity of mycoplasmas associated with distemper pneumonia / S. Rosendal // *The Journal of Infectious Diseases*. — 1978. — No. 138 (2). — P. 203–210.
189. Rosendal, S. Canine and feline mycoplasmas. / S. Rosendal // In: *The Mycoplasmas. Volume II: Human and Animal Mycoplasmas*. — Edited by Tully J.G. & Whitcomb R.F. — NY: Academic Press, 1979. — P. 217–234.
190. Rosendal, S. Canine mycoplasmas: their ecologic niche and role in disease / S. Rosendal // *Journal of the American Veterinary Medical Association*. — 1982. — No. 180 (10). — P. 1212–1214.
191. Rycroft, A.N. Serological evidence of *Mycoplasma cynos* infection in canine infectious respiratory disease / A.N. Rycroft, E. Tsounakou, V. Chalker // *Veterinary microbiology*. — 2007. — No. 120 (3–4). — P. 358–362.
192. Sachse, K. Emendation of the family Chlamydiaceae: proposal of a single genus, Chlamydia, to include all currently recognized species / K. Sachse, P.M. Bavoil, B. Kaltenboeck et al. // *Systematic and applied microbiology*. — 2015. — No. 38 (2). — P. 99–103.
193. Sandmeyer, L.S. Comparison of polymerase chain reaction tests for diagnosis of feline herpesvirus, *Chlamydophila felis*, and *Mycoplasma* spp. infection in cats with ocular disease in Canada / L.S. Sandmeyer, C.L. Waldner, B.S. Bauer et al. // *The Canadian veterinary journal*. — 2010. — No. 51 (6). — P. 629–633.
194. Saraya, T. The History of *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia / T. Saraya // *Frontiers in microbiology*. — 2016. — No. 7. — article 364.
195. Schmidt, J. Elimination of mycoplasma from cell cultures and establishment of mycoplasma free cell lines / J. Schmidt, V. Erfle // *Experimental Cell Research*. — 1984. — No. 152 (2). — P. 565–570.
196. Schulz, B.S. Detection of feline *Mycoplasma* species in cats with feline asthma and chronic bronchitis / B.S. Schulz, P. Richter, K. Weber et al. // *Journal of feline medicine and surgery*. — 2014. — No. 16 (12). — P. 943–949.
197. Schulz, B.S. Comparison of the prevalence of *Mycoplasma* species in dogs with and without respiratory disease / B.S. Schulz, K. Raufeisen, K. Weber et al. // *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*. — 2015. — No. 128 (7–8). — P. 304–309.
198. Scolten, S.S. Molecular detection and seroprevalence of *Mycoplasmas* in clinically healthy working dogs / S.S. Scolten, N. Tozon, S. Koprivec et al. // *Slovenian Veterinary Research*. — 2017. — No. 54 (4). — P. 155–161.

199. Senior, D.F. The role of *Mycoplasma* species and *Ureaplasma* species in feline lower urinary tract disease / D.F. Senior, M.B. Brown // *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. — 1996. — No. 26 (2). — P. 305–308.
200. Shahhosseiny, M.H. Rapid and sensitive detection of Mollicutes in cell culture by polymerase chain reaction / M.H. Shahhosseiny, Z. Hosseiny, H.R. Khoramkhorshid et al. // *Journal of basic microbiology*. — 2010. — No. 50 (2). — P. 171–178.
201. Shewen, P.E. A survey of the conjunctival flora of clinically normal cats and cats with conjunctivitis / P.E. Shewen, R.C. Povey, M.R. Wilson // *The Canadian veterinary journal*. — 1980. — No. 21 (8). — P. 231–233.
202. Shoetensack, H.M. Pure cultivation of filterable virus isolated from canine distemper / H.M. Shoetensack // *The Kitasato Archives of Experimental Medicine*. — 1934. — No. 11. — P. 227–290.
203. Smart, C.D. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region / C.D. Smart, B. Schneider, C.L. Blomquist et al. // *Applied and Environmental Microbiology*. — 1996. — No. 62 (8). — P. 2988–2993.
204. Sontakke, S. Use of broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology / S. Sontakke, M.B. Cadenas, R.G. Maggi et al. // *Journal of microbiological methods*. — 2009. — No. 76 (3). — P. 217–225.
205. Sorci, G. Immunity, resistance and tolerance in bird-parasite interactions / G. Sorci // *Parasite immunology*. — 2013. — No. 35 (11). — P. 350–361.
206. Spargser, J. Identification and differentiation of canine *Mycoplasma* isolates by 16S-23S rDNA PCR-RFLP / J. Spargser, R. Rosengarten // *Veterinary microbiology*. — 2007. — No. 125 (1–2). — P. 170–174.
207. Spargser, J. *Mycoplasma mucosicanis* sp. nov., isolated from the mucosa of dogs / J. Spargser, S. Langer, S. Muck et al. // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. — 2011. — No. 61 (4). — P. 716–721.
208. Stenske, K.A. Acute polyarthritis and septicemia from *Mycoplasma edwardii* after surgical removal of bilateral adrenal tumors in a dog / K.A. Stenske, D.A. Bemis, K. Hill et al. // *Journal of Veterinary Internal Medicine*. — 2005. — No. 19 (5). — P. 768–771.
209. Stipkovits, L. Mycoplasmal arthritis and meningitis in calves / L. Stipkovits, M. Rady, R. Glavits // *Acta veterinaria Hungarica*. — 1993. — No. 41 (1–2). — P. 73–88.
210. Suárez-Pérez, A. *Mycoplasma neophronis* sp. nov., isolated from the upper respiratory tract of Canarian Egyptian vultures (*Neophron percnopterus majorensis*) / A. Suárez-Pérez, A.S. Ramírez, R.S. Rosales et al. // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. — 2012. — No. 62 (Pt. 6). — P. 1321–1325.

211. Sung, H. PCR-based detection of *Mycoplasma* species / H. Sung, S.H. Kang, Y.J. Bae et al. // The journal of microbiology. — 2006. — No. 44 (1). — P. 42–49.
212. Tan, R.J. Incidence and significance of mycoplasmas in sick cats / R.J. Tan, J.A. Miles // Research in Veterinary Science. — 1974. — No. 16 (1). — P. 27–34.
213. Tang, J. A polymerase chain reaction based method for detecting *Mycoplasma*/*Acholeplasma* contaminants in cell culture / J. Tang, M. Hu, S. Lee et al. // Journal of microbiological methods. — 2000. — No. 39 (2). — P. 121–126.
214. Taylor-Robinson, D. Mycoplasmal and mixed infections of the human male urogenital tract and their possible complications. / D. Taylor-Robinson // In: The mycoplasmas. Volume IV: *Mycoplasma* pathogenicity. — Edited by Razin S. & Barile M.F. — Orlando: Academic Press, 1985. — P. 28–68.
215. Taylor-Robinson, D. Infections due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: an update / D. Taylor-Robinson // Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. — 1996. — No. 23 (4). — P. 671–682.
216. Thacker, E.L. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia / E.L. Thacker, P.G. Halbur, R.F. Ross et al. // Journal of clinical microbiology. — 1999. — No. 37 (3). — P. 620–627.
217. Thrusfield, M.V. Canine kennel cough: a review / M.V. Thrusfield // Veterinary Annual. — 1992. — No. 32. — P. 1–12.
218. Torres-Henderson, C. Pilot study to evaluate the role of *Mycoplasma* species in cat bite abscesses / C. Torres-Henderson, J. Hesser, D.R. Hyatt et al. // Journal of Feline Medicine and Surgery. — 2014. — No. 16 (12). — P. 997–1000.
219. Trow, A.V. Primary mycoplasma pneumonia associated with reversible respiratory failure in a cat / A.V. Trow, E.A. Rozanski, A.S. Tidwell et al. // Journal of Feline Medicine and Surgery. — 2008. — No. 10 (4). — P. 398–402.
220. Tully, J.G. Cloning and filtration techniques for mycoplasmas / J.G. Tully // In: Methods in Mycoplasmaology. Volume I: *Mycoplasma* Characterization. — Edited by Razin S. & Tully J.G. — NY: Academic Press, 1983. — P. 173–177.
221. Ueland, K. Serological, bacteriological and clinical observations on an outbreak of canine infectious tracheobronchitis in Norway / K. Ueland // The Veterinary record. — 1990. — No. 126 (19). — P. 481–483.
222. Ulgen, M. Urinary tract infections due to *Mycoplasma canis* in dogs / M. Ulgen, C. Cetin, S. Sentürk et al. // Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine. — 2006. — No. 53 (7). — P. 379–382.
223. Van Kuppeveld, F.J. Genus- and species-specific identification of *Mycoplasmas* by 16S rRNA amplification / F.J. van Kuppeveld, J.T. van der Logt, A.F. Angulo et al. // Applied and environmental microbiology. — 1992. — No. 58 (8). — P. 2606–2615.

224. Veir, J.K. Prevalence of selected infectious organisms and comparison of two anatomic sampling sites in shelter cats with upper respiratory tract disease / J.K. Veir, R. Ruch-Gallie, M.E. Spindel et al. // Journal of feline medicine and surgery. — 2008. — No. 10 (6). — P. 551–557.
225. Volokhov, D.V. Sequencing of the intergenic 16S-23S rRNA spacer (ITS) region of Mollicutes species and their identification using microarray-based assay and DNA sequencing / D.V. Volokhov, J. George, S.X. Liu et al. // European journal of applied microbiology and biotechnology. — 2006. — No. 71 (5). — P. 680–698.
226. Volokhov, D.V. *Mycoplasma enhydrae* sp. nov. isolated from southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) / D.V. Volokhov, F. Batac, Y. Gao et al. // International journal of systematic and evolutionary microbiology. — 2019. — No. 69 (2). — P. 363–370.
227. Wagener, J.S. Role of canine parainfluenza virus and *Bordetella bronchiseptica* in kennel cough / J.S. Wagener, R. Sobonya, L. Minnich et al. // American Journal of Veterinary Research. — 1984. — No. 45 (9). — P. 1862–1866.
228. Waites, K.B. New insights into the pathogenesis and detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections / K.B. Waites, M.F. Balish, T.P. Atkinson // Future microbiology. — 2008. — No. 3 (6). — P. 635–648.
229. Walker, R.D. Recovery of two mycoplasma species from abscesses in a cat following bite wounds from a dog / R.D. Walker, R. Walshaw, C.M. Riggs et al. // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. — 1995. — No. 7 (1). — P. 154–156.
230. Webley, W.C. Infectious asthma triggers: time to revise the hygiene hypothesis? / W.C. Webley, K.L. Aldridge // Trends in microbiology. — 2015. — No. 23 (7). — P. 389–391.
231. Willi, B. From Haemobartonella to hemoplasma: molecular methods provide new insights / B. Willi, F.S. Boretti, S. Tasker et al. // Veterinary microbiology. — 2007. — No. 125 (3–4). — P. 197–209.
232. Williams, M. Transtracheal wash from a puppy with respiratory disease / M. Williams, C. Olver, M.A. Thrall // Veterinary Clinical Pathology. — 2006. — No. 35 (4). — P. 471–473.
233. Windsor, R.C. Lymphoplasmacytic rhinitis in 37 dogs: 1997-2002 / R.C. Windsor, L.R. Johnson, E.J. Herrgesell et al. // Journal of the American Veterinary Medical Association. — 2004. — No. 224 (12). — P. 1952–1957.
234. Windsor, R.C. Canine chronic inflammatory rhinitis / R.C. Windsor, L.R. Johnson // Clinical Techniques in Small Animal Practice. — 2006. — No. 21 (2). — P. 76–81.
235. Windsor, R.C. Molecular detection of microbes in nasal tissue of dogs with idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis / R.C. Windsor, L.R. Johnson, J.E. Sykes et al. // Journal of Veterinary Internal Medicine. — 2006. — No. 20 (2). — P. 250–256.

236. Wise, K.S. Antigenic variation. / K.S. Wise, D. Yogev, R. Rosengarten // In: *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. — Edited by Maniloff J., McElhaney R.N., Finch L.R. et al. — Washington: American Society for Microbiology, 1992. — P. 473–489.
237. Wise, K.S. Adaptive surface variation in mycoplasmas / K.S. Wise // *Trends in Microbiology*. — 1993. — No. 1 (2). — P. 59–63.
238. Woese, C.R. Bacterial evolution / C.R. Woese // *Microbiological reviews*. — 1987. — No. 51 (2). — P. 221–271.
239. Wong, W.T. Pyothorax in the cat – a report of two cases / W.T. Wong, F. Noor // *Kajian Veterinar*. — 1984. — No. 16. — P. 15–17.
240. Wu, Q. Toll-like receptor 2 down-regulation in established mouse allergic lungs contributes to decreased mycoplasma clearance / Q. Wu, R.J. Martin, S. Lafasto et al. // *American journal of respiratory and critical care medicine*. — 2008. — No. 177 (7). — P. 720–729.
241. Wünschmann, A. Phenotypical characterization of T and B cell areas in lymphoid tissues of dogs with spontaneous distemper / A. Wünschmann, E. Kremmer, W. Baumgärtner // *Veterinary immunology and immunopathology*. — 2000. — No. 73 (1). — P. 83–98.
242. Wyrzykowski, B. Retrospective study of *Mycoplasma gallisepticum* meningoencephalitis in six turkey flocks in western France / B. Wyrzykowski, O. Albaric, S. Moreau et al. // *Journal of comparative pathology*. — 2013. — No. 148 (2–3). — P. 173–177.
243. Yavari, C.A. *Mycoplasma tullyi* sp. nov., isolated from penguins of the genus *Spheniscus* / C.A. Yavari, A.S. Ramírez, R.A.J. Nicholas et al. // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. — 2017. — No. 67 (10). — P. 3692–3698.
244. Ziegler, L. *Mycoplasma hafezii* sp. nov., isolated from the trachea of a peregrine falcon (*Falco peregrinus*) / L. Ziegler, F. Möller Palau-Ribes, D. Enderlein et al. // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. — 2019. — No. 69 (3). — P. 773–777.
245. Zeugswetter, F. Erosive polyarthritis associated with *Mycoplasma gateae* in a cat / F. Zeugswetter, K.M. Hittmair, A.G. de Arespachochaga et al. // *Journal of Feline Medicine and Surgery*. — 2007a. — No. 9 (3). — P. 226–231.
246. Zeugswetter, F. Lethal bronchopneumonia caused by *Mycoplasma cynos* in a litter of golden retriever puppies / F. Zeugswetter, H. Weissenbock, S. Shibly et al. // *Veterinary Record*. — 2007b. — No. 161 (18). — P. 626–628.

7 ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1 – Рассмотрение, одобрение и утверждение методических рекомендаций в ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина»

Рассмотрены и одобрены

Утверждаю

Научно-методическим советом
при ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА
имени К.И. Скрябина

Проректор по науке и инновациям
профессор

« 11 » декабря 2018 г.

« 11 » декабря 2018 г.



МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

**по пробоотбору и культивированию микоплазм,
обитающих на конъюнктиве и слизистых оболочках
верхнего респираторного тракта собак и кошек.
Сравнительный анализ чувствительности
бактериологического метода и метода ПЦР**

Разработчики: А.А. Сидорчук, С.Т. Орлова

Приложение 2 – Уведомление о приеме и регистрации заявки на патент (номер заявки 2019110925, дата поступления 11.04.2019)

ФР-18-499
28.04.19
Форма № 94 ИЗ, ПМ, ПО-2016

Федеральная служба по интеллектуальной собственности
Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Федеральный институт промышленной собственности»
(ФИПС)

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-5, 125993

Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРИЕМЕ И РЕГИСТРАЦИИ ЗАЯВКИ

11.04.2019	021182	2019110925
Дата поступления	Входящий №	Регистрационный №

ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ (фамилия, имя) 11 АПР 2019 (21) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ № ВХОДЯЩИЙ № (85) ДАТА ПЕРЕВОДА международной заявки на национальную фазу ☐ ФИПС ОТДМУ (регистрационный номер международной заявки и дата международной подачи, установленные национальным ведомством) ☐ (87) (номер и дата международной публикации международной заявки) ☐ (96) (номер европейской заявки и дата ее подачи) ☐ (97) (номер и дата публикации европейской заявки) ЗАЯВЛЕНИЕ о выдаче патента Российской Федерации на изобретение В Федеральную службу по интеллектуальной собственности Бережковская наб., д. 30, корп. 1, г. Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация (54) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ НАБОР СРЕД ДЛЯ ВИЗУАЛЬНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КЛАССА MOLLICUTES В ОБРАЗЦАХ С КОНЪЮНКТИВЫ И ИЗ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА СОБАК И КОШЕК, СПОСОБ ИЗЪЯТИИ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКОПЛАЗМ, АХОЛЕПЛАЗМ И УРЕАПЛАЗМ ОТ СОБАК И КОШЕК (71) ЗАЯВИТЕЛЬ (фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) физического лица или наименование юридического лица (согласно официальному документу), место жительства или место нахождения, название страны и почтовый индекс) Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» (ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина), г. Москва, 109472, ул. Академика Скрябина, д.23 ☐ изобретение создано за счет средств федерального бюджета Заявитель является: ☐ государственным заказчиком ☐ муниципальным заказчиком исполнитель работ (указать наименование) ☐ исполнителем работ по: ☐ государственному контракту ☐ муниципальному контракту заказчик работ (указать наименование) ИДЕНТИФИКАТОРЫ ЗАЯВИТЕЛЯ ОГРН 1037739216790 КПП 772101001 ИНН 7721043179 СНИЛС ДОКУМЕНТ (серия, номер) КОД СТРАНЫ (если он установлен) RU (74) ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ (указывается фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) лица, назначенного заявителем своим представителем для ведения дел по подаче заявки на патент в Федеральную службу по интеллектуальной собственности или являющегося таковым в силу закона) ☐ патентный поверенный ☐ представитель по доверенности ☐ представитель по закону	ОТД 17 12 АПР 2019 240 60 16 Dent
--	--

Общее количество документов в листах	66	Лицо, зарегистрировавшее документы
Из них: - количество листов комплекта изображений изделия (для промышленного образца)	0	Мазур О.В.
Количество платежных документов	1	
Сведения о состоянии делопроизводства по заявкам размещаются на сайте ФИПС по адресу «www.fips.ru» в разделе «Информационные ресурсы / Открытые реестры»		

Приложение 3 – Справка об использовании материалов диссертационной работы в учебном процессе

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ
ВETERИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ И
БИОТЕХНОЛОГИИ - МВА ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА»

ОГРН 1037739216790

109472, г. Москва,

ул. Академика Скрябина, д.23.

тел. 377-92-86, факс: 377-49-39

e-mail: rector@mgavm.ru, сайт: www.mgavm.ru

№ 06-20-1921 от 23.10.2019

На № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ
ВРИО ректора, профессор

С.В. Полябин

2019г



СПРАВКА

об использовании в учебном процессе материалов
диссертационной работы на тему:

«Усовершенствование методов обнаружения микоплазм
у собак и кошек»

Материалы изложенные в кандидатской диссертационной работе соискателя кафедры эпизоотологии и организации ветеринарного дела ФГБОУ ВО МГАВМиБ- МВА имени К.И.Скрябина Орловой Светланы Тихоновны по усовершенствованию методов обнаружения микоплазм у собак и кошек с помощью микробиологических и молекулярно-генетических методов, взятию и сохранению проб биоматериала и дальнейшей идентификации выделенных культур микоплазм используются при чтении лекций и проведении практических занятий на кафедре микробиологии академии со студентами ФВМ и при повышении квалификации ветеринарных врачей.

Заведующая
кафедрой микробиологии
доктор биологических наук, профессор

Т.Н.Грязнева

Приложение 4 – Справка об использовании материалов диссертационной работы в ФГБУ «ВГНКИ»

РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ»
(ФГБУ «ВГНКИ»)**



ЦЕНТР ВСЕМИРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ЖИВОТНЫХ (МЭБ) ПО БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВОЙ
ПРОДУКЦИИ, ДИАГНОСТИКЕ И БОРЬБЕ С БОЛЕЗНЯМИ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ СТРАН ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ,
ЦЕНТРАЛЬНОЙ АЗИИ И ЗАКАВКАЗЬЯ

123022, г. Москва,
Звенигородское шоссе, 5
тел (499) 253-14-91
факс (495) 982-50-84
ИНН 7703056867, КПП 770301001
E.mail: kanc@vgnki.ru

СПРАВКА

об использовании материалов диссертационной работы Орловой С.Т. на тему:
«Усовершенствование методов обнаружения микоплазм у собак и кошек».

Материалы, изложенные в кандидатской диссертационной работе соискателя кафедры эпизоотологии и организации ветеринарного дела ФГБОУ ВО МГАВМиБ-МВА имени К.И.Скрябина Орловой Светланы Тихоновны по усовершенствованию методов обнаружении микоплазм с помощью микробиологических и молекулярно-генетических методов, взятию и сохранению проб биоматериала и дальнейшей идентификации выделенных культур микоплазм, используются при проведении исследований биологического материала, поступающего в ФГБУ «ВГНКИ», а также при выполнении научно-исследовательской работы.

Заведующий отделом генодиагностики
инфекционных болезней животных,
к.биол.н.

Ученый секретарь ФГБУ «ВГНКИ»,
д.биол.н., профессор



С.П. Яцентюк

Н.К. Букова