

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» (ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина»).

Научный руководитель:

доктор ветеринарных наук, профессор
Сидорчук Александр Андреевич

Официальные оппоненты:

Чернов Владислав Моисеевич – доктор биологических наук, профессор, Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» (ФИЦ «КазНЦ РАН»), руководитель.

Волков Михаил Сергеевич – кандидат ветеринарных наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), заведующий лабораторией эпизоотологии и мониторинга.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО «СПбГАВМ»).

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2020 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.02 на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ «ФНЦ ВИЭВ РАН») по адресу: 109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, корп. 1, тел.: +7 (495) 970-03-68.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «ФНЦ ВИЭВ РАН» и на сайте <http://viev.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2020 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

**Ездакова
Ирина Юрьевна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (Борхсениус С.Н. и др., 2016, 2018; Borchsenius S.N. et al., 2018; Chae Ch., 2016; Grissett G.P. et al., 2015; Horner P. et al., 2018; Le Boedec K., 2017; Maksimović Z. et al., 2018; Nicholas R.A.J. et al., 2016; Priestnall S.L. et al., 2014; Rosales R.S. et al., 2017; Saraya T., 2016; Sorci G., 2013).

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 (Fuursted K. et al., 2008; Sontakke S. et al., 2009). 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) (Сидоров М.А. и др., 1976; Коромыслов Г.Ф. и др., 1987).

Первую методику культивирования микоплазм собак, получившую широкую известность, разработал S. Rosendal в 1973 году (Rosendal S., 1973). 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 М. Ogata (Ogata M., 1983). 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 PPLO 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. 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 раздельного 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 «подрачивание» микоплазм перед проведением посева в среде для взятия образцов биоматериала, содержащей современные бактерицидные антибиотики амоксиклав 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 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 ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) 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.

Объем 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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнялась в 2013-2019 гг. на кафедре эпизоотологии и ветдела ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина», а также на базе лаборатории молекулярной диагностики подразделения Институт вирусологии им. Д.И. Иванова ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России в порядке научного сотрудничества. Материал для исследований (мазки и смывы с конъюнктивы или со слизистых оболочек верхнего респираторного тракта) собирали в 2 ветеринарных клиниках и 1 приюте для кошек (Москва и Московская область), пробы были взяты у 138 собак и 62 кошек. Для выполнения разных этапов исследования из них случайным образом были сформированы 5 групп. Всего при проведении работы исследовано 267 образцов. При оптимизации методики изоляции микоплазм для каждого образца использовали схему исследования, приведённую на рисунке 1.



Рисунок 1 – Схема исследования образца, взятого с конъюнктивы или со слизистых оболочек верхнего респираторного тракта собаки либо кошки

Для приготовления среды пользовались основой среды и обогащающими добавками промышленного производства. Индикатором служил феноловый красный. Используемые для разных этапов культуральных работ варианты питательной среды, которые различались по плотности или содержанию энергетических добавок, приведены в таблице 1 (в их состав стандартно входил бензилпенициллин). Используемые 9 вариантов среды (таблица 1) комбинировали в наборы для посева 1 образца 3 составов (рисунок 2).

Таблица 1 – 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

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 2).

	Г	А	М	ГАМ
Ж	●	●	●	
П	●	●		
Т	○	○		

или

	Г	А	М	ГАМ
Ж	●	●	●	
П	●	●		
Т				○

А. Посев на 6-7 вариантов среды (полный набор).

	Г	А	М
Ж			●
Т	●	●	

Б. Посев на 3 варианта среды (минимальный набор).

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

или

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

В. Посев на 5 вариантов среды (набор промежуточного размера, состоящий преимущественно из полужидких сред).

Рисунок 2 – Апробированные схемы посева одного образца.

ж – жидкая среда; *п* – полужидкая среда; *т* – твёрдая среда; *Г* – среда с глюкозой; *А* – среда с аргинином; *ГА* – среда с глюкозой и аргинином; *ГАМ* – среда с глюкозой, аргинином и мочевиной; *М* – среда с мочевиной; ● или ○ – на этот тип среды производится посев

Таблица 2 – Стандартизированные модификации среды для взятия образцов

Обозначение	Содержащиеся антибиотики
«Old»	бензилпенициллин
«AK»	бензилпенициллин + амоксиклав
«С»	бензилпенициллин + цефепим
«AK+С»	амоксиклав + цефепим

При посевах засеивали зондом-тампоном твёрдые среды выбранного набора, затем отбирали мерной пипеткой среду для взятия образцов биоматериала из пластиковой пробирки и разносили её в равном объеме по пробиркам с жидкими и полужидкими вариантами среды данного набора. Посевы **инкубировали** при 37 °С: пробирки – до появления явных признаков роста или вплоть до 28 суток, чашки Петри – до появления явных признаков роста или 2-3 недели. **Осмотр** пробирок и чашек Петри проводился через 1, 3 и 7 суток после посева, далее – еженедельно.

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 проводилась *микроскопия* с окрашиванием мазков по Граму и/или Романовскому-Гимзе. 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 1).

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

Выделение ДНК из исследуемого материала проводили с помощью набора реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-В вариант 100». **Выявление ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma*** производили методом рутинной ПЦР с использованием готовой коммерческой тест-системы «МИК-КОМ». **Для видовой идентификации** амплифицировали полную нуклеотидную последовательность межгенного пространства 16S/23S рРНК методом рутинной ПЦР, используя описанные в литературе праймеры (прямой Мус1 5'-CACCGCCCGTCACACCA-3' и обратный Мус2 5'-CAAGGCATCCACCAAAAАСТСТ-3') при температурно-временных режимах: 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. Снятые с агарозного геля амплифицированные фрагменты ДНК секвенировали по методу Сэнгера. Сравнительный компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программы «BLAST».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Оптимизация и стандартизация состава культуральных сред

В работе использовались 9 вариантов среды, различающихся по плотности или содержанию энергетических добавок (таблица 1). Состав сред основывался на методике М. Ogata. Наиболее значимые изменения в составе сред заключались в добавлении к жидким и твёрдым средам полужидких сред с 0,3 % агара, на которых рост микоплазм и ахлеплазм имеет своеобразный, отличный от других бактерий, вид, а также в получении более плавного перехода рН в разных вариантах среды за счёт

добавления вариантов пГА и тГАМ (рН которых стабилизировали на уровне 7,5). Для стандартизации состава при приготовлении сред пользовались имеющими постоянный стабильный состав компонентами промышленного производства.

Отбор наиболее удобных для работы вариантов среды

Считывать результаты роста на твёрдых и полужидких средах использованной плотности оказалось проще и надёжнее, чем на жидких. На твёрдых средах рост микоплазм исключительно характерен – их колонии похожи на «яичницу-глазунью» (рисунок 3А), он не требует какой-либо дополнительной проверки. 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 3Б). Но иногда на полужидкой среде вырастают слишком мелкие колонии микоплазм, что приводит только к её помутнению. Такую форму роста трудно распознать или отличить от роста других бактерий. Приняв помутнение за рост микоплазм без дополнительного подтверждения другими методами, можно получить ложноположительный результат.

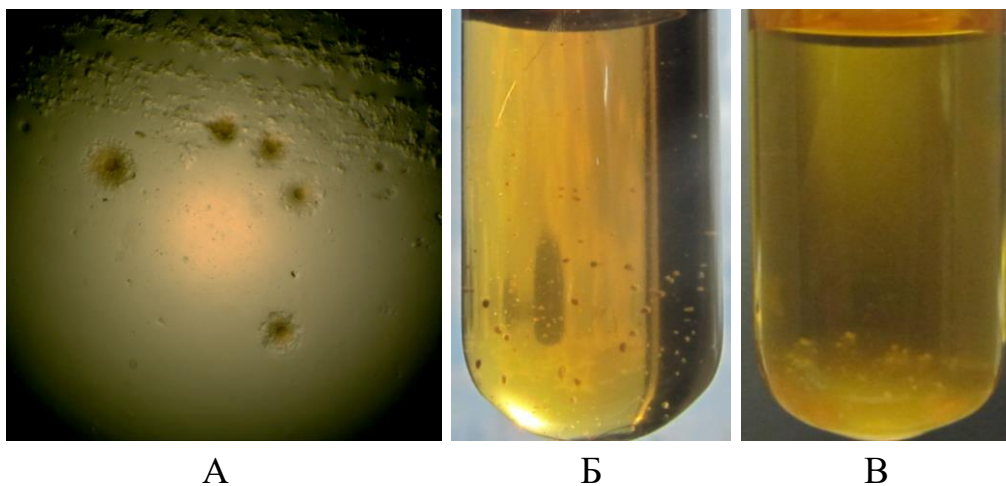


Рисунок 3 – Особенности микоплазменного роста на средах разной плотности.

А – «колонии-яичницы» на твёрдой среде (увеличение в 64 раза);

Б – колонии-«шарики» на полужидкой среде; В – «шарики» на жидкой среде

На жидких питательных средах рост микоплазм не имеет ярко выраженных, свойственных только микоплазмам особенностей – обычно это образование мелкого светлого осадка, оседающего на дно пробирки, которое не всегда сопровождается изменением цвета среды. В отдельных случаях на жидких средах тоже наблюдали образование маленьких «шариков» (рисунок 3В), но оно скорее является

исключением. Помутнение, образование осадка и/или изменение цвета жидкой среды может быть вызвано ростом посторонней микрофлоры. Микоплазменный осадок трудно бывает отличить и от осадка, образующегося при оседании белков из содержащейся в средах сыворотки крови. Поэтому риск получения ложноположительных результатов для жидких сред очень высок и их использование менее предпочтительно.

Снижение числа вариантов среды для посева 1 образца

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. Предложенные нами 9 вариантов среды (таблица 1) позволяют составить множество комбинаций. Нами были апробированы 3 схемы посева: из 6-7, из 5 и из 3 вариантов среды (рисунок 2). Максимально возможные простота и удобство методики, в том числе, за счёт использования вариантов среды, дающих наиболее чёткие и наглядные результаты, рассматривались как необходимая составляющая для её дальнейшего широкого использования в ветеринарных лабораториях.

Анализ каждого образца проводился в соответствии со схемой, приведённой на рисунке 1. ПЦР-анализ смывов, взятых одновременно с мазками с тех же анатомических мест (глаза, нос, зев), позволял оценить общее количество положительных образцов (как «референтный» метод). Результаты, полученные с помощью бактериологической методики (при простом осмотре посевов), проверяли посредством проведения ПЦР культур. Микроскопическое исследование культур давало большое количество ложноположительных результатов и оказалось непригодным для проверки наличия или отсутствия роста в случае с микоплазмами. Поскольку было замечено, что если рост отмечался в пробирке со слепым пассажем, он проявлялся и в пробирке, из которой тот был сделан, в ходе её дальнейшего инкубирования, от проведения слепых пассажей отказались.

Проведя посев на *полный набор сред* из **6-7 вариантов среды**, при визуальной

оценке (простом осмотре) полужидких сред считали положительным результатом не только типичный 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 изменение цвета. Специфичность бактериологической методики при её самостоятельном использовании для набора из 6-7 вариантов среды оказалась низкой – при таком способе учёта она составила 33,3 %.

Хотя при пробном посеве 2 образцов на *минимальный набор сред*, состоящий из **3 вариантов среды**, не было получено ложноположительных или ложноотрицательных результатов, оказалось, что чувствительность посева на твёрдые среды низкая – среди засеянных положительными образцами чашек Петри на твёрдой среде тГ рост наблюдали в 69,2 %, на среде тГАМ – в 66,7 %, а на среде тА – только в 33,3 %. Логично предположить, что и весь минимальный набор сред при более развёрнутом тестировании будет обладать меньшей чувствительностью, чем наборы, включающие полужидкие или другие жидкие среды.

При посеве на *набор промежуточного размера, состоящий преимущественно из полужидких сред* и включающий **5 вариантов среды**, для полужидких вариантов среды за положительные в процессе визуального осмотра засчитывали только посева, в которых наблюдался типичный микоплазменный рост (крошковые колонии в виде «штришков», «кометок» или «шариков»). По изменению цвета единственной жидкой среды жМ судили о наличии в образце уреаплазм (колонии уреаплазм на полужидких и твёрдых средах очень мелкие, их посева на эти среды не имеют особенного вида, поэтому для индикации уреаплазм пользовались только этой жидкой средой). В результате набор из 5 вариантов среды был признан *оптимальным* как по чувствительности и специфичности (ложноотрицательных и ложноположительных результатов не было), так и по удобству использования. Число засеянных пробирок и чашек Петри для каждого исследуемого образца в таком наборе снижено с 20-50, как предлагается у М. Ogata, до 5 (то есть в 4-10 раз).

Было сделано предположение, что если при визуальной оценке посевов не пренебрегать помутнением полужидких сред, а засчитывать его за сомнительный

результат (\pm) и дополнительно проверять методом ПЦР, чувствительность набора станет выше. Дополнение разработанной методики посева избирательным ПЦР-анализом для полужидких вариантов среды с сомнительным результатом роста (\pm) формирует инновационный комплексный метод, объединяющий бактериологические и молекулярно-генетические методы.

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

Для 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. Для повышения селективности было решено ввести в состав сред амоксилав и/или цефепим, в большей степени соответствующие современным условиям, чем предложенный М. Ogata в 1983 году бензилпенициллин. Ограничились внесением новых антибиотиков только в состав среды для взятия образцов (таблица 2), поскольку заметили, что введение цефепима во все среды для культивирования замедляет рост микоплазм. Собранный в новые модификации среды для взятия образцов патологический материал «подращивали» в термостате 2-4 часа перед проведением посева. Посев каждой пробы производили на признанный оптимальным набор сред из **5 вариантов среды**. Обобщённый (для всех вариантов среды) результат культивирования мазка сравнивали с результатом ПЦР взятого одновременно с ним смыва.

Образцы от собак. Мазки из зева собак отбирали с использованием сред «*Old*», «*AK*» и «*C*». Среда «*Old*» и «*AK*» показали близкие результаты – рост примесной микрофлоры обнаруживался в 33,7 и 32,9 %, а чувствительность предложенного варианта бактериологической методики оказалась близка к 100 % (ложноотрицательных образцов не было). Для среды «*C*» число проростов сократилось до 11,4 %, но при этом и чувствительность самостоятельно используемой методики бактериологического посева снизилась до 89,8 %. Дополнение методики проверкой с помощью

ПЦР слабоположительных и сомнительных культур (\pm) на полужидких вариантах среды, как и ожидалось, повысило чувствительность – до 98,0 % (таблица 3).

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

Таблица 3 – Чувствительность 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
«С»	собаки	89,8	98,0	11,4
«AK+С»	кошки	69,0	79,3	17,1

Образцы от кошек. Мазки из зева и с конъюнктивы кошек брали с использованием сред «Old», «AK» и «AK+С». У кошек новые модификации среды для взятия образцов биоматериала «AK» и «AK+С» снижали число проростов в посевах почти в 2 раза по сравнению со средой «Old» – с 29,2 до 16,6 и 17,1 % (таблица 3). 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 показала чувствительность 80 % для среды «Old», 71,4 % для среды «AK» и 69,0 % для среды «AK+С». 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+С» (таблица 3). Но она всё равно была ниже, чем при применении аналогичных модификаций среды для взятия образцов биоматериала у собак.

Ложноположительных результатов при культивировании кошачьих образцов получено не было, следовательно, специфичность предложенной методики

бактериологического посева близка к 100 %. Кроме того, использование методики бактериологического посева позволило *дополнительно выявить* 3 положительных образца (правильность интерпретации результатов посева для них подтверждена исследованием культур методом ПЦР). Исходя из общего количества выявленных с помощью всех используемых методов положительных образцов чувствительность ПЦР при его применении для анализа смывов можно оценить в 94,4 %.

Оптимизация взятия патологического материала для выявления микоплазм

Было установлено, что применять для взятия проб вместо контейнеров со специальной средой для взятия образцов биоматериала эппендорфы с физиологическим раствором нецелесообразно из-за увеличения роста посторонних микроорганизмов в посевах и снижения чувствительности методики почти в 3 раза (до 37,5 %).

При проведении культуральных работ было замечено, что рост в посевах мазков из зева чище и интенсивнее, чем в посевах мазков из носа. Это подтвердило и ПЦР-исследование содержимого пробирок после культивирования – для мазков из носа количество ДНК микоплазм в культурах на всех вариантах среды было существенно ниже, чем для мазков из зева. Поэтому предпочтительнее выбрать для взятия мазков из верхнего отдела респираторного тракта не носовые ходы, а зев.

Оказалось допустимым замораживать перед посевом отобранные с использованием специальной среды для взятия образцов биоматериала мазки на срок до 10 суток с последующей отправкой в лабораторию на льду.

Оптимизация молекулярно-генетического типирования микоплазм

Для большинства видов животных характерно одновременное носительство нескольких видов микоплазм. Смешанная микоплазменная флора неразличима в образцах морфологически, но осложняет биохимическое изучение, а также серологическое или молекулярно-генетическое типирование. Для проведения видовой идентификации все выделенные изоляты, представляющие, как правило, смешанные культуры, должны быть клонированы с целью получения чистых культур. Хорошей практикой считается получение и идентификация нескольких клонов из каждого образца. Для микоплазм однократный перенос отдельной колонии с содержащей агар

питательной среды на свежую жидкую среду часто не приводит к получению чистой культуры, поэтому процедуру клонирования принято повторять несколько раз.

Электрофореграмма продуктов рутинной ПЦР с «родовыми» праймерами Мус1 и Мус2 для 5 клонов, полученных однократным клонированием одного из изолятов, приведена на рисунке 4. Оказалось, что для 4 клонов из 5 даже однократная процедура клонирования позволила достаточно полно разделить 2 присутствующих в образце вида микоплазм, и лишь в одном клоне они остались в виде смеси.

Секвенирование по методу Сэнгера нескольких клонов, являющихся продуктами однократно проведённого клонирования, но выглядящих гомогенно на электрофореграмме (как клоны 1-4 на рисунке 4), позволило получить хроматограммы секвенирования хорошего качества, также указывающие на отсутствие гетерогенности ДНК-матрицы. Сравнительный компьютерный анализ полученных нуклеотидных последовательностей с помощью программы «BLAST» показал хорошее совпадение с эталонными штаммами микоплазм.

Для неразделённых клонов (как клон 5 на рисунке 4) удовлетворительные результаты дало повторение процедуры клонирования 1-3 раза без приготовления серии разведений или фильтрования посевного материала, рекомендуемых в литературе. Промежуточный ПЦР-контроль позволяет определить, какое из повторений процедуры клонирования является достаточным.

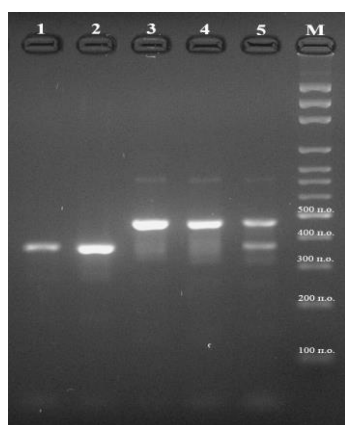


Рисунок 4 – Электрофореграмма продуктов ПЦР с «родовыми» праймерами Мус1 и Мус2 для 5 клонов, полученных путём однократного клонирования одного из изолятов (со среды тГ на среду пГ).

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*.

M – метчик

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*.

Очистка изолятов от устойчивой к бензилпенициллину микрофлоры

Для изолятов, содержащих сопутствующую микрофлору, устойчивую к бензилпенициллину, был предложен способ деконтаминации в процессе клонирования, который включает последовательные пересевы на среду с добавкой цефепима и среду с добавкой амфотерицина В с дальнейшей доочисткой полученных культур путём фильтрования через бактериальные фильтры.

Культивирование полученных фильтратов на свежих средах показало наличие чистого роста микоплазм умеренной интенсивности. При дальнейшем пассировании одного из клонов чистый рост без признаков наличия примесной микрофлоры сохранялся в 12 последовательно проведённых пересевах.

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). Наилучший результат был получен для клона, 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. Однако большинство клонов и изолятов плохо адаптировалось к используемым питательным средам – интенсивность роста от пассажа к пассажиу снижалась, особенно на средах с аргинином.

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 свежезасеянных пробирок и отсутствовать в другой или может сопровождаться изменением цвета, соответствующим в одной – подкислению, а во второй – защелачиванию среды. 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. Молекулярно-генетическими методами выборочно было подтверждено, что вид выросших микоплазм в таких случаях действительно

не соответствует энергетической добавке в среде. 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*, подтвердили, что при наличии в образце уреоплазм они растут не только на среде с мочевиной, но и на других используемых нами вариантах среды. Рост отдельных видов микоплазм, присутствующих в изоляте, при последовательных пассажах на средах с несоответствующей их потребностям энергетической добавкой мог как затухать, так и усиливаться. Возможно, микоплазмам многих видов хватает глюкозы, аргинина и мочевины, которые содержатся в добавляемой к средам лошадиной сыворотке крови даже без искусственного введения этих добавок в состав среды. Вероятно, для роста того или иного вида микоплазм более важным является рН среды.

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, следует проводить промежуточный контроль с помощью молекулярно-генетических методов.

Оптимизация хранения микоплазм собак и кошек

Была исследована возможность хранения изолятов и клонов микоплазм, полученных от собак и кошек, при температуре -18°C . Установлено, что небольшая доля жизнеспособных организмов сохраняется при таких условиях значительно дольше 12 месяцев, как предполагалось ранее. Оказалось, что, хотя длительное хранение в условиях умеренно отрицательных температур снижает интенсивность роста после размораживания, в большинстве изолятов даже через 3 года сохраняется небольшое количество жизнеспособных клеток микоплазм. Изоляты и клоны из респираторного тракта и с конъюнктивы собак и кошек оказались менее устойчивы на средах с аргинином как при пассировании, так и при хранении в замороженном виде.

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 амоксициллина 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) 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.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*1. Орлова, С.Т. Респираторные микоплазмы собак. Часть I. Роль микоплазм в респираторной патологии собак / С.Т. Орлова, А.А. Сидорчук // РВЖ. МДЖ. — 2013. — № 6. — С. 36–39.

*2. Орлова, С.Т. Респираторные микоплазмы собак. Часть II. Сложности диагностики и терапии / С.Т. Орлова, А.А. Сидорчук, Т.В. Гребенникова // РВЖ. МДЖ. — 2014. — № 1. — С. 43–48.

3. Орлова, С.Т. Культивирование микоплазм: ретроспектива и перспективы / С.Т. Орлова, А.А. Сидорчук, Т.В. Гребенникова // РВЖ. — 2018. — № 5. — С. 6–13.

*4. Орлова, С.Т. Микоплазмы, обитающие на слизистых оболочках респираторного тракта и конъюнктиве собак и кошек. Оптимизация методов пробоотбора, культивирования, клонирования выделенных изолятов и сохранения полученных изолятов и клонов / С.Т. Орлова, А.А. Сидорчук, Т.В. Гребенникова // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. — 2018. — № 10. — С. 51–61.

*5. Орлова, С.Т. Оптимизация методов взятия проб и культивирования микоплазм со слизистых оболочек респираторного тракта и конъюнктивы собак и кошек. Сообщение 1 / С.Т. Орлова, А.А. Сидорчук, Т.В. Гребенникова // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. — 2018. — № 11. — С. 51–61.

*6. Орлова, С.Т. Оптимизация методов взятия проб и культивирования микоплазм со слизистых оболочек респираторного тракта и конъюнктивы собак и кошек. Сообщение 2 / С.Т. Орлова, А.А. Сидорчук, Т.В. Гребенникова // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. — 2018. — № 12. — С. 6–15.

7. Сидорчук, А.А. Пробоотбор и культивирование микоплазм, обитающих на конъюнктиве и слизистых оболочках верхнего респираторного тракта собак и кошек. Сравнительный анализ чувствительности бактериологического метода и метода ПЦР. Методические рекомендации / А.А. Сидорчук, С.Т. Орлова — М.: МГАВМиБ – МВА им. К.И. Скрябина, 2019. — 32 с.

*8. Орлова, С.Т. Оптимизация клонирования и секвенирования микоплазм, выделенных из респираторного тракта и с конъюнктивы собак и кошек / С.Т. Орлова, А.А. Сидорчук, Т.В. Гребенникова // Ветеринария. — 2019. — № 6. — С. 28–33.

*9. Орлова, С.Т. Оптимизация адаптации к бесклеточным питательным средам и хранения микоплазм собак и кошек / С.Т. Орлова, А.А. Сидорчук, Т.В. Гребенникова // Ветеринария. — 2019. — № 9. — С. 55–60.

10. Заявка на патент № 2019110925 от 11.04.2019 «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».

11. Орлова, С.Т. Комплексный бактериологический и молекулярно-генетический метод индикации микоплазм у собак и кошек / С.Т. Орлова, А.А. Сидорчук // В: Сборник научных трудов международной учебно-методической и научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии и биотехнологии», посвящённой 100-летию со дня основания ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина». — М.: МГАВМиБ – МВА им. К.И. Скрябина, 2019. — С.150–152.

* – журналы списка ВАК

Автор выражает искреннюю благодарность за неоценимую помощь и содействие в проведении исследований заведующей лабораторией микоплазм и L-форм бактерий ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России профессору, д.б.н. И.В. Раковской; сотрудникам лаборатории молекулярной диагностики подразделения Института 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); 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); 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.