

ВЕТЕРИНАРИЯ

УДК 636.7: 616.99: 579.111

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ
УРОГЕНИТАЛЬНОГО МИКОПЛАЗМОЗА У СОБАК**

М.В. Лазарева, кандидат ветеринарных наук
Н.А. Шкиль, доктор ветеринарных наук, профессор
Новосибирский государственный аграрный
университет, Новосибирск, Россия
E-mail: lazareva_mv@nsau.edu.ru

Ключевые слова: микоплазмоз, уреаплазмоз, диагностика, микро-биоценоз, ДНК, метод ПЦР, микробиологический метод, собака

Реферат. Статья посвящена актуальной на сегодняшний день проблеме урогенитального микоплазмоза плотоядных. Изложены результаты исследований по сравнительному изучению методов диагностики урогенитального микоплазмоза у собак различных пород и возрастов, содержащихся в питомниках г. Новосибирска и принадлежащих частным владельцам. Для выявления микоплазм и уреаплазм в материале из урогенитального тракта был использован прямой микробиологический посев на селективные питательные среды и классический метод ПЦР с детекцией в агарозном геле. Отмечено, что жидкие селективные среды чувствительны к микоплазмам урогенитального тракта и позволяют не только выделять их, но и дифференцировать по основным биохимическим показателям (аргинин, глюкоза, мочевины). Доказана эффективность диагностики, включающей использование одновременно двух методов – культурального в сочетании с полимеразной цепной реакцией. Определена частота выявления среди собак различных пород микоплазм и уреаплазм. Установлено сочетанное носительство разных видов микоплазм и уреаплазм. Сравнение методов индикации микоплазм показало, что при исследовании методом ПЦР частота выявления микоплазм выше, чем бактериологическим методом на жидких селективных средах. Представлены электрофореграммы продуктов амплификации ДНК микоплазм, обнаруженных в урогенитальных смывах собак. Обусловлена необходимость мониторинга носительства микоплазм и уреаплазм в популяции собак. Рекомендована диагностика как основное противоэпизоотическое мероприятие, позволяющее проводить рациональную и эффективную терапию и прогнозировать дальнейшее течение и исход болезни.

**EFFICIENCY OF MICROBIOLOGICAL DIAGNOSTICS OF DOGS' UROGENITAL
MYCOPLASMOSIS**

Lazareva M.V., Candidate of Veterinary Medicine
Shkil N.A., Dr. of Veterinary Sc., Professor

Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

Key words: mycoplasmosis, ureaplasmosis, diagnostics, microbiocenosis, DNA, PCR method, microbiological method, dog.

Abstract. The paper is devoted to the important problem of meat-eaters' ureagenital mycoplasmosis. The authors show the research results on comparative analysis of the diagnostic methods of dogs' urogenital mycoplasmosis. The researchers conducted experiment on the dogs of different breeds and age, which are kept in the kennels of Novosibirsk and which belong to the owners. The researchers used microbiological inoculation

on selective growing mediums from urogenital tract in order to reveal mycoplasmas and ureaplasmas. The authors used PCR method with detection in agarose gel. Liquid selective mediums are not resistant to mycoplasmas of urogenital tract and differentiate them on the main biochemical parameters (arginine, glucose and BUN). The authors prove the efficiency of diagnostics that includes application of cultural method combined with PCR method. The research defines the frequency of mycoplasmas and ureaplasmas performance among the dogs of different breeds. Comparative analysis of mycoplasmas identification has shown that PCR method reveals mycoplasmas more often than bacteriological method on liquid selective mediums. The paper shows electrophoretograms of mycoplasmas DNA amplification in urogenital scraping of dogs. The authors speak about necessary monitoring of mycoplasmas and ureaplasmas in dog populations. They recommend to conduct diagnostics as a main antiepidemiologic measure for efficient therapy and preventing disease.

Эффективность мероприятий по борьбе с инфекционными заболеваниями во многом зависит от своевременного выявления возбудителя. Диагноз основывается на данных клинического наблюдения и на результатах лабораторных исследований, которые должны быть получены в максимально короткие сроки. Дифференциация микоплазмозов от смешанных вирусных инфекций на ранних стадиях заболевания позволяет вовремя принять необходимые меры и сократить экономические потери [1, 2].

Ряд исследователей рассматривают диагностику как основные противоэпизоотические мероприятия, позволяющие проводить рациональную и эффективную терапию и прогнозировать дальнейшее течение и исход болезней [3–6].

Так как микоплазмы способны достаточно долго находиться в организме инфицированного животного, не проявляя себя, для своевременной и точной постановки диагноза необходимо применение высокочувствительных и специфичных методов, которые позволят в короткие сроки обнаружить и дифференцировать возбудителя [5].

Для идентификации урогенитальных микоплазмозов используются различные методы диагностики: микробиологический, серологический, метод прямой и непрямой иммунофлюоресценции, иммуноферментный анализ, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) [7–9]. Только сочетание различных методов (не менее двух одновременно, и один из них ПЦР) дает необходимую точность диагностики урогенитальной инфекции как для постановки первичного диагноза, так и для контроля эффективности лечения [7].

Началом диагностики инфекций урогенитального тракта должна быть оценка его микробиоценоза. Микроскопические методы исследования не позволяют выявить все многообразие микроорганизмов. Поэтому в результате проведенных исследований по оптимизации методов микробиологической диагностики урогенитальных инфекций составлен алгоритм исследования, включающий использование одновременно двух методов – культурального в сочетании с ПЦР [8].

Культуральный метод является наиболее информативным (100%-я чувствительность), но в силу высокой стоимости и трудоемкости не имеет широкого распространения. Этот метод очень важен при подозрении на персистирующую инфекцию. Микоплазмы, в силу структурных особенностей, слабо адаптируются на питательных средах. В своих исследованиях О.В. Вологодская [10] и А.Н. Свиридова [5] для выделения микоплазм использовали элективные жидкие и твердые питательные среды для индикации и идентификации микоплазм.

Наиболее современным и достоверным, по мнению многих авторов [11–16] методом диагностики микоплазмозов является метод полимеразной цепной реакции, основанный на выявлении генома возбудителя (ДНК) в биопробах. Полимеразная цепная реакция – это метод, имитирующий естественную репликацию ДНК и позволяющий обнаружить единственную специфическую молекулу ДНК в присутствии миллионов других молекул. Высокая чувствительность и специфичность ПЦР-метода позволяет гарантированно обнаруживать единичных возбудителей в биологическом материале за короткий промежуток

времени, что позволяет поставить точный диагноз, назначить адекватное лечение и разработать профилактические мероприятия [17].

Цель исследований – изучить эффективность микробиологических методов диагностики урогенитального микоплазмоза у собак.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследования послужили собаки различных пород и возрастов в количестве 145 голов, из них 80 голов содержатся в питомниках г. Новосибирска и 65 голов принадлежат частным владельцам. Материалом для исследования служила вагинальная слизь, полученная путем соскоба.

Забор проб слизи осуществляли с помощью ложки Фолькмана. Материал помещали в стерильные пробирки, в 1,0 мл стерильного 0,9%-го раствора NaCl.

У больных животных с симптомами эндометрита изучали микробиоценоз урогенитального тракта, используя методы бактериологического исследования: прямой микробиологический посев на селективные жидкие питательные среды («Среда для индикации уреазплазм», «Среда для индикации аргинин-ферментирующих микоплазм» и «Среда для индикации глюкозоферментирующих микоплазм» производства НИИ природно-очаговых инфекций, г. Омск) и метод ПЦР.

Бактериологический метод диагностики (цветная реакция) основан на расщеплении мочевины, необходимой для роста микоплазм и уреазплазм, изменении pH и, как следствие, изменении цвета среды, в которую добавлен индикатор. Пробирки с исследуемыми пробами помещали в термостат при температуре ($37 \pm 1^\circ\text{C}$). Учет результатов проводили через 72 ч. Положительной реакцию считали при появлении зеленой окраски среды в пробирке с пробой, исследуемой на наличие уреазплазм; при появлении желтой окраски среды в пробирке с пробой, исследуемой на наличие глюкозоферментирующих микоплазм; при появлении зеленой окраски среды в пробирке с пробой, исследуемой на наличие аргинин-ферментирующих микоплазм.

Для микроскопического исследования проб готовили нативные препараты, которые в дальнейшем окрашивали по Граму. Морфологию микроорганизмов изучали с помощью светового микроскопа при 1000-кратном увеличении.

ПЦР-диагностику 70 проб вагинальной слизи проводили в лаборатории молекулярной диагностики. Были использованы тест-системы для выявления возбудителей микоплазмоза методом полимеразной цепной реакции: ПЦР-комплект МИК-КОМ (Москва), комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала «АмплиПрайм ДНК-сорб-В». В работе применялся классический метод ПЦР с детекцией в агарозном геле.

Учет результатов проводили электрофоретическим методом по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфической полосы амплифицированной ДНК, начиная с результатов амплификации положительных и отрицательных контролей. В качестве отрицательного контроля (К-) вместо ДНК-пробы вносили в пробирку 10 мкл ДНК-буфера, в качестве положительного контроля (К+) – 10 мкл ДНК микоплазмы.

Материалы исследования обработаны методом вариационной статистики с определением критерия достоверности по Стьюденту. Статистическую обработку данных проводили в программе Microsoft Office Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При микробиологическом исследовании урогенитальной слизи 145 собак, 80 из которых содержались в питомниках, 65 – принадлежали частным владельцам, микоплазмы изолированы в 81 пробе, что составило 55,9%.

Среди собак различных пород наибольший процент инфицированных животных (77,8%) приходился на терьеров (керри-блю терьер, бультерьер, русский черный терьер), лаек (75%) и овчарок (немецкая, восточно-европейская, южно-русская, среднеазиатская) – 61,8% (табл. 1).

Таблица 1

Результаты диагностических исследований собак разных пород на микоплазмоз
Diagnostic results on dogs' mycoplasmosis

Породы	Кол-во, гол.	Кол-во инфицированных		Возраст, лет	Тип микоплазм		Уреаплазмы
		гол.	%		аргининферментирующие	глюкозоферментирующие	
Лайка	28	21	75	0,2–11	10	19	9
Овчарка	55	34	61,8	0,5–5	4	13	18
Русский спаниель	10	2	20	1,3–4	1	-	1
Терьер	9	7	77,8	1–5	3	2	2
Лабрадор	7	2	28,6	0,4–3	-	-	2
Мастино napoletano	7	1	14,3	1–3	-	1	-
Дог	11	3	27,3	1–4	2	1	-
Прочие породы	18	11	61,1	1–6	1	6	6
В с е г о	145	81	55,9	-	21	42	38

Наименьшее количество микоплазм выделено у мастино napoletano – 14,3%. Аргининферментирующий тип микоплазм выявлен у 21 собаки, в том числе у 10 лаек (47,6%). Уреаплазмы изолированы у 38 собак, в том числе у 18 овчарок (47,4%), 9 лаек (23,7%). Глюкозоферментирующий тип микоплазм выявлен у 42 собак, в том числе у 19 лаек (45,2%) и 13 овчарок (30,9%).

Возраст собак, в урогенитальных пробах от которых были обнаружены микоплазмы, в 31 случае составлял 2 года и старше (68,9%), в 8 случаях – от 6 месяцев до 2 лет (17,8%) и в 6 случаях это были щенки до 3-месячного возраста (13,3%).

В 4 случаях из 9 микоплазмы были изолированы из биоматериала как от щенков, так и их матерей, что составляет 44,5% от количества случаев одновременного исследования щенков и матерей.

Клинические симптомы заболевания (апатия, аппетит сохранён или слабо выражен, упитанность ниже средней, шёрстный покров тусклый, истечения из мочевого тракта, бесплодие, мало- и мелкоплодие, рождение нежизнеспособных щенков) проявились только у 21 головы – 25,9% от общего числа инфицированных, что подтверждает бессимптомное носительство микоплазм.

Морфологические свойства микоплазм изучали микроскопическим методом. Колонии микоплазм, изолированные из патологического материала и принадлежащие разным видам, имели морфологические сходства.

Исследование 70 проб урогенитальной слизи собак различных пород методом полимеразной цепной реакции (табл. 2) выявило наличие генома микоплазм в 47 случаях, что составило 67,1%.

Таблица 2

Результаты ПЦР-исследований на микоплазмоз собак
PCR diagnostics on dogs' mycoplasmosis

Тип содержания	Кол-во проб	Кол-во положительных	
		проб	%
Питомник № 1	37	19	51,4
Питомник № 2	13	9	69,2
Частное владение	20	19	95
В с е г о	70	47	67,1

Возраст собак, в пробах от которых были выделены нуклеиновые кислоты микоплазм, в 41 случае (87,2%) составил 2 года и старше, в 6 случаях (12,8%) – 1 год.

На рис. 1 представлены электрофореграммы продуктов амплификации ДНК микоплазм, обнаруженных в урогенитальных смывах собак, содержащихся в питомниках.

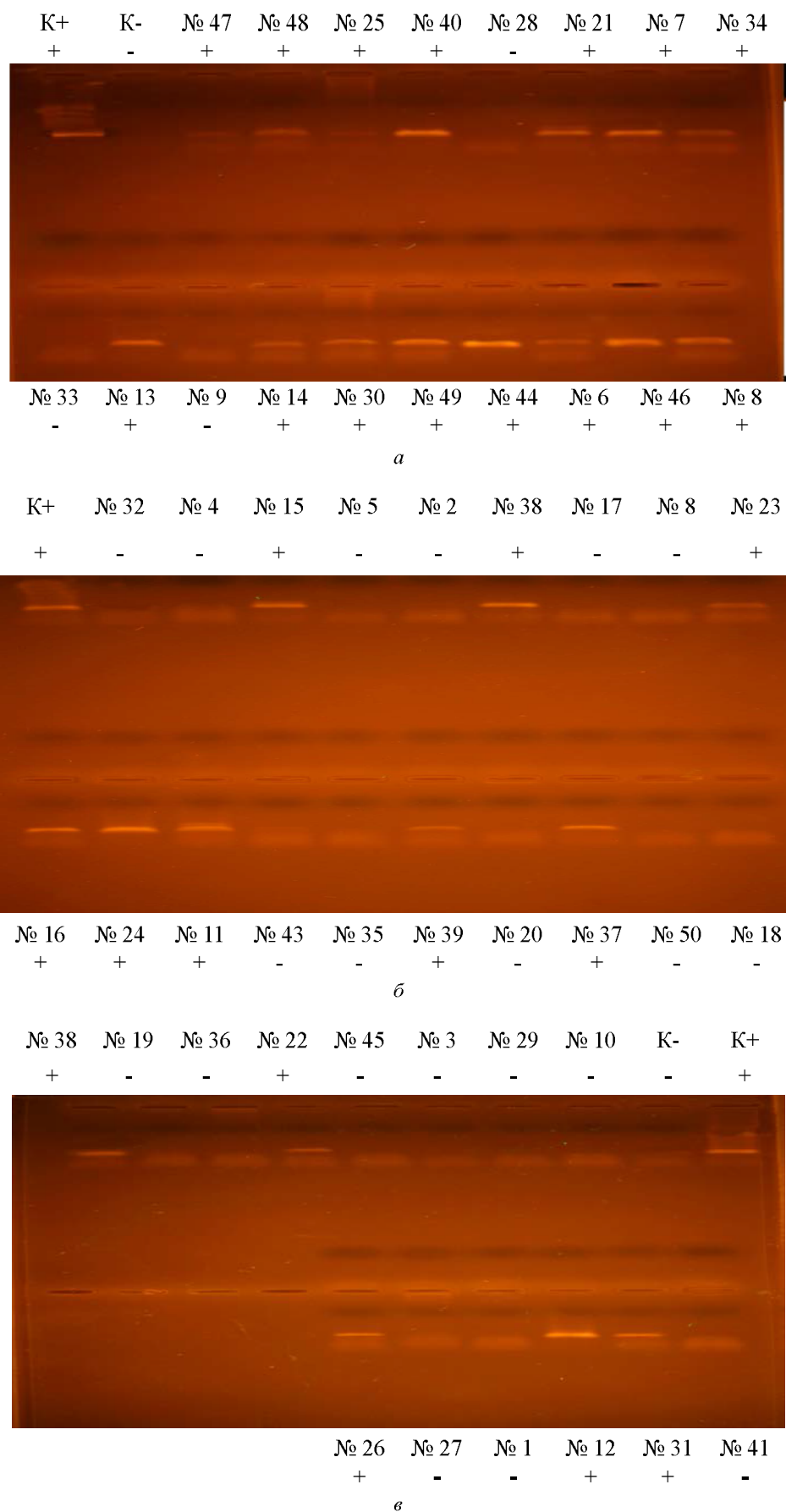


Рис. 1. Результаты ПЦР-анализа проб урогенитальной слизи собак на микоплазмоз
PCR analysis of urogenital mucus of dogs on mycoplasmosis

На первой электрофореграмме (см. рис. 1, *а*) в пробах № 47, 48, 25, 40, 21, 7, 34, 13, 14, 30, 49, 44, 6, 46, 8 наблюдали характерное свечение в виде полосы на гелевой дорожке, которая находится на том же расстоянии от старта, что полоса положительного контроля. Это говорит о наличии в данных пробах ДНК микоплазмы. Результат исследования в данных пробах положительный.

На второй электрофореграмме (см. рис. 1, *б*) отмечено характерное свечение в пробах № 15, 38, 23, 16, 24, 11, 39, 37. В данных пробах также отмечается наличие ДНК микоплазмы, результат исследований положительный.

На третьей электрофореграмме (см. рис. 1, *в*) в пробах № 38, 22, 26, 12, 31 результат исследований положительный, так как наблюдался характерный паттерн.

Таким образом, выявлено 28 положительных проб. Длина амплифицируемого фрагмента составила 509 п. н.

При исследовании урогенитальных смывов 20 собак, принадлежащих частным владельцам, методом полимеразной цепной реакции в пробах № 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 (рис. 2, *а*) и в пробах № 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 39 (см. рис. 2, *б*) наблюдали наличие специфической полосы амплифицированной ДНК на уровне 509 п. н. Данные пробы считали положительными.

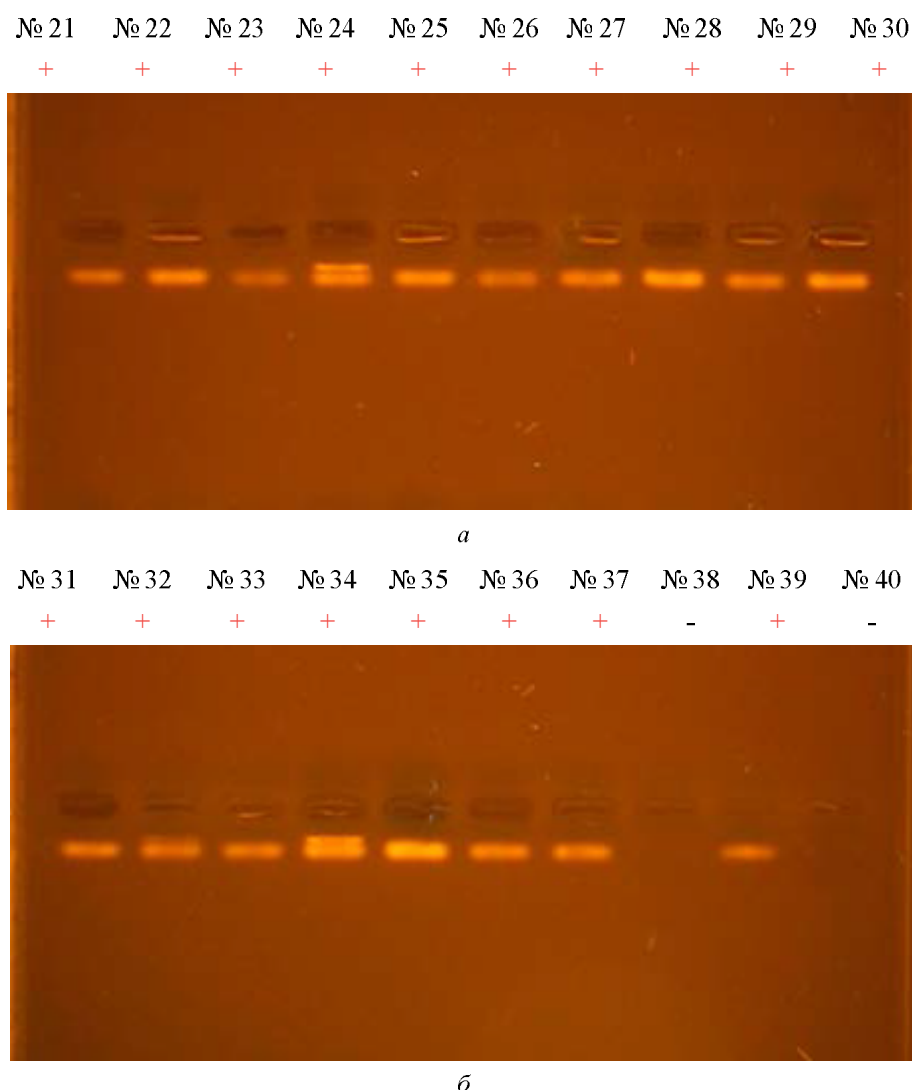


Рис. 2. Индикация микоплазм методом ПЦР в урогенитальной слизи собак частного владения
Mycoplasmosis indication by means of PCR method in urogenital mucus of private dogs

При сравнении методов индикации микоплазм отмечено, что при бактериальном методе исследования на жидких селективных средах частота выявления микоплазм составила 55,9%, а при исследовании методом ПЦР – 67,1%, что на 11,2% больше. Наиболее чувствительным оказался метод ПЦР.

ВЫВОДЫ

1. Микробиологическое исследование биоматериала от собак показало высокий уровень носительства микоплазм и уреаплазм.

Частота их выявления методом посева на жидкие селективные среды составила 55,9%.

2. Среди собак различных пород наибольшая доля инфицированных животных (77,8%) приходилась на терьеров (керри-блю терьер, бультерьер, русский черный терьер), лаек (75%) и овчарок (немецкая, восточно-европейская, южно-русская, среднеазиатская) – 61,8%.

3. Частота выявления генома микоплазм методом ПЦР составила 67,1%, что на 11,2% больше, чем при исследовании микробиологическим методом.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Красиков А. П., Новикова Н. Н. Урогенитальная микоплазмоз-ассоциированная инфекция плотоядных. – Омск: ФГОУ ВПО ОмГАУ, 2008. – 106 с.
2. Спрыгин А. В., Андрейчук Д. Б., Ирза В. Н. *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae*: биологические свойства и молекулярная диагностика: обзор литературы. – Владимир: ВНИИЗЖ, 2010. – 63 с.
3. Коромыслов Г. Ф., Мессарош Я., Штипкович Я. Микоплазмы в патологии животных. – М.: Агропромиздат, 1987. – 113 с.
4. Колупаев В. Е., Гиммельфарб Е. И., Липова Е. В. Анализ эффективности количественных и качественных лабораторных методов выявления уреа- и микоплазм // Вестн. последиплом. мед. образования. – 2009. – № 1. – С. 37–41.
5. Свиридова А. Н. Ассоциативный микоплазмоз телят и его диагностика // Состояние и перспективы аграрной науки Казахстана и Западной Сибири: сб. науч. тр. Сев.-Казахстан. НИИ животноводства и ветеринарии. – 2007. – С. 291–297.
6. Рищук С. В., Мирский В. Е., Афонина И. Е. Проблемы диагностики урогенитальной микоплазменной инфекции // Бюл. Оренбург. науч. центра УрО РАН (электрон. журн.). – 2013. – № 1. – С. 1–15.
7. Прилепская В. Н., Абакарова П. Р. Урогенитальный хламидиоз // Гинекология. – 2004. – № 1. – С. 1–7.
8. Савичева А. М. Генитальные микоплазмы – проблемы диагностики и лечения // Клиническая дерматология и венерология. – 2008. – № 6. – С. 80–90.
9. Протопопова Т. А. Влагилищные инфекции // Рус. мед. журн. – 2012. – № 21. – С. 1102.
10. Диагностика ассоциативных инфекционных болезней крупного рогатого скота / А. П. Красиков, В. Э. Малошевич, Н. В. Лобанова [и др.] // Проблемы ветеринарного образования и научных исследований в агропромышленном комплексе: сб. науч. тр. ИВМ ОмГАУ. – 2004. – С. 187–193.
11. Ковалева И. В., Поддубная О. В. Возможность применения ПЦР-метода в ветеринарии // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. – 2012. – С. 264–266.
12. Обухов И. Л., Ярлова Е. А. Молекулярная диагностика инфекционных заболеваний кошек и собак // РВЖ. МДЖ. – 2005. – № 2. – С. 40–41.
13. Обухов И. Л. Применение ПЦР в ветеринарии // Аграр. Россия. – 2002. – № 2. – С. 62–64.
14. Красникова Е. С. Применение ПЦР в практике ветеринарного врача // Ветеринарная медицина. Современные проблемы и перспективы развития: материалы Междунар. науч.-практ. конф. – Саратов, 2010. – С. 239–242.
15. Хворик Д. Ф. Хламидийно-ассоциированные инфекции: диагностика и лечение: монография. – Гродно: ГрГМУ, 2011. – 328 с.

16. Погосян Г.П., Коновалова А.А., Акимова В.В. Сравнительный анализ распространенности различных видов микоплазм // Междунар. журн. приклад. и фундаментал. исследований. – 2012. – № 1. – С. 99–101.
17. Новикова Н.Н. Экспресс-методы диагностики урогенитального микоплазмоза плотоядных: автореф. дис. ... канд. вет. наук. – Новосибирск, 2002. – 18 с.

REFERENCES

1. Krasikov A. P., Novikova N. N. *Urogenital'naya mikoplazmoz-assotsirovannaya infektsiya plotoyadnykh* (Urogenitalnaya mycoplasmosis – the associated infection carnivorous), Omsk: FGOU VPO OmGAU, 2008, 106 p.
2. Sprygin A. V., Andreichuk D. B., Irza V. N. *Mycoplasma gallisepticum i Mycoplasma synoviae: biologicheskie svoystva i molekulyarnaya diagnostika* (Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae: biological properties and molecular diagnostics), Vladimir: VNIIZZh, 2010, 63 p.
3. Koromylov G. F., Messarosh Ya., Shtipkovich Ya. *Mikoplazmy v patologii zhivotnykh* (Mycoplasmas in pathology of animals), Moscow: Agropromizdat, 1987, 113 p.
4. Kolupaev V. E., Gimmel'farb E. I., Lipova E. V., *Vestnik poslediplomnogo meditsinskogo obrazovaniya*, 2009, No. 1, pp. 37–41. (In Russ.)
5. Sviridova A. H., *Sostoyaniye i perspektivy agrarnoy nauki Kazakhstana i Zapadnoy Sibiri: sb. nauch. tr. Severo-Kazakhstanskogo NII zhivotnovodstva i veterinarii*, 2007, pp. 291–297. (In Russ.)
6. Rishchuk S. V., Mirskii V. E., Afonina I. E., *Byul. Orenburg. nauch. tsentra UrO RAN (elektron. zhurn.)*, 2013, No. 1, pp. 1–15. (In Russ.)
7. Prilepskaya V. N., Abakarova P. R., *Ginekologiya*, 2004, No. 1, pp. 1–7.
8. Savicheva A. M., *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya*, 2008, No. 6, pp. 80–90. (In Russ.)
9. Protopopova T. A., *Rus. med. zhurn.*, 2012, No. 21, p. 1102. (In Russ.)
10. Krasikov A. P., Maloshevich V. E., Lobanova N. V., Vologodskaya O. V., *Problemy veterinarnogo obrazovaniya i nauchnykh issledovaniy v agropromyshlennom komplekse: sb. nauch. tr. IVM OmGAU*, 2004, pp. 187–193. (In Russ.)
11. Kovaleva I. V., Poddubnaya O. V., *Aktual'nye problemy intensivnogo razvitiya zhivotnovodstva*, 2012, pp. 264–266. (In Russ.)
12. Obukhov I. L., Yalalova E. A., *RVZh MDZh*, 2005, No. 2, pp. 40–41. (In Russ.)
13. Obukhov I. L., *Agrar. Rossiya*, 2002, No. 2, pp. 62–64. (In Russ.)
14. Krasnikova E. S., *Veterinarnaya meditsina. Sovremennye problemy i perspektivy razvitiya* (Veterinary Medicine. Modern problems and prospects): Proceedings of the International Scientific and Practical Conference, Saratov GAU, 2010, pp. 239–242. (In Russ.)
15. Khvorik D. F. *Khlamidiino-assotsirovannye infektsii: diagnostika i lechenie* (Chlamydia-related infections: diagnosis and treatment), Grodno: GrGMU, 2011, 328 p.
16. Pogosyan G. P., Konovalova A. A., Akimova V. V., *Mezhdunar. zhurn. priklad. i fundamental. issledovaniy*, 2012, No. 1, pp. 99–101.
17. Novikova N. N., *Ekspress-metody diagnostiki urogenital'nogo mikoplazmoza plotoyadnykh* (Express methods of diagnostics of urogenital mycoplasmosis carnivorous): avtoref. dis. ... kand. vet. nauk, Novosibirsk, 2002, 18 p.