

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovisgenitalium*, *Mycoplasma californicum* И ВЫЯВЛЕНИЕ *Ureaplasma diversum* МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

А.Д. КОЗЛОВА, Н.С. ГОРБАЧЕВА, Р.Ф. ХАЕРОВА, М.С. КРАСНИКОВА,
Е.А. ЛАЗАРЕВА, С.П. ЯЦЕНТЮК

Микоплазмы и уреаплазмы — важные этиологические агенты маститов, пневмоний и репродуктивных нарушений у крупного рогатого скота (КРС), которые наносят значительный экономический ущерб хозяйствам. К наиболее распространенным клинически значимым видам относятся *Mycoplasma bovis*, *M. bovisgenitalium*, *M. californicum* и *Ureaplasma diversum*. Существующие диагностические наборы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяют с высокой точностью выявлять в биологическом материале бактерии рода *Mycoplasma*, но не проводить видовую идентификацию. В представленной работе с помощью разработанных методик на основе ПЦР мы впервые выявили и дифференцировали патогенные виды семейства *Mycoplasmatataceae* в образцах криоконсервированной спермы быков-производителей, используемой для искусственного осеменения в отечественных хозяйствах. Нашей целью была разработка методик для идентификации и дифференциации наиболее распространенных патогенных микоплазм (*Mycoplasma bovis*, *M. californicum*, *M. bovisgenitalium*) и *Ureaplasma diversum* на основе ПЦР с гибридно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. В качестве мишеней для ПЦР были выбраны гены *UvrC* для *M. bovis*, 16S рРНК для *M. bovisgenitalium* и *U. diversum*, ген *rpoB* для *M. californicum*. В методики включили систему праймеров и зондов для детекции амплификации экзогенного неконкурентного внутреннего контрольного образца (ВКО). Специфичность разработанных методик проверяли на панели образцов, содержащей вирусные и бактериальные патогены, которые вызывают заболевания у крупного рогатого скота, а также геномную ДНК коровы. Для оценки чувствительности каждой методики были разработаны положительные контрольные образцы на основе генно-инженерных конструкций, содержащих участок соответствующей специфической ДНК. Аналитическую чувствительность оценивали отдельно для каждого патогена, для чего исследовали 10-кратные разведения соответствующих контрольных образцов в отрицательных пробах биологического материала (сперма, молоко, влагалищные смывы, внутренние органы). Для разных видов материала аналитическая чувствительность составила в среднем 5×10^3 копий/мл. Эффективность амплификации для *M. bovis* составила 99 %, для *M. bovisgenitalium* — 87 %, для *M. californicum* — 94 %, для *U. diversum* — 98 %. С помощью разработанных методик были исследованы 410 образцов спермы быков для искусственного осеменения из отечественных и зарубежных племенных центров. ДНК *M. bovis* была обнаружена в 2,5 % образцов из зарубежных племенных центров. В образцах спермы из отечественных хозяйств ДНК *M. bovis* не выявили. Положительный результат обнаружения ДНК *M. bovisgenitalium* был получен для 60,7 % отечественных и для 25,1 % импортных образцов спермы, ДНК *M. californicum* обнаружили соответственно в 51,7 % и 25,1 % образцов. ДНК *Ureaplasma diversum* — в 55 % образцов спермы быков из российских племенных центров и в 12,1 % образцов спермы иностранного происхождения. Коинфицирование *M. californicum*/*M. bovisgenitalium* выявили в 97 образцах (23,7 %), *M. bovisgenitalium*/*U. diversum* — в 86 случаях (21 %). Одновременное инфицирование *M. bovisgenitalium*, *M. californicum* и *U. diversum* отмечали в 52 образцах (24,6 %) спермы из отечественных хозяйств и в 4 образцах (2,0 %) из зарубежных племенных центров. Разработанные методики могут использоваться в ветеринарных лабораториях для совершенствования диагностики и оптимизации противоэпизоотических мероприятий, а также для мониторинга качества спермы КРС, используемой для искусственного осеменения.

Ключевые слова: *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma bovisgenitalium*, *Ureaplasma diversum*, ПЦР в реальном времени, быки, сперма.

Микоплазмы и уреаплазмы — важные этиологические агенты маститов, пневмоний и репродуктивных нарушений у крупного рогатого скота (КРС), которые наносят значительный экономический ущерб хозяйствам. К наиболее распространенным патогенным и клинически значимым видам относятся *Mycoplasma bovis*, *M. bovisgenitalium*, *M. californicum* и *Ureaplasma diversum* (1, 2).

M. bovis — один из самых опасных патогенов, возбудитель заболе-

ваний верхних дыхательных путей, пневмоний, отитов, артритов, маститов, эндометритов, кератоконъюнктивитов, а также других патологий у КРС (3-5). При маститной патологии на втором по распространенности месте после *M. bovis* находится *M. californicum*, которая вызывает артриты и пневмонии у молодых животных (6, 7). Вид *M. bovigentialium*, который также может вызывать маститы у коров, обнаруживается в репродуктивном тракте и ассоциирован с эндометритами, бесплодием, нарушением родовой деятельности (8, 9). Показано, что *M. bovigentialium* служит возбудителем некротического вульвовагинита, наносящего ущерб хозяйствам, занимающимся разведением КРС (10). Кроме того, установлена статистически значимая корреляция между присутствием этой микоплазмы в сперме быков и сниженной подвижностью сперматозоидов.

Другой представитель семейства *Mycoplasmataceae* — *Ureaplasma diversum* отличается от видов рода *Mycoplasma* способностью к гидролизу мочевины, но тоже ассоциирован с различными нарушениями репродуктивных функций КРС, такими как гранулярный вульвовагинит, эндометриты, сальпингиты, спонтанные аборт, бесплодие и рождение слабого потомства (11, 12).

Классическим методом выявления микоплазм считается культивирование на селективных питательных средах (13). Однако этот метод имеет ряд ограничений. Для роста микоплазм необходимы специализированные среды и микроаэрофильные условия культивирования. Исследование занимает от 7 до 10 сут. При этом рост других видов бактерий существенно затрудняет или делает невозможным точную идентификацию возбудителя.

В настоящее время при диагностике микоплазмозов широко применяется полимеразная цепная реакция (ПЦР) с родоспецифическими праймерами, позволяющая выявлять представителей рода *Mycoplasma* в различных образцах биологического материала за короткое время и независимо от других микроорганизмов, присутствующих в пробе. Однако использование такого подхода не позволяет дифференцировать видовую принадлежность возбудителя.

В представленной работе с помощью разработанных методик на основе ПЦР мы впервые выявили и дифференцировали патогенные виды семейства *Mycoplasmataceae* в образцах криоконсервированной спермы быков-производителей, используемой для искусственного осеменения в отечественных хозяйствах. Проведено сравнение обсемененности микоплазмами спермопродукции, поставляемой из отечественных и зарубежных племенных хозяйств, отмечены случаи одновременного инфицирования образцов несколькими видами микоплазм.

Нашей целью была разработка методик идентификации и дифференциации наиболее распространенных патогенных микоплазм (*Mycoplasma bovis*, *M. californicum*, *M. bovigentialium*) и *Ureaplasma diversum* на основе полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Методика. В работе использовали вагинальные смывы, молоко, паренхиматозные органы, сперму КРС и штаммы *Mycoplasma bovis* ATCC 25523, *M. bovigentialium* ATCC 19852, *M. arthritidis* ATCC 19611, *M. bovirhinis* PG43 ATCC 27748, *M. arginine* G230 ATCC 23838-TTR; *Histophilus somni* ATCC 700025; *Campylobacter fetus* 25936; *Brucella abortus* 82; *Yersinia enterocolitica* серотип 03; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Dublin 6; *Pseudomonas aeruginosa* серотип 0-17; *Staphylococcus aureus* ВКПМВ 6646; *Mycobacterium bovis* AN5 2/5-69-MS-07, *Mycobacterium intracellulare* 13-4; *Leptospira interrogans* Pomona ВГНКИ-6; *Bacillus cereus* ВКПМ В-8076; *Arcanobacterium pyogenes* ATCC 8164; *Neospora caninum* ATCC 50977; *Escherichia coli* 0157:H7; *Clos-*

tridium perfringens тип С; *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615; *Candida albicans* ATCC 10231; *Aspergillus niger* ATCC 16404; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; Bovine Herpesvirus 1 MBA 2; Bovine Herpesvirus ATCC-VR-845; Bovine Herpesvirus 4 DN-599ATCC-VR-631; штамм вируса диареи (ВД) КРС Oregon C24V; штамм ВД КРС NADL; штамм вируса парагриппа КРС ПТК 45/86; ДНК вируса нодулярного дерматита; положительный материал от КРС, содержащий РНК вируса болезни Шмалленберга.

Исследовали 410 образцов криоконсервированной спермы КРС из отечественных и зарубежных племенных центров.

Экстракцию ДНК осуществляли с использованием коммерческого набора Рибо-преп («Амплисенс», Россия). Микроорганизмы рода *Mycoplasma* выявляли с помощью тест-системы Мик-Ком («Амплисенс», Россия). Также в работе использовали ПЦР-набор LSI VetMAX™ *Mycoplasma bovis* («Thermo Fisher Scientific», Франция).

ПЦР для идентификации *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. californicum* и *U. diversum* проводили в режиме реального времени на приборах RotorGene Q («Qiagen», Германия) и CFX («Bio-Rad», США). Результаты амплификации интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией. Реакционная смесь для амплификации содержала 10 мкл ДНК-матрицы, 10 мкл ПЦР-смеси-1 (6 мкМ специфических праймеров, 3 мкМ специфических зондов, 3 мкМ праймеров для амплификации экзогенного неконкурентного внутреннего контрольного образца — ВКО, 1,5 мкМ зонда ВКО, раствор дНТФ, деионизованная вода), 0,5 мкл Taq-F полимеразы, 5 мкл ПЦР-смеси-2-FRT («Амплисенс», Россия). Программа амплификации для *M. bovis*, *M. californicum*, *M. bovis genitalium* была следующей: 15 мин при 95 °С; 10 с при 95 °С, 20 с при 60 °С, 10 с при 72 °С (10 циклов без детекции флуоресцентного сигнала); 10 с при 95 °С, 20 с при 55 °С, 10 с при 72 °С (35 циклов с детекцией флуоресцентного сигнала). Программа амплификации для *U. diversum* включала следующие этапы: 15 мин при 95 °С; 10 с при 95 °С, 20 с при 55 °С, 10 с при 72 °С (10 циклов без детекции флуоресцентного сигнала); 10 с при 95 °С, 20 с при 55 °С, 10 с при 72 °С (35 циклов с детекцией флуоресцентного сигнала).

Положительные контрольные образцы (ПКО) получали методом клонирования специфического продукта амплификации в плазмиду pAL2-T («Евроген», Россия). Клонирование продуктов ПЦР в вектор pAL2-T производили по стандартной методике производителя без предварительной обработки рестриктазами и экзонуклеазами. Концентрацию полученных плазмид измеряли спектрофотометрически и выражали как число копии в 1 мл.

Аналитическую чувствительность методик оценивали отдельно для каждого патогена. Образцами служили 10-кратные разведения плазмид в заведомо отрицательных образцах спермы, молока, влагалищных смывов, 10 % суспензии внутренних паренхиматозных органов. Специфичность оценивали на панели образцов, состоящей из геномной ДНК коровы, ДНК штаммов микоплазм и гетерологичных бактерий и вирусов, вызывающих заболевания у КРС. Положительные образцы подтверждали секвенированием ПЦР-фрагментов с использованием специфичных праймеров. Секвенирование осуществляли с применением набора Big Dye® Terminator v1.1. Cycle Sequencing Kit на амплификаторе GeneAmp PCR System 2720 («Applied Biosystem», США) и автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer («Applied Biosystem», США).

Результаты. Для выявления и дифференциации микоплазм моле-

кулярно-биологическими методами в иностранной литературе предлагаются протоколы ПЦР, обладающие различной диагностической эффективностью (1, 14, 15). Для амплификации *M. bovis genitalium* и *U. diversum* большинство авторов используют праймеры, подобранные на ген 16S рРНК и 16S-23S рРНК межгенный спейсер (16-18), для *M. californicum* — на ген *rpoB* (1, 2). Наибольшее число работ посвящено выявлению *M. bovis* в разных типах биологического материала. Для увеличения чувствительности и специфичности предлагается использовать системы праймеров на гены *vsp*, *fusA*, *oppD* (1, 14, 19). Представлена информация об использовании гена *uvrC* для выявления *M. bovis* (14, 15, 20). Специфические последовательности, подобранные для амплификации этого фрагмента генома, позволяют дифференцировать *M. bovis* от видов *M. californicum*, *M. bovis genitalium*, *M. bovirhinis*, *M. bovoculi*, *M. dispar*, *M. agalactiae*.

В результате анализа нуклеотидных последовательностей, представленных в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), с помощью программного обеспечения VectorNTI Advanced 11.0 («InforMax, Inc.», США) нами были предложены олигонуклеотидные праймеры и ДНК-зонды для амплификации участков генов *UvrC* для *M. bovis*, 16S рРНК для *M. bovis genitalium* и *U. diversum*. Для идентификации *M. californicum* использовали последовательности олигонуклеотидов, представленные в работе S. Voonyayatra с соавт. (1). Выбранные праймеры фланкируют участки генов длиной 148 п.н. (позиции 697986-698133 последовательности GenBank CP019639.1) для *M. bovis*, 96 п.н. (позиции 504837-504932 последовательности GenBank CP007521.1) для *M. californicum*, 127 п.н. (позиции 131-257 последовательности GenBank AY974058.1) для *M. bovis genitalium*, 114 п.н. (позиции 119-232 последовательности GU227397.1) для *U. diversum*. Были подобраны олигонуклеотидные зонды, несущие флуоресцентные красители HEX и ROX, которые позволяют одновременно выявлять и дифференцировать *M. californicum*/*M. bovis genitalium* и *M. bovis*/*U. diversum* в мультиплексном формате. Амплификацию внутреннего контрольного образца во всех методиках детектировали с помощью зонда с флуорофором FAM.

Специфичность олигонуклеотидов изучали с помощью Интернет-сервиса Nucleotide BLAST online (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch). Была показана гомология выбранных олигонуклеотидов со специфическими мишенями и не обнаружено их значимой гомологии с нуклеотидными последовательностями у других видов *Mollicutes*, а также каких-либо вирусов, бактерий или эукариот. Экспериментальное подтверждение специфичности работы праймеров получили с использованием контрольной панели, включающей ДНК 32 штаммов различных микроорганизмов, а также геномную ДНК крупного рогатого скота. При тестировании предложенной панели методика показала 100 % специфичность.

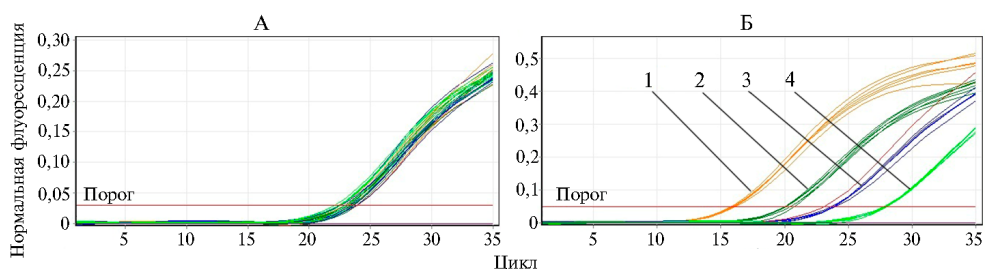
Чтобы предотвратить ложноотрицательные результаты, в образцы на этапе экстракции ДНК вносили экзогенный неконкурентный внутренний контрольный образец (ВКО), который амплифицировали одновременно со специфической мишенью. ВКО — плаزمида pAL2-T, содержащая искусственно синтезированный фрагмент ДНК. Введение ВКО позволяло контролировать выполнение всех этапов ПЦР-исследования для каждого образца.

Для определения абсолютной чувствительности праймеров мы использовали 10-кратные разведения ПКО с известной концентрацией плазмидной ДНК, содержащей клонированные фрагменты специфических мишеней. Также анализировали амплификацию серии 10-кратных

разведений ПКО (в концентрациях от 5×10^5 до 5×10^2 копий/мл) в отрицательных образцах спермы, молока, влагалищных смывов КРС и суспензий внутренних паренхиматозных органов.

Эксперименты проводились в разные дни, разными исполнителями и на разных приборах. Эффективность ПЦР определяли автоматически с помощью программного обеспечения амплификаторов RotorGene Q. Каждый образец исследовали в 6 повторах. За аналитическую чувствительность принимали наименьшую концентрацию ПКО ДНК, дающую положительный сигнал в ПЦР в 6 случаях из 6.

Чувствительность разработанных методик для разных видов биологического материала составила в среднем 5×10^3 копий/мл (результат анализа проб молока иллюстрирует рисунок). Эффективность амплификации составила 99 % для *M. bovis*, 87 % — для *M. bovis genitalium*, 94 % — для *M. californicum*, 98 % — для *U. diversum*.



Графики накопления флуоресцентного сигнала при амплификации целевых фрагментов ДНК, выделенной из 10-кратных разведений положительных контрольных образцов ДНК в отрицательных образцах молока: А — амплификация ВКО (флуорофор FAM), Б — амплификация *Ureaplasma diversum* (флуорофор HEX); 1, 2, 3, 4 — разведения ДНК в концентрации соответственно 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 и 5×10^2 копий/мл.

Выявление различных видов *Mycoplasmataceae* в образцах спермы крупного рогатого скота, предназначенной для искусственного осеменения, методом ПЦР в реальном времени

Патоген	Племенные центры				Всего ($n = 410$)	
	отечественные ($n = 211$)		зарубежные ($n = 199$)			
	обнаружена ДНК	%	обнаружена ДНК	%	обнаружена ДНК	%
<i>Mycoplasma</i> spp.	182	86,3	127	63,8	309	75,4
<i>M. bovis</i>	0	0	5	2,5	5	1,2
<i>M. californicum</i>	109	51,7	44	22,1	153	37,3
<i>M. bovis genitalium</i>	128	60,7	50	25,1	178	43,4
<i>Ureaplasma diversum</i>	116	55,0	24	12,1	140	34,1

Примечание. n — число образцов.

Разработанные методики использовали для выявления патогенных микоплазм в образцах криоконсервированной спермы от быков-производителей. Всего проанализировали 410 образцов спермы от быков из отечественных и зарубежных племенных центров (табл.). Предварительно эти образцы были исследованы с использованием тест-системы Мик-Ком («Амплисенс», Россия), предназначенной для выявления ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma* в биологическом материале (21).

В сперме, полученной из зарубежных племенных хозяйств, бактерии рода *Mycoplasma* в целом и патогенные микоплазмы в частности выявлялись реже, чем в сперме быков из отечественных хозяйств. Однако *M. bovis* была обнаружена только в импортной сперме. Присутствие *M. bovis* в образцах подтверждали с использованием тест-системы LSI VetMAX™ *Mycoplasma bovis*. Положительные результаты выявления и дифференци-

ции *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. californicum* и *U. diversum* были подтверждены секвенированием.

Коинфицирование различными видами микоплазм наблюдалось в 121 пробе из отечественных хозяйств (57,3 %) и в 31 пробе из зарубежных племенных центров (15,5 %). Коинфицирование *M. californicum*/*M. bovis genitalium* выявили в 74 пробах из отечественных хозяйств и в 24 образцах импортной спермы (23,7 % от всех образцов), *M. bovis genitalium*/*U. diversum* — в 79 пробах отечественной спермы и в 7 образцах из зарубежных хозяйств (21,0 % от всех проб). Одновременное инфицирование *M. bovis genitalium*, *M. californicum* и *U. diversum* наблюдалось в 52 образцах (24,6 %) спермы из отечественных хозяйств и в 4 пробах (2 %) из зарубежных племенных центров.

Поскольку у животного выделение микоплазм со спермой часто протекает без клинических проявлений (22), важно исследовать сперму перед осеменением коров, чтобы избежать заражения и последующего развития маститов (23). Высокая распространенность маститов, репродуктивных и респираторных нарушений микоплазменной этиологии у КРС свидетельствует об актуальности подтверждения микоплазменной природы возбудителя (1). На основании полученных данных можно рекомендовать разработанные методики для использования в ветеринарных лабораториях, совершенствования диагностики и оптимизации противоэпизоотических мероприятий, а также для мониторинга качества спермы КРС, используемой для искусственного осеменения.

Таким образом, разработанные методики идентификации и дифференциации патогенных микоплазм *Mycoplasma californicum*, *M. bovis genitalium*, *M. bovis* и *Ureaplasma diversum* на основе полимеразной цепной реакции в реальном времени показали высокую специфичность и чувствительность, в среднем для разного материала составившую 5×10^3 копий целевой ДНК в 1 мл. В исследованных образцах замороженной спермы крупного рогатого скота, предназначенной для искусственного осеменения, выявлена высокая степень заражения патогенными микоплазмами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Boonyayatra S., Fox L.K., Besser T.E., Sawant A., Gay J.M., Raviv Z.A. PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism combination identifying the 3 primary *Mycoplasma* species causing mastitis. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(1): 196-205 (doi: 10.3168/jds.2011-4531).
2. Parker A.M., House J.K., Hazelton M.S., Bosward K.L., Sheehy P.A. Comparison of culture and a multiplex probe PCR for identifying *Mycoplasma* species in bovine milk, semen and swab samples. *PLoS ONE*, 2017, 12(3): e0173422 (doi: 10.1371/journal.pone.0173422).
3. Bürki S., Frey J., Pilo P. Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Microbiology*, 2015, 179(1-2): 15-22 (doi: 10.1016/j.vetmic.2015.02.024).
4. Maunsell F., Brown M.B., Powe J., Ivey J., Woolard M., Love W., Simecka J.W. Oral inoculation of young dairy calves with *Mycoplasma bovis* results in colonization of tonsils, development of otitis media and local immunity. *PLoS ONE*, 2012, 7(9): e44523 (doi: 10.1371/journal.pone.0044523).
5. Fraser B.C., Anderson D.E., White B.J., Miesner M.D., Lakritz J., Amrine D., Mosier D.A. Associations of various physical and blood analysis variables with experimentally induced *Mycoplasma bovis* pneumonia in calves. *American Journal of Veterinary Research*, 2014, 75(2): 200-207 (doi: 10.2460/ajvr.75.2.200).
6. Mackie D.P., Ball H.J., Logan E.F. Isolation of *Mycoplasma californicum* from an outbreak of bovine mastitis and the experimental reproduction of the disease. *Veterinary Record*, 1982, 110(25): 578-580 (doi: 10.1136/vr.110.25.578).
7. Kirk J.H., Glenn K., Ruiz L., Smith E. Epidemiologic analysis of *Mycoplasma* spp. isolated from bulk-tank milk samples obtained from dairy herds that were members of a milk cooperative. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1997, 211(8): 1036-1038.

8. Brenner J., Lysnyansky I., Elad D., Blum S., Bernstein M., Friedgut O., Rotenberg D. Granulo-pustular vulvovaginitis ("Jackal bite") an emerging disease: *Mycoplasma bovis* and *M. canadense* infection of dairy cattle in Israel. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 2009, 64(4): 103-107.
9. Ghanem M.E., Higuchi H., Tezuka E., Ito H., Devkota B., Izaike Y., Osawa T. *Mycoplasma* infection in the uterus of early postpartum dairy cows and its relation to dystocia and endometritis. *Theriogenology*, 2013, 79(1): 180-185 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.09.027).
10. Lysnyansky I., Brenner J., Alpert N., Benjamin A., Bernstein M., Elad D., Blum S., Friedgut O., Rotenberg D. Identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma canadense* from outbreaks of granulopapular vulvovaginitis in dairy cattle. *Veterinary Record*, 2009, 165(11): 319-322 (doi: 10.1136/vr.165.11.319).
11. Vasconcellos Cardoso M., Blanchard A., Ferris S., Verlengia R., Timenetsky J., Florio Da Cunha R.A. Detection of *Ureaplasma diversum* in cattle using a newly developed PCR-based detection assay. *Veterinary Microbiology*, 2000, 72(3-4): 241-250 (doi: 10.1016/S0378-1135(99)00203-5).
12. Gaeti J.G., Lana M.V., Silva G.S., Lerner L., de Campos C.G., Haruni F., Colodel E.M., Costa E.F., Corbellini L.G., Nakazato L., Pescador C.A. *Ureaplasma diversum* as a cause of pustular vulvovaginitis in bovine females in Vale Guapore, Mato Grosso State, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 2014, 46(6): 1059-1063 (doi: 10.1007/s11250-014-0614-5).
13. Parker A.M., Sheehy P.A., Hazelton M.S., Bosward K.L., House J.K. A review of mycoplasma diagnostics in cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2018, 32(3): 1241-1252 (doi: 10.1111/jvim.15135).
14. Bashiruddin J.B., Frey J., Königsson M.H., Johansson K.E., Hotzel H., Diller R., de Santis P., Botelho A., Ayling R.D., Nicholas R.A., Thiaucourt F., Sachse K. Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*: a collaborative trial. *The Veterinary Journal*, 2005, 169(2): 268-275 (doi: 10.1016/j.tvjl.2004.01.018).
15. Clothier K.A., Jordan D.M., Thompson C.J., Kinyon J.M., Frana S., Strait E.L. *Mycoplasma bovis* real-time polymerase chain reaction assay validation and diagnostic performance. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2010, 22(6): 956-960 (doi: 10.1177/104063871002200618).
16. Marouf S.A., Mohamed Kh.F., El-Jakee J. Detection of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma bovis* in cattle and buffalo in Egypt using dot ELISA and PCR with anti-microbial trials. *European Journal of Biological Sciences*, 2011, 25: 136-146.
17. Argue B., Chousalkar K.K., Chenoweth P.J. Presence of *Ureaplasma diversum* in the Australian cattle population. *Australian Veterinary Journal*, 2013, 91(3): 99-101 (doi: 10.1111/avj.12009).
18. Marques L.M., Buzinhan M., Neto R.L., Oliveira R.C., Yamaguti M., Guimarães A.M., Timenetsky J. Detection of *Ureaplasma diversum* in bovine semen straws for artificial insemination. *Veterinary Record*, 2009, 165(19): 572-573 (doi: 10.1136/vr.165.19.572).
19. Tenk M., Bálint A., Stipkovits L., Biry J., Dencso L. Detection of *Mycoplasma bovis* with an improved PCR assay. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2006, 54(4): 427-435 (doi: 10.1556/AVet.54.2006.4.1).
20. Subramaniam S., Bergonier D., Poumarat F., Capaul S., Schlatter Y., Nicolet J., Frey J. Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC* genes by PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 1998, 12(3): 161-169 (doi: 10.1006/mcpr.1998.0160).
21. Яцентюк С.П., Горбачева Н.С., Яралова Е.А., Козлова А.Д. Использование метода ПЦР для выявления возбудителей инфекционных болезней в сперме крупного рогатого скота. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*, 2017, 10(70): 331-337 (doi: 10.18551/rjoas.2017-10.47).
22. Morton J.M., Bosward K.L., Sheehy P.A., Parker A.M., House J.K. Isolation of *Mycoplasma* spp. and serological responses in bulls prior to and following their introduction into *Mycoplasma bovis*-infected dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(8): 7412-7424 (doi: 10.3168/jds.2018-14457).
23. Haapala V., Pohjanvirta T., Vähänikkilä N., Halkilahti J., Simonen H., Pelkonen S., Soveri T., Simojoki H., Autio T. Semen as a source of *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy herds. *Veterinary Microbiology*, 2018, 216: 60-66 (doi: 10.1016/j.vetmic.2018.02.005).

ФГБУ Всероссийский государственный центр качества
и стандартизации лекарственных средств
для животных и кормов,

123022 Россия, г. Москва, Звенигородское ш., 5,
e-mail: pcr-lab@vgnki.ru ✉, kozlova-aleksandra@yandex.ru,
m.krasnikova@vgnki.ru, e.lazareva@vgnki.ru, gorbacheva@vgnki.ru,
ruf.haerowa2014@yandex.ru

Поступила в редакцию
9 ноября 2018 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2019, V. 54, № 2, pp. 378-385

DIFFERENTIATION OF *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovis*

Mycoplasma californicum AND IDENTIFICATION OF *Ureaplasma diversum* BY REAL-TIME PCR

A.D. Kozlova, N.S. Gorbacheva, R.F. Hayerova, M.S. Krasnikova, E.A. Lazareva,
S.P. Yatsentyuk

Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, 5, Zvenigorodskoe sh., Moscow, Russia 123022, e-mail pcr-lab@vgnki.ru (✉ corresponding author), kozlova-aleksandra@yandex.ru, m.krasnikova@vgnki.ru, e.lazareva@vgnki.ru, gorbacheva@vgnki.ru, ruf.haerowa2014@yandex.ru

ORCID:

Kozlova A.D. orcid.org/0000-0002-4793-2345

Krasnikova M.S. orcid.org/0000-0002-6248-419X

Gorbacheva N.S. orcid.org/0000-0001-8388-3045

Lazareva E.A. orcid.org/0000-0001-7368-6873

Hayerova R.F. orcid.org/0000-0003-4313-1177

Yatsentyuk S.P. orcid.org/0000-0002-4819-2131

The authors declare no conflict of interests

Received November 9, 2018

doi: 10.15389/agrobiology.2019.2.378eng

Abstract

Mycoplasmas and ureaplasmas are important etiological agents of mastitis, pneumonia and reproductive disorders in cattle, which cause significant economic damage to cattle farming. The most significant species are *Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. californicum* and *Ureaplasma diversum*. Commercial diagnostic PCR systems for the detection of bacteria of the genus *Mycoplasma* in different biological samples are described, but no PCR kits have been developed to address the identification of *Mycoplasma* species. In this work, real time PCR assays for differentiation of pathogenic mycoplasmas (*Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. californicum*) and detection of *Ureaplasma diversum* in biological material (semen, milk, vaginal swabs, tissues) are developed. *UvrC* gene for *M. bovis*, 16S rRNA gene for *M. bovis genitalium* and *U. diversum*, and *rpoB* gene for *M. californicum* were chosen as target genes. The PCR assays included a system of primers and probes for detection of exogenous noncompetitive internal control sample. The specificity of the developed techniques was tested on a panel of samples containing viral and bacterial pathogens causing diseases in cattle, as well as cow genomic DNA. To assess the sensitivity of each PCR assay, positive control samples were developed based on genetically engineered constructs containing the region of the corresponding specific DNA. Analytical sensitivity of the PCR assays was evaluated separately for each pathogen, for which we used 10-fold dilutions of the corresponding control samples in negative samples of biological material, i.e. semen, milk, vaginal swabs and tissues. The sensitivity (detection limit) of the assays for different types of biological species was 5×10^3 copies per ml on average. The efficiency of PCR was 99 % for *M. bovis*, 87 % for *M. bovis genitalium*, 94 % for *M. californicum*, and 98 % for *U. diversum*. A total of 410 samples of bovine semen intended for artificial insemination from local and foreign breeding centers were tested to detect *M. californicum*, *M. bovis genitalium*, *M. bovis* and *U. diversum*. DNA of *M. bovis* was found in 2.5 % of semen samples from foreign centers. In samples of Russian origin *M. bovis* DNA was not detected. DNA of *M. bovis genitalium* was identified for 60.7 % of local and 25.1 % of foreign semen samples; DNA of *M. californicum* was detected in 51.7 % and 25.1 % samples, respectively. *Ureaplasma diversum* DNA was found in 55.0 % of semen samples from Russian bulls and in 12.1 % of semen samples of foreign origin. Co-infection of *M. californicum*/*M. bovis genitalium* was detected in 97 samples (23.7 %), *M. bovis genitalium*/*U. diversum* in 86 cases (21.0 %). Simultaneous infection of *M. bovis genitalium*, *M. californicum* and *U. diversum* was observed in 52 samples (24.6 %) of semen from domestic bull sires and in 4 samples (2.0 %) from foreign breeding centers. Novel PCR assay tests can be used for monitoring of semen quality as well as control and prevention of the pathogens distribution.

Keywords: *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma bovis genitalium*, *Ureaplasma diversum*, real-time PCR, bovine semen.

Научные собрания

8th INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF EMERGING AND RE-EMERGING PIG DISEASES

(June 23-26, 2019, Santiago, Chile)

Knowledge and health towards productivity

Organized by Universidad de Concepcion

Information: <http://emerging2019.com>, emerging2019@grupodos.cl

26th INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS

(June 2-5, 2020, Florianopolis, Brazil)

Knowing the challenges to increase profitability

Information: <http://ipvs2020.com>, ipvs2020@ipvs2020.com