

MYCOPLASMA SPP. NOTEIKŠANAS METODIKAS IZSTRĀDE PIENA LOPKOPĪBĀ

Kaspars Kovaļenko, Aija Mālniece, Margarita Terentjeva, Lelde Tītmāne,

Aīda Vanaga, Agris Zirņītis

Latvijas Lauksaimniecības universitāte, Veterinārmedicīnas fakultāte

kaspars.kovalenko@llu.lv

Ievads

Mikoplazmu sugas visā pasaulē rada būtiskus ekonomiskus zaudējumus govju un citu dzīvnieku saslimšanas dēļ, tostarp izraisa mastītus, artrītus, pneimonijas, vidusauss iekaisumu un reproduktīvos traucējumus. Vairākas mikoplazmu sugas ir ļoti kontagiozas, spēj izraisīt arī smagu slimības formu, kas ir grūti ārstējama, bet svarīgākais ir savlaicīga un precīza mikoplazmu izraisīto slimību diagnostika, lai novērstu un kontrolētu slimības uzliesmojumus saimniecībā un valstī (Lysnyansky, Ayling, 2016). Šajā pētījumā īpaša uzmanība pievērsta dažādu riska faktoru analīzei, kas veicina mikoplazmozes izplatību saimniecībā vai reģionā, dažādu dzīvnieku paraugu iegūšanas metodikas izstrādei mikoplazmu noteikšanai, *Mycoplasma bovis* izolēšanai, antigēno īpašību noteikšanai un autogēno vakcīnu izstrādes iespējām, kas būtu piemērojamas Latvijas lauksaimniecības apstākļiem. Tradicionāli mikoplazmu identifikāciju un diagnostiku veic, izmantojot bakterioloģisko kultivēšanu, bet pēdējā laikā arvien biežāk izmanto polimerāzes ķēdes reakciju, lai noteiktu mikoplazmu klātbūtni un mikoplazmu sugas dažādos paraugos no liellopiem. Polimerāzes ķēdes reakcijai laboratorijas diagnostikā ir lielāka efektivitāte, specifiskums un jutīgums, salīdzinot ar parastajām, uz mikrobioloģisko kultivēšanu balstītajām metodēm, lai gan molekulārās metodes nesniedz iespēju izolēt mikoplazmas un neļauj noteikt to antigēnās īpašības un dzīvotspēju. Šī iemesla dēļ pētījumā līdztekus polimerāzes ķēdes reakcijai izmanto arī konvenciālo mikrobioloģiju, kas mikoplazmu izolēšanai ir komplicēta to specifiskās vairošanās un uzbūves dēļ. Seroloģiskai mikoplazmu diagnostikai ir izmantojama netiešā imūnfermentācijas analīze (ELISA), kas ļauj noteikt antimikoplazmu antivielas asins serumā un pienā (Salina, et al., 2020).

Pētījuma mērķis – izstrādāt paraugu iegūšanas un paraugu izmeklēšanas metodiku turpmākai izmantošanai klīniskajā praksē piena lopkopības sektorā *Mycoplasma* spp. noteikšanai.

Materiāli un metodes

Saimniecību atlase pētījumam tika veikta pēc brīvprātības principa, balstoties uz apkalpojošā veterinārārsta sniegto informāciju par dzīvnieku veselības problēmām saimniecībā, kas ir asociējamās ar mikoplazmozi, piemēram, augsts somatisko šūnu skaits, respiratoro infekciju klīniskās izpausmes, locītavu iekaisumi, kas nav saistīti ar novirzēm labturībā u. c., vai arī pamatojoties uz iepriekš laboratoriski apstiprinātu mikoplazmozi saimniecībā pēdējā gada laikā. Balstoties uz šīm metodēm, pētījumā ir atlasītas 10 dažāda lieluma piena lopkopības saimniecības no četriem Latvijas reģioniem, tādējādi nodrošinot izolātu maksimāli plašu ģeogrāfisko pārstāvniecību.

Faringo-ezofagālās zondes (rīkles zondes) izmantošanas procedūra faringeālo paraugu iegūšanā mikoplazmu noteikšanai. Faringo-ezofagālās zondes parasti pielieto mutes un nagu sērgas diagnostikā kā vienu no uzticamākajām metodēm, jo rīkles ventrālā siena bagātīgi satur limfoidos audus un šeit ir novērojama vairāku infekcijas slimību ierosinātāju izteikta primārā replikācija. Faringeālos paraugus, kas iegūti ar rīkles zondi, var efektīvi izmantot arī *Mycoplasma bovis* un citu mikoplazmu noteikšanai, ņemot vērā mikoplazmu neizturību ārvidē un to replikāciju elpošanas ceļu un rīkles epitēlija šūnās, kas bieži neļauj veiksmīgi noteikt mikoplazmu klātbūtni dzīvniekiem saimniecībā nepietiekamā mikoplazmu daudzuma dēļ nazālā noslaucījuma vai transtarheālā noskalojuma paraugā. Šāda parauga iegūšanas pieeja var kalpot kā efektīvāka metode mikoplazmu noteikšanai saimniecībā klīniskās un subklīniskās infekcijas gadījumā, jo satur lielu daudzumu rīkles epitēlija šūnu. Izvēlas atbilstošu rīkles zondes izmēru, vadoties pēc dzīvnieka lieluma, piemēram, aitām un teļiem lieto pirmā vai otrā izmēra rīkles zondi, attiecīgi govīm izmanto trešā izmēra rīkles zondi. Parauga iegūšanas tehnika – pareizi nofiksē dzīvniekus stellēs vai citā dzīvniekam un procedūras veicējam drošā veidā. Vizuāli nomēra nepieciešamo rīkles zondes ievadīšanas dziļumu, lai sasniegtu faringeālo telpu. Ar kreisās rokas pirkstiem (labrociem) atver vaļā dzīvnieka muti, ievietojot diastomā kreisās rokas rādītājpirkstu. Uzmanīgi ievada rīkles zondes kausu mutē, pārliecinoties, ka rīkles zondes stieples rokturis ir vērsts uz leju. Turpina virzīt rīkles zondi pāri mēlei rīklē. Pēc ievadīšanas rīklē zondes pozīciju var noteikt, izmantojot rīkles kraniālās daļas palpāciju. Rīkles zondi virza no augšas uz leju aptuveni 5–10 cm diapazonā. Zondi izvelk uzmanīgi, lai netraumētu dzīvnieku un maksimāli saglabātu paraugu. 0.5–1 mL

zondes kausiņa saturu ar sterilu šļirci vai mikropipeti pārnes atsevišķā stobriņā ar 2 ml mikoplazmu selektīvo buljonu (tajā selektivitāti nodrošina penicilīns un tallija acetāts, kuri attiecīgi darbojas antibakteriāli pret grampozitīvajām un gramnegatīvajām baktērijām). Iepriekšminēto stobriņu ar saturu 4–6 h laikā $4 \pm 2^\circ\text{C}$ nogādāja laboratorijā turpmāko izmeklējumu veikšanai.

Līdztekus faringeālajiem paraugiem no dzīvniekiem tika iegūti arī nazālie noslaucījumu paraugi (svābu), sinoviālie paraugi, piena kopparaugi un asins paraugi.

Paraugu izmeklēšanas metodika – mikoplazmu noteikšanai klīniskajos paraugos un koppiena paraugos var izmantot vairākas metodes. Kā viena no vecākajām metodēm mikoplazmu noteikšanai ir bakterioloģiskā mikoplazmu kultivēšana specifiskajās barotnēs un mikroaerofilos apstākļos. Savukārt jaunākas metodes, ko plaši izmanto klīniskajā praksē, ir metodes, kas balstītas uz atsevišķu mikoplazmu gēnu noteikšanu, piemēram, konvenciālā polimerāzes ķēdes reakcija (PĶR) vai reālā laika polimerāzes ķēdes reakcija (RT-PĶR), vai arī uz pilnu mikoplazmu genoma sekvencēšanu, taču parasti vienlaikus izmanto arī seroloģiskās metodes antivielu noteikšanai pret mikoplazmām.

Paraugu mikrobioloģiskā izmeklēšana. Pēc selektīvā buljona ar faringeālo paraugu nogādāšanas laboratorijā to inkubē termostātā 37°C temperatūrā 3–4 dienas. Nazālos paraugus uzreiz pēc to iegūšanas ievieto Amies transporta barotnē bez ogles, nogādā laboratorijā, uzglabājot $4 \pm 2^\circ\text{C}$ vismaz 4–6 h laikā. Laboratorijā svāba galu, apmēram 2 cm garumā ar vates daļu, ar sterilām grieznēm nogriež un ievieto stobriņā sterilā mikoplazmu selektīvajā buljonā 2 mL apjomā, to inkubē termostātā 37°C temperatūrā 3–4 dienas. Pēc tam no sētā mikoplazmu selektīvā buljona paņem 200 μL buljona un uzsēj uz mikoplazmu selektīvā agara barotnes ar sterilu špāteli. Barotni inkubē 37°C temperatūrā mikroaerofilos apstākļos (O_2 koncentrācija $< 10\%$ un CO_2 koncentrācija $< 10\%$), mitrā kamerā 7–14 dienas, sējumus inspicē ik pēc 2–3 dienām, barotnes virsmu aplūko ar gaismas mikroskopu $40\text{--}60\times$ palielinājumā, kamēr uz barotnes virsmas novēro mikoplazmām raksturīga izskata kolonijas, kuras vizuāli atgādina "ceptas olas" struktūru, ar kolonijas sabiezējumu tās vidusdaļā. Konstatējot mikoplazmām raksturīgās kolonijas, tās pēcāk identificē molekulārbioloģiski.

Bez mikrobioloģiskās izmeklēšanas paraugus izmeklē arī ar RT-PĶR un ELISA, bet izolāti turpmāk tiks analizēti, īstenojot genotipēšanas metodes, lai noteiktu to genotipiskās variācijas piena lopkopības sektorā Latvijā.

Secinājumi

1. Faringo-ezofagālās zondes izmantošana faringeālo parauga iegūšanai *Mycoplasma* spp. noteikšanai ir ērti lietojama, salīdzinot ar citām metodēm, ko izmanto paraugu iegūšanai no elpošanas ceļiem ar mērķi izolēt mikoplazmas.
2. Ar faringo-ezofagālās zondes palīdzību iegūtā parauga apjoms ir lielāks salīdzinājumā ar citām metodēm, kas atvieglo paraugu sagatavošanu testēšanai un mikoplazmu izolēšanai.

Pateicības

Pētījums tapis ar projekta "*Mycoplasma bovis* autogēno vakcīnu pielietošanas iespējas antimikrobiālās rezistences mazināšanai piena lopkopībā Latvijā" (20-00-SOINV05-000030) atbalstu.

Izmantotā literatūra

1. Lysnyansky I., Ayling R. D. (2016). *Mycoplasma bovis*: Mechanisms of resistance and trends in antimicrobial susceptibility. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 7 (4), p. 1–7.
2. Salina A., Timenetsky J., Barbosa M. S., Azevedo C. M., Langoni H. (2020). Microbiological and molecular detection of *Mycoplasma bovis* in milk samples from bovine clinical mastitis. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, Vol. 40 (2), p. 82–87.