

УДК 636.22./28:619:616.006.446

Е.С. Усенбеков, М.Д. Кенешбаев, А.А. Жаксылыкова  
 Казахский национальный аграрный университет, г. Алматы, Казахстан  
 \*e-mail: usen03@mail.ru

### Диагностика микоплазмоза у коров с помощью полимеразной цепной реакции

С целью выявления животных-носителей микоплазм был использован метод полимеразной цепной реакции. Все коровы, взятые в анализ, показали наличие микоплазм в их половых путях. Коров отбирали по признаку проблем с воспроизводством, с высоким индексом осеменения.

**Ключевые слова:** Индекс осеменения, микоплазменные половые инфекции, искусственное осеменение, выделение ДНК, ПЦР, агароза, горизонтальный электрофорез.

Y.S. Ussenbekov, M.D. Keneshbaev, A.A. Zhaksylikova

### Diagnosis mycoplasmosis of cows by polymerase chain eaction

In order to detect mycoplasma animal carrier was used the polymerase chain reaction. All the cows are taken to the analysis showed the presence of mycoplasma in their genital tract. The cows were selected on the basis of reproductive problems, with a high index of insemination.

**Keywords:** Index insemination mycoplasma genital infection, fertilization, DNA extraction, PCR, horizontal electrophoresis.

Е.С. Усенбеков, М.Д. Кенешбаев, А.А. Жаксылыкова

### Сиырларда микоплазмозға балауды полимераздық тізбек реакциясының көмегімен жасау

Жыныстық микоплазма инфекциясын балау мақсатында сиырларда полимераздық тізбек реакциясы қолданылған. Барлық сынама алынған сиырларда жыныс мүшелерінде микоплазма инфекциясының бар екендігі анықталған. Зерттеуге көбею қызметінде ақауы бар сиырлар алынған, олардың ұрықтану индексі жоғары болды.

**Түйін сөздер:** ұрықтану индексі, микоплазма, жыныстық инфекция, ұрықтану, ДНК бөлу, ПТР, горизонтальдық электрофорез.

Молочному животноводству страны наносит большой экономический ущерб – симптоматическое бесплодие у коров в результате ассоциированной половой инфекции. Микоплазмоз является типичной хронической инфекцией с присущей ей длительной персистенцией возбудителя в организме. При этом микоплазмы способны сохранять жизнеспособность в фагоцитах и оказывать повреждающее действие на макрофаги, что приводит к нарушению их функции и снижению резистентности организма. Вступая в синергические отношения с вирусной, бактериальной и условно-патогенной микрофлорой, микоплазмы создают условия для ее активного роста и развития, что усиливает тяжесть течения данного заболевания. Особенностью организма микоплазм является чрезвычайно малый

физический размер (до 1 микрометра) и малый размер генома [1, 2, 3].

Способность микоплазм к длительному персистированию в инфицированном организме никак не проявляя своего присутствия в нем, требует высоко чувствительных и специфичных методов для своевременной постановки диагноза. Современные подходы к исследованию проблемы позволяют наиболее точно и в короткие сроки не только выделить возбудителя, но и отдифференцировать его от других видов микроорганизмов.

Молекулярно-генетический метод - полимеразная цепная реакция (ПЦР), в отличие от многих других методов, способен выявлять ничтожно малое число бактериальных клеток (несколько десятков микробных клеток в 1 мл биологического материала). Своевременное выявление животных-носителей инфекции

позволяет более эффективно проводить лечебные и профилактические мероприятия, направленные на повышение репродуктивной функции у животных и лечения бесплодия. Данный метод хорошо зарекомендовал себя в медицине. В последние годы метод ПЦР, включая ПЦР в реальном времени (real-time PCR), активно начинает использоваться и в ветеринарной практике. За рубежом метод ПЦР давно уже стал стандартным в практике животноводства [4].

Диагностика микоплазмозов основана на серологических методах, которые уступают методу ПЦР по надежности, скорости и воспроизводимости результатов. Использование в практике метода ПЦР позволяет выявить наличие микоплазм в биологическом материале. Кроме того, микоплазменная инфекция часто является причиной развития маститов у коров, что снижает качество молока [5].

Анализ воспроизводительной функции коров племенного завода СХПК «Алматы» показывает, что 10-18% коров имеют высокий индекс осеменения. Методом УЗИ сканирования у этих животных не выявлены патологические изменения в половых органах, обычно матка расположена в тазовой или частично в брюшной полости в зависимости от возраста животного, матка ригидная, яичники нормального размера. Однако, такие коровы в длительное время остаются бесплодными. В связи с вышеизложенным, перед нами была поставлена задача, проверить коров с высоким индексом осеменения на наличие половой микоплазменной инфекции методом полимеразной цепной реакции.

#### **Материалы и методы**

Исследуемый материал отбирали в виде мазков из половых путей коров, имеющих высокий индекс осеменения. Материал собирали в пробирки и замораживали до использования. ДНК выделяли согласно инструкции к набору «Мик-Ком» ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

В пробирки с лизирующим раствором вносили 100 мкл пробы. Образец тщательно перемешиваем на вортексе и прогреваем 5 мин при температуре 65 °С. Центрифугировали 5 секунд при 5000 об/мин на микроцентрифуге. В каждую пробирку затем вносили 25 мкл универсального сорбента. Перемешивали на

вортексе, оставляли инкубироваться 2 минуты, затем еще раз перемешивали на вортексе, инкубировали дополнительно 5 минут. Осаждали сорбент центрифугированием при 5000 об/мин в течение 30 секунд. Удаляли надосадочную жидкость, затем вносили по 300 мкл раствора для отмывки №1. Перемешивали на вортексе, осаждали сорбент центрифугированием, удаляли надосадочную жидкость. Вносили 500 мкл раствора для отмывки №2, перемешивали на вортексе, центрифугировали, удаляли надосадочную жидкость. Повторяли процедуру отмывки с использованием раствора для отмывки №2. Подсушивали сорбент универсальный после удаления надосадочной жидкости в термостате при 65 °С в течение 5-10 минут. В пробирки вносили по 50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК. Перемешивали на вортексе, инкубировали в термостате при 65 °С в течение 5 минут с периодическим встряхиванием. Центрифугировали пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги в течение 1 минуты. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК, которую в последующем использовали в постановке реакции ПЦР.

ПЦР проводили в объеме 25 мкл. Используя прилагаемые к набору «Мик-Ком» пробирки вносили на поверхность воска 10 мкл ПЦР-смеси-2 blue, при этом она не должна проваливаться под воск. Сверху прибавляли 1 каплю стерильного минерального масла. Затем вносили по 10 мкл выделенной ДНК и ставили пробирки вместе с положительным и отрицательным контролями в термоциклер. Условия проведения ПЦР описаны в инструкции к набору. После окончания ПЦР пробы отбирали из нижней фазы и вносили в лунки 2% агарозного геля. Выявление продуктов амплификации проводили после 30 минутного электрофореза при напряжении 150 вольт.

#### **Результаты и их обсуждение**

Анализ образцов ДНК, выделенной из коров с высоким индексом осеменения выявил наличие микоплазм во всех образцах. В качестве примера, на рисунке 1 показаны результаты выявления микоплазм у коров племенного хозяйства СХПК «Алматы». Во всех случаях в образцах выявляли полосу, соответствующую положительному контролю

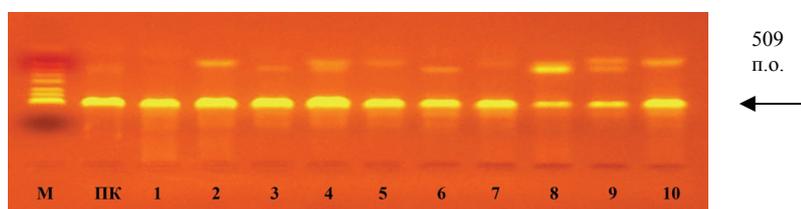
(включен в набор). Данная полоса определяется фрагментом ДНК длиной в 509 пар оснований.

Наличие полосы на уровне полосы у положительного контроля (509 пар оснований ДНК, указано стрелкой) означает присутствие микоплазменной ДНК в образце. Высокая частота встречаемости микоплазм в половых путях коров может объясняться тем, что большинство коров имели проблемы с воспроизводством (высокий индекс осеменения, перегулы, скрытые эндометриты и т.д.).

Микоплазма вызывает персистентную инфекцию, один раз появившись в половых

путях, микроорганизм, как правило, сохраняется длительное время. Содержание животных вместе, тесный физический контакт между животными способствует распространению инфекции.

Молекулярно-генетический метод выявления микоплазмоза позволяет достоверно выявить инфицированных животных в течение 5-6 часов. Результаты исследования свидетельствуют, что микоплазменная инфекция у коров является основным фактором в этиологии неплодотворных осеменений.



М – ДНК маркер, ПК – положительный контроль

**Рисунок 1** – Электрофореграмма продуктов полимеразной цепной реакции на выявление носительства микоплазменной инфекции у 10 коров племенного хозяйства СХПК «Алматы»

### Литература

- 1 Прозоровский С.В. Персистенция микоплазм в инфицированном организме: наблюдения, причины и механизмы, диагностика // ЖМЭИ. – 1997. - №4. – С. 47-51.
- 2 Андреев Е.В., Фукс П.П. Смешанная вирусомикоплазменная инфекция // Ветеринария. – 1980. - №8. – С. 30-32.
- 3 Маркина О.С. Сравнительное изучение геномов микоплазм инфицирующих рогатый скот // Автореф. дис.... канд. ветеринар. наук. – Казань, 1995. - 22 с.
- 4 Bashiruddin J.B., Frey J., Konigsson M.N. Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*: a collaborative trial // Vet. J. – 2005. – V. 169. – P. 268-343.
- 5 Балабанов Д.Н. Сравнительная оценка методов диагностики микоплазменных инфекций урогенитального тракта // Журнал Микробиологии. – 2006. - №4. – С. 82-85.