УДК 619:616-07,619:579.62 ***DOI 10.52578/2305-9397-2023-4-1-3-10***
МРНТИ 68.41.41

Әбдіғұлов Б.Б., бакалавр естествознания, **основной автор,** https://orcid.org/0009-0004-4550-252X
ТОО «Национальный центр биотехнологии» МЗ РК, г. Астана, Коргалжинское шоссе 13/5, 010000, Казахстан, abdigulovbolat3@gmail.com
Амиргазин А. О., бакалавр технологических наук, https://orcid.org/0000-0001-9418-7758
ТОО «Национальный центр биотехнологии» МЗ РК, г. Астана, Коргалжинское шоссе 13/5, 010000, Казахстан, asylulan0894@gmail.com
Рыскельдина А. Ж., магистр технологических наук, докторант, https://orcid.org/0000-0002-7100-2711
ТОО «Национальный центр биотехнологии» МЗ РК, г. Астана, Коргалжинское шоссе 13/5, 010000, Казахстан, anararyskeldina@gmail.com
Абдуллина Э. С., магистр ветеринарных наук, докторант, https://orcid.org/0000-0001-8558-329X
НАО «Университет имени Шакарима города Семей», г. Семей, ул. Глинки 20(а), 071412, Казахстан, elmira.abdullyna@gmail.com
Шевцов А. Б., кандидат биологических наук, доцент, https://orcid.org/0000-0002-0307-1053
ТОО «Национальный центр биотехнологии» МЗ РК, г. Астана, Коргалжинское шоссе 13/5, 010000, Казахстан, ncbshevtsov@gmail.com
Бердикулов М. А., кандидат ветеринарных наук, https://orcid.org/0000-0003-1304-0354
РГП «Национальный референтный центр по ветеринарии» Комитета ветеринарного контроля и надзора МСХ РК, г. Астана, Сарыаркинский район, улица 150 лет Абая, 22/3, 010000, Казахстан, berdikulov.ma@mail.ru
Куйбагаров М. А., кандидат ветеринарных наук, https://orcid.org/0000-0001-7428-7620
ТОО «Национальный центр биотехнологии» МЗ РК, г. Астана, Коргалжинское шоссе 13/5, 010000, Казахстан, marat.kuibagarov@gmail.com

Abdigulov B. B., Bachelor of natural sciences, **the main author,** https://orcid.org/0009-0004-4550-252X
LLP «National Center for Biotechnology» MoH RK, Astana, Kurgalzhynskoye road, 13/5, 010000, Kazakhstan, abdigulovbolat3@gmail.com
Amirgazin A. O., Bachelor of technological sciences, https://orcid.org/0000-0001-9418-7758
LLP «National Center for Biotechnology» MoH RK, Astana, Kurgalzhynskoye road, 13/5, 010000, Kazakhstan, asylulan0894@gmail.com
Ryskeldina A. Zh., Master of technological sciences, PhD student, https://orcid.org/0000-0002-7100-2711
LLP «National Center for Biotechnology» MoH RK, Astana, Kurgalzhynskoye road, 13/5, 010000, Kazakhstan, anararyskeldina@gmail.com
Abdullina E. S., Master of veterinary sciences, PhD student, https://orcid.org/0000-0001-8558-329X
NJSC Shakarim University of Semey, Semey, Glinka St. 20(a), 071412, Kazakhstan, elmira.abdullyna@gmail.com
Shevtsov A. B., Candidate of biology sciences, associate professor, https://orcid.org/0000-0002-0307-1053
LLP «National Center for Biotechnology» MoH RK, Astana, Kurgalzhynskoye road, 13/5, 010000, Kazakhstan, ncbshevtsov@gmail.com
Berdikulov M.A., Candidate of veterinary sciences, https://orcid.org/0000-0003-1304-0354
RSE "National Veterinary Reference Center" of the Ministry of Agriculture Committee of Veterinary Control and Supervision of the Republic of Kazakhstan, Astana, 150th anniversary of Abai str., 22/3, 010000, Kazakhstan, berdikulov.ma@mail.ru
Kuibagarov M. A., Candidate of veterinary sciences, https://orcid.org/0000-0001-7428-7620
LLP «National Center for Biotechnology» MoH RK, Astana, Kurgalzhynskoye road, 13/5, 010000, Kazakhstan, marat.kuibagarov@gmail.com

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *MYCOPLASMA SPP.* АССОЦИИРОВАННЫХ С МАСТИТАМИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
POLYMERASE CHAIN REACTION FOR THE DETECTION OF *MYCOPLASMA SPP.* ASSOCIATED WITH CATTLE MASTITIS

Аннотация

Микоплазмы выступают как в роли секундарной микрофлоры, присоединяясь к патологическому процессу, вызванному другими микроорганизмами, так и в качестве первичных этиологических агентов на фоне ослабления общей резистентности организма животного. Вследствие широкого разнообразия микоплазменных патогенов, особенно актуальным становится своевременное выявление и видовое определение микоплазм вовлеченных в патологический процесс. В этой ситуации важным моментом является наличие у ветеринарных лабораторных специалистов высокочувствительных и специфичных способов диагностики.

Целью данной работы было разработка протокола полимеразной цепной реакции (ПЦР) и определение возможности его использования для изучение видового разнообразия микоплазм ассоциированных с маститами крупного рогатого скота (КРС). В результате исследований были подобраны специфичные праймеры к роду *Mycoplasma* spp. на нуклеотидную последовательность рибосомального оперона для «вложенной» ПЦР. Для подобранных праймеров были оптимизированы условия постановки ПЦР реакции и оптимизирован состав реакционной смеси. Оптимизированный протокол был использован для определения генетического материала микоплазм в пробах молока от коров с маститом. Последующее секвенирования ПЦР продуктов позволило определить видовую принадлежность микоплазм. Предварительные результаты показали перспективность использования примененного протокола исследований в качестве высокочувствительного способа определения патогенных микоплазм ассоциированных с маститами.

ANNOTATION

Mycoplasmas act both as a secondary microflora, joining the pathological process caused by other microorganisms, and as primary etiological agents against the background of weakening of the general resistance of the animal organism. Due to the wide variety of mycoplasma pathogens, timely identification and species determination of mycoplasmas involved in the pathological process becomes especially relevant. In this situation, an important point is that veterinary laboratory specialists have highly sensitive and specific diagnostic methods.

The aim of this work was to develop a polymerase chain reaction (PCR) protocol and determine the possibility of its use for studying the species diversity of mycoplasmas associated with mastitis in cattle. Specific primers for the genus *Mycoplasma spp* were determined for the nucleotide sequence of the ribosomal operon for nested PCR. For the selected primers, the conditions for setting up the PCR reaction were optimized, as was the composition of the reaction mixture. An optimized protocol was used to determine the genetic material of mycoplasmas in milk samples from cows with mastitis. Subsequent sequencing of PCR products made it possible to determine the species of mycoplasmas. Preliminary results showed the promise of using the applied research protocol as a highly sensitive method for determining pathogenic mycoplasmas associated with mastitis.

Ключевые слова: *Mycoplasma, маститы, крупный рогатый скот, праймеры, «вложенная» ПЦР, Mycoplasma canadense*

Key words: *Mycoplasma, mastitis, cattle, primers, nested PCR, Mycoplasma canadense*

Введение. Микроорганизмы рода *Mycoplasma* принадлежат к классу *Mollicutes*, которые характеризуются отсутствием клеточной стенки, низким содержанием G+C (23–40%) и небольшим размером генома (0,58-1,4 Mbp) [1]. Отсутствие клеточной стенки не позволяет отнести их ни к грамположительным, ни к грамотрицательным микроорганизмам и делает не эффективным применение антибиотиков пенициллинового ряда. Микоплазмы могут служить этиологическими факторами целого ряда различных патологий у крупного рогатого скота [2]. Маститы, вызванный видами *Mycoplasma spp*., отличаются высоким уровнем контагиозности для молочного скота, способны вызывать серьезные патологии и ведут к значительным экономическим потерям в хозяйствах молочного животноводства многих стран мира [3,4]. Уникальность микоплазм в сравнении с большинством других бактерий участвующих в патогенезе маститов, заключается в отсутствие клеточной стенки и меньшим размером генома [5]. Микоплазмы могут вызывать клинические, субклинические и хронические маститы, которые могут сохраняться как в течение текущей лактации и в последующие лактации [5,6]. Хотя распространенность микоплазменных маститов в сравнении с бактериальными не так высока, они могут приводить к тяжелому заболеванию вымени [7].

Экспресс выявление и определение видов микоплазм вовлеченных в патологический процесс, позволяет таргетно скорректировать схемы лечения. Традиционно, для обнаружения *Mycoplasma,* поражающих крупный рогатый скот, используют получение и идентификацию культур. Этот метод довольно широко применяется специалистами диагностических лабораторий [[8],9,10,11,12]. К недостаткам следует отнести длительность культивирования, частая контаминация другими микрорганизмами, сложность дифференциации, необходимость наличия в пробе живых микоплазм. Использование ПЦР для обнаружения видов *Mycoplasma в* различных типах образцов продемонстрировало более высокую эффективность, специфичность и чувствительность [[1]3,14,15] и показало высокий потенциал и практичность. Лабораторная диагностика микоплазмозов животных в Казахстане не развита из-за сложности культивирования патогенов, не изученности вопроса превалирования микоплазмозов и отсутствия диагностических ПЦР тест-систем.

Целью данного исследования было определение протокола ПЦР и возможности его использования для изучение видового разнообразия микоплазм ассоциированных с маститами КРС.

Материалы и методы исследованй. В качестве объекта исследования были определены пробы молока от коров симментальской породы хозяйства Абайской области с клиническими признаками серозного мастита. Для выделения ДНК, пробы молока отбирали в стерильные пробирки и транспортировали в исследовательскую лабораторию в течение 24 часов при температуре не выше 8ºС. Отбирали по 300 мкл пробы без сливок в отдельную пробирку, добавляли по 900 мкл лизирующего раствора с хаотропными агентами из набора для выделения ДНК «ДНК/РНК-С-ФАКТОР» (ООО «ВЕТ ФАКТОР», Россия кат.№ EDR001-VET). Лизировали 60 мин при 65С. Дальнейшие этапы выделения ДНК проводить согласно инструкции по применению набора.

Концентрацию ДНК определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop1000. Метод основан на существовании у ДНК и РНК максимума поглощения при длине волны 260 нм. Это означает, что в растворах нуклеиновых кислот максимальная фотометрическая абсорбция наблюдается при 260 нм и она прямо коррелирует с концентрацией ДНК или РНК.

В качестве варианта ПЦР, была выбрана «вложенная» полимеразная цепная реакция (nested polymerase chain reaction, nested PCR) с использованием двух пар праймеров (внешних и внутренних), одна из которых способна амплифицировать внутренний участок ампликона, полученного после первого раунда амплификации с внешней парой праймеров. Для разработки праймеров специфичных к *Mycoplasma spp.,* были использованы последовательности рибосомального оперона. Для этого, из международной базы данных NCBI были скачаны последовательности рибосомального оперона порядка *Mycoplasmatales, к*оторые были выровнены с использованием программного обеспечения BioEdit. К консервативным участкам для *Mycoplasma* spp были подобраны праймеры. Подобранные праймеры анализировали на образование вторичных структур (димеров, шпилек) с использованием программного обеспечения PrimerSelect (DNASTAR). Оценка отжига праймеров на другие геномы (бактерии, вирусы, животные, растения и т.д.) проводилась с использованием приложения PrimerBlast в международной базе NCBI. Праймеры имеющие тугоплавкие вторичные структуры, а также комплементарные не целевым мишеням были исключены (таблица 1).

На основании результатов оптимизации был разработан протокол выявления *Mycoplasma spp.* методом «вложенной» ПЦР с электрофоретической детекцией. Реакционная смесь включает в себя: по 400 нМ прямого и обратного праймера соответствующего раунда амплификации, 10 мМ Tris-HCl (pH 9,0 при 25°C), 50 мМ KCl, 2,5 мМ MgCl2, Тритон X-100 в конечной концентрации 0,1%, дНТФ в концентрации 0,2 мМ каждого, 1,5 единицы Taq полимеразы (Биолабмикс, Россия) и 5 мкл ДНК для 1-го этапа или 2 мкл ПЦР продукта на втором раунде. Программа ПЦР амплификации: длительная денатурация 95°C - 5 минуты; 30 циклов: 95°C - 30 секунд, 59°C - 30 секунд, 72°C - 2,5 мин для 1-го этапа и 2 мин для 2-го, 72°C - 5 мин.

Анализ амплифицированных целевых фрагментов ДНК проводили методом разделения фрагментов ДНК в 1,5 % агарозном геле, с использованием 1х ТАЕ буфера и интеркалирующего агента - бромистого этидия. Электрофорез проводили в камере горизонтального электрофореза PowerPac, используя источник тока BioRad Electrophoretic bath. Документирование полученных результатов проводили, используя систему документации гелей Gel Doc (Bio-Rad), с программным

обеспечением Quantity One (Bio-Rad). В качестве маркера молекулярных масс использовали DNA Marker 250 bp (BIOSAN).

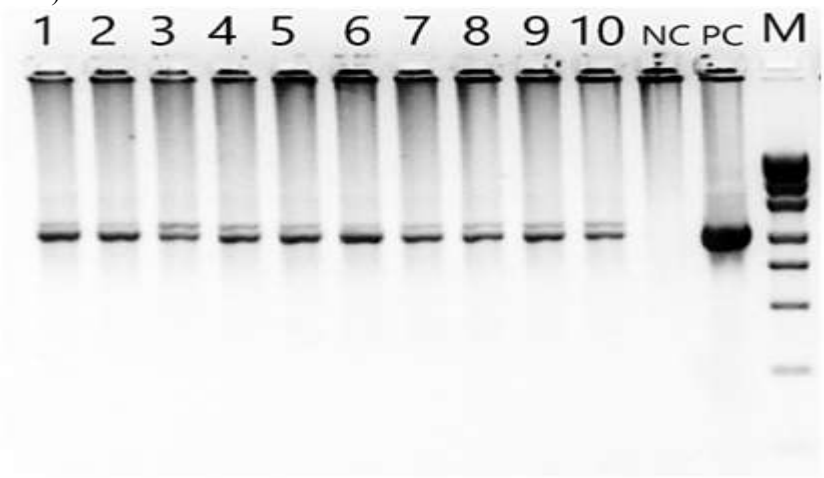
Видовую принадлежность микоплазм проводили методом секвенирования прямой нуклеотидной последовательности ПЦР. Очистку ПЦР продуктов проводили ферментативным методом используя, Exonuclease I (Thermo Scientific™) и щелочную фосфатазу (Shrimp Alkaline Phosphatase, Thermo Scientific™) [16]. Реакцию секвенирование проводили с применением BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Нуклеотидные последовательности, полученные, с применением прямого и обратного праймеров были проанализированы и объединены в общую последовательность, используя программное обеспечение SeqMan (Lasergene, DNASTAR). Полученные нуклеотидные последовательности были идентифицированы относительно доступных нуклеотидных последовательностей, депонированных в базах данных Gene Bank (www.ncbi.nih.gov), используя алгоритм BLAST [17].

Результаты исследования. Всего было подобрано 4 праймера, не образующих тугоплавкие димеры с залипшим 3’ концом. Синтез праймеров был осуществлен в Лаборатории органического синтеза ТОО «Национальный центр биотехнологии» (таблица 1).

Таблица 1 – Праймеры для *Mycoplasma*

Праймеры Название	Последовательность (5’->3’)	Размер фрагмента
1 раунд амплификации		
Myco_g1_R3460-2 (внешний)	CACGCTAGCCCTAAAGCTATTTC	1750bp
Myco_g1_f_1050 (внешний)	TACGCGGAGAACCTTACCCACT	
2 раунд амплификации		
Myco_g1_f_1220 (внутренний)	CAAATCATCATGCCTCTTACGAG	1200bp
Myco_g1_R_3100 (внутренний)	CTATCGGTGTCTGGTTAGTATTTAGC	

В результате постановки «вложенного» ПЦР в 10 пробах ДНК выделенных из молока от коров с серозным маститом были идентифицированы ПЦР продукты ожидаемого размера 1200 п.н. (рисунок 1).



М-маркер молекулярного веса 250-3000 п.н., 1-10 исследуемые образцы, NC- отрицательный контрольный образец, PC- положительный контрольный образец

Рисунок 1 – Результаты 2-го раунда «вложенной» ПЦР

В результате секевенирования прямой нуклеотидной последовательно и ее идентификации в BLAST была установлена максимальная идентичность на уровне 99,6-100% с последовательностями рибосомального оперона *Mycoplasma canadense* (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты ПЦР на *Mycoplasma* от животных с маститом

№ пробы	Порода	Возраст	Вид мастита	Результаты ПЦР	Вид *Mycoplasma* по результатам секвенирования
1	Симментальская	5 лет	серозный	положительный	*Mycoplasma canadense*
2	Симментальская	5 лет	серозный	положительный	*Mycoplasma canadense*
3	Симментальская	5 лет	серозный	положительный	*Mycoplasma canadense*
4	Симментальская	5 лет	серозный	положительный	*Mycoplasma canadense*
5	Симментальская	5 лет	серозный	положительный	*Mycoplasma canadense*
6	Симментальская	5 лет	серозный	положительный	*Mycoplasma canadense*
7	Симментальская	5 лет	серозный	положительный	*Mycoplasma canadense*
8	Симментальская	5 лет	серозный	положительный	*Mycoplasma canadense*
9	Симментальская	5 лет	серозный	положительный	*Mycoplasma canadense*
10	Симментальская	5 лет	серозный	положительный	*Mycoplasma canadense*
11	Положительный контрольный образец				*Mycoplasma bovoculi*

Заключение. Для своевременного и правильного лечения, а также профилактики инфекций, осложненных вовлечением в патогенез микоплазм, важна своевременная диагностика. До недавнего времени у ветеринарных специалистов диагностика микоплазмоза КРС вызывала затруднения в связи с тем, что клинические и патологические признаки могут быть сходными и для других заболеваний. На данный момент нет объективных эпизоотологических данных о распространении и видовом разнообразие микоплазм, ассоциированных с наиболее распространенными патологиями КРС. Обладание подобного рода информацией, позволит ветеринарным специалистам таргетно корректировать протоколы применения противомикробных препаратов, средств специфической профилактики и быть более успешным в терапевтических мероприятиях.

В результате проведенной работы был определен дизайн и синтезированы праймеры специфичные *Mycoplasma spp.* для постановки «вложенной» ПЦР. Использованный протокол позволил определить ДНК микоплазм – возможных участников патогенного процесса. Результаты секвенирования ПЦР продуктов показали, что выявленные микоплазмы относятся к виду *Mycoplasma canadense*. При обсуждении проблем микоплазменых инфекций ассоциированными с маститами КРС обычно упоминается вид *Mycoplasma bovis* [3,18,19]. Однако имеется достаточно большое количество публикаций, доказывающих участие в патогенезе маститов вида *Mycoplasma canadense* [20,21,22]. Таким образом, использованный протокол постановки «вложенной» ПЦР может рассматриваться как перспективный вариант определения патогенных микоплазм и в случае успешной апробации с применением проб от животных с другими типами инфекций, может быть рекомендован в качестве универсального способа выявления *Mycoplasma spp.*

Источник финансирования. Исследования были проведены в рамках грантового финансирования по научным и (или) научно-техническим проектам на 2021-2023 годы, ИРН AP09259225.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 Parte, A. Manual of Systematic Bacteriology[Text] / A. Parte, W. Ludwig. // NY.: Springer, 2011. – P. 245.

2 Maunsell, F.P. Mycoplasma bovis infections in cattle [Text] / F.P. Maunsell [and etc.] // Journal of Veterinary Internal Medicine, - 2011. – Vol. 25(4). - P. 772-783.

3 Nicholas, R.A. Mycoplasma mastitis in cattle: To cull or not to cull [Text] / R.A. Nicholas, L.K. Fox, I. Lysnyansky // Vet J.- 2016. - Vol. 216. – P. 142-7. doi: 10.1016/j.tvjl.2016.08.001

4 Shimazu, T. Immunological characterization of peripheral blood leukocytes using vaccine for mycoplasmal pneumonia of swine (MPS) in swine line selected for resistance to MPS [Text] / T. Shimazu [and etc.] // Animal Science Journal. – 2013. - Vol 84. – P. 683– 692.

[5] Fox, L.K. Mycoplasma mastitis: a review of transmission and control [Text] / L.K. Fox, J.H. Kirk, A. Britten // J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. – 2005. – Vol. 52(4). – P. 153-60. doi: 10.1111/j.1439-0450.2005.00845.x.

6 Parker, A.M. A review of mycoplasma diagnostics in cattle [Text] / A.M. Parker [and etc.] // J Vet Intern Med. - 2018. – Vol. 32(3). – P. 1241-1252. doi: 10.1111/jvim.15135. Epub 2018 Apr 19. PMID: 29671903; PMCID: PMC5980305.

7 Fox, L.K. Bulk tank milk analysis: factors associated with appearance of Mycoplasma sp. in milk [Text] / L.K. Fox // J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. – 2003. – Vol. 50(5). – P. 235-40. doi: 10.1046/j.1439-0450.2003.00668.x.

8 Biddle, M. Effects of storage time and thawing methods on the recovery of Mycoplasma species in milk samples from cows with intramammary infections [Text] / M. Biddle [and etc.] // Journal of dairy science. - 2004. – Vol. 87(4). - P. 933-936.

9 González, R.N. Mycoplasmal mastitis in dairy herds [Text] / R.N. González, D.J. Wilson // Veterinary Clinics: Food Animal Practice. – 2003. - Vol 19(1). - P.199-221.

10 Parker, A. Milk acidification to control the growth of Mycoplasma bovis and Salmonella Dublin in contaminated milk [Text] / A. Parker [and etc.] // Journal of dairy science. – 2016. - Vol 99(12) - P. 9875-9884.

11 Punyapornwithaya, V. The effect of centrifugation and resuspension on the recovery of Mycoplasma species from milk [Text] / V. Punyapornwithaya // Journal of dairy science. – 2009. – Vol. 92(9). - P. 4444-4447.

12 Quinn, P.J. Veterinary microbiology and microbial disease [Text]: P.J. Quinn [and etc.] // Chichester: John Wiley & Sons. 2011. – P 301.

13 Boonyayatra, S. A PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism combination identifying the 3 primary Mycoplasma species causing mastitis [Text] / S. Boonyayatra // Journal of dairy science. – 2012. – Vol. 95(1) - P. 196-205.

14 Cornelissen, J.B. Mycoplasma detection by triplex real-time PCR in bronchoalveolar lavage fluid from bovine respiratory disease complex cases [Text] / J.B. Cornelissen [and etc.] // BMC Veterinary Research. – 2017. – Vol. 13(1). - P. 97.

15 Janda, J. M. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls [Text] / J. M. Janda, S. L. Abbott // Journal of clinical microbiology. – 2007. - Vol 45(9). - P. 2761-2764.

16 Werle, E. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing [Text] / E. Werle [and etc.] // Nucleic acids research. – 1994. – Vol. 22(20). – P. 4354. DOI: 10.1093/nar/22.20.4354

17 Altschul, S. F. Basic local alignment search tool [Text] / S. F. Altschul [and etc.] // J Mol Biol. – 1990. – Vol. 215(3). – P. 403–10.

18 Dudek, K. Mycoplasma bovis Infections-Occurrence, Diagnosis and Control [Text] / K. Dudek [and etc.] // Pathogens. – 2020. – Vol. 6;9(8). – P. 640. doi: 10.3390/pathogens9080640.

19 Gelgie, A.E. Mycoplasma bovis Mastitis [Text] / M.G. Korsa,O. Kerro Dego // Curr Res Microb Sci. – 2022. - Vol. 24;3. - P. 100123. doi: 10.1016/j.crmicr.2022.100123.

20 Garg, D. N. Experimental pathogenicity evaluation of Mycoplasma canadense from bovine mastitis in vitro and in vivo laboratory models [Text] / D. N. Garg [and etc.] //Indian J Exp Biol. – 2004. – Vol. 42(2). – P. 152-6.

21 Neder, V. E. Detection by multiplex PCR of Mycoplasma species associated with dairy cattle in Argentina [Text] / A. F. Amadio, L.F. Calvinho // Rev Argent Microbiol. – 2022 – Vol. 54(2). – P. 158-161. doi: 10.1016/j.ram.2021.07.001.

22 Gioia, G. Mycoplasma species isolated from bovine milk collected from US dairy herds between 2016 and 2019 [Text] / G. Gioia [and etc.] // J Dairy Sci. – 2021. – Vol. 104(4). – P. 4813-4821. doi: 10.3168/jds.2020-19171.

REFERENCES

1 Parte, A. Manual of Systematic Bacteriology[Text] / A. Parte, W. Ludwig. // NY.: Springer, 2011. – P. 245.

2 Maunsell, F.P. Mycoplasma bovis infections in cattle [Text] / F.P. Maunsell [and etc.] // Journal of Veterinary Internal Medicine, - 2011. – Vol. 25(4). - P. 772-783.

3 Nicholas, R.A. Mycoplasma mastitis in cattle: To cull or not to cull [Text] / R.A. Nicholas, L.K. Fox, I. Lysnyansky // Vet J.- 2016. - Vol. 216. – P. 142-7. doi: 10.1016/j.tvjl.2016.08.001

4 Shimazu, T. Immunological characterization of peripheral blood leukocytes using vaccine for mycoplasmal pneumonia of swine (MPS) in swine line selected for resistance to MPS [Text] / T. Shimazu [and etc.] // Animal Science Journal. – 2013. - Vol 84. – P. 683– 692.

[5] Fox, L.K. Mycoplasma mastitis: a review of transmission and control [Text] / L.K. Fox, J.H. Kirk, A. Britten // J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. – 2005. – Vol. 52(4). – P. 153-60. doi: 10.1111/j.1439-0450.2005.00845.x.

6 Parker, A.M. A review of mycoplasma diagnostics in cattle [Text] / A.M. Parker [and etc.] // J Vet Intern Med. - 2018. – Vol. 32(3). – P. 1241-1252. doi: 10.1111/jvim.15135. Epub 2018 Apr 19. PMID: 29671903; PMCID: PMC5980305.

7 Fox, L.K. Bulk tank milk analysis: factors associated with appearance of Mycoplasma sp. in milk [Text] / L.K. Fox // J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. – 2003. – Vol. 50(5). – P. 235-40. doi: 10.1046/j.1439-0450.2003.00668.x.

8 Biddle, M. Effects of storage time and thawing methods on the recovery of Mycoplasma species in milk samples from cows with intramammary infections [Text] / M. Biddle [and etc.] // Journal of dairy science. - 2004. – Vol. 87(4). - P. 933-936.

9 González, R.N. Mycoplasmal mastitis in dairy herds [Text] / R.N. González, D.J. Wilson // Veterinary Clinics: Food Animal Practice. – 2003. - Vol 19(1). - P.199-221.

10 Parker, A. Milk acidification to control the growth of Mycoplasma bovis and Salmonella Dublin in contaminated milk [Text] / A. Parker [and etc.] // Journal of dairy science. – 2016. - Vol 99(12) - P. 9875-9884.

11 Punyapornwithaya, V. The effect of centrifugation and resuspension on the recovery of Mycoplasma species from milk [Text] / V. Punyapornwithaya // Journal of dairy science. – 2009. – Vol. 92(9). - P. 4444-4447.

12 Quinn, P.J. Veterinary microbiology and microbial disease [Text]: P.J. Quinn [and etc.] // Chichester: John Wiley & Sons. 2011. – P 301.

13 Boonyayatra, S. A PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism combination identifying the 3 primary Mycoplasma species causing mastitis [Text] / S. Boonyayatra // Journal of dairy science. – 2012. – Vol. 95(1) - P. 196-205.

14 Cornelissen, J.B. Mycoplasma detection by triplex real-time PCR in bronchoalveolar lavage fluid from bovine respiratory disease complex cases [Text] / J.B. Cornelissen [and etc.] // BMC Veterinary Research. – 2017. – Vol. 13(1). - P. 97.

15 Janda, J. M. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls [Text] / J. M. Janda, S. L. Abbott // Journal of clinical microbiology. – 2007. - Vol 45(9). - P. 2761-2764.

16 Werle, E. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing [Text] / E. Werle [and etc.] // Nucleic acids research. – 1994. – Vol. 22(20). – P. 4354. DOI: 10.1093/nar/22.20.4354

17 Altschul, S. F. Basic local alignment search tool [Text] / S. F. Altschul [and etc.] // J Mol Biol. – 1990. – Vol. 215(3). – P. 403–10.

18 Dudek, K. Mycoplasma bovis Infections-Occurrence, Diagnosis and Control [Text] / K. Dudek [and etc.] // Pathogens. – 2020. – Vol. 6;9(8). – P. 640. doi: 10.3390/pathogens9080640.

19 Gelgie, A.E. Mycoplasma bovis Mastitis [Text] / M.G. Korsa,O. Kerro Dego // Curr Res Microb Sci. – 2022. - Vol. 24;3. - P. 100123. doi: 10.1016/j.crmicr.2022.100123.

20 Garg, D. N. Experimental pathogenicity evaluation of Mycoplasma canadense from bovine mastitis in vitro and in vivo laboratory models [Text] / D. N. Garg [and etc.] //Indian J Exp Biol. – 2004. – Vol. 42(2). – P. 152-6.

21 Neder, V. E. Detection by multiplex PCR of Mycoplasma species associated with dairy cattle in Argentina [Text] / A. F. Amadio, L.F. Calvinho // Rev Argent Microbiol. – 2022 – Vol. 54(2). – P. 158-161. doi: 10.1016/j.ram.2021.07.001.

22 Gioia, G. Mycoplasma species isolated from bovine milk collected from US dairy herds between 2016 and 2019 [Text] / G. Gioia [and etc.] // J Dairy Sci. – 2021. – Vol. 104(4). – P. 4813-4821. doi: 10.3168/jds.2020-19171.

ТҮЙІН

Микоплазмалар басқа микроорганизмдер тудырған патологиялық процеске қосыла отырып, екінші микрофлора ретінде де, жануар ағзасының жалпы төзімділігінің әлсіреуі аясында бастапқы этиологиялық агенттер ретінде де әрекет етеді. Микоплазмалық патогендердің алуан түрлілігіне байланысты патологиялық процеске қатысатын микоплазмаларды уақытылы анықтау және түр алуандығын анықтау әсіресе өзекті болып табылады. Бұл жағдайда ветеринарлық зертхана мамандарының жүргізетін диагностиканың жоғары сезімтал және ерекше әдістерінің болуы маңызды болып табылады.

Бұл жұмыстың мақсаты полимеразды тізбекті реакция (ПТР) хаттамасын әзірлеу және оны ірі қара мал маститтерімен (ІҚМ) байланысты микоплазмалардың түр алуантүрлілігін зерттеу үшін пайдалану мүмкіндігін анықтау болды. Зерттеу нәтижесінде *Mycoplasma spp* тұқымдасына "кірістірілген" ПТР үшін рибосомалық оперонның нуклеотидтер тізбегіне арнайы праймерлер таңдалды. Таңдалған праймерлер үшін ПТР реакциясын қою шарттары және реакция қоспасының құрамы оңтайландырылды. Оңтайландырылған хаттама маститі бар сиырлардың сүт үлгілеріндегі микоплазмалардың генетикалық материалын анықтау үшін пайдаланылды. ПТР өнімдерін кейінгі секвенирлеу микоплазмалардың түрлерін анықтауға мүмкіндік берді. Алдын ала алынған нәтижелер маститтермен байланысты патогенді микоплазмаларды анықтаудың жоғары сезімтал әдісі ретінде қолданылған зерттеу хаттамасын пайдалану перспективасын көрсетті.