



# Молекулярно-генетический и бактериологический методы диагностики микоплазмоза крупного рогатого скота

Е. В. Ремизова<sup>1</sup>, А. В. Горбатов<sup>2</sup>, Л. К. Семина<sup>3</sup>, З. А. Скулябина<sup>4</sup>, Н. В. Шмидт<sup>5</sup>, Г. А. Балдичева<sup>6</sup>, Н. Н. Авдеевская<sup>7</sup>

<sup>1,3,4,6,7</sup> Вологодский филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук» (Вологодский филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), г. Вологда, Россия

<sup>2</sup> ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), г. Москва, Россия

<sup>5</sup> Бюджетное учреждение ветеринарии Вологодской области «Вологодская областная ветеринарная лаборатория» (БУВВО «Вологодская облветлаборатория»), г. Вологда, Россия

<sup>1</sup> AuthorID: 790839, e-mail: Elena\_remizowa@mail.ru

<sup>2</sup> AuthorID: 739926, e-mail: incidentor@yandex.ru

<sup>3</sup> AuthorID: 795877, e-mail: viev\_mastit@yandex.ru

<sup>4</sup> AuthorID: 795900, e-mail: zengira@mail.ru

<sup>6</sup> AuthorID: 1054756

<sup>7</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6392-5823>, e-mail: Natali.Avduevskaya@mail.ru

## РЕЗЮМЕ

Микоплазмы – бактерии, лишенные ригидной клеточной стенки, поэтому крайне неустойчивы *in vitro*. Чаще всего их выявляют в ассоциации с другими возбудителями, среди которых есть те, что способны образовывать L-форму под действием антибиотических препаратов. Микоплазменные колонии, так же как и колонии L-форм, имеют вид «яичницы-глазуньи», поэтому для точного диагноза и выбора направления лечения необходимо провести их дифференциацию. В статье приведены данные о диагностике микоплазменной инфекции у крупного рогатого скота и результаты дифференциации выделенных колоний микоплазм и колоний L-форм бактерий методом многократных пассажей и с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Для выполнения поставленных задач были отобраны 177 образцов от животных, имеющих клинические признаки микоплазмоза, из них 45 исследованы молекулярно-генетическим методом, 132 – бактериологическим. При этом ДНК микоплазмы была выявлена в 71,1% проб, специфические колонии – в 3,8% образцов. Такие тесты биохимической идентификации микоплазм, как гидролиз аргинина, разжижение сыворотки крови, образование пленки и пятен, посев на среду с Твином-80, гемадсорбция и гемолиз эритроцитов, не дают объективную оценку видовой принадлежности микоплазм, но, согласно полученным результатам, изолированный вид с наибольшей вероятностью относится к *Mycoplasma dispar*, являющейся патогенной для крупного рогатого скота. Несомненно, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени – наиболее точный и быстрый метод диагностики микоплазмоза, но предварительный диагноз можно установить и бактериологически в течение 2–7 сут. Кроме того, при проведении микробиологических тестов возможно провести оценку антибиотикорезистентности изолированных микоплазм, тем самым разработать оптимальную и качественную схему лечения и профилактики заболевания.

**Ключевые слова:** микоплазма, бактериологическая диагностика, факторная инфекция, микрофлора, пневмония, L-форма бактерии, специфические питательные среды, молекулярно-генетическая диагностика

**Благодарности:** Исследования выполнены в рамках Государственного задания Минобрнауки России по теме № FGUG-2022-0009 этапа «Культурально-морфологические, биохимические и серологические исследования штаммов микоплазм, выделенных от быков и коров».

**Для цитирования:** Ремизова Е. В., Горбатов А. В., Семина Л. К., Скулябина З. А., Шмидт Н. В., Балдичева Г. А., Авдеевская Н. Н. Молекулярно-генетический и бактериологический методы диагностики микоплазмоза крупного рогатого скота. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (4): 335–340. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-4-335-340.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для корреспонденции:** Ремизова Елена Васильевна, старший научный сотрудник Вологодского филиала ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, 160000, г. Вологда, ул. Чехова, д. 10, e-mail: Elena-remizowa@mail.ru.

## Molecular genetic and bacteriological methods of bovine mycoplasmosis diagnosis

E. V. Remizova<sup>1</sup>, A. V. Gorbatov<sup>2</sup>, L. K. Semina<sup>3</sup>, Z. A. Skulyabina<sup>4</sup>, N. V. Shmidt<sup>5</sup>, G. A. Baldicheva<sup>6</sup>, N. N. Avduevskaya<sup>7</sup>

<sup>1,3,4,6,7</sup> Vologda Branch of the Federal State Budget Scientific Institution “Federal Scientific Centre VIEV” (Vologda Branch of the FSC VIEV), Vologda, Russia

<sup>2</sup> Federal State Budget Scientific Institution “Federal Scientific Centre VIEV” (FSC VIEV), Moscow, Russia

<sup>5</sup> State-Financed Veterinary Institution of the Vologda Oblast “Vologda Oblast Veterinary Laboratory” (SFVIVO “Vologda OVL”), Vologda, Russia

<sup>1</sup> AuthorID: 790839, e-mail: Elena\_remizowa@mail.ru

<sup>2</sup> AuthorID: 739926, e-mail: incidentor@yandex.ru

© Ремизова Е. В., Горбатов А. В., Семина Л. К., Скулябина З. А., Шмидт Н. В., Балдичева Г. А., Авдеевская Н. Н., 2022

<sup>3</sup> AuthorID: 795877, e-mail: view\_mastit@yandex.ru

<sup>4</sup> AuthorID: 795900, e-mail: zengira@mail.ru

<sup>6</sup> AuthorID: 1054756

<sup>7</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6392-5823>, e-mail: Natali.Avduevskaya@mail.ru

## SUMMARY

Mycoplasmas are bacteria that are extremely unstable *in vitro* as they lack a rigid cell wall. They are most often detected in association with other pathogens, including those that can become L-forms if treated with antibiotics. *Mycoplasma* colonies, as well as colonies of L-form bacteria, have a typical "fried egg" appearance, therefore it is necessary to differentiate them for the accurate diagnosis and choice of treatment. The paper presents data on mycoplasma infection diagnosis in cattle and results of differentiation of isolated mycoplasma and L-form bacteria colonies using multiple passaging and real-time polymerase chain reaction. For that, 177 samples were collected from animals with mycoplasmosis clinical signs, 45 of them were tested using molecular genetic method, 132 samples were subjected to bacteriological testing. *Mycoplasma* DNA was detected in 71.1% of samples, and specific colonies were detected in 3.8% of samples. Such biochemical tests of mycoplasma species identification as arginine hydrolysis, blood serum liquefaction, film and grain formation, inoculation into Tween-80-containing medium, hemadsorption and hemolysis of erythrocytes do not allow an objective assessment of the species belonging to mycoplasmas, but, according to the results obtained, the isolated species most likely belongs to *Mycoplasma dispar*, which is pathogenic for cattle. Real-time polymerase chain reaction is undoubtedly the most accurate and rapid diagnostic method for mycoplasmosis, but a preliminary diagnosis can also be established bacteriologically within 2–7 days. In addition, during microbiological testing, it is possible to assess the antibiotic resistance of mycoplasma isolates, thereby developing an optimal and high-quality scheme of the disease treatment and prevention.

**Keywords:** *Mycoplasma*, bacteriological diagnosis, factor infection, microflora, pneumonia, L-form bacteria, specific nutrient media, molecular genetic diagnosis

**Acknowledgements:** The research was carried out within State Programme of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Topic No. FGUG-2022-0009 at the stage of "Cultural-morphological, biochemical and serological studies of *Mycoplasma* strains isolated from bulls and cows".

**For citation:** Remizova E. V., Gorbатов A. V., Semina L. K., Skulyabina Z. A., Shmidt N. V., Baldycheva G. A., Avduevskaya N. N. Molecular genetic and bacteriological methods of bovine mycoplasmosis diagnosis. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (4): 335–340. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-4-335-340.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**For correspondence:** Elena V. Remizova, Senior Researcher, Vologda Branch of the FSC VIEV, 160009, Russia, Vologda, ul. Chekhova, 10, e-mail: Elena-remizova@mail.ru.

## ВВЕДЕНИЕ

Микоплазмы (молликуты) – очень мелкие микроорганизмы, способные проходить через бактериальные фильтры и редуцироваться на бесклеточных питательных средах. Они не имеют ригидной клеточной стенки и окружены лишь трехслойной цитоплазматической мембраной, в связи с этим обладают выраженным полиморфизмом, в мазках обнаруживают округлые, овальные и нитевидные образования. Микоплазмы крайне неустойчивы *in vitro*. Их цитоплазматическая мембрана состоит из стеринных липидов, что сближает эти микроорганизмы с эукариотами и отличает от других прокариот [1–3]. Среди микоплазм есть виды, которые вызывают патологические процессы у животных, а также те, что находятся в тесной связи с клетками макроорганизма и не провоцируют инфекцию.

Наибольшую этиологическую значимость в патологии крупного рогатого скота имеют *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma mycoides*, *Mycoplasma bovigenitalium*, *Mycoplasma bovoculi*, *Mycoplasma dispar* [4, 5]. Возбудители микоплазмоза вызывают у животных пневмонии различной тяжести, артриты, конъюнктивиты, вульвовагиниты, эндометриты, маститы, баланопоститы, аборт и бесплодие коров и быков [4, 6, 7]. При патолого-анатомическом вскрытии отмечают ателектаз верхушечных долей легких, многочисленные некротические фокусы, при сочетанных с микоплазмозом инфекциях – массивный спаечный процесс в плевральной полости и абсцессы в легочной ткани [8, 9].

Микоплазмоз распространен повсеместно, не только в зарубежных странах, но и в Российской Федерации. В большинстве случаев протекает бессимптомно и хронически, острые клинические проявления отме-

чаются на фоне снижения общей резистентности организма в осенне-зимний и весенний периоды, зачастую диагностируется случайно. Для микоплазм характерна длительная персистенция в организме. Известно, что микоплазмозом могут болеть до 40% коров в стаде [7, 10], что наносит предприятию огромный экономический ущерб. Вакцинацию против этой инфекции в нашей стране не проводят, меры профилактики должны быть направлены на улучшение условий кормления и содержания животных [11], проведение мониторинга качества спермы и санации коров в сухостойный период, также возможна антибиотикопрофилактика.

Зачастую микоплазмоз диагностируют в ассоциации с такими бактериальными и вирусными инфекциями, как лептоспироз, листериоз, пастереллез, диплококкоз, инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея, паратрип и другие [12–15].

Лабораторную диагностику микоплазмоза составляют микробиологическая и молекулярно-биологическая идентификация возбудителя. С целью обнаружения носительства в стаде проводят оценку уровня антител с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) [16–18].

Микоплазмы требовательны к составу питательных сред и условиям культивирования, они чувствительны к pH питательной среды, оптимум pH для роста составляет 7,8–8,2. В питательные среды добавляют экстракт дрожжей, глюкозу и сыворотку крови как источники энергии и стерола. Кроме того, большинство видов микоплазм характеризуется медленным размножением, культивирование продолжается несколько недель [19–21].

При выявлении специфических колоний необходимо провести их дифференциацию от L-форм бактерий.

Проблема микоплазма-инфекций тесно связана с учетом об L-формах бактерий. Обнаруженные впервые в культуре *Streptobacillus moniliformis* в 1935 г. были названы L-формой и благодаря своему необычайно-му сходству с микоплазмами первоначально отнесены в группу PPLO-микроорганизмов. При изучении свойств L-форм ученые выяснили, что одни из них могут реверсировать в бактериальную форму, а другие – нет, их стали называть «стабильные L-формы». В 1956 г. для возбудителя перипневмонии крупного рогатого скота было принято название «*M. mycoides*» [22].

К основным аспектам исследований биологии L-форм бактерий и семейства микоплазм следует отнести: изучение их морфологических и физиологических признаков; исследование механизмов превращения бактерий в L-форму; разработку критериев дифференциации L-форм и микоплазм, призванных раскрыть роль L-форм в филогенезе семейства *Mycoplasmataceae* и послужить основой для создания наиболее рациональной схемы классификации данных форм; выяснение роли L-форм бактерий и семейства *Mycoplasmataceae* при патологических процессах, инфекционная природа которых не укладывается в рамки бактериальной или вирусной этиологии [23].

Морфологические особенности L-форм и микоплазм, а именно отсутствие ригидной клеточной стенки, обуславливает их высокую пластичность, хрупкость и выраженный полиморфизм. Физиологические особенности L-форм и микоплазм в значительной степени связаны с особенностями их тонкой структуры. Обе группы близки по составу белков, углеводов и липидов, литические агенты, разрушающие липопротеины, растворяют обе группы микроорганизмов [24]. Осмотический шок не оказывает резкого действия на микоплазмы и соленезависимые L-формы [25].

Микоплазмы, так же как и L-формы, устойчивы к действию тех антибиотиков и лекарственных средств, исходное действие которых связано с ингибированием синтеза клеточной стенки микроорганизмов. Лизоцим, который, как известно, действует на  $\beta$ -глюкозидные связи клеточной оболочки, не действует ни на L-формы, ни на микоплазмы.

Адекватным высокочувствительным современным методом диагностики микоплазмоза является полимеразная цепная реакция (ПЦР), направленная на выявление ДНК и видовую идентификацию возбудителей микоплазмоза. Этот метод в ветеринарной практике широко используют в основном для массовых исследований в комплексе с другими методами или как метод экспресс-диагностики инфекций [26, 27].

Целью данной работы явилось изучение культурально-морфологических свойств микоплазм и их дифференциация от L-форм бактерий, а также поиск высокочувствительных и качественных методов диагностики и дифференциальной диагностики микоплазмоза крупного рогатого скота.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась в Вологодском филиале ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (г. Вологда), ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (г. Москва) и БУВВО «Вологодская облветлаборатория» (г. Вологда).

Материалом для бактериологического исследования являлись: цервикальная слизь ( $n = 35$ ) и секрет молочной железы коров ( $n = 30$ ), назальная ( $n = 58$ ), конь-

юнктивальная ( $n = 6$ ) и препуциальная слизь ( $n = 1$ ) телят разного возраста, а также патолого-анатомический материал от двух телят – пробы легочной ткани (участок условно здоровой ткани, граница «патология – норма», участок с патолого-анатомическими изменениями) и пробы из средостенных лимфатических узлов, морфологическая структура которых была не нарушена.

Для ПЦР-исследования использовали цервикальную ( $n = 18$ ), назальную ( $n = 18$ ), конъюнктивальную ( $n = 2$ ), препуциальную слизь ( $n = 1$ ), кровь ( $n = 1$ ) и патолого-анатомический материал ( $n = 2$ ) от телят разного возраста.

Первичный посев материала проводили в жидкую и плотную питательные среды, изготовленные на основе мясо-пептонного бульона или агара и бульона Мартена, с добавлением 20% сыворотки крови лошади, 10% дрожжевого экстракта, ингибиторов роста посторонней микрофлоры. Дальнейшие пересевы проводили на плотную питательную среду, при этом использовали метод агаровых блоков, а также гомогенизации агаровых блоков в физиологическом растворе. При обнаружении специфических колоний проводили их микроскопию с последующей идентификацией. Контроль роста на жидкой питательной среде осуществляли ежедневно, визуально оценивали степень мутности, наличие осадка и пленки в течение 14 дней. Далее производили пересев материала на плотную питательную среду, контроль за посевами осуществляли также в течение 14 дней [3, 20].

В ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) использовали праймеры на обнаружение ДНК микоплазм в соответствии с инструкцией, прилагаемой к набору реагентов «ПЦР-МИКОПЛАЗМОЗ-ФАКТОР» (ООО «ВЕТ ФАКТОР», Россия).

При проведении исследований руководствовались «Методическими рекомендациями по выделению, культивированию и идентификации микоплазм, ахолеплазм и уреоплазм» [20].

Изучение некоторых культуральных и ферментативных признаков, а именно: образование пленки и пятен, посев на среду с Твином-80 (принадлежность к *M. bovis*), гидролиз аргинина, разжижение сыворотки крови, реакцию гемадсорбции и гемолиз колоний, проводили согласно методикам Л. Штипкович [1].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Образцы биоматериала отбирали от животных, имеющих клинические проявления микоплазмоза: у коров – хронические маститы, эндометриты, аборты в анамнезе, у телят – риниты, конъюнктивиты, баланопоститы, артриты и пневмонии. До отправки в лабораторию пробы хранили в физиологическом растворе.

Всего для исследования в ПЦР-РВ взяты 45 проб. Результаты представлены в таблице.

Установлено, что из 45 образцов положительными оказались 32 (71,1%). В одном случае ДНК микоплазмы обнаружена в цервикальной слизи матери и назальной слизи теленка, в пяти – ДНК микоплазмы выявлена в назальной слизи и не обнаружена в крови телят.

Бактериологически было исследовано 132 образца биоматериала. Специфические колонии микоплазм изолированы лишь в пяти из них (3,8%): в четырех пробах назальной слизи и одной пробе патологического материала (ткань лимфатического узла средостения) от павшего теленка.

**Таблица**  
**Результаты исследования образцов в ПЦР-РВ на наличие ДНК *Mycoplasma* spp.**

**Table**  
**RT-PCR results for samples tested for presence of *Mycoplasma* spp. DNA**

Исследуемый материал	Выявление ДНК <i>Mycoplasma</i> spp.		
	ДНК обнаружена	ДНК не обнаружена	Итого
Цервикальная слизь коров	11	7	18
Назальная слизь телят	17	1	18
Конъюнктивальная слизь телят	2	0	2
Кровь телят	0	5	5
Патматериал	2	0	2
Итого	32	13	45

Первичный посев патолого-анатомических образцов легочной ткани и лимфатических узлов средостения осуществляли в жидкую питательную среду. В течение 14 дней наблюдения помутнения бульона, появления пленки и осадка не зафиксировано. При пересеве на плотную питательную среду еще через 14 дней были обнаружены колонии, морфологически схожие с колониями *Mycoplasma* spp.

Как видно на рисунке 1, колонии имеют характерный вид «яичницы-глазуньи» с приподнятым центром и более светлой периферической частью.

На фотографии также виден рост посторонней микрофлоры, поэтому появились сомнения в принадлежности колоний к микоплазменным. В результате окраски мазков неспецифических колоний по Граму и Романовскому – Гимзе были установлены бактерии, схожие по структуре с одноклеточными грибами (идентификацию не проводили).

Дальнейшие исследования были направлены на дифференциацию колоний микоплазм от колоний L-форм бактерий и получение чистой культуры микоплазм данного вида методом многократных пассажей.

Точечно под контролем микроскопа иссекали нужные колонии и пересевали блоками на плотную и жидкую питательные среды с ингибиторами и без ингиби-

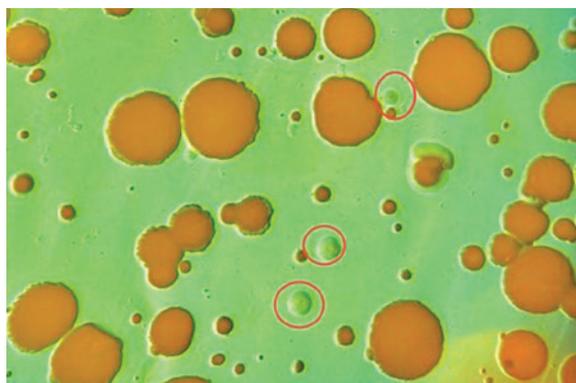


Рис. 1. Рост смешанной микрофлоры на плотной обогащенной питательной среде, колонии микоплазм обведены красным (микроскоп стереоскопический МБС-10, увеличение 14 × 2)

Fig. 1. Growth of mixed microflora in solid enriched nutrient medium, *Mycoplasma* colonies are circled in red (MBS-10 stereoscopic microscope, 14 × 2 magnification)

торов, а также блоки суспендировали в физрастворе. При этом рост микоплазм был отмечен на первые – третьи сутки (рис. 2).

В ходе исследования установили, что колонии остались схожими с колониями микоплазм, но уже имели более выраженную центральную часть. Для подтверждения результата собственных исследований колонии помещали в физиологический раствор и проводили ПЦР-исследование на принадлежность к *Mycoplasma* spp. Все образцы оказались положительными.

Первичный посев цервикальной, назальной, конъюнктивальной, препуциальной слизи и секрета молочной железы осуществляли на плотную питательную среду. При этом специфические колонии в посевах назальной слизи были обнаружены через 48 ч. Они также были отнесены к *Mycoplasma* spp. по результатам молекулярно-генетического метода и метода многократных пассажей.

Некоторые биохимические тесты показали, что с наибольшей вероятностью изолированные штаммы относятся к *M. dispar*, которая является возбудителем микоплазмоза крупного рогатого скота.

На рисунке 3а показан рост микоплазм на среде с Твином-80, которую используют для определения принадлежности к *M. bovis*. Реакция считается положительной, если вокруг колоний образуется светлое кольцо, на фото виден отрицательный результат.

Покраснение среды (повышение pH) свидетельствует о гидролизе микоплазмами аргинина (рис. 3б). Следует отметить, что данным биологическим свойством обладают *M. alcaescens*, *M. arginini*, *M. canadense*.

При идентификации микоплазм с помощью теста «разжижение сыворотки крови» получен положительный результат: образовалась жидкость, появились полости и разрывы (рис. 3с).

Также при росте на питательных средах не было отмечено образования пленок (представляют собой холестеролы и фосфолипиды) и зерен (состоят из выпавших в осадок солей магния и кальция), что свидетельствует об отсутствии липолитического действия микоплазм. При проведении работ по изучению гемадсорбирующих и гемолитических свойств с использова-

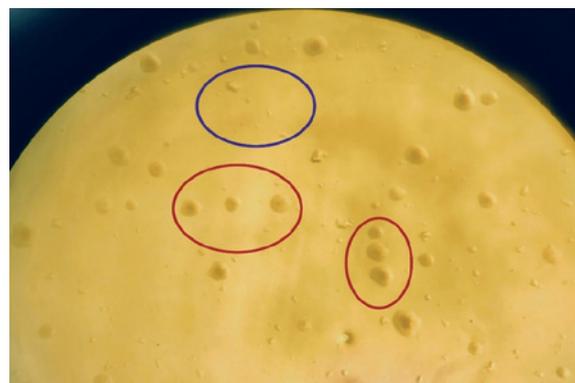


Рис. 2. Чистая культура микоплазм: красным обведены колонии микоплазм, синим – кусочки питательной среды от предыдущего пассажа (микроскоп стереоскопический МБС-10, увеличение 14 × 2)

Fig. 2. Pure *Mycoplasma* culture: *Mycoplasma* colonies are circled in red, parts of nutrient medium from the previous passage are circled in blue (MBS-10 stereoscopic microscope, 14 × 2 magnification)

нием эритроцитов крупного рогатого скота получен отрицательный результат.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из представленных результатов, наиболее быстрая и точная диагностика микоплазменной инфекции у крупного рогатого скота сводится к проведению молекулярно-генетических исследований, однако предварительный диагноз можно установить и бактериологически в течение 2–7 сут. Кроме того, при использовании микробиологических тестов можно провести оценку антибиотикорезистентности изолированных микоплазм, тем самым разработать оптимальную и качественную схему лечения и профилактики. При молекулярно-генетическом и бактериологическом методах диагностики микоплазмоза возможны ложноотрицательные результаты, но ввиду небольшой скорости роста микоплазм и резистентности ассоциированной микрофлоры к антимикробным средствам, входящим в состав питательных сред, при бактериологическом методе их гораздо больше.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коромыслов Г. Ф., Месарош Я., Штипкович Л. и др. Микоплазмы в патологии животных. М.: Агропромиздат; 1987. 256 с.
2. Хоулт Дж., Криг Н., Снит П., Стейли Дж., Уильямс С. Определитель бактерий Берджи. В 2 т. М.: Мир; 1997. 800 с.
3. Скородумов Д. И., Субботин В. В., Сидоров М. А., Костенко Т. С. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных: справочник. М.: Издательство; 2005. 656 с.
4. Красиков А. П., Рудаков Н. В. Микоплазмозы человека и животных и их эпидемиологическое значение: монография. Омск: Омский научный вестник; 2015. 717 с.
5. Eissa S. I., Hassan A. M., Hashem Y. M., Shaker M. M. Comparative molecular study of *Mycoplasma bovis* isolates from Egyptian buffaloes and cows suffered from mastitis. *European J. Biol. Sci.* 2012; 4 (4): 114–120. DOI: 10.5829/idosi.ejbs.2012.4.4.6668.
6. Коваленко Я. Р. Новые данные в изучении микоплазм и микоплазмозов животных. *Труды ВИЭВ.* 1977; 46: 3–7. eLIBRARY ID: 22403215.
7. Васильев Р. М., Васильева С. В. Иммунобиологические свойства вагинального секрета у здоровых и больных микоплазмозом коров. *Медицинская иммунология.* 2021; 23 (4): 987–990. DOI: 10.15789/1563-0625-IBP-2278.
8. Пудовкин Д. Н., Щепеткина С. В., Карпенко Л. Ю., Ришко О. А. Болезни молодняка крупного рогатого скота: практические рекомендации. 2-е изд. доп. СПб.: ФГБОУ ВПО «СПбГАВМ»; 2019. 204 с.
9. Гречаний В. С., Ключников А. Г., Карташов С. Н. Патоморфологические особенности пневмонии у телят, вызванных ВПГ-3, *Mycoplasma bovis* и *Haemophilus somnus*. *Ветеринарная патология.* 2010; 3 (34): 85–89. eLIBRARY ID: 16701725.
10. Смирнова Л. И., Темникова Л. В. Лабораторная диагностика ассоциированных урогенитальных микоплазменных инфекций крупного рогатого скота. *Международный вестник ветеринарии.* 2008; 4: 6–9. eLIBRARY ID: 23066526.
11. Красиков А. П., Вологодская О. В., Алексеева И. Г., Водопьянова Н. И. Профилактика носительства ассоциаций патогенных микроорганизмов у беременных коров и нетелей. *Ветеринарная патология.* 2006; 3 (18): 144–147. eLIBRARY ID: 16823125.
12. Красиков А. П., Трофимов И. Г., Алексеева И. Г., Заболотных М. В. Комплексная диагностика ассоциативных инфекционных болезней крупного рогатого скота. *Ветеринарная патология.* 2014; 1 (47): 13–21. eLIBRARY ID: 21757161.
13. Лукьянова И. А., Ермакова Т. В., Плешакова В. И., Хатько Н. Ф. Ассоциативные вирусно-бактериальные респираторные инфекции крупного рогатого скота в Омском регионе. *Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии имени В. Р. Филিপцова.* 2012; 2 (27): 7–10. eLIBRARY ID: 17784122.
14. Трухоненко А. А., Строганова И. Я. Микоплазмы крупного рогатого скота в хозяйстве, неблагоприятном по вирусным болезням. *Инновационные тенденции развития российской науки: материалы VII Международной научно-практической конференции молодых ученых (24–26 марта, 2014 г.)*. Красноярск: Красноярский ГАУ; 2014. 117–118.
15. Свиридова А. Н. Схемы лечения телят и лабораторные методы контроля их эффективности при микоплазмоз-ассоциированной ин-

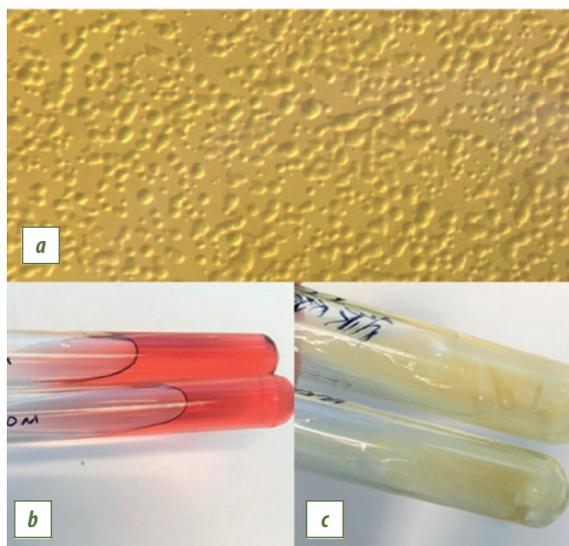


Рис. 3. Биохимические свойства выделенной микоплазмы: а – тест «посев на среду с Твином-80» (принадлежность к *M. bovis*); б – гидролиз аргинина; с – разжижение сыворотки крови

Fig. 3. Biochemical properties of isolated *Mycoplasma*: а – inoculation into medium supplemented with Tween-80 (test for typing as *M. bovis*); б – hydrolysis of arginine; с – liquefaction of blood serum

фекции. *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки.* 2007; 6: 69–74. eLIBRARY ID: 9497384.

16. Строганова И. Я., Трухоненко А. А., Гуменная Е. Ю. Полимеразная цепная реакция в диагностике микоплазмозов крупного рогатого скота в хозяйствах Восточной Сибири. *Вестник КрасГАУ.* 2014; 12: 147–150. eLIBRARY ID: 22895357.

17. Безбородова Н. А., Кожуховская В. В. Значение молекулярно-биологических методов для диагностики инфекционных болезней крупного рогатого скота. *Актуальные вопросы ветеринарной биологии.* 2018; 4 (40): 22–25. eLIBRARY ID: 36702271.

18. Шнейдер Э. Д., Макавич С. А. Идентификация и диагностика микоплазменных маститов коров при помощи бактериологических и молекулярно-генетических методов. *Бактериология.* 2018; 3 (1): 22–25. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-22-25.

19. Козлов Д. А., Волков М. С., Черняева Т. Ю., Сорокина М. И., Ирза В. Н. Влияние сыворотки крови крупного рогатого скота на ростовые свойства питательной среды для культивирования *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae*. *Ветеринария сегодня.* 2022; 11 (2): 156–162. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-2-156-162.

20. Коваленко Я. Р., Шегидевич Э. Ф., Яблонская И. А. и др. Методические рекомендации по выделению, культивированию и идентификации микоплазм, ахлеплазм и уреоплазм. М.: ВАСХНИЛ; 1982. 47 с.

21. Суханова С. М., Бердникова З. Е., Тихонова А. С. Совершенствование методики оценки качества питательной среды для выявления микоплазм. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика и лечение.* 2019; 19 (3): 161–168. DOI: 10.30895/2221-996X-2019-19-3-161-168.

22. Klieneberger E. The natural occurrence of pleuropneumonia-like organism in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and other bacteria. *J. Pathol.* 1935; 40 (1): 93–105. DOI: 10.1002/PATH.1700400108.

23. Тимаков В. Д., Каган Г. Я. Биология L-форм бактерий. М.: Медгиз; 1961. 235 с.

24. Plackett P., Buttery S. H., Cottew G. S. Carbohydrates of some *Mycoplasma* strains. In: *Recent Progress in Microbiology VIII: Symposia Held at the VIII International Congress for Microbiology Montreal.* Ed. N. E. Gibbons. University of Toronto Press; 1962; 535–548. Режим доступа: <http://www.jstor.org/stable/10.3138/j.ctt1vgw69r.74>.

25. Тимаков В. Д., Каган Г. Я. Семейство *Mycoplasmataceae* и L-формы бактерий. М.: Медицина; 1967. 336 с.

26. Козлова А. Д., Горбачева Н. С., Хаерова Ф. Ф., Красникова М. С., Лазарева Е. А., Яцентюк С. П. Дифференциация *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovigenitalium*, *Mycoplasma californicum* и выявление *Ureaplasma diversum* методом ПЦР в реальном времени. *Сельскохозяйственная биология.* 2019; 54 (2): 378–385. DOI: 10.15389/agrobiology.2019.2.378rus.

27. Доронин М. И., Лозовой Д. А., Щербак А. В., Макаров В. В. Применение метода ПЦР в режиме реального времени в ветеринарной практике. *Российский ветеринарный журнал.* 2020; 2 (6): 5–12. DOI: 10.32416/2500-4379-2020-2-5-12.

## REFERENCES

- Koromyslov G. F., Mesarosh Ya., Shtipkovich L., et al. *Mycoplasma* species in animal pathology. Moscow: Agropromizdat; 1987. 256 p. (in Russ.)
- Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994. 787 p.
- Skorodumov D. I., Subbotin V. V., Sidorov M. A., Kostenko T. S. Microbiological diagnosis of bacterial animal diseases: Handbook. Moscow: Izograf; 2005. 656 p. (in Russ.)
- Krasikov A. P., Rudakov N. V. Mycoplasmoses in humans and animals and their epidemiological significance: Monograph. Omsk: Omsk Scientific Bulletin; 2015. 717 p. (in Russ.)
- Eissa S. I., Hassan A. M., Hashem Y. M., Shaker M. M. Comparative molecular study of *Mycoplasma bovis* isolates from Egyptian buffaloes and cows suffered from mastitis. *European J. Biol. Sci.* 2012; 4 (4): 114–120. DOI: 10.5829/idosi.ejbs.2012.4.4.6668.
- Kovalenko Ya. R. Novye dannye v izuchenii mikoplazm i mikoplazmozov zhivotnykh = New study data on animal mycoplasmas and mycoplasmoses. *Trudi VIEV*. 1977; 46: 3–7. eLIBRARY ID: 22403215. (in Russ.)
- Vasiliev R. M., Vasilieva S. V. Immuno-biological properties of vaginal discharge in healthy and mycoplasmosis-infected cows. *Medical Immunology (Russia)*. 2021; 23 (4): 987–990. DOI: 10.15789/1563-0625-IBP-2278.
- Pudovkin D. N., Shchepetkina S. V., Karpenko L. Y., Rishko O. A. Diseases of young cattle: practical recommendations. 2<sup>nd</sup> ed. supplemented. Saint Petersburg: FSBEI HPE SPbGAVM; 2019. 204 p. (in Russ.)
- Grechaniy V. S., Klyuchnikov A. G., Kartashov S. N. Patomorfologichesky features of the pneumonia at the calves caused by association virus parainfluenza-3, *Mycoplasma bovis* and *Haemophilus somnus*. *Veterinarnaya patologiya*. 2010; 3 (34): 85–89. eLIBRARY ID: 16701725. (in Russ.)
- Smirnova L. I., Temnicova L. V. Laboratory diagnostic of association urogenitalis infections by *Mycoplasma* of large horned livestock. *International Bulletin of Veterinary Medicine*. 2008; 4: 6–9. eLIBRARY ID: 23066526. (in Russ.)
- Krasikov A. P., Vologodskaya O. V., Alekseeva I. G., Vodop'yanova N. I. Profilaktika nositel'stva assotsiatsii patogennykh mikroorganizmov u beremennykh korov i netelei = Prevention of carriage of pathogenic microorganisms associations in pregnant cows and heifers. *Veterinarnaya patologiya*. 2006; 3 (18): 144–147. eLIBRARY ID: 16823125. (in Russ.)
- Krasikov A. P., Trofimov I. G., Alekseeva I. G., Zabolotnysh M. V. Complex diagnosis of mixed infective diseases in cattle. *Veterinarnaya patologiya*. 2014; 1 (47): 13–21. eLIBRARY ID: 21757161. (in Russ.)
- Lukjanova I., Ermakova T., Pleshakova V., Hatko N. Associative respiratory viral-bacterial infections of cattle in Omsk region. *Vestnik of Buryat State Academy of Agriculture named after V. Philippov*. 2012; 2 (27): 7–10. eLIBRARY ID: 17784122. (in Russ.)
- Trukhonenko A. A., Stroganova I. Ya. Mikoplazmy krupnogo rogatogo skota v khozyaistve, neblagopoluchnom po virusnym boleznyam = Bovine mycoplasmas in a holding infected with viral diseases. *Innovatsionnye tendentsii razvitiya rossijskoi nauki: materialy VII Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii molodykh uchennykh (24–26 marta, 2014 g.) = Innovative trends in the development of Russian science: proceedings of the VII International Scientific and Practical Conference of Early Career Researchers (March 24–26, 2014)*. Krasnoyarsk: KrasGAY; 2014. 117–118. (in Russ.)
- Sviridova A. N. Treatment regimens and laboratory testing methods of their efficiency applied for calves affected with mycoplasmosis-associated infection. *Siberian Herald of Agricultural Science*. 2007; 6: 69–74. eLIBRARY ID: 9497384. (in Russ.)
- Stroganova I. Ya., Trukhonenko A. A., Gumennaya E. Yu. Polymerase chain reaction in diagnosis of the cattle mycoplasmosis in the Eastern Siberia animal farms. *The Bulletin of KrasGAVU*. 2014; 12: 147–150. eLIBRARY ID: 22895357. (in Russ.)
- Bezborodova N. A., Kozhukhovskaya V. V. The importance of molecular-biological methods for diagnosis of cattle infectious diseases. *Actual Questions of Veterinary Biology*. 2018; 4 (40): 22–25. eLIBRARY ID: 36702271. (in Russ.)
- Shneyder E. D., Makavchik S. A. Identification and diagnostics of pathogens of bovine mycoplasma mastitis by bacteriological and molecular genetic methods. *Bacteriology*. 2018. 3 (1): 22–25. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-22-25. (in Russ.)
- Kozlov D. A., Volkov M. S., Chernyayeva T. Yu., Sorokina M. I., Irza V. N. Influence of bovine blood serum on growth properties of nutrient media for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* cultivation. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (2): 156–162. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-2-156-162.
- Kovalenko Ya. R., Shegidevich E. F., Yablonskaya I. A., et al. Guidelines for isolation, cultivation and identification of mycoplasmas, achholeplasmas and ureaplasmas. Moscow: VASKhNIL; 1982. 47 p. (in Russ.)
- Sukhanova S. M., Berdnikova Z. E., Tikhonova A. S. Ways to improve quality control of culture medium used for *Mycoplasma* detection. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019; 19 (3): 161–168. DOI: 10.30895/2221-996X-2019-19-3-161-168. (in Russ.)
- Klieneberger E. The natural occurrence of pleuropneumonia-like organism in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and other bacteria. *J. Pathol.* 1935; 40 (1): 93–105. DOI: 10.1002/PATH.1700400108.
- Timakov V. D., Kagan G. Ya. Biology of L-form bacteria. Moscow: Medgiz; 1961. 235 p. (in Russ.)
- Plackett P., Buttery S. H., Cottew G. S. Carbohydrates of some *Mycoplasma* strains. In: *Recent Progress in Microbiology VIII: Symposia Held at the VIII International Congress for Microbiology Montreal*. Ed. N. E. Gibbons. University of Toronto Press; 1962; 535–548. Available at: <http://www.jstor.org/stable/10.3138/j.ctt1vgw69r.74>.
- Timakov V. D., Kagan G. Ya. Family *Mycoplasmataceae* and L-form bacteria. Moscow: Meditsina; 1967. 336 c. (in Russ.)
- Kozlova A. D., Gorbacheva N. S., Hayerova R. F., Krasnikova M. S., Lazareva E. A., Yatsentyuk S. P. Differentiation of *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovigenitalium*, *Mycoplasma californicum* and identification of *Ureaplasma diversum* by real-time PCR. *Agricultural Biology*. 2019; 54 (2): 378–385. DOI: 10.15389/agrobiol.2019.2.378eng.
- Doronin M. I., Lozovoy D. A., Shcherbakov A. V., Makarov V. V. Application of the real-time PCR in veterinary practice. *Russian veterinary journal*. 2020; 2 (6): 5–12. DOI: 0.32416/2500-4379-2020-2-5-12. (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 28.10.2022

Поступила после рецензирования / Revised 09.11.2022

Принята к публикации / Accepted 21.11.2022

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Ремизова Елена Васильевна**, старший научный сотрудник Вологодского филиала ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, г. Вологда, Россия.

**Горбатов Александр Вениаминович**, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, г. Москва, Россия.

**Сёмина Людмила Константиновна**, ведущий научный сотрудник Вологодского филиала ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, г. Вологда, Россия.

**Скулябина Зоя Александровна**, старший научный сотрудник Вологодского филиала ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, г. Вологда, Россия.

**Шмидт Наталья Вячеславовна**, ветеринарный врач БУВВО «Вологодская облветлаборатория», г. Вологда, Россия.

**Балдичева Галина Александровна**, младший научный сотрудник Вологодского филиала ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, г. Вологда, Россия.

**Авдеевская Наталья Николаевна**, научный сотрудник Вологодского филиала ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, г. Вологда, Россия.

**Elena V. Remizova**, Senior Researcher, Vologda Branch of the FSC VIEV, Vologda, Russia.

**Alexander V. Gorbatov**, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Head of Laboratory of Microbiology, FSC VIEV, Moscow, Russia.

**Lyudmila K. Semina**, Leading Researcher, Vologda Branch of the FSC VIEV, Vologda, Russia.

**Zoya A. Skulyabina**, Senior Researcher, Vologda Branch of the FSC VIEV, Vologda, Russia.

**Natalia V. Schmidt**, Veterinarian, SFVIVO "Vologda OVL", Vologda, Russia.

**Galina A. Baldicheva**, Junior Researcher, Vologda Branch of the FSC VIEV, Vologda, Russia.

**Natalia N. Avduevskaya**, Researcher, Vologda Branch of the FSC VIEV, Vologda, Russia.