

Atskaite

par ZM subsīdiju projektu

**“*Mycoplasma bovis* autogēno vakcīnu
pielietošanas iespējas antimikrobiālās rezistences
mazināšanai piena lopkopībā Latvijā”**

Projekta vadītājs: Kaspars Kovaļenko, Dr. med. vet.,

dekāns, vadošais pētnieks, profesors

Jelgava 2020

Galvenie izpildītāji:

Kaspars Kovaļenko

Margarita Terentjeva

Aija Mālniece

Lelde Tītmane

Aīda Vanaga

Agris Zirnītis

Kristīne Zemīte-Peškina

Studējošie:

Diāna Rātenberga

Satura rādītājs

ANOTĀCIJA	4
IEVADS	6
1. METODIKAS IZSTRĀDE UN PRELIMINĀRIE REZULTĀTI.....	8
1.1. Anketas izstrādes metodika.....	8
1.2. Saimniecību rekrutēšana pētījumam	9
1.3. Paraugi iegūšanas metodika	9
1.4. Paraugu izmeklēšanas metodika.....	20
1.4.1. Paraugu bakterioloģiskā izmeklēšana	20
1.4.2. Paraugu molekulārbioloģiskā izmeklēšana.....	22
1.4.3. Paraugu seroloģiskā izmeklēšana	22
1.5. Preliminārie rezultāti	23

ANOTĀCIJA

***Mycoplasma bovis* autogēno vakcīnu pielietošanas iespējas antimikrobiālās rezistences mazināšanai piena lopkopībā Latvijā** (2020). Latvijas Lauksaimniecības universitāte. Jelgava, LLU. 24 lpp., 11. att.

Mikoplazmu sugas visā pasaulē izraisa 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. Šajā pētījumā īpašu uzmanību pievēršot, tieši 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 identifikācija un diagnostika tiek veikta, izmantojot bakterioloģisko kultivēšanu, bet pēdējā laikā ar vien biežāk tiek izmantota polimerāzes ķēdes reakcija, 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 bakterioloģisko kultivēšanu balstītajām metodēm, lai gan molekulārās metodes nesniedz iespēju izolēt mikoplazmas un neļauj noteikt to antigēnās īpašības, tādēļ pētījumā paralēli polimerāzes ķēdes reakcijai tiek izmantota arī konvencionālā bakterioloģija, kas mikoplazmu izolēšanai ir stipri komplicēta, mikoplazmu specifiskās uzbūves un vairošanās dēļ. Seroloģiskai mikoplazmu diagnostikai, izmantojama ir netiešā ELISA metode, kas ļauj noteikt antimikoplazmu antivielas asins serumā un pienā. Lai gan katrai testēšanas metodei ir stiprās puses un ierobežojumi, to kombinētā izmantošana sniedz papildinformāciju, kas, interpretējot to kopā ar klīniskajām pazīmēm un ganāmpulka anamnēzi, atvieglo patogēnu noteikšanu un liellopu populācijas slimības stāvokļa raksturošanu kā arī sniedz rīkus šīs infekcijas ierobežošanai. Jāatzīmē, ka COVID-19 pandēmijas dēļ reaģentu un materiālu piegāde bija būtiski traucēta, kā rezultātā veicamo darbu plāns tika koriģēts pievēršot pastiprinātu uzmanību tieši konvencionālajai bakterioloģijai, izstrādājot precīzu mikoplazmu kultivēšanas metodiku, izmantojot references mikoplazmu celmus. Pētījuma otrajā posmā paredzams, ka būs iespēja veikt precīzu metodikas izstrādi paraugu iegūšanai izmantojot rīkles zondes kā arī salīdzināt reālā laika polimerāzes ķēdes reakcijas datus ar konvencionālās bakterioloģijas un seroloģijas datiem.

Mērķis: Noskaidrot *Mycoplasma bovis* izplatību Latvijā piena lopkopības sektorā dažādos Latvijas reģionos. Veikt *Mycoplasma bovis* genotipisko un antigēno īpašību noteikšanu un, pamatojoties uz iegūto datu analīzi, meklēt iespējamus risinājumus mikoplazmozes ierobežošanai, klīnisko pazīmju un inficēšanas risku mazināšanai piena lopkopības sektorā Latvijā.

Darba uzdevumi:

- 2.1. Veikt saimniecību rekrutēšanu un atlasi pētījumam, balstoties uz saimniecību pašiniciatīvu un LDC Piena pārraudzības datiem, identificēt saimniecības ar augstu piena somatisko šūnu skaitu;
- 2.2. Iegūt piena, sinoviālā šķidrums, bronhoalveolāro lavāžu, treheālo noskalojumu vai rīkles paraugus, kā arī patoloģiskā materiāla paraugus no dažādām piena liellopu saimniecībām Latvijā;
- 2.3. Veikt iegūto paraugu mikrobioloģisko un molekulārbioloģisko izmeklēšanu;
- 2.4. Veikt izolēto mikoplazmu antigēno īpašību noteikšanu un balstoties uz iegūtajiem datiem identificēt autogēno vakcīnu izstrādāšanas iespējas Latvijas piena lopkopības sektoram;
- 2.5. Izstrādāt labas ražošanas prakses ieteikumus mikoplazmozes ierobežošanai piena lopkopībā Latvijā;
- 2.6. Sagatavot zinātniskās un populārizinātniskās publikācijas par pētījuma gaitā iegūtajiem rezultātiem.

IEVADS

***Mycoplasma bovis* autogēno vakcīnu pielietošanas iespējas antimikrobiālās rezistences mazināšanai piena lopkopībā Latvijā.**

Mikoplazmu sugas visā pasaulē izraisa 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 diagnostika, lai novērstu un kontrolētu slimības uzliesmojumus saimniecībā un valstī. Šajā pētījumā īpašu uzmanību pievēršsim tieši 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 apstākļiem. Tradicionāli mikoplazmu identifikācija un diagnostika tiek veikta, izmantojot bakterioloģisko kultivēšanu, bet, pēdējā laikā arvien biežāk tiek izmantota polimerāzes ķēdes reakcija, lai noteiktu mikoplazmu klātbūtni un to sugas dažādos paraugos no liellopiem. Polimerāzes ķēdes reakcijai laboratorijas diagnostikā ir lielāka efektivitāte, specifiskums un jutīgums, salīdzinot ar parastajām uz kultūru izolēšanu balstītajām metodēm, lai gan molekulārās metodes nesniedz iespēju izolēt mikoplazmas un neļauj noteikt to antigēnās īpašības, tādēļ pētījumā paralēli konvencionālajai bakterioloģijai izmantojam arī polimerāzes ķēdes reakciju. Seroloģiskai mikoplazmu diagnostikai, izmantojama ir netiešā ELISA metode, kas ļauj noteikt antimikoplazmu antivielas asins serumā un pienā. Lai gan katrai testēšanas metodei ir stiprās puses un ierobežojumi, to kombinētā izmantošana sniedz papildinformāciju, kas, interpretējot to kopā ar klīniskajām pazīmēm un ganāmpulka anamnēzi, atvieglo patogēnu noteikšanu un liellopu populācijas slimības stāvokļa raksturošanu kā arī sniedz rīkus šīs infekcijas ierobežošanai.

Projekta mērķis un sasniedzamā rezultāta praktiskais pielietojums nozares attīstībā:

Balstoties uz Nacionālā rīcības plāna “Par antimikrobiālās rezistences ierobežošanu un antimikrobiālo līdzekļu atbildīgu un piesardzīgu lietošanu dzīvnieku veselības jomā” 9.1 punktā minēto ‘pilnveidot lauksaimniecības dzīvnieku imunizācijas sistēmu, lai veicinātu vakcinācijas efektivitāti un samazinātu antimikrobiālo līdzekļu lietošanu’, noskaidrot *Mycoplasma bovis* izplatību Latvijā piena lopkopības sektorā dažādos Latvijas reģionos. Veikt *Mycoplasma bovis* genotipisko un antigēno īpašību noteikšanu un, pamatojoties uz iegūto datu analīzi, meklēt iespējamus risinājumus mikoplazmozes ierobežošanai, klīnisko pazīmju un inficēšanas risku mazināšanai piena lopkopības sektorā Latvijā.

2. Darba uzdevumi:

- 2.1. Veikt saimniecību rekrutēšanu un atlasī pētījumam, balsoties saimniecību pašiniciatīvu un LDC Piena pārraudzības datiem identificēt saimniecības ar augstu piena somatisko šūnu skaitu;
- 2.2. Iegūt piena, sinoviālā šķidrums, bronhoalveolāro lavāžu, treheālo noskalojumu vai rīkles paraugus, kā arī patoloģiskā materiāla paraugus no dažādām piena liellopu saimniecībām Latvijā;
- 2.3. Veikt iegūto paraugu mikrobioloģisko un molekulārbioloģisko izmeklēšanu;

2.4. Veikt izolēto mikoplazmu antigēno īpašību noteikšanu un balstoties uz iegūtajiem datiem identificēt autogēno vakcīnu izstrādāšanas iespējas Latvijas piena lopkopības sektoram;

2.5. Izstrādāt labas ražošanas prakses ieteikumus mikoplazmozes ierobežošanai piena lopkopībā Latvijā;

2.6. Sagatavot zinātniskās un populārizinātniskās publikācijas par pētījuma gaitā iegūtajiem rezultātiem.

1. METODIKAS IZSTRĀDE UN PRELIMINĀRIE REZULTĀTI

1.1. Anketas izstrādes metodika

Lai noskaidrotu *Mycoplasma* spp. izplatību veicinošos faktoros govju saimniecībās, tika izstrādāta anketa, kur informācijas iegūšanai tiks izmantotas intervijas ar dzīvnieku saimniecību atbildīgajiem pārstāvjiem. Intervēšanu nodrošinās projekta dalībnieki. Saimniecību informācija tiks analizēta un apkopota, kā arī vēlāk tiks izmantota datu apstrādei, zinātnisko publikāciju sagatavošanai un labas ražošanas prakses vadlīniju izstrādei dzīvnieku audzētājiem.

Kā zināms, pastāv vairāki faktori, kas padara ganāmpulku uzņēmīgāku pret *Mycoplasma* infekciju, ietekme infekcijas klīniskās izpausmes un uzliesmojuma izplatību vai infekcijas attīstības dinamiku ganāmpulkā. Pie svarīgākajiem faktoriem pieskaita ganāmpulka menedžmentu, kas var samazināt vai veicināt ierosinātāja transmisijas risku, savlaicīgi atklājot klīnisko slimus dzīvniekus. Pētījuma izpildei ganāmpulka menedžmenta faktori tiks skatīti kopā ar infekcijas slimību izplatību, kas ļautu identificēt infekcijas dinamikā kontekstā ar infekcijas izplatību ietekmējošiem faktoriem.

Lai izstrādātu efektīvāku programmu *Mycoplasma* ierobežošanai ganāmpulkā, izstrādātā anketa palīdzēs raksturot ganāmpulka menedžmentu, biodrošības noteikumu piemērošanu, lai pilnveidotu esošās biodrošības programmas. Bez iepriekš minētā anketēšana ļaus noteikt un raksturot ierosinātāju un individuālos dzīvnieka faktoros, kas var būt saistīti ar infekcijas slimības izplatību, ieskaitot veterināro aprūpi ganāmpulkā. Aptaujas veidošanai tika izmantoti citu valstu pētījumi un gūtās atziņas (Somijā, Dānijā, Šveice), ņemot vērā Latvijas lauksaimniecības specifiku un ganāmpulka menedžmenta īpatnības.

Kopumā anketa sastāv no 3 daļām, kur pirmā sadaļa ietver informāciju par ganāmpulku, jo tā nepieciešama, lai izprastu ierosinātāja izplatību ietekmējošos faktoros un ganāmpulka menedžmenta īpatnības. Anketā tika iekļauti faktori, kuriem ir nozīme ierosinātāja izplatībā un kuri bija būtiski citos pētījumos, piem., ražošanas modelis un ganāmpulka lielums, mītnes mikroklimata prasības, jaundzīvnieku un pieaugušo dzīvnieku turēšana, biodrošības pasākumi.

Otrā anketēšanas sadaļa iekļauj informāciju par slaukšanas menedžmentu. *Mycoplasma* spp. ir ļoti kontagiozs mastītu ierosinātājs piena govju ganāmpulkos, kurš tiek izplatīts no viena dzīvnieka uz citu, ja netiek ievēroti labas prakses pasākumi slaukšanas procesā (tesmeņa un pupu dezinfekcija, personāls, kontaminēta apkārtējā vide u.c.). Tā rezultātā infekcija var nodarīt būtiskus ekonomiskos zaudējumus ganāmpulka samazinātās produktivitātes dēļ. Ietvertā informācija nepieciešama, lai izvērtētu slaukšanas higiēnas atbilstību higiēnas prasībām un tās iespējamo korelāciju ar ierosinātāja izplatību ganāmpulkā.

Trešā anketas sadaļa paredzēta informācijas iegūšanai par epidemioloģisko situāciju ganāmpulkā, par dzīvnieku slimību diagnostiku un veterinārmedicīnas aprūpes īpatnībām, ieskaitot antimikrobiālo vielu lietošanu ganāmpulkā. Informācija par izplatītākajām slimībām ganāmpulka palīdz identificēt citus ierosinātājus, jo *Mycoplasma* spp. infekcija var padarīt ganāmpulku par uzņēmīgu arī pret citām infekcijām. Šī sadaļa paredzēta informācijas iegūšanai par ganāmpulka

veselības problēmām kopumā. Informācija par antimikrobiālo līdzekļu patēriņu ganāmpulkā ļauj analizēt ierosinātāju izplatību un antimikrobiālo līdzekļu patēriņu, sasaistot to ar dzīvnieku ārstēšanu un slimības klīniskajām izpausmēm.

1.2.Saimniecību rekrutēšana pētījumam

Saimniecību rekrutēšanai pētījumam tiek veikta uz 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 balstoties uz iepriekš laboratoriski apstiprinātu mikoplazmozi saimniecībā, pēdējā gada laikā. Balstoties uz šīm metodēm pētījumā ir atlasītas 10 dažāda lieluma piena lopkopības saimniecības no 4 Latvijas reģioniem, tādējādi nodrošinot izolātu maksimāli plašu ģeogrāfisko pārstāvniecību.

1.3. Paraugi iegūšanas metodika

1.3.1. Faringo-ezofagālo zondes (rīkles zondes) izmantošanas procedūra faringeālo paraugu iegūšanā mikoplazmu noteikšanai

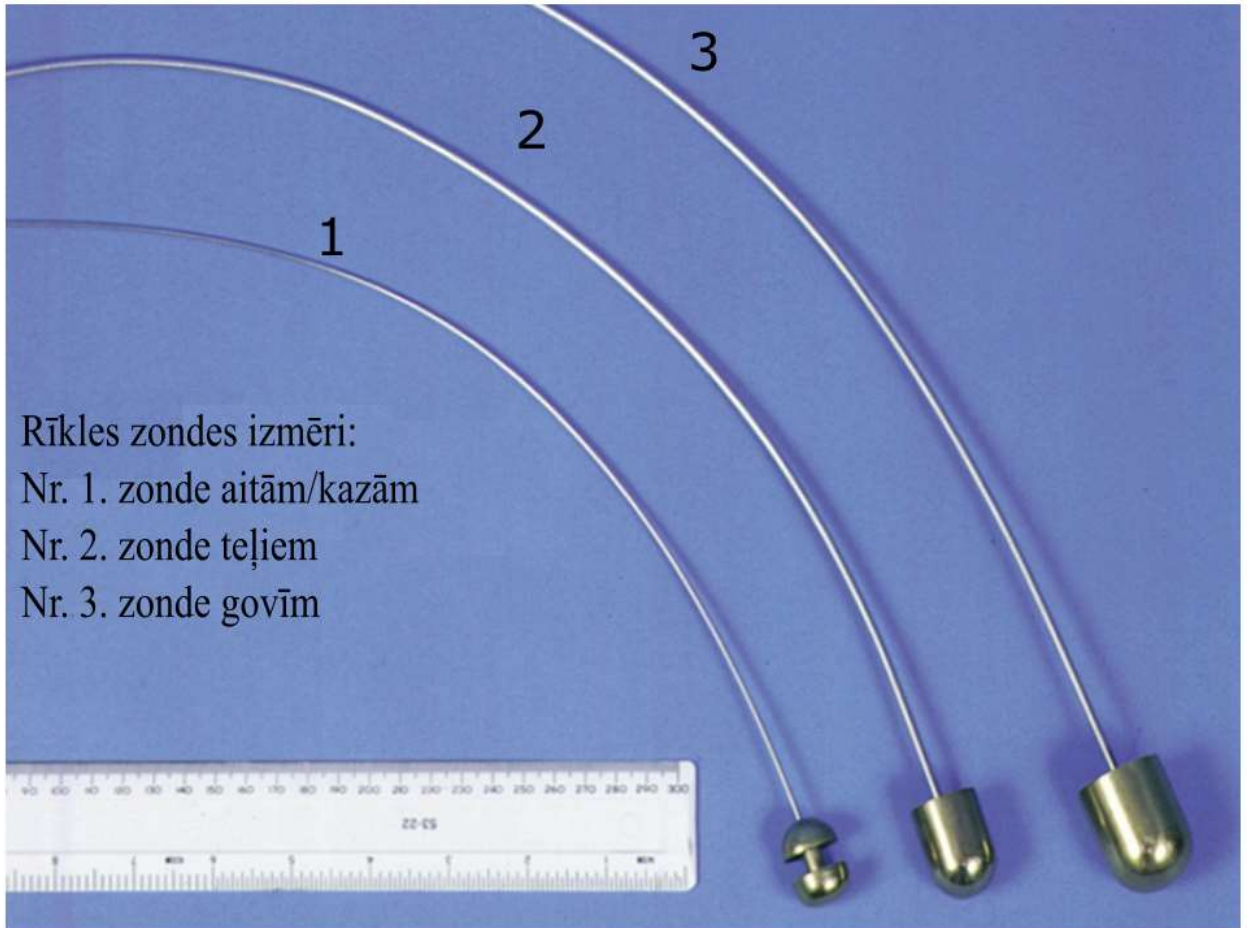
Faringeālo paraugu iegūšanu, izmantojot rīkles zondi, parasti pielieto mutes un nagu sērgas diagnostikā, kā vienu no uzticamākajām metodēm, jo rīkles ventrālā siena bagātīgi satur limfoīdos audus, un šeit ir novērojama vairāku infekcijas slimību ierosinātāju izteikta primārā replikācija. Faringeālie paraugi, kas iegūti ar rīkles zondi, var tikt efektīvi izmantoti arī *Mycoplasma bovis* un citu mikoplazmu noteikšanai, ņemot vērā mikoplazmu neizturību ārvīdē un to replikāciju elpošanas ceļu un rīkles epitēlija šūnās, kas bieži vien neļauj veiksmīgi noteikt mikoplazmu klātbūtni, dzīvniekiem saimniecībā, nepietiekamā mikoplazmu daudzuma dēļ 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.

1.3.1.1.Materiāli paraugu iegūšanai:

- a) Attiecīga izmēra rīkles zonde;
- b) Līdzekļi dzīvnieka fiksēšanai;
- c) Plastikāta trauks paraugu transportēšanai;
- d) Sterili, tukši 15ml stobriņi, stobriņi ar 2ml mikoplazmu selektīvo buljonu un sterilas šļirces 2-3ml apjomā (šļirces vietā var izmantot 5 ml mikropipeti);
- e) Paraugu pārvadāšanas konteiners ar aukstuma akumulatoriem.

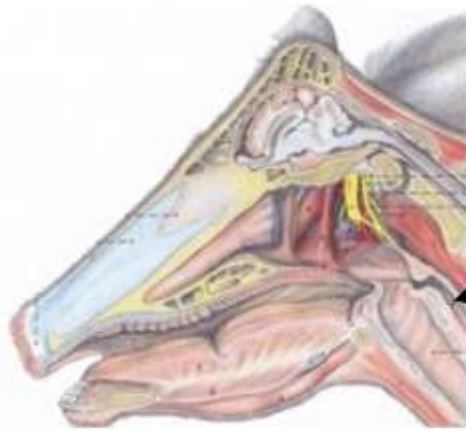
1.3.1.2.Faringeālo parauga iegūšanas tehnika:

- 1) Izvēlas pareizāko rīkles zondes izmēru, vadoties pēc dzīvnieka izmēra, piemēram, aitām un teļiem lieto pirmā, vai otrā izmēra rīkles zondi, attiecīgi govīm izmantos trešā izmēra rīkles zondi (1. att.).



1.att. Rīkles zondes izmēri (FAO, 2015)

- 2) Pareizi nofiksē dzīvniekus stellēs vai citā dzīvniekam un procedūras veicējam drošā veidā.
- 3) Nomēra nepieciešamo rīkles zondes ievadīšanas dziļumu, lai sasniegtu faringeālo telpu.
- 4) Ar kreisās rokas pirkstiem (labročiem) atver vaļā dzīvnieka muti, ievietojot diastomā kreisās rokas rādītājpirkstu.
- 5) Uzmanīgi ievada rīkles zondes kausu mutē, pārlicinoties, ka rīkles zondes stieples rokturis ir vērsts uz leju.
- 6) Turpina virzīt rīkles zondi pāri mēlei rīklē. Pēc ievadīšanas rīklē zondes pozīciju var noteikt, izmantojot rīkles kraniālās daļas palpāciju (2. att.).



Rīkles paraugu iegūšanas aptuvenā lokalizācija

2.att. Rīkles paraugu iegūšanas lokalizācija

- 7) Virza rīkles zondi no augšas uz leju aptuveni 5-10 cm diapazonā.
- 8) Zondi izvelk uzmanīgi, lai netraumētu dzīvnieku un maksimāli saglabātu paraugu.
- 9) 0,5-1ml zondes kausiņa saturu ar sterilu šļirci vai mikropipeti pārnes atsevišķā stobriņā ar mikoplazmu selektīvo buljonu 2ml apjomā.
- 10) Iepriekšminēto stobriņu ar saturu 4-6h laikā $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ nogādā laboratorijā tālāko izmeklējumu veikšanai.

1.3.2. Nazālo noslaucījumu (svābu) paraugi

Nazālie noslaucījumi var būt kā alternatīva metode transtraheālajiem vai bronhoalveolārajiem noskalojumiem vai faringeālajiem paraugiem, kas iegūti ar rīkles zondi, lai diagnosticētu *Mycoplasma bovis* un citas mikoplazmu sugas. Lai gan šim parauga iegūšanas veidam ir savi trūkumi, piemēram, nepieciešams liels ierosinātāja daudzums uz gļotādām, lai paraugā varētu konstatēt mikoplazmas – tā tomēr ir būtiski vieglāk veicama metode salīdzinājumā ar iepriekšminētajām metodēm.

1.3.2.1. Materiāli paraugu iegūšanai

Paraugu iegūšanai izmanto sterilus nazālos svābus. No viena dzīvnieka ņem divus nazālo svābu paraugus, kurus izmeklēšanai sagatavo divējādi - vienu ievieto transportbarotnē (Amies barotne bez ogles), otru sterilā plastmasas stobriņā, kurā iepildīts 6 ml 0,9% NaCl.

Lai iegūtu paraugus, nepieciešami sterili svābi, transportbarotnes, kas piemērotas mikoplazmu transportēšanai (Amies barotne bez ogles), sterili plastmasas stobriņi, sterils 0,9% NaCl, adata (G18), 10 ml šļirce, spirta tamponi, grieznes, marķieris parauga apzīmēšanai.

1.3.2.2. Paraugu iegūšanas tehnika

Paraugu ņemšanai sākotnēji jānodrošina dzīvnieka fiksācija. Jaundzīvniekus var fiksēt manuāli, neizmantojot papildaprīkojumu, galvu cieši piefiksējot, bet pie nepieciešamības var izmantot arī apaušus (3. att.).



3. att. Jaundzīvnieka fiksācija pirms parauga noņemšanas

Pieaugušu dzīvnieku fiksācijai jāizmanto stelles, apauši vai galvas fiksatori, lai nodrošinātu drošu piekļuvi.

Pēc fiksācijas nodrošina nāss apkārtnes dezinfekciju, izmantojot spirta tamponu, sagatavo nāss apvidu, kurā ievadīs svābu.

Svābu ievieto paralēli deguna ventrālajai ejai, ievadot to apmēram 8 centimetrus dziļi. Ievietojot svābu, nodrošina, ka tas nesaskaras ar citām virsmām (4. att.).



4. att. Svāba ievietošana jaundzīvniekam

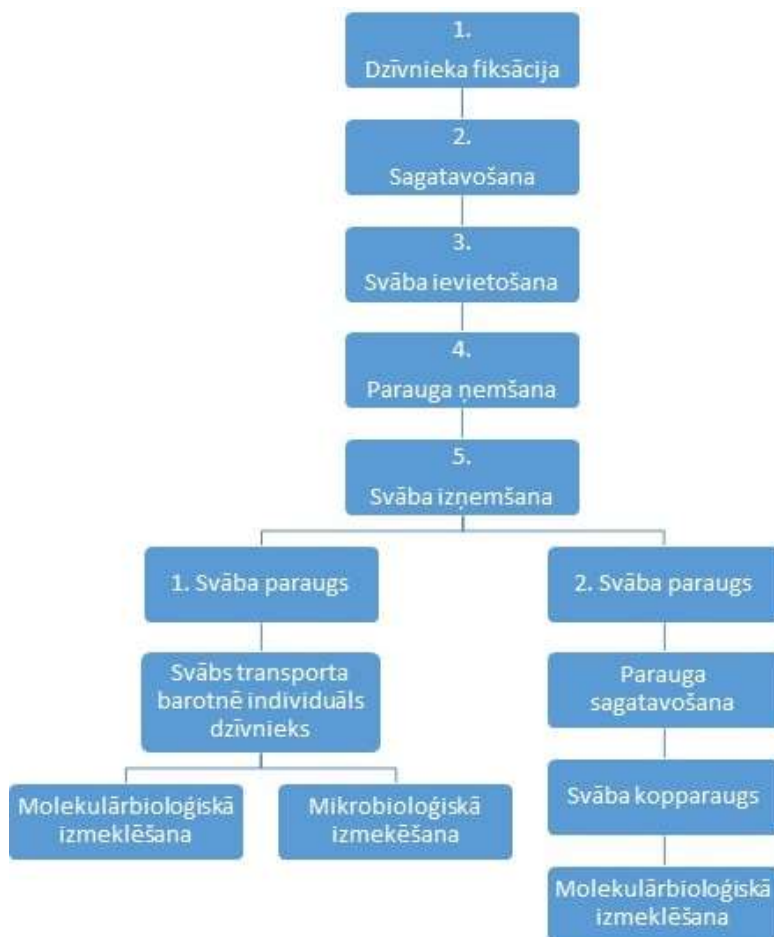
Paraugu ņem ar rotējošām kustībām, veicot noslaucījumu no gļotādām. Rotējošās kustības atkārto apmēram 30 sekundes.

Pēc tam svābu izņem no deguna ventrālās ejas, un atkarībā no parauga izmeklēšanas metodikas ievieto vai nu Amies transporta barotnē bez ogles, vai sterilā plastmasas stobriņā, kurā iepriekš, izmantojot 10 ml šļirci un 18G adatu, jau iepildīti 6 ml sterila 0,9% NaCl (5. att.).



5. att. Parauga ievietošana transporta barotnē

No katra dzīvnieka tiek ņemti divi svābu paraugi. Pirmo paraugu pēc izņemšanas uzreiz ievieto Amies transportbarotnē bez ogles. Šo individuālā dzīvnieka paraugu izmeklē mikrobioloģiski un molekulārbioloģiski. Otro svāba paraugu ievieto sterilā plastmasas stobriņā ar 0,9% NaCl, pirms tam ar sterilām grieznēm nogriežot svāba augšējo trešdaļu. Otrais svāba paraugs veidos kopparaugu, kuru izmeklēs molekulārbioloģiski (6. att.).



6. att. Svābu paraugu ņemšanas shēma

Abus paraugus pēc paņemšanas uzglabā $+4^{\circ}\text{C}$ temperatūrā līdz nogādāšanai laboratorijā.

1.3.3. Asins paraugi

1.3.3.1. Materiāli paraugu iegūšanai

Parauga iegūšanai nepieciešams 6 ml vakutainera stobriņš ar recēšanas aktivatoru, vakutainera adata (20G), vakutainera adatas turētājs, spirta tamponi dūriena vietas sagatavošanai un marķieris parauga apzīmēšanai.

1.3.3.2. Paraugu iegūšanas tehnika

Jaundzīvniekiem asins parauga iegūšanai izmanto jugulāro vēnu (*v. jugularis externa*) (7. att.).



7. att. Asins parauga iegūšana jaundzīvniekiem no jugulārās vēnas (*v. jugularis externa*)

Jaundzīvnieku fiksāciju var veikt izmantojot apaušus vai manuāli ar rokām.

Pieaugušiem dzīvniekiem asins paraugu iegūšanai izmanto jugulāro, vai astes vēnu (*v. caudalis mediana*). Paraugu iegūstot no jugulārās vēnas dzīvnieks ir jāpiefiksē ar apaušiem, lai nodrošinātu drošu piekļuvi. Izvēloties paraugu ņemt no astes vēnas, jāveic astes fiksācija, to paceļot perpendikulāri pret dzīvnieka ķermeni (8. att.).



8. att. Asins parauga iegūšana pieaugušam dzīvniekam no astes vēnas (*v. caudalis mediana*)

Pirms asins parauga iegūšanas dezinficē dūriena vietu. Jaundzīvniekiem nospiež jugulāro vēnu zem dūriena vietas, bet, ņemot no astes vēnas, nospiešana nav nepieciešama.

Jugulārajā vēnā dūrienu veic 20 grādu leņķī, bet, ņemot no astes vēnas, dūrienu veic perpendikulāri pret asti. Vispirms ievada vakutainera adatu, kas fiksēta adatas turētājā, tad pievieno vakutainera stobriņu, asinis ņem ne mazāk kā 6 ml. Pēc tam atvieno vakutainera stobriņu un izņem adatu no vēnas un nodrošina īslaicīgu kompresiju dūriena vietā. Pēc paraugu iegūšanas apzīmē to ar individuāla dzīvnieka numuru.

Paraugus pēc paņemšanas uzglabā +4° C temperatūrā līdz nogādāšanai laboratorijā. Asinis izmeklē seroloģiski.

1.3.4. Koppiena parauga iegūšana

Koppiena parauga iegūšanai izmanto 30 ml vienreizējas lietošanas sterilu plastmasas trauciņu ar skrūvējamu vāku. Koppiena paraugu iegūst no piena dzesētāja baseina, atverot vārstu un iepildot iepriekš sagatavotajā trauciņā, pēc tam identificējot to. Pēc paņemšanas uzglabā +4° C temperatūrā līdz nogādāšanai laboratorijā. Piena kopparaugu izmeklē molekulārbioloģiski.

1.3.5. Sinoviālo paraugu iegūšana

Viens no *Mycoplasma spp.* radītajiem bojājumiem atgremotāju organismā ir artrīts. Prasti tas attīstās paralēli ar pneimoniju vai mastītu, bet var arī attīstīties individuāli. Biežāk vienam dzīvniekam ir skartas vairāk nekā viena locītava un iekaisuma radītais klibums ir smagas pakāpes. Mikoplazmu izraisīts locītavu iekaisums, pārejot hroniskā formā, dzīvniekiem rada ilgtermiņa diskomfortu, samazinot produktivitāti. Ganāmpulkā, kurā paralēli pneimonijām, mastītiem, otītiem ir novērojami artrīti teļiem un pieaugušām govīm, diagnostikai būtu jāietver arī skarto locītavu sinovija paraugi, lai noteiktu bakterioloģisko kontamināciju tajā un izslēgtu vai apstiprinātu mikoplazmu klātbūtni.

1.3.5.1. Materiāli sinoviālā parauga iegūšanai:

1. Sedatīvie līdzekļi (Ksilazīna hidrohlorīds)
2. Lokālās anestēzijas līdzekļi (2% Lidokaīns)
3. Inventārs laukuma ķirurģiskai sagatavošanai (kliperis, tamponi, povidonjods, 70° spirts šķīdums)
4. Sterili tamponi
5. Sterili cimdi
6. Šļirces (5 – 10ml teļiem; govīm 10 – 20 ml)
7. Sterilas 20 – 22 G adatas
8. Sterili stobriņi ar 2ml mikoplazmu selektīvo buljonu

1.3.5.2. Sinoviālo paraugu iegūšanas tehnika

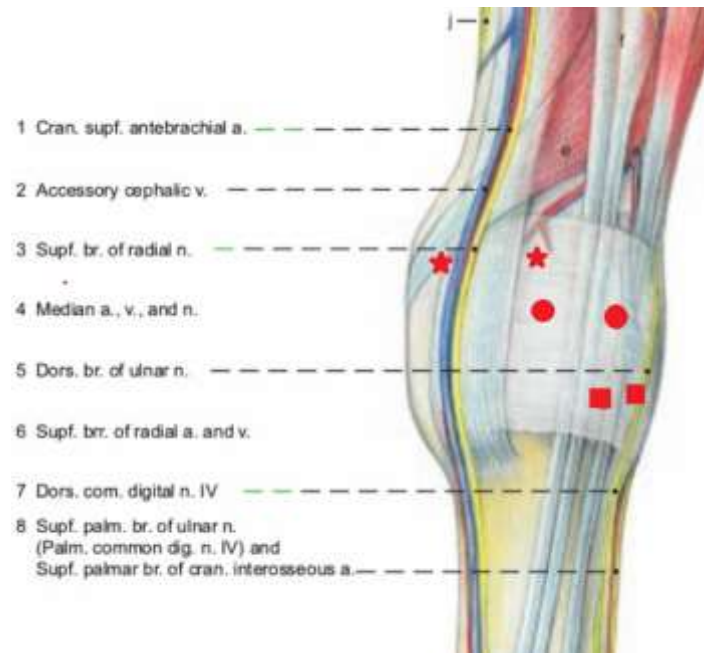
Svarīgi ievērot darba drošību un efektīvu dzīvnieka fiksāciju. Pieaugušos dzīvniekus var fiksēt fiksācijas stellēs ar iespēju fiksēt un pacelt priekškājas un pakaļkājas. Pieaugušiem dzīvniekiem manipulāciju veicot stāvus pozīcijā, var pielietot vieglu sedāciju. Ja nav pieejamas fiksācijas stelles, dzīvnieku sedē, izmantojot augstākas ksilazīna hidrohlorīda devas, kā iedarbības rezultātā dzīvnieks būs guļus pozīcijā. Teļus ieteicams sedēt izmantojot augstākas ksilazīna hidrohlorīda devas, kā iedarbības rezultātā teļš atradīsies guļus pozīcijā. Guļus pozīcijā sedēto dzīvnieku fiksē atbilstoši vispārpieņemtām teknikām.

Artrocentēzes procedūra:

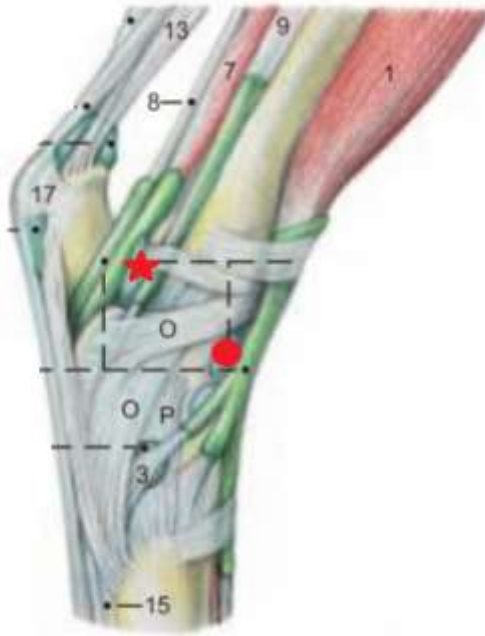
1. Noskuj apmatojumu plaša zonā skartās locītavas apvidū.
2. Veic ādas sagatavošanu izmantojot povidonjodu un spirta šķīdumu.
3. Tiek veikta subkutāna lokālas anestēzijas (2% lidokaīns) ievadīšana potenciālajās punkcijas vietās.
4. Atkārtoti veic ādas sagatavošanu izmantojot povidonjodu un spirta šķīdumu.
5. Punkcijas veicējs nomazgā, nodezinficē rokas un uzvelk sterilus cimdus.
6. Asistents, ievērojot aseptikas principus, pasniedz šļirci un adatu.
7. Punkcijas veicējs izpalpē precīzē punkcijas vietu (skat. 9. att. un 10. att.)

8. Veic adatas ievadīšanu sinoviālajā telpā un aspirē sinovija šķidrumu šļircē. Punkciju veic 10 minūtes pēc lokālās anastēzijas līdzekļa ievadīšanas.
9. Paraugu apmēram 0,2-1ml apjomā pēc iespējas ātrāk ievieto sterilā stobriņā ar sterilu mikoplazmu selektīvo buljonu 2ml apjomā un uzglabā +4C temperatūrā līdz nogādāšanai laboratorijā.

Sinoviālos paraugus izmeklē izmantojot polimerizēs ķēdes reakciju un bakterioloģijas metodes mikroorganismu izolēšanai un kultivēšanai.



9. att. Artrocentēzes vietas sinovialā parauga iegūšanai no karpālās locītavas. (zvaigzne - antebrahiokarpālās punkcijas vietas; punkts - vidējās karpālās punkcijas vietas; kvadrāts - karpometekarpālās punkcijas vietas)



10. att. Arthrocentēzes vietas sinovialā parauga iegūšanai tarsālās locītavas apvidū no mediālās puses. (zvaigzne - punkcijas vieta plantārajā locītavas maisiņā; punkts - punkcijas vieta dorsālajā locītavas maisiņā)

1.4. 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, jaunākas metodes, kas plaši tiek izmantotas klīniskajā praksē, ir metodes, kas balstītas uz atsevišķu mikoplazmu gēnu noteikšanu (konvenciālā PĶR vai reālā laika PĶR) vai arī uz pilno mikoplazmu genoma sekvencēšanu, bet parasti paralēli tiek pielietotas arī seroloģiskās metodes antivielu noteikšanai pret mikoplazmām.

1.4.1. Paraugu bakterioloģiskā izmeklēšana

1.4.1.1. Nazālie noslaucījumu paraugi:

- Paraugu uzreiz pēc tā iegūšanas Amies transporta barotnē bez ogles, nogādā laboratorijā, uzglabājot $4 \pm 2^\circ\text{C}$ vismaz 4-6 h laikā.
- Laboratorijā svāba galu, apmēram 2cm garumā ar vates daļu, ar sterilām grieznēm nogriež un ievieto stobriņā sterilā mikoplazmu selektīvajā buljonā 2ml apjomā, (tajā selektivitāti nodrošina penicilīns un tallija acetāts, kuri attiecīgi darbojas antibakteriāli pret

grampozitīvajām un gramnegatīvajām baktērijām), to inkubē termostatā 37°C temperatūrā 3-4 dienas;

- Tālāk no sētā mikoplazmu selektīvā buljona paņem 200mkl buljona uz uzsēj uz mikoplazmu selektīvā agara barotnes ar sterilu špāteli. Barotni inkubē 37°C temperatūrā mikroaerofilos apstākļos (O₂ koncentrācija līdz 10% un CO₂ koncentrācija līdz 10%), mitrā kamerā 7-14 dienas, sējumus inspicē ik pēc 2-3 dienām, barotnes virsmu aplūko ar gaismas mikroskopu 40-60 x palielinājumā, kamēr uz barotnes virsmas novēro mikoplazmām tipiska izskata kolonijas, kuras vizuāli atgādina “ceptas olas” struktūru, ar kolonijas sabiezējumu tās vidusdaļā.
- Konstatējot mikoplazmām raksturīgās kolonijas, tās tālāk identificē molekulārbioloģiski.

1.4.1.2. Faringeālie paraugi:

- Paraugu apmēram 0,5-1ml apjomā, uzreiz pēc tā iegūšanas ievieto sterilā mikoplazmu selektīvajā buljonā 2ml apjomā, (tajā selektivitāti nodrošina penicilīns un tallija acetāts, kuri attiecīgi darbojas antibakteriāli pret grampozitīvajām un gramnegatīvajām baktērijām), un, uzglabājot 4±2°C vismaz 4-6 h laikā nogādā laboratorijā tālākai kultivēšanai.
- Izmeklējamo materiālu laboratorijā inkubē termostatā mikoplazmu selektīvajā buljonā 37°C temperatūrā 3-4 dienas;
- Tālāk no sētā mikoplazmu selektīvā buljona paņem 200mkl buljona uz uzsēj uz mikoplazmu selektīvā agara barotnes ar sterilu špāteli. Barotni inkubē 37°C temperatūrā mikroaerofilos apstākļos (O₂ koncentrācija līdz 10% un CO₂ koncentrācija līdz 10%), mitrā kamerā 7-14 dienas, sējumus inspicē ik pēc 2-3 dienām, barotnes virsmu aplūko ar gaismas mikroskopu 40-60 x palielinājumā, kamēr uz barotnes virsmas novēro mikoplazmām tipiska izskata kolonijas, kuras vizuāli atgādina ceptas olas struktūru, ar kolonijas sabiezējumu tās vidusdaļā.
- Konstatējot mikoplazmām raksturīgās kolonijas, tās tālāk identificē molekulārbioloģiski.

1.4.1.3. Sinoviālie paraugi:

- Paraugu apmēram 0,2-1ml apjomā, uzreiz pēc tā iegūšanas ievieto sterilā mikoplazmu selektīvajā buljonā 2ml apjomā, (tajā selektivitāti nodrošina penicilīns un tallija acetāts, kuri attiecīgi darbojas antibakteriāli pret grampozitīvajām un gramnegatīvajām baktērijām), un, uzglabājot 4±2°C vismaz 4-6 h laikā nogādā laboratorijā tālākai kultivēšanai
- Izmeklējamo materiālu laboratorijā inkubē termostatā mikoplazmu selektīvajā buljonā 37°C temperatūrā 3-4 dienas;
- Tālāk no sētā mikoplazmu selektīvā buljona paņem 200mkl buljona uz uzsēj uz mikoplazmu selektīvā agara barotnes ar sterilu špāteli. Barotni kultivē 37°C temperatūrā mikroaerofilos apstākļos (O₂ koncentrācija līdz 10% un CO₂ koncentrācija līdz 10%), mitrā kamerā 7-14 dienas, sējumus inspicē ik pēc 2-3 dienām, barotnes virsmu aplūko ar gaismas

mikroskopu 40-60 x palielinājumā, kamēr uz barotnes virsmas novēro mikoplazmām tipiska izskata kolonijas, kuras vizuāli atgādina ceptas olas struktūru, ar kolonijas sabiezējumu tās vidusdaļā.

- Konstatējot mikoplazmām raksturīgās kolonijas, tās tālāk identificē molekulārbioloģiski.

1.4.2. Paraugu molekulārbioloģiskā izmeklēšana

Ka viena no pamata metodēm mikoplazmu molekulārai noteikšanai mūsdienās tiek pielietota reālā laika polimerāzes ķēdes reakcija (qPĶR) paralēli vai pilnībā aizvietojot konvenciālo polimerāzes ķēdes reakciju. Mikoplazmu sugu noteikšanai ar qPĶR tiek izmantota “SYBR green dye” interkalācija un fluorescentās zondes.

“SYBR green” ciāna krāsas piesaistās pie visām DNS dubultspirālēm, kas rezultējas ar gaismas signāla emisiju 520nm gaismas spektrā. Jo vairāk PĶR cikli tiek veikti, jo lielāks ir DNS dubultspirāļu daudzums un līdz ar to palielinās arī gaismas emisija. Tā kā “SYBR green” nav specifisks mērķa sekvencei tas nodrošina daudz lētāku reālā laiku PĶR veikšanu, jo mērķa oligonukleotīdu sekvences nav jāsinetēzē. Lai gan dēļ tā, ka “SYBR green” saistās ar visām DNS dubultspirālēm, tas var izraisīt fona signālu un samazināt specifiskumu salīdzinot ar qPĶR metodi, kad tiek izmantotas specifiskās zondes. “SYBR green” qPĶR metodi reti izmanto mikoplazmu noteikšanai klīniskajos paraugos, bet to plaši pielieto piena kopparaugu testēšanā nosakot mikoplazmu ģints 16S-23S starpgēnu reģionus.

Lai sasniegtu augstāku specifiskumu ir izstrādātas qPĶR fluorescentās zondes. Bez praimeru hibridizācijas zonde saistās arī ar mērķa reģionu. Zondes ir specifiskas konkrētai mērķa sekvencei, tādejādi mazinot fona signālus, palielinot metodes specifiskumu. Šīs metodes priekšrocība ir tāda, ka vairākas zondes var tikt kombinētas ar dažādām krāsām un dzēsējmolekulām rezultātā ir iespēja veikt multipleks qPĶR vienas reakcijas laikā, ietaupot laiku un reaģentus. Lai gan testa izmaksas ir lielākas, dēļ tā, ka jālieto vairākas zondes. Lai gan uz zonžu izmantošanu balstītas qPĶR ir ar augstāku specifiskumu, var veidoties krusteniskās amplifikācijas starp *M.bovis* un *M.agalactiae*, ja izmanto 16s rRNS gēnu. Lai mazinātu šo trūkumu ir izstrādātas metodes, kas balstītas uz *uvrC* gēna noteikšanu. Šīs metodes noteikšanas limits ir aptuveni 2.4×10^2 KVV/ml. Papildus specifiskumu var iegūt izmantojot *oppD/F* gēnu noteikšanu.

Nemot vērā, ka mikoplazmoze govīm neraksturojas tikai ar *M.bovis* izraisītiem mastītiem, bet ar plašāku klīnisko ainu, ko bieži izraisa arī citas mikoplazmu sugas, piemēram, *M.californicum*, *M.leachii*, *M.dispar*, *M.canadense*, un *M.alkalescens*, klīnisko paraugu izmeklēšana no govīm ir jāpielieto metodes, kas ļauj noteikt visus šos ierosinātājus.

1.4.3. Paraugu seroloģiskā izmeklēšana

Seroloģisko metožu pielietošana ļauj noteikt dzīvnieku iepriekšēju mikoplazmu ekspozīciju, salīdzinājumā ar konvenciālajām bakterioloģijas metodēm un PĶR, kad mikoplazmas var noteikt tikai tajos gadījumos, ja tās vēl ir atrodamas klīniskajos paraugos. Parasti dzīvniekiem

saimniecībās antivielu klātbūtni pret mikoplazmām var noteikt būtiski biežāk nekā noteikt pašu ierosinātāju. Antivielu klātbūtne neliecina par to, ka dzīvnieks joprojām ir inficēts un izdala ierosinātāju. Tāpēc pieeja, kad izmantojot ELISA datus, izvēlās dzīvnieku brāķēšanu, nav saimnieciski pamatojama. Tāpēc ELISA dati ir jāinterpretē kopā ar citām ierosinātāja noteikšanas metodēm. Papildu problēmas rada arī novēlota antivielu producēšana, kā rezultātā bieži ir novērojama viltus negatīvi rezultāti. Antivielas, detekcijas līmenī saimniecībā, saglabājas aptuveni 15 nedēļas pēc pēdējā klīniskā gadījuma. Kā efektīvāka un precīzāka antivielu noteikšanas metode ir antivielu noteikšana asins serumā un nevis piena vai koppiena paraugos.

1.4.4. Izolātu genotipēšana

Mikoplazmu tipēšanai izmantojot ģenētiskās īpašības, var izmantot pulsējošā lauka gēla elektroforēzi (PFGE), amplificēto fragmentu garuma polimorfismu (AFLP), vairāku lokusu mainīga skaita tandēma atkārtotu analīzi (MLVA) vai multilokusu sekvenču tipēšanu (MLST). Izmantojot PFGE ir pierādīts, ka gan mastītus, gan citas klīniskās pazīmes govīm var izraisīt viens mikoplazmu celms, ko bieži atrod vairākos saimniecības dzīvniekos vai dažkārt vairākās saimniecībās reģionā. Izmantojot AFLP Dānijā pierādīts, ka viens mikoplazmu celms var izraisīt mikoplazmu uzliesmojumus vairākos ganāmpulkos, saglabājot piederību konkrētam celmam. Savukārt izmantojot MLST metodi, ir pierādīts, ka mikoplazmu celmam nonākot valstī, parasti saistībā ar dzīvnieku tirdzniecību, šis celms uzsāk ģeogrāfiski neatkarīgu evolūciju, rezultātā izplatoties konkrētā reģionā. Pamatojoties uz šiem datiem autogēno, vakcīnu pielietošana Latvijā vai atsevišķā Latvijas reģionā ir iespējama, ja pierādītos mikoplazmu celmu homologija reģionā.

Pilna genoma sekvencēšana kļūst arvien populārāk, pieejamāka un ātrāka metode baktēriju ģenētisko īpašību analizēšanai. Šo metodi var izmantot klīniskajā diagnostikā, uzliesmojumu epidemioloģiskajos izmeklējumos un antimikrobiālās rezistences noteikšanai. Pašlaik genomu datubāzēs ir pieejami sekvencēšanas dati par *M.bovis*, *M.californicum*, *M.arginini*, *M.bovigenitalium*, *M.canadense*, *M.bovoculi* un *M.leachii*. Pētījumā Austrālijā, izmantojot pilna genoma sekvencēšanas metodi, pierādīja, ka valstī ir izplatīti savstarpēji homologu celmi ar nelielām variācijām. Šī paši celmi tika izolēti no dažādiem klīniskiem paraugiem, kas pierādīja šo celmu nozīmi dažādos patogēnēzes mehānismos dzīvnieku organismā un pierādīja arī subklīnisku dzīvnieku nozīmi šīs infekcijas uzturēšanā un izplatīšanā, kas sniedz papildus iespējas efektīvas konkrētam reģionam piemērotas autogēnas vakcīnas izstrādes un efektīvas pielietošanas iespējas kopējā antimikrobiālās rezistences mazināšanai un produktivitāte paaugstināšanai, paralēli mazinot mikoplazmozes izraisītās piena kvalitātes, sekundāro infekciju u.c. negatīvo epidemioloģisko faktoru ietekmi uz piena lopkopību.

1.5. Preliminārie rezultāti

Pirmajā atskaites perioda rezultāti ir pētījumā metodikas izstrāde, aptaujas anketas izstrāde, tehniskā metodoloģijas izstrāde paraugu iegūšanai. Saimniecības apmeklējums un anketas aizpildīšana, nazālo noslaucījumu veikšana un asins paraugu iegūšana teļiem un pieaugušām govīm.

Pētījuma metodikas izstrādes un fermu atlasīšanas posmā iegūtie paraugi, paralēli to bakterioloģiskajai izmeklēšanai, tika sūtīti uz valsts akreditēto laboratoriju BIOR un izmeklēti ar reālā laika polimerāzes ķēdes reakciju diagnozes apstiprināšanai.

Pašreizējā pētījuma posmā saimniecībā netika konstatēta *Mycoplasma bovis*, bet *Mycoplasma* spp. *Mycoplasma* spp. tika konstatēta nazālo noslaucījumu kopparaugos gan teļiem, gan govīm, bet koppienā netika konstatētas mikoplazmu DNS (11. att.). Tas parāda, ka praksē ierastā koppiena testēšana ne vienmēr var būt objektīvs tests mikoplazmozes diagnostikā un ir nepieciešams pielāgot paraugu iegūšanas metodes mikoplazmozes aizdomu gadījumos. Tālāka izolātu izmeklēšana un genotipisko un antigēno īpašību noteikšana notiks pētījuma otrajā un trešajā posmā.

Identifikācija	Rādītājs/Metode	Rezultāts
1 - Noslaucījumi Govs Nazālo noslaucījumu kopparaugs teļiem	Liellopu mikoplazmozes ierosinātāja <i>M. bovis</i> specifiskais ģenētiskais materiāls - reālā laika PĶR - Clothier et al. 2010 ⁺	Nav konstatēts
	<i>Mycoplasma</i> spp. ģenētiskais materiāls - PĶR – komerciāls reaģentu komplekts ⁺	Ir konstatēts
2 - Noslaucījumi Govs Nazālo noslaucījumu kopparaugs govīm	Liellopu mikoplazmozes ierosinātāja <i>M. bovis</i> specifiskais ģenētiskais materiāls - reālā laika PĶR - Clothier et al. 2010 ⁺	Nav konstatēts
	<i>Mycoplasma</i> spp. ģenētiskais materiāls - PĶR – komerciāls reaģentu komplekts ⁺	Ir konstatēts
3 - Piens Govs Nazālo noslaucījumu kopparaugs govīm	Liellopu mikoplazmozes ierosinātāja <i>M. bovis</i> specifiskais ģenētiskais materiāls - reālā laika PĶR - Clothier et al. 2010 ⁺	Nav konstatēts
	<i>Mycoplasma</i> spp. ģenētiskais materiāls - PĶR – komerciāls reaģentu komplekts ⁺	Nav konstatēts

11. att. Testēšanas pārskats