

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 2021

Galvenie izpildītāji:

Kaspars Kovaļenko

Margarita Terentjeva

Aija Mālniece

Aīda Vanaga

Agris Zirnītis

Kristīne Zemīte-Peškina

Andris Bāliņš

Dmitrijs Ponomorjovs

Studējošie:

Diāna Rātenberga (2 līmeņa profesionālā programma “Veterinārmedicīna”)

Lelde Tītmane (doktora programma “Veterinārmedicīna”)

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
1.5.1. <i>Mycoplasma bovis</i> infekcijas izplatība govju ganāmpulkos Latvijā.....	24
1.5.2. <i>Mycoplasma bovis</i> izplatība dzīvnieku novietnēs.....	25
Literatūras avoti	34

ANOTĀCIJA

***Mycoplasma bovis* autogēno vakcīnu pielietošanas iespējas antimikrobiālās rezistences mazināšanai piena lopkopībā Latvijā** (2020). Latvijas Lauksaimniecības universitāte. Jelgava, LLU. 35 lpp., 11. att. un 5 tabulas

Mikoplazmu sugas visā pasaulē izraisa būtiskus ekonomiskus zaudējumus govju un citu dzīvnieku saslīmšanas 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 complicēta, 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 pirmajā projekta realizācijas gadā 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 tika veikta desmit saimniecību apsekošana, anketēšana, paraugu ievākšana šajās saimniecībās un attiecīgi, paraugu bakterioloģiskā, seroloģiskā un molekulāri bioloģiskā izmeklēšana. Tika konstatēts, ka no izmeklētajiem 200 dzīvniekiem 15,4% bija mikoplazmu seropozitīvi, *M.bovis* PQR pozitīvi 10,4% nazālo paraugu un 16,9% faringeālo paraugu. Savukārt bakterioloģiski mikoplazmas izdevās izolēt vien 3% nazālo un 6% faringeālo paraugu. Papildus tika analizēti dati par dažādu riska faktoru ietekmi uz mikoplazmu sastopamību saimniecībā.

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 atlasīti 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 pievēršim 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 atlasīti 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 asociējamas 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. Paraugu iegūšanas metodika

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

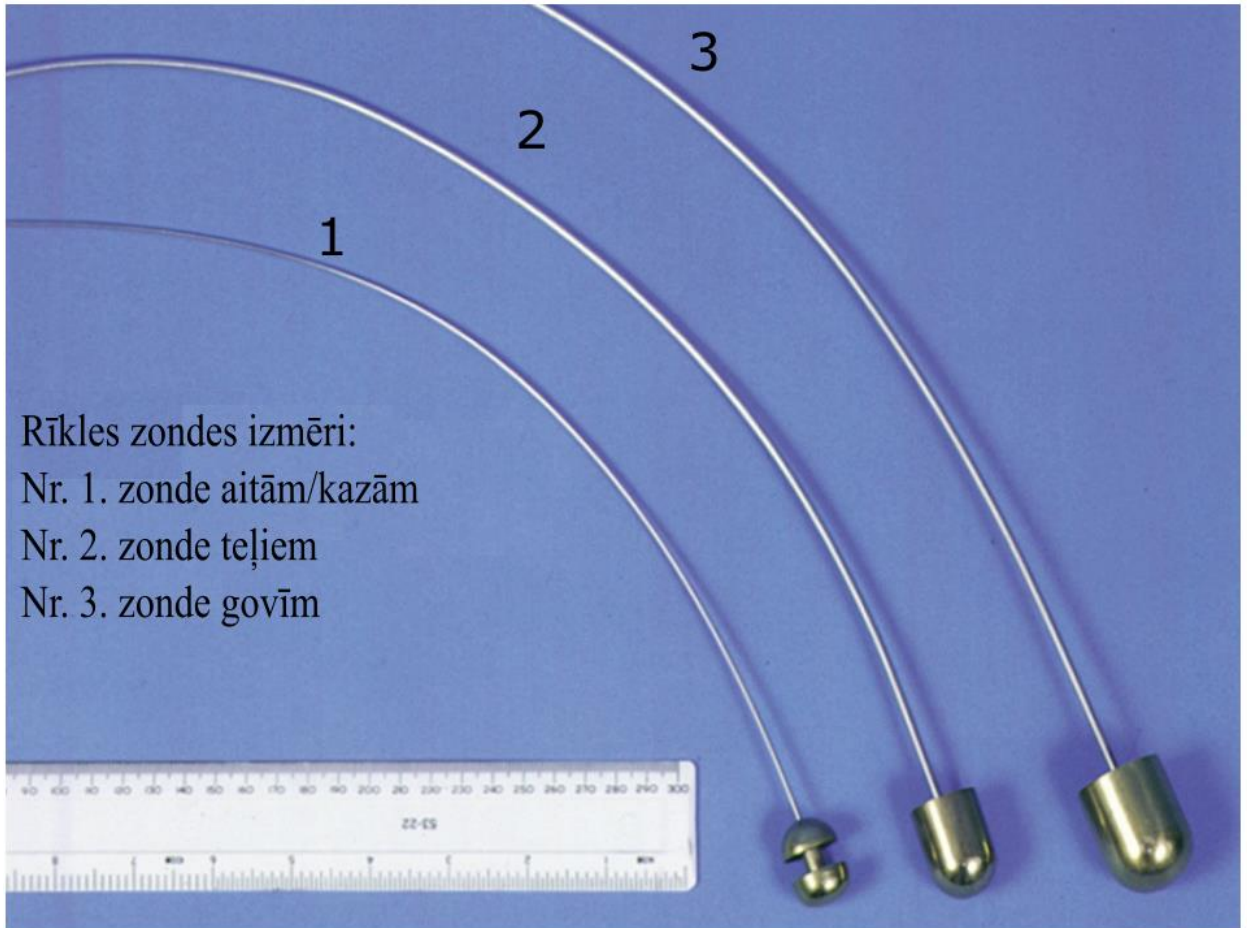
Faringeālo paraugu iegūšanu, izmantojot rīkles zondi, parasti pielieto mutes un nagu sērgas diagnostikā, kā vienu no uzticamākajām metodēm, jo rīkles ventrālā siena bagātīgi satur limfoīdos audus, un šeit ir novērojama vairāku infekcijas slimību ierosinātāju izteikta primārā replikācija. Faringeālie paraugi, kas iegūti ar rīkles zondi, var tikt efektīvi izmantoti arī *Mycoplasma bovis* un citu mikoplazmu noteikšanai, ņemot vērā mikoplazmu neizturību ārvidē 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 klīniskas un subklīniskas 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.

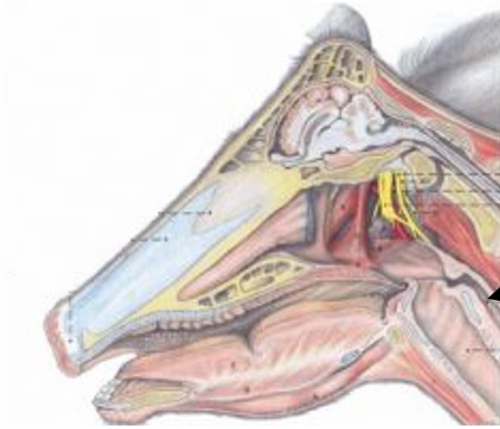
1.3.1.2.Faringeālo parauga iegūšanas tehnika:

- 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 ņemšanas

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

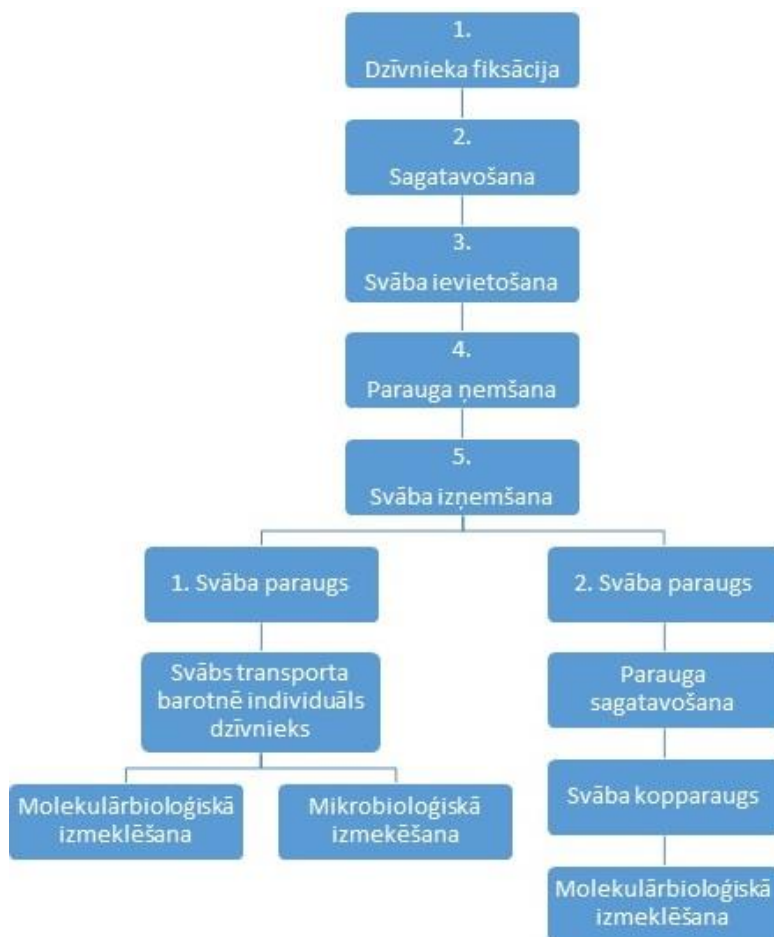
Paraugu ņem ar rotējošām kustībām, veicot noslaucījumu no gļotādām. Rotējošās kustības atkārto apmēram 30 sekundes.

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. Otrā svāba paraugu ievieto sterilā plastmasas stobriņā ar 0,9% NaCl, pirms tam ar sterilām grieznēm nogriežot svāba augšējo trešdaļu. Otrā svāba paraugs veidos kopparaugu, kuru izmeklēs molekulārbioloģiski (6. att.).



6. att. Svābu paraugu ņemšanas shēma

Abus paraugus pēc ņemšanas uzglabā +4° C temperatūrā līdz nogādāšanai laboratorijā.

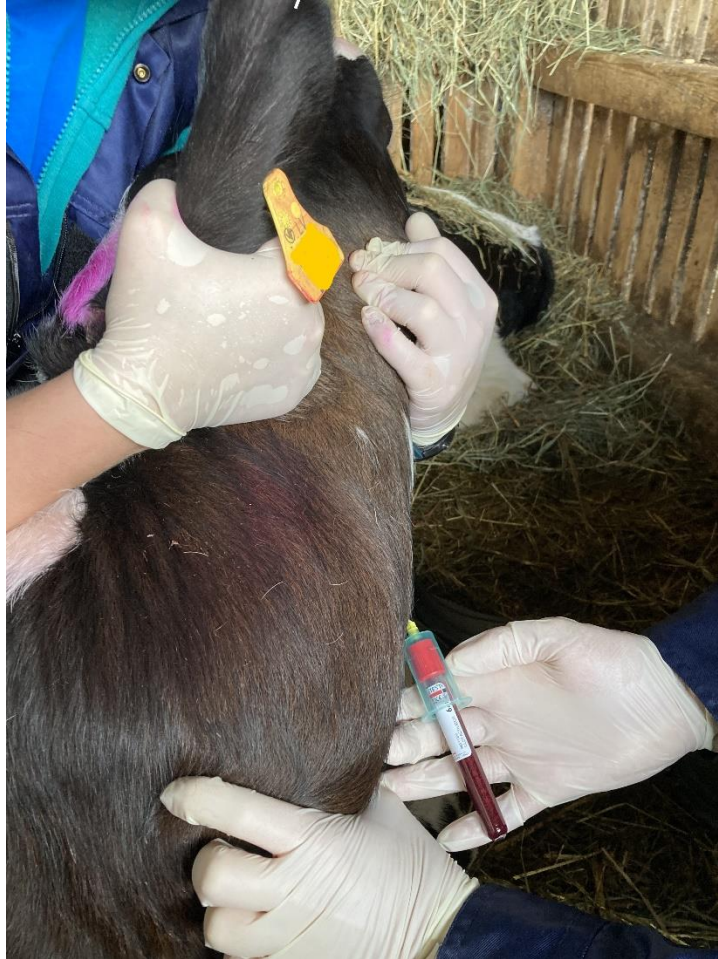
1.3.3. Asins paraugi

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.* radītājiem 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. Sedaīvie 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

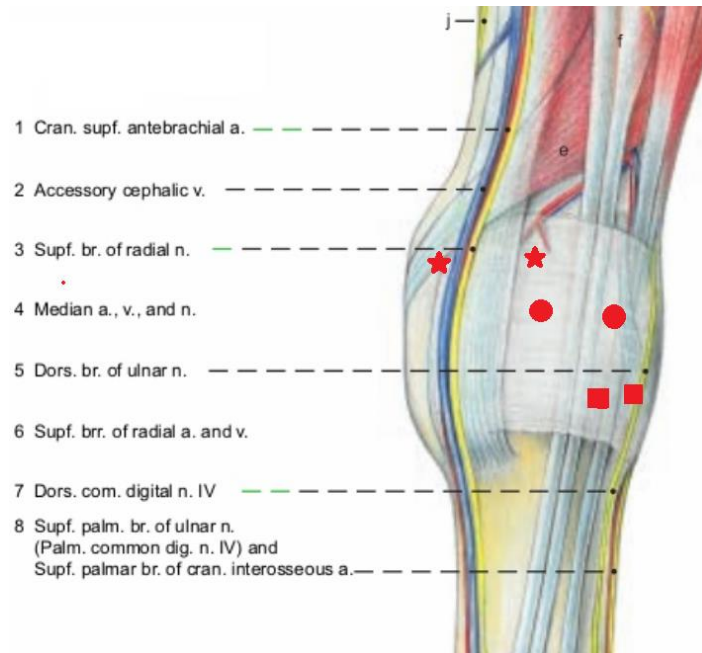
Svarīgi ievērot darba drošību un efektīvu dzīvnieka fiksāciju. Pieaugušos dzīvniekus var fiksēt fiksācijas stellēs ar iespēju fiksēt un pacelt priekškājas un pakājkājas. Pieaugušiem dzīvniekiem manipulāciju veicot stāvus pozīcijā, var pielietot vieglu sedāciju. Ja nav pieejamas fiksācijas stelles, dzīvnieku 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:

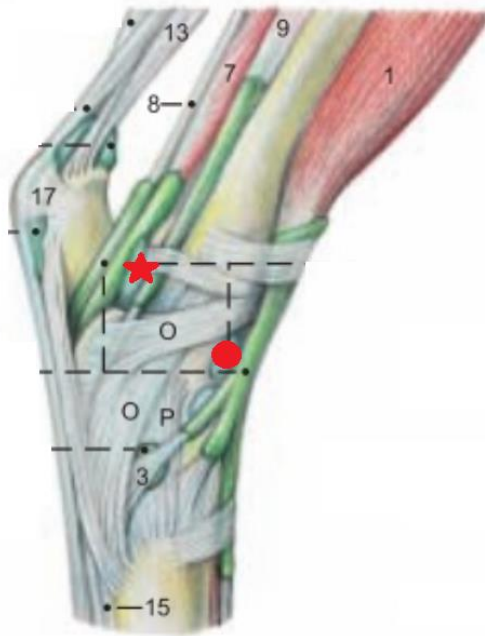
1. Noskuj apmatojumu plaša zonā skartās locītavas apvidū.
2. Veic ādas sagatavošanu izmantojot povidonjodu un spirta šķīdumu.
3. Tiek veikta subkutāna lokālas anestēzijas (2% lidokaīns) ievadīšana potenciālajās punkcijas vietās.
4. Atkārtoti veic ādas sagatavošanu izmantojot povidonjodu un spirta šķīdumu.
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. Arthrocentēzes 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 aizvietojošā 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 praimēru 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 dzēsēj molekulām 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 ierosinātos.

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.

1.5.1. *Mycoplasma bovis* infekcijas izplatība govju ganāmpulkos Latvijā

Projekta analizēta informācija no 10 ganāmpulkiem, kuri piekrituši piedalīties pētījumā. Izvēlētie ganāmpulki atradās 10 novados: Augšdaugavas, Dobeles, Grobiņas, Gulbenes, Krimuldas, Preiļu, Smiltenes, Tērvetes, Tukuma, Ventspils. Saimniecības veids bija industriāls (9/10) un bioloģiskais (1/10), visas saimniecības specializējās piena ražošanā. Vidējais produktīvo dzīvnieku skaits ganāmpulkos bija 534, bet jaundzīvnieku skaits bija 486. Produktīvo dzīvnieku turēšanas veids bija galvenokārt nepiesiets, bet jaundzīvnieki tika turēti individuāli būros vai aplokos. Pētījumā tika noņemti 200 asins paraugi, kuri tika izmeklēti ar ELISA metodi, nosakot antivielas pret *M. bovis* kā arī nazālie paraugi, faringeālie paraugi un piena paraugi, kuros tika noteikta dzīvotspējīgu mikoplazmu klātbūtne kā arī mikoplazmu DNS klātbūtne (dati apkopoti 1. tabulā)

Tabula 1.

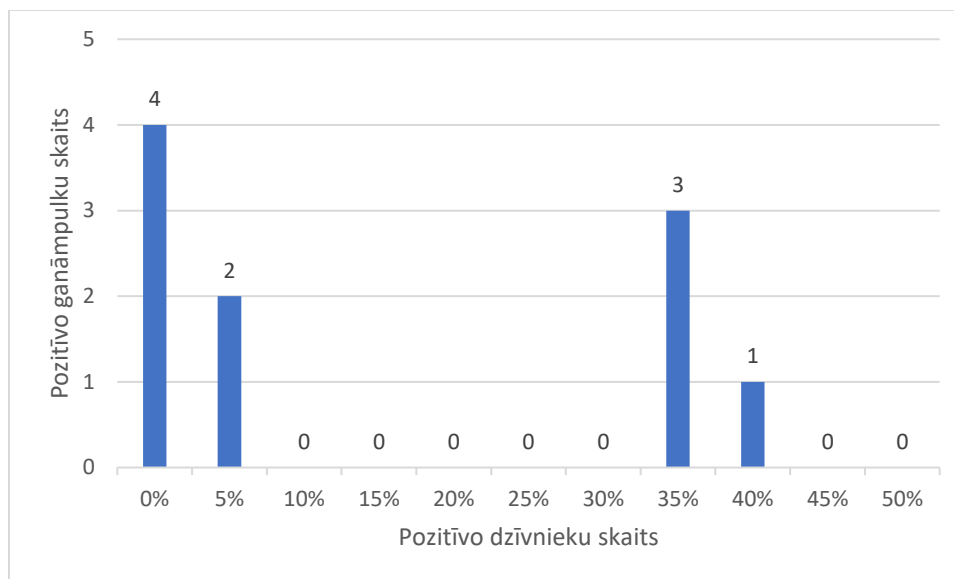
Mikoplazmu sastopamība saimniecībās

Saimniecība	Bakterioloģija Mycoplasmataceae		Seroloģija	qPĶR (nazālie)					qPĶR (faringeālie)					Piens bakterioloģija
	nazālie	faringeālie		<i>M. agalactiae</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. capricolum</i>	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. mycoides</i>	<i>M. agalactiae</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. capricolum</i>	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. mycoides</i>	
% Kopā	3	6	15,4	14,4	10,4	65,7	15,4	45,3	17,9	16,9	54,2	18,9	5,5	0
A	5	0	5	0	15	35	35	0	10	5	60	10	0	0
B	0	5	35	35	15	70	40	15	60	50	90	70	10	0
C	5	15	0	5	10	65	15	35	5	0	0	0	0	0
D	15	15	35	35	40	90	5	45	0	0	5	0	0	0
E	0	5	40	15	0	75	0	40	35	35	20	0	0	0
F	0	10	0	10	0	55	0	60	20	20	65	10	5	0
G	5	5	35	10	15	45	5	95	20	35	55	10	10	0
H	0	5	0	15	5	90	25	100	5	10	100	50	5	0

I	0	0	5	5	0	55	25	40	5	10	80	30	20	0
J	0	0	0	15	5	80	5	25	20	5	70	10	5	0

1.5.2. *Mycoplasma bovis* izplatība dzīvnieku novietnēs

Antivielas pret *Mycobacterium bovis* konstatētas 15,4% dzīvnieku (30/200) sešās novietnēs. Pozitīvi reaģējušo dzīvnieku skaits novietnē bijā no 5% līdz 40%. Tikai vienā no testētajiem ganāmpulkiem iepriekš tika veikta *Mycoplasma bovis* diagnostika, un ganāmpulks tika atzīst par pozitīvo, kas neatspirinājās mūsu pētījumā. Savukārt trijos ganāmpulkos iepriekš tika iegūti negatīvi rezultāti, un negatīvi rezultāti apstiprinājās divos ganāmpulkos, bet viens ganāmpulks tika atzīst par pozitīvu.



11. Att. Pētījumā konstatēto *Mycoplasma bovis* pozitīvo un negatīvo dzīvnieku ganāmpulku skaits

Ganāmpulka lielums tika atzīst, ka būtisks faktors tā inficēšanai ar *M. bovis*, kur lielāks infekcijas risks konstatēts ganāmpulkos no 200 dzīvniekiem. Mūsu pētījumā konstatētais vidējais produktīvo dzīvnieku skaits bija 338 negatīvajos ganāmpulkos, bet 666 pozitīvajos ganāmpulkos, kas parāda, ka dzīvnieku skaitam novietnē ir nozīme arī mūsu pētījumā (Hurai and Higuchi, 2019).

Analizējot dzīvnieku turēšanas veidu, konstatējām, ka tas ir līdzīgs pozitīvajos un negatīvajos ganāmpulkos.

Atšķirības tika konstatētas ganāmpulka struktūrā, un 67% pozitīvo ganāmpulku īpašnieku iegādājās dzīvniekus, kamēr *Mycoplasma*-negatīvajos ganāmpulkos šis rādītājs bija 50%. Pozitīvajos ganāmpulkos tika atjaunoti līdz 20%, bet negatīvajos līdz 25% dzīvnieku. Uzskatīts, ka asimptomātisko dzīvnieku iegāde ir galvenais faktors *Mycoplasma* infekcijas izplatībā. Pēc noklušanas ganāmpulkā ierosinātājs ātri izplatās uz neinficētiem dzīvniekiem (Wilson et al., 2007).

Starp *Mycoplasma*- pozitīvajām un negatīvajām novietnēm nebija konstatētas atšķirības novietņu tīrīšanā un jaundzīvnieku guļvietu pakaišu izmantošanā: novietņu tīrīšana tika veikta mehāniski (87%) un mehāniski un ar rokām pozitīvajās un negatīvajās saimniecībās, atbilstīgi.

Salmu kā pakaišu materiāla izmantošana bija izplatītāka pozitīvajos ganāmpulkos salīdzinājumā ar negatīvajiem. Lielākās iespējas *M. bovis* izdzīvošanai ir mitra, auksta vidē, dīķos un netīros aplokos piena govju fermās, ierosinātājs var mēnešiem izdzīvot smilšu pakaišos (Justice-Allen et al., 2010). Matračī (50%) biežāk tika izmatoti negatīvajās novietnēs salīdzinājumā ar pozitīvajām novietnēm (17%).

Ventilācijai ir svarīga loma *Mycoplasma* spp. infekcijas mazināšanai, jo uzskatīts, ka ierosinātājs tiek izplatīts, ne tikai ar kontaminētiem apkārtējās vides objektiem, bet arī ar gaisu. Jumta ventilācijas sistēma tika ierīkota 33% pozitīvajās novietnēs un 50% negatīvajās novietnēs, bet otrā biežāk ierīkota ventilācijas sistēma pozitīvajās novietnēs bija jumta/vaļējo sienu (33%), bet negatīvajās - gaisa pievades, izvades sistēma (17%) un jumta/vaļējo sienu kombinācija (17%). *M. bovis* ir lokalizējas uz gļotādām, tāpēc ieelpojot, dzīvnieki var tikt kolonizēti ar ierosinātāju. Aerosola nozīme *M. bovis* infekcijas izplatībā pierādīta slimo teļu, ko var mazināt ar efektīvu ventilācijas sistēmu.

Piena ganāmpulkos *M. bovis* tradicionāli uzskatīts par kontagiozā mastīta ierosinātāju, kas tiek izplatīts slaucot dzīvniekus, kā arī kontakta rezultātā no apkārtējās vides. Tāpēc slaukšanas tehnoloģija var ietekmēt *M. bovis* izplatību ganāmpulkā. Negatīvajos ganāmpulkos dominēja slaukšana slaukšanas zālē (50%), tikmēr negatīvajos ganāmpulkos lielāks akcents tika likts robotizēto slaukšanu. Transmisijas no tesmeņa uz tesmeni ir prioritāte inficētajos ganāmpulkos, arī slaukšanas reizēs jābūt atdalīties inficētajiem un neinficētajiem dzīvniekiem, kas, visticamāk, viegli izpildāms neinficētajos ganāmpulkos.

Tabula 2.

Dzīvnieku turēšanas apstākļu analīze pētījuma novietnēs

Rādītājs	Ganāmpulks ar apstiprinātu <i>Mycoplasma</i> infekciju (n=6)	<i>Mycoplasma</i> spp. negatīvs ganāmpulks n=4
	Ganāmpulku skaits (%)	
Produktīvie dzīvnieki, turēšanas veids		
- nepiesiets	5 (83)	4 (100)
- piesiets, nepiesiets	1 (10%)	0 (0)
Jaundzīvnieki, turēšanas veids		
- aploki	2 (33)	1 (25)
- individuālie būri	2 (33)	1 (25)
- Individuālie būri, aploki	2 (33)	2 (50)
Ganāmpulka struktūra		

- iepirktie	4 (66)	2 (50)
- saimniecības	2 (33)	2 (50)
Novietnes tīrīšana		
- mehāniski	5 (83)	3 (75)
- mehāniski, ar rokām	1 (17)	1 (25)
Jaundzīvnieki, guļvietu pakaiši		
- salmi	6 (100)	4 (100)
Produktīvie dzīvnieki, guļvietu pakaiši		
- matračī	1 (17)	1 (25)
- salmi	4 (66)	1 (25)
- salmi, kūdra	1 (17)	-
- salmi, matracis	-	1 (25)
- skaidas	-	1 (25)
Kūtsmēslu glabāšana		
- speciālā mēslu krātuve	5 (83)	4 (100)
- biogāze	1 (17%)	-
Ventilācijas sistēma		
- jumta	2 (33)	2 (50)
- gaisa pievades, izvades sistēma	1 (17)	1 (25)
- jumta, vaļējās sienas	2 (33)	1 (25)
- izvades, vaļējās sienas	1 (17)	-
Slaukšanas veids		
- robots	3 (49)	1 (25)
- Karuselis	2 (33)	1 (25)
- Slaukšanas zāle	1 (17)	2 (50)

Turēšanas sistēmu ietekme uz *M. bovis* ganāmpulku statusu joprojām ir debatējams jautājums, tā piemērām, ganāmpulka vidējā izslaukuma un lieluma rādītāji var vairāk liecināt, ka noteiktā lieluma fermas spēj labāk pārvaldīt infekcijas slimību izplatību starp dzīvniekiem.

Biodrošībai un slaukšanas higiēnai ir būtiska nozīme *M. bovis* izplatības kontrolē. *M. bovis* ir klātesošs uz gļotādām, un transmisija notiek ar respiratorā trakta izdalījumiem, aerosola tipa izplatību vai tiešā kontakta rezultātā. Netieši infekciju var izplatīt dzīvnieki, kontaminējot apkārtējo vidi, jo ierosinātājs var izdzīvot barībā, ūdenī, saglabāties uz apkārtējās vides objektiem. Kūts objektu piesārņojums ir nozīmīgs *M. bovis* faktors mastītu izraisīšanā (Maunsell et al., 2011).

Mycoplasma spp. ir saimnieku specifiski mikroorganismi, un parasti katrai dzīvnieku sugas saslimšanu izraisa tikai tai raksturīgs ierosinātājs. Konstatēts, ka dažas *Mycoplasma* sugas var tikt izdalītas no citām dzīvnieku sugas nekā tās, kurām *Mycoplasma* spp. ir pielāgojušas. Piemēram, Ongor et al., 2008 pētījumā *M. bovis* tika izdalīta no cāļiem, tāpēc nevar pilnībā izslēgt citu dzīvnieku sugu lomu *M. bovis* transmisijā. Analizējot citu dzīvnieku sugu piekļuvi govju ganāmpulkiem, konstatējām, ka pozitīvajos (49%) un negatīvajos (50%) ganāmpulkos biežākais,

ar ko produktīvie dzīvnieki kontaktējās, bija putni, peles, žurkas. Ziņots arī par citu dzīvnieku nokļūšanas iespēju ganāmpulkā – savvaļas dzīvnieku, lapsu, stirnu – kas bija raksturīgs pozitīvajos un negatīvajos ganāmpulkos.

Slaukšana ir nozīmīgs posms *M. bovis* izplatīšanā, jo ierosinātājs var nokļūt uz govju gļotādām, kolonizēt tās, izraisot mastītus un, iespējami, izdaloties apkārtējā vidē. Analizējot tesmeņu slaukšanas higiēnu pozitīvajās un negatīvajās novietnēs, konstatēts, ka pirmslaukšanas un pēcslaukšanas pupu higiēnai pievērsta būtiska uzmanība pozitīvajās (66% un 100%) un negatīvajās (50% un 75%), attiecīgi. Lielākās atšķirības tika konstatētas starpslaukšanas pupu higiēnā un pēcslaukšanas sistēmas dezinfekcijas veikšanā. Tas liecina, ka atsevišķās pozitīvajās vai negatīvajās saimniecībās slaukšanas higiēnai netiek pievērsta pietiekama uzmanība, piem., starpslaukšanas higiēnas veikšanu un pēcmazgāšanas sistēmas dezinfekcijas izmantošanu norādījuši tikai 33% un 25%, kā arī 66% un 75% pozitīvo un negatīvo ganāmpulku pārstāvju, attiecīgi. Korekta slaukšanas higiēna, ievērot visus pētījumā apskatītos etapus svarīga, lai novērsta ierosinātāju transmisiju. Ņemot vērā, ka eksperimentāli pierādīta *M. bovis* spēja veidot bioplēves, pēcslaukšanas sistēmas mazgāšana ir svarīgs pasākums, lai novērstu ierosinātāja izplatību (McAuliff et al., 2006, Aebi et al., 2015).

Atšķirības konstatētas ārstēto dzīvnieku pienā iznīcināšanā, jo negatīvās saimniecības pienu iznīcināja (100%), kamēr pozitīvās saimniecības t.sk. novirzīja biogāzei un izbaroja bulļiem.

Tabula 3.

Bidrošības un slaukšanas higiēnas faktoru analīze

Rādītājs	Ganāmpulks ar apstiprinātu <i>Mycoplasma</i> infekciju (n=6)	<i>Mycoplasma</i> spp. negatīvs ganāmpulks n=4
Ganāmpulku skaits (%)		
Deratizācija		
- tiek veikts	4 (66)	2 (50)
- netiek veikta	2 (33)	2 (50)
Iespēja kontaktēties ar citiem dzīvniekiem		
- kaķi	5 (83)	2 (50)
- kaķi, suņi	1 (17)	2 (50)
Iespēja kontaktēties ar savvaļas dzīvniekiem		
- putni, peles, žurkas	3 (49)	2 (50)
- savvaļas dzīvnieki, putni, peles, žurkas	1 (17)	1 (25)
- lapsas, putni, peles, žurkas	-	1 (25)
- putni	1 (17)	-
- stirnas	1 (17)	-

Pirmslaukšanas pupu dezinfekcija		
- ir	4 (66)	2 (50)
- nav	1 (17)	1 (25)
- nav norādīts	1 (17)	1 (25)
Pēcslaukšanas pupu dezinfekcija		
- ir	6 (100)	3 (75)
- nav norādīts	0 (0)	1 (25)
Starpslaukšanas pupu dezinfekcija		
- ir	2 (33)	1 (25)
- nav	4 (67)	1 (25)
- nav norādīts	-	2 (50)
Sistēmas pēcslaukšanas dezinfekcija		
- ir	4 (66)	3 (75)
- nav	1 (17)	-
- nav norādīts	1 (17)	1 (25)
Ārstēto dzīvnieku piens		
- utilizēts	3 (49)	4 (100)
- biogāze	1 (17)	-
- bulļiem	1 (17)	-
- nav norādīts	1 (17)	-

Mycoplasma bovis infekcijai piemīt dažādas izpausmes, un tā raksturojas ar mastītiem, pneimonijām un artrītiem, tāpēc pētījumā tika iekļauti veselības dati par dzīvniekiem, uzmanību pievēršot mastītu, artrītu un/vai bursītu, kā arī elpošanas sistēmas slimību pazīmēm (Maunsell et al., 2011, Nicholas et al., 2002). *M. bovis* izraisītās infekcijas ietver mastītus, respiratorās slimības un artrītus, taču slimības smagums var būt dažāds. *M. bovis* var tikt izolēts no ar mastītu slima govs piena dziedzeriem un no locītavām, stiegrām un periartikulārajiem audiem no teļiem, kas uzrāda artrīta, tenosinovīta, hroniskas pneimonijas vai poliartīta sindromu (Maunsell et al., 2011, Nicolas et al.).

Slimo dzīvnieku piena izbarošana bija saistīta ar mikoplazmu izraisīto infekciju parādīšanos teļos (Butler et al., 2000).

Pētījumā konstatēts, ka 83% un 75% *M. bovis* pozitīvo un negatīvo ganāmpulku attiecīgi veikuši infekcijas slimību diagnostiku pēdējos 5 gados. Pozitīvās saimniecības galvenokārt veica izmeklēšanu infekciju slimību un mastītu izraisītāju testēšanai (83%), kamēr negatīvās saimniecības veica arī neprecizētu saslimšanu diagnostiku (50%). Diagnostikas veikšanas iemesli bija līdzīgi pozitīvajās un negatīvajās novietnēs, kur svarīga loma bija veterinārārsta ieteikumiem – 66% un 50% attiecīgi.

Mastītus pieaugušajiem dzīvniekiem un jaundzīvnieku respiratorās saslimšanas novēroja visās izmeklētajās novietnēs, šīs saslimšanas ir arī biežākas *M. bovis* infekcijas izpausmes (Aebi et al., 2015). Atšķirības konstatētas respiratoro slimību izplatībā produktīviem dzīvniekiem, jo tās novēroja 83% un 25% novietņu ar aptirpināto un neapstiprināto mikoplazmu infekciju. Artrītu un bursītu izplatība bija atšķirīga novietnēs ar apstiprinātu un neapstiprinātu infekciju. Artrītus un bursītus konstatēja 33% jaundzīvniekiem pozitīvajās novietnēs, kamēr jaundzīvniekiem negatīvajās novietnēs šie simptomi netika konstatēti. Artrīti un bursīti konstatēti produktīviem dzīvniekiem visās pozitīvajās novietnēs, kamēr negatīvajās novietnēs šī problēma netika konstatēta. Artrīti un bursīti ir salīdzinoši reti reģistrētas mikoplazmu infekcijas klīniskās izpausmes, kas var norādīt uz dažādu mikoplazmu infekciju gaitu un smagumu iesaistītajos ganāmpulkos (Aebi et al., 2015).

Rīcībā infekciju slimību konstatēšanas rezultātā bija līdzīga pozitīvajās un negatīvajās novietnēs, kad 67% un 50% ganāmpulkos dzīvnieki tika izolēti.

Tabula 4.

Dzīvnieku veselības stāvokļa analīze

Rādītājs	Ganāmpulks ar apstiprinātu <i>Mycoplasma</i> infekciju (n=6)	<i>Mycoplasma</i> spp. negatīvs ganāmpulks n=4
	Ganāmpulku skaits (%)	
Infekciju slimību laboratoriskie izmeklējumi pēdējos 5 gados		
- tiek veikts	5 (83)	3 (75)
- netiek veikta	1 (17)	1 (25)
Indikācijas laboratorisko izmeklējumu veikšanai		
- infekcijas slimības, mastīti	5 (83)	2 (50)
- infekcijas slimības, mastīti, neprecizētas saslimšanas	1 (17)	2 (50)
Diagnostiku veic, jo:		
- ieteica veterinārārsts	4 (66)	2 (50)
- pašu iniciatīva	1 (17)	1 (25)
- nav	1 (17)	1 (25)
Vai novēro mastītus:		
- novēro	6 (100)	4 (100)
- nenovēro	0 (0)	0 (0)
Vai veic mastītu laboratorisko diagnostiku?		
- veic	4 (66)	4 (100)
- neveic	2 (34)	-

Vai novēro jaundzīvniekiem respiratorās saslimšanas?		
- novēro	6 (100)	4 (100)
- nenovēro	-	-
Vai novēro produktīvo dzīvnieku respiratorās saslimšanas?		
- novēro	5 (83)	1 (25)
- nenovēro	1 (17)	2 (50)
- nav informācijas	-	1 (25)
Vai novēro artrītus, bursītus jaundzīvniekiem?		
- novēro	2 (33)	-
- nenovēro	4 (67)	2 (50)
- nav informācijas	-	2 (50)
Vai novēro artrītus, bursītus produktīvajiem dzīvniekiem?		
- novēro	6 (100)	-
- nenovēro	-	2 (50)
- nav informācijas	-	2 (50)
Rīcība, ja konstatē infekcijas slimības.		
- izolē	4 (67)	2 (50)
- atstāj grupā	2 (33)	-
- nav informācijas	-	2 (50)

Analizējot ganāmpulka epidemioloģisko situāciju, iepriekš konstatētās saslimšanas un veiktos izmeklējumus, novērots, ka *Mycoplasma* spp. diagnostiku veica 33% pozitīvo un 67% negatīvo ganāmpulku. Negatīvajos ganāmpulkos biežāk veica arī Q drudža diagnostiku (75%) salīdzinājumā ar pozitīvajiem ganāmpulkiem (25%). Netika konstatētas atšķirības Šmalenberga vīrusa diagnostikā starp pozitīvajiem un negatīvajiem ganāmpulkiem, kur 50% ganāmpulkos šī diagnostika tika nodrošināta. Ievērojamas atšķirības tika konstatētas attiecībā uz citām infekciju slimībām, kuru diagnostiku veic, kā arī izdalīto ierosinātāju daudzveidībā mastītu, respiratoro saslimšanu gadījumā.

Iepriekš konstatēta sakarība starp *M. bovis* un citu ierosinātāju izraisītajām infekcijām: Kanādā ziņots par sakarību starp govju virusālo diareju un *M. bovis* infekciju (Shahriar et al., 2002). Biežāk ziņots par asociācijām starp baktēriju izraisītajām infekcijām un *M. bovis* pneimoniju, piemēram, *M. bovis* tika izolēts no 82% no teļu plaušām ar *Manheimia haemolytica* izraisīto fibrinosupurātīvo pneimonija. Konstatēta arī sakarība ar *Pasteurella multocida* infekciju teļos (Stipkovits et a., 2000).

Pozitīvajos ganāmpulkos biežāk tiek veikta ierosinātāju diagnostika, kā arī tika konstatēti ierosinātāji, ar kuriem citos pētījumos tika asociēta *M. bovis* infekcija. Ziņots kā slimības, citas kā *M. bovis*, biežāk reģistrētas saimniecības ar apstiprinātu *M. bovis* infekciju (Haapala et al., 2021).

Tabula 5.

Informācija par epidemioloģisko situāciju ganāmpulkā un konstatētājām saslimšanām

Rādītājs	Ganāmpulks ar apstiprinātu <i>Mycoplasma</i> infekciju (n=6)	<i>Mycoplasma</i> spp. negatīvs ganāmpulks n=4
	Ganāmpulku skaits (%)	
Vai iepriekš tika veikta <i>Mycoplasma</i> ierosinātāja diagnostika?		
- veikta	2 (33)	2 (50)
- netika veikts	4 (67)	2 (50)
Vai iepriekš veikta Q drudža ierosinātāja diagnostika?		
- veikta	2 (33)	3 (75)
- nav veikta	4 (66)	1 (25)
Vai iepriekš tika veikta Šmalenberga vīrusa diagnostika?		
- veikta	3 (50)	2 (50)
- nav veikta	3 (50)	2 (50)
Citas infekcijas, kurām veic diagnostiku	Paragripa 3, govju virusālā diareja, govju respiratorais sincitiālais vīruss, govju koronovīrusālā infekcija, rota vīruss, koronavīruss, <i>Pasteurella</i> , <i>Manheimia hemolytica</i> , <i>Cryptosporidium</i> , govju infekciozais rihotraheīts	Govju koronovīrusālā infekcija, paragripa, govju vīrusālā diareja
Konstatētie mastīta ierosinātāji	<i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus disgalactiae</i> , <i>Streptococcus uberis</i> , miktiskie mastīti, <i>Trueperella pyogenes</i> , vides mastītu ierosinātāji	<i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Mycoplasma</i>
Jaudzīvnieku respiratoro infekciju izraisītāji	<i>Pasteurella multocida</i> , <i>Manheimia hemolytica</i> , <i>Mycoplasma</i> spp., govju respiratori sinticiālais vīruss, govju infekciozais rinotraheīts	Nav vai neveic, jo nenovēro saslimšanas
Produktīvo dzīvnieku respiratoro infekciju izraisītāji	<i>Mycoplasma</i> spp., <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Manheimia haemolytica</i>	Nav vai neveic, jo nenovēro saslimšanas

Asimptomātisko nēsātāju identificēšana ir grūts uzdevums, jo prasa sistemātisku pieeju un laboratoriskos izmeklējumu veikšanu. Taču asimptomātisko nēsātāju identificēšana nepieciešama, lai novērstu slimības izplatību, jo *M. bovis* strauji izplatās ganāmpulkā (Maunsell et al., 2011). Pieaugušo dzīvnieku kolonizācija konstatēta arī klīniski veselos dzīvniekos ar horizontālu transmisiju no dzīvniekiem - nēsātājiem uz blakusstāvošiem dzīvniekiem (Aebi et al., 2015). Jaunie dzīvnieki var inficēties no pieaugušajiem, uzturot infekciju ganāmpulkā (Timsit et al., 2012).

Antivielu noteikšana uzskatīta par vienu no metodēm, kā identificēt *M. bovis* infekciju ganāmpulkā, un tā tiek uzskatīta par daļu no ganāmpulka biodrošības programmas, jo *M. bovis* specifiskās antivielas tiek noteiktas jau 6-10 dienas pēc eksperimentālas inficēšanās (O'Farrell et al., 2001), bet pietiekami bieži mikoplazmu specifiskās antivielas netiek producētas ilgstoši, kas apgrūtina seroloģisko datu interpretāciju.

Ganāmpulku līmenī, seropozitīvo dzīvnieku atklāšana norāda uz to, ka palielinās multifaktoriālo govju respiratoru slimības risks un tam sekojošu dzīvnieku ārstēšanu (Martin et al., 1990). Šajos ganāmpulkos ieteicams strādāt pie *Mycoplasma* spp. izplatības novēršanas programmas izstrādes.

Tālāka izolātu izmeklēšana un genotipisko un antigēno īpašību noteikšana notiks pētījuma trešajā posmā.

Literatūras avoti

- Aebi M., van den Borne B.H.P., Raemy A., Steiner A., Pilo P., Bodmer M. 2015. *Mycoplasma bovis* infections in Swiss dairy cattle: A clinical investigation. *Acta Vet Scand*, 57, 10.
- Butler J.A., Sickles S.A., Johanns C.J., Rosenbusch R.F. 2000. Pasteurization of discard mycoplasma mastitic milk used to feed calves: Thermal effects on various mycoplasma. *J Dairy Sci*, 83, 2285–2288.
- Justice-Allen A, Trujillo J, Corbett R, *Harding R., Goodell G., Wilson D.* 2010. Survival and replication of *Mycoplasma* species in recycled bedding sand and association with mastitis on dairy farms in Utah. *J Dairy Sci*, 93, 192–202.
- Haapala V., Vahanikkila N., Kulkas L., Tuunainen E., Pohjanvirta T., Autio T., Pelkonen S., Soveri T., Simojoki H. 2021. *Mycoplasma bovis* infection in dairy herds – Risk factors and effect of control measures. *J Dairy Sci*, 104, 2254-2265.
- Maunsell F.P., Woolums A.R., Francoz D., Rosenbusch R.F., Step D.L., Wilson D.J., Janzen E.D. 2011. *Mycoplasma bovis* infections in cattle. *J Vet Int Med*, 25(4), 772-783.
- McAuliffe L., Ellis R.J., Miles K., Ayling R.D., Nicholas R.A.J. 2006. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology*, 152, 913-922.
- Murai K., Higuchi H. 2019. Prevalence and risk factors of *Mycoplasma bovis* infection in dairy farms in northern Japan. *Res. Vet. Sci*, 123:29–31.
- Nicholas R.A., Ayling R.D., Stipkovits L.P. 2002. An experimental vaccine for calf pneumonia caused by *Mycoplasma bovis*: Clinical, cultural, serological and pathological findings. *Vaccine*, 20, 3569–3575.
- O'Farrell K., Dillon P., Mee J., *Crosse S., Nolan M., Byrne N., Reidy M., Flynn F., Condon T.* 2001. Strategy for restocking of Moorepark after depopulation following bovine spongiform encephalopathy. *Ir Vet J*, 54(2), 70–75.
- Ongor H., Kalin R., Karahan M., Cetinkaya B., McAuliffe L., Nicholas R.A.J. 2008. Isolation of *Mycoplasma bovis* from broiler chickens in Turkey. *Avian Pathology*, 37, 587-588.
- Stipkovits L., Ripley P., Varga J., Palfi V. 2000. Clinical study of the disease of calves associated with *Mycoplasma bovis* infection. *Acta Vet Hung*, 48, 387–395.
- Thomas A., Ball H., Dizier I., *Trolin A., Bell C., Mainil J., Linden A.* 2002. Isolation of mycoplasma species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium. *Vet Rec*, 151, 472–476.

Timsit E., Arcangioli M., Bareille N., Seegers H., Assie S. 2012. Transmission dynamics of *Mycoplasma bovis* in newly received beef bulls at fattening operations. J Vet Diagn Investig, 24, 1172-1176.

Wilson D.J., Skirpstunas R.T., Trujillo J.D., Cavender K.B., Bagley C.V., Harding R.L. 2007. Unusual history and initial clinical signs of *Mycoplasma bovis* mastitis and arthritis in first-lactation cows in a closed commercial dairy herd. J Am Vet Med Assoc, 230, 1519–1523.