

MIKOPLAZMŲ IŠ GALVIJŲ NOSIES ERTMĖS IŠSKYRIMAS

Aušra Gabinaitienė, Jūratė Šiugždaitė

Užkrečiamųjų ligų katedra, Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas
 el. paštas: gabinaitiene@lva.lt

Užkrečiamųjų ligų katedra, Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas
 tel. (8~37) 36 23 92; el. paštas: jurate.saugzdaite@lva.lt

Santrauka. Bandymo metu ištyrėme pieninio, mėsinio ir mišraus (pieninio ir mėsinio) tipo galvijus mikoplazmų atžvilgiu, nustatėme jų nešiojimus ir identifikavome mikoplazmas iki rūšies. Dėl mikroorganizmų sukeltų infekcijų, ypač *Mycoplasma bovis*, daugelyje Europos valstybių galvijininkystės pramonėje, penimų ir pieninio tipo galvijų ūkiuose patiriami dideli ekonominiai nuostoliai. Mikoplazmos į bandas, kur galvijai dar nesirgo mikoplazmozėmis, dažniausiai patenka įsigyjant naujus sveikus veršelius – mikoplazmų nešiojimus, kurie mėnesius ar net išties metus mikoplazmas į aplinką išskiria su nosies išskyromis.

Mėginius (105), paimtus iš sveikų pieninio, mėsinio ir mišraus tipo galvijų nosies ertmės, tyrėme kai šie buvo 110, 310 ir 510 amžiaus dienų. Nustatėme, kad 27,61 proc. galvijų yra mikoplazmų nešiojimai. Trys jų rūšys identifiukuotos pagal biochemines ir antigenines savybes – *Mycoplasma bovis* (54,1 proc.), *Mycoplasma dispar* (37,8 proc.) ir *Mycoplasma bovirhinis* (8,1 proc.). Apdoroję gautus duomenis MINITAB 14.20 programa, nustatėme, kad tarp mėsinio tipo galvijų veislės *Mycoplasma bovis* dažniau išskirta iš 110 ir 310 amžiaus dienų ($p < 0,05$), o *Mycoplasma dispar* – iš 110 dienų amžiaus galvijų ($p < 0,05$). Tarp mėsinio tipo galvijų *Mycoplasma bovis* daugiausiai išskirta iš 110 dienų galvijų ($p < 0,05$).

Raktažodžiai: galvijai, nosies ertmė, mikoplazmos, nešiojimai.

ISOLATION OF MYCOPLASMA FROM THE NASAL CAVITY OF CATTLE

Aušra Gabinaitienė, Jūratė Šiugždaitė

Department of Infectious Diseases, Lithuanian Veterinary Academy, Tilžės str. 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania
 Phone: +370 37362392; e-mail: gabinaitiene@lva.lt; jurate.saugzdaite@lva.lt

Summary. The aim of performed research was to determinate the prevalence of genus *Mycoplasma* in healthy cattle of dairy, beef and dairy–beef breeds and identify *Mycoplasma* species. In European dairy and beef cattle industry mycoplasma infections, especially *Mycoplasma bovis*, is one of the leading causes of economic losses. The infection can be introduced into *M. bovis*-free herds by clinically healthy calves or young cattle – mycoplasma carriers. They shed mycoplasma through their nasal discharge for months or years.

One hundred and five nasal swabs of 110, 310 and 510 days old healthy cattle of dairy, beef and dairy–beef breeds were examined. The study showed that 27.61 % of animals are mycoplasma carriers. Using biochemical and antigenic characterization of mycoplasma three species were identified: *Mycoplasma bovis* (54.1 %), *Mycoplasma dispar* (37.8 %) and *Mycoplasma bovirhinis* (8.1 %). According to MINITAB 14.20 program, *M. bovis* was isolated mostly from cattle of dairy–beef breed at 110 and 310 days of age ($p < 0.05$). *Mycoplasma dispar* was isolated mostly from the same breed at the age of 110 days ($p < 0.05$). From the animals of beef breed *Mycoplasma bovis* was isolated mostly at the age of 110 days.

Keywords: cattle, nasal cavity, mycoplasma, carriers.

Įvadas. Dėl galvijų respiratorinės ligos daugelyje Europos valstybių patiriami ekonominiai nuostoliai, kurių žala – 576 milijonai eurų (Nicholas, Ayling, 2003; Nicholas et al., 2000). Tarp respiratorinių susirgimų galvijininkystėje išskirtinis vaidmuo tenka veršelių pneumonijai (Hirose et al., 2003). Didžiojoje Britanijoje kasmet nuo šios ligos gaišta apie 157 tūkst. veršelių, nuostoliai sudaro apie 99 milijonus svarų sterlingų (Nicholas, 2004).

Mikoplazmos kaip normali organizmo mikroflora lokalizuojasi žmonių ir gyvūnų viršutinių kvėpavimo takų, lyties ir šlapimo organų gleivinėse. Atrajotojams patogeninės mikoplazmų rūšys pažeidžia pieno liauką, kvėpavimo ir lyties organus, sąnarius, konjunktyvą (Tenk, 2005).

Mikoplazmos yra panašios į gramteigiamas bakterijas, tačiau priskiriamos atskirai – *Mollicutes* klasei (Elli, 2001; Nicholas, 2004). Tai mažiausia galinti replikuotis

gyvybės forma. Viena iš savybių, kuri skiria mikoplazmas nuo kitų bakterijų, – ląstelė neturi sienelės. Dėl to mikoplazmos yra atsparios beta laktaminiams antibiotikams (Poumarat et al., 1996). Mažas genomo dydis nulemia mikoplazmų rūšims būdingą specifiskumą pasirenkant šeimininkus ar mitybines terpes, būtinas gyvybinei veiklai palaikyti (Nicholas, Ayling, 2003). Mikoplazmoms identifiukuoti taikomos įvairios fluorescuojančių antikūnų modifikacijos, polimerazės grandininė reakcija, atsitiktinės amplifiukuotos polimorfinės DNR metodas, DNR molekulinė hibridizacija, molekuliniai zondai (Bashiruddin et al., 2005; Konigsson et al., 2002; Šiugždaitė, Kevišas, 2001; Šiugždaitė, Žilinskas, 2003).

Europos šalyse labiausiai paplitusi patogeninė mikoplazmų *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) rūšis (Nicholas, Ayling, 2003; Nicholas, 2004). Ji karvėms sukelia pieno

liaukos uždegimą, pažeidžia lytinius organus, sukelia endometritą, salpingitą, abortą, buliams dažniausiai sukelia orchitą, epididimitą (Byrne et al., 1999; Ruhnke, 1994; Stipkovits, 2000). Penimiems mėšiniams galvijams *Mycoplasma bovis* sukelia plaučių uždegimą, poliartritą, sinovitą, veršeliams – plaučių uždegimą (Pfützner, Sachse, 1996; Ter Laak et al., 1992). Pastebėta, kad veršeliai mikoplazmine pneumonija susergerdami mikoplazminį mastitinį karvių pieną (Gonzalez et al., 1992).

Airijoje *Mycoplasma bovis* buvo išskirta iš 13–23 proc. pneumonija sirgusių galvijų plaučių. Prancūzijoje, 2001 metais ištyrus pneumonija sirgusių galvijų prieauglio bandas, nustatyta, kad *Mycoplasma bovis* sudarė 30 proc. visų išskirtų mikroorganizmų (Byrne et al., 2001). Tais pačiais metais Didžiojoje Britanijoje aukšti antikūnų titrai kraujyje buvo rasti 20–25 proc. galvijų. Patekę į galvijų organizmą iš nosies ertmės išskiriami mikroorganizmai jau po 24 valandų (Nicholas et al., 2001; Stipkovits et al., 2000). Po įvairius organus, sąnarius, nervus mikoplazmos išplinta ir hematogeniniu keliu (Maeda et al., 2003).

Kitos mikoplazmų rūšys, svarbios galvijų plaučių ligų etiologijoje – *Mycoplasma dispar* (*M. dispar*), *Mycoplasma bovirhinis* (*M. bovirhinis*) ir *Mycoplasma bovigenitalium* (*M. bovigenitalium*) (Hirose et al., 2003; Ross, 1993). *Mycoplasma dispar* dažniausiai lokalizuojasi galvijų kvėpavimo sistemoje kaip saprofitinė organizmo mikroflora, tačiau galvijų prieaugliui ji gali sukelti lėtinės respiratorinės sistemos ligas. Ši mikoplazmų rūšis auga lėtai (14–20 dienų) ir išskiriama iš 3–4 mėnesių pneumonija sergančių veršelių. Sveiki veršeliai *Mycoplasma dispar* užsikrečia aerogeniniu būdu nuo lėtinėmis ar slaptomis respiratorinėmis ligomis sergančių gyvulių (Hirose et al., 2003; Marques et al., 2007; Ross, 1993). *Mycoplasma bovirhinis* sukelia kvėpavimo sistemos ligas, pieno liaukos uždegimą, sąnarių uždegimą, lyties organų susirgimus (Hirose et al., 2003; Ross, 1993). *Mycoplasma bovigenitalium* dažniausiai randama sveikų ir sergančių karvių bei bulių lytiniuose organuose, todėl ši mikoplazmų rūšis labiau susijusi su reprodukcinės sistemos ligomis – nevaisingumu, endometritu, vezikulitu (Nicholas et al., 2002). Literatūroje aprašomi atvejai, kai *Mycoplasma bovigenitalium* buvo išskirta iš mastitu sergančių karvių, artritu sergančių veršelių ir iš bronchopneumonija sirgusių galvijų (Hirose et al., 2003). *Mycoplasma alkalescens*, *Mycoplasma canis*, *Mycoplasma canadense*, *Mycoplasma californicum* ir *Mycoplasma arginini* literatūroje aprašomos kaip saprofitinė galvijų kvėpavimo sistemos mikrobiota. Šios mikoplazmų rūšys, sąveikaudamos su daugeliu organizmo apsauginės sistemos silpninančių veiksnių, gali sukelti mastitą, artritą, otitą, pneumoniją (Kokotovic et al., 2007; Ross, 1993).

Galvijininkystės ūkiuose mikoplazmas dažniausiai platina pneumonija sergantys galvijai tiesioginio kontakto metu, aerogeniniu būdu. Galvijai – *Mycoplasma bovis* nešiotojai – mikoplazmas su nosies išskyromis į aplinką išskiria mėnesius ar net ištisus metus. Sveiki galvijai nuo mikoplazmų nešiotojų užsikrečia tiesioginio kontakto metu, per spenio kanalą ar lyties organus dirbtinai sėklinant karves. Labai svarbi yra reguliari užšaldytos spermos

kontrolė, kuri sumažintų ne tik galvijų lyties organų, bet ir respiratorinių ligų plitimą (Tenk, 2005).

Cituojamuose literatūros šaltiniuose nurodoma, kad mikoplazmos dažnai išskiriamos iš sveikų galvijų – mikoplazmų nešiotojų. Šio darbo tikslas – ištirti pieninio, mėsinio ir mišraus tipo galvijus dėl mikoplazmų, nustatyti nešiotojus ir identifikuoti išskirtų mikoplazmų rūšis.

Medžiagos ir metodai. Tyrimai atlikti 2006–2008 metais Lietuvos veterinarijos akademijos Užkrečiamųjų ligų katedros Mikrobiologijos laboratorijoje. Laikantis 1997 11 06 Lietuvos Respublikos gyvūnų globos, laikymo ir naudojimo įstatymo reikalavimų Nr. 8–500 („Valskybės Žinios“, 1997 11 27, Nr. 108), X ūkyje buvo tiriami 105 mėsinio, pieninio ir mišraus tipo galvijų veislių palikuonys. Mėginiai iš nosies ertmės imti tris kartus: kai galvijams buvo 110 dienų, 310 dienų ir bandymo pabaigoje – 510 dienų. Prieš imant mėginius buvo atliekama bendroji klinikinė galvijų apžiūra, matuojama rektinė kūno temperatūra, skaičiuojamas kvėpavimo dažnumas, vertinama, ar galvijai sveiki. Mėginiai iš nosies ertmės imami steriliais vatos tamponais į sterilius mėgintuvėlius su pernešimo terpe („Liofilchem“, Italija) ir transportuojami konteineryje.

Bakteriologiniai tyrimai. Mikoplazmoms išskirti naudojome SB, HAU ir NHS selektyvias, skystas mitybines terpes („Difco“, JAV) ir selektyvų agarą (Friis, 1975; Hayflick, 1965). Užsėtą skystą mitybinę terpę 7–14 dienų kultivavome aerobinėmis sąlygomis, o standžias terpes – mikroaerofilinėmis sąlygomis. Standžioje mitybinėje terpėje mikoplazmų augimą su mikroskopu, padidinę 40 kartų, stebėjome po 48–96 val. Skystose selektyvinėse mitybinėse terpėse (SB, HAU ir NHS) mikoplazmų augimą vertinome pagal terpių spalvos pokyčius. Dėmesys buvo kreipiamas į pH kaitą – nuo geltonos spalvos (rūgšti reakcija) iki raudonos (šarminė reakcija). Toliau persėti buvo atrinkti mėgintuvėliai su pakitusia terpės spalva. Skystoje selektyvinėje terpėje mikoplazmų kultūra persėta tris kartus.

Išskirtoms mikoplazmoms identifikuoti naudojome etalones mikoplazmų padermes – *Mycoplasma arginini* G230 (ATCC23838), *Mycoplasma bovigenitalium* PG11 (ATCC19852), *Mycoplasma bovirhinis* PG43 (ATCC27748), *Mycoplasma bovis* Donetta PG45 (ATCC25523) ir *Mycoplasma dispar* 462/2.

Antrinei mikroflorai išskirti naudojome Kolumbijos agarą („Liofilchem“, Italija), širdies ir smegenų infuzijos agarą („Mast laboratories ltd“, Anglija), *Pseudomonas (cetrimide)* agarą, Drigalskio laktozės, Levino ir Kanamicino aeskulino azido agarus („Liofilchem“, Italija). Pasėtus mėginius Petri lėkštelėse kultivavome aerobinėmis sąlygomis 37°C temperatūroje 24–48 val. Mikroorganizmų morfologijai nustatyti paruošėme tepinėlius iš užaugusių mikroorganizmų kultūrų, dažėme Gramo metodu („Diagnostica Marck“, Vokietija). Bakterijas iki rūšies identifikuojome pagal biochemines savybes – gliukozės, laktozės, manito fermentavimą, katalazės ir oksidazės testus.

Grynos mikoplazmų kultūros išskyrimas (klonavimas). Grynai mikoplazmų kultūrai išskirti agaro blokas su užaugusia mikoplazmų kultūra išpjautas ir įdėtas į mė-

gintuvėlių su skysta selektyvia terpe. Kultivuota 37°C temperatūroje aerobinėmis sąlygomis 48–72 val. Išaugusios mikoplazmų kultūros filtruotos per sterilius 0,45 μm membraninius celiuliozės acetato filtrus („Sartorius“, Vokietija). Filtruotos mikoplazmų kultūros persėtos ant standžios selektyvios terpės. Gryna mikoplazmų kultūra gauta pagal F. J. R. Goll rekomendacijas (Goll, 1994).

Mikoplazmų biocheminių savybių nustatymas. Mikoplazmoms identifikuoti iki rūšies ištirtos biocheminės savybės – gliukozės fermentavimas, arginino hidrolizė, fosfatazės aktyvumas, tetrazolio druskų redukavimas, eritrocitų hemolizė, proteolitinis aktyvumas, taškelių ir plėvelių gamyba (Aluotto et al., 1970).

Mikoplazmoms identifikuoti iki rūšies atlikta augimo slopinimo (inhibicijos) reakcija (Clyde, 1964). Naudoti popieriniai diskai su etaloninių padermių antiserumais – *Mycoplasma arginini* G230, *Mycoplasma bovigenitalium* PG11, *Mycoplasma bovirhinis* PG43, *Mycoplasma bovis* Donetta PG 45, *Mycoplasma dispar* 462/2.

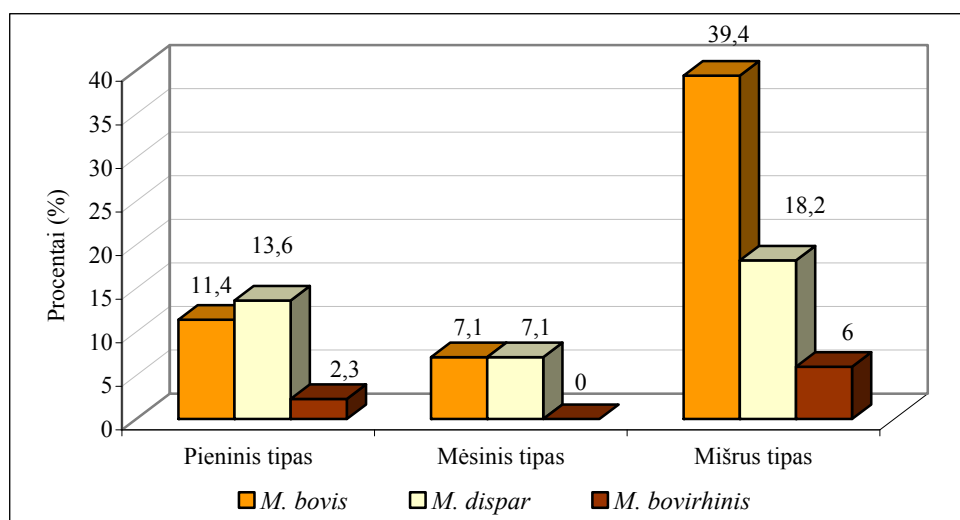
Statistiniai skaičiavimai. Norėdami nustatyti, ar mikoplazmų išskyrimo dažnumui turėjo įtakos galvijų tipas ir amžius, gautus duomenis apdorojome MINITAB 14.20 programa. Dažnių skirtumų patikimumas įvertintas ap-

skaičiavus χ^2 kriterijū. Rezultatai buvo laikomi patikimais, kai $p < 0,05$.

Tyrimo rezultatai. Nustatyti, ar galvijai neturėjo respiratorinių ligų simptomų, kiekvieno tyrimo etapo metu atlikta bendra klinikinė apžiūra. Šių tyrimų metu 110, 310, 510 dienų galvijams respiratorinių ligų simptomų nerasta. Klinikinės apžiūros metu galvijų kvėpavimo dažnis buvo nuo 12 iki 25 k. / min., galvijų prieauglio iki vienerių metų temperatūra – 38,5–40°C, vyresnių kaip vieneri metai – 37,5–39,5°C.

Ištyrę 44 pieninio, 28 mėsinio bei 33 mišraus tipo galvijų mėginius iš nosies ertmės, mikoplazmas išskyrėme iš 29 (27,6 proc.) galvijų. *Mycoplasma bovis* buvo išskirta 11,4 proc., *Mycoplasma dispar* – 5,7 proc., *Mycoplasma bovirhinis* – 2,8 proc. galvijų. Dvi mikoplazmų rūšys – *Mycoplasma bovis* ir *Mycoplasma dispar* – išskirtos asociacijoje (7,6 proc.).

Išskirtas mikoplazmų padermes ištyrėme pagal biochemines ir antigenines savybes. Identifikavome tris mikoplazmų rūšis – *Mycoplasma bovis* – 54,1 proc., *Mycoplasma dispar* – 37,8 proc. ir *Mycoplasma bovirhinis* – 8,1 proc. (Pav.).



Pav. Išskirta mikoplazmų iš įvairaus tipo galvijų

Pasėtų mikoplazmų augimas skystose mitybinėse terpėse vertintas po 3–4 parų. Ant standžių selektyvinių terpių po 72–96 val. buvo matomos *Mycoplasma bovirhinis* kolonijos. *Mycoplasma bovis* kolonijos ant standžios mitybinės terpės buvo matomos po 7–9 parų. Šioms mikoplazmų rūšims būdinga kepto kiaušinio („fried egg“) morfologija. *Mycoplasma dispar* kolonijų centras, skirtingai nuo *Mycoplasma bovirhinis* ir *Mycoplasma bovis*, nėra iškilęs; kolonijos ant agarų augo lėtai – iki 20 dienų.

Identifikuojant *Mycoplasma bovis* buvo kreipiamas dėmesys į angliavandenių gliukozės fermentavimą, fosfatazės aktyvumą, tetrazolio druskos redukavimą. Dvidešimt išskirtų mikoplazmų padermių iš dalies fermentavo gliukozę, pasižymėjo fosfatazės aktyvumu, tetrazolio druskų redukavimu. Augdamos standžioje mitybinėje terpėje mikoplazmos formavo taškelius ir plėveles. Jų

augimą slopino *Mycoplasma bovis* „Donetta PG 45“ antiserumas. Šiai mikoplazmų rūšiai proteolitinis aktyvumas nebuvo būdingas.

Mycoplasma dispar biocheminės savybės buvo būdingos 14 mikoplazmų padermių, išskirtų iš galvijų. Jos fermentavo gliukozę, redukavo tetrazolio druskas, buvo jautrios *Mycoplasma dispar* 462/2 antiserumui. Išskirtos *Mycoplasma dispar* padermės nepasižymėjo proteolitiniais ir fosfataziniais aktyvumais.

Tyrimų metu išskyrėme ir identifikavome dar vieną mikoplazmų rūšį – *Mycoplasma bovirhinis*. Šios rūšies (trys padermės) mikoplazmos fermentavo gliukozę, pasižymėjo daliniu fosfataziniais ir stipriai proteolitiniais aktyvumu, redukavo tetrazolio druskas, augdamos standžioje terpėje negamino taškelių ir plėvelių. Jų augimą slopino *Mycoplasma bovirhinis* PG43 antiserumas.

Analizuojant tyrimų duomenis nustatyta, kad iš 110 dienų pieninio tipo galvijų išskirtos dvi (10 proc.) *Mycoplasma bovis* ir keturios (20 proc.) *Mycoplasma dispar* padermės. Iš šio tipo 310 amžiaus dienų galvijų išskirta viena (12,5 proc.) *Mycoplasma bovis* ir viena (12,5 proc.) *Mycoplasma bovirhinis* padermė; iš 510 dienų galvijų išskirtos dvi (12,5 proc.) *Mycoplasma bovis* ir dvi (12,5 proc.) *Mycoplasma dispar* padermės.

Iš 110 amžiaus dienų mėsinio tipo galvijų išskirtos dvi (28,6 proc.) *Mycoplasma bovis* ir keturios (14,3 proc.) *Mycoplasma dispar* padermės; iš 310 dienų – mikoplazmų neišskirta; iš 510 dienų mėsinų veislių galvijų išskirta viena (10 proc.) *Mycoplasma dispar* padermė.

Iš 110 dienų mišraus tipo galvijų išskirtos keturios (50 proc.) *Mycoplasma bovis* ir trys (37,5 proc.) *Mycoplasma dispar* padermės; iš 310 dienų galvijų – septynios (43,8 proc.) *Mycoplasma bovis* ir viena (6,3 proc.) *Mycoplasma bovirhinis* padermė; iš 510 dienų galvijų išskirtos dvi (22,2 proc.) *Mycoplasma bovis*, trys (33,3 proc.) *Mycoplasma dispar* ir viena (11,1 proc.) *Mycoplasma bovirhinis* padermė.

Analizavome, ar mikoplazmų išskyrimo dažnumui turėjo įtakos galvijų amžius. Nustatyta, kad tarp pieninio tipo *Mycoplasma bovis* dažniau išskirta iš 310 ir 510 dienų galvijų, rečiau – iš 110 dienų galvijų ($p > 0,05$; $\chi^2 = 0,068$). *Mycoplasma dispar* dažniau išskirta iš 110 dienų šio tipo galvijų, rečiau – iš 510 dienų ($p > 0,05$; $\chi^2 = 1,968$).

Tarp mėsinio tipo *Mycoplasma bovis* išskirta iš 110 dienų galvijų. Iš 310 ir 510 dienų šio tipo galvijų *Mycoplasma bovis* išskirta nebuvo ($p < 0,05$; $\chi^2 = 6,462$). *Mycoplasma dispar* dažniau išskirta iš 110 ir 510 dienų mėsinio tipo galvijų, rečiau – iš 310 dienų galvijų ($p > 0,05$; $\chi^2 = 1,508$).

Iš mišraus tipo galvijų *Mycoplasma bovis* daugiausia išskirta, kai galvijų amžius buvo 110 ir 310 dienų, rečiau išskirta iš 510 dienų sulaukusių galvijų ($p > 0,05$; $\chi^2 = 1,616$). *Mycoplasma dispar* iš šio tipo galvijų dažniau išskirta sulaukus 110 amžiaus dienų ($p < 0,05$; $\chi^2 = 6,951$). *Mycoplasma bovirhinis* dažniau išskirta iš 510 dienų, rečiau – iš 310 ir 110 dienų galvijų ($p > 0,05$; $\chi^2 = 0,920$).

Įvertinta ir galvijų tipo įtaka mikoplazmoms. Iš tyrimo duomenų matyti, kad *Mycoplasma bovis* dažniau išskirta, iš 110 dienų mišraus tipo, rečiau – pieninio ir mėsinio tipo galvijų ($p < 0,05$; $\chi^2 = 5,347$). Iš 310 dienų galvijų ši mikoplazmų rūšis išskirta taip pat iš mišraus tipo galvijų veislių ($p < 0,05$; $\chi^2 = 7,707$). Tarp 510 dienų amžiaus galvijų *Mycoplasma bovis* dažniau išskirta iš pieninio ir mišraus tipo galvijų ($p > 0,05$; $\chi^2 = 2,344$).

Mycoplasma dispar dažniau buvo išskirta iš 110 dienų pieninio tipo galvijų ($p > 0,05$; $\chi^2 = 1,357$). Ši mikoplazmų rūšis iš 510 dienų galvijų dažniau išskirta tarp mišraus tipo, rečiau – tarp pieninio ir mėsinio tipo galvijų ($p > 0,05$; $\chi^2 = 2,263$). Iš 310 dienų galvijų *Mycoplasma dispar* išskirta nebuvo.

Iš visų mėginių (105), paimtų iš sveikų pieninio, mėsinio ir mišraus tipo galvijų nosies ertmės, išskirta ir anterinė mikroflora – *Pasteurella multocida* (*P. multocida*), *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*) ir *Enterococcus* spp. *P. multocida* išskirta 13 (12,4 proc.) galvijų, *M.*

haemolytica – 16 (15,2 proc.), o *Enterococcus* spp. – 11 (10,5 proc.) galvijų. Penkiems (17,2 proc.) galvijams, kurie buvo mikoplazmų nešiotojai, *Mycoplasma bovis* išskirta asociacijoje su *Pasteurella multocida*. *Mannheimia haemolytica* asociacijoje su *Mycoplasma bovis* išskirta iš aštuonių (27,6 proc.) galvijų.

Tyrimo rezultatų aptarimas. Tiriamąjį darbą atlikome norėdami išsiaiškinti galvijus – mikoplazmų nešiotjus. Įvertinę pieninio, mėsinio ir mišraus tipo galvijų klinikinės apžiūros duomenis, nustatėme, kad tiriamieji galvijai buvo sveiki. Galvijų, surinktų iš įvairių vietų, laikymas ir būrių papildymas naujais palaiko stacionarią mikoplazminę infekciją. Persistuojančias mikoplazmas gali suaktyvinti mikoplazmų turėtojų patiriami stresai (pergrupavimas, transportavimas), taip pat antrinių infekcijų sukėlėjai. Mikoplazmos plinta per tiesioginius kontaktus, dažnai – per kvėpavimo sistemą. Jos, skirtingai nuo bakterijų, neturi ląstelės sienelės, o yra apsuptos trisluoksne citoplazmine membrana, todėl pasižymi morfologinių ir fiziologinių savybių specifiskumu. Identifikuojant šiuos mikroorganizmus reikšmingi yra biocheminių savybių tyrimai. Tyrimų metu *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar* ir *Mycoplasma bovirhinis* lokalizacija nosies ertmės gleivinėje nustatyta išskiriant gryną mikoplazmų kultūrą. *Mycoplasma bovis* – viena dažniausiai išplitusių mikoplazmų rūšių galvijų bandose. Nustatyta, kad apie 40 proc. tik ką atvestų veršelių yra užsikrėtę šia mikoplazmų rūšimi (Stipkovits et al., 2001). Mikoplazmos į galvijo prieauglio organizmą patenka ir su mastitiniu karvių pienu (Tenk, 2005). Pagal tyrimo duomenis galime konstatuoti, kad 19 proc. galvijų yra *Mycoplasma bovis*, 13,3 proc. – *Mycoplasma dispar* ir 2,8 proc. – *Mycoplasma bovirhinis* nešiotojai. Iš 7,6 proc. galvijų išskyrėme mišrią mikroflorą (*Mycoplasma bovis* ir *Mycoplasma dispar*). 2002 metais Belgijoje atlikti tyrimai parodė, kad 16 proc. kliniškai sveikų galvijų buvo *Mycoplasma bovirhinis* nešiotojai, kitos mikoplazmų rūšys išskirtos nebuvo (Thomas et al., 2002).

Savo tyrimų metu *Mycoplasma bovis* išskyrėme iš visų tirtų amžiaus grupių (110, 310 ir 510 dienų) galvijų. Olandijoje A. E. Ter Laak su bendradarbiais (1992) iš kliniškai sveikų 6 mėnesių pieninio tipo galvijų išskyrė šias mikoplazmų rūšis: *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovoculi*, *Mycoplasma canis*, *Acholeplasma laidlawii*. Mokslininkas nurodo, kad daugiausia buvo išskirta *Mycoplasma dispar* (40 proc.) ir *Mycoplasma bovirhinis* (66 proc.) (Ter Laak et al., 1992). Mūsų tyrimo metu 10 proc. 110 dienų galvijų buvo *Mycoplasma bovis*, 20 proc. – *Mycoplasma dispar* nešiotojai. Iš 310 dienų galvijų išskyrėme dvi rūšis – *Mycoplasma bovis* ir *Mycoplasma bovirhinis*. Cituojamuose šaltiniuose nurodoma, kad šios mikoplazmų rūšys dažniau išskiriamos iš galvijų, rečiau – iš veršelių (Tenk, 2005).

Mycoplasma bovis dažniau buvo išskirtos iš sveikų mėsinio, rečiau – iš pieninio tipo galvijų (Ter Laak et al., 1992). Mes tyrimo metu daugiausia *Mycoplasma bovis* išskyrėme iš mišraus tipo galvijų. Tarp mėsinio tipo galvijų šią mikoplazmų padermę išskyrėme iš 110 dienų gyvulių. Tarp pieninio tipo *Mycoplasma bovis* daugiausiai iš-

skirta iš 110 ir 510 dienų galvijų.

Mycoplasma dispar išskirta iš visų tipų galvijų, kai jiems buvo 110 ir 510 dienų. Cituojamuose šaltiniuose nurodoma, kad *Mycoplasma dispar* dažniausiai išskiriama iš sveikų ir slapta pneumonijos forma sergančių veršelių kvėpavimo takų (Ross, 1993; Hirose et al., 2003). *Mycoplasma bovirhinis* daugiausia išskyrėme iš mišraus tipo galvijų. Ši mikoplazmų rūšis galvijų kvėpavimo sistemoje lokalizuojasi kaip saprofitinė flora (Ross, 1993).

Iš tirtų galvijų išskirta ir antrinė galvijų nosies ertmės mikroflora – *Pasteurella multocida* ir *Mannheimia haemolytica*. Šios bakterijos yra viršutinės kvėpavimo sistemos mikrofloros dalis. Veikiant įvairiems patogeniniams agentams (virusams ar mikoplazmoms), nusilpsta gyvulio imuninė sistema, susidaro palankios sąlygos *Pasteurella* spp. sukeliams antrinėms respiratorinių ligų infekcijoms pasireikšti (Umemory et al., 2005). Mūsų tyrimo metu 17,2 proc. *Pasteurella multocida* ir 27,6 proc. *Mannheimia haemolytica* išskirtos asociacijoje su *Mycoplasma bovis*. Nusilpus galvijų organizmo imuninei sistemai, hemofilinių bakterijų patogeniškumo veiksniai ap sunkintų pirminės ligos eigą.

Savo studijų metu mikoplazmas išskyrėme iš sveikų įvairaus tipo galvijų nosies ertmės. Mikoplazmozėms būdinga slapta forma, todėl manome, kad galvijai į bandą buvo atvežti su mikoplazmine infekcija. Būdami viename tvarte nuo 110 iki 510 dienų, mūsų tirti galvijai užsikrėtė mikoplazmomis tiesioginio kontakto ir oro lašeliniu būdais. *Mycoplasma bovis* į laisvas nuo šio sukėlėjo galvijų bandas gali patekti su užšaldyta buliaus sperma, kurioje mikroorganizmai gyvybingi išlieka keletą metų. Sveikos karvės *Mycoplasma bovis* perneša per pienu, užkrėsdamos žindomus veršelius. Jas platina ir slaptomis respiratorinių ligų formomis sergantys galvijų prižiūrėtojai (Tenk, 2005). Tik ištyrę galvijus – mikoplazmų nešiotojus ar slaptomis mikoplazmozių formomis sergančius gyvūnus, užkirsime kelią šio mikroorganizmo plitimui.

Išvados.

1. Ištyrę įvairaus tipo ir amžiaus galvijus, nustatėme 27,6 proc. mikoplazmų nešiotojų.

2. Iš pieninio, mėsinio ir mišraus tipo galvijų nosies ertmės išskyrėme ir identifikavome tris mikoplazmų rūšis – *Mycoplasma bovis* (54,1 proc.), *Mycoplasma bovirhinis* (8,1 proc.) ir *Mycoplasma dispar* (37,8 proc.).

3. Daugiausia *Mycoplasma bovis* (39,4 proc.), *Mycoplasma bovirhinis* (6 proc.) ir *Mycoplasma dispar* (18,2 proc.) padermių buvo išskirta iš įvairaus amžiaus mišraus tipo galvijų.

Literatūra

- Ayling R. D., Baker S. E., Peek M. L., Simon A. J., Nicholas R. A. J. Comparison of in vitro activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Rec.*, 2000. N. 146. P. 745–747.
- Aluotto B. B., Wittler R. G., Williams C. O., Faber J. E. Standardized bacteriologic techniques for the characterization of *Mycoplasma* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1970. N. 20. P. 35–58.

- Bashiruddin J. B., Frey J., Königsson M. H., Johansson K. E., Hotzel H., Diller R., de Santis P., Botelho A., Ayling R. D., Nicholas R. A. J., Thiaucourt F., Sachse K. Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*: a collaborative trial. *Veterinary Journal*, 2005. N. 169 (2). P. 268–75.

- Byrne W. J., Brennan P., McCormack R., Ball, H. J. Isolation of *Mycoplasma bovis* from the abomasal contents of an aborted bovine fetus. *Vet. Rec.*, 1999. N. 144. P. 211–212.

- Byrne W. J., McCormack, R., Brice, N., Egan, J., Markey, B., Ball, H. J. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical samples in the Republic of Ireland. *Vet. Rec.*, 2001. N. 148. P. 331–333.

- Brown D. R., Whitcomb R. F., Bradbury J. M. Revised minimal standards for description of new species of the class *Mollicutes* (division *Tenericutes*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2007. N. 57. P. 2703–2719.

- Clyde W. A. *Mycoplasma* species identification based upon growth inhibition by specific antisera. *J. Immunol.*, 1964. N. 92. P. 958–965.

- Elli J. A. The immunology of the bovine respiratory disease complex. *Vet. Clin. North. Amer.-Food Anim. Prac.*, 2001. N.17, 3. P. 535–550.

- Friis N. F. Some recommendations concerning primary isolations of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*. *Nordic Vet. Med.*, 1975. N. 27. P. 337–339.

- Goll F. J. R. Identification of mycoplasmas isolated from domestic animals. In *Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis*. Edited by Whitford H. W., Rosenbusch R. F., Lauerma L. H. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1994. P. 15–30.

- Gonzalez R. N., Sears P. M., Merrill R. A., Hayes G. L. Mastitis due to *Mycoplasma* in the state of New York during the period 1972-1990. *Cornell Vet.*, 1992. N. 82. P. 29.

- Hayflick L. Tissue cultures and mycoplasmas. *Tex Rep. Biol. Med.*, 1965. N. 1. P. 285.

- Hirose K., Kobayashi H., Ito N., Kawasaki Y., Zako M., Katani K., Ogawa H., Sato H. Isolation of mycoplasmas from nasal swabs of calves affected with respiratory diseases and antimicrobial susceptibility of their isolates. *J. Vet. Med.*, 2003. N. 50. P. 347–351.

- Kokotovic B., Friis N. F., Ahrens P. *Mycoplasma alkalescens* demonstrated in bronchoalveolar lavage of cattle in Denmark. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2007. N. 49. P. 2.

- Königsson M. H., Bölske G., Johansson K. E. Intraspecific variation in the 16S rRNA gene sequences of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* strains. *Veterinary Microbiology*, 2002. N. 85. P. 209–220.

16. Maeda T., Shibahara T., Kilmura K., Wada Y., Sato K., Imada Y., Ishikawa Y., Kadota K. *Mycoplasma bovis* associated otitis media and pneumonia in bull calves. *Journal of Comparative Pathology*, 2003. N. 129 (2–3). P.100–10.
17. Marques L. M., Buzinhani M., Yamaguti M., Oliveira R. C., Ferreira J. B., Mettifogo E., Timenetsky J. Use of a polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma dispar* in the nasal mucus of calves. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2007. N. 19. P. 103–106.
18. Nicholas R. A., Ayling R. D. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Res. Vet. Sci.*, 2003. N. 74. P. 105–112.
19. Nicholas R. A. J., Ayling R. D., Stipkovits L. An experimental vaccine for calf pneumonia caused by *Mycoplasma bovis*. *Vaccine*, 2002. N. 20. P. 3569–3575.
20. Nicholas R. A. J., Wood E., Baker S., Ayling R. D. Mycoplasmas isolated from ruminants in Britain 1995–2000. In: Poveda J. B., Fernandez A., Frey J., Johansson K.- E. (Eds.), *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*. Vol. 5. European Commission, Brussels, 2001. P. 116–120.
21. Nicholas R. A. J., Baker S., Ayling R. D., Stipkovits L. *Mycoplasma* infections in growing cattle. *Cattle Pract.*, 2000. N. 8. P. 115–118.
22. Nicholas R. A. J. Recent developments in the diagnosis and control of mycoplasma infections in cattle. 23 World Buiatrics Congress. Canada, 2004. P. 13.
23. Pfützner H. Epizootiology of *Mycoplasma bovis* infection of cattle. Edited by: Stanek G., Cassell G. H., Tully J. H., Whitcomb R. F. *Recent advances in mycoplasmaology*. Proceedings of the 7th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology, vol. 20. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, Germany, 1990. P. 394–399.
24. Pfützner H., Sachse K. *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. *Rev. Sci. Tech.*, 1996. N. 15. P.1477–494.
25. Poumarat F., Le Grand D., Bergonier D. Propriétés générales des mycoplasmes et hypervariabilité antigénique. *Point. Vet.*, 1996. N. 28. P 761–767.
26. Ross R. F. *Mycoplasma – animal pathogens*. Rapid diagnosis of mycoplasmas, edited by Kahane I., Adoni, A. Plenum Press, New York, 1993. P. 69–78.
27. Ruhnke H. L. *Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis*. Mycoplasmas associated with bovine genital tract infections. Edited by Whitford H. W., Rosenbusch R. F., Lauerma L. H. Iowa State University Press Ames., 1994. P. 50–56.
28. Stipkovits L., Ripley P., Varga J., Palfi V. Clinical study of the disease of calves associated with *Mycoplasma bovis* infection. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2000. N. 48. P. 387–395.
29. Stipkovits L., Ripley P. H., Varga J., Palfi V. Use of valnemulin in the control of *Mycoplasma bovis* infection under field conditions. *Vet. Rec.*, 2001. N. 148. P. 399–402.
30. Šiugždaitė J., Kevišas E. Indirect immunofluorescence method for detection *Mycoplasma hyopneumoniae* smears from bronchi. *Veterinarija ir zootechnika*. Kaunas, 2001, T. 13 (35). P. 50–51.
31. Šiugždaitė J., Žilinskas H. Detection of MCS4 RNA genes in *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* type strain California kid and strain GM262G. *Veterinarija ir zootechnika*. Kaunas, 2003, T. 24 (46). P. 56–59.
32. Tenk M. Examination of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. Doctoral Thesis Budapest, 2005. P. 70.
33. Ter Laak E. A., Noordergraaf J. H., Boomsluiters E. The nasal mycoplasmal flora of healthy calves and cows. *Zentralbl. Veterinarmed*, 1992. N. 39. P. 610–616.
34. Thomas A., Dizier I., Trolin A., Mainil J., Linden A. Comparison of sampling procedures for isolating pulmonary mycoplasmas in cattle. *Vet. Res. Comm.*, 2002. N. 26. P. 333–339.
35. Umemory Y., Hiraki A., Murakami T., Aoe K., Matsuda E., Makihara S., Takeyama H. Chronic lung abscess with *Pasteurella multocida* infection. *Internal Medicine*, 2005. N. 44. P. 754–756.
- Gauta 2009 03 19
Priimta publikuoti 2010 03 05