

STRESZCZENIE

Zakażenia mykoplazmowe u bydła, a zwłaszcza na tle *M. bovis*, stanowią istotny problem epidemiologiczny i ekonomiczny w wielu krajach świata. Uważa się, że *M. bovis* jest odpowiedzialna za 25% do 33% przypadków zapaleń płuc w Europie. Ze względu na niespecyficzne i słabo nasilone w początkowym okresie zakażenia objawy kliniczne, rozpoznanie infekcji tylko na tej podstawie jest praktycznie niemożliwe. Z tego powodu zasadniczym elementem właściwego rozpoznania tych zakażeń są dodatkowe badania laboratoryjne. Dotychczasowe epidemiologiczne badania nad występowaniem i rozprzestrzenianiem się zakażeń *M. bovis* u bydła w Polsce były fragmentaryczne i nikt nie prowadził przy tym badań filogenetycznych w tym zakresie. Ponadto, nie przeprowadzono też badań porównawczych nad przydatnością dostępnych metod diagnostycznych.

Celem badań była ocena występowania zakażeń *M. bovis* w populacji bydła podejrzanego o zakażenie w wybranych regionach Polski połączona z molekularną identyfikacją szczepów terenowych tego patogenu oraz porównaniem przydatności dostępnych obecnie metod diagnostycznych. Podjęcie badań w zakresie występowania zakażeń *M. bovis* połączone z izolacją i szczegółową identyfikacją molekularną szczepów terenowych pozwoliło na ocenę podobieństwa w strukturze genomu pomiędzy poszczególnymi szczepami oraz szczepem wzorcowym.

Badaniami w kierunku oceny seroprevalencji zakażeń *M. bovis* w Polsce objęto 361 stad bydła i przebadano w sumie 3670 sztuk bydła. W drugim etapie badań, obejmującym wyłącznie zwierzęta podejrzanego o zakażenie, przebadano w sumie 713 zwierząt pochodzących z 73 stad. Dla stad uwzględnionych w drugim etapie badań zbierano dane na temat stanu zdrowotnego zwierząt biorąc pod uwagę występowanie objawów klinicznych.

W badaniach wykorzystano zarówno metody serologiczne (ELISA), hodowlane oraz badania molekularne (PCR, PCR/DGGE, RAPD-PCR i sekwencjonowanie). Wyniki badań molekularnych zostały poddane analizie bioinformatycznej. Wykonano analizę filogenetyczną przy użyciu algorytmu „neighbour-joining” oraz metody UPGMA. Ponadto, wyniki badań uzyskane przy zastosowaniu poszczególnych metod badawczych zostały poddane analizie statystycznej przy zastosowaniu testu istotności χ^2 (chi-kwadrat). Dla ustalenia poziomu istotności poszczególnych, jednostkowych porównań, zastosowano poprawkę Bonferroniego oraz poprawkę Yatesa. Do oceny zależności pomiędzy wynikiem dodatnim w ELISA na obecność przeciwciał, a występowaniem objawów klinicznych oraz wynikami badań

uzyskanymi przy zastosowaniu innych metod użyto testu Manna-Whitney'a. Jako miarę korelacji wykorzystano współczynnik Φ .

Przedstawiona w dysertacji ocena seroprewalencji wykazała, że odsetek stad serologicznie dodatnich dla *M. bovis* wyniósł 56%. Obecność antygeny *M. bovis* wykazano u 7,3% zwierząt, natomiast odsetek izolatów terenowych *M. bovis* wyniósł 6,9%, a metoda PCR wykazała jej obecność u 5,5% badanych zwierząt. W izolatach DNA z wymazów od 79,1% zwierząt PCR/DGGE wykazał obecność *Mycoplasma* spp. i/lub *U. diversum*. *M. bovis* za pomocą tej metody stwierdzono w 9,3% badanych zwierząt. Z czego w 2,4% stwierdzono obecność tylko *M. bovis*, a w 6,9% *M. bovis* towarzyszyły inne patogeny z gatunku *Mycoplasma* spp. lub/i *U. diversum*. Natomiast w izolatach DNA z wymazów od 69,8% zwierząt występowały mikoplazmy, inne niż *M. bovis*, i *U. diversum*. W izolatach od 20,9% zwierząt nie wykryto DNA specyficznego dla *Mycoplasma* spp., *U. diversum* i *A. laidlawii*. Nie wykazano istotnej statystycznie zależności pomiędzy występowaniem poszczególnych gatunków mykoplazm, a odnotowanymi objawami klinicznymi.

Otrzymane fragmenty genu *uvrC* zsekwencjonowano, a sekwencje zamieszczono w bazie NCBI GenBank. Analiza filogenetyczna terenowych szczepów *M. bovis* wykazała, że u większości z nich fragment analizowanego genu *uvrC* w strukturze molekularnej jest identyczny ze szczepem wzorcowym *M. bovis* PG45, ale część z nich wykazywała różnice w odniesieniu do tego wzorca i obserwowano mutacje punktowe. Z kolei analiza RAPD-PCR wykazała, że polskie szczepy terenowe *M. bovis* dzielą się na dwie grupy, w tym, że w grupie I obecne są cztery podgrupy (A-D) obejmujących w sumie 30% wszystkich otrzymanych izolatów, a w grupie II dwie (F i G) stanowiące pozostałe 70% szczepów. Szczep referencyjny został umieszczony w grupie I (podgrupa E).

Analiza porównawcza zastosowanych metod badawczych wykazała dodatnią korelację pomiędzy zastosowanymi metodami. Najwyższy stopień korelacji odnotowano pomiędzy metodą izolacji oraz testem ELISA dla wykrywania antygeny oraz metodami molekularnymi PCR/DGGE oraz klasycznym PCR. Najniższy stopień korelacji wykazał natomiast test ELISA do wykrywania przeciwciał w surowicy w porównaniu z pozostałymi ocenianymi metodami. Z kolei metodą wykazującą najwyższy stopień korelacji z występowaniem objawów klinicznych jest PCR/DGGE oraz ELISA do wykrywania przeciwciał anti-*M. bovis*.

Reasumując należy stwierdzić, że *M. bovis* jest patogenem, który powszechnie występuje w hodowli bydła w Polsce, któremu bardzo często towarzyszą inne patogeny z klasy *Mollicutes*. Potwierdzenie zjawiska występowania mutacji w genomie *M. bovis* wskazuje na konieczność ciągłego weryfikowania, doskonalenia i poszukiwania nowych

metod diagnostycznych, a zwłaszcza technik molekularnych. Przeprowadzone badania wykazały, że metoda ELISA do wykrywania obecności antygenu i PCR/DGGE oraz PCR są najbardziej przydatne w diagnostyce zakażeń *M. bovis*.

SUMMARY

Mycoplasmal infections in cattle, especially related to *M. bovis*, are an essential epidemiological and economical issue in many countries all over the world. It is thought that *M. bovis* is responsible for 25% to 33% of all calf pneumonia cases in Europe. The proper diagnosis of *M. bovis* infection is almost impossible due to non-specific and only slightly increased clinical signs of infection in its initial stage. For that reason, laboratory testing is vital in proper diagnosis of infection. The existing survey on the prevalence and spread of *M. bovis* in Poland was insufficient and the phylogenetic diversity of *M. bovis* strains in Poland has not been examined. Additionally, no comparative studies over the usefulness of different available diagnostic methods have been conducted in Poland.

The aim of this study was the assessment of *M. bovis* prevalence in cattle population suspected of infection in different regions of Poland combined with molecular identification of Polish field strains and comparison of the usefulness of the available diagnostic methods in *M. bovis* detection. The undertaken research on *M. bovis* infection combined with isolation and detailed molecular identification of the field strains allowed to assess the similarity in the genome structure between particular strains and the reference strain.

The research on the seroprevalence of *M. bovis* infection in Poland was conducted on 361 cattle herds, with 3,670 animals tested. During the second stage, which was limited to animals suspected of infection, 713 animals from 73 herds were tested. For the herds included in the second stage of the research, the data on animal health status were collected, taking into account the occurrence of clinical symptoms.

The research used serological (ELISA), culture as well as molecular methods (PCR, PCR/DGGE, RAPD-PCR and sequencing). The results of molecular testing were analysed with the use of bioinformatics tools. The phylogenetic analysis was performed with the use of “neighbour – joining” and UPGMA methods. Moreover, the results received with the use of particular methods were subjected to statistical analysis using the test of significance χ^2 (chi-square). For the assessment of the level of significance, Bonferroni adjustment and Yates adjustment were applied. To evaluate the influence of a positive result in ELISA for anti-*M. bovis* antibodies detection, the occurrence of clinical signs and the results obtained with the use of particular methods Mann-Whitney test was used. The Φ factor was used as a measure of correlation.

The evaluation of seroprevalence revealed that 56% of herds were positive for *M. bovis*. The presence of *M. bovis* antigen with the use of ELISA was detected in 7.3% of

animals, the percent of isolated *M. bovis* field strains was 6.9% and PCR revealed its presence in 5.5% animals. Among DNA isolates from swabs in 79.1% of animals PCR/DGGE revealed the presence of *Mycoplasma* spp. and/or *U. diversum*. *M. bovis* was found in 9.3% of examined animals. In 2.4% of them only *M. bovis* was found. In 6.9% of them *M. bovis* was detected with other bacteria from *Mycoplasma* spp. or/and *U. diversum*. In DNA isolates from swabs among 69.8% of animals there were other mycoplasmas and *U. diversum*. In isolates originating from 20.9% of animal swabs no DNA specific for *Mycoplasma* spp., *U. diversum* and *A. laidlawii* have been found. No statistically significant dependence between the presence of the individual *Mycoplasma* spp. and the clinical signs of *M. bovis* infection was observed.

The obtained *uvrC* gene fragments were sequenced, and the identified sequences were submitted to NCBI GenBank database. The phylogenetic analysis of the *M. bovis* field strains revealed that in the majority of them, the molecular structure of the analysed fragment of *uvrC* gene is identical with the reference strain *M. bovis* PG45, but a part of them differed from it and the point mutations were observed. The RAPD-PCR analysis revealed that Polish field strains of *M. bovis* were divided into two groups; in group I, there were four subgroups (A – D) comprising a total of 30% of all field strains, and in group II – two subgroups (F and G) constituting the remaining 70% of the strains. The reference strain was placed in group I (subgroup E).

The comparative analysis of the methods used in *M. bovis* detection revealed the positive correlation among all of them. The highest level of correlation was seen between the isolation method and ELISA for antigen detection and between molecular methods (PCR/DGGE and classic PCR). The lowest level of correlation in comparison with the other methods studied was shown by the ELISA for the anti-*M. bovis* antibodies detection. The method that revealed the highest level of correlation with the occurrence of clinical signs is the PCR/DGGE and ELISA for the anti-*M. bovis* antibodies detection.

In summary, it can be affirmed that *M. bovis* is a pathogen commonly present in cattle herds in Poland, which are often accompanied another pathogens from *Mollicutes* class. Confirmation of the presence of mutations in the genome of field strains of *M. bovis* indicates the necessity of constant verification and searching for new diagnostic methods, mainly the molecular ones. The research revealed that ELISA for antigen detection, PCR/DGGE and PCR are the most suitable in the diagnosis of *M. bovis* infections in cattle.