

3. Похиленко, В.Д. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность / В.Д. Похиленко, В.В. Перельгин // Хим. и биол. безопасность. – 2007. – № 2/3. – С.20-41.
4. Принципиально новый подход к лечению бактериальных и вирусных инфекций / И.Б. Сорокулова, С.Л. Рыбалко, А.А. Руденко, Т.Г. Берестовая, К.Н. Легеза, В.С. Подгорский, К.В. Куришук. – Киев, 2010. – С. 22-25.
5. Псахис, И. Б. Современные возможности и перспективы использования пробиотиков группы самоэлиминирующихся антагонистов в терапии инфекционных заболеваний / И.Б. Псахис, Т. Е. Маковская // Здоровье ребенка. – 2014. – № 4. – С. 91-94.
6. Характеристика условно-патогенных микроорганизмов при острых и хронических заболеваниях кишечника / Н.Ф. Брусникина, Н.В. Залесских, С.А. Быкова, М.А. Власнеко // Республикан. сб. науч. тр. / под ред. И.Н. Блохиной, К.Л. Соколовой. – 2005. – С. 234-238.
7. Edward, J.B. Bacillus cereus, a Volatile human pathogen / J.B. Edward // Clinical Microbiology. – 2010. – Vol. 23. – P. 382-398.
8. Fatal pneumonia among metalworkers due to inhalation exposure to Bacillus cereus containing Bacillus anthracis toxin genes / S. B. Avashia, W. S. Wiggins, C. Lindley [et al.] // Betz. Clin. Infect. – 2007. – № 44. – P.414-416.

УДК 619 DOI: 10.17238/issn2072-2419.2018.3.17

РАСПРОСТРАНЁННОСТЬ НОСИТЕЛЬСТВА *U. DIVERSUM* В РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Ваганова А. Н., мл. научный сотрудник, лаборатория молекулярно биологических технологий, Отдел новых технологий, Фрейлихман О. А., к. б. н., зав. лаб., лаборатория молекулярно-биологических технологий, отдел новых технологий, Борисенко С. В., к. вет.н., старший научный сотрудник, лаборатория иммуно-химических технологий, отдел новых технологий, В.В. Рока, к. б. н., старший научный сотрудник, лаборатория биопрепаратов, Отдел новых технологий, Вербов В.Н., к. х.н., зав. отделом, Отдел новых технологий (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера).

Ключевые слова: *Ureaplasma diversum*, заболевания репродуктивной системы КРС, ПЦР, ПЦР в реальном времени. **Key words:** *Ureaplasma diversum*, diseases of the reproductive system of cattle, PCR, real-time PCR

РЕФЕРАТ

Ureaplasma diversum — оппортунистический патоген крупного рогатого скота, способный к колонизации репродуктивной и респираторной систем. В большинстве случаев носительство уреоплазм как в репродуктивном, так и в респираторном тракте протекает бессимптомно. Носительство в респираторном тракте более характерно для молодняка, в то время как дистальные отделы репродуктивного тракта уреоплазмы заселяют преимущественно взрослых животных. Целью данного исследования было сравнение распространённости *U. diversum* среди нетелей и коров различного возраста в рамках одного животноводческого предприятия. Для оценки частоты распространения носительства *U. diversum* среди коров и нетелей у животных были отобраны мазки с поверхности слизистых оболочек преддверия влагалища. Выявление *U. diversum* в полученном клиническом материале проводилось методом ПЦР в реальном времени. В результате исследования было установлено, что распространённость носительства значительно выше среди

нетелей (75%), чем среди взрослых коров (56,25%). При этом среди взрослых коров частота носительства значительно снижается с увеличением числа отёлов. Полученные результаты указывают на высокую значимость контактного пути передачи *U. diversum*, поскольку основная часть носителей уреоплазм являлась нетелями, которым ранее не проводилось осеменения. Кроме того, согласно полученным данным, при оценке распространённости носительства *U. diversum* среди коров следует учитывать возрастную структуру исследуемой выборки, поскольку этот фактор может оказать выраженное влияние на результат эпизоотологического исследования.

ВВЕДЕНИЕ

Ureaplasma diversum является оппортунистическим патогеном крупного рогатого скота (КРС), вызывающим заболевание, ведущие к существенному снижению репродуктивных качеств. Однако бессимптомное носительство *U. diversum* является достаточно распространённым в поголовье КРС в различных странах. В Бразилии инфицированность коров уреоплазмами составляет в различных регионах 13%-46,42% [1; 2]. В Австрии распространённость носительства *U. diversum* несколько ниже и составляет 36% [3], во Франции — 40% [4].

При оценке факторов риска колонизации половой системы коров *U. diversum* было отмечено, что чаще уреоплазмы выявляются у животных в хозяйствах с плохими санитарными условиями в доильных помещениях, а пополнение поголовья в значительной мере происходит путём приобретения скота в других хозяйствах [5]. Также установлено, что в хозяйствах, где воспроизведение поголовья происходит путём бесконтрольного скрещивания, инфицированность *U. diversum* животных, включая молодняк, может достигать 100% [6]. Было отмечено, что различные породы КРС отличаются разной восприимчивостью к *U. diversum*, в частности носительство более распространено среди коров джерсейской породы, чем среди коров голштинской породы [7].

Для молодняка КРС, как и для взрослых животных, характерно носительство уреоплазм репродуктивной системе. При исследовании тёлочек из поголовья хозяйств, расположенных в Австралии, носительство в репродуктивной системе отмечалось у 35% животных [8], что со-

поставимо с показателем частоты носительства *U. diversum* в поголовье взрослого КРС на этом континенте. Однако данных о распространении носительства в различных возрастных группах КРС в настоящее время недостаточно.

Целью данного исследования было оценить распространённость носительства *U. diversum* в репродуктивной системе среди различных возрастных групп коров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Клинические образцы

Исследуемую группу составляли коровы (n=32) и нетели (n=20). С целью исследования были взяты мазки с поверхности слизистых оболочек преддверия влагалища (52 образца). Забор материала у коров проводился в первые две недели после отёла. Материал отбирался с помощью зондов-тампонов. Забор мазка из преддверия влагалища проводился в области нижнего свода влагалища с захватом области ямки клитора и локализации патологических изменений при их наличии.

Непосредственно после отбора зонды-тампоны помещались в 1,5 мл среды “УРЕАПЛАЗМА СРЕДА” (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера) для поддержания жизнеспособности уреоплазм до замораживания материала.

2.2. Выделение ДНК

Перед выделением ДНК зонд-тампон извлекался из транспортной среды. Транспортную среду в полном объёме переносили в микроцентрифужную пробирку типа эппендорф объёмом 1,5 мл. Образец концентрировали центрифугированием 5 минут при 14 000 g на центрифуге “MiniSpin” (Eppendorf, Германия).

Надосадочную жидкость удаляли, осадок на дне пробирки использовали для выделения ДНК. Выделение ДНК из проводилось с помощью набора “ДНК-сорб-В” (ФБУН НИИ эпидемиологии, Москва) согласно инструкции.

2.3 ПЦР в реальном времени

Для выявления ДНК *U. diversum* применялась тест-система для ПЦР в реальном времени “*Ureaplasma diversum* Amp” (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера). Постановку реакции проводили согласно инструкции. Для проведения реакции был использован амплификатор CFX96 (Bio-Rad, США). Детекция накопления специфического продукта проводилась по каналу FAM.

2.4. Статистический анализ

Статистическая обработка результатов исследований проводилась с использованием электронных таблиц Microsoft® Office Excel. Для оценки различий между выборками был применён t-критерий Стьюдента. Для оценки взаимосвязи показателей использовался коэффициент корреляции Пирсона

РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Характеристика исследуемых групп.

Для исследования была отобрана группа из 32 коров. Отбор мазков с поверхности слизистой оболочки преддверия влагалища проводился через 1-21 день после отёла. Образцы от 8 животных были получены после первой стельности, от 13 животных — после 2 стельности, от 11 животных — после трёх и более стельностей. Потомство, полученное при предшествующем забору клинических образцов отёла, было жизнеспособным.

Группа нетель включала 20 голов, отобранных из поголовья случайным образом.

Все исследованные животные содержались в одном хозяйстве. Нетели содержались в отдельном здании, обособленном от мест содержания молодняка и коров старшего возраста. На момент отбора материала все обследованные коровы содержались в родильном отделе хозяйства. Взятие мазков проводилось в

помещениях, где животные содержались на момент проведения исследования.

3.2. Распространённость носительства *U. diversum* среди нетель и взрослых коров различного возраста.

При исследовании мазков с поверхности слизистых оболочек преддверия влагалища, полученных от 20 нетель, методом ПЦР в реальном времени, носительство *U. diversum* было обнаружено в 15 случаях (75%). Носительство *U. diversum* в репродуктивном тракте взрослых коров отмечалось реже и составило 18 случаев из 32 (56,25%).

При этом в группе животных, у которых материал отбирался после первой стельности частота носительства *U. diversum* составляла 87% (7 из 8 случаев), среди коров, обследованных после второй стельности, частота носительства *U. diversum* отмечалась реже и составила 53,8% (7 из 13 случаев), а в группе коров, обследованных после трёх и более стельностей составила 36,6% (4 из 11 случаев). Таким образом, отмечалась тенденция к снижению частоты носительства *U. diversum* в исследованных группах коров старшего возраста (таблица 1).

3.3. Связь распространённости носительства *U. diversum* с возрастной структурой исследуемой группы.

При сравнении частоты носительства *U. diversum* в группах коров, разделённых по показателю числа стельностей (от 0 до 7) было установлено, что между числом случаев носительства *U. diversum* и количеством отёлов у коров в оцениваемой группе существует выраженная обратная связь ($r=0,83$, $p<0,01$).

Сопоставление среднего числа стельностей у группы животных, в преддверии влагалища которых была обнаружена *U. diversum* и группы, в которой носительства *U. diversum* выявлено не было, также показало, что среднее число стельностей у носителей *U. diversum* значительно ниже (2,2 стельности), чем у коров, не являющихся носителями *U. diversum* (3,2 стельности), $p < 0,05$.

ОБСУЖДЕНИЕ

U. diversum широко распространена в поголовье КРС в различных странах. Как

Таблица 1
Распространение носительства *U. diversum* среди коров различных возрастных групп

Число стельностей в группе	Количество обследованных животных	Количество случаев колонизации <i>U. diversum</i>	Частота носительства <i>U. diversum</i>
0 (нетели)	20	15	75%
1	8	7	87 %
2	13	7	53,8 %
3	2	1	50%
4	3	1	33%
5	2	0	0%
6	3	1	33%
7	1	1	100%

правило, носителями являются более 20% поголовья. Однако показатели инфицированности поголовья КРС *U. diversum* могут значительно варьировать как между странами, так и внутри страны на животноводческих предприятиях, расположенных относительно близко [1, 2, 9].

Были выявлены различные факторы, влияющие на распространение *U. diversum* в поголовье КРС, такие как порода, условия содержания, способ гормональной стимуляции и другие. Также было показано, что носителями чаще являются взрослые животные, чем молодняк [10]. В данном исследовании была проведена оценка распространённости носительства *U. diversum* в различных возрастных группах коров, показавшая, что коровы старшего возраста реже являются носителями *U. diversum*. Таким образом, на показатель частоты носительства *U. diversum* может оказать влияние возрастная структура поголовья, а также возрастная структура группы, на основании обследования которой делается заключение о

распространённости носительства *U. diversum* в данном поголовье.

Согласно полученным результатам, что носительство чаще всего встречается среди нетелей, и коров, перенесших одну стельность. В старших возрастных группах доля инфицированных животных значительно снижается. Выраженное снижение частоты носительства *U. diversum* в преддверии влагалища наблюдается в исследуемой выборке у коров после второй стельности. При этом между числом отёлов и частотой носительства в соответствующей возрастной группе существует выраженная отрицательная корреляция.

Высокая частота носительства *U. diversum* среди нетелей указывает на значимость контактного пути распространения *U. diversum*. Контактный путь заражения может осуществляться при родах, при этом *U. diversum* сохраняется в организме и колонизирует репродуктивную систему потомства. Также описано рас-

пространение *U. diversum* через объекты окружающей среды. Не исключена передача уреаплазм при контактах между животными [11].

На основании полученных данных можно рекомендовать проведение оценки частоты носительства *U. diversum* в поголовье КРС с учётом возрастной структуры обследуемой группы. Преобладание в исследуемом поголовье нетелей и коров после первого отёла может привести к получению завышенных относительно других исследуемых хозяйств показателей частоты носительства. При этом полученные показатели будут следствием высокого числа более молодых животных в поголовье, а не сложившейся неблагоприятной эпизоотической обстановки.

THE PREVALENCE OF *U. DIVERSUM* CARRIAGE IN DIFFERENT AGE GROUPS OF CATTLE.

A.N. Vaganova - Researcher, Laboratory of Molecular Biology, Department of New Technologies, OА Freilikhman - Candidate of Biological Sciences, Head. lab, laboratory of molecular biological technologies, department of new technologies, S.V. Borisenko - candidate of veterinary sciences, senior researcher, laboratory of immunochemical technologies, department of new technologies, V.V. Roca - Candidate of Biological Sciences, senior researcher, laboratory of biopreparations, V.N. Verbov - candidate of chemical sciences, department head, department of new technologies (Saint-Petersburg Pasteur Institute).

ABSTRACT

Ureaplasma diversum is an opportunistic pathogen of cattle, it is capable to colonize reproductive and respiratory systems. The most of ureaplasma carriage cases both in the reproductive and the respiratory tract are asymptomatic. Respiratory tract carriage is more specific for calves, while the ureaplasma carriage in the distal parts of the reproductive tract is more frequent in adult cattle. The purpose of this study was to compare the prevalence of *U. diversum* among heifers and cows of different ages within the single cattle-breeding farm. To assess *U. diversum* carriage frequency among cows and heifers

smears from the surface of the mucous membranes of the vestibule of vagina were collected. Detection of *U. diversum* in the obtained clinical material was carried out by real-time PCR. As the result, the study found that the prevalence of carriage is significantly higher among the heifers (75%) than in adult cows (56.25%). At the same time, among adult cows the carrier frequency decreases significantly with increasing the number of calves. The results indicate a high significance of the contact pathway for the transmission of *U. diversum*, since the high frequency of the ureaplasma carriage in heifers that had not previously undergone insemination. In addition, they are consistent with data on the possibility of developing protective mechanisms against colonization with ureaplasmas. It is possible that the transferred diseases lead to the formation of weak immunity to repeated infection of *U. diversum*, therefore the frequency of carriage among young cows is higher than in older age groups. In addition, according to the obtained date, it is necessary to take into account the age structure of the group for assessment the prevalence *U. diversum* carriage in the female cattle, since this factor may have a pronounced effect on the result of the epizootic examination.

ЛИТЕРАТУРА

- 1.Santos S.B., Pinheiro-Júnior J.W., Mota A.R., Santos A.S., Alves B.H.L.S., Oliveira J.M.B., Silva L.B.G., Mota R.A. / Recovery of Mollicutes from the reproductive tract of dairy cattle in the state of Pernambuco, Brazil // *Pesq. Vet. Bras.* — 2015. — V.35, N.6 — P. 491-496.
- 2.Marques L.M., Amorim A.T., Martins H.B., Rezende I.S., Barbosa M.S., Lobão T.N., Campos G.B., Timenetsky J. / A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Ureaplasma diversum* // *Vet Microbiol.* — 2013. — V.167, N.3-4. — P.670-674.
- 3.Petit T., Spergser J., Aurich J., Rosengarten R. / Prevalence of Chlamydiaceae and Mollicutes on the genital mucosa and serological findings in dairy cattle // *Vet Microbiol.* — 2008. — V.127, N.3-4. — P. 325-333.

4. Le Grand D., Poumarat F., Martel J.L. / Genital *Ureaplasma diversum* infection: investigations in cattle in France // *Vet Res.* — 1995, — V.26, N.1. — P.11-20.
- Nascimento-Rocha J.M., Oliveira B.D.F., Arnhold E., Pôrto R.N.G., Lima S.F., Gambarini M.L. / Assessment of cow and farm level risk factors associated with *Ureaplasma diversum* in pasture-based dairy systems - A field study // *An Acad Bras Cienc.* — 2017. — V.89, N.3. — P. 1779-1783.
- Reid SW, Madill DG, Vreugdenhil AH. / Ontario. *Ureaplasma* vulvovaginitis and infertility in eight southern Ontario dairy herds // *Can Vet J.* — 1989. — V.30, N.3. — P.255.
- León B.A., Campos E., Bolaños H., Caballero M. / Risk factors for *Ureaplasma diversum* infections in cattle of a tropical environment // *Rev Biol Trop.* — 1995. — V.43, N.1-3. — P.21-25.
- Smith A., Chousalkar K.K., Chenoweth P.C. / Polymerase chain reaction for detection of *Ureaplasma diversum* from urogenital swabs in cattle in Australia // *Aust Vet J.* — 2012. — V.90, N.7. — P. 275-276.
- Petit T., Spersger J., Aurich J., Rosengarten R. / Examination of semen from bulls at five Austrian artificial insemination centres for chlamydiae and mollicutes // *Vet Rec.* — 2008. — V.162, N.24. — P.792-793.
- ter Laak E.A., Noordergraaf J.H., Boomsluiter E. / The nasal mycoplasmal flora of healthy calves and cows // *Zentralbl Veterinarmed B.* — 1992. — V.39, N.8. — P.610-616.
- Nicholas R. *Mycoplasma Diseases of Ruminants* // Nicholas R., Ayling R., McAuliffe L. — CABI, Wallingford. — 2008. - 239 p.

УДК 579.62 DOI: 10.17238/issn2072-2419.2018.3.22

ОЦЕНКА КОЛОНИЗАЦИИ *UREAPLASMA DIVERSUM* РЕПРОДУКТИВНОЙ И РЕСПИРАТОРНОЙ СИСТЕМ КОРОВ

Ваганова А. Н., мл. научный сотрудник, лаборатория молекулярно биологических технологий, Отдел новых технологий, Фрейлихман О. А., к. б. н., зав. лаб., лаборатория молекулярно-биологических технологий, отдел новых технологий, Борисенко С. В., к. вет.н., старший научный сотрудник, лаборатория иммуно-химических технологий, отдел новых технологий, В.В. Рока, к. б. н., старший научный сотрудник, лаборатория биопрепаратов, Отдел новых технологий, Вербов В.Н., к. х.н., зав. отделом, Отдел новых технологий (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера).

Ключевые слова: *Ureaplasma diversum*, уреаплазмоз КРС, заболевания репродуктивной системы КРС, ПЦР. **Key words:** *Ureaplasma diversum*, ureaplasmosis of cattle, reproductive diseases of cattle, PCR.

РЕФЕРАТ

Заболевания крупного рогатого скота, ассоциированные с *Ureaplasma diversum* ведут к экономическому ущербу, обусловленному бесплодием, абортными и рождением ослабленного потомства. *U. diversum* способна к колонизации слизистых оболочек репродуктивного и респираторного тракта взрослых животных и молодняка, при этом в большинстве случаев носительство протекает бессимптомно, что затрудняет контроль распространения инфекции. Целью данного исследования была оценка носительства *U. diversum* в носовой полости, влагалище и преддверии влагалища у взрослых коров. Для исследования были отобраны мазки с поверхности слизистых оболочек соответствующих отделов репродуктивной и респираторной систем у 32 животных. С целью выявления *U. diversum* в исследуемом материале применялась ПЦР в реальном времени. Наиболее