

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

распространённым вариантом носительства *U. diversum* была колонизация преддверия влагалища, выявленная у 48% обследованных животных. Однако ДНК *U. diversum* также выявлялась во влагалище и носовой полости обследованных коров. Было показано, что носительство уреоплазм в преддверии влагалища и носовой полости ассоциировано с колонизацией влагалища, а также, что колонизация респираторного тракта чаще выявляется у животных, являющихся носителями уреоплазм в половой системе. Полученные данные позволяют рекомендовать использование мазков из преддверия влагалища в качестве исходного материала при контроле данной инфекции. Носительство *U. diversum* в преддверии влагалища взрослых коров является фактором риска заражения молодняка при родах, а также колонизации других отделов репродуктивной системы, в том числе при искусственном осеменении.

ВВЕДЕНИЕ

Ureaplasma diversum считается оппортунистическим патогеном [1]. Тем не менее, заражение этими уреоплазмами может приводить к выкидышам и рождению ослабленного потомства, а также к развитию пневмонии у телят [2]. Часто носительство этих уреоплазм в органах мочеполовой системы взрослого крупного рогатого скота (КРС) протекает бессимптомно [3; 4]. Уреоплазмы с равной частотой выявляются у здоровых и у больных животных, вне зависимости от пола [4; 5; 6].

Уреоплазмы чаще выделяются из образцов, взятых с поверхности слизистой оболочки наружных половых органов коров, чем из цервикального мазка. Воспалительные процессы, вызываемые ими, также обычно локализованы в области наружных половых органов, и только 2% случаев приходится на цервициты [7]. При этом уреоплазмы могут при беременности проникать в оболочки плода, вызывая аборт [8].

Помимо мочеполовой системы, *U. diversum* колонизирует респираторный тракт, где также возможно бессимптомное носительство. Активный рост уреоплазм в бронхах и альвеолах лёгких телят приводит к развитию пневмонии. Отмечено, что у телят с пневмонией *U. diversum* выделяется из носовой полости в шесть раз чаще, чем у здорового молодняка [9].

Для выявления уреоплазм применяются как культуральные, так и молекулярно-биологические методы. Культуральные методы идентификации основаны на био-

химических свойствах микроорганизма (защелачивание среды при росте в присутствии мочевины). Для повышения селективности питательных сред используют смеси антибиотиков и противогрибковых соединений. Однако культуральный метод с использованием жидких питательных сред обладает низкой специфичностью при использовании для исследования животных. В связи с этим для выявления *U. diversum* применяют методы ПЦР и ПЦР в реальном времени [4,6].

Целью данного исследования была оценка распространённости колонизации *U. diversum* половой и респираторной систем у коров с использованием ПЦР в реальном времени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Клинические образцы

Исследуемую группу составляли коровы (n=33) без симптомов респираторных заболеваний и инфекций репродуктивной системы. С целью исследования были взяты мазки с поверхности слизистых оболочек носовой полости (32 образца), преддверия влагалища (27 образцов) и влагалища (32 образца). Материал отбирался с помощью зондов-тампонов. Для забора мазка из носовой полости зонд-тампон вводился на глубину 12-14 см. Забор мазка из преддверия влагалища проводился в области нижнего свода влагалища, при заборе мазка из влагалища зонд вводился на глубину 12-14 см. Непосредственно после отбора зонды-тампоны помещались в 1,5 мл среды "УРЕАПЛАЗМА СРЕДА" (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им.

Пастера) для поддержания жизнеспособности уреаплазм 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-Экстрен" (ООО "Синтол", 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 U-критерий Манна-Уитни. Для оценки взаимосвязи показателей использовался коэффициент корреляции Пирсона

РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Распространённость *U. diversum* в мазках с поверхности слизистых оболочек носовой полости и половых органов

При исследовании распространённости носительства уреаплазм в респираторном тракте, число животных, в носовой полости которых выявлялась ДНК *U. diversum*, составило 9 из 32 (28,1%).

При исследовании мазков из преддверия влагалища ДНК *U. diversum* была выявлена в 13 из 27 образцов (48%). Частота выявления *U. diversum* в мазках из

влагалища была ниже и составила 11 случаев выявления в 32 образцах (34%). При этом у 8 (27%) животных было отмечено присутствие уреаплазм в мазках из обоих отделов полового тракта, у одного животного (4%) носительство было обнаружено только во влагалище, у трёх животных (11%) присутствие уреаплазм было установлено только в преддверии влагалища.

3.2 Оценка риска колонизации органов половой системы при носительстве уреаплазм в респираторном тракте

Количество случаев сочетанной колонизации респираторного и полового тракта составило 8 из 27 (30%), в одном случае (3,8%) наблюдалась только колонизация носовой полости, в 8 случаях (30%) колонизация по крайней мере одного образца их полового тракта без сопутствующей колонизации респираторного тракта (учитывались только те животные, для которых были доступны мазки из носовой полости, преддверия влагалища и влагалища, 27 голов).

Оценка различий по частоте выявления колонизации полового тракта между животным с колонизацией респираторного тракта и без колонизации респираторного тракта показало, что колонизация полового тракта и преддверия влагалища достоверно чаще наблюдается у животных, являющихся носителями уреаплазм в носовой полости ($U_{Эмп} = 48, p \leq 0.05$, $U_{Эмп} = 56.5, p \leq 0.05$). В то же время статистической связи между колонизацией носовой полости и колонизацией влагалища отмечено не было ($U_{Эмп} = 56.5, p > 0.05$, табл. 1).

3.3 Оценка риска колонизации респираторного тракта при носительстве уреаплазм в половой системе

Оценка различий по частоте инфицированности респираторного тракта между животным с колонизацией любого отдела полового тракта и без колонизации полового тракта показало, что колонизация респираторного тракта достоверно чаще наблюдается у животных, являющихся носителями уреаплазм в половой системе ($U_{Эмп} = 28, p \leq 0.05$). При этом носительство уреаплазм в преддверии влагалища

Таблица 1
Распространённость носительства уреоплазм в половом тракте взрослого КРС при наличии или отсутствии носительства в носовой полости

Наличие носительства уреоплазм		Группа носителей (респираторный тракт)	Группа без носительства в респираторном тракте	Критерий U
Носительство в половых органах	Присутствует	89%	44%	U=48 p≤0.05
	Отсутствует	11%	56%	
Носительство в преддверии влагалища	Присутствует	75%	16%	U=27 p≤0.05
	Отсутствует	25%	36%	
Носительство во влагалище	Присутствует	62%	37%	U=46 p>0.05
	Отсутствует	38%	63%	

Таблица 2
Распространённость носительства уреоплазм во влагалище и респираторном тракте взрослого КРС при наличии или отсутствии носительства в преддверии влагалища

Наличие носительства уреоплазм		Группа носителей (преддверие влагалища)	Группа без носительства в преддверии влагалища	Критерий U
Носительство во влагалище	Присутствует	69%	8%	U=32,5 p≤0.01
	Отсутствует	31%	92%	
Носительство в респираторном тракте	Присутствует	31%	15%	U=71,5 p>0.05
	Отсутствует	69%	85%	

было ассоциировано и с колонизацией влагалища (UЭмп = 32.5, p≤0.01), но не колонизацией респираторного тракта (UЭмп = 71,5, p>0.05, табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Носительство *U. diversum* широко распространено среди КРС и не всегда при-

водит к развитию выраженной симптоматики, однако колонизация репродуктивного тракта уреоплазмами повышает риск рождения ослабленного потомства. Кроме того, носитель может являться источником инфекции, поэтому осуществление контроля носительства *U. diversum* пред-

ставляется целесообразной мерой для снижения экономического ущерба, наносимого животноводческим хозяйствам инфекционной заболеваемостью.

При исследовании образцов, полученных из различных отделов половой системы, было установлено, что носительство в преддверии влагалища более распространено, чем носительство во влагалище. Этот показатель в исследуемой группе был довольно высоким и составил 48%, что согласуется с литературными данными [10].

Наиболее вероятным объяснением может быть характерная для преддверия влагалища повышенная концентрация мочевины, поступающей вместе с мочой. Мочевина является основным соединением, которое служит источником энергии уреоплазм. Данные о более широком распространении носительства в преддверии влагалища по сравнению с носительством во влагалище также описаны в литературе [7].

Носительство *U. diversum* в репродуктивном тракте характерно для взрослых особей КРС, в то время как носительство в респираторном тракте более распространено у телят. В ходе данного исследования было установлено, что носительство уреоплазм в верхних отделах респираторного тракта может выявляться и у взрослых животных, при этом оно ассоциировано с носительством в органах репродуктивной системы. У телят носительство часто протекает бессимптомно [9]. В исследуемой выборке взрослых животных также не отмечалось симптоматики каких-либо заболеваний респираторного тракта.

Согласно полученным данным, персистенция уреоплазм в преддверии влагалища является наиболее частой формой носительства среди взрослого КРС. Присутствие микоплазм в преддверии влагалища ассоциировано как с их проникновением во влагалище, так и с колонизацией респираторного тракта. Таким образом, исследование образцов данного типа на предмет носительства уреоплазм является наиболее информативным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Осуществление контроля носительства *U. diversum* у КРС имеет существенное значение для снижения экономического ущерба, наносимого животноводческим хозяйствам инфекционной заболеваемостью, что обуславливает необходимость совершенствования лабораторной диагностики уреоплазмоза КРС с использованием ПЦР и ПЦР в реальном времени. Одним из аспектов такой оптимизации является выбор типа материала для исследования.

Так, для выявления ДНК *U. diversum* в клиническом материале от взрослого КРС целесообразно использовать мазки из преддверия влагалища. Этот не только чаще содержит ДНК *U. diversum*, чем мазки из преддверия влагалища, а также не содержит большого количества слизи, как мазки из верхних отделов влагалища и шейки матки, благодаря чему снижается риск ингибирования ПЦР из-за неполного удаления слизи из препарата ДНК.

ASSESSMENT OF *U. DIVERSUM* CARRIER STATE IN REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYSTEM OF COWS.

A.N. Vaganova - Researcher, Laboratory of Molecular Biology, Department of New Technologies, OA Freilikhman - Candidate of Biological Sciences, Head, 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

Cattle diseases associated with *Ureaplasma diversum* lead to economic burden caused by infertility, abortion and the birth of weakened offspring. *U. diversum* is capable to colonise the mucous membranes of the reproductive and respiratory systems cattle and calves, and most cases of carriage are asymptomatic, which makes it difficult to control the spread of the infection. The pur-

pose of this study was to evaluate frequency of *U. diversum* carriage in the nasal cavity, vagina and vestibule of vagina of adult female cattle. Smears from the surface of the mucous membranes of the reproductive and respiratory systems were sampled from 33 animals. Samples were tested for *U. diversum* DNA by real-time PCR. The most common variant of *U. diversum* carriage was the colonization of the vestibule of vagina, it was found in 48% of the examined animals. However, the DNA of *U. diversum* was also detected in the vagina and nasal cavity of the examined cattle. It was shown that the carriage of ureaplasma in the vestibule of vagina or nasal cavity was associated with colonization of the vagina, and that colonization of the respiratory tract is more often detected in animals that carry ureaplasma in the reproductive system. These data allow the use of smears from the vestibule of vagina as sample for the control and diagnosis of this infection. The carriage of *U. diversum* on the vestibule of the vagina in adult cows is a risk factor for calves infection during labor, as well as for colonization of other parts of the reproductive system, including contamination in artificial insemination.

ЛИТЕРАТУРА

1. Krieg N.R. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 4. 2nd Edition. // Krieg N.R., Staley J.T., Brown D.R. et al. — NY, Springer-Verlag. 2011. — 949 p.
2. Miller R.B., Ruhnke H.L., Doig P.A. et al. The effects of *Ureaplasma diversum* inoculated into the amniotic cavity of cows // *Theriogenol.* — 1983. — V. 20. N. 3. — P. 367–374.
3. Argue B., Chousalkar K.K., Chenoweth P.J. Presence of *Ureaplasma diversum* in the Australian cattle population // *Aust Vet J.* — 2013. — V. 91. N 3. — P. 99–101.
4. 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.
5. Смирнова Л. И., Темникова Л. В. Особенности проявления и диагностики уреоплазменной инфекции крупного рогатого скота в условиях промышленного животноводства // *Международный вестник ветеринарии.* — 2009. — № 3. — С.6–9.
6. Smirnova L.I., Temnikova L.V. Features of display and diagnostics infections of ureaplasma of a horned cattle in the conditions of animal industry // *International Bulletin of Veterinary.* — 2009. — N.3. — P. 6–9
7. Marques LM, Amorim AT, Martins HB et al. A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Ureaplasma diversum* // *Vet Microbiol.* — 2013. — V. 167. N 3-4. — P. 670–674
8. Virakul P., Hongyantarachai K., Mahavirorn K. et al. Genital Tract Lesions and the Isolation of *Ureaplasma Diversum* from the Reproductive Tract of Normal and Repeat Breeding Dairy Cows // *Thai J. Vet. Med.* — 2001. — V. 31. N. 4. — P. 33–40.
9. Weston J.F., Murray R., Borsberry S. Clinical Forum – Investigation of Bovine Abortion // *Livestock.* — V. 17. N. 5. — P. 15–24.
10. ter Laak EA, Noordergraaf JH, Boomsluiter E. The nasal mycoplasmal flora of healthy calves and cows // *Zentralbl Veterinarmed B.* — 1992. — V. 39. N. 8. — P. 610–616.
11. Argue B., Chousalkar K.K., Chenoweth P.J. Presence of *Ureaplasma diversum* in the Australian cattle population // *Aust Vet J.* — 2013. — V.91, N.3. — P. 99–101.