

Наталья Александровна Безбородова^{1✉}, Вероника Валентиновна Кожуховская²,
Антонина Павловна Порываева³, Евгения Николаевна Шилова⁴,
Елена Владимировна Печура⁵

1,2,3,4,5Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр УрО РАН, Екатеринбург, Россия

¹bezborodova@mail.ru

²tetramegon@yandex.ru

³app1709@inbox.ru

⁴adelaida.gurgenovna@mail.ru

⁵ev-pechura@bk.ru

ЗНАЧЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В ВЫЯВЛЕНИИ ИНФЕКЦИОННЫХ АГЕНТОВ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Целью нашей работы являлось выявление методом ПЦР бактериальных и вирусных инфекционных агентов в биологическом материале от коров и телят при разном клиническом проявлении заболеваний. Биологический материалы от животных поступали в ПЦР-лабораторию из 23 сельскохозяйственных организаций Уральского региона. Всего исследовано 808 проб, из них в 11,9 % случаев обнаружены геномы патогенов: ДНК *Mycoplasma bovis* в 2,4 % проб, РНК *Bovine virus diarrhoea* в 2,3 % проб, ДНК *Mycoplasma spp.* и *Chlamydia spp.* в 2 % проб, единично встречались *Mycoplasma bovigenitalium*, *Bovine herpesvirus (type 1)*, *Chlamydia abortus*, *Chlamydia pecorum*. Из 80 проб в 36,2 % биоматериалов были обнаружены специфические участки ДНК *Cl. difficile* – 31,2 % проб, *Cl. perfringens* – 20,0 % проб, *Cl. Difficile* + *Cl. Perfringens* – 25,0 % биопроб. У *Cl. difficile* были обнаружены токсины: CDT токсин у 41,0 % клостридий, токсин В у 6,0 % патогенов, реже токсин А. В отдельных случаях в биоматериале от погибших телят были обнаружены клостридии (*Cl. perfringens*, *Cl. difficile* В), что подтвердило диагноз – инфекционная анаэробная энтеротоксемия телят. В биоматериале от павших коров были выявлены бактерии (*E. coli*, *Salmonella enterica spp. entericaserogroup C (0:9, 2)*, ДНК *Cl. Perfringens* и *Cl. difficile* CDT), что подтвердило диагноз – острая кишечная инфекция. Все обнаруженные патогены были представлены в виде моноинфекции и единично в виде микст-инфекций. С помощью ПЦР удалось обнаружить ДНК и РНК инфекционных агентов при разном клиническом проявлении заболеваний бактериальной и вирусной этиологии в стадах крупного рогатого скота на территории Уральского региона.

Ключевые слова: ДНК, РНК, ПЦР-диагностика, *Mycoplasma spp.*, *Chlamydia spp.*, *Bovine herpesvirus 1*, *Bovine virus diarrhoea*

Для цитирования: Значение полимеразной цепной реакции в выявлении инфекционных агентов у крупного рогатого скота / Н.А. Безбородова [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2022. № 12. С. 127–133. DOI: 10.36718/1819-4036-2022-12-127-133.

Natalia Alexandrovna Bezborodova^{1✉}, Veronika Valentinovna Kozhukhovskaya²,
Antonina Pavlovna Poryvaeva³, Evgenia Nikolaevna Shilova⁴, Elena Vladimirovna Pechura⁵

^{1,2,3,4,5}Ural Federal Agrarian Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia

¹bezborodova@mail.ru

²tetramegon@yandex.ru

³app1709@inbox.ru

⁴adelaida.gurgenovna@mail.ru

⁵ev-pechura@bk.ru

THE IMPORTANCE OF PCR IN THE INFECTIOUS AGENTS DETECTION IN CATTLE

The aim of our work was to identify bacterial and viral infectious agents in biological material from cows and calves with different clinical manifestations of diseases by PCR. Biological materials from animals were sent to the PCR laboratory from 23 agricultural organizations in the Ural Region. A total of 808 samples were studied, of which genomes of pathogens were found in 11.9 % of cases: Mycoplasma bovis DNA in 2.4 % of samples, Bovine virus diarrhoea RNA in 2.3 % of samples, Mycoplasma spp. and Chlamydia spp DNA in 2 % of samples, Mycoplasma bovigenitalium, Bovine herpesvirus (type 1), Chlamydophila abortus, Chlamydophila pecorum were found singly. Out of 80 samples in 36.2 % of biomaterials, specific DNA sites of Cl. difficile were found – 31.2 % of samples, Cl. perfringens – 20.0 % of samples, Cl. difficile + Cl. perfringens – 25.0 % of biosamples. Toxins were found in Cl. difficile: CDT toxin in 41.0 % of clostridia, toxin B in 6.0 % of pathogens, less often toxin A. In some cases, clostridia (Cl. perfringens, Cl. difficile B) were found in the biomaterial from dead calves, which confirmed the diagnosis – infectious anaerobic enterotoxemia of calves. Bacteria (E. coli, Salmonella enterica spp. entericaserogroup C (0:9, 2), Cl. perfringens and Cl. difficile CDT DNA) were detected in the biomaterial from dead cows, which confirmed the diagnosis of acute intestinal infection. All detected pathogens were presented in the form of monoinfection and singly in the form of mixed infections. Using PCR, it was possible to detect DNA and RNA of infectious agents in various clinical manifestations of diseases of bacterial and viral etiology in cattle herds in the Ural Region.

Keywords: DNA, RNA, PCR diagnostics, Mycoplasma spp., Chlamydia spp., Bovine herpes virus1, Bovine virus diarrhoea

For citation: The importance of pcr in the infectious agents detection in cattle / N.A. Bezborodova [et al.] // Bulliten KrasSAU. 2022;(12): 127–133. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2022-12-127-133.

Введение. Возникновение любого заразного заболевания крупного рогатого скота сопровождается серьезными экономическими убытками. При обнаружении больных особей нужно немедленно проводить диагностические исследования на определение патогенного агента, вызывающего заболевание, и последующие своевременные лечебно-профилактические мероприятия [1, 2].

Инфекционные болезни вызывают микроорганизмы (вирусы, бактерии), попадающие в организм крупного рогатого скота различными путями. Ряд возбудителей обладают политропизмом и вызывают сходные клинические признаки, что затрудняет диагностику заболевания. Такие заболевания, как хламидийная и микоплазменные инфекции, инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота (ИРТ КРС), вирусная диарея крупного рогатого скота (ВД КРС) и клостридиозы,

протекают с поражением респираторной, репродуктивной, пищеварительной систем и имеют разные формы течения заболевания – от острых до латентных [3, 4]. Молодняк крупного рогатого скота переболевает чаще в острой форме с выраженными клиническими признаками, а у взрослого поголовья клиническая картина имеет стертый характер, заболевания протекают хронически и бессимптомно [5, 6].

Панель диагностических тестов по определению инфекционных заболеваний включает серологические, иммуноферментные, микробиологические, вирусологические и молекулярно-генетические исследования. Все перечисленные методы имеют специфические особенности [2, 7]. Метод ПЦР позволяет выявлять генетический материал некультивируемых патогенных агентов, идентифицировать геномы возбудителя, проводить типизацию и видовую идентификацию ви-

русных и бактериальных молекул при скрытых формах течения заболеваний [8].

Для сохранения эпизоотического благополучия в стадах крупного рогатого скота необходимо проведение мониторинговых исследований, которые позволяют определить спектр возбудителей, циркулирующих в стадах крупного рогатого скота, и своевременно провести профилактические мероприятия [1, 9]. На этом основаны программы оздоровительных и противоэпизоотических мероприятий для сохранения здоровья сельскохозяйственных животных и получения продукции животноводства [4, 10].

Цель исследований – выявление бактериальных и вирусных инфекционных агентов в биологическом материале от коров и телят методом ПЦР.

Материалы и методы. Исследования проводились в рамках Государственного задания Минобрнауки России в ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН. Биологические пробы от коров и телят были направлены на исследования из 23 сельскохозяйственных предприятий Уральского региона в период с 2017 по 2021 г. Биологические пробы: молоко, цельная кровь, соскобы из слизистой цервикального канала, с носовой полости, кусочки плаценты, кал; суставная жидкость, смывы с конъюнктивы и слизистой оболочки носовой полости у молодняка; образцы органов и тканей (кусочки гортани, носовой перегородки, легкого, трахеи) от павших телят; внутренние органы от абортированных плодов.

Биоматериал от животных, подозрительных на кластридиальную инфекцию, поступил в лабораторию в количестве 80 проб, отобранных из 10 ферм за период с 2020 по 2021 г. Биологический материал: навоз, смывы с раневых поверхностей копытцев; внутренние органы от погибших телят (кусочки печени, почек, сердца, легких и селезенки).

В общей сложности было исследовано 808 проб биоматериала.

В ПЦР использовали набор для выделения ДНК «Diatom DNA Prep 200» (Россия), набор для выявления ДНК *Mycoplasma* spp., *Mycoplasma bovis* и *Mycoplasma bovisgenitalium* (Россия), ИРТ крупного рогатого скота «Gen Pak DNA PSR Test BHV1» (Россия), ВД крупного рогатого скота (Россия), *Chlamydia* spp., *C. abortus*, *C. pecorum* (Россия), наборы «РеалБест-Вет ДНК *Clostridium difficile*/*Clostridium perfringens*», «РеалБест-Вет ДНК *Clostridium difficile* tcdA/tcdB/CDT» (Россия).

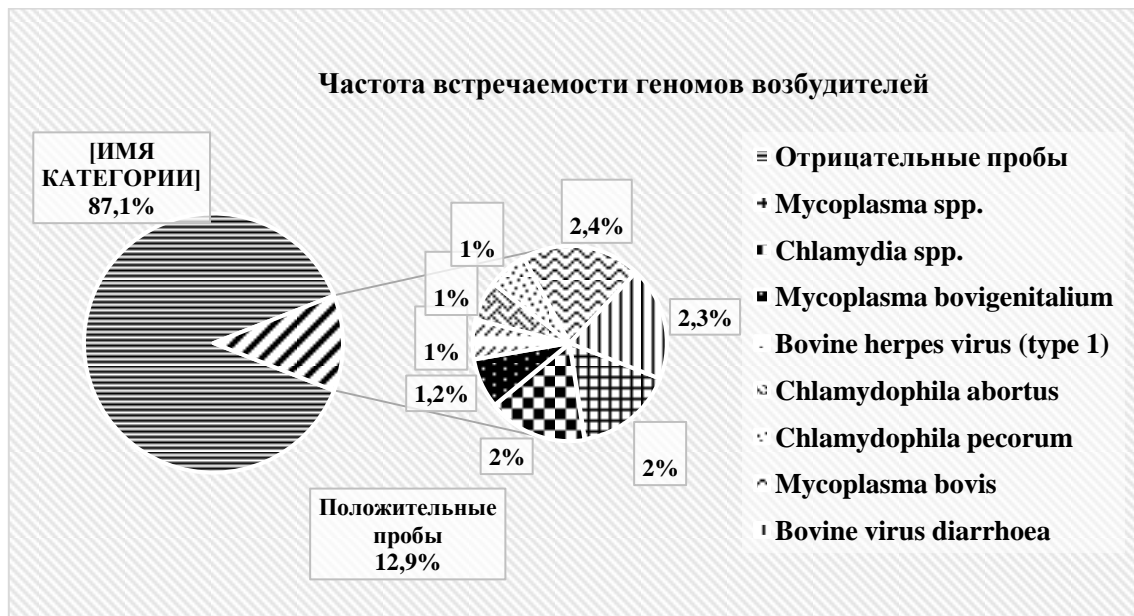
Аmplификацию проводили на Rotor-Gene 3000 (Австралия), QuantStudio 5 (США), SWIFT Maxi PROESCO (США). Электрофорез с применением мини-камер: Mini-Sub Cell GT (США), CHEMIDOC XRS+ (США).

Результаты и их обсуждение. Проведенные нами исследования 808 биоматериалов методом ПЦР показали, что ДНК и РНК патогенных возбудителей обнаружены в 96 пробах (12,9 %). ДНК *Mycoplasma bovis* выявлена в 2,4 % проб, РНК *Bovine virus diarrhoea* (BVD) – в 2,3 % проб, геномы *Mycoplasma* spp. и *Chlamydia* spp. – в 2 %, генетический материал *Mycoplasma bovisgenitalium*, *Bovine herpes virus (type 1)* (BHV-1), *Chlamydia abortus*, *Chlamydia pecorum* выявлен единично (рис.).

При анализе выявления возбудителей установлено, что в вагинальных соскобах от коров, в образцах последа и в материалах от абортированных плодов аминокислотные последовательности *Bovine herpes virus (type 1)* обнаружены в 1 % случаев от числа исследованных проб, РНК *Bovine virus diarrhoea* – в 2,3 % случаев.

Единично в пробах суспензии органов от абортированного плода и в последе от коровы присутствовали аминокислотные последовательности BVD и BHV-1. Что говорит о циркуляции вируса диареи крупного рогатого скота и герпес-вируса 1-го типа в сельскохозяйственных предприятиях Уральского региона в форме латентных, бессимптомных и хронических заболеваний.

В проведенных нами исследованиях биопроб от коров и телят на наличие ДНК бактерий рода *Mycoplasma* spp. диагностировали в 2 % случаев, геномы *Mycoplasma bovis* в 2,4 % случаев и *Mycoplasma bovisgenitalium* в 1,2 % случаев. *Mycoplasma bovis* была выделена из образцов синовиальной жидкости от телят, из смывов с носоглотки телят, вагинальных соскобов у коров и биоматериалов от абортированных плодов. ДНК *Mycoplasma bovisgenitalium* были обнаружены в смывах с носоглотки телят и цервикальных соскобах от коров в 1,2 % проб. Одновременное присутствие ДНК *Mycoplasma bovis*/*Mycoplasma bovisgenitalium* было обнаружено в 3 образцах (смыв с носоглотки теленка, соскоб с влагалища у коровы, суспензия из органов абортированного плода). Данные диагностических исследований говорят о том, что среди молодняка и взрослого поголовья крупного рогатого скота происходит постоянная циркуляция двух видов микоплазм – *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovisgenitalium*.



Спектр возбудителей, выделенных в образцах биоматериала (n = 808)

В 2 % проб были выделены геномы *Chlamydia spp.* из соскобов со слизистых оболочек влагалища от коров, абортировавших на разных сроках беременности. ДНК *Chlamydia abortus* встречали единично только из биологических проб от абортировавших коров (соскобы со слизистой оболочки влагалища и пробы плаценты). *Chlamydia pecorum* была обнаружена в 1 % проб вагинальных соскобов коров, в смывах с конъюнктивы и носоглотки у телят с признаками кератоконъюнктивита и пневмонии.

Нами выявлены микст-инфекции при разном сочетании патогенов. Так, в смывах носоглотки телят присутствовали ДНК *Mycoplasma bovis genitalium* + *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia pecorum* + BVD. В суспензии органов от абортировавшего плода выявлена ассоциация BHV-1 + BVD + *Mycoplasma bovis genitalium* + *Mycoplasma bovis*; в суспензиях органов от абортированных плодов *Mycoplasma bovis genitalium* + BVD, BHV-1 + BVD. Полученные данные свидетельствуют об активной циркуляции возбудителей бактериальных и вирусных инфекций в обследуемых стадах крупного рогатого скота.

В биологических пробах от животных в 36,2 % образцов были обнаружены специфические участки ДНК клостридий: *Cl. difficile* – 31,2 % проб, *Cl. perfringens* – 20,0 % проб, *Cl. Difficile* + *Cl. perfringens* – 25,0 % биопроб. Геномы *Cl. difficile* и *Cl. perfringens* чаще обнаруживали в биопробах кала – 23,2 %, в образцах молока – 8,0 %, реже в биоматериале от погибших коров и

телят – 5,0 %. Выявленные *Cl. difficile* обладали токсигенностью в 48,0 % случаев. Бинарный токсин (CDT) присутствовал у 41,0 % клостридий. Токсинотип В выявлен у 6,0 % анаэробов. Реже встречали токсинотип А, а также сочетание нескольких токсинотипов А/В/CDT в одной пробе в 6,0 % случаев, единично *Cl. difficile* А/В, А/CDT, В/CDT. Остальные *Cl. difficile* были отнесены к токсин-отрицательным.

В отдельном случае с помощью ПЦР-диагностики в биоматериале от погибших телят были обнаружены основные патогены – *Cl. Perfringens* и *Cl. difficile B*, что подтвердило диагноз – инфекционная анаэробная энтеротоксемия телят. В биоматериале от павших коров были выявлены бактерии *E. coli* и *Salmonella enterica spp. enterica serogroup C* (0 : 9, 2), а также ДНК *Cl. perfringens* и *Cl. difficile CDT*, что подтвердило диагноз – острая кишечная инфекция у погибших животных.

В пробах молока от коров с признаками воспалительного процесса молочной железы были обнаружены геномы *Cl. difficile* А/В/CDT – 31,2 % проб и *Cl. perfringens* – 12,5 % проб, ДНК *Staphylococcus spp.* в 40,0 % проб, *E. Coli / S. agalactiae* в 30,0 % проб, ДНК *S. aureus* в 26,6 % проб.

Проведенные нами лабораторные исследования показали высокую выявляемость клостридий в биоматериале. В некоторых образцах была

выделена полимикробная инфекция, которая включала аэробные и анаэробные бактерии.

Заключение. В результате проведенных ПЦР-исследований было выявлено, что в поступивших биообразцах присутствовали геномы возбудителей инфекционных заболеваний в 11,9 % случаев.

Наибольшее количество образцов биоматериала при обследовании коров с нарушением воспроизводства содержали геномы *Mycoplasma bovis* (в 2,4 % случаев) и BVD (в 2,3 % проб). В 2 % проб были выделены геномы *Chlamydia* spp. (*Chlamydia abortus* и *Chlamydia pecorum*) и ДНК бактерий рода *Mycoplasma* spp. (*Mycoplasma bovis* и *Mycoplasma bovis genitalium*). ДНК герпес-вируса первого типа была выявлена в 1 % проб. Также в пробах единично выявлено сочетание генетического материала нескольких инфекционных возбудителей: *Mycoplasma bovis* / *Mycoplasma bovis genitalium*; *Mycoplasma bovis genitalium* / *Chlamydia pecorum*; BHV-1 / BVD / *Mycoplasma bovis genitalium* / *Mycoplasma bovis*; *Chlamydia pecorum* / BVD; *Mycoplasma bovis genitalium* / BVD / BHV-1).

Полученные результаты показывают наличие циркуляции данных патогенов в молочных стадах Уральского региона.

При диагностике анаэробных инфекций в 36,2 % образцов от животных были обнаружены специфические участки ДНК *Cl. difficile* – 31,2 % проб, *Cl. perfringens* – 20,0 % проб, *Cl. Difficile* + *Cl. perfringens* – 25,0 % биопроб. *Cl. difficile* обладали токсигенностью в 48,0 % случаев. CDT-токсин присутствовал у 41,0 % клостридий. Токсинотип В выявлен у 6,0 % анаэробов. Единично токсинотип А. Остальные *Cl. difficile* были отнесены к токсин-отрицательным.

Таким образом, проведенные ПЦР-исследования подтверждают необходимость проведения постоянных мониторинговых исследований у крупного рогатого скота на наличие инфекционных патогенов. ПЦР-метод позволяет своевременно выявлять животных вирус- и бактерионосителей. Детализация этиологического пейзажа возбудителей инфекционных заболеваний крупного рогатого скота и выявление биологических особенностей инфекционных агентов обеспечат эффективность противоэпизоотических, лечебно-профилактических и оз-

доровительных мероприятий как в конкретном животноводческом предприятии, так и на территории субъекта в целом.

Список источников

1. Патоморфологические изменения в системе «мать-плацента-плод» у коров при хламидиозе / О.В. Соколова [и др.] // Ветеринария. 2020. № 12. С. 9–12.
2. Юров К.П., Гулюкин М.И. Контроль и пути оздоровления скота племенных хозяйств и племенных предприятий от инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи // Российская сельскохозяйственная наука. 2018. № 1. С. 59–63.
3. Красиков А.П., Рудаков Н.В., Заболотных М.В. Понятие паразитоценозов, смешанных и ассоциативных инфекций животных // Вестник ОмГАУ. 2016. № 4 (24). С. 158–165.
4. Нефедченко А.В., Глотова Т.И., Глотов А.Г. Комплексный подход к определению этиологической структуры респираторных болезней крупного рогатого скота в молочных хозяйствах // Вестник КрасГАУ. 2017. № 1 (124). С. 65–71.
5. Полимеразная цепная реакция в диагностике латентных, бессимптомных и хронических форм инфекционных заболеваний крупного рогатого скота / Н.А. Безбородова [и др.] // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2019. № 4. С. 30–33.
6. Патогенность нецитопатогенных изолятов вируса вирусной диареи-болезни слизистых оболочек для серонегативных телят / А.Г. Глотов [и др.] // Вопросы вирусологии. 2014. № 4 (59). С. 46–49.
7. Значение лабораторных исследований в системе эпизоотологической характеристики и оптимизации эпизоотологического надзора за острыми респираторными вирусными инфекциями крупного рогатого скота / Е.В. Печура [и др.] // Ветеринарный фармакологический вестник. 2020. № 4(13). С. 151–158.
8. Красиков А.П., Алексеева И.Г. Комплексная диагностика инфекционных болезней круп-

- ного рогатого скота // Электронный научно-методический журнал Омского ГАУ. 2015. № 1. С. 9.
9. Программы контроля инфекционных факторов, влияющих на репродуктивную функцию высокопродуктивных молочных коров / *И.А. Шкуратова* [и др.] // Ветеринария и кормление. 2020. № 2. С. 54–57.
 10. Сравнительная характеристика клинических проявлений генитальной формы инфекционного ринотрахеита у коров и нетелей в условиях специфической вакцинопрофилактики / *М.В. Ряпосова* [и др.] // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2017. № 3. С. 59–62.
 11. stvah // Vestnik KrasGAU. 2017. № 1 (124). С. 65–71.
 5. Polimeraznaya cepnaya reakciya v diagnostike latentnyh, bessimptomnyh i hronicheskikh form infekcionnyh zabozevanij krupnogo rogatogo skota / *N.A. Bezborodova* [i dr.] // Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii. 2019. № 4. С. 30–33.
 6. Patogennost' necitopatogennyh izolyatov virusa virusnoj diarei-bolezni slizistyh oboloček dlya seronegativnyh telyat / *A.G. Glotov* [i dr.] // Voprosy virusologii. 2014. № 4 (59). С. 46–49.
 7. Znachenie laboratornyh issledovanij v sisteme `epizootologicheskoy harakteristiki i optimizacii `epizootologicheskogo nadzora za ostrymi respiratornymi virusnymi infekcijami krupnogo rogatogo skota / *E.V. Pechura* [i dr.] // Veterinarnyj farmakologicheskij vestnik. 2020. № 4(13). С. 151–158.
 8. *Krasikov A.P., Alekseeva I.G.* Kompleksnaya diagnostika infekcionnyh boleznej krupnogo rogatogo skota // `Elektronnyj nauchno-metodicheskij zhurnal Omskogo GAU. 2015. № 1. С. 9.
 9. Programmy kontrolya infekcionnyh faktorov, vliyayuschih na reproduktivnuyu funkciyu vysokoproduktivnyh molochnyh korov / *I.A. Shkuratova* [i dr.] // Veterinariya i kormlenie. 2020. № 2. С. 54–57.
 10. Sravnitel'naya harakteristika klinicheskikh proyavlenij genital'noj formy infekcionnogo rinothraheita u korov i netelej v usloviyah specificheskoy vakcinoprofilaktiki / *M.V. Ryaposova* [i dr.] // Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii. 2017. № 3. С. 59–62.

References

1. Patomorfologicheskie izmeneniya v sisteme «mat'-placenta-plod» u korov pri hlamidioze / *O.V. Sokolova* [i dr.] // Veterinariya. 2020. № 12. С. 9–12.
2. *Yurov K.P., Gulyukin M.I.* Kontrol' i puti ozdorovleniya skota plemennyh hozyajstv i plemennyh predpriyatij ot infekcionnogo rinothraheita i virusnoj diarei // Rossijskaya sel'skohozyajstvennaya nauka. 2018. № 1. С. 59–63.
3. *Krasikov A.P., Rudakov N.V., Zabolotnyh M.V.* Ponyatie parazitocenzov, smeshannyh i associativnyh infekcij zhivotnyh // Vestnik OmsGAU. 2016. № 4 (24). С. 158–165.
4. *Nefedchenko A.V., Glotova T.I., Glotov A.G.* Kompleksnyj podhod k opredeleniyu `etiologicheskoy struktury respiratornyh boleznej krupnogo rogatogo skota v molochnyh hozyaj-

Статья принята к публикации 07.09.2022 / The article accepted for publication 07.09.2022.

Информация об авторах:

Наталья Александровна Безбородова¹, старший научный сотрудник отдела геномных исследований и селекции животных, кандидат ветеринарных наук

Вероника Валентиновна Кожуховская², младший научный сотрудник лаборатории микробиологических и молекулярно-генетических методов диагностики

Антонина Павловна Порываева³, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусных болезней, доктор биологических наук

Евгения Николаевна Шилова⁴, старший научный сотрудник лаборатории вирусных болезней, доктор ветеринарных наук

Елена Владимировна Печура⁵, старший научный сотрудник лаборатории вирусных болезней, кандидат ветеринарных наук

Information about the authors:

Natalia Alexandrovna Bezborodova¹, Senior Researcher, Department of Genomic Research and Animal Breeding, Candidate of Veterinary Sciences

Veronika Valentinovna Kozhukhovskaya², Junior Researcher, Laboratory of Microbiological and Molecular Genetic Diagnostic Methods

Antonina Pavlovna Poryvaeva³, Leading Researcher, Laboratory of Viral Diseases, Doctor of Biological Sciences

Evgenia Nikolaevna Shilova⁴, Senior Researcher, Laboratory of Viral Diseases, Doctor of Veterinary Sciences

Elena Vladimirovna Pechura⁵, Senior Researcher, Laboratory of Viral Diseases, Candidate of Veterinary Sciences

