DOI <https://doi.org/10.18551/rjoas.2017-10.45>

ГИСТОФИЛЁЗ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА **HISTOPHILOSIS OF CATTLE**

Капустин А.В.*, **Моисеева Н.В.**, **Лаишевцев А.И.**, **Лучко М.А.**, научные сотрудники
Kapustin A.V., Moiseeva N.V., Laishevtcev A.I., Luchko M.A., Researchers

**Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной
ветеринарии имени Я.Р. Коваленко, Москва, Россия**
All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine
named after Y.R. Kovalenko, Moscow, Russia

Яцентюк С.П., **Горбачева Н.С.**, научные сотрудники
Yatsentyuk S.P., Gorbacheva N.S., Researchers

**Всероссийский государственный центр качества и стандартизации
лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Россия**
All-Russian State Research Institute for Control Standardization and Certification
of Veterinary Preparations, Moscow, Russia

*E-mail: kapustin_andrei@mail.ru

АННОТАЦИЯ

В работе приведены данные об инфекционном заболевании крупного рогатого скота – гистофилёзе, зафиксированном на территории Российской Федерации. Описано клинико-морфологическое проявление данного заболевания у восприимчивых животных. Рассмотрены физико-биологические особенности изолята *Histophilus somni*, выделенного на территории Российской Федерации. При сравнении двух методов диагностирования заболевания было установлено, превосходство молекулярно-биологических методов над методами рутинной микробиологии в плане диагностики гистофилёза. Так в ходе проведения комплексного микробиологического исследования 186 образцов клинического и секционного материала был выделен всего 1 изолят *Histophilus somni*, что составило 0,53 %. При этом изолят был выделен из вагинальных смывов коровы, не оплодотворявшейся длительное время. Из тканей лёгких, сердечной мышцы, смывов с препуция, а также образцов семени, бактериологическими методами, возбудитель выделен не был.

ABSTRACT

The paper contains data on the infectious disease of cattle - histophilosis, recorded in the territory of the Russian Federation. A clinical and morphological manifestation of this disease in susceptible animals is described. The physicobiological peculiarities of *Histophilus somni* isolated in the territory of the Russian Federation are considered. When comparing the two methods of diagnosing the disease, it was established that the superiority of molecular biological methods over methods of routine microbiology in the diagnosis of histophilosis. So, during the complex microbiological study of 186 samples of clinical and sectional material, only one isolate of *Histophilus somni* was isolated, which was 0.53%. In this case, the isolate was allocated from the vaginal washings of the cow, not fertilized for a long time. Of the lungs, heart muscle, washings with prepuce, as well as seed samples, bacteriological methods, the causative agent was not isolated.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Крупный рогатый скот, диагностика, респираторные инфекции, эпизоотическое благополучие, клинические признаки, распространённость заболевания.

KEY WORDS

Cattle, diagnosis, respiratory infections, epizootic well-being, clinical signs, prevalence of the disease.

Инфекционные болезни сельскохозяйственных животных, вызванные бактериями семейства *Pasteurellaceae*, являясь широко распространёнными на территории Российской Федерации, часто не могут быть диагностированы. Причин этому несколько: во-первых, это связано с отсутствием структурированных данных о том или ином заболевании, позволяющих поставить предварительный диагноз на основе клинико-морфологических проявлений инфекции, и отсутствием чёткой последовательности действий, направленных на подтверждение диагноза лабораторными методами. Во-вторых, сложность постановки окончательного диагноза обуславливается отсутствием доступных средств, необходимых для проведения лабораторной диагностики. В-третьих, диагностика микробиологическими методами осложняется особенностями возбудителя, связанными с его низкой сохранностью *in vitro*, высокой чувствительностью к факторам внешней среды, а также особыми ростовыми требованиями. В качестве яркого примера данной ситуации стоит рассмотреть гистофилёз, возбудителем которого являются бактерии вида *Histophilus somni*.

Гистофилёз - инфекционное заболевание преимущественно жвачных видов животных, проявляющееся поражением органов респираторной и/или репродуктивной систем, а также сепсисом [4, 17]. До недавнего времени инфекция часто фиксировалась в странах северной и южной Америки, Европы, Африки, а также в Японии, Австралии, Новой Зеландии и т.д. [9, 13, 15, 21]. На территории Российской Федерации эта инфекционная патология официально фиксируется редко, что в свою очередь стоит объяснять отсутствием разработанной научно-технической документации, регламентирующей проведение лабораторной диагностики.

Согласно современной классификации возбудителем гистофилёза является вид *Histophilus somni*, относящийся к семейству *Pasteurellaceae*. Впервые *H. somni* был выделен от быков с инфекционным менингоэнцефалитом в Калифорнии в 1960 году и описан как «*Haemophilus* - подобный микроорганизм» [3, 14]. Поэтому в более ранней литературе этот вид имеет синонимичное название *Haemophilus somnus* [7, 10, 18, 22].

Histophilus somni - это неподвижная аэробная грамотрицательная коккобацилла, не обладающая способностью образовывать споры и капсулу. В соответствии с научной литературой возбудитель стоит рассматривать комменсалом нижних и верхних дыхательных путей, а также репродуктивной системы крупного рогатого скота. Но при этом возбудитель способен вызывать у крупного рогатого скота широкий спектр заболеваний, среди которых стоит отметить: менингоэнцефалит, миокардит, отит, мастит, заболевания кишечного тракта у крупного рогатого скота, овец и американского бизона, и эндометриты у коров в послеродовой период [1, 19].

Источником возбудителя инфекции являются больные животные, а также бактерионосители, которые выделяют возбудитель с биологическими жидкостями. Болезнь быстро распространяется среди животных, содержащихся в помещениях не соответствующих санитарным нормам. Возбудитель способен длительное время персистировать в организме восприимчивого животного, постепенно распространяясь по всему стаду. При этом само распространение инфекции в стаде зачастую происходит без проявления явных клинических признаков, что обуславливает сложность диагностики заболевания, основанной на клинико-морфологическом проявлении.

К гистофилёзу восприимчив крупный рогатый скот всех возрастных групп, но наибольший процент заболеваемости и летальности наблюдается у телят в возрасте 1-2 месяцев. У данной группы молодняка заболевание протекает в респираторной форме в виде воспаления лёгких с переменной лихорадкой, кашлем и т.д., но аналогичное проявление не исключено и у более взрослых животных на откорме [8].

Гистофилёз имеет 3 формы проявления заболевания, а именно:

1. Мочеполовая форма, сопровождающаяся поражением мочевыводящих путей и репродуктивных органов у коров, а также препуция у быков. Распространению патогена и передаче его здоровым животным способствуют маточные и вагинальные выделения, моча инфицированных животных. Как правило, такая форма проявления

болезни длительно остается не замеченной, однако при возникновении стресс-факторов может проявляться внутриутробной гибелью плодов и массовым бесплодием. Стоит отметить, что распространение возбудителя в стаде происходит как при естественном, так и при искусственном осеменении животных, так как возбудитель может находиться в семени производителей.

2. Респираторная форма проявляется поражением верхних и нижних дыхательных путей. У животных развивается воспаление лёгких, наблюдается лихорадка, отказ от корма, затруднённое дыхание, кашель. Если позволить инфекции распространиться, то поражается дыхательное горло и голосовые связки, а затем легкие, что ведет к пневмонии и быстрой гибели животного [12]. Пневмонии редко вызываются исключительно *Histophilus somni*, часто при этом возникает ассоциация с другими микроорганизмами, такими как *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica* [6, 11, 23].

3. Септическая форма развивается из-за заражения крови. Клинические признаки зависят от локализации возбудителя в организме животного, в то время как степень тяжести зависит от количества отмерших тканей в результате сгущения крови. После попадания в кровоток бактерии могут уйти от защитных механизмов организма и вызвать апоптоз эндотелиальных клеток. Это ведет к васкулиту и тромбозу, которые приводят к нейтрофильной инфильтрации и некрозу тканей в головном мозге, что проявляется нервными расстройствами. В тканях сердца это может вызвать миокардит с множественными инфарктами и некрозом. У животных с миокардитом болезнь развивается быстро, единственным клиническим проявлением может быть летальный исход. Миокардит диагностируют редко [16]. КРС, имеющий это заболевание, демонстрирует признаки сердечной недостаточности (непереносимость физических нагрузок, дыхание с открытым ртом, кашель и т.д.) [5, 20].

Начало инфекционного процесса, как правило, требует наличие предрасполагающих факторов, в роли которых могут быть стресс, первичное вирусное или бактериальное заболевание. В свою очередь стресс-факторы могут быть разделены на психологические и физические. В первом случае стресс вызывается страхом, лечебными манипуляциями, фиксацией животного. Возникновению физического стресса предшествует голод, жажда, усталость, скученность, нарушение зоогигиенических условий. Реакция на стрессовые факторы для каждого отдельного животного является сугубо индивидуальным процессом. Значение стресс-фактора при развитии патогенеза инфекционной болезни подтверждается множественными наблюдениями, свидетельствующими о резком начале массовых заболеваний после смены погодных или зоогигиенических условий. Кроме того, причиной возникновения повышенной чувствительности при стрессе можно считать естественное снижение иммунитета. В качестве первичных вирусных или бактериальных возбудителей, открывающих ворота инфекции для *Histophilus somni*, стоит рассматривать парагрипп и герпесвирусную инфекцию крупного рогатого скота, респираторно-синцитиальную инфекцию, аденовиروзы и реовирусы, а также микоплазмоз.

Гистофилез КРС в РФ ошибочно считается малозначимым инфекционным заболеванием и не отслеживается в ходе проведения государственного эпизоотического мониторинга, что обуславливает отсутствие современных отечественных данных о распространённости данного вида бактерий и вызываемом им заболевании.

Цель работы – изучение распространённости возбудителя гистофилёза в скотоводческих предприятиях Российской Федерации при использовании для диагностики микробиологических методов и методов молекулярной биологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование проводилось на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко», а также Федерального

государственного бюджетного учреждения «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов». Секционный и клинический материал для выделения возбудителя был получен из предприятий Московской, Тульской, Смоленской, Владимирской, Калужской, Тверской, Новгородской, Нижегородской, Белгородской, Орловской, Рязанской, Курской, Кировской, Тамбовской, Челябинской, Пензенской областей, Ставропольского и Краснодарского краев, Республики Мордовия.

При проведении комплексного микробиологического исследования, для выделения бактерий семейства *Pasteurellaceae*, были использованы: агар МакКонки, колумбийский агар, сердечно-мозговой агар, эугоник агар, эугоник бульон, бульон с бромкрезоловым пурпуром, мясо-пептонный агар, мясо-пептонный бульон, триптон-соевый бульон, среда для *Haemophilus CM0898B*, триптон соевый агар производства ООО «Himedia» (Индия) и фирмы «Oxoid» (Великобритания).

Микробиологическое исследование с целью обнаружения *Histophilus somni* проводили по следующей схеме: посев материала проводился методом отпечатка на питательную среду CM0898B с добавлением саплимента FD117, а также на шоколадный агар. Культивирование проводили в условиях 10%-ной CO₂ атмосферы в течение 48 часов.

Для изучения биохимических свойств, а также для родовой и видовой идентификации выделенных изолятов бактерий семейства *Pasteurellaceae* использовали следующие коммерческие тест системы: *RapID NF Plus Panel (R8311005)*, *API® NH*, *API® 20 E*, *API® 20 NE ID 32 E* с сопутствующими расходными принадлежностями и электронной базой для интерпретации полученного результата. Помимо коммерческих биохимических тест-систем были использованы углеводы в дисках для определения сахаролитических свойств выделенных изолятов: адонит, арабиноза, галактоза, D-глюкоза, дульцит, инозит, инулин, ксилоза, мальтоза, маннит, манноза, раффиноза, рамноза, салицит, сорбит, сахароза, трегалоза, фруктоза, целлобиоза производства ООО «Himedia».

ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени проводили с использованием набора *LSI VetMAX HISTOPHILUS SOMNI (Thermo Fisher, Франция)*. Для 23 образцов дополнительно проводили подтверждение результатов ПЦР секвенированием фрагмента генома возбудителя с использованием дополнительной пары праймеров, комплиментарных фрагменту гена 16 S *pPHK H. somni*. Секвенирование ПЦР-фрагментов осуществляли с использованием набора *Big Dye® Terminator v1.1. Cycle Sequencing Kit* на амплификаторе *GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystem, США)* и автоматическом секвенаторе *ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для достижения поставленной цели в период 2016-2017 гг. были проведены диагностические исследования 186 проб клинического и секционного материала (кусочки лёгких, сердечная мышца, вагинальные смывы и смывы с препуция) полученных от 145 животных разных возрастных, половых и физиологических групп, с признаками респираторных и репродуктивных поражений. Из 145 животных 76 голов были коровы или тёлки, длительное время не осеменявшиеся, 41 телёнок в возрасте 7-60 дней с признаками респираторной патологии, 28 бычков в возрасте 1,5-2 года. Поскольку клиничко-морфологическое проявление ряда заболеваний, вызванных бактериями семейства *Pasteurellaceae*, может иметь схожие черты, то при диагностике обращалось особое внимание на все представители данного семейства. Кроме этого исследованию было подвергнуто 222 образца стабилизированной спермы быков из отечественных и иностранных племенных центров. При этом исследование проб клинического и секционного материала проводилось комплексно для выявления бактерий семейства *Pasteurellaceae*, являющимися возможными возбудителями

респираторных инфекций. Микробиологические исследования образцов семени проводилось лишь с целью выделения *Histophilus somni*.

В ходе проведения бактериологического исследования секционного и клинического материала был выделен широкий спектр бактериальных агентов. Структура выделенной флоры приведена в таблице №1.

Таблица 1 – Структура бактериальной микрофлоры выделенной от крупного рогатого скота

Образец или ткань (количество)	Вид	Количество (%)
Вагинальные смывы (n=76)	<i>Histophilus somni</i>	1 (1,3)
	<i>Actinobacillus ureae</i>	1 (1,3)
Лёгкие (n=41)	<i>Pasteurella multocida</i>	23 (56,0)
	<i>Actinobacillus ureae</i>	2 (4,8)
	<i>Mannheimia haemolytica</i>	5 (12,2)
	<i>Bibersteinia trehalosi</i>	1 (2,4)
	<i>Mannheimia glucosida</i>	1 (2,4)
Сердечная мышца (n=41)	<i>Pasteurella multocida</i>	4 (9,7)
	<i>Actinobacillus ureae</i>	1 (2,4)
	<i>Mannheimia haemolytica</i>	2 (4,8)
Смывы с препуций (n=28)	-	-

Как видно из приведённых в таблице 1 данных, из 186 образцов, подвергнутых бактериологическому исследованию, был выделен всего один изолят *Histophilus somni*. Принадлежность изолята к данному виду была подтверждена при помощи нуклеотидного секвенирования. Культура была выделена из образца вагинальных смывов от коровы с хроническим эндометритом. При исследовании тканей лёгких и сердечной мышцы в преобладающем количестве случаев были выделены изоляты *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Actinobacillus ureae*, *Bibersteinia trehalosi* и *Mannheimia glucosida*.

При бактериологическом исследовании 222 проб семени, ни в одном случае возбудитель гистофилёза выделен не был, не смотря на то, что методом ПЦР ДНК возбудителя была обнаружена в 78,8% случаев.

Выделенный изолят *Histophilus somni* на колумбийском агаре с добавлением 5% дефибринированной крови барана, образовывал мелкие колонии диаметром до 1 мм при культивировании в условиях 10%-ной CO₂ атмосферы в течение 48 часов (рис. 1).

Рисунок 1 – Рост 48-ми часовой культуры *Histophilus somni* на кровяном агаре

Примечательным стало то, что рост культуры способствовал незначительному просветлению питательной среды вокруг колонии, слабо заметном при визуальном

осмотре (рис. 2). Для наглядности изображение с гемолизом было отредактировано в графическом редакторе благодаря функции «автотон» (рис. 3).

Рисунок 2 – слабый гемолиз гистофилюсов при обычной фотосъёмке

Рисунок 3 – слабый гемолиз гистофилюсов. Фото обработано в программе *Photoshop* с использованием функции автотон

Как видно на изображении №3, гистофилы проявляют неполный гемолиз на кровяной среде. При микроскопировании было обнаружено, что клетки данного вида - грамотрицательные тонкие палочки (рис. 4).

Рисунок 4 – морфологические и тинкториальные свойства *Histophilus somni* при окрашивании методом Грама и микроскопировании при 100x кратном увеличении

Как видно из фото №4, клетки *Histophilus somni* имеют типичные морфологические и тинкториальные свойства данного вида.

Все выделенные изоляты были сохранены в коллекции микроорганизмов ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко для дальнейшего изучения, в том числе для разработки отечественных средств специфической профилактики гистофилёза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время лабораторная диагностика гистофилёза проводится с помощью бактериологического и молекулярно-биологического методов [2]. При этом нами подтверждена высокая чувствительность ПЦР для выявления данного

возбудителя, ДНК *Histophilus somni* была обнаружена в 78,8% образцах спермы КРС при исследовании 222 образцов. ПЦР широко используется для выявления животных с клинической и скрытой формой заболевания, а также бактерионосителей. Данный метод, благодаря высокой чувствительности и специфичности может с успехом использоваться при проведении скрининговых исследований, как альтернатива выделению микроорганизма, т.к. из-за особых требований *Histophilus somni* к условиям культивирования, на основании рутинных микробиологических методов диагностика часто затруднительна.

Отсутствие своевременной диагностики приводит к широкому распространению инфекции в стаде. Совершенствование диагностики, в частности разработка методик на основе ПЦР, является очень актуальной задачей, позволяющей своевременно поставить диагноз и организовать систему мероприятий, предотвратив экономический ущерб, который складывается из гибели животных, снижения их продуктивности, развития бесплодия и т.д. Полученные данные подтверждают необходимость разработки методических указаний по лабораторной диагностике гистофилёза.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Andrews JJ, Anderson TD, Slife LN, Stevenson GW. Microscopic lesions associated with the isolation of *Haemophilus somnus* from pneumonic bovine lungs. *Vet Pathol.* 1985;22(2):131–6.
2. Angen Ø, Ahrens P, Tegtmeier C, Angen E, Ahrens P, Tegtmeier C. Development of a PCR test for identification of *Haemophilus somnus* in pure and mixed cultures. *Vet Microbiol.* 1998 Aug;63(1):39–48.
3. Brown WW, Griner LA, Jensen R. Infectious embolic meningo-encephalitis in cattle. *J Am Vet Med Assoc.* Not Available; 1956 Nov;129(9):417–21.
4. Bryan Markey, Finola Leonard, Marie Archambault, Ann Cullinane DM. *Haemophilus* and *Histophilus* species. In: *Clinical Veterinary Microbiology.* 2013. p. 349–54.
5. Guichon PT, Pritchard J, Jim GK. *Haemophilus somnus* myocarditis in a feedlot steer. *Can Vet J.* 1988;29(12):1012–3.
6. Haines DM, Moline KM, Sargent R a., Campbell JR, Myers DJ, Doig P a. Immunohistochemical study of *Hemophilus somnus*, *Mycoplasma bovis*, *Mannheimia hemolytica* and bovine viral diarrhea virus in death losses due to myocarditis in feedlot cattle. *Can Vet J.* 2004;45(3):231–4.
7. Harris FW, Janzen ED. The *Haemophilus somnus* disease complex (hemophilosis): a review. *Can Vet J.* 1989;30(10):816–22.
8. http://www.tgw1916.net/image_tem.html
9. Humphrey JD, Stephens LR. “*Haemophilus somnus*”: A Review. *Commonhealth Bur Anim Heal Vet Bull.* 1983;53(11):987–1004.
10. Janzen ED. Overview of histophilosis. In: *The Merck Veterinary Manual*, 10th edition. 2010.
11. Kapustin A.V., Laishevtcev A.I. Pasteurellosis of cattle caused by *Mannheimia haemolytica*// *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences.* 2016. Т. 52. № 4. С. 3-12.
12. Klima CL, Zaheer R, Cook SR, Booker CW, Hendrick S, Alexander TW, et al. Pathogens of bovine respiratory disease in North American feedlots conferring multidrug resistance via integrative conjugative elements. *J Clin Microbiol.* 2014;52(2):438–48.
13. Krishna Datt Bhatt // «Characterization of Antimicrobial and Metal Resistance in Contemporary and Historical clinical isolates of *Histophilus somni* from Feedlot cattle in Alberta », September, 2016
14. MacDonald DW, Christian RG CG. Infectious thromboembolic meningoencephalitis: literature review and occurrence in Alberta, 1969-71. *Can Vet Journal.* 1973;14(3):57–61.
15. Miller JJ, Handerek BP, Beasley BW, Olson ECS, Yanke LJ, Larney FJ, et al. Quantity and quality of runoff from a beef cattle feedlot in southern Alberta. *J Environ Qual.* 2005;33(3):1088–97.

16. O'Toole D, Allen T, Hunter R, Corbeil LB. Diagnostic exercise: Myocarditis due to *Histophilus somni* in feedlot and backgrounded cattle. *Vet Pathol.* 2009;46(5):1015–7.
17. O'Toole D, Sondgeroth KS. Histophilosis as a Natural Disease. In: *Current topics in microbiology and immunology.* 2015.
18. Orr JP. *Haemophilus somnus* infection: A retrospective analysis of cattle necropsied at the Western College of Veterinary Medicine from 1970 to 1990. *Can Vet J.* 1992;33(11):719–22.
19. Saunders JR, Thiessen W a., Janzen ED. *Haemophilus somnus* infections I. A ten year (1969-1978) retrospective study of losses in cattle herds in Western Canada. *Can Vet J.* 1980;21(4):119–23.
20. Schuh J, Harland R. Saskatchewan. *Haemophilus somnus* myocarditis versus thrombotic meningoencephalitis in western Canada. *Can Vet J.* 1991;32(7):439.
21. Sharifzadeh A., Doosti A., and Dehkordi P.G. Frequency of *Haemophilus somnus* in the semen of bulls in Iran as determined by polymerase chain reaction *Scientific Research and Essays* Vol. 6(6), pp. 1458-1460, 2011
22. Van Donkersgoed J, Janzen ED, Harland RJ. Epidemiological features of calf mortality due to hemophilosis in a large feedlot. *Can Vet J.* 1990;31(12):821–5.
23. Капустин А.В., Лаишевцев А.И., Ездакова И.Ю., Скворцов В.Н., Степанова Т.В., Гулюкин М.И. Диагностика пастерелллёза сельскохозяйственных животных, птиц и пушных зверей // Москва, 2016.

© 2017 by the authors. Licensee RJOAS, Orel, Russia. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>