DOI <https://doi.org/10.18551/rjoas.2017-10.47>

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПЦР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ В СПЕРМЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**
USING THE PCR METHOD TO IDENTIFY THE CAUSATIVE AGENTS OF INFECTIOUS
DISEASES IN CATTLE SPERM

Яцентюк С.П., Горбачева Н.С., Яралова Е.А., Козлова А.Д., научные сотрудники
Yatsenyuk S.P., Gorbacheva N.S., Yaralova E.A., Kozlova A.D., 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: pcr-lab@vgnki.ru

АННОТАЦИЯ

Образцы замороженной спермы от 217 отечественных и импортных быков были исследованы методом ПЦР на наличие фрагментов генома *Neospora caninum*, вируса герпеса КРС 1 и 4 типа, вируса диареи КРС, лейкоза КРС, вируса Шмалленберг, нодулярного дерматита, микроорганизмов рода *Mycoplasma*, *Brucella*, *Chlamydia*, *Campylobacter*, *Leptospira* а также *Histophilus somni*. Было показано присутствие в сперме КРС генетического материала вирусов герпеса КРС (0.92%). Проведенный анализ результатов ПЦР-исследований показал высокую частоту встречаемости *Histophilus somni*, микроорганизмов рода *Campylobacter* и *Mycoplasma* в стабилизированной сперме отечественного производства и поставляемой из других государств.

ABSTRACT

The results of the study of bull's semen used for artificial insemination are presented in the article. 217 samples of frozen semen from bulls of Russian and international origin were analyzed by PCR assays for genetic material of *Neospora caninum*, Bovine Herpesvirus types 1 and 4, Bovine viral diarrhea virus, Bovine leukemia virus, Schmallenberg virus, Lumpy skin disease virus, *Mycoplasma spp.*, *Brucella spp.*, *Chlamydia spp.*, *Campylobacter spp.*, *Leptospira spp.* and *Histophilus somni*. The results showed presence of Bovine Herpesvirus type 1 and Bovine Herpesvirus type 4 (0.92% semen samples) and high frequency of *Histophilus somni*, *Campylobacter spp.* and *Mycoplasma spp.* in artificially prepared semen that is used for artificial insemination.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Полимеразная цепная реакция, сперма КРС, искусственное осеменение, идентификация возбудителей.

KEY WORDS

PCR, cattle's semen, artificial insemination, pathogen identification.

При разведении крупного рогатого скота в настоящее время широко используются технологии искусственного осеменения коров спермой, полученной от быков-доноров из различных племенных центров. Современные технологии получения спермодоз предполагают использование глубокого замораживания и применения криопротекторов, что позволяет некоторым возбудителям инфекционных болезней сохранять жизнеспособность. Широкая продажа спермодоз племенных животных увеличивает потенциальные риски распространения инфекционных болезней. Национальные стандарты и требования к тестированию быков-производителей и контролю качества спермопродукции, как правило, разрабатывают на основе комплексной оценки, учитывающей статус страны по заболеванию и анализ здоровья

поголовья животных. Требования и правила контроля и мониторинга должны постоянно совершенствоваться и обновляться по мере поступления новой информации о патогенезе заболеваний, о циркулирующих штаммах известных возбудителей, используемых средствах специфической профилактики и методах диагностики, а также с учетом обнаружения новых возбудителей и/или появления информации об изменении роли ранее выявлявшихся и малоизученных патогенов [4].

На настоящий момент широкий спектр инфекционных агентов может быть обнаружен в сперме крупного рогатого скота [6, 9-12,15]. При оценке степени рисков, связанных с передачей инфекционных агентов через сперму, предназначенную для искусственного осеменения коров, согласно данным 1997 года, выделяют 3 категории [11]:

1 категория – инфекционные заболевания, для которых доказанной является степень риска передачи через сперму от умеренной до высокой. В данную категорию входят ящур, везикулярный стоматит, чума КРС, инфекционный ринотрахеит КРС, вирусная диарея КРС, туберкулез, кампилобактериоз, бруцеллез, трихомоноз, микоплазмоз, гистофилез. Высокая частота встречаемости в сперме КРС также показана для убиквитарных микроорганизмов (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*).

2 категория – заболевания, для которых существуют свидетельства о низкой степени риска передачи через сперму. К этой категории отнесены такие заболевания, как блутанг, лейкоз КРС, лептоспироз, эфемерная лихорадка КРС, болезнь Акабане.

3 категория - заболевания, для которых мало или нет информации о передаче через сперму, включающая как инфекции, для которых передача посредством искусственного осеменения вероятна и инфекции, для которых передача возбудителя через спермопродукцию маловероятна. В перечень данных заболеваний входят нодулярный дерматит, хламидиоз, инфекции, вызванные грибной микрофлорой, паратуберкулез, лихорадка долины Рифт, пастереллез, листериоз, контагиозная плевропневмония, анаплазмоз.

Со временем набор возбудителей, обнаруживаемых в сперме быков был пополнен *Ureaplasma diversum*, *Acholeplasma spp.*, *Arcanobacterium pyogenes* и *Neospora caninum* [16], а также пестивирусом Hobi-like (вирус диареи КРС 3 типа, BVD-3) [7-8] герпесвирусом 4 типа [13,15] и вирусом болезни Шмалленберг [18-19]. В отдельных работах [21] при проведении оценки опасностей, связанных с передачей возбудителей инфекций КРС со спермой, рассматриваются также вирус респираторно-синцитиальной инфекции КРС, вирус парагриппа-3 КРС, коронавирус КРС, а также микроорганизмы рода *Salmonella*.

В отношении оценки качества и безопасности спермы быков в России сейчас действует ГОСТ 26030 [1], согласно которому определение патогенных и условно-патогенных бактерий и грибов в спермодозах производится микробиологическим методом по ГОСТ ISO 8607 [2] и ГОСТ 32198, а методы определения вирусов и микоплазм не регламентированы. Для оценки существующих рисков и, следовательно, необходимости усовершенствования правил контроля спермопродукции актуальным является проведение исследований методом ПЦР для выявления инфекционных агентов.

Цель работы - оценка частоты встречаемости возбудителей болезней в спермопродукции КРС, предназначенной для искусственного осеменения молекулярно-генетическими методами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследовали 217 доз семени быков-производителей различных пород мясного и молочного направления, в том числе 103 спермодозы от быков из отечественных племенных центров, 114 – из иностранных племенных центров, включая 13 образцов спермы, разделенной по полу.

Выделение нуклеиновых кислот осуществляли наборами «ДНК-сорб-С», «Рибо-преп» («Amplisens», ФБУН ЦНИИЭ), а также наборами «Проба-ГС» и «Проба-НК» («ДНК-технология») и с помощью автоматической станции NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция).

При проведении ПЦР использовали наборы реагентов, представленные в таблице 1.

Таблица 1 – Наборы реагентов для ПЦР, использованные в работе

N п/п	Наименование набора	Детектируемый возбудитель	Формат детекции продуктов амплификации	Производитель набора
1	LSI VetMAX™ Neospora caninum	Neospora caninum	Гибридизационно-флуоресцентная в режиме «реального времени»	Life Technologies Corporation (Франция)
2	LSI VetMAX™ IBR gB	Вирус герпеса КРС 1 типа	Гибридизационно-флуоресцентная в режиме «реального времени»	Life Technologies Corporation (Франция)
3	LSI VetMAX™ Bovine Herpes Virus Type 4	Вирус герпеса КРС 4 типа	Гибридизационно-флуоресцентная в режиме «реального времени»	Life Technologies Corporation (Франция)
4	LSI VetMAX™ Histophilus somni	Histophilus somni	Гибридизационно-флуоресцентная в режиме «реального времени»	Life Technologies Corporation (Франция)
5	LSI VetMAX™ Campylobacter spp.	Виды рода Campylobacter	Гибридизационно-флуоресцентная в режиме «реального времени»	Life Technologies Corporation (Франция)
6	LSI VetMAX™ Campylobacter fetus	Campylobacter fetus	Гибридизационно-флуоресцентная в режиме «реального времени»	Life Technologies Corporation (Франция)
7	LSI VetMAX™ Mycoplasma bovis	Mycoplasma bovis	Гибридизационно-флуоресцентная в режиме «реального времени»	Life Technologies Corporation (Франция)
8	Тест-система "МИК-КОМ"	Виды рода Mycoplasma	Электрофоретическая детекция в агарозном геле	Amplisens (Россия)
9	Тест-система "ХЛА-КОМ"	Виды рода Chlamydia	Электрофоретическая детекция в агарозном геле	Amplisens (Россия)
10	Тест-система "РИНОКОР"	Вирус герпеса КРС 1 типа	Гибридизационно-флуоресцентная в режиме «реального времени»	Amplisens (Россия)
11	Тест-система "ЛЕЙКОЗ"	Вирус лейкоза крупного рогатого скота	Гибридизационно-флуоресцентная в режиме «реального времени»	Amplisens (Россия)
12	Тест-система «КАМ-БАК»	Campylobacter jejuni	Электрофоретическая детекция в агарозном геле	Amplisens (Россия)
13	Тест-система «SBV»	Вирус Шмалленберг	Гибридизационно-флуоресцентная в режиме «реального времени»	Amplisens (Россия)
14	Тест-система «ЛПС»	Патогенные виды рода Leptospira	Гибридизационно-флуоресцентная в режиме «реального времени»	Amplisens (Россия)
15	Тест-система «ВД»	Вирус диареи КРС	Гибридизационно-флуоресцентная в режиме «реального времени»	Amplisens (Россия)
16	Тест-система «Бру-ком»	Виды рода Brucella	Гибридизационно-флуоресцентная в режиме «реального времени»	Amplisens (Россия)
17	Набор для выявления ДНК вируса нодулярного дерматита КРС (Lumpy skin disease)	Вирус нодулярного дерматита	Гибридизационно-флуоресцентная в режиме «реального времени»	FractalBio (Россия)

В каждой ПЦР использовали контрольные образцы: отрицательный и положительный контроли ПЦР, а также отрицательный контроль экстракции РНК/ДНК. Реакцию амплификации для наборов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» проводили согласно инструкции производителя на приборах RotorGene 6000 и RotorGene Q (Corbett Research, Австралия, Qiagen, Германия). ПЦР с электрофоретической детекцией осуществляли с использованием амплификаторов «Терцик» производства «ДНК-технология».

Эффективность экстракции РНК/ДНК из образцов материала оценивали по прохождению реакции амплификации внутренних контролей (ВКО). В работе использовали два типа ВКО: экзогенный контроль, добавляемый при проведении этапа выделения ДНК и эндогенный контроль, которым служили фрагменты генома животного – хозяина, амплифицируемые в мультиплексной реакции вместе с искомой мишенью возбудителя.

Результаты амплификации в «реальном времени» интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией.

Электрофоретическую детекцию результатов амплификации проводили в 1,5% агарозном геле, содержащем бромистый этидий.

Продукты амплификации секвенировали с использованием специфичных праймеров. 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

Экстракцию нуклеиновых кислот проводили с использованием разных наборов для ручного выделения нуклеиновых кислот и автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG. Эффективность выделения оценивали по амплификации внутреннего экзогенного контроля при использовании тест-системы «Ринокор» (Amplisens) и внутреннего эндогенного контроля при использовании тест-системы LSI VetMAX™ IBR gB (Life Technologies Corporation).

В целом было показано, что использование сорбентного метода выделения ДНК менее эффективно, чем использование метода, включающего стадию спиртового осаждения нуклеиновых кислот. Из-за удобства использования, связанного, в том числе, с сокращением общего времени экстракции, набор «Рибо-преп» был выбран для дальнейшей работы.

Спермодозы от 217 быков были исследованы методом ПЦР на наличие фрагментов генома *Neospora caninum*, вируса герпеса КРС 1 и 4 типа, вируса диареи КРС, лейкоза КРС, вируса Шмалленберг, вируса нодулярного дерматита, микроорганизмов рода *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Campylobacter*, *Leptospira*, *Brucella* а также *Histophilus somni*.

По результатам молекулярно-генетических исследований ни в одном образце не была выявлена инфицированность патогенными видами рода *Leptospira*, микроорганизмами рода *Brucella*, *Neospora caninum*, вирусом Шмалленберг и вирусом лейкоза КРС.

В нашей работе, в отличие от исследований украинских ученых [14], в образцах семени не был выявлен генетический материал микроорганизмов рода *Chlamydia*. Также ни в одном из образцов в нашем исследовании не обнаружены фрагменты генома вируса диареи КРС. Необходимо отметить, что аналогичные исследования спермы, проводимые в Иране в 2010-2011 году, показали, что уровень контаминации вирусом диареи достигал 18,6% [20].

Результаты выявления фрагментов генома микроорганизмов в сперме КРС представлены в таблице 2.

Фрагменты генома вируса герпеса КРС 4 типа (Bovine Herpesvirus 4, BHV4) были обнаружены в 2-х образцах: одном образце из отечественного и в одном образце из иностранного племенного центра.

ДНК вируса герпеса 1 типа (Bovine Herpesvirus 1, BHV1) была выявлена в 2-х образцах из отечественных племенных центров как с использованием тест-системы "РИНОКОР" (Россия), так и с помощью набора реагентов LSI VetMAX™ IBR gB (Франция). Секвенирование участка ДНК вируса с использованием специфичных к 3' области гена gC праймеров [22] показало 100% идентичность анализируемой

последовательности аналогичному участку изолятов и штаммов BHV1, представленных в базе данных GeneBank.

Таблица 2 – Результаты выявления ДНК микроорганизмов в сперме КРС

Происхождение образца	Количество образцов	Обнаружена ДНК											
		BHV1		BHV4		Mycoplasma spp.		Campylobacter spp.		C. jejuni		H. somni	
Отечественные племенные центры	103	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Иностранные племенные центры	114	-	-	1	0.87	69	60,5	83	72,8	5	4,38	78	68,4
N - количество образцов, в которых обнаружена ДНК микроорганизма													

ДНК вирусов герпеса КРС в сперме, предназначенной для искусственного осеменения, обнаруживали при проведении исследований в Аргентине [15], генетический материал вируса герпеса 1 типа выявляли при тестировании спермодоз из разных районов Украины [14].

При исследовании образцов спермы на присутствие ДНК *Campylobacter spp.* положительный результат был получен для 78,3% образцов. Поскольку основным возбудителем генитального кампилобактериоза КРС считается *C. fetus*, а также есть информация о влиянии некоторых штаммов *C. jejuni* на фертильность крупного рогатого скота [9], было проведено дополнительное исследование образцов на наличие ДНК *C. fetus* и *C. jejuni*. Фрагменты генома *C. fetus* выявлены не были, а ДНК *C. jejuni* была обнаружена в 11,05% образцов, полученных из отечественных и иностранных племенных центров. Возможно, присутствие в большом числе спермодоз ДНК *C. jejuni* является следствием контаминации образцов при заборе семени.

ДНК *Histophilus somni* в нашем исследовании была выявлена в 78,8% образцов. Положительный результат был подтвержден нуклеотидным секвенированием продуктов амплификации гена 16S рРНК *H. somni* с использованием специфичных праймеров [21]. Результаты подобного исследования спермодоз, используемых для искусственного осеменения в Иране выявили значительно меньшую обсемененность спермодоз - 21,62% [21]. Есть свидетельства, что *H. somni* может присутствовать в репродуктивном тракте здоровых животных, однако также оказывает негативное влияние на репродуктивные качества семени [13].

При исследовании образцов с помощью тест-системы «МИК-КОМ» фрагменты ДНК *Mycoplasma spp.* были выявлены в 94 образцах спермы из отечественных племенных центров и в 69 образцах спермы из иностранных племенных хозяйств. Чтобы уточнить видовую принадлежность микоплазм, для 33 образцов было проведено секвенирование продуктов ПЦР. В пробах обнаруживали *M. bovis genitalium*, *M. californicum* и *Ureaplasma diversum*, при этом для большинства образцов было выявлено несколько сигналов чтения матрицы, что свидетельствует о наличии в образце нескольких видов *Mycoplasma*. Для исключения контаминации спермопродукции видом *M. bovis* образцы были дополнительно исследованы с помощью набора LSI VetMAX™ *Mycoplasma bovis*. Ни в одном из исследованных образцов ДНК *M. bovis* не была выявлена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вопросы распространенности и контроля инфекций в племенных хозяйствах являются актуальными во всем мире. Отечественными специалистами широко обсуждалось значение выявления ДНК микоплазм в сперме КРС [3,4,5]. Поскольку ПЦР-исследование не говорит о жизнеспособности микроорганизма, для принятия решений о возможности использования спермы для искусственного осеменения необходимо создание схемы лабораторного контроля семенного материала, которая будет включать как метод ПЦР, так и бактериологические исследования с

использованием современных сред для выращивания труднокультивируемых микроорганизмов.

Проведенный анализ результатов ПЦР-исследований показал высокую частоту встречаемости *Histophilus somni*, микроорганизмов рода *Campylobacter* и *Mycoplasma* в стабилизированной сперме отечественного производства и поставляемой из других государств. В семени КРС обнаруживали вирусы герпеса 1 и 4 типов, что подтверждает необходимость совершенствования контроля племенного материала при организации мероприятий по обеспечению эпизоотического благополучия товарных хозяйств.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. ГОСТ 26030 Средства воспроизводства. Сперма быков замороженная. Технические условия.
2. ГОСТ ISO 8607-2015 Средства воспроизводства. Сперма племенных быков замороженная. Подсчет живых аэробных микроорганизмов.
3. Манжурина О.А. Степанов А.В. Королькова А.О. Значение определения микоплазм в оценке качества спермы. Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2014» с.515.
4. Козлова А.Д., Горбачева Н.С., Клименкова О.В., Ярлова Е.А., Яцентюк С.П. Применение метода ПЦР для выявления возбудителей инфекционных болезней в сперме крупного рогатого скота // Перспективы и актуальные проблемы развития высокопродуктивного молочного и мясного скотоводства: материалы Международной научно-практической конференции, Витебск, 25-27 мая 2017 г. / УО ВГАВМ; редкол: Н.И. Гавриченко (гл. ред.) [и др.]. – Витебск, 2017. – С 89-95.
5. Терлецкий В.П. Тыщенко В.И., Гайрабеков Р.Х., Шахтамиров И.Я., Усенбеков Е.С.З. Распространенность микоплазменной инфекции в племенных хозяйствах. Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2014» с. 491-492.
6. Afshar A., Eaglesome M.D. (1990). - Viruses associated with bovine semen. Vet. Bull, 60 (2), 93-109.
7. Bauermann F. V. et al (2013). HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 25(1) 6–15.
8. Bauermann, F.V. and Ridpath, J.F. (2015) «HoBi-like viruses – the typical “atypical bovine pestivirus», Animal Health Research Reviews, 16(1), pp. 64–69.
9. Eaglesome M.D. & Garcia M.M. (1992). - Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part I. Brucella abortus, Leptospira, Campylobacter fetus and Tritrichomonas foetus. Vet. Bull, 62 (8), 743-775.
10. Eaglesome M.D., Garcia M.M. & Stewart R.B. (1992). - Microbial agents associated with bovine genital tract infections. Part II. Haemophilus somnus, Mycoplasma spp. and Ureaplasma spp., Chlamydia; pathogens and semen contaminants; treatment of bull semen with antimicrobial agents. Vet. Bull, 62 (9), 887-910.
11. Eaglesome M.D., Garcia M.M. (1997). Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 16 (1), 215-225.
12. Hare W.C.D. (1985). - Diseases transmissible by semen and embryo transfer techniques. Technical Series No. 4. Office International des Epizooties, Paris, 117 pp.
13. González Altamiranda E, Manrique JM, Pérez SE, Ríos GL, Odeón AC, Leunda MR. (2015) Molecular Characterization of the First Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4) Strains Isolated from In Vitro Bovine Embryos production in Argentina. PLoS ONE 10(7): e0132212. doi:10.1371/journal.pone.0132212
14. Isakov M.M. Solodiankin O.S., Bolotin V.I., Gerilovych A.P. PCR detection of genital infections in bull semen from different regions of Ukraine, 2013 - 2016 Arhiv veterinarske medicine, Vol. 9, No. 2, 63 - 70, 2016

15. Morán P.E., Favier P.A., Lomónaco M., Catena M.C., Chiapparrone M.L., Odeón A.C., Verna A.E., Pérez S.E. (2013). Search for the genome of bovine herpesvirus types 1, 4 and 5 in bovine semen. *Open Veterinary Journal*, Vol. 3(2): 126-130.
16. Peña M.A, Góngora A, Jiménez C. (2011). Infectious agents affecting fertility of bulls, and transmission risk through semen. Retrospective analysis of their sanitary status in Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu*; 24:634-646.
17. Phillpot M. (1993). - The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Br. vet. J.*, 149, 339-369.
18. Ponsart C., Pozzi N., and Vitour D. (2014). Evidence of excretion of Schmallenberg virus in bull semen *Vet Res.*; 45(1): 37.
19. Schulz C, Wernike K, Beer M, Hoffmann B. (2014) Infectious Schmallenberg virus from bovine semen, Germany *Emerg Infect Dis.* Feb; 20(2): 338–340.
20. Sharifzadeh A., Doosti A., and Dehkordi P.G. Reverse Transcriptase PCR Assay for Detection of Bovine viral diarrhea virus (BVDV) Infection in Iranian Bull's Semen Samples *Middle-East J. Sci. Res.*, 9 (1): 132-139, 2011
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. Sviland, S., Høgåsen, H.R., Mørk, T. (2014). Import risk assessment for frozen cattle semen from Norway to Iceland. *Norwegian Veterinary Institute's Report Series* 16-2014
23. Traesel CK, Sá e Silva M., Spilki F.R, Weiblen R., Flores E.F. Nucleotide sequencing and phylogenetic analysis of the 3' region of glycoprotein C gene of South American bovine herpesviruses 1 and 5. *Res Vet Sci.* 2013 Feb;94(1):178-85.

© 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/>