



Тваринництво, ветеринарна медицина

УДК 619:616.98:636.2.082.4

© 2015

*Б.Т. Стегній,
академік НААН, доктор
ветеринарних наук*

*А.П. Герілович,
доктор
ветеринарних наук*

*В.І. Болотін,
кандидат
ветеринарних наук*

*М.М. Ісаков
Національний науковий
центр «Інститут
експериментальної
і клінічної ветеринарної
медицини»*

*М.І. Бащенко,
академік НААН,
доктор сільсько-
господарських наук
Національна академія
аграрних наук України*

ВИЯВЛЕННЯ ВІРУСНИХ ТА БАКТЕРІАЛЬНИХ КОНТАМІНАНТІВ СПЕРМИ ПЛЕМІННИХ БУГАЇВ З ВИКОРИСТАННЯМ МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Мета. Виявити контамінацію глибокозамороженої сперми племінних бугаїв вірусними та бактеріальними агентами. **Методи.** Бактеріологічні, молекулярно-генетичні, статистичні. **Результати.** Досліджено 826 зразків з 6-ти областей України, що дало змогу виявити генетичний матеріал вірусів інфекційного ринотрахеїту і діареї великої рогатої худоби у 3,5 та 6,1% випадків відповідно. ДНК хламідій та мікоплазм виявляли в 3,15 та 8,6% досліджених зразків відповідно. Встановлено належність вірусу діареї, виявленого в спермі бугаїв, до 2-го генотипу збудника. Висновки. З огляду на наявні ризики поширення інфекційних хвороб через контаміновану сперму бугаїв-плідників є потреба в упровадженні заходів поглибленого контролю за якістю генетичних ресурсів великої рогатої худоби.

Ключові слова: сперма заморожена, бугаї-плідники, вірусна та бактеріальна контамінація, полімеразна ланцюгова реакція, лабораторна діагностика.

Розв'язання проблем патології відтворення тварин нині є запорукою успішного ведення промислового тваринництва в Україні. З огляду на інтенсивне впровадження у виробничу практику новітніх біотехнологій відтворення тварин і широкий міжнародний обмін генетичними ресурсами потрібно приділяти більше уваги ефективному контролю за спермопродукцією, яйцеклітинами та ембріонами на всіх етапах їх отримання, заморожування, транспортування і використання безпосередньо в господарствах. Технологія роботи сучасного племпідприємства має бути на належному санітарному рівні та

характеризуватися високою ефективністю запліднення незалежно від строків зберігання замороженої сперми в рідкому азоті [1].

Сучасні вимоги до санітарної якості сперми бугаїв-плідників спрямовані на профілактику ураження ендометрія корів збудниками інфекційних хвороб вірусної та бактеріальної етіології під час штучного запліднення глибокозамороженою спермопродукцією. Додавання компонентів тваринного походження (яєчний жовток, молоко) до більшості комерційних розріджувачів, які використовують для заморожування сперми бугаїв, створює потенційні ризики контамінації бактеріями, особливо

мікоплазмами, що створює загрози поширення економічно значущих захворювань великої рогатої худоби [8, 17]. Отже, потрібно приділяти увагу контролю за генетичними ресурсами у племінній роботі з метою ефективного розриву епізоотичного ланцюга.

Найчастіше в зразках сперми племінних бугаїв виявляють генетичний матеріал песті- та герпесвірусів, а також хламідій та мікоплазм. Серед інших збудників також слід назвати бруцели, лептоспіри, кампілобактерії, коксієли, віруси лейкозу, парагрипу-3 та хвороби Шмалленберга. Раніше для виключення контамінації сперми використовували культуральний метод, що є доволі витратною і тривалою процедурою з невисоким відсотком чутливості [5]. Вірус діареї (ВД) великої рогатої худоби може зберігати свою активність у сперміях бугаїв-плідників протягом кількох місяців [10]. Цей вірус здатний викликати імунотолерантні ембріональні захворювання, народжені телята стають персистентно інфікованими та є постійним джерелом передачі вірусу в популяції великої рогатої худоби [7].

Хламідійні інфекції у жуйних тварин мають широкий спектр симптомів, зокрема поліартрити, кон'юнктивіти, пневмонії та аборти [11]. До поширення мікоплазм та уреоплазм призводить міжнародна торгівля тваринами, спермою, ембріонами [16].

Серед експрес-тестів широкого застосування набули реакція імунофлюоресценції та полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Остання є більш чутливою та специфічною. Існує думка, що дослідження біологічного матеріалу з використанням молекулярно-генетичних методів дуже дороге, проте з огляду на високу чутливість реакції зразки можна об'єднувати у пули, що значно здешевлює аналіз. Крім того, вчасне виявлення контамінованої продукції може запобігти значним економічним збиткам у господарствах.

Мета досліджень — виявити контамінацію глибокозамороженої сперми племінних бугаїв вірусами інфекційного ринотрахеїту (ІРТ), ВД, лейкозу великої рогатої худоби, а також хламідіями та мікоплазмами.

Матеріали та методи досліджень. Заморожену сперму бугаїв-плідників в об'ємованих гранулах або пайетах доставляли до лабораторії з різних господарств України в посудинах Д'юара за температури -196°C .

Зразки сперми досліджували щодо загальної мікробної контамінації, а також наявності

генетичного матеріалу вірусів ІРТ, ВД, лейкозу великої рогатої худоби, хламідій і мікоплазм за допомогою ПЛР [3] згідно з протоколами, розробленими у відділі молекулярної діагностики ННЦ «ІЕКВМ».

Секвенування геному ВД великої рогатої худоби здійснювали за методом S. Vilcek [pers. comm.] на базі Університету Кошице (Словаччина).

Результати досліджень. Упродовж 2010–2014 рр. досліджено 826 зразків замороженої сперми. Установлено, що за біологічними показниками 11 серій (11,8%) не відповідали вимогам ГОСТ №27777–88 «Сперма бугаїв заморожена», при цьому рухливість сперміїв після розморожування становила 1,5–3 бали за допустимої норми не нижче 4 балів (40% активних сперміїв з прямолінійно-поступальним рухом), а життєздатність гамет за температури тіла тварини — не менше 5 год.

За бактеріологічними дослідженнями 93-х серій сперми в 21-й серії (22,6%) виявлено бактеріальну контамінацію (перевищення кількості мікробних тіл в одиниці об'єму в одній спермодозі в 3–4 рази).

За проведення молекулярно-генетичних досліджень наявність вірусу ІРТ великої рогатої худоби підтверджено в 3,5% проб, а РНК ВД великої рогатої худоби — у 6,1% (таблиця).

Генетичний матеріал хламідій та мікоплазм за результатами ПЛР виявлено у 3,15 та 8,6% зразків відповідно. Отже, ці результати корелюють з отриманими нами даними у 2008 р. [12] та істотно відрізняються від результатів російських учених, які виявляли вірус ІРТ у кожній 3-й пробі замороженої сперми бугаїв-плідників [2]. Згідно з іншими літературними даними, виявлення вірусів ІРТ та ВД у спермі плідників варіює від 3 до 34% [6, 9, 15]. У Швейцарії дослідження 304-х зразків нативної та замороженої сперми бугаїв-плідників за ПЛР свідчили про наявність генетичного матеріалу хламідій у 20 випадках (6,6%) [14].

Дослідження цих зразків спермопродукції щодо наявності збудника лейкозу великої рогатої худоби свідчить про відсутність специфічних продуктів ПЛР в аналізованих пробах. Зазначене є свідченням того, що загрози інфікування поголів'я великої рогатої худоби вірусом лейкозу під час штучного осіменіння через контаміновану спермопродукцію немає. Водночас потенційні ризики поширення збудника зі спермою та ембріонами існують [12, 13].

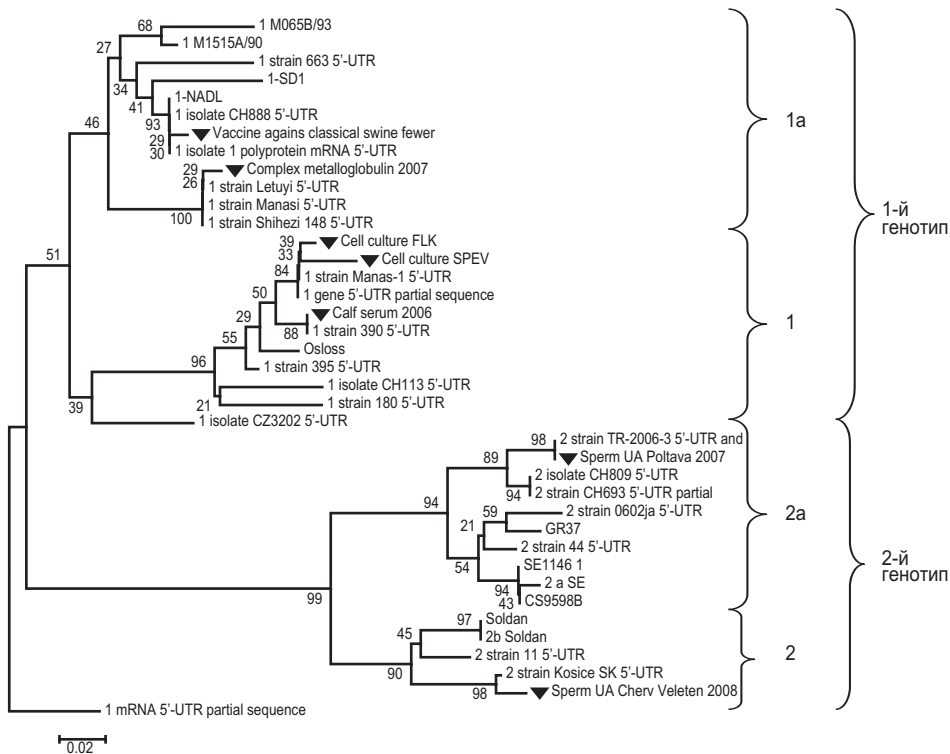
Результати дослідження зразків замороженої сперми бугаїв-плідників за 2010–2014 рр. (n=826)

Область	Досліджено разом	Виявлено позитивних зразків							
		вірус IPT		вірус діареї ВРХ		хламідії		мікоплазми	
		п.	%	п.	%	п.	%	п.	%
Запорізька	35	2	5,7	1	2,9	0	0,00	3	8,6
Київська	72	5	6,9	2	2,8	0	0,00	2	2,8
Полтавська	124	8	6,5	5	4,0	0	0,00	7	5,6
Дніпропетровська	93	3	3,2	7	7,5	3	3,23	8	8,6
Харківська	451	11	2,4	34	7,5	23	5,10	51	11,3
Сумська	51	0	0,0	1	2,0	0	0,00	0	0,0
Усього	826	29	3,5	50	6,1	26	3,15	71	8,6

Примітка. п. — позитивний зразок.

Отримані в результаті проведеного секвенування нуклеотидні послідовності фрагмента 5'-UTR завдовжки 287 п. н. зразків ВД великої рогатої худоби, виявлених у спермі, свідчать про наявність двох варіантів збудника (міжгрупові відстані 0,200–0,373).

Побудована на основі отриманого рівняння дендрограма за топографічними особливостями гілкування розщеплювалась на 2 основні лінії, що містили штами генотипів 1 і 2. Контамінанти, детектовані в спермі плідників, належали до генотипу 2 (рисунок).



Філогенетичні зв'язки між штамами вірусу діареї великої рогатої худоби (Neighbor Joining, Bootstrap = 1000, ▼ — ізоляти українського походження)

Ізоляти ВД Poltava та Cherv Veleten, виявлені у зразках імпортованої спермопродукції, належать до субтипів 2a та 2b відповідно. Їх топографічне розташування на дендрограмі вказувало на спорідненість означених контамінантів зі штамми TR-2006 (Канада) та Kosice (Західна Європа) відповідно. Отримані дані свідчать, що в Україні вже циркулюють неендемичні варіанти вірусу, здатні спричинити масове захворювання телят і дорослих тварин. На жаль, наша держава є не єдиною з-поміж країн Європи, на території яких останнім часом зареєстровано циркуляцію вірусу генотипу 2 (вірус цієї генетичної родини детектували в Словаччині, Франції, Нідерландах та інших країнах). Виявлення неендемичних варіантів вірусу великої рогатої худоби у країнах Євразії є сигналом для посилення заходів щодо контролю за його поширенням, включаючи розробку засобів діагностики та систем моніторингу, а також зумовлює потребу ретельного скринінгу

об'єктів ветеринарного нагляду, особливо генетичних ресурсів, які можуть вміщувати означений тип збудника.

Отже, молекулярно-генетичні методи досліджень відіграють важливу роль у системі контролю за генетичними ресурсами великої рогатої худоби. При цьому ПЛР має високу аналітичну та діагностичну чутливість з огляду на те, що вона спрямована на виявлення не самого збудника, а лише його генетичного матеріалу. Співробітники відділу молекулярної діагностики ННЦ «ІЕКВМ» постійно працюють над розробкою нових методик щодо виявлення контамінантів сперми та ембріонів великої рогатої худоби. Напрацювання у цьому напрямі вже дали змогу впровадити дуплексний варіант ПЛР для одночасного виявлення генетичного матеріалу ВД великої рогатої худоби та мікоплазм [4]. Наразі триває робота над новою системою контролю за генетичними ресурсами великої рогатої худоби на основі ПЛР у режимі реального часу.

Висновки

За результатами досліджень 826 зразків замороженої сперми бугаїв-плідників генетичний матеріал вірусів ІРТ та ВД виявлено, відповідно, в 3,5 та в 6,1% випадків. ДНК хламідій та мікоплазм ідентифіковано в 3,15 та 8,6% зразків відповідно. Установлено відсутність контамінації генетичних ресурсів збудником лейкозу великої рогатої худоби, однак, згідно з літературними даними, ризики такої контамінації високі, що зумовлює потребу впровадження заходів поглибленого контролю за якістю сперми та ембріонів. Визначено належність

пестивірусних контамінантів сперми плідників до ВД 2-го генотипу. Через наявні ризики контамінації замороженої сперми племінних бугаїв-плідників патогенними вірусами або бактеріями під час розробки вітчизняного стандарту на заморожену сперму потрібно передбачити її вірусологічний та бактеріологічний контроль на ІРТ, ВД, мікоплазмоз і хламідіоз з використанням прийнятих у міжнародній практиці методів лабораторної діагностики (ПЛР, реакції імуофлуоресценції, виділення та ідентифікації збудника).

Бібліографія

1. *Ветеринарно-санитарные требования к сперме при искусственном осеменении животных*/ Н.Г. Балашов, А.К. Бутаков, В.Н. Родина, Н.Ф. Чуков. — М.: Колос, 1977. — 220 с.
2. *Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота*/А.Г. Гловат, А.Ф. Шуляк, Г.И. Гловатова, А.Н. Сергеев//РАСХН, Сиб. отд-ние, ГНУ ИЭВСиДВ. — Новосибирск: ИПЦ «Юпитер», 2006. — С. 196.
3. *Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини: наук.-метод. посіб.*/ Б.Т. Стегній, А.П. Герілович, О.Ю. Лиманська та ін.; під ред. Б.Т. Стегнія та А.П. Геріловича. — Х.: ННЦ «ІЕКВМ», 2006. — 110 с.
4. *Розробка дуплексної ПЛР для індикації мікоплазм та вірусів діареї великої рогатої худоби, з подальшим генотипуванням збудника*/А.П. Герілович, І.В. Горайчук, В.І. Болотін, О.С. Солодякін//Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — Львів, 2013. — Т. 11, № 1. — С. 28–33.
5. *Фарботко Г.Э. Обнаружение вирусов в сперме быков*/Г.Э. Фарботко, Н.Н. Кондрахина// Ветеринария. — 1992. — № 5. — С. 47–48.
6. *Analytical sensitivity of assays used for detection of bovine viral diarrhea virus in semen samples from the Southeastern United States*/M.D. Givens, A.M. Heath, R.L. Carson et al.//Vet Microbiol. — 2003. — V. 96 (2). — P. 145–155.

7. Bolin S.R. Control of bovine virus diarrhoea virus/S.R. Bolin//Res. Sci. Tech. — 1990. — V. 9, № 1. — P. 163–171.

8. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents/S. Bousseau, J.P. Brillard, B. Marguant-Le Guienne et al.//Theriogenology. — 1998. — V. 50(5). — P. 699–706.

9. Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen/C.B. Smits, C. Van Maanen, R.D. Glas et al.//Vet Methods. — 2000. — V. 85(1–2). — P. 65–73.

10. Detection of bovine viral diarrhoea virus in semen obtained after inoculation of seronegative postpubertal bulls/M.D. Givens, A.M. Heath, K.V. Brock, B.W. Brodersen//Vet Res. — 2003. — V. 64(4). — P. 428–434.

11. Isolation of an avian serovar of *Chlamydia psittaci* from a case of bovine abortion/H.U. Cox, P.G. Hoyt, R.P. Poston et al.//Vet Diagn Invest. — 1998. — V. 10. — P. 280–282.

12. PCR-screening of *Chlamydiae* and Viral Contamination of Bull Semen in Farms of Southern and Eastern Ukraine/A.P. Gerilovych, A.V. Skrypyuk,

V.I. Bolotin et al.//Infektionen durch intrazelluläre Erreger-Diagnostik, Epidemiologie und Pathogenese der Chlamydien- und Coxielleninfektionen: Zusammenarbeit mit dem NRL Q-Fieber und dem AVID (Jena, 25–26 Sept., 2008). — Jena, 2008. — P. 39–41.

13. Potential risks of BLV distribution via bulls semen/D. Beier, K. Bogner, A. Krisch et al.//Proc. European virology association congress. — 2011. — P. 113.

14. Prevalence of chlamydiae in semen and genital tracts of bulls, rams and bucks/K. Teankum, A. Pospischil, F. Janett et al.//Theriogenology. — 2007. — V. 15. — P. 303–310.

15. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay/S.A. Masri, W. Olson, P.T. Nguyen et al.//Can J. Vet Res. — 1996. — V. 60(2). — P. 100–107.

16. *Ureaplasma diversum* as a cause of reproductive disease in cattle/B. Miller, A. Chelmonska, B. Smits et al.//Food Animal Practice. — 1994. — V. 10. — P. 479–490.

17. Virulence and genotype of a bovine herpesvirus 1 isolate from semen of a subclinically infected bull/J.T. van Oirschot, F.A. Rijsewijk, P.J. Straver et al.//Vet Res. — 1995. — V. 137(10). — P. 235–239.

Надійшла 27.01.2015.