

# Исследование вагинальной слизи высокопродуктивных коров в послеотельный период посредством ПЦР в реальном времени

Г.Ю. Лаптев<sup>1</sup>, доктор биологических наук ([deniz@biotrof.ru](mailto:deniz@biotrof.ru)), Н.И. Новикова<sup>1</sup>, кандидат биологических наук, Л.А. Ильина<sup>1</sup>, кандидат биологических наук, Е.А. Йылдырым<sup>1</sup>, кандидат биологических наук, В.А. Думова<sup>1</sup>, Е.А. Корочкина<sup>2</sup>, кандидат ветеринарных наук ([e.kora@mail.ru](mailto:e.kora@mail.ru)).

<sup>1</sup> ООО «Биотроф» (Санкт-Петербург).

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» (Санкт-Петербург).

Цель данных исследований состояла в сравнительном анализе посредством ПЦР в реальном времени вагинального микробиоценоза высокопродуктивных коров в послеотельный период. Согласно результатам исследований, коровы с диагнозом «острый послеродовой эндометрит» имеют более высокое содержание условно-патогенных и патогенных микроорганизмов по сравнению с клинически здоровыми животными.

**Ключевые слова:** высокопродуктивные коровы, микробиоценоз влагалища, послеродовой период, ПЦР в реальном времени

**Сокращения:** ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в реальном времени

## Введение

Иммунодепрессия, выражающаяся в ослаблении устойчивости организма к воздействию патогенной и условно-патогенной микрофлоры, служит результатом современного ведения животноводства, часто связанного с неблагоприятными условиями содержания и кормления животных. Ослабленная иммунная система, а также стрессовое состояние организма матери, особенно в период беременности, негативно отражаются на течении родов и послеотельного периода (задержание последа, субинволюция матки, острые послеродовые эндометриты) [3, 4]. Данная патология очень часто приводит к снижению воспроизводительной способности, увеличению сервис-периода в среднем на 17...30 дней, снижению оплодотворяемости на 17,7...23,3 % и выхода приплода на 7...11 %, уменьшению молочной продуктивности в среднем на 24 %, возникновению общей интоксикации организма с последующим поражением почек и печени и, как следствие, преждевременной выбраковке животных [12, 14]. Поэтому так актуальны своевременная диагностика и профилактика акушерской патологии у коров [5, 6].

В настоящее время существует достаточно большой спектр методик исследования половой системы самок, основными являются экспресс-метод диагностики гипотонии матки и эндометритов у коров; экспресс-метод диагностики острых послеродовых эндометритов; цитологическое исследование маточных выделений; определение клеточного состава цервикально-вагинальной слизи; прижизненное гистологическое исследование эндометрия; цитологичес-

кая диагностика эндометритов у коров и др. Однако число скрининговых методик, используемых в ветеринарном акушерстве, весьма ограничено. Из-за некоторых особенностей микрофлоры половых путей (преимущественно — некультивируемые виды анаэробных микроорганизмов [17]) лабораторные исследования не всегда бывают информативными и достоверными.

Появление и развитие современных молекулярно-генетических методов сделало возможным изучение разнообразия микроорганизмов без ограничений, сопутствующих традиционным методам микробиологии, то есть, минуя стадию культивирования. Один из наиболее перспективных молекулярно-генетических методов — анализ с использованием ПЦР-РВ (количественная ПЦР). С помощью данного метода можно за короткий срок определять содержание бактерий, дрожжей, мицелиальных грибов в половых путях коров, дифференцировать состояние физиологического равновесия и дисбаланса, на ранних стадиях выявлять возбудителей заболеваний, оценивать действие профилактических и лечебных препаратов, влияющих на микрофлору.

## Цель исследования

Провести сравнительный анализ микробиоценоза влагалища высокопродуктивных коров в послеотельный период с использованием метода ПЦР-РВ.

## Материалы и методы

Эксперименты по изучению состава микрофлоры влагалищных выделений проводили в ЗАО ПЗ «Гатчинское» Ленинградской области на коровах голштинизированной черно-пестрой породы в послеотельный период. Возраст коров — от 3 до 7 лет, среднегодовая молочная продуктивность — 8115 кг. Пробы были отобраны у 3 клинически здоровых и 4 больных коров (с диагнозом «острый гнойно-катаральный послеродовой эндометрит»).

**1. Праймеры и условия амплификации для анализа количества бактерий, входящих в состав микрофлоры влагалища коров, посредством ПЦР-РВ**

Микроорганизмы	Праймер (5'-3')	Ссылка на исследование
Универсальные праймеры на общее количество бактерий	HDA1: ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG HDA2: GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA	22
<i>Lactobacillus</i> spp.	Lac1: AGC AGT AGG GAA TCT TCC A Lab667r: CAC CGC TAC ACA TGG AG	22
<i>Megasphaera</i> spp., <i>Veillonella</i> spp., <i>Dialister</i> spp.	Mega-142F: GATGGGGACAACAGCTGGA Mega-X: GACTCTGTTTTGGGG	15
<i>Streptococcus</i> spp.	SE16SF: AATTCTAATACGACTCACTATAGGGCAAGTCGAGCGAACAGACGA SE16S R: TGTCACCGGCAGTCAACTTA	24
<i>Lachnobacterium</i> spp. и <i>Clostridium</i> spp.	P930: GTGAAATGCGTAGAGATTAGGAA P932: GATYGGGATTACTAGYAACCTC	7
<i>Atopobium</i> spp.	10f: AGTTTGATCCTGGCTCAG 534r: ATTACCGGGCTGCTGG	21
<i>Staphylococcus</i> spp.	TStaG422: GGC CGT GTT GAA CGT GGT CAA ATC TStaG765: TIA CCA TTT CAG TAC CTT CTG GTA A	22
<i>Candida</i> spp.	Calb28SF: AATTCTAATACGACTCACTATAGGGCGATACTGCCAGCCTAGACC Calb28S: CGCTCTCCAGCCATAAGAC	24
<i>Fusobacteriaceae</i>	Fs619F: CGCAGAAGGTGAAAGTCTGTAT Fs719R: TGGTCCTCACTGATTCACACAGA	20
<i>Enterobacteriaceae</i>	Enterobac-F: CAT TGA CGT TAC CCG CAG AAG AAG C Enterobac-R: CTC TAC GAG ACT CAA GCT TGC	22
<i>Prevotella</i> spp. и <i>Porphyromonas</i> spp.	BacPre: GAGTACGCCGGCAACGGTGA rBacPre: TCACCGTTGCCGGGCTACTC	23
<i>Mobiluncus</i> spp. и <i>Corynebacterium</i> spp.	C240F: GGAAGGAYGCATCTTGCCAGTCT C445R: CATYGGGAARTCRCCGATGA	11
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	For: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG Rev: ACGGGCGGTGTGTRC	16
<i>Eubacterium</i> spp.	For: TCCCTTACTAGGCACCCA Rev: AGGGAAUGAUCGGUGGU	21

Пробы влагалищных выделений брали из верхнебокового свода влагалища на уровне шейки матки с соблюдением условий асептики.

Состав микрофлоры влагалища коров определяли посредством ПЦР-РВ. Принцип метода основан на использовании процесса амплификации ДНК, заключающемся в повторяющихся циклах: температурной денатурации ДНК, отжиге праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройкой полинуклеотидных цепей с этих праймеров термостабильной ДНК-полимеразой. Для анализа количества бактерий, входящих в состав микрофлоры влагалища коров, использовали праймеры, представленные в таблице 1. Условия амплификации соответствовали каждому праймеру согласно исследованиям. Для проведения ПЦР-РВ использовали амплификатор детектирующий ДТ Lite-4 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

После прохождения ПЦР-амплификации в реальном времени на основании «стандартов» с известной концентрацией геномов программно рассчитывали общее количество всех бактерий, а также количество микроорганизмов, входящих в отдельные группы [1].

Математическая и статистическая обработки результатов проведены по стандартным методикам дисперсионного анализа [2] с использованием программного обеспечения EXCEL 2010.

## Результаты

Сравнительный анализ микробиоценоза вагинальных выделений показал, что представители нормофлоры, а также условно-патогенной и патогенной микрофлоры присутствовали во влагалищных выделениях коров обеих опытных групп (табл. 2).

Во влагалищных выделениях коров с диагнозом «эндометрит» наблюдали угнетение представителей нормофлоры: кислот-утилизирующих бактерий *Megasphaera* spp., *Veillonella* spp. и *Dialister* spp. и стрептококков. Полученные нами данные согласуются с результатами экспериментов [17], согласно которым процентное соотношение представителей фило *Firmicutes*, а именно *Streptococcus suis*, *St. uberis* и *Veillonella* spp., было значительно ниже во влагалищных выделениях

## 2. Общее количество бактерий и содержание некоторых групп микроорганизмов в пробах, Ig геномов/г

Группа микроорганизмов	Клинически здоровые коровы (n=3)	Коровы с диагнозом «эндометрит» (n=4)
Общее количество бактерий	6,6±3,9	7,6±5,1
<b>Нормофлора</b>		
<i>Lactobacillus</i> spp. (лактобактерии)	<п.д.о.*	<п.д.о.
<i>Megasphaera</i> spp., <i>Veillonella</i> spp. и <i>Dialister</i> spp.	5,3±2,8	4,8±2,2
<i>Streptococcus</i> spp.	4,1±1,7	3,5±0,9
<b>Условно-патогенная микрофлора</b>		
<i>Lachnobacterium</i> spp. и <i>Clostridium</i> spp.	5,9±3,5	5,8±3,1
<i>Atopobium</i> spp. (актиномицеты)	2,5±0,2	2,5±0,3
<i>Staphylococcus</i> spp.	3,0±1,0	3,1±0,8
<i>Candida</i> spp. (дрожжи)	3,9±1,5	3,8±1,1
<b>Патогенная микрофлора</b>		
<i>Fusobacteriaceae</i>	5,3±2,6	6,0±3,8
<i>Enterobacteriaceae</i>	5,1±3,0	6,4±4,1
<i>Prevotella</i> spp. и <i>Porphyromonas</i> spp. (бактероиды)	6,4±4,4	7,4±5,2
<i>Mobiluncus</i> spp. и <i>Corynebacterium</i> spp. (актиномицеты)	4,7±1,9	5,1±2,5
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	5,4±3,2	5,8±3,8
<i>Eubacterium</i> spp.	5,5±3,0	5,9±3,6
<b>Примечание.</b> <п.д.о.* — предел достоверного определения посредством ПЦР-РВ		

коров с диагнозом «эндометрит» по сравнению с клинически здоровыми животными.

Содержание во влагалищных выделениях коров из обеих опытных групп представителей нормофлоры — молочнокислых бактерий *Lactobacillus* spp. — находилось ниже предела достоверных значений.

Анализ результатов исследования численности микроорганизмов *Lachnobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., актиномицетов *Atopobium* spp., а также дрожжей *Candida* spp. не выявил достоверных различий между опытными группами. Вероятно, данные микроорганизмы не являются этиологическим началом послеотельного эндометрита у коров.

Дисбиотический характер изменения состава микрофлоры у коров с диагнозом «эндометрит» заключался в возрастании численности условно-патогенной и патогенной групп микроорганизмов по сравнению с клинически здоровыми коровами. Спектр данных микроорганизмов включал в себя представителей

Fusobacteriaceae, Enterobacteriaceae, бактериоиды *Prevotella* spp. и *Porphyromonas* spp., актиномицеты *Mobiluncus* spp. и *Corynebacterium* spp., а также бактерии *Peptostreptococcus* spp. и *Eubacterium* spp. Так, содержание бактериоидов *Prevotella* spp. и *Porphyromonas* spp. во влагалищных выделениях коров с диагнозом «эндометрит» имело тенденцию к увеличению в 1,15 раза; представителей Enterobacteriaceae — в 1,25 раз, актиномицетов *Mobiluncus* spp. и *Corynebacterium* spp. — в 1,1 раза и представителей Fusobacteriaceae — в 1,13 раз. Факт присутствия данных микроорганизмов во влагалищных выделениях клинически здоровых животных позволяет считать их перманентной вагинальной микрофлорой. Таким образом, слизистая оболочка влагалища, заселенная множеством микроорганизмов, является местом хрупкого равновесия между местной микрофлорой и защитными силами организма. При снижении общей, а также местной иммунной защиты равновесие нарушается, что способствует развитию очага инфекции во влагалище.

Приведенные нами данные во многом согласуются с результатами зарубежных исследований, выполненных с использованием как классических [8...10, 13, 19], так и молекулярно-генетических методов [17, 19]. По мнению большинства авторов, ведущая роль в этиологии послеродового эндометрита у коров принадлежит ассоциации четырех микроорганизмов: *Bacteroides smelanogenicus*, *Fusobacterium necrophorum*, *Escherichia coli* и актиномицета *Arcanobacterium pyogenes*, действующих в синергизме.

## Выводы

На основании проведенных исследований микрофлоры влагалища установлено, что у коров с диагнозом «эндометрит» заметно увеличено содержание условно-патогенной (*Lachnobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Atopobium* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp.) и патогенной групп микроорганизмов (Fusobacteriaceae, Enterobacteriaceae, *Prevotella* spp. и *Porphyromonas* spp., *Mobiluncus* spp. и *Corynebacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp. и *Eubacterium* spp.) по сравнению с клинически здоровыми коровами.

## Библиография:

1. Брюханов, А.Л. Молекулярная биология / А.Л. Брюханов, К.В. Рыбак, А.И. Нетрусов. — М.: Издательство Московского университета, 2012. — 480 с.
2. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
3. Лободин, К.А. Состояние воспроизводительной функции у коров с разным уровнем молочной продуктивности / К.А. Лободин // Аграрная наука в начале 21 века: Матер. междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых и спец-тов. — Воронеж: ВГАУ, 2002. — С. 28–30.
4. Нежданов, А.Г. Физиология и патология родов и послеродового периода у сельскохозяйственных животных / А.Г. Нежданов. — Воронеж: ВГАУ, 1991. — 60 с.

5. Племяшов, К.В. Производственное долголетие коров в Ленинградской области / К.В. Племяшов // Ветеринария. — 2008. — № 2. — С. 9–11.
6. Полянцева, Н.И. Профилактика послеродового эндометрита у коров / Н.И. Полянцева, С.Н. Боровая, Л.Г. Войтенко // Зоотехния. — 1994. — №3. — С. 31–32.
7. Bourhis, L.A. Development and Validation of PCR Primers To Assess the Diversity of Clostridium spp. in Cheese by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis / A.L. Bourhis, K. Saunier, J. Dore, J.P. Carlier, J.F. Chamba, M.R. Popoff, J.L. Tholozan // Appl. Environ. Microbiol. — 2005. — V. 71(1). — P.29–38.
8. Dohmen, M.J. Relationship between Intra-uterine Bacterial Contamination, Endotoxin Levels and the Development of Endometritis in Postpartum Cows with Dystocia or Retained Placenta / M.J. Dohmen, K. Joop, P.E. Bols, and A. Lohuis // Theriogenology. — 2000. — V. 54. — P. 1019–1032.
9. Foldi, J. Bacterial Complications of Postpartum Uterine Involution in Cattle / J. Foldi, M. Kulcsar, A. Pecs, B. Huyghe, C. de Sa, J.A. Lohuis, P. Cox, and G. Huszenicza // Anim. Reprod. Sci. — 2006. — V. 96. — P. 265–281.
10. Huszenicza, G. Uterine Bacteriology, Resumption of Ovarian Activity and Fertility in Postpartum Cows Kept in Large-scale Dairy Herds / G. Huszenicza, M. Fodor, M. Gacs, M. Kulcsar, M.J. Dohmen, M. Vamos, L. Portokolab, T. Kegl, J. Bartyk, J.C. Janosi, G. Szita // Reprod. Domest. Anim. — 1999. — V.34. — P.237–245.
11. Khamis, A. rpoB Gene Sequencing for Identification of Corynebacterium Species / A. Khamis, D. Raouf, B. La Scola // J. Clin. Microbiol. — 2004. — V. 42(9). — P. 3925–3931.
12. Kossabati, M.A. The costs of production diseases in dairy herds in England / M.A. Kossabati, R.J. Esslemont // The Veterinary Journal. — 1997. — V. 154. — P. 41–51.
13. Mateus, L. Influence of Puerperal Uterine Infection on Uterine Involution and Postpartum Ovarian Activity in Dairy Cows / L. Mateus, L.L. da Costa, F. Bernardo, J.R. Silva // Reprod. Domest. Anim. — 2002. — V. 37. — P. 31–35.
14. McDougall, S. Effect of intrauterine antibiotic treatment on reproductive performance of dairy cows following periparturient disease / S. McDougall // New Zealand Veterinary Journal. — 2001. — V. 49. — P. 150–158.
15. Ohnishi, A. Development of a 16S rRNA Gene Primer and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Method for Rapid Detection of Members of the Genus Megasphaera and Species-Level Identification / A. Ohnishi, S. Abe, S. Nashirozawa, S. Shimada, N. Fujimoto, M. Suzuki // Appl. Environ. Microbiol. — 2011. — V. 77(15). — P. 5533–5535.
16. Riggio, M.P. Identification of Oral Peptostreptococcus Isolates by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of 16S rRNA Genes / M.P. Riggio, A. Lennon // J. Clin. Microbiol. — 2003. — V. 41(9). — P. 4475–4479.
17. Santos, T.M. Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows / T.M. Santos, R.O. Gilbert, R.C. Bicalho // J. Dairy Sci. — 2011. — V. 94(1). — P. 291–302.
18. Schwertz, A. Quantification of Different Eubacterium spp. in Human Fecal Samples with Species-Specific 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes / A. Schwertz, G. Le Blay, M. Blaut // Appl. Environ. Microbiol. — 2000. — V. 66(1). — P. 375–382.
19. Silva, E. Genomic Characterization of Arcanobacterium pyogenes Isolates Recovered from the Uterus of Dairy Cows with Normal Puerperium or Clinical Metritis / E. Silva, M. Gaivao, S. Leitao, B.H. Jost, C. Carneiro, C.L. Vilela, L. Lopes da Costa, L. Mateus // Vet Microbiol. — 2008. — V.132. — P. 111–118.
20. Suzuki, N. Quantitative Microbiological Study of Subgingival Plaque by Real-Time PCR Shows Correlation between Levels of Tannerella forsythensis and Fusobacterium spp. / N. Suzuki, A. Yoshida, T. Saito, M. Kawada, Y. Nakano // J. Clin. Microbiol. — 2004. — V. 42(5). — P.2255–2257.
21. Verhelst, R. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between Atopobium vaginae, Gardnerella vaginalis and bacterial vaginosis / R. Verhelst, H. Verstraelen, G. Claeys, G. Verschraegen, J. Delanghe, L. Van Simaey, C. De Ganck, M. Temmerman, M. Vaneechoutte // BMC Microbiol. — 2004. — V. 4. — P. 16.
22. Wang, Y. Characterisation of the bacterial microbiota of the vagina of dairy cows and isolation of pediocin-producing *Pediococcus acidilactici* / Y. Wang, B.N. Ametaj, D.J. Ambrose and M.G. Ganzle // BMC Microbiology. — 2013. — V. 13 — P. 19–30.
23. Wood, J. Estimation of the Relative Abundance of Different Bacteroides and Prevotella Ribotypes in Gut Samples by Restriction Enzyme Profiling of PCR-Amplified 16S rRNA Gene Sequences / J. Wood, K.P. Scott, G. Avgustin, C.J. Newbold, H.J. Flint // Appl. Environ. Microbiol. — 1998. — V. 64(10). — P.3683–3689.
24. Zhao, Y. Rapid Real-Time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification-Molecular Beacon Platform To Detect Fungal and Bacterial Bloodstream Infections / Y. Zhao, S. Park, B.N. Kreiswirth, C.C. Ginocchio, R. Veyret, A. Laayoun, A. Troesch, D.S. Perlin // J. Clin. Microbiol. — 2009. — V. 47(7). — P. 2067–2078.

## SUMMARY

G.Yu. Laptev<sup>1</sup>, N.I. Novikova<sup>1</sup>, L.A. Ilyina<sup>1</sup>, E.A. Yyldyrym<sup>1</sup>, V.A. Dumova<sup>1</sup>, E.A. Korochkina<sup>2</sup>

<sup>1</sup> LLC «Biotrof» (St. Petersburg).

<sup>2</sup> St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine (St. Petersburg).

**Research of Vaginal Bacterial Slime Matrix of High-yielding Cows in Postpartum Period by Real-time PCR-method.** The objective of this study was to realize the comparative analysis of vaginal microbiocenosis of high-yielding cows in the postpartum period by Real-time PCR-method. Results of this study indicate that cows with acute postpartum endometritis have an acrid increase of number of opportunistic and pathogenic microorganism compare with clinically healthy cows.