

демии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. – 2015. – №1. Т. 221. – С. 118-120.  
4. Фофанова И.Ю. Современные представления об урогенитальной микоплазменной инфекции / И.Ю. Фофанова, В.Н. Прилепская // Гинекология.

– 2014. – Т.16. №2. – С. 4-8.

5. Vasiliev, R.M. Immuno-biological properties of vaginal discharge in healthy and mycoplasmosis-infected cows / R.M. Васильев, С.В. Васильева // Медицинская иммунология. – 2021. – Том 23, №4. – С. 987-990.

## INDICATORS OF CELLULAR IMMUNITY IN COWS WITH GENITAL MYCOPLASMOSIS

Roman M. Vasiliev, Ph.D. of Veterinary Sciences, Docent, [orcid.org/0000-0002-0693-3050](https://orcid.org/0000-0002-0693-3050)

St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, Russia

Urogenital mycoplasmosis is currently widespread in livestock farms both in our country and abroad. Unfortunately, today we have little data on the pathogenesis of this disease, and in particular on the state of the immune system of cows with genital mycoplasmosis. We have carried out a comparative study of indicators of cellular immunity in healthy cows and cows with genital mycoplasmosis. The study was carried out on pregnant cows. In healthy and mycoplasma-infected cows, the relative and absolute content of lymphocyte subpopulations was determined. It has been established that with genital mycoplasmosis in cows there is a significant decrease in the number of leukocytes and a decrease in the relative and absolute content of B-lymphocytes. Thus, infected animals develop a moderate immunodeficiency state due to prolonged exposure to mycoplasma metabolites, which inhibit the proliferative activity of immunocompetent cells. These changes should be taken into account when developing treatment regimens for genital mycoplasmosis.

**Key words:** mycoplasmosis, cows, immunity, T-lymphocytes, B- lymphocytes.

## REFERENCES

1. Vasiliev R.M. The role of chlamydial and mycoplasmal infection in the etiology of infertility in cattle / R.M. Vasiliev // International Veterinary Bulletin. - 2008. - No. 3. - S. 15-16.
2. Vasiliev, R.M. Immunological indicators of blood serum of cows and calves with mycoplasmosis / R.M. Vasiliev // Issues of legal regulation in veterinary medicine. - 2012. - No. 3. - S. 26-29.
3. Kovalev S.P. Dynamics of some humoral indicators of innate immunity in calves with enteritis / S.P. Kovalev,

V.A. Trushkin // Scientific notes of the Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after A.I. N. E. Bauman. - 2015. - No. 1. Т. 221. - S. 118-120.

4. Fofanova I.Yu. Modern ideas about urogenital mycoplasma infection / I.Yu. Fofanova, V.N. Prilepskaya // Gynecology. - 2014. - Т.16. No. 2. - P. 4-8.

5. Vasiliev, R.M. Immuno-biological properties of vaginal discharge in healthy and mycoplasmosis-infected cows / R.M. Vasiliev, S.V. Vasilyeva // Medical Immunology. - 2021. - Volume 23, No. 4. - S. 987-990.

УДК: 579.842.1/2.083.18

DOI: 10.52419/issn2782-6252.2022.3.33

## ДЕТЕКЦИЯ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Макавичик Светлана Анатольевна, д-р.ветеринар.наук, доц., [orcid.org/0000-0001-5435-8321](https://orcid.org/0000-0001-5435-8321)

Воробьева Елизавета Дмитриевна, студент,

Травина Валерия Вячеславовна, студент

Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Россия

## РЕФЕРАТ

Цель работы - провести полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени для выделения энтеробактерий из фекалий маисового полоза и их идентификации.

Отобраны фекальные массы после линьки у самца маисового полоза по кличке Кролик морфы Bloodred het Pied-Sided. Дата выхода из яйца: 19.06.2020.

Выделение нуклеиновых кислот из образцов фекалий проводили с использованием комплекта реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии) в соответствии с инструкцией производителя.

Для проведения амплификации применяли тест – систему «Сальм-ИДС» для выявления патогенных сальмонелл (*Salmonella spp et Salmonella Typhi*). Процесс амплификации проводили в приборе для ПЦР-РВ LightCycler 96 (Roche).

При исследовании фекалий от пресмыкающегося молекулярным методом обнаружен род *Salmonella*.

ПЦР-исследование не позволило провести видовую идентификацию и определить жизнеспособность микроорганизма, то необходимо создание схемы лабораторного контроля сальмонеллезной инфекции, которая будет включать как ПЦР, так и бактериологические исследования.

**Ключевые слова:** энтеробактерии, ПЦР в режиме реального времени, детекция, идентификация.

## ВВЕДЕНИЕ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени и с электрофоретической детекцией широко применяется в ветеринарных лабораториях. Благодаря своей высокой чувстви-

тельности, ПЦР позволяет выявить возбудителя даже при минимальном его содержании, особенно это актуально при бессимптомном течении инфекционного процесса [2,3,4,8].

В связи с этим, одним из приоритетных направлений развития лабораторной идентифи-

кации энтеробактерий является внедрение в практику новых молекулярно-генетических методов и усовершенствование имеющихся тест-наборов, повышая чувствительность, специфичность и быстроту исполнения [5,6,7].

В лабораторной практике используются наборы реагентов (тест-системы) для выявления энтеропатогенной кишечной палочки «Коли-ИДС» (*E.coli*), условно-патогенных энтеробактерий «Энтеробак-ИДС» (*Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*) и др. производства «Инновационные диагностические системы» («ИДС») можно использовать для скрининговых исследований биологического материала, полученного от животных [1].

Секвенирование 16S рРНК применяют как референс-метод для идентификации выделенных микроорганизмов с атипичными свойствами [1,7].

Молекулярно-генетический метод расширяет наше представление о видовом разнообразии энтеробактерий, выделенных от животных и дает основание для изучения их возможной роли как в поддержании состояния нормоценоза, так и развитии патологических процессов [7,9].

Эпизоотологический надзор за инфекционными болезнями должен основываться на этиологической расшифровке возбудителей. Идентификация вида возбудителя является основой эпизоотологического надзора и определяет тактику планируемых противоэпизоотических мероприятий [1,6].

**Цель исследования:** применение полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для детекции энтеробактерий рода *Salmonella* из фекалий маисового полоза.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отобраны фекальные массы после линьки у самца маисового полоза по кличке Кролик морфы Bloodred het Pied-Sided (рис.1). Дата выхода из яйца: 19.06.2020.

На данный момент змея содержится на субстрате из буковых щепок. Питается размороженными мышами из магазина «ЗАВР», который специализируется на экзотических животных. Питомец имеет постоянный доступ к укрытию и свежей воде. Активничает и любит внимание. В этом возрасте уже считается половозрелым, но и половину от взрослого веса еще не набрал.

Змея линяет неделю, и если до линьки примет



Рисунок 1. Самец маисового полоза по кличке Кролик морфы Bloodred het Pied-Sided

пищу, то не сможет испражниться во время самой линьки.

Выделение нуклеиновых кислот из образцов фекалий проводили с использованием комплекта реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии) в соответствии с инструкцией производителя.

Для проведения амплификации применяли тест – систему «Сальм-ИДС» для выявления патогенных сальмонелл (*Samonella spp. et Salmonella Typhi*). Процесс амплификации проводили в приборе для ПЦР-РВ LightCycler 96 (Roche). Для амплификации, состоящей из циклов денатурация, гибридизация и синтез цепей ДНК использовали температурные параметры: 95° С-5 мин -1цикл, последующие 5 и 35 циклов 2-этапная амплификация 95 °С в течение 15 сек, 56°С-30 сек.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании молекулярным методом в фекалиях от маисового полоза обнаружен род *Salmonella*. Полученные результаты учитывали и считали достоверными, если одновременные исследования положительных и отрицательных контролей дают соответственные положительные и отрицательные результаты (Рис.2).

Анализируя график регистрации результатов ПЦР в режиме реального времени видно, что исследуемая проба содержит генетический материал *Salmonella spp.*

Поскольку ПЦР в режиме реального времени не позволяет определить жизнеспособность микроорганизма и провести видовую идентификацию, то необходимо создание схемы лабораторного контроля сальмонеллезной инфекции, которая будет включать как ПЦР, так и бактериологические исследования.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для своевременной идентификации, диагностики, эффективного лечения и профилактики инфекционных болезней животных необходимо проводить комплексные лабораторные исследования, которые включают молекулярно-генетические и бактериологические методы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Макавчик, С.А. Лабораторные методы контроля полирезистентных возбудителей бактериальных болезней животных и рациональное применение антимикробных препаратов: монография / С.А. Макавчик, А.А. Сухинин, С.В. Енгашев, А.Л. Кротова. – Санкт-Петербург: изд-во ВВМ, 2021 г. – 152 с.: ил.

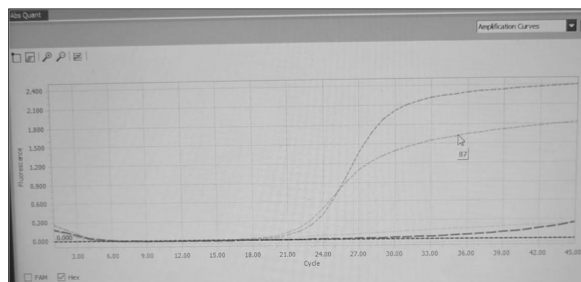


Рисунок 2. График регистрации результатов ПЦР в режиме реального времени

2. Макавчик, С.А. Эффективность определения *Mycoplasma bovis* в молоке коров при маститах с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на микрочипе с лиофилизированными тест-системами/Макавчик С.А.// Международный вестник ветеринарии. - 2019.- № 2.- С. 11-16.
3. Понамарёв, В.С. Полимеразная цепная реакция с электрофоретической детекцией продуктов амплификации /Понамарёв В.С., Макавчик С.А.// Молодежный научный форум: естественные и медицинские науки.- 2016. -№ 10 (38).- С. 148-152.
4. Сухинин, А.А. Применение полимеразной цепной реакции в молекулярной диагностике инфекционных болезней животных/ Сухинин А.А., Макавчик С.А., Прасолова О.В., Виноходова М.В.// Учебное пособие.— СПб.: Изд-во ФГБОУ ВО СПбГАВМ, 2017,— 96 с.
5. Сухинин, А.А. Положительные и отрицательные аспекты диагностического использования мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени (Real - time PCR)// Сухинин А.А., Макавчик С.А., Прасолова О.В. Международный вестник ветеринарии. 2016. - № 1. - С. 41-45.
6. Сухинин, А.А. Мультиплексная ПЦР в реальном времени, как экспресс-метод лабораторной

диагностики инфекционных болезней животных/ Сухинин А.А., Макавчик С.А., Прасолова О.В.// В книге: Новые методы экспресс-диагностики микроорганизмов в медицине, фармации, ветеринарии и экологии. Сборник материалов.- 2015.- С. 253-254.

7. Сухинин, А.А. Полимеразная цепная реакция для выявления *Ureaplasma diversum* у крупного рогатого скота/ Сухинин А.А., Макавчик С.А., Смирнова Л.И., Приходько Е.И.//Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии.- 2017.- № 1. -С. 45-47.
8. Сухинин, А.А. Практикум по общей ветеринарной микробиологии/Сухинин А.А., Тулева Н.П., Белкина И.В., Смирнова Л.И., Бакулин В.А., Приходько Е.И., Макавчик С.А., Виноходов В.О. Санкт-Петербургский политологический журнал. - 2016.- С. 100.
9. Сулянь, О.С. Ассоциированная устойчивость к полимиксину и бета-лактамам *Escherichia coli*, выделенных от людей и животных/ Сулянь О.С., Агеев В.А., Сухинин А.А., Агеев И.В., Абгарян С.Р., Макавчик С.А., Каменева О.А., Косякова К.Г., Мругова Т.М., Попов Д.А., Пунченко О.Е., Сидоренко С.В. // Антибиотики и химиотерапия. - 2021. - Т. 66. - № 11-12.- С. 9-17.

#### DETECTION OF ENTEROBACTERIA USING POLYMERASE CHAIN REACTION REAL-TIME

*Svetlana A. Makavchik, Dr.habil of Veterinary Sciences, Docent, orcid.org/ 0000-0001-5435-8321,*

*Elizaveta D. Vorobieva, student,*

*Valeria V. Travina, student*

*St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, Russia*

The purpose of the work is to carry out a real-time polymerase chain reaction for the isolation of enterobacteria from the faeces of the maize snake and their identification.

Fecal masses after molting were collected from a male maize snake named Rabbit of Bloodred het Pied-Sided morph. Egg release date: 06/19/2020.

Isolation of nucleic acids from faecal samples was carried out by the sorption method using the AmpliPrime DNA-sorb-AM reagent kit (Central Research Institute of Epidemiology) in accordance with the manufacturer's instructions.

For amplification, a test was used - the Salm-IDS system for the detection of pathogenic *Salmonella* (*Salmonella* spp et *Salmonella* Typhi). The amplification process was carried out in a LightCycler 96 (Roche) PCR-RT instrument.

In the study of feces from a reptile by the molecular method, the genus *Salmonella* was discovered.

The PCR study did not allow for species identification and determination of the viability of the microorganism, it is necessary to create a scheme for laboratory control of salmonella infection, which will include both the PCR method and bacteriological studies.

**Key words:** enterobacteria, PCR Real - time, detection, identification.

#### REFERENCES

1. Makavchik, S.A. Laboratory methods for the control of multiresistant pathogens of bacterial animal diseases and the rational use of antimicrobial drugs: monograph / S.A. Makavchik, A.A. Sukhinin, S.V. Engashev, A.L. Krotov. - St. Petersburg: VVM publishing house, 2021 - 152 p.: ill.
2. Makavchik, S.A. Efficiency of detection of *Mycoplasma bovis* in milk of cows with mastitis using real-time polymerase chain reaction on a microchip with lyophilized test systems / Makavchik S.A.// International Veterinary Bulletin. - 2019.- No. 2.- S. 11-16.
3. Ponomarev, V.S. Polymerase chain reaction with electrophoretic detection of amplification products /Ponomarev V.S., Makavchik S.A.// Youth Scientific Forum: Natural and Medical Sciences. - 2016. - No. 10 (38). - P. 148-152.
4. Sukhinin, A.A. The use of polymerase chain reaction in the molecular diagnosis of infectious animal diseases / Sukhinin A.A., Makavchik S.A., Prasolova O.V., Vinokhodova M.V. 2017. - 96 p.
5. Sukhinin, A.A. Positive and negative aspects of the diagnostic use of real-time multiplex polymerase chain reaction (Real-time PCR)// Sukhinin A.A., Makavchik S.A., Prasolova O.V. International Bulletin of Veterinary

Medicine. 2016. - No. 1. - S. 41-45.

6. Sukhinin, A.A. Multiplex real-time PCR as an express method for laboratory diagnosis of infectious animal diseases / Sukhinin A.A., Makavchik S.A., Prasolova O.V.// In the book: New methods of express diagnostics of microorganisms in medicine, pharmacy, veterinary medicine and ecology. Collection of materials.- 2015.- S. 253-254.

7. Sukhinin, A.A. Polymerase chain reaction for the detection of *Ureaplasma diversum* in cattle / Sukhinin A.A., Makavchik S.A., Smirnova L.I., Prihodko E.I.//Issues of legal regulation in veterinary medicine.- 2017.- No. 1. -S. 45-47.

8. Sukhinin, A.A. Workshop on General Veterinary Microbiology/ Sukhinin A.A., Tuleva N.P., Belkina I.V., Smirnova L.I., Bakulin V.A., Prihodko E.I., Makavchik S.A., Vinokhodov V.O. St. Petersburg Journal of Political Science. - 2016. - P. 100.

9. Sulyan, O.S. Associated resistance to polymyxin and *Escherichia coli* beta-lactams isolated from humans and animals Sulyan O.S., Ageevets V.A., Sukhinin A.A., Ageevets I.V., Abgaryan S.R., Makavchik S.A., Kamenева O.A., Kosyakova K.G., Mrugova T. M., Popov D.A., Puchenko O.E., Sidorenko S.V. // Antibiotics and chemotherapy. - 2021. - Т. 66. - No. 11-12.- S. 9-17.