

## **ДЕТАЛИЗАЦИЯ СХЕМ МОНИТОРИНГА И АЛГОРИТМА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПРИ АССОЦИИРОВАННЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

**Багрецова А.А., Иванова А.А., Клёпова Ю.В. аспиранты**

**Порываева А.П., доктор биологических наук**

**Петрова О.Г., доктор ветеринарных наук**

**ФГБНУ «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр» УрО РАН**

**Аннотация.** Получены данные о проблемах диагностики этиологических агентов возбудителей эпизоотически значимых болезней и возбудителей ассоциированных инфекционных болезней крупного рогатого скота среди популяций сельскохозяйственных животных Уральского Федерального Округа. Детализованы схемы мониторинга и дифференциальной диагностики заболеваний с респираторным синдромом у крупного рогатого скота. Уточнены основные факторы, влияющие на процессы антителообразования при вакцинопрофилактике острых респираторных вирусных инфекций крупного рогатого скота, у эпизоотически значимых групп животных. Проведен ретроспективный и оперативный анализ данных о применяемых лабораторных методах диагностики ассоциированных инфекционных болезней крупного рогатого скота, в том числе в отношении возбудителей группы острых респираторных вирусных инфекций крупного рогатого скота. Разработана схема диагностических исследований по выявлению этиологического агента заболеваний с респираторным синдромом у молодняка крупного рогатого скота. Проведены экспериментальные исследования по апробации разработанной схемы диагностических исследований по выявлению этиологических агентов заболеваний с респираторным синдромом у эпизоотически значимых групп животных; по изучению особенностей формирования поствакцинального иммунитета против возбудителей ОРВИ у эпизоотически значимых групп животных на базе сельскохозяйственных предприятий Свердловской области.

**Ключевые слова:** лабораторные исследования, ассоциированные инфекционные заболевания, острые респираторные вирусные инфекции, крупный рогатый скот, экономические потери, алгоритм диагностики.

## **DETAILED MONITORING SCHEMES AND DIFFERENTIAL DIAGNOSIS ALGORITHM FOR ASSOCIATED INFECTIOUS DISEASES OF CATTLE**

**Bagretsova A.A., Ivanova A.A., Klepova Yu.V. graduate students**

**Poryvaeva A.P., doctor of biological sciences**

**Petrova O.G., doctor of veterinary sciences**

**Ural Federal Agrarian Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences**

**Annotation.** Data on the problems of diagnosing etiological agents of pathogens of epizootically significant diseases and causative agents of associated infectious diseases of cattle among the populations of farm animals of the Ural Federal District were obtained. Detailed monitoring and differential diagnosis diagnosis schemes with respiratory syndrome in cattle. The main factors affecting the processes of antibody formation with the vaccine-philaxcies of acute respiratory viral infections of cattle, in epizootically significant groups of animals are refined. A retrospective and operational analysis of data on the laboratory methods of diagnostics of associates of cattle infectious diseases applied, including in relation to the pathogens of a group of acute respiratory viral livestock infections. A diagram of diagnostic research was developed to identify the etiological agent of diseases with respiratory syndrome in young cattle. Experimental studies on the approbation of the developed diagnostic study scheme to identify the etiological agents of diseases with respiratory syndrome in epizootically significant groups of animals; To study the peculiarities of the formation of post-validity immunity against the ESVI pathogens in

epizootically significant groups of animals were performed on the basis of agricultural enterprises of the Sverdlovsk region

**Keywords:** laboratory studies, associated infectious diseases, acute respiratory viral infections, cattle, economic losses, diagnostic algorithm

**Цель работы** – дать теоретическое обоснование детализации схем мониторинга и алгоритма дифференциальной диагностики при эпизоотически значимых инфекционных болезнях сельскохозяйственных животных.

#### **Задачи:**

Обосновать и провести сравнительный анализ эффективности детализации алгоритма дифференциальной диагностики при ассоциированных инфекционных болезнях сельскохозяйственных животных, в том числе в отношении возбудителей группы острых респираторных вирусных инфекций крупного рогатого скота.

#### **Материалы и методы**

Работа выполнена в рамках направления 160 Программы ФНИ государственных академий наук по теме «Изучить структуру антигенного пейзажа возбудителей эмерджентных инфекций сельскохозяйственных животных, биологические особенности механизмов их взаимодействия с макроорганизмом» (№ 0532-2021-0007) в отделе мониторинга и прогнозирования инфекционных болезней ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН.

Ретроспективный анализ о диагностических исследованиях в отношении возбудителей группы ОРВИ крупного рогатого скота проведён по данным 28 сельскохозяйственных предприятий (СХП) из 5 районов Свердловской области за период 2014-2021 гг.

Сравнительный анализ эффективности применения усовершенствованного комплекса диагностических мероприятий при ассоциированных с ОРВИ инфекционных болезнях сельскохозяйственных животных выполнен на ограниченной популяции молодняка из 3-х сельскохозяйственных предприятий Свердловской области (n=249 голов).

В процессе работы применяли серологические, вирусологические, иммунологические, молекулярно-генетические, копрологические методы исследований, статистические методы обработки данных.

*Серологические исследования* биоматериалов выполняли методом непрямой гемагглютинации (РНГА), в реакции торможения гемагглютинации (РТГА), методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для выявления антител к вирусам ИРТ КРС, ВД КРС, ПГ-3 КРС, РСИ КРС использовали коммерческие наборы эритроцитарных диагностикумов (производство России). Учет результатов РНГА, РТГА проводили визуально, титр антител выражали в обратных значениях логарифма по основанию 2 ( $\log_2$ ). Для выявления

антигенов возбудителей ротавирусной, коронавирусной инфекции, эшерихиоза, ИРТ КРС, ВД КРС, хламидиоза, неоспороза применяли тест-системы ИФА производства IDEXX Laboratories Inc, France. Постановка реакций осуществлялась в боксах биобезопасности (ESCO, Корея); учет результатов ИФА исследований – на ридере SUNRISE (Tecan, Австрия).

*Вирусологические исследования* биоматериалов проводили на клеточной культуре MDBK. Идентификацию выделенного возбудителя ВД КРС проводили методом твердофазного ИФА с использованием набора «Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Antigen Test Kit/Serum Plus» (IDEXX Laboratories, Inc, США); с учетом результатов на ридере SUNRISE (Tecan, Австрия).

*Иммунологические исследования* – определение относительного и абсолютного числа Т- и В- лимфоцитов; фагоцитарной активности нейтрофильных клеток; уровня циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови проводили согласно методическим рекомендациям. Реакции клеточного звена иммунитета учитывали на микроскопе MC 50 (MICROS, Австрия), уровень ЦИК – на ридере SUNRISE (Tecan, Австрия).

*Бактериологические исследования* биоматериалов проводили по методам общей микробиологии «Методические рекомендации. Методы бактериологического исследования условно-патогенных микроорганизмов в клинической микробиологии», 1991, МУК 4.2.1890-04. Учет результатов исследования осуществляли на микроскопе Axio Observer (Zeiss, Германия).

*Молекулярно-генетические исследования* биоматериалов проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). При проведении дифференциальных лабораторных исследований использовали набор для выделения РНК (Bovine virus diarrhoea) и ДНК (Bovine herpes virus type 1, Chlamydia abortus, Chlamydia pecorum, Mycoplasma spp.) патогенов методом ПЦР с применением тест-систем для выделения ДНК «Diatom DNA Prep 200» компания ООО «ИзоГен» (Москва), наборов на определение хламидиоза крупного рогатого скота «ПЦР-Хламидия – фактор» (компания ООО «ФакторМед», Москва), на определение инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота «Gen Pak DNA PSR Test BHV1» (ООО «ИзоГен», Москва), на определение вируса диареи крупного рогатого скота, микоплазмоза (ООО «ИнтерЛабСервис», Москва). Исследования проводили в режиме реального времени (Rotor-Gene 3000 (Corbett Life Science, Австралия).

Исследования выполнены в электрофорезном варианте с применением агарозного геля и мини-камеры Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, США) с визуализацией под

ультрафиолетовым излучением в камере CHEMIDOC XRS+ с интерпретацией результатов с помощью гель-документации Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США).

*Копрологические исследования* биоматериалов проводили методом седиментационной и флотационной диагностики по Фюллеборну. Учет результатов исследования осуществляли на микроскопе «Биолам 13» и «Микмед-5» (производство РФ).

Достоверность результатов подтверждали путем статистической обработки и определения различий средних значений с помощью критерия Стьюдента. Результаты считали достоверными при  $P < 0,05$ . Для обработки полученных данных использовали программу Microsoft Excel, входящую в пакет программ Microsoft Office Pro.

## **Введение**

Вопросы оздоровления и защиты популяций животных от эпизоотически значимых болезней являются актуальными для ветеринарной науки и практики. Внедрение многоуровневого эпизоотического надзора над популяциями сельскохозяйственных животных позволяет предупреждать возникновение и распространение особо опасных инфекций, сдерживать управляемые инфекции, снижать риск постинфекционных осложнений, повышать экономическую эффективность животноводческой отрасли в целом [1-3,9,10].

Высокая концентрация поголовья на ограниченной территории, несоблюдение зоогигиенических норм и различные стресс-факторы создают условия для возникновения и формирования ассоциированных инфекционных болезней (АИБ). В ряду полиэтиологических возбудителей ассоциированного инфекционного процесса вирусы группы ОРВИ являются одними из кофакторов, которые способны снижать в разы уровень общей резистентности организма животного.

Вопросы комплексных клинико-лабораторных исследований остаются актуальными в современной ветеринарной практике. Развитие методологической и инструментальной базы, материально-технического оснащения ветеринарной медицины не снижает остроту проблемы качества и эффективности клинико-лабораторной диагностики ОРВИ крупного рогатого скота. Ранняя диагностика, а также своевременное выявление скрытых вирусоносителей служит важным фактором в оздоровлении племенных хозяйств от ОРВИ крупного рогатого скота и недопущении распространения инфекции. В связи с этим применение новых методов диагностики, способных выявить латентных вирусоносителей в племенных хозяйствах является весьма актуальным [4-7].

## Результаты исследования

Анализ лабораторных методов диагностики, применяемых в отношении возбудителей группы ОРВИ крупного рогатого скота, установил, что в 73,5-82,1% случаев применялись традиционные методы серологического скрининга для определения напряженности иммунитета у животных после проведения вакцинопрофилактики (рис. 1)

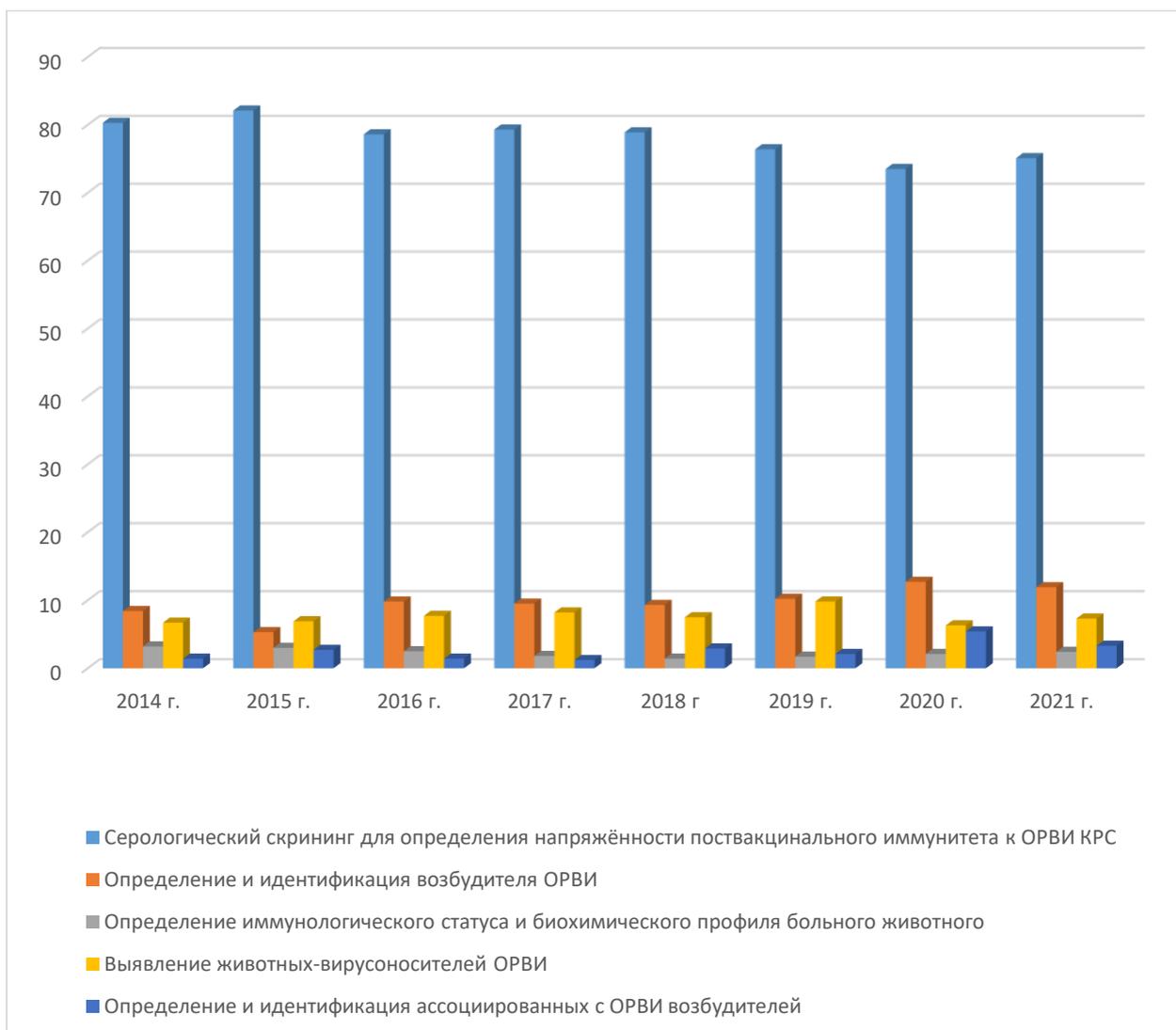


Рисунок 1 – Долевое распределение методов лабораторной диагностики ОРВИ крупного рогатого скота и ассоциированных с ними инфекционных агентов в период 2014-2021 г.

Для детализации антигенного пейзажа при ассоциированных инфекционных болезнях сельскохозяйственных животных Донник И.М., Порываевой А.П., Шиловой Е.Н., Печура Е.В. (2018) было предложено применение комплекса диагностических мероприятий (рис. 2)



Рисунок 2 – Схема диагностических мероприятий при ассоциированных инфекционных болезнях сельскохозяйственных животных, в том числе в отношении возбудителей группы ОРВИ крупного рогатого скота

Эффективность разработанного алгоритма диагностики инфекционной этиологии заболеваний крупного рогатого скота изучали на ограниченной популяции молодняка сельскохозяйственных предприятий Свердловской области (табл. 1). По статистическим данным ветеринарной отчетности заболевания респираторного тракта у молодняка крупного рогатого скота регистрируются в 24-28% случаев, заболевания желудочно-кишечного тракта – в 48-52%, заболевания незаразной патологии – в 20-36% случаев. При заболеваниях респираторного тракта вирусная этиология заболевания диагностируется в 14,7% случаев, при заболеваниях желудочно-кишечного тракта – в 12,4%, при заболеваниях незаразной патологии – в 0,9% случаев [2, 5, 8].

Таблица 1 – Долевое распределение нозологических форм заболеваний у обследованных телят, принадлежащих СХП Свердловской области

Нозологическая форма	СХП -1 n=73	СХП -2 n=108	СХП -3 n=68
Заболевания респираторного тракта	16,4%	48,1%	5,9%
Заболевания респираторного тракта с диарейным синдромом	1,4%	25,0%	5,6%
Заболевания желудочно-кишечного тракта	43,2%	6,5%	22,1%
Заболевания незаразной патологии – нарушение минерального обмена, гипотрофия и т.д.	38,4%	20,4%	66,4%

Проведенные диагностические исследования показали, что у обследованного молодняка крупного рогатого скота этиологическим агентом инфекционных заболеваний являются ассоциации возбудителей – вирусы группы ОРВИ, ОКИ, патогенные микроорганизмы, простейшие.

При сравнительном анализе полученных результатов исследований было установлено, что в СХП – 1 при заболеваниях респираторного тракта диагностируется возбудители группы ОРВИ: серологическим методом (РТГА парных сывороток) в 2,1% случаев обнаружен ПГ-3; молекулярно-генетическим методом (ПЦР) – вирус ИРТ в 2,1% случаев; в ассоциации с патогенными микроорганизмами рода *Staphylococcus spp.* Отсутствие возбудителей ОРВИ в группе телят с незаразной патологией указывает на то, что в обследованной популяции животных циркуляция этих инфекционных агентов минимальна и количество животных-вирусоносителей не превышает 0,3% от общего поголовья молодняка [7].

В СХП – 2 количество инфицированных возбудителями ОРВИ телят составляло 37,2%. У животных диагностировали вирус ПГ-3 в 20,6% случаев, ассоциации вирус ПГ-3 + вирус ВД – в 5,4 %, вирус ПГ-3 + вирус ИРТ – в 10,1%, вирус ПГ-3 + вирус ИРТ + вирус ВД – 1,1% случаев. Антиген вируса ВД был выявлен методом ИФА. Кроме того молекулярно-генетическим методом (ПЦР) в обследованной популяции выявлены телята-вирусоносители. В 13,8% случаев вирусоносители возбудителя ИРТ, в 8,9% случаев – возбудителя ВД.

В СХП – 3 у телят этиологическим агентом заболеваний респираторного тракта являются патогенные микроорганизмы рода *Staphylococcus spp.* Возбудители группы ОРВИ не были обнаружены. Необходимо также отметить, что и при заболеваниях желудочно-кишечного тракта у телят только в 12% случаев определялись антигены вирусов группы ОКИ. Методом ИФА ротавирус диагностировали в 5% случаев и коронавирус – в 7% случаев. Доминирующими этиологическими агентами, как при заболеваниях респираторного тракта, так и желудочно-кишечных заболеваниях являлись *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* и гемолизирующая *E. coli*.

Во всех обследованных сельскохозяйственных предприятиях у молодняка крупного рогатого скота диагностированы протозойные инвазии, в основном *Eimeria bovis*: в СХП -1 – в 6,8% случаев; в СХП-2 – в 13,6% случаев; в СХП -3 – в 3,1% случаев.

### **Выводы**

Таким образом, выполненные комплексные диагностические исследования по детализации схем мониторинга и алгоритма дифференциальной диагностики при ассоциированных инфекционных заболеваниях крупного рогатого скота позволили установить ведущее звено в этиологической структуре заболеваний респираторного тракта молодняка крупного рогатого скота в сельскохозяйственных предприятиях :

1. В СХП -1 только в 4,2% случаев заболевания респираторного тракта были обусловлены возбудителями группы ОРВИ. В 32,2% случаев у больных телят диагностировали ассоциации патогенных микроорганизмов с доминированием представителей рода *Staphylococcus spp*; у 3,2% животных заболевание осложнялось протозойной инвазией.

2. В СХП-2 у 37,2% телят в качестве ведущего кофактора при заболеваниях респираторного тракта выявляли вирус ПГ-3, который в 20,6% случаев определялся в ассоциации с патогенными микроорганизмами *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp*. В 16,6% случаев диагностировались вирус-вирус-бактериальные ассоциации с сопутствующей протозойной инвазией.

3. В СХП-3 у телят заболеваний респираторного тракта обусловлены бактериальной инфекцией (5,9%). Основной нозологической формой (27,7%) в обследованной популяции молодняка были заболевания желудочно-кишечного тракта. Вирусная этиология заболевания установлена в 12% случаев.

### **Список литературы**

1. Алексеев А.Д. Особенности проявления острых респираторных вирусных инфекций крупного рогатого скота в современных условиях/ А.Д. Алексеев, О.Г. Петрова, Л.И. Дроздова// Аграрный вестник Урала. – 2015. - № 6(136). – С. 38-40.

2. Вакцины и вакцинация: национальное руководство. Под. общ. ред. Зверев В.В., Семенов Б.Ф., Хайтов Р.М. // М: Геотар-Медиа, 2011 – 880 с.

3. Глотов А.Г. Вирусная диарея: значение в патологии воспроизводства крупного рогатого скота/ А.Г. Глотов, Т.И. Глотова // Ветеринария. - 2015. - № 4. - С. 3-8.

4. Львов Н.И. Острые респираторные заболевания. Руководство по инфекционным болезням: в 2 кн. / Н.И. Львов, В.П. Лихопоев. – СПб.: Фолиант, 2011. – 2(III). – С. 7-122.

5. Манько В.М. Ветеринарная иммунология. Фундаментальные основы. Учебник / В.М. Манько, Д.А. Девришов – М.: Агровет, 2011. – 752 с.
6. Мищенко В.А. Основные причины выбытия высокопродуктивных коров / В.А. Мищенко, Н.А. Яременко, Д.К. Павлов// Ветеринария. - 2004. - № 10. – С. 15-17.
7. Никулина Н.Б. Влияние микотоксинов на показатели поствакцинального иммунитета у коров и колострального иммунитета у телят/ Н.Б. Никулина// Сиб. вест. с-х науки. – 2010. - № 6. – С. 82-87.
8. Ряпосова М.В. Распространение и структура гинекологических заболеваний у коров в племенных организациях Свердловской области/ М.В. Ряпосова// Аграрный вестник Урала. – 2011. - № 6. – С. 21-22.
9. Шилова Е.Н. Применение инактивированной вакцины «Хипробовис-4» для профилактики ОРВИ в хозяйствах Свердловской области/ Е.Н. Шилова, Л.А. Климова, И.В. Вялых, Д.М. Кадочников, М.И. Тарасов// Ветеринария. – 2014. – № 11. – С. 15-17.
10. Шкуратова И.А. Ветеринарно-санитарные аспекты профилактики болезней молодняка крупного рогатого скота в современных промышленных комплексах/ И.А. Шкуратова, Е.Н. Шилова, О.В. Соколова// Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2015.– № 3 (15). – С. 60-63.