

УДК 619:578.825.15

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Красочко В.П., Красочко П.П., Яромчик Я.П.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

*Использование праймеров, подобранных к участкам генов вируса ИРТ КРС кодирующих гликопротеин В, главный белок капсида, входной белок капсида и отвечающий за синтез РНКазы, позволяет достоверно установить генетическую вариабельность консервативных генов изучаемого вируса. **Ключевые слова:** вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, геном, вариабельность, праймеры.*

GENETIC VARIABILITY OF INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS VIRUS

Krasochka V.P., Krasochka P.P., Yaromchik Y.P.

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

*The use of primers selected for sections of the genes of the IBR virus encoding glycoprotein B, the main protein of the capsid, the input protein of the capsid and responsible for the synthesis of RNase, can reliably establish the genetic variability of the conserved genes of the studied virus. **Keywords:** bovine infectious rhinotracheitis virus, genome, variability, primers.*

Введение. Среди вирусных инфекций крупного рогатого скота широко распространены заболевания органов дыхания, пищеварения и размножения, возбудителями которых являются в основном вирусы, относящиеся к семействам герпесвирусов (вирус инфекционного ринотрахеита/ инфекционного пустулезного вульвовагинита крупного рогатого скота (ИРТ/ИПВ КРС, далее ИРТ КРС)), парамиксовирусов (вирусы парагриппа-3 и респираторно-синтициальный вирус), флавивирусы (вирус диареи – болезни слизистых), аденовирусы и т.д. Это так называемые «малые» инфекции, которые у здоровых животных с нормальным функционированием иммунной системы протекают бессимптомно без выраженных клинических признаков или животные вообще не переболевают данными инфекциями. Особенно тяжело болеют животные, когда в патологический процесс вовлекается 2 и более вирусов, то есть возникает смешанная или ассоциативная инфекция [2, 4]. По данным Е.В. Андреева [1], П.П. Фукс [7], П.А. Красочко [5] и других исследователей, течение вышеуказанных болезней развивается в две фазы: первая – вирусная, вторая – бактериальная. При тяжелом течении вирусной фазы болезни наряду с поражением чувствительных клеток наступает значительное угнетение клеточного и гуморального звеньев иммунитета, на фоне чего условно-патогенная микрофлора активизируется и у животных развивается «энзоотическая пневмония» [5]. В этиологической структуре заболеваний, поражающих органы дыхания, пищеварения и размножения, ведущим агентом является вирус ИРТ КРС. Его особенностью является то, что у молодняка до 1 месяца он вызывает энтериты, у более старших животных – респираторные заболевания, а у взрослых половозрелых коров и быков – нарушение воспроизводительной функции. Этот возбудитель репродуцируется в клетках респираторного и желудочно-кишечного тракта, клетках эндометрия, то есть он пантропен. Это обуславливает его высокую контагиозность и тяжесть течения болезни (Е.В. Андреев (1978, 1979), П.П. Фукс (1990), П.А. Красочко (1999)) [1, 5, 7].

Начиная с момента открытия вируса ИРТ КРС и предложения первых вакцин, ученые начинают изучать различные штаммы, используя имеющиеся в их арсенале методы [6, 11]. Вначале используются серологические и культуральные [8], а затем, при открытии новых методов исследования, применяют их. С открытиями в молекулярной генетике вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота начинают характеризовать не только с позиции антигенной вариабельности, но и с молекулярно-генетической изменчивости [10, 12]. Несмотря на имеющиеся публикации по данной проблематике, изучение генома вируса продолжается, при этом используют наиболее современные методы, такие как полногеномное секвенирование [10]. Однако проводимые исследования относятся к северо-американскому и западно-европейскому региону и, соответственно, к тем штаммам, которые были там выделены. В России проблемой генетической типизации вируса ИРТ КРС занимался Глотов А.Г. с соавт. [3]. Информации о молекулярно-генетическом изучении штаммов, встречающихся в странах СНГ, в открытых источниках не обнаруживается.

Целью настоящей работы явилось изучение генетической вариабельности вируса ИРТ КРС с использованием праймеров к разным участкам консервативных генов вируса.

Материалы и методы исследований. В качестве источника генома вируса ИРТ КРС использовали патологический материал от больных телят с признаками ИРТ КРС, принадлежа-

щих животноводческим хозяйствам Витебской области.

Для выделения ДНК использовали коммерческий набор «Реагенты для очистки ДНК АртДНК» (Артбиотех, Беларусь).

Для подтверждения наличия генома вируса ИРТ КРС руководствовались методическими указаниями по диагностике инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции (Утв. ГУВ МСХП РБ 21.06.2008 г., № 10-1-5/565).

Важным этапом при изучении генетической вариабельности вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота у персистентно инфицированных и вакцинированных животных является подбор праймеров. Как правило, для подбора оптимальной пары праймеров используется специализированное программное обеспечение, которое на основе имеющейся последовательности подбирает оптимальную пару праймеров. Однако следует отметить, что на данный момент не существует алгоритма выбора последовательности праймера, который на 100% гарантировал бы его работоспособность. В этой связи имеются определенные требования к олигонуклеотидам, которыми мы руководствовались при определении их последовательности:

1. Длина 18-24 нуклеотида.
2. Последовательность не должна содержать повторов и протяженных участков из одного типа нуклеотидов (более 4-5 азотистых оснований одного типа подряд, особенно пуринов).
3. Последовательность должна содержать больше пиримидинов, чем пуринов.
4. Четыре и более 3'-концевых нуклеотида не должны быть комплементарны самому праймеру, праймеру в паре, пробе или иным синтетическим нуклеотидам, добавляемым в реакцию.
5. Температура отжига должна лежать в диапазоне 60-70°C.
6. Температура плавления праймеров, работающих в паре, для большинства приложений должна быть сходной (кроме случаев, когда разница в температуре плавления необходима по методике).
7. Желательно, чтобы температура плавления 5'-концевой части праймера была выше температуры плавления 3'-концевой части.
8. С 5'-конца праймера может быть добавлена не комплементарная матрице последовательность практически любой длины.

Желательно, чтобы праймер не образовывал шпилечных структур с ΔG (изменение свободной энергии Гиббса), меньшей ΔG гибридизации праймера на матрицу.

Для изучения вариабельности участков генома вируса ИРТ КРС проводили постановку полимеразной цепной реакции (ПЦР) с подобранными праймерами (UL19F, UL19R, UL41F, UL41R, UL26F и UL27R). Постановку ПЦР проводили в соответствии со следующими условиями:

- состав премикса на одну реакцию: 2,5 мкл 10X премикса для полимеразы, 0,2 мкл полимеразы «Diamant HF», по 10 пмоль прямого и обратного праймера, деионизированная вода до 20 мкл (реагенты производства ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси»);
- условия реакции: первоначальная денатурация 94°C – 2 мин.; далее 40 циклов: денатурация 94°C - 30 сек., отжиг 64°C – 30 сек., элонгация 72°C – 30 сек.; финальная элонгация 72°C – 5 мин.;
- электрофорез проводили по стандартной методике в 2% агарозном геле с напряжением 5 В/см.

Результаты исследований. Клиническое проявление ИРТ КРС наиболее выражено у молодняка, главным образом респираторная форма болезни. У коров болезнь проявляется абортами и эндометритами, этиология которых достаточно разнообразна: нарушение кормления животных, наличие микотоксинов в кормах, а также иные инфекционные агенты. В связи с этим целевой группой животных для отбора материала были выбраны телята до 2-3-месячного возраста.

Первоначально был определен ряд хозяйств, которые не вакцинируют животных против ИРТ КРС по данным районных ветеринарных станций и главных ветеринарных врачей хозяйств. Далее среди этих хозяйств были выбраны хозяйства с наличием болезней респираторных органов у молодняка. При выезде в хозяйство проводили клинический осмотр телят, и при наличии клинических признаков ИРТ КРС (угнетенное состояние, увеличение температуры тела, носовые истечения, кашель, покраснение носогубного зеркальца) проводили отбор материала.

В результате предварительного анализа профилактических мероприятий и эпизоотологической обстановки в хозяйстве были определены 3 хозяйства, куда были совершены выезды для отбора материала.

Было отобрано 25 проб носовых смывов, среди которых в 10 было подтверждено наличие генома вируса ИРТ КРС с помощью ПЦР. В дальнейшем велась работа с ДНК, выделенной из этих проб.

При анализе генома вируса ИРТ КРС было определено количество однонуклеотидных замен на каждый ген вируса ИРТ КРС. Наибольшее количество таких участков отмечалось в генах UL36, UL30, UL6, UL52, UL19. Однако длина этих генов варьируется от 1800 до 8000 пар нуклеотидов. Планируемый в дальнейшем к использованию метод секвенирования по Сэнгеру с использованием автоматического секвенатора имеет ограничение в 1000 пар нуклеотидов за один проход, что накладывает ограничения на длину амплифицируемого фрагмента. В связи с этим дополнительно добавляется условие – длина фрагмента не должна превышать 1000 пар нуклеотидов.

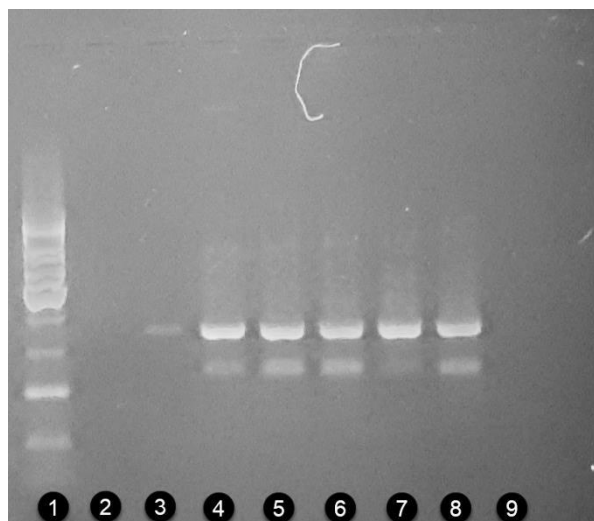
Исходя из вышеобозначенных условий, в каждом из наиболее вариабельных генов в размер 1000 пар нуклеотидов попадает не более 2-3 нуклеотидных замен. В связи с этим выбор генов для подбора праймеров осуществляли по принципу наличия нуклеотидных замен в данном участке, а также важностью гена в структуре и функционировании вириона. Для детального анализа и подбора праймеров нами были выбраны 3 гена, отвечающих за синтез структурных белков (гликопротеин В, главный белок капсида и входной белок капсида) и один функциональный (синтез РНКазы). Данные гены имеют от 3 до 7 нуклеотидных замен в своем составе. К данным участкам были подобраны праймеры, которые представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Праймеры к различным участкам генома вируса ИРТ КРС

Ген	Наименование праймера	Последовательность	Позиция	Размер продукта
UL41	UL41F	GCTCACGTACGGCCAGTTCC	21826–21845	401
	UL41R	TCGTGTCCACCACGTGCTTT	22207–22226	
UL26	UL27F	CCCATGAAGGCGCTGTACCCGATCACCACG	58075–58104	961
	UL26R	GTTCCCTGCCGTAGCTGCAGCACCCAGCGACC	59006–59035	
UL19	UL19F	ACGAGGGCACGATCCAATTTGAG	70192–70214	340
	UL19R	TACAGCGAGAGCGGCACCAG	70512–70531	

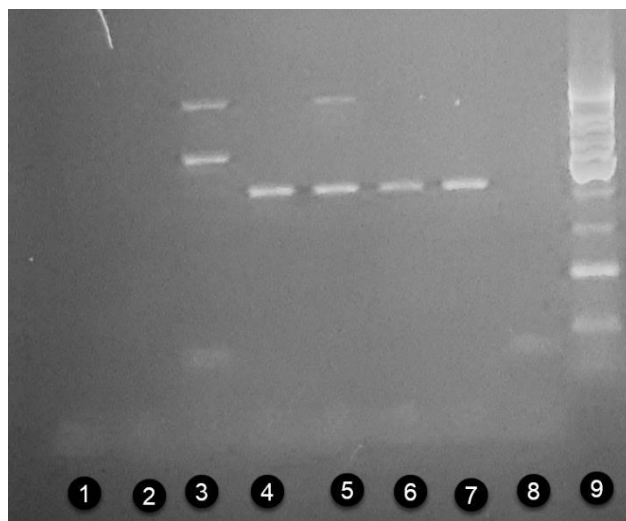
При постановке ПЦР проводили объединение проб по 2 из одного хозяйства. Таким образом, было поставлено 6 образцов (2 пробы из ОАО «Возрождение», 2 пробы из ОАО «Агротруд» и 2 пробы из КУСХП «им. Свердлова»).

Результаты исследования показали, что пара праймеров UL19F и UL19R обладает наибольшей специфичностью к геномам полевых штаммов вируса ИРТ КРС – все пробы, за исключением одной из ОАО «Возрождение», демонстрируют формирование четкой полосы на уровне 340 п.н. (рисунок 1).



1 - маркер молекулярной массы; 2,3 – пробы из ОАО «Возрождение»; 4,5 – пробы из ОАО «Агротруд»; 6,7 - пробы из КУСХП «им. Свердлова»; 8 – положительный контроль (вакцина «Bovishield Gold»); 9 – отрицательный контроль

Рисунок 1 – Результат электрофореза с парой праймеров UL19F и UL19R

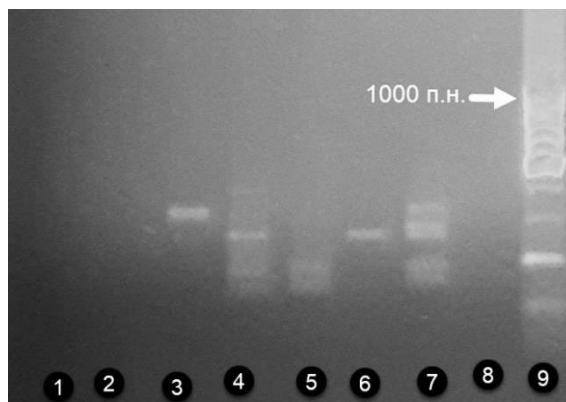


1, 2 – пробы из ОАО «Возрождение»; 3,4 – пробы из ОАО «Агротруд»; 5,6 - пробы из КУСХП «им. Свердлова»; 7 – положительный контроль (вакцина «Bovishield Gold»); 8 – отрицательный контроль; 9 - маркер молекулярной массы

Рисунок 2 – Результат электрофореза с разной парой праймеров UL41F и UL41R

Пары праймеров UL41F и UL41R избирательно специфичны к геномам полевых изолятов: пробы ДНК из ОАО «Возрождение» не показали образование специфических полос на требуемом уровне, одна из двух проб ДНК из ОАО «Агротруд» демонстрировала образование 2 дополнительных неспецифических полос, а одна проба из КУСХП «им. Свердлова» показывала одну дополнительную неспецифическую полосу (рисунок 2).

Пара праймеров UL27F и UL26R не показала специфичность к полевым изолятам вируса ИРТ КРС, также как и в предыдущих экспериментах с ДНК из биологических препаратов. На электрофорезе не отмечалось наличие специфической полосы на уровне 961 п.н., а были разнородные неспецифические линии на разных уровнях (рисунок 3).



1,2 – пробы из ОАО «Возрождение»; 3,4 – пробы из ОАО «Агротруд»; 5,6 - пробы из КУСХП «им. Свердлова»; 7 – положительный контроль (вакцина «Bovishield Gold»); 8 – отрицательный контроль; 9 - маркер молекулярной массы

Рисунок 3 – Результат электрофореза с парой праймеров UL27F и UL26R

Заключение. Таким образом, полученные результаты показали частичную специфичность праймеров к полевым изолятам вируса ИРТ КРС. Проведенные эксперименты показали наличие вариабельности в геномах полевых изолятов, что подтверждается неоднородной картиной при учете результатов после электрофореза, а также неполным соответствием праймеров к положительным образцам клинического материала. Для дальнейшего изучения фрагментов необходимо провести секвенирование, что позволит детально изучить нуклеотидные замены в полевых изолятах вируса ИРТ КРС из хозяйств Витебской области.

Исследования выполнялись по проекту «Изучение генетической вариабельности вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота у персистентно инфицированных и вакцинированных животных» по договору с БРФФИ № Б18М-016.

Литература. 1. Андреев, Е. В. Ассоциированное воздействие на организм вируса и условно-патогенных бактерий / Е. В. Андреев // *Ветеринария*. – 1984. – № 6. – С. 25–27. 2. Апатенко, В. М. Смешанные вирусные инфекции сельскохозяйственных животных / В. М. Апатенко. – Киев : Урожай, 1978. – 120 с. 3. Глотов, А. Г. Диагностика инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота методом молекулярной гибридизации и особенности эпизоотического процесса заболевания в современных условиях : автореф. дис. ... д-ра вет. наук : 16.00.03 / А. Г. Глотов. – Новосибирск, 1999. – 39 с. 4. Басова, Н. Ю. Респираторные болезни молодняка крупного рогатого скота инфекционной этиологии в условиях Северного Кавказа : автореф. дис. ... д-ра вет. наук : 16.00.03. / Н. Ю. Басова. – Краснодар, 2002. – 42 с. 5. Красочко, П. А. Моно- и ассоциативные вирусные респираторные инфекции крупного рогатого скота, (иммунологическая диагностика, профилактика и терапия) : автореф. дис. ... д-ра вет. наук : 16.00.06 / П. А. Красочко ; БелНИИЭВ. – Минск. – 1997. – 34 с. 6. Средства специфической профилактики инфекционных болезней крупного рогатого скота и свиней / П. А. Красочко [и др.]. – Минск : ИВЦ Минфина, 2018. – 368 с. 7. Фукс, П. П. Патогенное действие герпесвируса-1 на воспроизводительную функцию крупного рогатого скота / П. П. Фукс, Н. П. Четчикова, Е. В. Андреев // *Достижения ветеринарной науки и практики по повышению продуктивности сельскохозяйственных животных : материалы Респ. конф.* – 1988. – Т. 2 : Теоретические и практические вопросы ветеринарии. – С. 42–44. 8. Comparative studies of the etiological agents of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis / D. G. McKercher [et al.] // *Can. J. Comp. Med.* – 1959. – № 23. – P. 320–328. 9. Bovine herpesvirus 1 : evaluation of genetic diversity of subtypes derived from field strains of varied clinical syndromes and their relationship to vaccine strains / R. W. Fulton [et al.] // *Vaccine*. – 2015. – Vol. 15, №33 (4). – P. 549–555. 10. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies / A. E. Metzler [et al.] // *Arch. Virol.* – 1985. – № 85. – P. 57–69. 11. Kendrick, J. W. Infectious pustular vulvovaginitis / J. W. Kendrick, J. H. Gillespie, K. McEntee // *Cornell Vet.* – 1958. – Vol. 48 (4). – P. 458–495. 12. Wang, J. Genetic characterization of bovine herpesvirus 1 in New Zealand / J. Wang, G. W. Horner, J. S. O'Keefe // *N Z Vet J.* – 2006. – № 54. – P. 61–66.

Статья передана в печать 31.01.2020 г.