

3. Антибиотикорезистентность и способы её преодоления: Монография / Н.Н. Шкиль, Е.В. Неведова // - Новосибирск: СФНЦА РАН, 2022. - 410с.

4. Nefedova E. AgNPs Targeting the Drug Resistance Problem of *Staphylococcus aureus*: Susceptibility to Antibiotics and Efflux Effect / E. Nefedova, N. Shkil, R.L. Vazquez-Gomez, D. Garibo, A. Pestryakov, N. Bogdanchikova // *Pharmaceutics*. – 2022, № 14. - P. 763.

5. Perfilova A.I. The current aspects of using chemically synthesized compounds of silver nanoparticles in animal husbandry and agrochemistry / A.I. Perfilova, I.A. Graskova, O.A. Nozhkina, N.S. Zabanova, B.G. Sukhov, N.N. Shkil, E.V. Nefyodova // *Nanotechnologies in Russia*. - 2019. - Vol. 14, № 9-10. - P. 489-496.

6. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания МУК 4.2. 1890-04, - ЦНИИЭ. - М., - 2004. - 101с.

ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ РЕСПИРАТОРНОГО КОМПЛЕКСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

НЕФЕДЧЕНКО А.В., КОТЕНЕВА С.В., ГЛОТОВА Т.И., ГЛОТОВ А.Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский научный центр агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН). Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (ИЭВСиДВ), Россия

Приведены результаты разработки и оценки диагностической эффективности тест-системы на основе мультиплексной полимеразной реакции для выявления возбудителей респираторного комплекса крупного рогатого скота. Установлено, что реакция осуществляется с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с использованием синтетических олигонуклеотидных праймеров и зондов SEQ ID NO:1 – 28. Обратную транскрипцию для синтеза кДНК проводили непосредственно в ходе мультиплексной ПЦР. Исследование каждой пробы биологического материала осуществляли в двух независимых реакциях с целью обнаружения восьми вирусов (BPIV, BRSV, BHV-1, BHV-4, BCoV, BVDV1, BVDV2, BVDV3). При исследовании 115 проб биологического материала, отобранного от 23 телят в возрасте 2-4-х мес. с признаками респираторной патологии, было выявлено 56,5% положительных проб. В исследованных пробах внутренних органов выявили все анализируемые возбудители респираторного комплекса КРС, но чаще всего – BHV-4 и BHV-1, реже BVDV2 и BVDV3. **Ключевые слова:** респираторный комплекс, вирусы, полимеразная цепная реакция, крупный рогатый скот

DETECTION OF CATTENTS OF THE RESPIRATORY COMPLEX OF CATTLE WITH THE HELP OF MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION

NEFEDCHENKO A.V., KOTENEVA S.V., GLOTOVA T.I., GLOTOV A.G.

Federal State Budgetary Institution of Science Siberian Scientific Center for Agrobiotechnologies of the Russian Academy of Sciences. Institute of Experimental Veterinary Medicine of Siberia and the Far East, Russia

The results of the development and evaluation of the diagnostic efficiency of a test system based on the multiplex polymerase reaction for the detection of pathogens of the respiratory complex in cattle are presented. It was established that the reaction is carried out with real-time hybridization-fluorescence detection using synthetic oligonucleotide primers and probes SEQ ID NO: 1 - 28. Reverse transcription for cDNA synthesis was performed directly during multiplex PCR. The study of each sample of biological material was carried out in two independent reactions in order to detect eight viruses (BPIV, BRSV, BHV-1, BHV-4, BCoV, BVDV1, BVDV2, BVDV3). Of the 115 studied samples of biological material taken from 23 calves aged 2-4 months. with signs of respiratory pathology, 56.5% of positive samples were detected. In the studied samples of internal organs, all analyzed pathogens of the bovine respiratory complex were detected, but most often - BHV-4 and BHV-1, less often BVDV2 and BVDV3. **Keywords:** respiratory complex, viruses, polymerase chain reaction, cattle

Введение. Возбудители респираторного комплекса крупного рогатого скота (КРС) оказывают серьезное влияние на производство животноводческой продукции во всем мире. Экономические потери от них включают гибель и снижение массы тела животных, затраты на средства терапии и профилактики, снижение продуктивности животноводства. Чаще болеет молодняк, чем взрослые животные. В развитии респираторного комплекса принимают участие несколько возбудителей вирусной и бактериальной природы, при этом вирусы играют наиболее важную роль, запуская весь каскад реакций,

приводящих к поражению респираторных органов у животных и создавая благоприятные условия для размножения патогенных бактерий. По результатам вирусологических и серологических диагностических исследований установлено, что наиболее значимыми возбудителями респираторного комплекса КРС по частоте выявления у животных являются вирусы: вирусной диареи – болезни слизистых оболочек КРС 1-3 генотипов (*Bovine viral diarrhoea virus*, BVDV1, BVDV2, BVDV3), респираторно-синцитиальной инфекции КРС (*Bovine respiratory syncytial virus*, BRSV), инфекционного ринотрахеита КРС (*Bovine herpesvirus-1*, BHV-1), коронавирус КРС (*Bovine coronavirus*, BCV), парагриппа-3 КРС (*Bovine parainfluenza virus 3*, BPIV), герпеса 4-го типа КРС (*Bovine herpesvirus-4*, BHV-4) [1-4]. Другие вирусы КРС имеют меньшее значение и не способны самостоятельно вызывать поражение респираторных органов.

Эффективность лечения и профилактики респираторных болезней крупного рогатого скота во многом определяются ранней диагностикой возбудителей и установлением их роли в развитии болезни. Наиболее точным способом постановки диагноза на вирусную инфекцию является выделение вируса в чувствительной культуре клеток и его идентификация с помощью специфичных иммунных сывороток или молекулярно-генетических методов [3], но он является длительным (не менее 3-х недель) и высоко затратным. Эффективность его во многом зависит от стадии заболевания, сроков отбора проб биоматериала и соблюдения всех требований их доставки, так как вирусы можно выделить в культуре клеток не на всех стадиях развития инфекционной болезни. В последние годы в диагностических лабораториях широкое применение получили способы диагностики, основанные на выявлении фрагментов геномов возбудителей с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), которые разработаны для диагностики и генотипирования каждого из респираторных вирусов крупного рогатого скота в отдельности, как методом гель-электрофореза, так и в реальном времени.

Существуют определенные ограничения в применении мультиплексной ПЦР, обусловленные тем, что отдельные праймеры и зонды в мультиплексной реакции могут взаимодействовать между собой, а также конкурировать за реактивы во время самой реакции [5-6],

Целью данной работы являлась разработка мультиплексной ПЦР для выявления восьми вирусов (BPIV, BRSV, BHV-1, BHV-4, BCoV, BVDV1, BVDV2, BVDV3), принимающих активное участие в развитии респираторной патологии у крупного рогатого скота.

Материалы и методы. Для идентификации возбудителей методом мультиплексной ПЦР использовали синтетические олигонуклеотидные праймеры и зонды, использованные нами ранее при разработке диагностических тест-систем на каждый отдельный представитель респираторного комплекса КРС. С использованием программы Vector NTI 9.0.0 (InforMax) они были проверены на комплементарность друг другу и отсутствие перекрестных реакций.

Так как приборы для ПЦР в режиме реального времени имеют только 5 каналов детекции, поэтому все праймеры и зонды разделили на две реакции, для выявления в каждой 4-х возбудителей. Пятый канал используется для выявления гена *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) КРС в качестве контроля ПЦР.

Для контроля амплификации были получены положительные контрольные образцы (ПКО) методом молекулярной трансформации компетентных бактериальных клеток *Escherichia coli* плазмидами pCR 2.1, содержащими специфические ДНК вставки соответствующих детектируемых участков геномов каждого возбудителя.

Для подтверждения специфичности полученных фрагментов определяли их нуклеотидную последовательность, для чего использовали набор реагентов BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, США). Продукты секвенирующей реакции анализировали методом капиллярного электрофореза в автоматическом секвенаторе ABI PRISM[®] 3130xl (Applied Biosystems/Hitachi, Япония). Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями базы данных NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Все фрагменты ДНК, необходимые для получения ПКО, являлись целевыми и соответствовали участкам геномов анализируемых возбудителей.

Условия проведения амплификации оптимизировали по следующим параметрам: концентрация ионов магния в реакционной смеси; концентрация праймеров и зондов в реакционной смеси; температура отжига праймеров.

Аналитическую чувствительность метода для каждого вируса определяли постановкой ПЦР в режиме реального времени, где в качестве исследуемых проб использовали 10-кратные разведения положительных контрольных образцов, при этом оценку проводили как отдельно для каждой пары праймеры – зонд (в моноварианте), так и в окончательном варианте в мультиплексном формате.

Результаты исследований. В результате проведенных исследований было установлено, что предложенные для мультиплексного формата реакционные смеси, включающие смеси праймеров и зондов, оказались эффективными. Практически не наблюдалось конкурентного связывания и перекрестных реакций между отдельными парами праймеров и зондов. Минимальное количество ПКО,

детектируемое с применением наших праймеров и зондов после оптимизации условий проведения реакции, выраженное в ГЭ (геномных эквивалентах) в 1 мкл ПКО, составило от 10 до 10¹ ГЭ для разных ПКО.

Для оценки специфичности реакции исследовали контрольные штаммы вирусов: BVDV 1 «Oregon C24V» с титром 10^{4,5} ТЦД50/см³, BVDV 2 «Изолят БЛ» с титром 10^{3,5} ТЦД50/см³, BVDV 3 «Изолят УТ», BCoV «КМИЭВ-1» с титром 10^{6,5} ТЦД50/см³, BRSV «PCB № 3» с титром 10⁴ ТЦД_{50/мл}, BHV-4 «Movar» с титром 10^{5,5} ТЦД50/см³, BHV-1 «Оренбург» с титром 10^{7,5} ТЦД50/см³, вакцины Бови-шилд Голд FP5, в первом компоненте содержащей вирусы BHV-1, BVDV1, BVDV2, BRSV, BPVI, а во втором – штаммы лептоспир, и вакцину Кэтлмастер Голд FP5 L5, первый компонент которой содержит вирусы BHV-1, BRSV, BPVI, а второй компонент – штаммы лептоспир и вирусы BVDV1, BVDV2. В качестве контроля применяли родственные штаммы вирусов KPC, свиней, культуры клеток, а также сыворотку крови KPC, свиней, собак, человека. Результаты исследования установили высокую специфичность мультиплексной ПЦР при выявлении ДНК и РНК исследуемых вирусов.

Диагностическая эффективность мультиплексной ПЦР была определена при исследовании 115 проб биологического материала отобранного от 23 телят в возрасте 2-4-х мес. с признаками респираторной патологии. Количество положительных проб составило 56,5%. В исследованных пробах внутренних органов выявили все анализируемые возбудители респираторного комплекса KPC, но чаще всего выявляли BHV-4 и BHV-1, реже BVDV2 и BVDV3.

Заключение.

Таким образом, разработана мультиплексная полимеразная цепная реакция в реальном времени, которая позволяет выявлять в пробах биологического материала вирусы: BPIV, BRSV, BHV-1, BHV-4, BCoV, BVDV1, BVDV2, BVDV3, принимающие активное участие в развитии респираторной патологии у крупного рогатого скота. Она обладает высокой специфичностью и диагностической эффективностью.

Литература. 1. *Диагностика инфекционных болезней сельскохозяйственных животных: вирусные заболевания : монография / А. А. Шевченко [и др.] ; Кубанский государственный аграрный университет им. И. Т. Трубилина, Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Краснодар : КубГАУ, 2018. – 484 с. 2. Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота/ А.Г. Готов [и др.], // Ветеринария. 2002; № 3. С. 17–21. 3. Готов А.Г., Готова Т.И., Нефедченко А.В., Котенева С.В. Респираторные болезни у импортного скота в период адаптации на молочных комплексах // Ветеринария. 2022. № 2. С. 3-8. 4. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных. М.: ВНИТИБП, 1998, 928 с. 5. Fulton R.W. Bovine respiratory disease research (1983-2009). Anim. Health Res. Rev. 2009; 10: 131–139. 6. Kalle E., Kubista M., Rensing C. Multi-template polymerase chain reaction. Biomol. Detect. Quantif. 2014; 2: 11–29. 7. Parker J., Fowler N., Walmsley M.L., Schmidt T., Scharrer J., Kowaleski J., Grimes T., Hoyos S., Chen J. Analytical sensitivity comparison between singleplex real-time PCR and a multiplex PCR platform for detecting respiratory viruses. PLoS One. 2015;10.*

ИММУНОГЕННОСТЬ ИНАКТИВИРОВАННОЙ АССОЦИИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСНЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

ПРИТЫЧЕНКО А.В., КРАСОЧКО И.А.

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

*Приведены результаты определения титров противовирусных антител у лабораторных животных после иммунизации ассоциированной инактивированной вакциной против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота. Установлено, что введение иммунизирующих доз вакцины морским свинкам и кроликам способствует выработке специфических антител. **Ключевые слова:** титр антител, морские свинки, кролики, вакцина.*

IMMUNOGENICITY OF THE INACTIVATED ASSOCIATED VACCINE AGAINST VIRUS RESPIRATORY INFECTIONS OF CATTLE

PRYTYCHENKO A.V., KRASOCHKO I.A.

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Republic of Belarus