

## Литература

1. Иванов В.С. Бешенство животных экспериментально-теоретическое обоснование разработки, производства, применения культуральных инактивированных вакцин и новые подходы к проблеме экстренной защиты ЦНС от возбудителя заболевания: Автореф. дис....д-ра вет.наук.-М.: 2001.-20с.

2. Singh H.  $\beta$ -propiolactone-inactivated sheep brain vaccine. Methods of vaccine production //Laboratory Techniques in rabies. - Geneva, 1996.- P. 234 -242.

## СОСТОЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

*В.В.Максимович, П.П.Красочко*

Витебская государственная академия ветеринарной медицины,  
Витебск, Республика Беларусь

В современных условиях ведения животноводства инфекционные болезни причиняют наиболее значимый экономический ущерб. Среди крупного рогатого скота наиболее распространен инфекционный ринотрахеит. Возбудитель вызывает заболевание у различных возрастных групп животных и поражает у них различные органы и системы. Так, у новорожденных телят вирус инфекционного ринотрахеита вызывает поражение желудочно-кишечного тракта (энтериты), у телят старше 1-месячного возраста поражение органов дыхания (респираторные заболевания), глаз (конъюнктивиты), центральной нервной системы (энцефалиты), у взрослых животных – поражение репродуктивных органов: у коров – пустулезный вульвовагинит, у быков - баланопостит и орхит.

Особенностью инфекционного ринотрахеита является его длительная персистенция в организме после переболевания и выделение с различными секретами (носовыми истечениями, слезами, спермой, молоком и т.д.).

В этой связи своевременно поставленный диагноз позволяет целенаправленно проводить комплекс ветеринарно-санитарных мероприятий при инфекционном ринотрахеите.

В современных условиях для лабораторной диагностики инфекционного ринотрахеита используются вирусологические, иммунологические, серологические и молекулярно-генетические методы.

Из вирусологических методов классический - вирусовыделение на культуре клеток с последующей его идентификацией на культуре клеток с заранее положительными сыворотками. Однако этот метод длительный и по времени занимает от 14 дней до 1 месяца.

Для ускорения постановки диагноза предложены методы электронной и иммунной электронной микроскопии. Это достаточно точные тесты, но для их постановки необходим электронный микроскоп.

Иммунологические методы диагностики инфекционного ринотрахеита направлены как на определение вирусных антигенов в биологическом материале, так и антител к вирусу.

Для выявления вирусных антигенов используются реакция иммунодиффузии, реакция связывания комплемента, реакция нейтрализации, иммуноферментный анализ. Эти методы различные по чувствительности и специфичности, требуют различное время для получения результата. Однако иммуноферментный анализ наиболее быстрый, чувствительный и специфичный тест.

Выявление противовирусных антител в сыворотках крови больных и переболевших животных – один из наиболее широко распространенных приемов при диагностике инфекционного ринотрахеита. При этом используются как одиночные, так и парные сыворотки крови. Антитела выявляют с помощью реакций нейтрализации, задержки гемагглютинации, непрямой гемагглютинации, иммуноферментного анализа. Это достаточно точные, специфичные и чувствительные методы, однако при их постановке нет возможности проводить дифференциацию поствакцинальных от постинфекционных антител. Хотя

в различных странах мира и применяют маркерные вакцины, но в Республике Беларусь они не применяются.

Из современных тестов, применяемых для диагностики инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, молекулярно-генетические позволяют снять все недостатки вирусологических и иммунологических методов.

Из молекулярно-генетических методов применяются полимеразная цепная реакция (ПЦР), метод молекулярной гибридизации (ДНК-зонды).

А.Г.Гловым (1999) на основе клона 34EP сконструирован плазмидный ДНК-зонд (pUC34EP), специфичный ДНК вируса ИРТ КРС, и в радиоактивном варианте обладающий чувствительностью 10-100 пгр выявления вирусной нуклеотидной последовательности, а нерадиоактивный ДНК-зонд M1 3np8BHV34EP, специфичный ДНК вируса ИРТ КРС с чувствительностью 1-10 пгр вирусной нуклеотидной последовательности, что соответствует 4-5 Ig ТЦД/мл инфекционной активности вируса.

В 1983 году Kary Mullis предложена полимеразная цепная реакция. ПЦР - метод амплификации *in vitro*, с помощью которого в течение нескольких часов можно выделить и размножить обозначенную последовательность ДНК в количестве, превосходящим исходную в миллионы раз. ПЦР это процесс, который протекает в одной пробирке и складывается из повторных циклов амплификации (размножения и копирования) специфической последовательности молекул ДНК с целью получения большого количества копий, которые могут быть выявлены обычными методами детекции (Б.Т.Стегний с соавт. 2005).

Преимуществами ПЦР перед другими тестами являются:

- прямое выделение возбудителя инфекционных болезней;
- высокая чувствительность – от 10 до 100 клеток в пробе (98%);
- высокая специфичность (98,8%);
- при использовании ПЦР-анализа существует защита от ложноположительных и ложноотрицательных результатов;

-метод имеет возможность, в отличие от традиционных серологических методов, провести анализ серонегативных животных на ранних стадиях инфекционного процесса;

-с использованием ПЦР имеется возможность выявить возбудителя инфекции за короткие сроки - в течение 1 дня.

Для диагностики инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в настоящее время имеется ряд тест-систем для ПЦР, основанных на применении различных участков генома вируса.

В институте экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Сибирского отделения РАСХН применяются праймеры, синтезированные к области высоко консервативного гена ICP 18,5, кодирующего гликопротеин В вируса ИРТ КРС. Праймер В1 соответствует фрагменту 24002-24021 н., праймер В2 - фрагменту 24464-24445 н. (обратный) генома ВHV-1 (нумерация нуклеотидов приводится по полной последовательности генома ВHV-1 штамма Соорег). Это позволяет дифференцировать вакцинные штаммы от эпизоотических (Т.И.Глотова, 2005).

В институте экспериментальной и клинической ветеринарной медицины Украинской академии аграрных наук используются праймеры RTK-1 и RTK-2, гомологичные для консервативного участка гена тимидинкиназы вируса ИРТ (П.П.Фукс, 1999). Кроме этого, ПЦР для диагностики ИРТ применяют в ВГНКИ ветпрепаратов и Всероссийском НИИ защиты животных.

Использование ПЦР повышает эффективность и информативность исследований по молекулярной эпизоотологии ИРТ КРС, т.к. дает возможность не только выявлять ДНК различных штаммов вируса независимо от их природы, но и проводить дифференциацию между ними, в том числе дифференцировать вакцинные штаммы, используемые для производства аттенуированных вакцин, от эпизоотических штаммов и изолятов вируса.