

ПОДБОР ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ MORAXELLA BOVIS И MORAXELLA BOVOCULI С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР

Красочко П.П., д.в.н., к.в.н., доцент, УО ВГАВМ, г. Витебск, Республика Беларусь

Красочко В.П., к.в.н., УО ВГАВМ, г. Витебск, Республика Беларусь

Черноков А.И., аспирант УО ВГАВМ, г. Витебск, Республика Беларусь

***Аннотация:** Разработан мультиплексный метод ПЦР в реальном времени для одновременной детекции и дифференциации возбудителей инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота – *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi*. Метод основан на использовании оригинальных праймеров и зондов к консервативным генам цитотоксинов *MbxA* и *MbvA*, что обеспечивает его высокую специфичность. Проведенная оптимизация показала чувствительность метода $3,8 \times 10^3$ КОЕ/мл для *M. bovis* и $6,5 \times 10^3$ КОЕ/мл для *M. bovoculi*, что позволяет эффективно выявлять как моно-, так и микст-инфекцию в клиническом материале.*

***Ключевые слова:** инфекционный кератоконъюнктивит, крупный рогатый скот, *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi*, ПЦР, праймеры, диагностика.*

Введение. Инфекционный кератоконъюнктивит (ИКК) является широко распространенной и экономически значимой болезнью КРС, приводящей к снижению продуктивности и слепоте. Основными бактериальными патогенами, вызывающими ИКК, являются *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi*. Традиционная бактериологическая диагностика моракселлеза затруднена из-за медленного роста возбудителей, низкой биохимической активности и контаминации проб сопутствующей микрофлорой. Существующие в Республике Беларусь системы эпизоотологического учета не отражают истинной распространенности данной патологии. В связи с этим, разработка быстрого и специфичного метода молекулярной диагностики является актуальной задачей. Настоящее исследование посвящено подбору специфических праймеров и оптимизации мультиплексной ПЦР для детекции *M. bovis* и *M. bovoculi*.

Цель и задачи исследования.

Разработать мультиплексный метод ПЦР для специфического выявления *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Подобрать и оценить специфические олигонуклеотидные праймеры и зонды к генам цитотоксинов *M. bovis* (*MbxA*) и *M. bovoculi* (*MbvA*).
2. Определить аналитическую чувствительность метода и оптимизировать условия постановки мультиплексной ПЦР.

Материалы и методы.

Работа проводилась на базе НИИ ПВМиБ УО ВГАВМ. В качестве ДНК-матрицы использовали ДНК из идентифицированных изолятов *M. bovis* и *M. bovoculi*, полученных от КРС с клиническими признаками кератоконъюнктивита. Идентификация изолятов была подтверждена масс-спектрометрией (MALDI-TOF).

Для подбора праймеров использовали нуклеотидные последовательности генов цитотоксина *MbxA* (для *M. bovis*) и *MbvA* (для *M. bovoculi*) из базы данных GenBank. Подбор олигонуклеотидов проводили с использованием программного обеспечения Primer3 и SnapGene. Для подбора олигонуклеотидов к *Moraxella bovis* использовали геномы штаммов SAM102599, SAM57954, Ерр63, NCTC9426, SAM109237, SAM57947, SFS9a, а для *Moraxella bovoculi* 2471-2, 4785, SFS9a, 371, 58069, 22581.

Выделение ДНК проводили с использованием набора «АртМагнит Вет». ПЦР в реальном времени ставили с использованием премикса «АртМих ДНК-полимераза» и амплификатора Gentier 96. Оценку специфичности проводили с ДНК гетерологичных микроорганизмов (вирус ИРТ КРС, хламидии, *E. coli*, *S. aureus* и др.). Чувствительность определяли методом серийных десятикратных разведений ДНК.

Результаты исследования.

Ключевой задачей являлся целенаправленный подбор праймеров, обеспечивающих специфичную детекцию каждого вида. Для этого в качестве мишеней были выбраны гены цитотоксинов *MbxA* (для *M. bovis*) и *MbvA* (для *M. bovoculi*), как высококонсервативные в пределах вида и переменные между видами. Для каждого гена с помощью биоинформационных методов было сконструировано по три кандидатных набора праймеров и зондов, из которых по результатам сравнительного анализа был выбран один оптимальный для каждого вида. Критериями для сравнительного анализа и итогового выбора служили:

Длина ампликона: приоритет отдавался наиболее коротким продуктам для сокращения времени амплификации.

Температура плавления: выбирались пары праймеров со схожей температурой плавления в диапазоне 58–62°C для совместимости в мультиплексном формате.

Содержание GC: оптимальным считался уровень 45–60% для обеспечения стабильной гибридизации.

Специфичность отобранных олигонуклеотидов была проверена в серии перекрестных ПЦР. Реакции с ДНК *M. bovis* давали положительный сигнал только с набором Mb3, а с ДНК *M. bovoculi* — только с набором Mbo2, что подтвердило отсутствие перекрестной реактивности и возможность их совместного использования в мультиплексном формате. Для оптимизации температуры отжига ПЦР проводили в диапазоне 58–62°C. Анализ показал, что температура 58°C является оптимальной для обоих наборов, поскольку при этом значении регистрировался максимальный относительный уровень флуоресценции (1693 у.е. для *M. bovis* и 1339 у.е. для *M. bovoculi*) при

минимальном пороговом цикле (Ct). Настроенная мультиплексная ПЦР надежно детектировала как моно-, так и микст-инфекцию в одной реакции.

Аналитическую чувствительность определяли методом серийных десятикратных разведений ДНК, выделенной из суспензий бактерий с известной концентрацией (подтвержденной чашечным методом). Установленный предел детекции составил $3,8 \times 10^3$ КОЕ/мл для *M. bovis* и $6,5 \times 10^3$ КОЕ/мл для *M. bovoculi*. Аналитическую специфичность оценивали, тестируя разработанную систему на панели ДНК гетерологичных микроорганизмов. Отрицательные результаты были получены с ДНК вируса ИРТ КРС, хламидий, а также ряда бактерий (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* и других коагулазо-негативных стафилококков и стрептококков), что доказывает высокую специфичность метода и отсутствие ложноположительных результатов.

В результате сравнительного анализа для каждого вида был выбран один оптимальный набор, наилучшим образом отвечающий всем критериям:

Для *M. bovis*: праймеры Mb3-1 (5'-tggtgacgaccgcttggtt-3'): Tm = 60°C, GC = 53% и Mb3-2 (5'-aatcatcgcttcatctccag-3'): Tm = 57°C, GC = 48%, зонд Mb3-3 (5'-gtcgtcgttgcccttaccacc-3'): Tm = 59°C, GC = 55% с флуорофором флуоресцин (FAM). Длина ампликона — 63 п.н.

Для *M. bovoculi*: праймеры Mbo2-1 (5'-cgtacagtggtctaaaggtgata-3'): Tm = 57°C, GC = 45% и Mbo2-2 (5'-tctcaattcataatcacgatactcaag-3'): Tm = 55°C, GC = 33%, зонд Mbo2-3 (5'-gccaaagatactgcggtaggtaaacg-3'): Tm = 61°C, GC = 52% с флуорофором гексахлорфлуоресцеин (HEX). Длина ампликона — 105 п.н.

Заключение.

Таким образом, в результате комплексного подхода, сочетавшего биоинформационный анализ консервативных генов вирулентности с последующей экспериментальной оптимизацией, был разработан мультиплексный метод ПЦР в реальном времени для одновременной детекции и дифференциации *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi*. Метод основан на использовании оригинальных наборов праймеров и зондов к генам цитотоксинов MbxA и MbvA, что обеспечивает его высокую специфичность. Проведенная оптимизация условий реакции и определение аналитических характеристик показали, что метод обладает достаточной для работы с клиническим материалом чувствительностью и позволяет надежно выявлять целевые патогены на фоне сопутствующей микрофлоры. Разработанная тест-система представляет собой эффективный инструмент для совершенствования диагностики и эпизоотологического мониторинга инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований.

Список литературы:

1. Бактерии рода *Moraxella* - возбудители инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота / Г.Н. Спиридонов [и др.] // Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и

переработки продукции сельского хозяйства : Материалы международной научно-практической конференции, Йошкар-Ола, 20–21 марта 2025 года. – Йошкар-Ола: Марийский государственный университет, 2025. С. 662-665.

2. Инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота в хозяйствах Республики Беларусь / М.А. Ананчиков [и др.] // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. 2025. № 1. С. 21-25.

3. Коб И.С., Козлов Ю.В., Решетникова Д.Г. Оценка терапевтической эффективности лекарственного препарата Тулатрин при инфекционном кератоконъюнктивите у крупного рогатого скота / И. С. Коба, // Ветеринария и кормление. 2022. № 3. С. 48-50.

4. Красочко В.П. Идентификация бактерий рода Моракселла // Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и болезней пчел в современных условиях: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 95-летию со дня рождения доктора ветеринарных наук, профессора Смирновой Нины Ивановны и Дню белорусской науки, Витебск, 07–08 декабря 2023 года. – Витебск: Учреждение образования "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины ", 2024. С. 103-105.

5. Красочко В.П. Роль бактерий рода Моракселла при инфекционном кератоконъюнктивите // Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и болезней пчел в современных условиях: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 95-летию со дня рождения доктора ветеринарных наук, профессора Смирновой Нины Ивановны и Дню белорусской науки, Витебск, 07–08 декабря 2023 года. – Витебск: Учреждение образования "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины ", 2024. С. 101-102.

6. Тучков Н.С., Карайченцев В.Н., Зуев Н.П. Эпизоотические культуры *Moraxella bovis*, их биологические свойства и вирулентность выделенных культур для телят // Молодые ученые - науке и практике АПК : Материалы Международной научно-практической конференции аспирантов и молодых ученых, Витебск, 25–26 апреля 2024 года. – Витебск: Витебская государственная академия ветеринарной медицины, 2024. С. 484-487.

7. Этиология и клинико-эпизоотологические аспекты инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота / Г.Н. Спиридонов [и др.]// Ученые записки учреждения образования Витебская ордена Знак почета государственная академия ветеринарной медицины. 2018. Т. 54, № 4. С. 133-137.

8. Этиология, способы профилактики и лечения при инфекционном кератоконъюнктивите крупного рогатого скота / С. Н. Семенов, А. Н. Лопанов, В. Н. Карайченцев [и др.] // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2024. № 6(236). С. 55-60.

9. Камошенков А.Р. Современная диагностика инфекционных заболеваний крупного рогатого скота /А.Р. Камошенков [и др.] // учебно-методическое пособие // Смоленск, 2013.

10. Красочко П.А. Моно- и ассоциативные вирусные респираторные инфекции крупного рогатого скота (иммунологическая диагностика, профилактика и терапия) : специальность 16.00.03 : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук / Красочко Петр Альбинович. – Минск, 1997. 37 с.

11. Красочко П.А., Красочко И.А., Кашко Л.С. Теоретические аспекты возникновения вирусных респираторных заболеваний и желудочно-кишечных инфекций телят // В сборнике: Проблемы патологии, санитарии и бесплодия в животноводстве. Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения Х.С. Горегляда и М.К. Юсковца. Минск, 1998. С. 39-40.