

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э.Баумана»

На правах рукописи

Гериш Ашуак

ГЕНОТИПИЗАЦИЯ ВИРУСА ПАРАГРИППА-3 КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ВЫДЕЛЕННОГО В РЕСПУБЛИКЕ ТАТАРСТАН

06.02.02 - Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
доктор ветеринарных наук, профессор
Галиуллин Альберт Камилович

Казань-2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1 Эпизоотическая обстановка по респираторным болезням молодняка крупного рогатого скота в России и в Европейских странах.....	9
1.2 Биологические особенности вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота.....	14
1.3 Методы диагностики респираторных болезней животных вирусной этиологии.....	17
1.3.1 Молекулярно-генетические методы исследования в вирусологии.....	20
1.3.2 Секвенирование и филогенетический анализ микроорганизмов.....	23
1.3.2.1 Секвенирование и филогенетический анализ вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота.....	24
2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	28
2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	28
2.1.1 Материалы исследования.....	29
2.1.2 Методы исследования.....	30
2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	39
2.2.1 Анализ производственной деятельности хозяйства.....	39
2.2.2 Клинико-эпизоотологические и патологоанатомические исследования респираторных болезней в опытном хозяйстве.....	39
2.2.3 Гистологический анализ легких и легочных лимфоузлов у телят с респираторной формой болезни.....	43
2.2.4 Серодиагностика проб сыворотки крови крупного рогатого скота.....	50
2.2.5 Вирусологический анализ патологического материала.....	52
2.2.6 Биологические и физико-химические свойства вирусного изолята.....	54
2.2.7 Молекулярно-генетическая детекция изолятов вируса ПГ-3.....	56

2.2.8 Секвенирование и филогенетический анализ изолята ЛД-9.....	64
3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	73
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	78
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	79
СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	81
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	83
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	102

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Болезни респираторных органов крупного рогатого скота имеют многофакторный и многоэтиологический характер, в котором, наряду с вирусами и бактериями, задействованы факторы риска, связанные с окружающей средой. К этиологическим факторам респираторных болезней относятся такие возбудители, как респираторно-синцитиальный вирус, вирус диареи, вирус парагриппа-3, вирус инфекционного ринотрахеита и др., которые являются одной из основных причин возникновения болезни среди крупного рогатого скота во всем мире, вызывая серьезные экономические потери [128], [151].

Вирус парагриппа крупного рогатого скота тип-3, входящий в эту группу является одним из основных возбудителей респираторных болезней, особенно у молодняка [145].

Это РНК-содержащий вирус, относящийся к роду *Paramyxoviridae*, поражающий центральную нервную и дыхательную системы, способствующий повреждению тканей у телят [110],[74]. Также может осложняться вторичной бактериальной инфекцией и приводить к тяжелой бронхопневмонии.

К респираторным болезням восприимчивы более 80% молодняка крупного рогатого скота до 1 года и 7,2-15,6% телят переболевают повторно. Причиной широкого распространения болезни на территории Российской Федерации является массовый завоз племенного скота в 70-е и 80-е годы прошлого столетия из европейских стран [1], [33]

На сегодняшний день на основе филогенетического анализа описаны три генотипа парагриппа-3, обозначенные как А (BPIV-3a), В (BPIV-3b) и С (BPIV-3c). Однако нет данных о том, какие генотипы возбудителя циркулируют на территории Российской Федерации, в частности, в Республике Татарстан.

Поэтому актуальной является необходимость проведения молекулярно-генетического анализа вируса ПГ-3, с целью установления его геномной принадлежности.

Степень разработанности темы. Одним из ключевых вопросов ветеринарной науки является разработка средств и методов диагностики инфекционных болезней животных и идентификации возбудителя, что непосредственно оказывает влияние на принятие своевременных мер борьбы и профилактики болезни.

Изучение вопросов диагностики и профилактики респираторных болезней молодняка крупного рогатого скота в нашем регионе проводили Гаффаров, Х.З. и др. (2014), Осянин, К.А. и др. (2020), Лартон, Р.Р., Алимов, А.М. (2020). В последние годы в диагностике и идентификации возбудителей инфекционных болезней достигнуты большие успехи в плане внедрения в производственную практику новых технологий, как секвенирование методами Сэнгера и «Next-Génération Sequencing» (NGS)[138]. Технологии секвенирования позволили значительно сократить стоимость базового секвенирования и значительно сэкономить время для индикации вируса и диагностики болезни. В результате разработки NGS и метода Сэнгера, секвенирование стало экономически выгодным для многих исследований. В микробиологии и вирусологии технология секвенирования нового поколения особенно применима для расшифровки всего или частичного генома [101],[81], [86].

В связи с этим, изучение генома респираторных вирусов, как вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота, представляет научный и практический интерес. При анализе литературных данных имеются единичные работы по генотипированию респираторных вирусов крупного рогатого скота. Сухинин, А.А. и др. (2017) дали молекулярно-генетическую характеристику возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота на территории Северо-Западного региона.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы явилось генотипирование эпизоотического штамма вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота, выделенного в Республике Татарстан.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота в отдельно взятых хозяйствах на территории Республики Татарстан.
2. Изучить биологические свойства изолятов вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота, выделенных на территории РТ.
3. Определить пригодность коммерческих праймеров для ПЦР в дифференциации изолятов вируса парагриппа-3.
4. Провести секвенирование частичного матричного гена и филогенетический анализ изолята изучаемого вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота.

Научная новизна работы. Впервые проведено секвенирование фрагмента М гена изолята вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота, выделенного на территории РТ, нуклеотидная последовательность которого депонирована в международную базу данных GenBank под названием ЛД-9 (MW524841). Показано его отличие от последовательности генома штамма ПТК-45/86, используемого для профилактики парагриппа-3 крупного рогатого скота на территории Российской Федерации. Филогенетическим анализом установлена принадлежность вирусного изолята ЛД-9 вируса ПГ-3 крупного рогатого скота к генотипу А.

В результате проведенных комплексных клинико-эпизоотологических, гистологических, серологических и вирусологических исследований выделен и изучен полевой изолят ЛД-9 вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота от больных респираторными заболеваниями телят. При этом получены новые данные о степени его распространения в неблагополучных хозяйствах региона.

Показана эффективность метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) для индикации вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота, не требующего выделения и культивирования самого вируса.

Теоретическая и практическая значимость работы. Установлены нуклеотидные последовательности частичного генома вирусного изолята и вакцинного штамма ПТК-45/86. Нуклеотидная последовательность изолята ЛД-9 депонирована в базу данных GenBank (MW524841), и может быть использована для филогенетического анализа представителей вируса парагриппа-3.

Проведены клинико-эпизоотологические исследования респираторных болезней крупного рогатого скота в отдельно взятых хозяйствах на территории Республики Татарстан.

Результаты проведенных исследований вошли во «Временные правила по генотипированию вируса ПГ-3».

Методология и методы исследований. Методологической основой проведенных исследований явилось обоснование возможности применения молекулярно-генетических методов для установления генотипа эпизоотического штамма вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота Республике Татарстан.

С целью выполнения поставленных задач были использованы клинико-эпизоотологические, физико-химические, гистоморфологические, серологические (РН, РНГА, РТГА), иммунохимические (ИФА), вирусологические и молекулярно-генетические методы (ПЦР, секвенирование).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Клинико-эпизоотологический анализ респираторных болезней крупного рогатого скота в РТ. В животноводческих фермах Республики в основном выделяются вирусы парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита, аденовирусной инфекции, респираторно-синцитиальной инфекции и вирусной диареи.
2. Идентификация изолята вируса ПГ-3 крупного рогатого скота на основе изучения физико-химических, биологических свойств и молекулярно-генетического анализа. Выделенный изолят вызывает дегенеративные изменения в монослое культуры клеток в течение 98-124 часов и вступает в специфическую реакцию в титре антител 1:32 и 1:4 в РДП.
3. Генетическая идентификация выделенного изолята ЛД-9 вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота на основе секвенирования фрагментов М гена возбудителя. Изолят ЛД-9 и вакциновый штамм ПТК-45/86 вируса парагриппа-3 принадлежат одному и тому же генотипу А и находятся в том же кластере, что и эталонный штамм SF-4.

Степень достоверности и апробации результатов. Материалы диссертации доложены, обсуждены и одобрены: на Международной научно-

практической конференции «Сельское хозяйство и продовольственная безопасность: технологии, инновации, рынки, кадры», посвящённой 100-летию аграрной науки, образования и просвещения в Среднем Поволжье (г. Казань, 2019); в конкурсе на предоставление грантов в форме субсидий на реализацию научных исследований и разработок в области агропромышленного комплекса в 2020 году «Молекулярно-генетический анализ вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота, циркулирующего в Республике Татарстан» (г. Казань, 2020).

Для статистической обработки полученных результатов использовали MicrosoftExcel 2010. Выравнивание геномов проводили методом Muscle в программах MegAlignPro, Mega 5.0 и Ugene.

Личный вклад соискателя. Все исследования по планированию, подготовке и проведению экспериментов, и статистической обработке их результатов, а также формированию выводов, основных положений, выносимых на защиту и оформлению диссертации, проведены лично автором. Доля участия диссертанта в выполнении работ составляет 85%.

Публикации результатов исследований. Научные положения диссертации и ее основные результаты исследований опубликованы в 5-ти печатных работах, в том числе 3 статьи – в изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации, одна статья – в изданиях, включённых в базу данных Web of Science.

Структура и объём работы. Диссертационная работа изложена на 125 страницах компьютерного текста, включает: введение, обзор литературы, собственные исследования, заключение, практические предложения, список использованной литературы, приложения. Список литературы включает 158 источников, в т.ч. 76 отечественных и 82 иностранных. Диссертация иллюстрирована 22 рисунками и 8 таблицами.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эпизоотическая обстановка по респираторным болезням молодняка крупного рогатого скота в России и Европейских странах

Болезни органов дыхания относятся к числу наиболее дорогостоящих заболеваний крупного рогатого скота, как с точки зрения потерь и ухода, так их влияния на экономику производства [9]. К возбудителям респираторных болезней крупного рогатого скота относятся: герпесвирус, респираторно-синцитиальный вирус - РСВ КРС (BRSV), вирус парагриппа-3- ПГ-3(BPI3) и др. [11], [12], [13], [14], [146].

В целом, респираторные вирусные инфекции распространены среди молодняка крупного рогатого скота, о чем свидетельствует высокая серопозитивность животных, как в Европе, так и в России. В 2010 году распространенность вириуса респираторно-синцитиальной инфекции имело место в шведском стаде на откорме от 8 до 70%, причиной стала высокая плотность животных, параллельно с РСВ имело место коронавирусная инфекция крупного рогатого скота [105], [57], [68]. В молочном животноводстве из 59 протестированных в Италии ферм, по крайней мере, одна корова с положительным результатом РСВ присутствовала во всех хозяйствах [85], а в Норвегии распространенность ПГ-3, ИРТ и РСВ среди телят в возрасте старше 5 месяцев на молочных фермах оценивалась в 50,2%, 39,3% и 31,2%, соответственно [108]. Во Франции частыми инфекциями крупного рогатого скота являются РСВ и ПГ-3 у телят в возрасте до 3 лет, серопозитивность которых составляет 60-70%, а распространенность инфекционного бычьего ринотрахеита (ИРТ) около 10-11% в зависимости от года. При этом распространенность в родильных отделениях выше, чем в молочном стаде.

Данные о распространенности респираторных болезней телят с клиническими проявлениями болезни в различных странах отличается, на что, возможно, оказывают влияние применяемые методы исследования и, вероятно, разнообразие климата, обусловленное географическими факторами.

Респираторно-синцитиальная инфекция является наиболее распространенной вирусной инфекцией у телят. В молочном животноводстве РСВ крупного рогатого скота ассоциируется с другими респираторными болезнями бактериальной этиологии на 60-70% ферм Дании, США, Швеции и Нидерландах.

Вирус РСВ крупного рогатого скота, как правило, поражает откормочное стадо, где содержится большое поголовье животных. Проведенные исследования во Франции в конце 90-х годов прошлого столетия выявили инфекционную причину в 65,4% случаев бронхопневмонии у телят связанную с РСВ [109]. Вирус поражал телят в виде моноинфекции или совместно с бактерией, и при этом в 52,4% случаев преобладал вирус диареи (болезнь слизистых оболочек) крупного рогатого скота. На востоке Франции в 2007 г проведено исследование сыворотки крови телят на антитела к вирусам респираторной этиологии, в результате установлено, что среди выявленных антител преобладал вирус ПГ-3 без клинических признаков. Большинство протестированных телят заразились в момент перегруппировки, примерно за 8-13 дней до отбора проб [89].

В России респираторные вирусные болезни крупного рогатого скота появились в 70-х годах прошлого столетия в результате интенсивного ввоза чистопородного скота из-за рубежа. Массовые эпидемии респираторных инфекций, вызванных распространением различных вирусов среди не иммунного крупного рогатого скота, протекала, как правило, с острым течением болезни и высокой смертностью. В ряде хозяйств АПК смертность достигала от 8 до 20% среди телят [35].

Заболевания с поражением респираторного тракта у животных являются одной из важнейших проблем, вызывающей серьезные экономические потери. Так, по данным российских авторов, от 40 до 80% всех болезней и до 50% отхода молодняка крупного рогатого скота, связаны с респираторной патологией [59], [71], [123].

Острые респираторные вирусные инфекции крупного рогатого скота негативно влияют на полноценный рост и формирование организма теленка. По данным информационно аналитического центра Россельхознадзора, в

период с 2008 по 2018 год заболеваемость острыми респираторными заболеваниями составляла более 50% от общей заболеваемости крупного рогатого скота [55]. По сведению ряда авторов, основой этиопатогенеза при респираторных заболеваниях животных является первичная активация условно-патогенной микрофлоры, ее накоплением и токсическим действием [141], [93].

Среди болезней крупного рогатого скота так же имеют место пневмоэнтериты, которые наносят огромный экономический ущерб животноводству. Возбудителями таких инфекций являются вирусы, относящиеся к семействам герпесвирусов, как инфекционный ринотрахеит (ИРТ), парамиксовирус, вирус парагриппа-3 (ПГ-3), респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), flavivирус, вирус диареи-болезни слизистых (ВД), аденоовирус, рота-и коронавирус 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 переболевают данными инфекциями без клинических признаков [38], [9], [10], [15], [19].

Болезни легких инфекционной этиологии часто принимают характер эпизоотий и поэтому представляют проблему для животноводства, и широко распространены в сельскохозяйственных предприятиях на территории Российской Федерации. Ежегодно ими заболевает 27,3% телят, а гибнет 5,8% животных от числа заболевших [17], [29].

По данным В.Н.Сюрина и соавт. (1991), В.В. Гуненкова и соавт. (1975) Ю.А. Костыркина и соавт. (2002), число заболевших животных респираторными инфекциями в центральной части РФ достигает 70-100%. Аналогичные результаты исследований были получены и в других регионах Российской Федерации, которые показали, что количество заболевших парагриппом-3 крупного рогатого скота составляло 81,9-90 %.

По данным «Федерального центра охраны здоровья животных» (2015г), при исследовании проб сыворотки крови телят в неблагополучных по респираторным

болезням хозяйствах было выявлено: в 543 пробах из 631 исследованных (86%) антитела к возбудителю инфекционного ринотрахеита, в 196 из 333 (58,8%)-к возбудителю вирусной диареи, в 480 из 519 (92,4%) –к парагриппу-3, в 180 из 228 (78,9%)- к респираторно-синцитиальной инфекции, в 141 из 316 (44,6%)-к ротавирусу и в 226 из 306 (73,8%) – к коронавирусу крупного рогатого скота.

Ежегодно по причине респираторных заболеваний на территории РФ гибнет до 30% телят в возрасте от 1 до 6 месяцев, кроме того, эти вирусы участвуют в патологии воспроизводительных функций крупного рогатого скота [63].

Однако, во всех случаях одним из этиологических агентов респираторных болезней, регистрируемым во многих регионах РФ, является вирус ПГ-3, который также является причиной возникновения смешанных инфекций крупного рогатого скота [16], [54],[7], [49].Заболевание ПГ-3 крупного рогатого скота впервые описали в США в 1932 г Скот и Фарлей. В СССР парагрипп-3 был выявлен в 1968 г., и в настоящее время зарегистрирован во всех регионах, где развито промышленное скотоводство [4]. Парагриппом-3 обычно болеют телята в возрасте с 10 дней до года, реже - молодняк старше года, взрослые животные тоже восприимчивы, но переболевают бессимптомно [33].

В 1959 г. после выделения изолированного этиологического агента инфекционного ринотрахеита появились новые сведения о возбудителе парагриппа-3 крупного рогатого скота [40]. Парагриппозная инфекция в хозяйствах может протекать и спорадически, но при ней характерно присутствие респираторного синдрома. Кроме того, среди молодняка, доставленного на доращивание, ПГ-3 может протекать в смешанной этиологии. Как показали исследования, специфические антитела к вирусу ПГ-3 при смешанных инфекциях обнаруживаются в сыворотке крови телят в 44-86% случаев [56], [18].

В 90-ые годы на территории Российской Федерации отмечали высокую циркуляцию вируса парагриппа-3 среди крупного рогатого скота, особенно в

хозяйствах по откорму. В последние годы при исследовании сыворотки крови телят разного возраста серопозитивность составляет 100%. По данным И.Я. Строгановой (2007) в хозяйствах средней Сибири выявлено наибольшее количество серопозитивных животных к вирусу ПГ-3 крупного рогатого скота – 13,1%, а в 2008-5,1%. При этом в большинстве случаев респираторные болезни протекали в смешанной форме (ПГ-3 и респираторно-синцитиальная инфекция, ПГ-3 и адено-вирусная инфекция). Парагрипп-3 в таких случаях, поражал до 90% животных в неблагополучных стадах, обусловливая 18-24% случаев энзоотий респираторных болезней [51].

Больные телята в острой стадии болезни выделяют вирус в количестве 10^6 - $10^{7.5}$ ТЦД_{50/мл}, заражение телят, как правило, происходит воздушно-капельным путем.

При большей концентрации животных, поступающих из разных хозяйств, имеющих не одинаковые циркуляции возбудителя в стаде, его накопление во внешней среде приводит к повышению вирулентности вируса. Этиологическая роль парагриппа-3 в развитии болезни несомненна, однако, болезнь крупного рогатого скота осложняется другими микроорганизмами (адено-вирусами, вирусом инфекционного ринотрахеита, хламидиями, микоплазмами, пастереллами, кокками и др.).

1.2 Биологические особенности вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота

Парагрипп-3 крупного рогатого скота или транспортная лихорадка крупного рогатого скота характеризуется поражением органов верхних дыхательных путей, а в тяжелых случаях - легких [95].

Вирус парагриппа-3 крупного рогатого скота вызывает тяжелую форму инфекции при интенсивном ведении животноводства. Это один из наиболее распространенных возбудителей респираторных инфекций у крупного рогатого скота [23],[131],[136].

Парагрипп-3 крупного рогатого скота по своему клиническому проявлению идентичен с другими респираторными заболеваниями (ИРТ, РС, ВД, аденовирусная инфекция и др.). Поэтому при постановке диагноза на ПГ-3 необходимо исключить эти вирусные болезни [91].

Вирус ПГ-3 крупного рогатого скота относится к семейству Paramyxoviridae, состоящему из 2-х подсемейств и 5-ти родов, которые поражают позвоночных животных. Подсемейство Paramyxovirinae:

- род *Respirovirus*, включает японский геммаглютинирующий вирус мышей, вирусы парагриппа-3 крупного рогатого скота, человека 1, 3 и свиней 1;
- род *Morbillivirus* (от лат. *morbillus* – корь) – вирусы чумы крупного рогатого скота, мелких жвачных и плотоядных и др.;
- род *Rubulavirus*: вирусы болезни Ньюкасла, паротита и др.

Подсемейство *Pneumovirinae*: - род *Pneumovirus*: респираторно-синцитиальные вирусы крупного рогатого скота и др.;

- род *Metapneumovirus*: вирус ринотрахеита индеек [2], [119], [6], [67].

Парамиксовирусы представлены однонитевой не фрагментированной РНК с молекулярной массой $6\text{-}8 \times 10^6$ Д – отнесены к оболочечным вирусам. Вирусные частицы округлой формы, размером 150-300 нм. Капсидная оболочка имеет спиральный тип симметрии. В вирионах содержится 70% белка, 20-25% липидов, 6% углеводов [64], [37].

Вирионы состоят из нуклеокапсида спиральной симметрии и липопротеидной оболочки, на поверхности которой имеются выступы (отростки) длиной 8—12 нм. Липиды образуют двойной центральный слой вирусной мембранны и являются ее структурным каркасом. Белки расположены снаружи и изнутри двойного липидного слоя. Гликолипиды составляют наружный белковый слой, образованный двумя гликопротеидами — НН (гемагглютинин и нейраминидаза) и F (белок слияния), а негликозилированный мембранный белок образует внутренний слой, который называют матриксом вириона (М-белок)[5], [76], [107].

Геном вирус парагриппа-3 крупного рогатого скота состоит приблизительно из 15500 оснований, кодирующих шесть больших открытых рамок считывания (ORFs): фосфопротеин (P), матричный белок (M), нейраминидазы гликопротеин (HN), гликопротеин (F), полимеразный белок (L), главный нуклеокапсидный протеин (NP) [96].

Вирус ПГ-3 крупного рогатого скота инактивируется эфиром, хлороформом, растворами кислот и щелочей, ультрафиолетовым излучением. Хорошо сохраняется при низких температурах и лиофилизированном состоянии [21].

Вирус парагриппа-3 крупного рогатого скота хорошо культивируется в культурах клеток почек телят, буйволов, коз, крольчат, собак и обезьян, с ясно выраженным цитопатогенным действием в виде округления и зернистого перерождения клеток, а также в куриных эмбрионах. Лабораторные животные не восприимчивы. Для экспериментального заражения вирусом используют телят в возрасте 5-6 месяцев [20].

Антигенная вариабельность штаммов вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота не установлена. В разных странах все штаммы, выделенные от телят и взрослых животных, по антигенной структуре идентичны и соответствуют прототипному штамму SF-4, выделенному в США [90]. Вирус обладает выраженной антигенной активностью и имеет два типа антигенов, различающихся по свойствам и специфичности: рибонуклеопротеидный, или S-антиген, и поверхностный Vi-антиген. Кроме того, вирус ПГ-3 обладает гемагглютинирующими, гемадсорбирующими свойствами, гемолитическим действием, что используется при лабораторной диагностике болезни [73].

Эритроциты многих видов животных адсорбируются на клетках, инфицированных вирусом ПГ-3 крупного рогатого скота (гемадсорбция), а вирусная суспензия агглютинирует эритроциты морской свинки, кролика, свиньи, обезьяны, коровы и других видов животных и не агглютинирует эритроциты лошади [59].

Инкубационный период парагриппа -3 длится от 24 до 30 часов. У больных телят повышена температура тела до 42^0C , снижается аппетит, наблюдаются истечения из носовой полости, глаз, учащенное дыхание.

Клиническое проявление зависит от вирулентности штамма вируса, возраста, сопутствующих инфекционных болезней. Болезнь протекает остро, подостро и хронически. При тяжелом течении болезни у телят вначале развивается серозный конъюнктивит, ринит, сопровождающийся обильным слюноотделением, высокой температурой и диареей, катаральным воспалением слизистых оболочек верхних дыхательных путей, воспалением передних и средних долей легкого, иногда - диафрагмальных. Из бронхов выделяется слизистый, иногда слизисто-гнойный экссудат, при фибринозном воспалении легкие плотной консистенции, пёстро окрашены. На легочной плевре встречаются пленки фибрина [12], [14].

У телят, инфицированных вирусам ПГ-3, развиваются клинические признаки в виде лихорадки, кашля, выделений из носа и глаз, инфицированные одновременно двумя вирусами, более угнетены и температура тела у них гораздо выше, чем у телят, зараженных только вирусом ПГ-3. Известно также, влияние вируса ПГ-3 на иммунную систему организма животных [61], [18].

Манифестация ПГ-3 у коров в условиях молочной фермы проявляется, как правилоапатией, уменьшением поедаемости корма на 40%, снижением суточных удоев на 30%, гипертермией у 42% животных, серозно-слизистыми истечениями из носа – у 70%, кашлем и одышкой – у 50,4%, маститамиу 27,2%, от числа отелившихся коров зарегистрировано 12,5% случаев аборта, 8,3% - мертворождений, 14% послеродового пареза, 22%-задержаний последа, 36%-случаев эндометрита.

Вирус ПГ-3 крупного рогатого скота может кумулятивно способствовать повреждению тканей и иммуносупрессии, что приводит к тяжелой бронхопневмонии от стресса при транспортировке[151].

1.3 Методы диагностики респираторных болезней животных вирусной этиологии

Постановка диагноза основана на анализе данных эпизоотологических, клинических и патологоанатомических изменений, а также лабораторных исследований [73].

Патологоанатомические изменения наиболее часто отмечают катаральное воспаление слизистых оболочек верхних дыхательных путей и обильное скопление тягучей слизи, иногда единичные мелкие кровоизлияния. Заглоточные, подчелюстные, средостенные лимфоузлы набухшие, сочные и покрасневшие. В легких чаще воспалены верхушечные и сердечные доли, в отдельных случаях диафрагмальные. Воспаленные участки уплотнены, окрашены более темно; на разрезе четко выступает набухшая перибронхиальная и междольковая ткань, из просветов бронхов выделяется слизистый, иногда слизисто-гнойный экссудат. В случаях крупозного воспаления легкие плотной консистенции, пестрого цвета: нередко на легочной плевре имеются пленки фибрина. Иногда обнаруживают серые очаги в мышцах задних конечностей [70], [41].

Клиническая диагностика болезни. Диапазон клинического проявления болезни у животных разнообразен: от легких ринитов и бронхитов до тяжелых бронхопневмоний. Течение болезни зависит от многих факторов: путей заражения животных, вирулентности вируса, иммунного статуса, воздействия неблагоприятных факторов внешней среды.

Инкубационный период может длиться от 24 до 30 часов, вначале у больных телят повышается температура тела до 41-42, ухудшается аппетит, появляется сухой кашель, истечение из носовой полости, нередко из глаз, пульс учащается до 120 ударов, а дыхание до 84 в минуту, иногда наблюдается диарея. Постепенно истечения из носа становятся слизисто-гноинными, а слюноотделение более интенсивным. Иногда в ротовой полости появляются эрозии. У телят при подостром и хроническом течении отмечают признаки пневмонии и плеврита, иногда энтериты.

У взрослых животных болезнь, как правило, не сопровождается симптомами респираторного заболевания. У стельных коров инфекция может привести к внутриутробному заражению плода, абортам или рождению нежизнеспособных телят [36].

Лабораторная диагностика. Организация эффективных мер борьбы и профилактики респираторных болезней телят во многом зависит от быстрой и достоверной их диагностики.

Лабораторная диагностика вирусных болезней включает: 1) экспресс- методы; 2) вирусологические методы; 3) серологические методы (ретроспективная диагностика); 4) молекулярно- генетические методы (ПЦР, секвенирование)[22], [27].

Диагностика вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота включает: обнаружение антигена в мазках-отпечатках, гистологических препаратах патологического материала, взятого от больных животных в реакции иммунофлуоресценции; выделение возбудителя из патологического материала в культуре клеток почек или легких эмбриона коровы и его детекция в реакции торможения гемагглютинации, реакции иммунофлуоресценции и др.; выделение антител всывороток крови больных и реконвалесцентов (ретроспективная диагностика) в реакции торможения гемагглютинации [87], [24], [25].

Основными методами диагностики болезней вирусной этиологии являются: экспресс методы путем индикации вируса в серологических реакциях; культивирование вируса на восприимчивых домашних или лабораторных животных; на развивающихся куриных эмбрионах и на культуре клеток и тканей; ретроспективная диагностика - исследование парных проб сыворотки крови, полученных в начале болезни и через 21 день в РНГА, РТГА, РН, РСК, ИФА. Вируса парагриппа-3 в культуре клеток выявляют по его цитопатогенному действию (клетки легких, эмбриона коровы, текстрикул бычка).

Ретроспективная диагностика основывается на выявление вирусного антигена в пробах патматериала и секретах полости носа методом МФА, изоляцию вируса в культуре клеток и его идентификацию в РГА, РЗГА [32], [47], [52], [53].

Серологическая диагностика вирусных болезней заключается в выявлении специфических антител в сыворотке крови больных или переболевших животных. Для серологического исследования направляют парные пробы сыворотки крови, т.е. взятые от одних и тех же животных, первый раз в начале заболевания, а второй раз – через 14-21 день. Полученную сыворотку крови сливают в стерильные флаконы и отправляют в лабораторию для исследования. По нарастанию титра антител в исследуемых сыворотках крови в 4 и более раз устанавливают диагноз на соответствующую вирусную болезнь [62].

Для диагностики инфекционного ринотрахеита используют реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА), реакцию диффузной преципитации (РДП) и реакцию нейтрализации (РН) с использованием биофабричных диагностикумов, иммуноферментного анализа (ИФА), иммунофлюоресценции (МФА).

Для диагностики парагриппа-3 используют реакции РЗГА, РНГА, РН или реакцию нейтрализации вирусных гемагглютининов (РНВГ) и ИФА.

Для диагностики вирусной диареи и аденоовирусной инфекции применяют РСК, ИФА, РИФ, РНГА.

Для -синцитиальной инфекции используют РПД, РНГА, ИФА.

В последние годы широко стали применяться иммунохимические методы, как иммуноферментный анализ - это наиболее используемый метод для определения сывороточных концентраций антител против известного антигена или наличия самого антигена[80].

ELISA иммунообсорбционный анализ с помощью связанного фермента позволяет обнаруживать вирусные антигены при экспресс-анализе. Этот метод является простым, более быстрым и менее затратным, чем клеточная культура и идентификация вируса [117], [30].

В зависимости от концентрации антигена в организме животных и чувствительности метода, ИФА можно применять, как в непрямом, так и прямом варианте, когда антиген находится в высокой концентрации в организме и при появлении симптомов болезни рекомендуется использовать прямой вариант ИФА.

Для лучшей чувствительности, когда патогенный белок находится в небольшом количестве, более эффективно применить непрямой ИФА[78].

Для обнаружения антител вируса герпеса, вируса парагриппа-3, вирусной диареи крупного рогатого скота и респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота, иммуноферментный анализ (ИФА) применили Mohamed Felshal, Philip Mccoujr (2006). По их мнению, данный метод подходит для высокопроизводительного скрининга.

В литературе имеются сообщения о высокой производительности модификационного метода ИФА на основе прибора «Luminex» для серологического тестирования [120], [124]. Она основана в использовании полистероловых шариков, наполненных двумя флуоресцентными красителями в разных соотношениях, в результате чего получается сто наборов микросфер, каждая из которых имеет свой уникальный спектральный адрес.

1.3.1 Молекулярно-генетические методы исследования в вирусологии

Во второй половине 20-го века менее чем за 50 лет, произошли две большие перемены в биологии: одна в биохимии белков и вторая в молекулярной генетике с серьезными последствиями для фундаментальных исследований в медицине и ветеринарии [98], [144].

Молекулярная генетика получило широкое распространение в вирусологической практике, когда имеется ограничение применение классических методов анализа. В этом контексте лидирующую позицию занимает полимеразная цепная реакция (ПЦР) [58], [69].

Количественная оценка транскриптор из неизвестных образцов стала возможной с появлением конкурентной ОТ-ПЦР [106].

В вирусологии обнаружение и количественное определение вируса основано главным образом на ПЦР. Клеточную культуру можно использовать для диагностики инфекций, связанных с вирусами, обладающими характерным цитопатогенным эффектом. Количественное определение вирусного генома в

ПЦР в режиме реального времени, позволяет экспрессное выявление вируса от больных животных [115], [130].

Полимеразная цепная реакция является высокоспецифичным методом амплификации нуклеиновой кислоты. Однако чувствительна к загрязнению посторонними или предварительно амплифицированными штаммами ДНК. Порой специфические копии ДНК, получаемые из каждого раунда амплификации с помощью одного аэрозоля, содержащего до 24 000 копий амплифицированного материала контаминируются посторонними белками. Поэтому наиболее важным фактором при проектировании и оснащении лаборатории для ПЦР является, сведение к минимуму риска загрязнения исследуемого материала.

Эффективность идентификации вирусного РНК из биологического материала требует быстрой транспортировки и адекватного хранения образцов из-за нестабильной природы РНК [112], [147].

Вследствие высокой чувствительности и специфичности (99%), тест системы на основе полимеразной цепной реакции незаменимы в тех случаях, когда другие методы диагностики невозможны. Применение метода ПЦР способствует ранней диагностике заболеваний с использованием как клинического, так и патологического материалов, а также проб с объектов внешней среды [8], [3], [139].

ПЦР представляет собой циклическую реакцию, в которой ДНК-мишень амплифицируется *in vitro* и включает в себя три этапа: нагревание при 91–97°C, где дуплекс ДНК-матрицы денатурируется (расплывается) до отдельных нитей; отжиг обычно при 40–65°C, когда короткие олигонуклеотидные праймеры связываются с единственной матрицей ДНК и стадия удлинения при 68–73°C, где термостабильная ДНК-полимераза катализирует синтез новой цепи ДНК путем удлинения загрунтованной цепи. Реакция требует двух коротких олигонуклеотидов (праймеров), фланкирующих область-мишень для амплификации, которые присутствуют в большом молярном избытке и гибридизируется с комплементарными сегментами ДНК. Во время реакции дезоксинуклеотидтрифосфаты (dNTP), то есть dATP, dCTP, dGTP и dTTP, связанны

со свободным 3'-гидроксильным концом новой цепи. Только дезоксинуклеотидмонофосфат включается в цепь ДНК, отщепляя пирофосфатную группу.

В идеале количество копий ДНК удваивается в каждом цикле. Следовательно, одну копию целевой ДНК теоретически следует умножить до 230, то есть $1,074 \times 10^9$, копий после 30 циклов. Однако, на практике, количество копий в конечном и методологических параметров, а также истощения реагентов [102], [106], [122].

Последовательности должны быть специфичными для вируса-мишени и должны быть хорошо сохранены для разных штаммов или типов вируса, в противном случае чувствительность анализа может быть нарушена, однако для многих вирусов трудно идентифицировать такую последовательность, они представляют собой несколько повторных проверок. Для этого, включая полиморфизм последовательностей вирусного генома, отсутствие информации о последовательности, а также предполагаемые изменения в клинической значимости некоторых вирусных, подтипов вируса парагриппа типа 3, респираторно-синцитиального вируса являются хорошими примерами этого феномена.

ДНК-секвенирующие гели включают специфическое применение электрофореза для устранения линейного сигнального трендового фрагмента, полученного в ходе реакции секвенирования, которая отличается по длине парой сигнальных оснований. Это требует использования акриламидного геля, обычно в концентрации 4-20, по меньшей мере, 40 см вобычно толщиной 0,4 мм (100). ПЦР в реальном времени - это непрерывный сбор флуоресцентного сигнала от одной или нескольких полимеразных цепных реакций в течение нескольких циклов, количественная ПЦР в реальном времени - это преобразование флуоресцентных сигналов от каждой реакции в числовое значение для каждого[77].

Флуоресцентные зонды, используемые в ПЦР в реальном времени, основаны на процессе передачи энергии посредством флуоресцентного резонанса или FRET. Эта система включает в себя два типа молекул: флуорофор и «гаситель».

Флуорофор возбуждается световой энергией. Он вернется в исходное состояние, испуская флуоресцентное излучение. Именно эта испускаемая флуоресценция обнаруживается устройством ПЦР в режиме реального времени. Поэтому измеренное излучение должно происходить только тогда, когда зонд специфически гибридизируется с целевой последовательностью[118].

Таким образом, исходя из краткого обзора основных достоинств и недостатков, приоритетным методом диагностики респираторных вирусных болезней является ПЦР. Наиболее перспективным в этом направлении является, применение ПЦР в реальном времени для быстрого выявления и купирования болезни молодняка крупного рогатого скота.

1.3.2 Секвенирование и филогенетический анализ микроорганизмов

После открытия структуры ДНК в 1953 году Джимом Уотсоном и Фрэнсисом Криком, с конца 1970-х годов были разработаны различные методы секвенирования ДНК. Секвенирование ДНК включает в себя определение последовательности нуклеотидов в фрагменте ДНК. Это позволяет получить из генома организма всю информацию, полученную из последовательностей ДНК, которые составляют его генетический материал. Все существующие методы секвенирования имеют одну общую особенность: они основаны на знаниях, полученных за последние тридцать лет в отношении механизмов репликации ДНК с использованием ДНК-полимеразы. Этот фермент способен синтезировать комплементарную цепь ДНК из матричной цепи. За последнее десятилетие новые методы, известные как технология высокопроизводительного секвенирования «hautdébit» или секвенирование нового поколения «*Next-Generation Sequencing :NGS*» [142], [137].

В 1977 году Фредерик Сэнгер и Аллан Коулсон опубликовали в Великобритании метод секвенирования ДНК, который произвел революцию в области молекулярной биологии. Этот так называемый метод «Сэнгера» значительно улучшил метод, разработанный в США Максамом и Гилбертом,

опубликованный в том же году, а также метод «плюс и минус», опубликованные Сэнгером и Коулсоном два года назад. За это открытие Гилберт и Сэнгер были награждены Нобелевской премией по химии в 1980 году [133], [111], [134].

В последние десять лет были достигнуты большие успехи в разработке и коммерциализации новых технологий секвенирования, сгруппированных под термином секвенирование нового поколения «Next - Génération Sequencing» [138], [79], [104].

Технологии NGS позволили значительно сократить стоимость базового секвенирования и значительно сэкономить время по сравнению с техникой Сэнгера. В результате разработки NGS секвенирование стало экономически выгодным для многих исследований [82], [83].

В микробиологии технология секвенирования нового поколения особенно применима для секвенирования всего или частичного генома [75], [77], [94].

1.3.2.1 Секвенирование и филогенетический анализ вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота

На сегодняшний день на основе филогенетического анализа были описаны три известных генотипа BPIV-3: A (BPIV-3a), B (BPIV-3b) и C (BPIV-3c). Генотип A впервые был выделен в США, затем в Египте, Китае и Японии. Генотип B впервые был описан в Австралии. Выделение генотипа C было проведено в Китае, Южной Корее и Японии, однако все три генотипа были зарегистрированы в Аргентине [50], [72], [152], [149], 140].

В Турции Мехмет Озкан (2018) в последующем при проведении исследований по обнаружению и молекулярной характеристики вируса парагриппа-3 и респираторно-инцитиального вируса крупного рогатого скота усовершенствовал метод секвенирования Сэнгера. В усовершенствованном варианте они использовали матричный ген (M ген) для ПГ-3 крупного рогатого скота (328 bp) и гликопротеин (F) для РСВ вирус с размером продукта 710 bp и 481 bp. Последовательности нуклеотидов ПГ-3 крупного рогатого скота, а выделенный

штамм PCB относится к подгруппе 3 (генотип A) входит в тот же кластер, что и референтный вирус (KU159366 USA, штамм FJ543092) [113].

Харун Альбайрак (2019) продолжая исследования Мехмета Озкана, для секвенирования генома вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота использовал метод нового поколения Illumina с использованием гликопротеина (F) размером 400 п.н. Филогенетический анализ первого изолята из образца легкого умершего теленка показал, что генотип С (номер доступа в GenBank MH357343) обнаруживается и в других регионах, который до сих пор описывался, как циркулирующий только в части Азии и Южной Америки.

Дальнейшие исследования были направлены на определение молекулярной характеристики изолятов вирусов ПГ-3 и PCB из носовых слизей коров в районе Эрзурум на востоке Турции. Всего было изолировано 155 образцов: 92 пробы от быков и 63 - коров. Возраст животных составлял от 9 месяцев до 5 лет. Большинство быков были на откорме и содержались в открытых помещениях; коровы находились в период лактации и содержались в свободных стойлах. Все отобранные образцы были проверены на наличие вирусного генома с использованием ПЦР. Ген-специфические праймеры в молекулярном методе идентифицировали штаммы РВС и ПГ-3 (M-ген) на уровне рода. В результате РНК из PCB и ПГ-3 был обнаружен в двух (1,29%) и трех (1,93%) образцах, соответственно, один из которых был секвенирован, и последовательности были сопоставлены с эталонными штаммами вируса. Филогенетический анализ распределил вирус ПГ-3 к генотипу С и штаммы PCB к подгруппе 3.

Таким образом, было установлено, что PCB и ПГ-3 КРС способствуют развитию респираторных заболеваний крупного рогатого скота в Турции.

Эльсио Леаль в 2008 году показал новый генотип вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота, выделенного в Китае под названием (BPIV-3 - BJ). Далее автор выделил другой штамм BPI-3 в культуре клеток (MDBK) и из образца носовых слизей, однако после секвенирования и филогенетического анализа NP белка (111-1658), полученные результаты показали расхождение

BPIV-3-BJ и BPI-3 генотипа A с эталонными изолятами выделенными в Китае NM09 (JQ063064) [88].

В Китае Сяобо Вэнь 2016) выделил еще четыре изолята парагриппа-3 крупного рогатого скота на культуре клеток MDBK. С помощью от ПЦР, нуклеотидного филогенетического анализа M гена и гемагглютинин-нейраминидаза (HN), все четыре изолята соответствовали геному для SD0835 (1048 п.н). При сравнении трех изолятов BPIV3 (Q5592, SF и 910N) с референтным штаммом SF-4 было установлено, что китайские изоляты ПГ-3 крупного рогатого скота могут быть потенциально новым генотипом C или субгенотипом ПГ-3[150].

В Бразилии Родриго А.В. (2008), геном HN и L секвенировал и подверг филогенетическому анализу два изолята ПГ-3 (изоляты были культивированы в клетках MDBK), в качестве положительного контроля были использованы SF-4(AF178655). В результате этих испытаний установлено, что полевые изоляты и референтный штамм SF-4 относятся той же группе генотипа A [113].

Геномный фрагмент гена NH и L из бразильского штамма вируса парагриппа 3 (BPIV-3), выделенного из клеточных культур и клинических образцов, амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (от ПЦР). Секвенированные образцы с использованием специфических дегенеративных праймеров в филогенетическом анализе, показали высокую степень генотипичности по сравнению со штаммом прототипа SF4/32.[130], [131].

Надер М. Собхи (2017) выделил вирус бычьего парагриппа типа 3 (BPIV-3) из носовой слизи египетского крупного рогатого скота с клиническими признаками легкой формы пневмонии. Вирус был выделен в клетках MDBK и подтвержден методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (от ПЦР). Полный геном египетского штамма BPIV-3 был секвенирован с использованием метода Illumina. Новый выделенный штамм был представлен в GenBanc с регистрационным номером KP757872, разделен на 6 кодирующие области (N, P,

M, F, HN и L) и 6 не кодирующих областей (ведущий UTR, NPUTR, PMUTR, MFUTR, F-HNUTR, HN-LUTR и трейлер UTR) [119].

На основании филогенетического анализа египетский изолят (PIV-3 / Egypt / 2014 /KP757872) был сгруппирован вместе с кластером генотипа A в последовательности с BPIV-3. Он был тесно связан с последовательностью генотипа ANM09 (JQ063064) из Китая, образуя уникальный субгенотип [103], [148], [128].

Сильвина С. Майдана (2012) провела исследование по выделению и характеристике вируса бычьего ПГ-3 от водяных буйволов в Аргентине. Пробы из носовой слизи и влагалища, собранные у 12 больных буйволов, позволили выделить три изолята ПГ-3. Выделенные изоляты от буйволов были отнесены к генотипу B. До настоящего времени о данном генотипе сообщалось только в Австралии. Молекулярно-генетическая характеристика изолятов ПГ-3 от буйволов показала, что эти вирусы более сходны с генами B, чем с A (эталонный штамм SF) [110].

Исследование носовой слизи от 63-хголов крупного рогатого скота с клиническими признаками, проведенные на аукционе в провинции Шаньдун, Китай (2008 год), показали следующие результаты: четыре назальных мазка положительных по гену гемагглютинин-нейрамидазы (HN), имели полную последовательность генома для одного изолята SD0835 (1048 п.н.).

Филогенетическая реконструкция генетического анализа данных китайских изолятов была составлена с использованием 697 нуклеотидной области матрицы, 603 нуклеотидной области HNBPIV3 и полной последовательности генома для изолята SD0835 (15474 п.н.). Анализ последовательности амплифицированной области генома у четырех изолятов, показал сходство нуклеотидов, которые варьировали от 82 до 83,3% по сравнению со штаммом BPIV3 Q5592. Диапазон сходства нуклеотидов для кодирующих областей BPIV3 между SD0835 и другим BPIV3 составил 79,9-85,3%. Филогенетический анализ с использованием последовательности области HN для четырех изолятов и полного генома для SD0835 указывало, что четыре китайских изолята BPIV3 могут быть

потенциально новым генотипом С (BPIV-3c). Кроме того, филогенетический анализ с матричным геном позволил предположить, что четыре китайских изолята BPIV-3 были наиболее тесно связаны с вирусами BPIV3b, но, по-видимому, отличались от существующих вирусов BPIV3 и также могут быть потенциально новым генотипом С или субгенотипом BPIVb [153].

В последующем геномы изолятов из Китая BPIV-3 были секвенированы и сопоставлены с Корейскими изолятами (12Q061). В результате был установлено отличие от ранее известного генотипа А и В. Данные изоляты были тесно связаны с китайским штаммом SD0835 ранее классифицированным, как генотип С (BPIV-3c) [121].

Таким образом, исходя из обзора литературных источников по молекулярно-генетической характеристике вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота, наиболее эффективным методом идентификации вируса является секвенирование и филогенетический анализ.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Научно-исследовательская работа проводилась с 2018 по 2021гг. на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана», отдельные исследования осуществлялись в ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» и Междисциплинарном центре протеомных исследований Института фундаментальной медицины и биологии (Казанский (Приволжский) федеральный университет).

При постановке опытов были использованы клинико-эпизоотологические, патологоанатомические, гистологические, серологические, вирусологические и молекулярно-генетические методы исследования.

2.1.1 Материалы исследования

В работе использовали следующие штаммы:

- 1.SF-4 - референтный штамм вируса ПГ-3, инфекционная активность на перевиваемой линии культуры клеток легкого эмбриона коровы (ЛЭК) – 7,25 lg ТЦД 50/мл, гемагглютинирующий титр 1:32 в РГА с 1% эритроцитами морской свинки, был использован для более глубокого изучения генотипа вируса.
- 2.ПТК-45/86 - вакцинный штамм вируса ПГ-3, инфекционная активность на перевиваемой линии культуры клеток ЛЭК - 6,75 lg ТЦД 50/мл, гемагглютинирующий титр 1:16 в РГА с 1% эритроцитами морской свинки (ЭМС), был использован в исследовании для контроля.
- 3.ЛД-9 - вирусный изолят, выделен из патологического материала, от больного респираторным заболеванием теленка (на основании изучения физико-химических и биологических свойств идентифицирован как вирус ПГ-3), инфекционная активность на перевиваемой линии культуры клеток ЛЭК - 6,25 lg ТЦД 50/мл.

Диагностические наборы:

- набор реагентов «ПЦР-ПАРАГРИПП-3-КРС-ФАКТОР» для выявления РНК вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота (*bovineparainfluenzavirus 3*) в биологическом материале методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ ПЦР РВ) (Россия).
- набор диагностикума парагриппа-3 крупного рогатого скота в реакции торможения гемагглютинации, изготовленный в ФГУ «Курская биофабрика, фирма «БИОК».
- набор для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-L», («AmpliSens»,ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).
- комплект реагентов «РИБО-преп», предназначенный для выделения тотальной РНК/ДНК из клинического материала для последующего анализа методом обратной транскрипции в полимеразной цепной реакции «AmpliSens» (Россия).

- комплект реагентов для ПЦР: смесь dNTP, H₂O, Taq ДНК полимераза, праймер (M₁ и M₂).; «SibEnzyme» (Россия).
- комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле « ЭФ»; «AmpliSens» (Россия).
- набор для секвенирования: BigDyeTerminatorv3.1 cycleSequencingkit(ThermoFisherSCIENTIFIC).

2.1.2 Методы исследования

Клинический осмотр больных телят проводили общепринятыми методами (измерение температуры тела, частоты пульса и дыхания). При клиническом обследовании животных тщательно осматривали видимые слизистые оболочки носовой и ротовой полостей, а также конъюнктиву, обращая внимание на их цвет, наличие выделений из полостей, а также на возможные дефекты (эрозии, язвы) слизистых оболочек.

Патологоанатомическое вскрытие вынужденно убитых и павших от респираторных заболеваний телят проводили по общепринятой методике. При осмотре особое внимание уделяли на наличие характерных изменений верхних дыхательных путей.

Отбор проб. У телят и коров с тяжелой клинической формой респираторного характера (выделения из носа, сильный кашель) было отобрано 38 образцов (мазки из носовой полости). Возраст животных варьировало от 1 месяца до 2 лет. Положительные образцы, выявленные с помощью ПЦР, были использованы для заражения культур клеток почки эмбриона коровы (ПЭК). Затем во флаконы вносили по 0,2 см³ суспензии исследуемых материалов и оставляли на контакте при температуре 37⁰С в течение 1 часа. Вслед за этим, во все флаконы с культурой клеток добавляли поддерживающую среду (ГЛА) и ставили в термостат.

Флаконы с зараженной культурой клеток ежедневно просматривали под малым увеличением светового микроскопа на наличие цитопатического эффекта (ЦПЭ).

Гистоморфологический анализ: с целью выявления патоморфологических изменений в легких телят с клиническими признаками хронической и острой

легочной патологии были выполнены гистологические исследования. Кусочки легких из пораженных долей, легочных лимфатических узлов, а также плевры, перикарда и миокарда были фиксированы в 10 %-ном нейтральном формалине, обезвожены в этаноле восходящей плотности, уплотнены заключением в парафин при температуре 56 °. Гистологические срезы толщиной 8 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Изготовленные гистологические срезы изучали при помощи светооптического микроскопа CarlZeissJena выбранные участки фотографировали фотокамерой SonyCyber-shot.

Биологические и физико-химические методы: на первом этапе работы провели сравнительное изучение биологических и физико-химических свойств изолята ЛД-9 с контрольными штаммами. Первоначальную идентификацию выделенного цитопатогенного агента проводили путем определения типа нуклеиновой кислоты в его геноме. С этой целью в качестве ингибитора синтеза ДНК использовали 5-бромдезоксиуридин (5-БДУ). Учет реакции проводили титрованием обработанного материала на культуре клеток ПЭК.

Сохранение инфекционной активности цитопатогенного агента после обработки 5-БДУ давало нам основание считать, что изолят является РНК-содержащим вирусом, тогда как у ДНК-содержащих вирусов инфекционная активность снижается на 1,0 lg ТЦД 50/мл и ниже.

Термостабильность изолята ЛД-9 изучали при температуре 56° С. С этой целью пробирки с пробами вирусного материала помещали в водяную баню с вышеуказанной температурой. После экспозиции 20, 30, 60 и 90 минут опытными пробами заражали культуру клеток. Снижение инфекционного титра более чем на 1,0 lg ТЦД 50/мл свидетельствовало о чувствительности изолята вируса к данной температуре.

Устойчивость вирусного изолята к различным значениям pH среды определяли по следующей методике. Первоначально при помощи 0,1 М раствора соляной кислоты доводили до соответствующего значения показатель pH поддерживающей среды. Затем 1 часть вирусного материала смешивали с 9 частями питательной среды соответствующей pH. После экспозиции в течение 3-х

часов при комнатной температуре каждой пробой инфицировали культуру клеток определяли наличие ЦПД в монослое культуры клеток.

С целью изучения чувствительности изолята вируса к эфиру вирус содержащей культуральной жидкости добавляли эфир до 20%-ной концентрации. Флаконы плотно укупоривали пробками и помещали в холодильник при температуре 7⁰С на 18-20 часов, периодически перемешивая исследуемые материалы. Затем резиновые пробки заменяли ватными, и флаконы оставляли в холодильнике до полного испарения эфира. После этого проводили титрацию на культуре клеток опытных и контрольных образцов вирусного материала. Снижение инфекционного титра вируса на 1,0 lg ТЦД 50/мл и более свидетельствовало о его чувствительности к эфиру.

Устойчивость вирусного изолята к хлороформу определяли по методу Mayr A, Bogel K (З. Лярский, 1980). Для этого исследуемый материал смешивали с 10% объемом хлороформа и встряхивали при помощи шуттль-аппарата в течение 1 часа при 4⁰ С, после чего смесь оставляли при той же температуре до следующего дня. Затем опытный материал центрифугировали при 2000 об/мин, в течение 30 минут. Образовавшуюся надосадочную жидкость титровали на культуре клеток в сравнении с необработанным вирусным материалом. Степень устойчивости вируса к хлороформу оценивали по изменению инфекционного титра в lg ТЦД 50/мл.

Серологический анализ: реакцию гемагглютинации (РГА) ставили макрометодом в лунках пластиковых панелей. С этой целью во все лунки панели вносили по 0,4 см³ физиологического раствора с pH 7,2 – 7,4. Затем в первую лунку вносили 0,4 см³ вирусодержащей культуральной жидкости и путем последовательного переноса в последующие лунки получали двукратно возрастающий ряд разведений. После чего во все лунки вносили по 0,4 см³ 1%-ой суспензии эритроцитов крупного рогатого скота, барана, кролика и морской свинки. Тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре. Учет реакции производили после оседания эритроцитов в контроле по 3-х, 4-х крестовой оценке агглютинации.

Реакцию гемадсорбции проводили на культуре клеток ЛЭК с использованием 0,5%-ной взвеси эритроцитов вышеперечисленных животных. С этой целью через 6-10 часов после инфицирования культуры клеток исследуемыми вирусными материалами во флаконы добавляли по 0,2 см³ взвеси эритроцитов и инкубировали 20 минут при комнатной температуре. Затем флаконы осторожно промывали раствором Хенкса, чтобы освободиться от осевших на монослои эритроцитов и просматривали под малым увеличением светового микроскопа.

При положительной реакции на поверхности зараженных клеток наблюдали диффузную адсорбцию эритроцитов, тогда как в интактной культуре они отсутствовали. Оценку реакции проводили визуально по 4-х крестовой степени адсорбции эритроцитов на монослое культуры клеток.

Ретроспективная серологическая диагностика основывалась на выявлении 2-4-х кратного прироста специфических антител к вирусу ПГ-3 в РТГА в парных пробах сыворотки крови, взятых в начальной стадии заболевания и через 3 недели после реконвалесценции. Для постановки реакции торможения гемагглютинации использовали «Набор диагностикумов парагриппа-3 КРС» ФГУ «Курская биофабрика-фирма «БИОК».

- серологическую идентификацию вирусного изолята осуществляли в реакциях нейтрализации (РН) с постоянной дозой вируса (100 ТЦД 50/см³) и диффузационной преципитации (РДП) по общепринятым методам.

В опытах были использованы гипериммунные сыворотки, полученные к референтным штаммам вирусов ИРТ, ПГ-3, ВД, РС и адено-вируса 1-ой серогруппы.

- с целью выделения предполагаемых возбудителей респираторной патологии у молодняка крупного рогатого скота, от больных брали носовые смывы, а у вынужденно убитых животных слизистые оболочки носовых перегородок, кусочки трахеи, легких, лимфатических узлов, селезенки, печени и почки. Из этих материалов готовили 10% суспензию на растворе Хенкса, содержащем смесь антибиотиков пенициллина со стрептомицином.

Вирусологические методы: вирус содержащим материалом заражали культуру клеток почки эмбриона коровы (ПЭК). С этой целью монослой культуры клеток трехкратно промывали раствором Хенкса, чтобы удалить сывороточные антитела и ингибиторы, присутствующие в ростовой среде. Затем во флаконы вносили по 0,2 см³ суспензии исследуемых материалов и оставляли на контакт при температуре 37°C, в течение 1 часа. После инкубации взвесь патологических материалов удаляли, и монослой 2-3-х кратно промывали раствором Хенкса. Вслед за этим, во все флаконы с культурой клеток добавляли поддерживающую среду (ГЛА) и ставили в термостат.

Флаконы с зараженной культурой клеток ежедневно просматривали под малым увеличением светового микроскопа на наличие цитопатического эффекта (ЦПЭ). В тех случаях, когда через 6-7 дней после первичного заражения не выявляли ЦПЭ на монослое, проводили дополнительно 2-3 «слепых пассажа».

Молекулярно-генетический анализ: определяли эффективность полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

Выделение РНК возбудителя парагриппа-3 крупного рогатого скота из биологического материала осуществляли с применением набора «ДНК/РНК – с-фактор» (ООО «ВЕТ ВАКТОР», Москва-Троицк).

Для экстракции РНК использовали по 10 мкл выделенного РНК при общем объёме реакционной смеси 25 мкл.

Для постановки ПЦР-РВ с флуоресцентной детекцией необходима двухцепочная ДНК, поэтому амплификации фрагментов генетического материала вируса парагриппа-3 предшествовало преобразование молекулы РНК возбудителя в ДНК путем обратной транскрипции.

Обратная транскрипция и амплификация осуществлялись по режиму, описанному в таблице 1 (согласно инструкции производителя).

Таблица 1- Температурно-временной режим амплификации на ДТ-96

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1.	55°C-15минут(обратная транскрипция)	1
2.	95°C-5мин	1
3.	95°C-20сек	45
	58°C-30с,детекция НЕХ,Cу5	
	72°C-20сек	

Выделение нуклеиновой кислоты вируса (РНК) проводили из собранных образцов тканей (носовая слизь, легочная ткань и лимфатические узлы) с использованием коммерческого набора РИБО-преп (AmpliSens, Россия), согласно инструкции производителя. Все выделенные пробы перед тестированием хранили при температуре минус20 ° С.

Обратная транскрипция:вирусная РНК подвергалась обратной транскрипции с помощью комплекта REVERTA-L (AmpliSens, Россия) в соответствии с инструкцией изготавителя.

ПЦР: образцы ДНК изолята ЛД-9, вакцинного штамма ПТК 45/56 и референтного штамма SF-4 были исследованы методом ПЦР со специфическими праймерами, кодирующими фрагмент матричного гена(М гена).В таблице 2 указаны область и размеры ампликона.

ПЦР проводили в объеме 20 мкл: 2 мкл образца ДНК, 13,09 мкл воды, 2 мкл dNTP, 0,48 праймера M₁,0,23мкл праймера M₂, 0,2 мкл ДНК полимеразы и 2 мкл 10 x ПЦР буфера, в конце добавляли минеральное масло. Затем пробирки были помещены в термоциклер для проведения амплификации по следующему термическому профилю: один цикл при 96,0°C в течение 6 мин для предварительного насыщения, 40 повторных циклов, состоящих из денатурирования (94,0°C,1 мин), этап отжига при 50,0°C также в течение одной минуты и элонгация 1 мин при 72,0°C. Процесс был завершен с окончательной элонгацией в течение 10 минут при 72,0°C.Амплификацию проводили в твердотельном амплификаторе фирмы «Терцик» ДНК-технология (Россия).

В конце опыта 10 мкл полученного продукта были перенесены на 1,5% агарозный гель, электрофорез проходил при 200 В в течение 40 мин. Наличие продукта 328 п.н рассматривалось как положительный результат. Детекцию результатов проводили на трансиллюминаторе длиной волны 312 нм.

Таблица 2- Область и размеры ампликона

вирус	ген	праймер	Нуклеотидные последовательности праймеров	размер
ВПГ-3	Matrix	M ₁	AGTGATCTAGATGATGATCCA	328bp
		M ₂	GTTATTGATCCAATTGCTGT	

Секвенирование: образцы ПЦР с наиболее четкими вирусоспецифическими полосами подвергались секвенированию. Секвенирование проводили методом Сэнгер в объеме 10 мкл реакционной смеси (концентрация праймера 3,2 пикомоля/мкл, 2,4 мкл big Dyeterminator 3.1 readyreactionmix и 4,4 мл воды) за 328bp(10нг). Полученные ПЦР образцы с использованием тех же самых праймеров ПЦР и режима амплификации.

Филогенетический анализ: частичная геномная последовательность полевого изолята, а также вакцинного штамма ПТК- 45/86 и референтного штамма были выровнены с последовательностями репрезентативных штаммов вирусов парагриппа-3, полученных из GenBank с использованием neighbourjoiningметода в системе ClustalW программы MegAlign Pro, (DNASTAR). Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3-Нуклеотидные последовательности штаммов вируса ПГ-3 крупного рогатого скота из GenBank использованные для филогенетического анализа

вирус	GenBankaccession	Страна	Генотип	Длина генома
SF-4	AF178655	USA	a	15456
NM09	JQ063064	China	a	15456
JCU	EF108221	Australia	a	697
BN-1	AB770484	Japan	a	15480
ISU	EU439428	USA	a	15480
910N	D84095	JAPAN	a	15480
Kansas	AF178654	USA	a	15454
BP4158	EF108222	Australia	b	697
Q5592	EU277658	Australia	b	15498
TVMDL15	KJ647284	USA	b	15474
SD0835	HQ530153	China	c	15498
SD0811	HQ530159	China	c	697
NX49	KT071671	China	c	15474
TVMDL20	KJ647287	USA	c	15474
HS9	LD000638	Japan	c	15474
12Q061	JX969001	Korea	c	15474

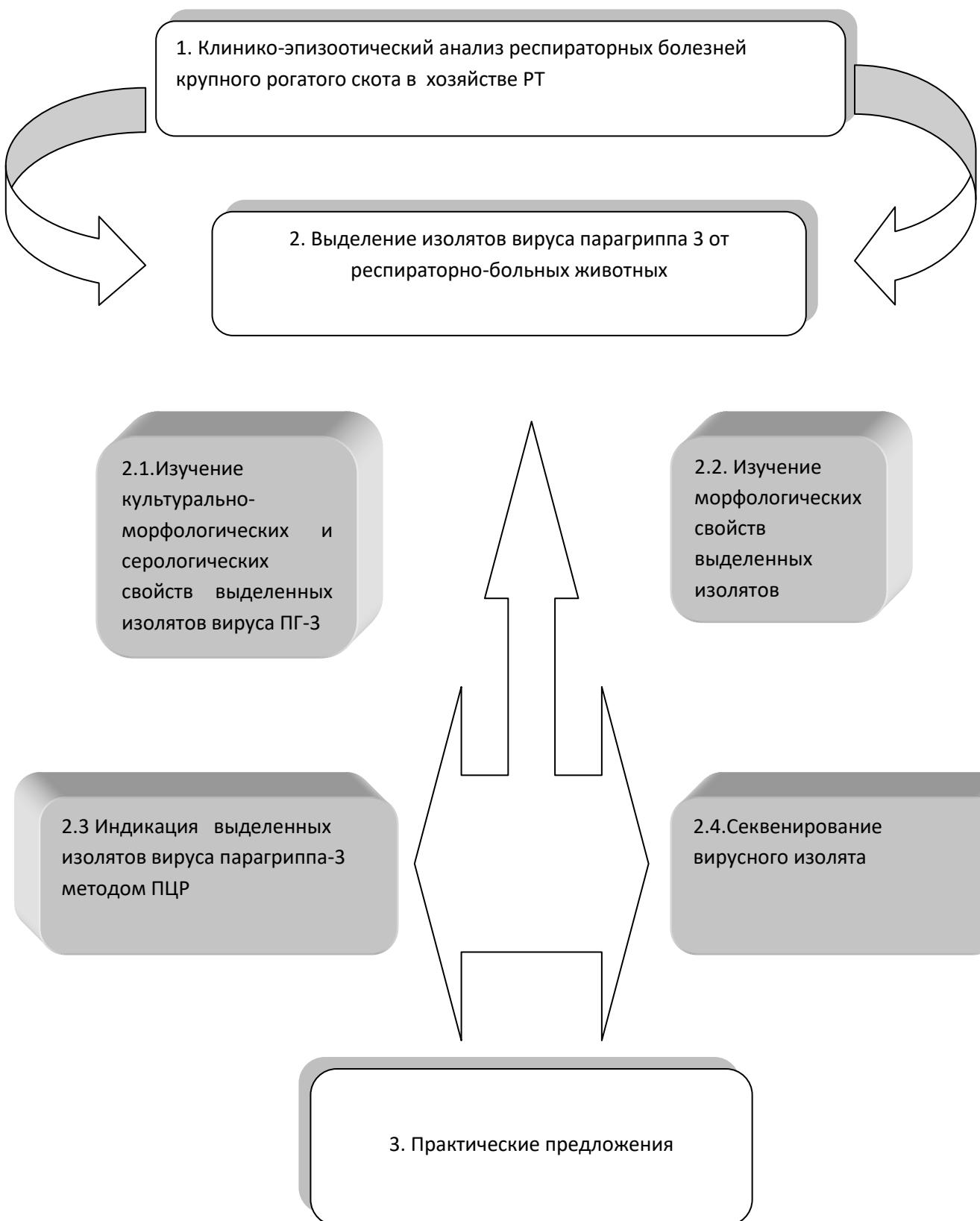


Рисунок 1- Схема основных этапов исследования.

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1 Анализ производственной деятельности хозяйства

В неблагополучных хозяйствах (Альметьевского, Чистопольского и Лаишевского районов Республики Татарстан), где были зарегистрированы вспышки респираторных заболеваний телят, первоначально провели исследования половозрастного состава животных, их размещения и характера ведения животноводства. При этом учитывали данные о ранее зарегистрированных заболеваниях в данном хозяйстве. В последующем выясняли сезонность возникновения инфекции, характер течения заболевания, источники и пути передачи возбудителей, возможность участия в инфекционном процессе различных возрастных групп, а также учитывали условия содержания, кормления животных и ветеринарно-санитарное состояние животноводческих помещений. Вирус ПГ-3 крупного рогатого скота изолировали в хозяйстве Лаишевского района.

Производственное направление ООО «Среднее Девятое» Лаишевского района Республики Татарстан - зерновое, молочное, мясное. В хозяйствах имеются 2300 голов крупного рогатого скота, в том числе 600 голов коров, продуктивность одной коровы в среднем составляет 5699 кг молока в год, жирность молока 3,8%. Содержание животных в стойловый период привязное, в летний период в летних лагерях.

Породный состав стада выглядит следующим образом: коровы имеют породность 3 поколения по Голштинской и Айрширской породе, а их потомство уже принадлежит к 4 поколению, или чистопородное.

2.2.2 Клинико-эпизоотологические и патологоанатомические исследования респираторных болезней в опытном хозяйстве

При респираторных заболеваниях крупного рогатого скота постановка диагноза сложная, основана на комплексном анализе эпизоотологических,

клинических и патологоанатомических данных, но решающее значение имеют лабораторные исследования: вирусологические, бактериологические, биологические, серологические и генетические. При этом необходимо учитывать возможность одновременного поражения различными вирусами, а также возбудителями бактериальной этиологии.

Дифференциальная диагностика заболеваний дыхательных путей у крупного рогатого скота основана на конвергентном и последовательном использовании клинических, эпидемиологических и лабораторных исследований. По этой причине каждое заболевание органов дыхания рассматривается в отдельности. Кроме того, для облегчения диагностики болезни возбудитель классифицируется в соответствии с предпочтаемым возрастом начала заболевания (телята, взрослое поголовье) и частотой их проявления.

Поэтому при клинико-эпизоотологическом исследовании опытного хозяйства использовали следующие методы: гистоморфологические, серологические, вирусологические и молекулярно-генетические.

Анализируя результаты исследования, можно отметить такие факторы риска, благоприятствующие возникновению респираторных болезней молодняка крупного рогатого скота, как способ содержания, ухода и кормления.

Другим важным фактором является сезон: пик заражения как правило, приходится на осень и зиму. Эта сезонность может быть объяснена, в частности, снижением температуры и повышением концентрации животных (Махин, 1982), не исключен и летний период содержания при нарушении зоогигиенических норм содержания.

Клинические признаки респираторных болезней животных разной степени тяжести отмечаются при ассоциированных респираторных болезнях, где обычно участвуют несколько патогенов, которые затрудняют диагностику, относящихся только к ПГ-3.

На основании изучения общих клинических признаков у телят наблюдали лихорадку, начинаящую примерно через 2 дня после заражения, которая достигает пика от $40,9^0$ до $41,4^0$ С на 4-5 день и продолжается до 7-10 дней.

Первыми клиническими признаками были кашель, отсутствие аппетита, лихорадка, имелись также серозно-слизистые выделения из носа, глаз, гиперемия носового зеркальца (рис. 2), что указывало на ринит. Дыхание было неглубоким и частым (60-70 в минуту), отмечались сухие хрипы. При легкой форме болезни выздоровление наступало на несколько дней раньше, все зависело от степени инфицированности и количества патогенных микроорганизмов и вирусов.

Однако, невозможно однозначно диагностировать вовлеченность ПГ-3 только по клиническим данным. Наличие быстрого наступления одышки больше наводит на мысль о вовлеченности ПГ-3, как отдельно, так и в комбинации с ПГ-3 и другими этиологическими агентами.

В основе клинического проявления болезни отмечали присутствие ринита, проявляющего слизисто-гнойным экссудатом в полости носа (рис. 3). Паталогоанатомически наблюдали макроскопическое повреждение легких (рис.4) в виде сращения в легких и ателектаза. В начале легкие кажутся опухшими, затем вдавленными, с красно-пурпурными твердыми участками (рис. 3), которые могут выделять слизисто-фиолетовый экссудат из дыхательных путей. На поверхности разреза легких наблюдали грудной отек. Лимфатические узлы в грудной клетке увеличены и отечны.

Полость в легком обычно увеличена, признаков плеврита нет или они минимальны. Эти грубые поражения лёгких аналогичны тем, которые возникают при экспериментальном заражении респираторно-синцитиальным вирусом, и являются наиболее тяжелыми через 4-16 дней после инфицирования. Наличие центрилобулярной эмфиземы и пузырьков в легких являются отличительной чертой респираторных инфекций, но при экспериментальном исследовании они не обнаруживаются.



Рисунок 2- Поражения легких с участками уплотнения красного цвета.



Рисунок 3- Гиперемия слизистой оболочки трахеи.

2.2.3 Гистологический анализ легких и легочных лимфоузлов у телят с респираторной формой болезни

С целью выявления патоморфологических изменений были выполнены гистологические исследования легких телят двух групп. Телята первой группы были больны парагриппом, а во вторую группу выделили телят с острым течением катарально-гнойной бронхопневмонии с клиническими признаками хронической и острой легочной патологии.

У телят первой группы при патологоанатомическом исследовании в легких обнаружены изменения, соответствующие хроническому бронхиту и межуточной пневмонии. Распределение патологических изменений в легких телят было неравномерным. В передних долях легких обнаруживали умеренно выраженные проявления межуточной пневмонии в виде неравномерного утолщения межальвеолярных перегородок, за счет их инфильтрации лимфоидными клетками, макрофагами и пролиферации респираторного эпителия. Местами возникали очаги разрывов альвеолярных септ (рис.4).

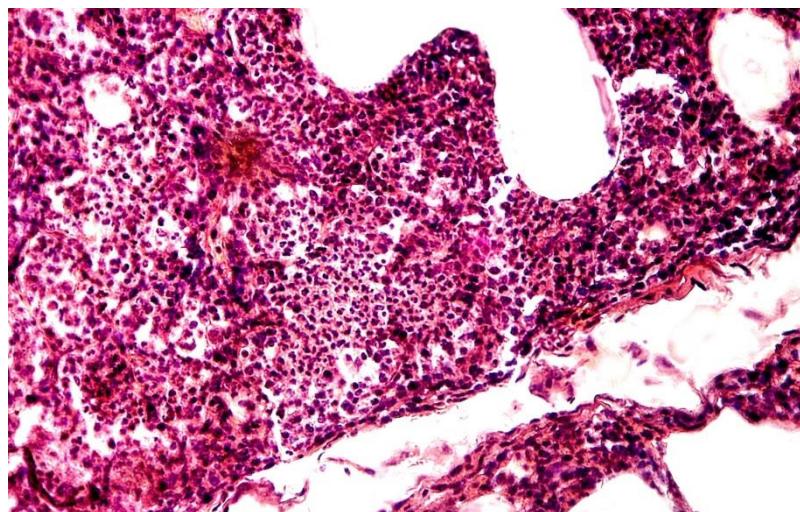


Рисунок 4- Интерстициальная пневмония. Хроническая альвеолярная эмфизема. Окраска гематоксилином и эозином.Х 140.

Преимущественно в мелких бронхах отмечали очаги трансформации эпителия в клетки с признаками гиперсекреции слизи, кариопикноза, вакуолизации цитоплазмы и десквамации. Местами обнаруживали очаги пролиферации бронхиального эпителия, инфильтрации его подслизистой основы лимфоидными клетками, единичными плазмоцитами и эозинофильными гранулоцитами. В

результате деструкции бронхиального эпителия, включая бокаловидные и реснитчатые клетки с ее мукоциллиарным аппаратом, объем катаральной массы в просвете значительно, а местами полностью отсутствовал. В большинстве мелких бронхов просветы заполнялись слущенными эпителиоцитами, с выраженными признаками вакуольной дистрофии и некробиоза. В воздухоносных путях большего диаметра возникали очаги сдавливания просветов вследствие обильной инфильтрации подслизистой основы и слизистой оболочки лимфоидными клетками с примесью плазматических клеток и единичных эозинофильных гранулярных лейкоцитов. В результате локальных нарушений дренажной функции бронхов появлялись очаги ателектазов, а в смежных участках - очаги компенсаторной хронической альвеолярной эмфиземы. Перибронхиальные и периваскулярные участки в передних долях легких насыщались макрофагами и лимфоидными клетками, что являлось проявлением хронической интерстициальной пневмонии.

Наиболее выраженные проявления патологии легких у телят первой группы отмечали в сердечных и диафрагмальных долях. Хроническая катаральная бронхопневмония сопровождалась обширными клеточными инфильтратами в перибронхиальных и периваскулярных областях, создавая участки апневматоза. В большинстве бронхов и бронхиол сердечных и диафрагмальных долей обнаруживали проявления избыточной регенерации многорядного эпителия с образованием скоплений клеток в виде локальных утолщений. Составляющий эти участки многорядный эпителий утрачивал полярную дифференциацию, а в ядрах клеток отмечался кариопикноз. Цитоплазма отдельных эпителиоцитов в середине этих утолщений отличалась оксифильностью и расположением в ее центре деформированного гиперхромного ядра. Апикальная область некоторых эпителиоцитов утолщений бронхов местами отторгалась, в других клетках наблюдался кариолизис и они приобретали вакуолизированный вид.

Необратимый деструктивный клеточный метаморфоз в слизистой оболочке мелких бронхов сопровождался разрушением базальной мембранны,

исчезновением базальных, а в крупных бронхах также и слизистых белковых желез.

Образовавшиеся в просвете дыхательных путей локальные клеточные выросты бронхиального эпителия в значительной степени затрудняли газообмен (рис. 5).

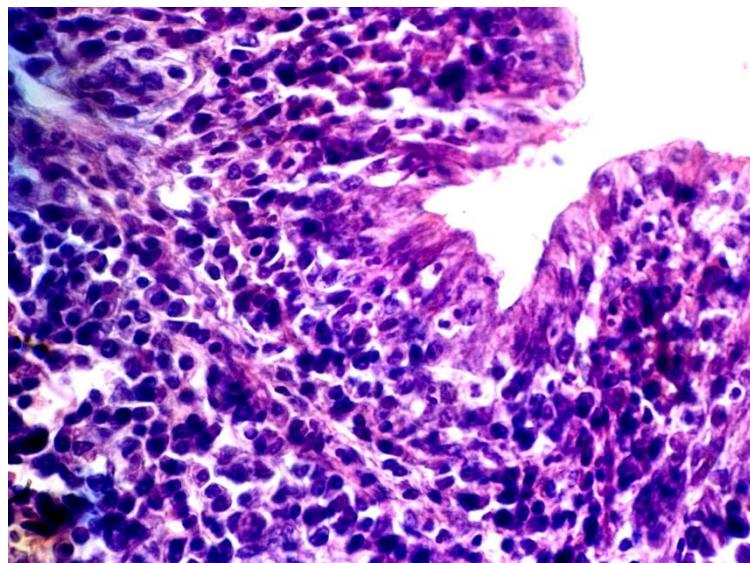


Рисунок 5-Локальные утолщения многорядного эпителия бронхов.

Окраска гематоксилином и эозином. X 480.

Исчезновение реснитчатых, бокаловидных клеток в пораженных участках слизистой оболочки бронхов, резкое сужение просветов в них приводило к затруднению, а в мелких бронхиолах к полному прекращению дренажной функции дыхательных путей. В прилегающих к ним участках обнаруживали небольшие по площади очаги компенсаторной хронической альвеолярной эмфиземы и обширные поля интерстициальной пневмонии. В просветах альвеол, сохраняющих признаки газообмена, местами обнаруживали проявления цитопатии альвеолоцитов. Обнаруживали многоядерные симпласты округлой формы, выделяющиеся интенсивной окси菲尔ной окраской, компактной цитоплазмой и наличием в ней 3-6 и более гиперхромных неправильной формой ядер (рис.6).

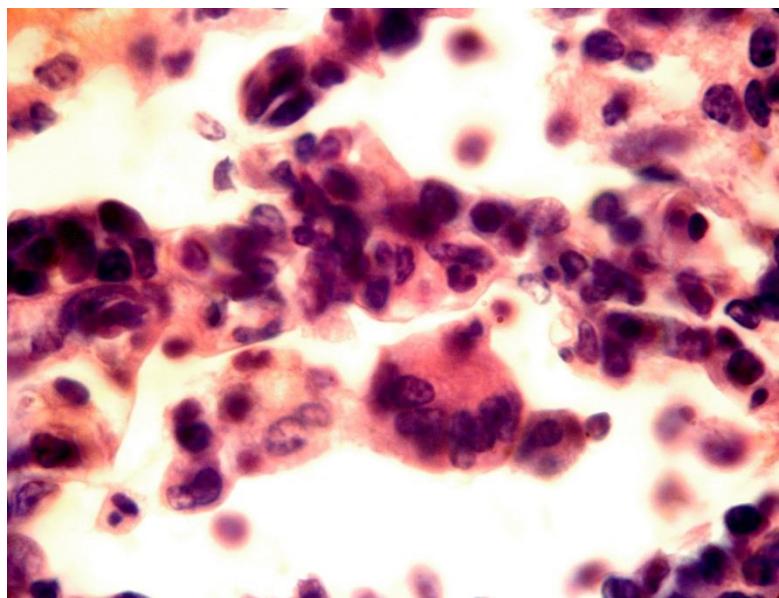


Рисунок 6- Образование симпластов в альвеолах Окраска гематоксилином и эозином. X 1000.

Явления слияния эпителиальных клеток, без признаков цитотомии в полной мере соответствует характеристике цитопатических свойств парамиксовирусов. Наличие в вирусах парагриппа липопротеида, обеспечивающего проникновение вирусных частиц в цитоплазму эпителиальных клеток, способствует объединению нескольких зараженных альвеолоцитов без слияния ядер. Местами цитопатические изменения в респираторном отделе проявлялись формированием только синцитиев из 5-10 и более клеток объединенных между собой участками цитоплазмы. Можно рассматривать данную форму цитопатии при парагрипозной инфекции как начальную незаверенную фазу образования симпластов. В пользу данного предположения свидетельствуют выявленные в просвете альвеол промежуточные фазы клеточного метаморфоза респираторного отдела, когда многоядерные симпласты соединялись несколькими цитоплазматическими мостиками с аналогичными симпластами (рис.7).

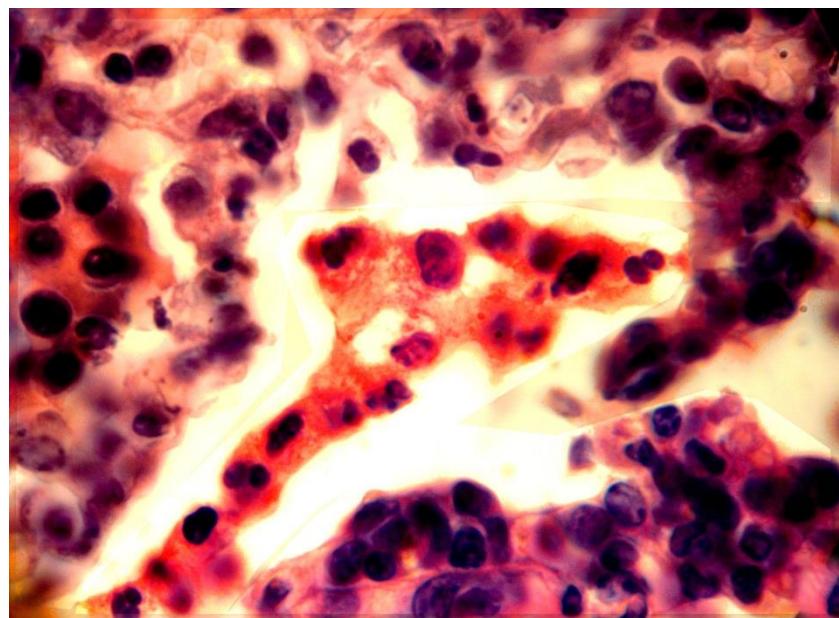


Рисунок 7- Образование синцитий и симпластов в альвеолах.
Окраска гематоксилином и эозином. X 1000.

Максимальная концентрация таких цитопатических изменений отмечалась в легких у телят с выраженным признаками частичной обструкции экссудатом просвета бронхов и межуточного альвеолита. Для обнаружения цитопатических изменений (симпластов, синцитиев) в респираторном отделе легких больных телят следует рассматривать просветы альвеол в сегментах легких сохраняющих вентиляцию и располагающихся в непосредственной близи с пораженными бронхами сердечных и диафрагмальных долей, как наиболее активно участвующих в газообмене. Следует отметить, что отсутствие в просветах дыхательных путей и альвеол и бронхоальвеолярной жидкости с пенистым включением является свидетельством того, что при длительном течении инфекции деструкция эпителия пораженных воздухоносных путей и респираторного отдела легких сопровождается разрушением мукоциллиарного аппарата и сурфактантной системы органа. Отмеченные изменения в лёгких указывают на преобладание клеточной воспалительной реакции над сосудистой.

Образование локальных периваскулитов и цитопатических проявлений в эпителии респираторного отдела легких являются морфологическим эквивалентом массивного действия единого белка - проникновения вируса

парагриппа. Наличие в белке проникновения гемагглютинина обеспечивает адгезию вирусных частиц на поверхности цитолеммы эпителиоцитов, а ее нейроминидазагидролизует молекулы сиаловых кислот цитомембранны. Обильное скопления муцина при бронхитах в начале парагриппозного вируса с концентрацией в ней вирусных частиц и белка проникновения, способствует дальнейшему бронхолегочному распространению инфекции.

Во внутрileгочных лимфатических узлах обнаруживали умеренную гиперплазию лимфоидной ткани с формированием малочисленных крупных вторичных лимфатических узелков в корковом веществе и наличием более мелких первичных формирующихся лимфоидных скоплений преимущественно в паракортикальной области органа. В медуллярной области лимфоидная ткань была представлена прерывистыми мякотными тяжами в окружении ретикулоцитов с утолщенными отростками. Вторичные лимфатические узелки выделялись наличием темной кольцеобразной зоны насыщенной малыми и средними лимфоцитами и широким герминативным центром, возникшим в результате продолжительного течения парагриппозной инфекции. Среди клеток герминативных центров лимфатических узелков преобладали малодифференцированные клетки с единичными фигурами митоза, лимфобласти, ретикулоциты, макрофаги и дендритные клетки. В кровеносных сосудах лимфатических узлов обнаруживали проявления мукоидного набухания стенок и умерено выраженный отек трабекул.

Продолжительное течение легочной патологии сопровождалось осложнениями со стороны серозных покровов грудной полости в виде очагового серозно-фибринозного плеврита переходящего в фибринозный пери- и эпикардит. Возникшая хроническая гипоксия тканей вызывала в миокарде больных телят дистрофические, атрофические изменения кардиомиоцитов и атипичных клеток и возникновение обширных участков серозного отека (рис.8).

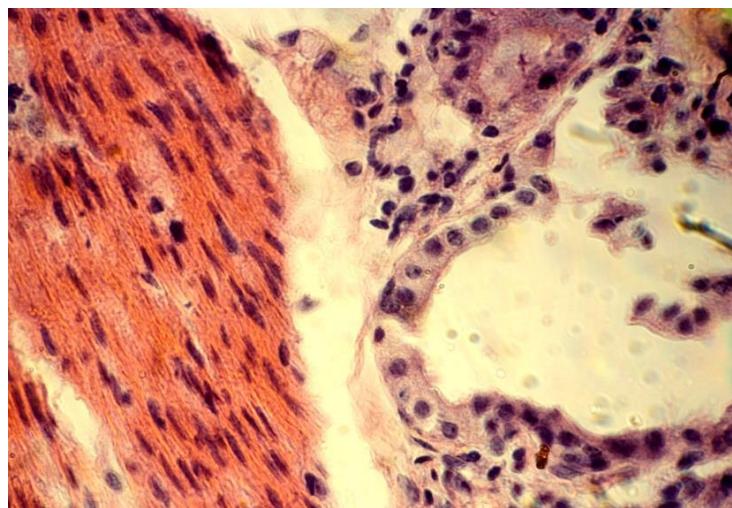


Рисунок 8-Отек миокарда. Дистрофия, атрофия кардиомиоцитов и атипичных клеток. Окраска гематоксилином и эозином. X 480.

Как результат этих нарушений ослабевал сократительный потенциала миокарда и возникал паралич сердца.

У больных телят второй группы павших в более короткие сроки по сравнению с телятами предыдущей группы в легких обнаруживали проявления острого катарального, катарально-гнойного бронхита и серозного альвеолита (рис. 9).

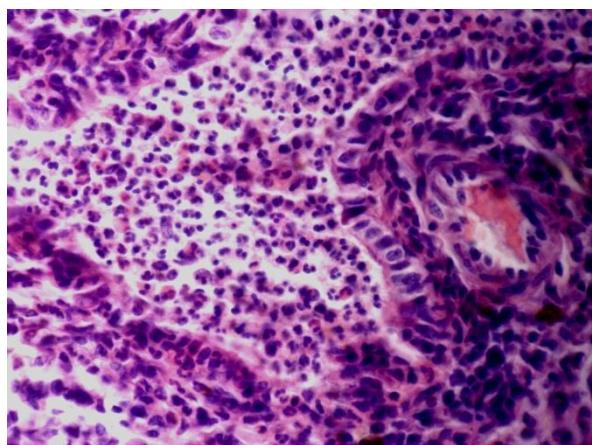


Рисунок 9-Гнойный экссудат в просвете бронхиолы.

Окраска гематоксилином и эозином. X 480.

Очаги воспаления в отличии от телят первой группы располагались преимущественно в передних и в меньшей степени сердечных долях легких. Обнаружить локальные утолщения стенок бронхов, врастания эпителия слизистой

оболочки в их просвет, а также цитопатические изменения в форме симпластов и синцитий в альвеолах не удавалось. Однако, в передних долях легких наблюдались очаги катарально-гнойной бронхопневмонии.

В легочных лимфатических узлах отмечали значительно меньшее количество первичных лимфатических узелков, в некоторых из них наблюдался небольшой разреженный герминативный центр, с плохо обозначенной темной клеточной периферией. Вследствие слабой выраженности пролиферации клеток лимфоидной ткани в мозговом веществе органа мякотные тяжи не просматривались. Медуллярная область узлов заполнялась в основном ретикулоцитами без признаков формирования дендритных форм клеток.

2.2.4 Серодиагностика проб сыворотки крови крупного рогатого скота

На втором этапе из отобранных проб сыворотки крови провели серологические исследования по выявлению титра антител и установлению степени распространения возбудителей инфекционных болезней.

Методом иммуноферментного анализа (ИФА) проведены исследования 272 проб сыворотки крови крупного рогатого скота разных половозрастных групп на следующие инфекции. Результаты исследований представлены на рисунке 10.

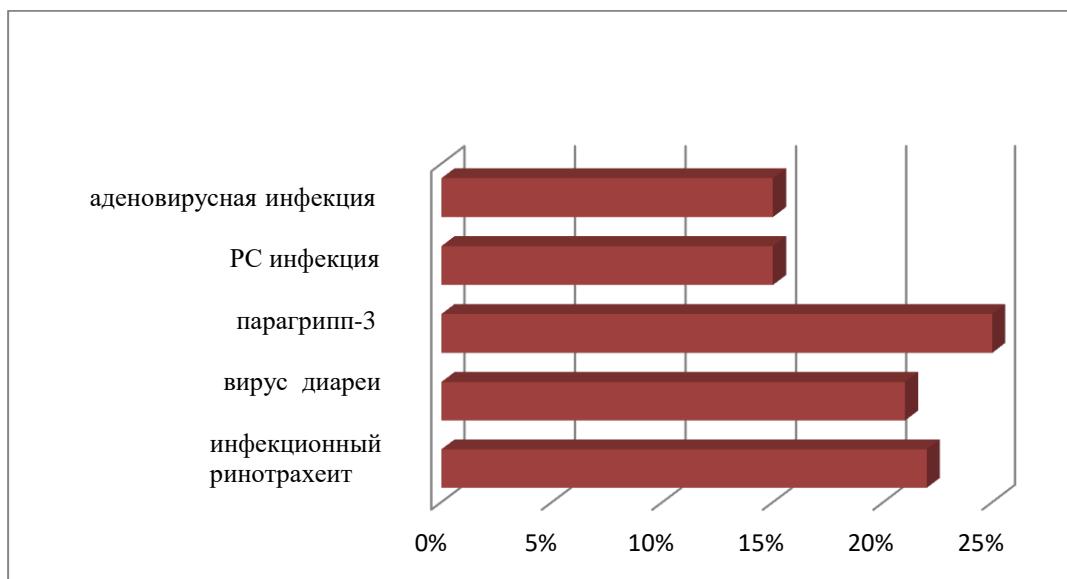


Рисунок 10- Иммуноферментный анализ проб сыворотки крови телят.

Поиск болезней респираторных органов - это прежде всего выявление этиологического агента для объяснения возникновения болезней, новых ассоциаций между патогенами или даже отсутствие положительных результатов в этиологической диагностике респираторных заболеваний.

На рисунке 10 показан процент положительных результатов по вирусным респираторным заболеваниям крупного рогатого скота (парагрипп-3, инфекционный ринотрахеит, аденоовирусная инфекция, респираторно-синцитиальная инфекция и вирусная диарея), зарегистрированны в хозяйстве. При этом обнаружены антитела к следующим возбудителям: парагрипп 3 - в 68 из 71(25%), ИРТв 61 из 77 (22%), респираторно-синцитиальной инфекции 15%, аденоовирусной инфекции в 59 из 73 (15%) и вирусной диареи 20%.

Исследование продолжили по определению титра антител сыворотки крови у телят 1, 2, 3-х месячного возраста против ПГ-3 в РТГА. Результаты исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4-Титры антител сыворотки крови телят к вирусу ПГ-3

№ п/п	№ живот -ных	Возраст телят	Титры гемагглютинирующих антител в РТГА	
			больные	переболевшие
1	347	1 месяц	1:20	1:80
2	335		1:10	1:160
3	356		1:20	1:80
4	361		1:20	1:80
5	241	2 месяца	1:5	1:80
6	229		1:5	1:80
7	244		0	1:40
8	235		1:10	1:160
9	118	3 месяца	0	1:40
10	126		1:5	1:80
11	115		1:5	1:80

12	110		0	1:80
----	-----	--	---	------

Исследования сыворотки крови телят 1 – 3-х месячного возраста, больных и переболевших респираторными заболеваниями, показали широкий диапазон титра колостральных антител против парагриппа-3. Телята в возрасте 1 месяца в начальной стадии имели титр антител 1:20 против парагриппа-3, что указывает о пассивном иммунитете. В этот период важно наличие колострального иммунитета, так как отсутствие последнего способно привести к серьезным инфекциям, приводящим к гибели животного.

2-3-месячные телята имели титр антител в интервале от 0 до 1:5, что свидетельствует о постепенном снижении титра антител к вирусу парагриппа-3.

После выздоровления у телят 3-х месячного возраста наблюдали увеличение титра антител 1:40-1:80, это объясняется развитием иммунной системы телят (приобретенный иммунитет).

2.2.5 Вирусологический анализ патологического материала

Выделение этиологического агента в патологическом материале от больных телят и вынужденно убитого животного проводили заражением культуры клеток ПЭК. Следует отметить, что уже на втором пассаже был изолирован цитопатогенный агент (ЛД-9), который вызывал дегенеративные изменения в монослое в течение 98-124 часа. ЦПД изолята на монослое культуры клеток характеризовался образованием синцития и вакуолей (рис. 11). В последующих пассажах срок наступления цитопатического эффекта сократился до 72 часов.

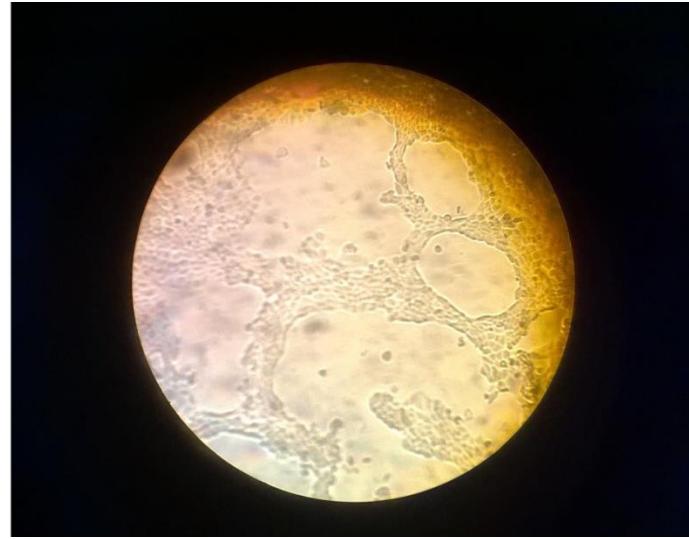


Рисунок 11- ЦПД изолята ЛД-9 на культуре клеток ПЭК.

С целью идентификации изолята вируса ПГ-3 была поставлена реакция нейтрализации на культуре клеток и диффузационной преципитации на агаре Дифко. Результаты исследований представлены в таблице 5.

Таблица 5- Идентификация вирусного изолята серологическими методами

Эталонные сыворотки к вирусу:	Штамм	Титры антител (\log_2)	
		Реакция нейтрализации	Реакция диффузационной преципитации
инфекционного ринотрахеита;	«TK-A (ВИЭВ)-B2»	0	0
парагриппа-3;	ЛД-9	5,0	2,0
респираторно-синцитиальный;	«Rondal»	0	0
вирусной диареи;	«BK-1»	0	0
аденовирус-1;	«Bovina -10»	0	0

Анализ результатов исследований показал, что изолят ЛД-9 реагирует со специфической сывороткой к вирусу ПГ-3 в титре 1:32 в РН и в титре 1:4 в РДП. Серопозитивность к другим вирусным агентам не установлена.

2.2.6 Биологические и физико-химические свойства изолятавируса

Инфекционную активность вирусного изолята ЛД-9 определяли путем обработки 5-бромдезоксиуридином, который способен ингибировать синтез ДНК. Достоверность ожидаемых результатов контролировали с использованием вакцинного ПТК-45/86 и референтного SF-4 штаммов вируса ПГ-3. Установление вирулентности испытуемого штамма позволил считать, что изолят является РНК-содержащим вирусом. Результаты исследований вирусного изолята представлены в таблице 6.

Таблица 6. Биологические и физико-химические свойства штаммов вируса парагриппа-3 КРС (n=4)

№ п/п	Виды исследований	Единица измерений	Вакцинны й штамм «ПТК- 45/86 вируса ПГ-3	Референт- ный штамм «SF-4» вируса ПГ-3	Вирусны й изолят «ЛД-9»
1	Инфекционная активность на культуре клеток	lg ТЦД 50/мл	6,75	7,25	6,25
2	Чувствительность к 5-БДУ	lg ТЦД 50/мл	6,5	7,0	6,0
3	Резистентность к эфиру	lg ТЦД 50/мл	0	0	0
4	Резистентность к хлороформу	lg ТЦД 50/мл	0	0	0
5	Инактивация при T +56 ⁰	минута	25	30	25
6	Чувствительность: к pH 8,0; к pH 5,0; к pH 3,0	lg ТЦД 50/мл	6,5 5,0 1,0	7,0 5,5 1,5	6,0 4,5 0,5

7	Способность агглютинировать эритроциты: кр. рог.скота; барана; кролика; морской свинки.	Титр в РГА	1:8 1:2 1:2 1:16	1:16 1:4 1:4 1:32	1:8 1:2 1:2 1:8
8	Способность адсорбировать эритроциты: кр. рог.скота; барана; кролика; морской свинки.	Визуальная оценка (+)	+++ ++ + ++++	+++ ++ ++ ++++	+++ + + ++++

В опыте по определению типануклеиновой кислоты у изолята ЛД-9 было установлено, что после обработки препаратом 5-БДУ всех 3-х испытуемых штаммов выявлено лишь незначительное (на 0,25 lg) снижение инфекционной активности. Данное обстоятельство свидетельствовало о том, что все они являются РНК-содержащими вирусами.

При постановке реакции гемагглютинации вирусный изолят ЛД-9, также как референтный и вакцинный штаммы ПГ-3, агглютинировал эритроциты морской свинки и КРС в титре 1:8, а также 1:2 эритроциты барана и кролика. Аналогичные результаты были получены и в реакции гемадсорбции. Все испытуемые штаммы вируса диффузно адсорбировали эритроциты вышеперечисленных животных.

Дальнейшую идентификацию изолята осуществляли путем изучения его физико-химических свойств в сравнении с вакциным и референтным штаммами вируса парагриппа-3. Так, при определении резистентности вирусов к эфиру и хлороформу установлено, что после обработки препаратами штаммы полностью инактивировались.

С целью изучения термостабильности изолята ЛД-9 вирусный материал выдерживали при температуре 56^0 С. В результате проведенных исследований

установлено, что все 3 штамма инактивируются при данной температуре в течение 25 – 30 минут.

В опытах по определению устойчивости вирусного изолята к различным параметрам рН установлено, что в щелочной среде вирус сохраняется лучше, чем в кислой.

Таким образом, проведенные опыты по идентификации выделенного вирусного агента ЛД-9 на основании изучения отдельных биологических и физико-химических свойств показали его идентичность с референтным и вакцинным штаммами вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота.

2.2.7 Молекулярно-генетическая детекция изолята вируса ПГ-3

(ПЦР)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - один из важнейших методов современной диагностики. Он может амплифицировать определенную последовательность ДНК из крошечных образцов с высокой эффективностью в течение нескольких часов.

ПЦР в реальном времени - это специальный метод полимеразной цепной реакции для измерения исходного количества ДНК. Количественная ПЦР фактически измеряет количество ампликона (частицы ДНК, определенной парой праймеров) в образце.

Флуоресцентное детектирование, способное осуществлять ПЦР накопление продукта при его удвоении, значительно повысило надежность данного метода. Существует хорошо известная обратная корреляция между шаблонной концентрацией и длительностью лаговой фазы ПЦР. Для ее использования было разработано целое поколение автоматизированных систем. При использовании любого из нескольких различных химических веществ накопление ПЦР-продукта контролируется до достижения заранее установленного порогового значения. Затем это время запаздывания сравнивается со стандартной кривой и вычисляется концентрация.

В наших исследованиях результаты кривых накоплений флуоресцентного сигнала анализировали с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в соответствии с инструкцией к прибору.

Учет результатов ПЦР-РВ проводили по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линии. На рисунках 12, 13, 14 представлены полученные нами графики амплификации.

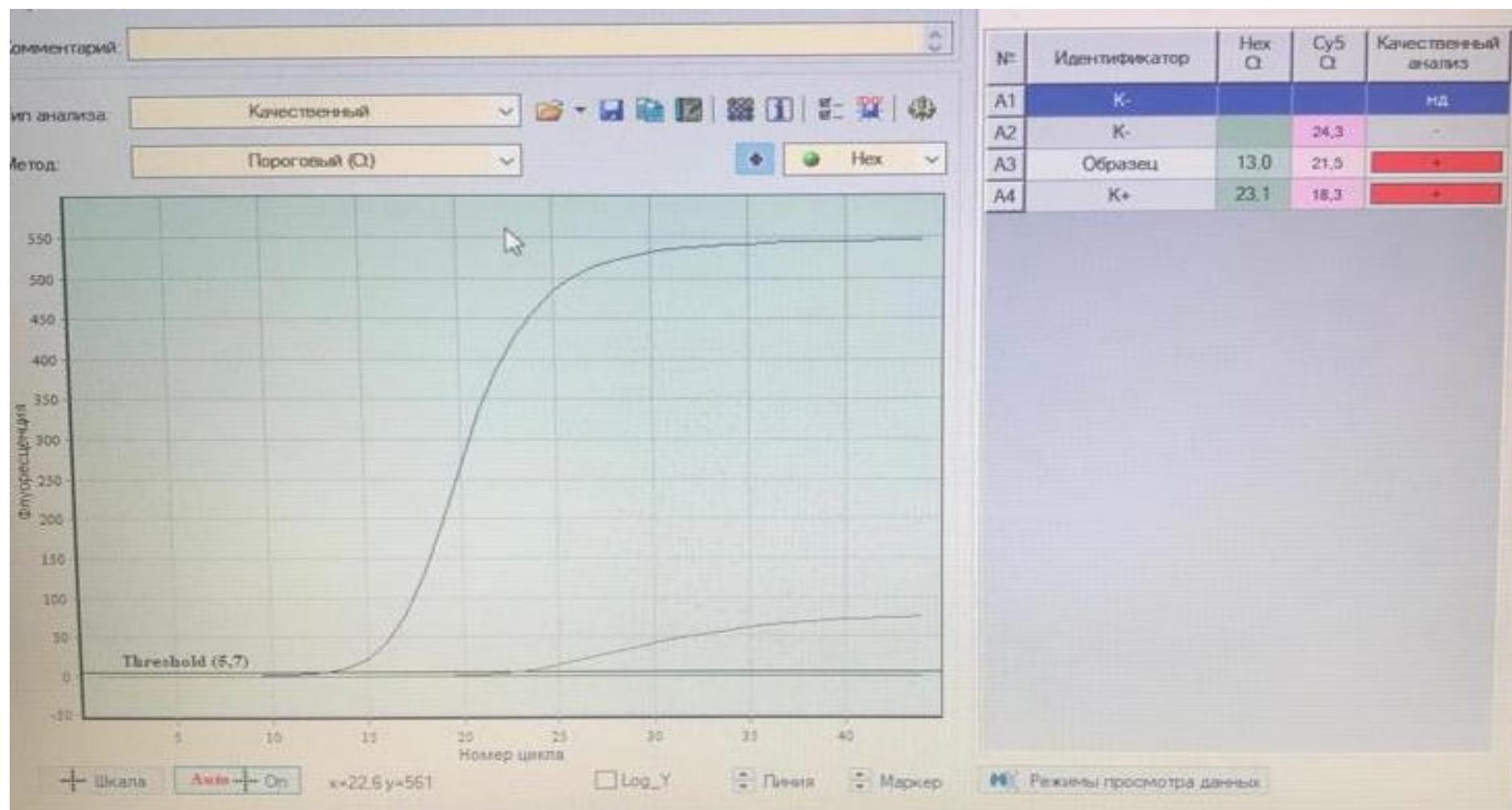


Рисунок 12-График амплификации по флуорофору HEX изолята ЛД-9 вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота.

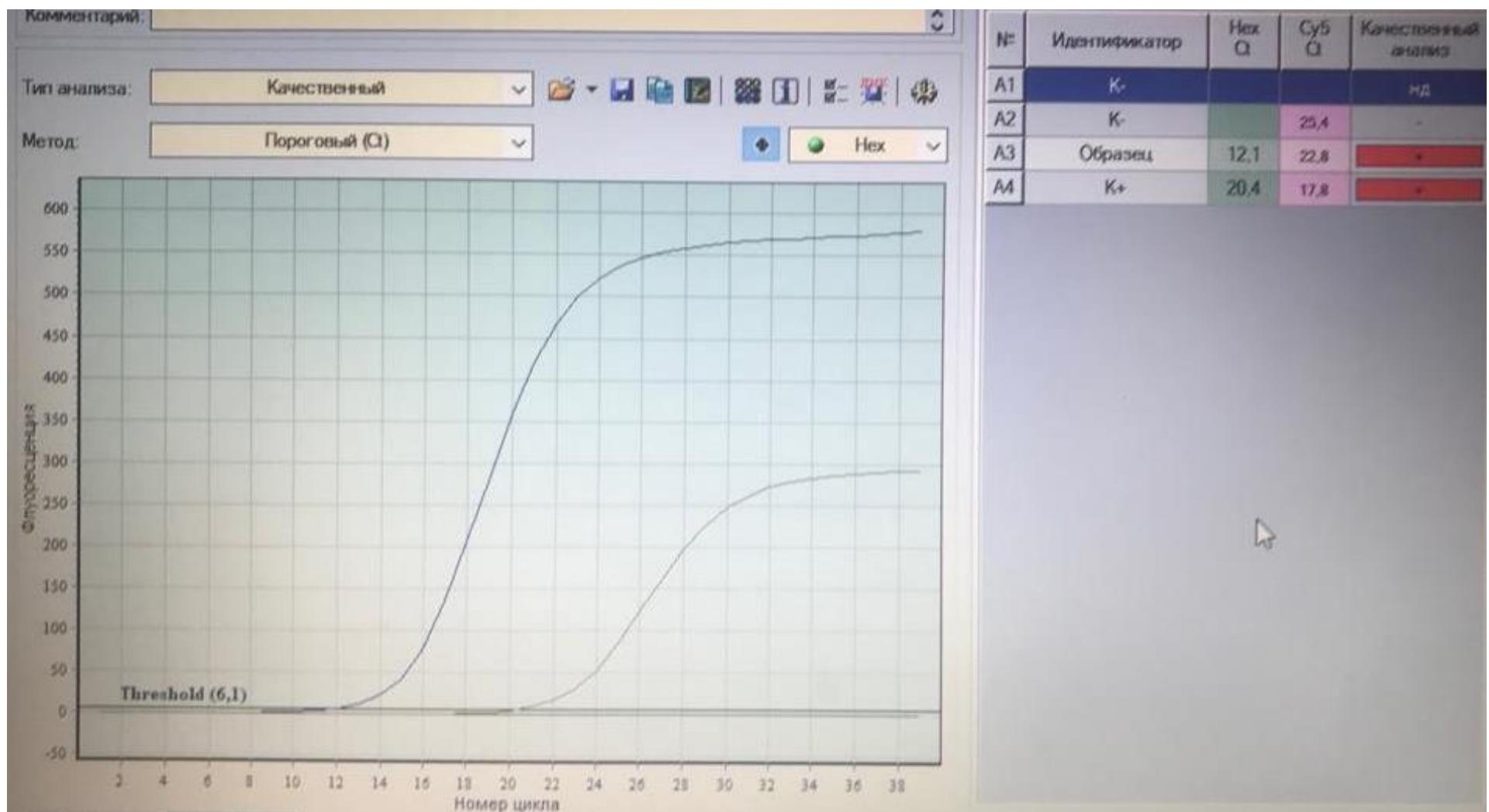


Рисунок 13-График амплификации по флуоресфору HEX вакцинного штамма ПТК 45/86 вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота.

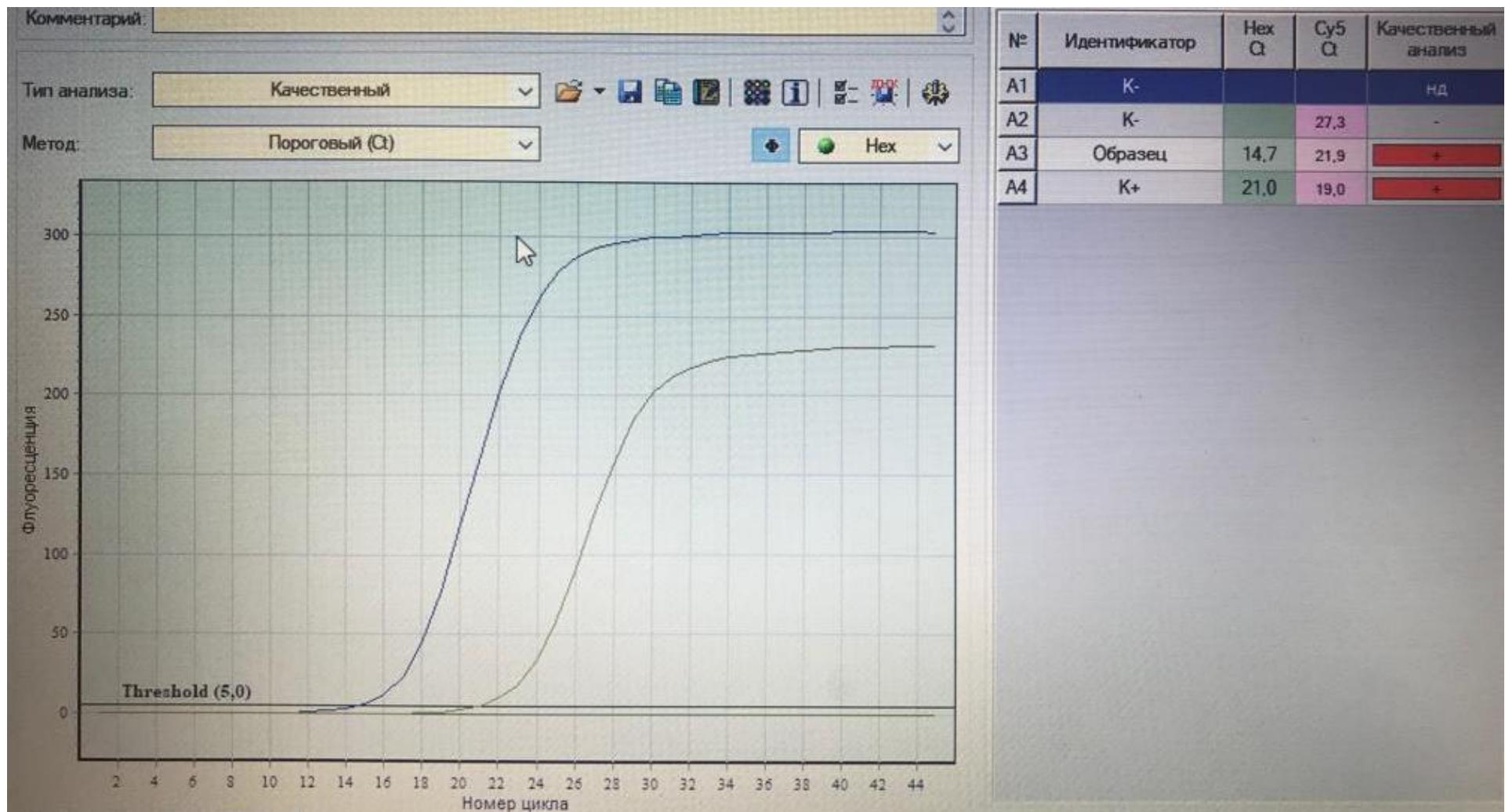


Рисунок 14-График амплификации по флуоресфору НЕХ референтного штамма SF-4вируса парагриппа-3 крупногорогатого скота.

На рисунках показаны графики накопления флуоресценции при постановке ПЦР-РВ со штаммами вируса ПГ-3. Сигналы флуоресценции исследуемых образцов во всех трёх случаях появляются значительно раньше, чем в положительных контролях, что указывает на изначально более высокую концентрацию вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота в пробах. В соответствии с вышеизложенным, испытуемый изолят и контролируемые штаммы, показали присутствие вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота в пробах.

Расшифровка графиков с указанием номеров циклов, начала сигнала флуоресценции представлена в таблице 7.

Таблица 7-Анализ по номеру цикла по видам штамма

№ п/п	Штамм	Идентификатор	СТ	Качественный анализ
1	Вирусный изолят «ЛД-9»	K-	-	-
		Образец	13,0	+
		K ⁺	23,1	+
2	Вакциновый штамм «ПТК 45/86»	K-	-	-
		Образец	12,1	+
		K ⁺	20,4	+
3	Референтный штамм «SF-4»	K-	-	-
		Образец	14,7	+
		K ⁺	21,0	+

Примечание: K⁻ - отрицательный контроль; K⁺ - положительный контроль; СТ - номер цикла.

Результаты исследований показали, что значения СТ контрольных образцов находятся в пределах нормы (СТ<31), значит наблюдается экспоненциальный рост сигнала по НЕХ, образец считается положительным, РНК вирус парагриппа-3 крупного рогатого скота присутствует.

Методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) известных штаммов (референтный SF-4, вакцинныи ПТК-45/86 и вирусный изолят ЛД-9) вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота оказались положительными. РНК вируса ПГ-3 крупного рогатого скота присутствует во всех образцах. При отрицательных контролях амплификации активности не зарегистрировано. Это говорит о высокой достоверности метода ПЦР-РВ при диагностике ПГ-3 крупного рогатого скота.

Таким образом, следует заключить, что полимеразная цепная реакция в реальном времени, основанная на обнаружении генетического материала возбудителя, является надежным, точным и быстрым методом диагностики парагриппа-3 и при этом не требует выделения и культивирования самого вируса.

В дальнейшем все образцы (ЛД-9, ПТК-45/86 и SF-4) подверглись полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией. В качестве мишени амплификации использовали участок *M* гена вируса ПГ-3 крупного рогатого скота размером 328 п.н. В результате из всех трех образцов были получены специфичные продукты амплификации.

Специфический фрагмент для матричного гена (matrixgene) размером 328 bp визуализирован с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле (рис.15).

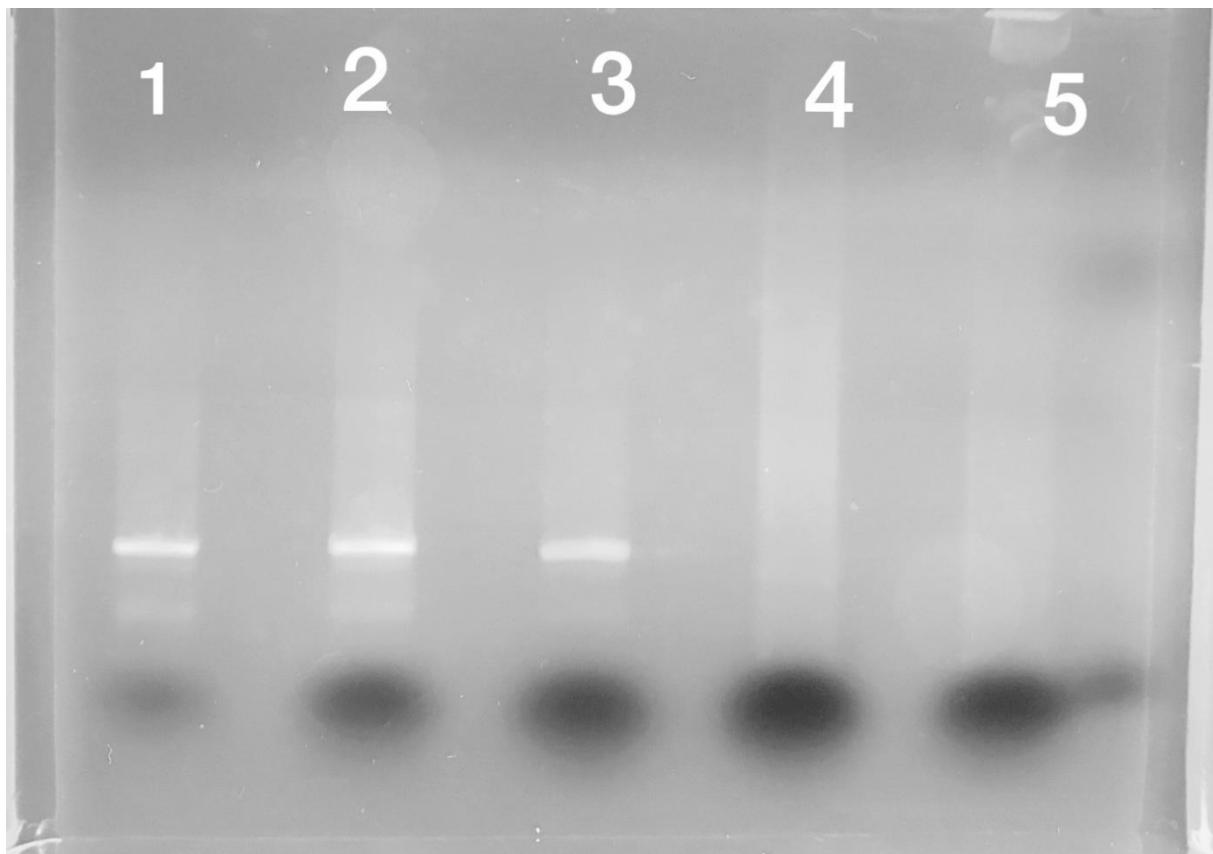


Рисунок 15- Электрофорез продуктов амплификации ПЦР.

1,2,3 - положительный результат амплификации соответствующего участка *M* гена штаммов SF-4, ПТК-45/86 и ЛД-9 вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота.

4,5 - отрицательный результат амплификации соответствующего участка *M* гена.

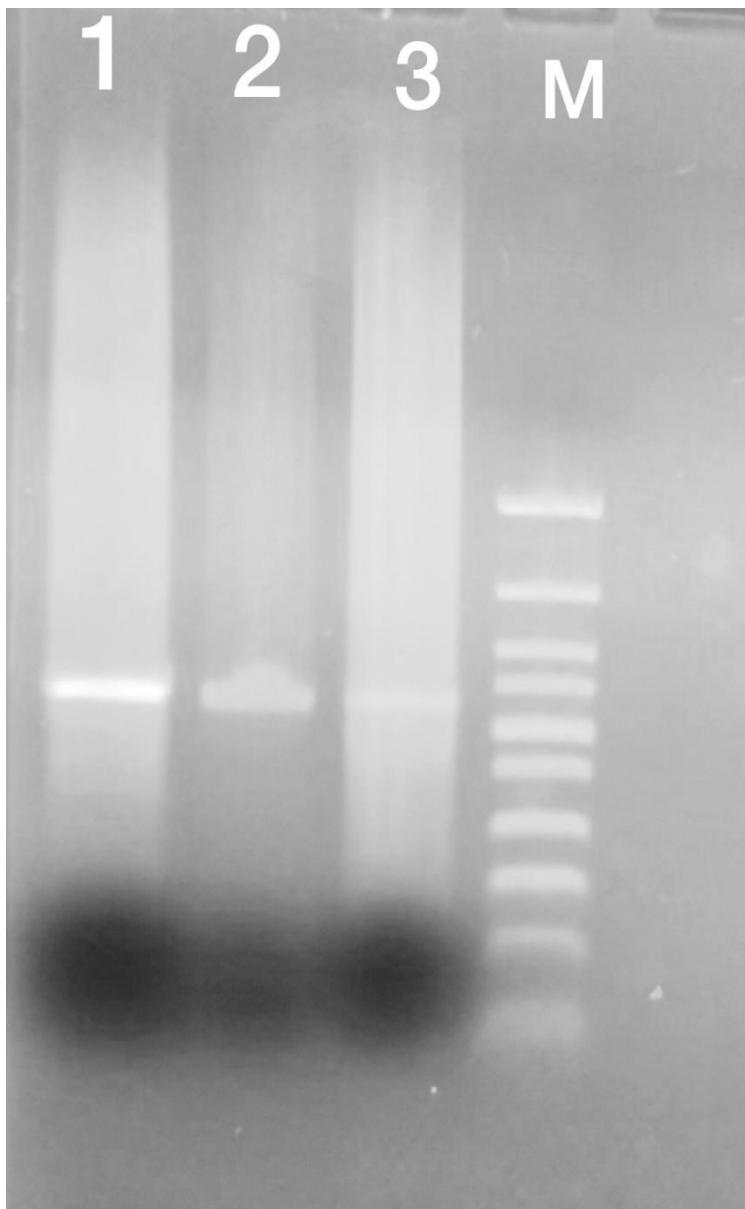


Рисунок 16- Электрофорез продуктов амплификации.

М - маркер молекулярных масс.

1.2.3 - положительный результат амплификации соответствующего участка *M* гена штаммов SF-4, ПТК-45/86 и ЛД-9 вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота.

2.2.8 Секвенирование и филогенетический анализ изолята ЛД-9

Секвенирование используется, когда последовательность эталонного генома уже известна, а затем используется для выяснения геномных вариаций изучаемого образца по сравнению с эталонными штаммами. Эти подходы, безусловно, являются одними из наиболее широко применяемых на сегодняшний день в

ветеринарной практике. Секвенирование позволяет отслеживать генетические мутации и болезни, точно описывать индуцированные геномные модификации, секвенирование также может быть использовано для характеристики различных штаммов патогенных агентов, в случае эпизоотологических исследований, что позволит сэкономить время за счет использования традиционных методов.

Секвенирование генома состоит в определении нуклеотидной последовательности ДНК, присутствующей в каждой клетке данного организма. В наших исследованиях мы использовали метод Сэнгера (Sanger), основанный на использовании дидеоксинуклеотидов (dideoxynucleotides) для секвенирования ДНК ферментативным синтезом по технологии BigDyeTerminator (BDT) с использованием резонансной системы передачи энергии между двумя флуорохромами, зафиксированными на одном и том же ddNTP и соединенными между собой связующим звеном. Результаты секвенирования были проанализированы с помощью системы UGENE.

MegAlign PRO используется для выравнивания нуклеотидных последовательностей и построения филогенетического дерева, 17 референтных штаммов, полученных из GenBank, были выровнены с изолятом ЛД-9. Геном изолята ЛД-9 зарезервирован в GenBank под номером MW524841, что показано на рисунке 19.

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности фрагмента *M* гена изолята ЛД-9 и вакцинного штамма ПТК-45/86 представлены на рисунках 17 и 18. Выравнивание нуклеотидных последовательностей участка *M* гена изолята ЛД-9 и вакцинного штамма ПТК-45/86 с другими последовательностями, представителями в базе данных GenBank, показало 100% идентичность данных участков вакцинного и референтного штамма SF-4.

Изолят ЛД-9 имеет некоторые отличия от референтного штамма в последовательности исследуемого фрагмента *M* гена (98% идентичности).

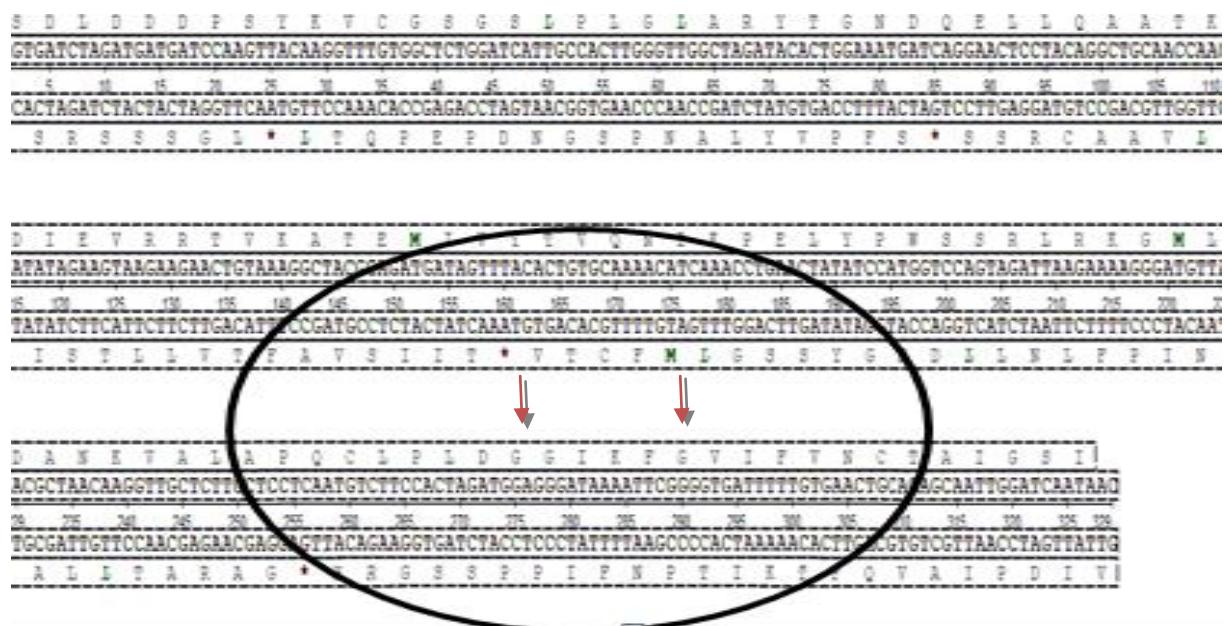


Рисунок 17- Нуклеотидная и аминокислотная последовательности участка М генома изолята ЛД-9 (MW24841)вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота.

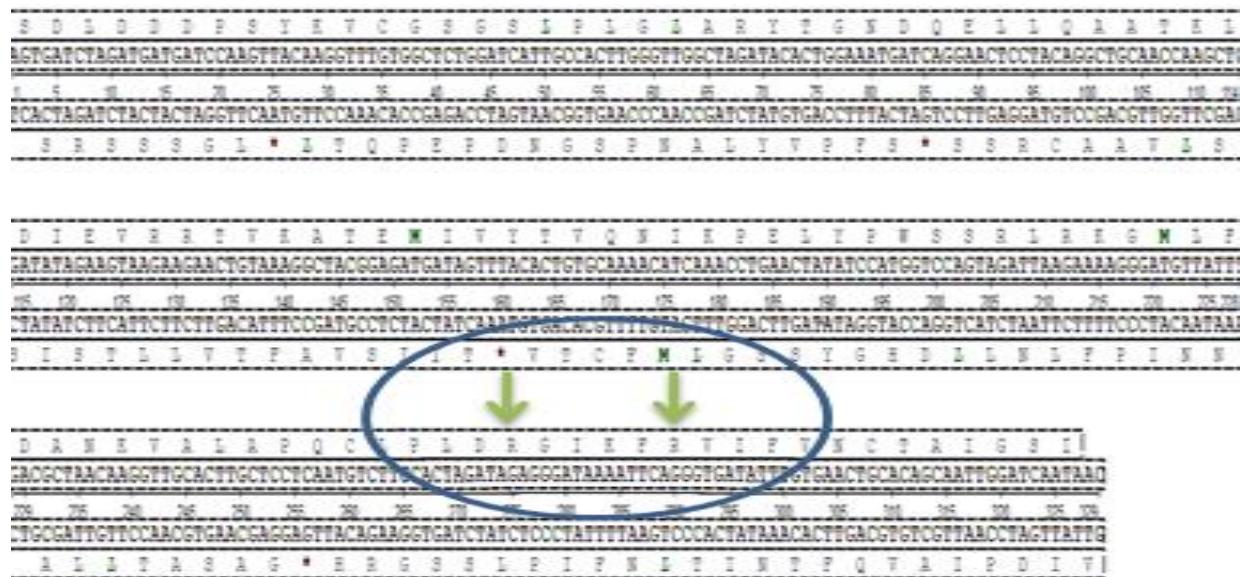


Рисунок 18-Нуклеотидная и аминокислотная последовательности фрагмента *M* генавакциинного штамма ПТК-45/86 вируса парагриппа-3.

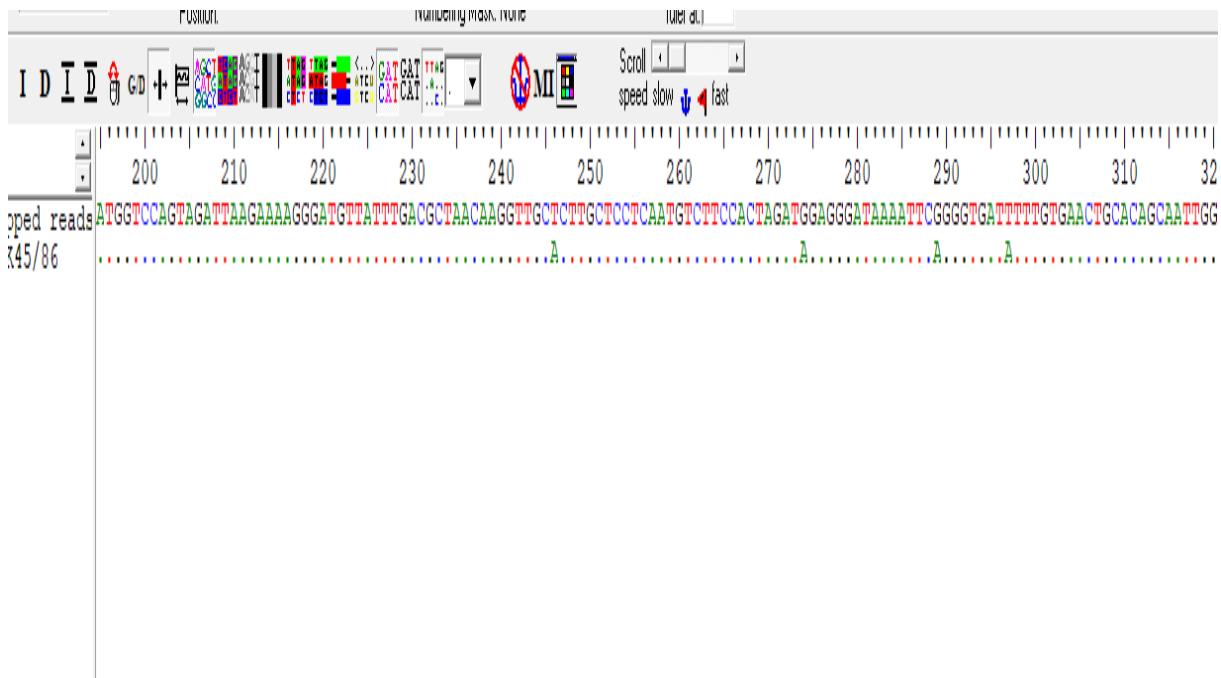


Рисунок 19-Выравнивание нуклеотидных последовательностей участка *M* гена вирусного изолята ЛД-9 (MW524841) и вакцинного штамма ПТК-45/86.

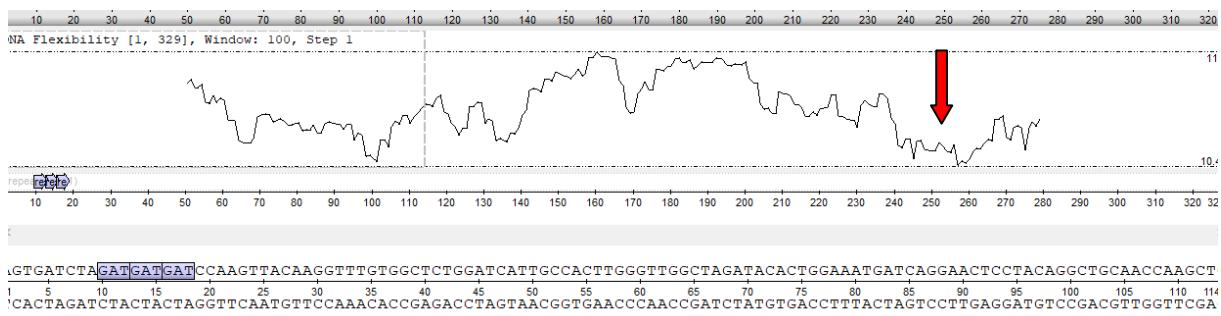


Рисунок 20- Хроматография участка *M* гена вирусного изолята ЛД-9(MW24841).

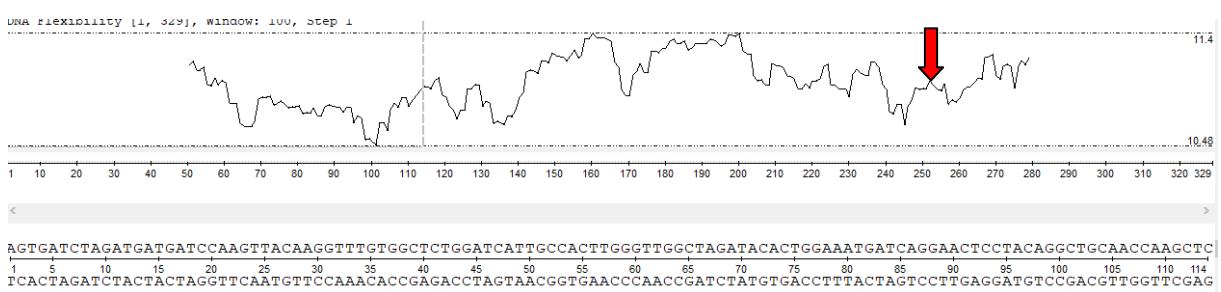


Рисунок 21-Хроматография участка *M* гена вакцинного штамма ПТК-45/86.

На рисунках 20 и 21 стрелкой показано место мутации изолята ЛД-9 по отношению к вакцинному штамму ПТК-45/86 крупного рогатого скота и изолята ЛД-9 и вакцинного штамма ПТК-45/86 к эталонному штамму SF-4.

В таблице 8 представлен сравнительный анализ последовательностей участка *M* гена представителей вируса ПГ-3 депонированных в GenBank, с исследуемыми штаммами (изолят ЛД-9 и вакцинный штамм ПТК-45/86) по результатам выравнивания.

Таблица 8- Сравнительный анализ идентичности в нуклеотидных последовательностях области 328-бр М гена изолят ЛД-9 некоторых штаммов вируса ПГ-3 крупного рогатого скота.

	штамм	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
A	ЛД-9		98,3	86,4	85,53	92,98	90,79	81,14	86,4	85,96	86,84	91,67	89,91	91,67	97,37	85,09	98,25	97,37	85,96	98,25
B	AF178655.1	0,02		87,72	87,28	94,3	92,54	81,58	87,72	87,28	88,16	93,42	91,67	93,42	99,12	86,84	100	99,12	87,28	100
C	HQ530153.1	0,14	0,12		88,6	85,09	88,16	81,14	100	97,81	96,93	88,16	86,4	88,16	86,84	86,4	87,72	86,84	96,93	87,72
D	EF108222.1	0,14	0,13	0,11		85,53	84,65	81,58	88,6	87,28	86,4	84,65	83,77	84,65	86,4	90,79	87,28	87,28	86,4	87,28
E	JQ063064.1	0,07	0,06	0,15	0,14		89,91	81,14	85,09	85,09	85,09	89,91	88,16	89,91	93,42	85,96	94,3	93,42	84,21	94,3
F	EF108221.1	0,09	0,07	0,12	0,15	0,1		82,46	88,16	89,47	89,47	99,12	97,37	99,12	93,42	88,16	92,54	91,67	88,6	92,54
G	AB012132*.1	0,19	0,18	0,19	0,18	0,19	0,18		81,14	82,02	82,89	83,33	82,46	83,33	81,58	81,58	81,58	80,7	83,33	81,58
H	KT071671.1	0,14	0,12	0	0,11	0,15	0,12	0,19		97,81	96,93	88,16	86,4	88,16	86,84	86,4	87,72	86,84	96,93	87,72
I	KJ647287.1	0,14	0,13	0,02	0,13	0,15	0,11	0,18	0,02		98,25	89,47	87,72	89,47	87,28	85,96	87,28	86,4	98,25	87,28
J	LC000638.1	0,13	0,12	0,03	0,14	0,15	0,11	0,17	0,03	0,02		90,35	88,6	90,35	88,16	85,53	88,16	87,28	99,12	88,16
K	AB770484.1	0,08	0,07	0,12	0,15	0,1	0,01	0,17	0,12	0,11	0,1		98,25	100	94,3	88,16	93,42	92,54	89,47	93,42
L	EU439428.2	0,1	0,08	0,14	0,16	0,12	0,03	0,18	0,14	0,12	0,11	0,02		98,25	92,54	87,28	91,67	90,79	87,72	91,67
M	D84095.1	0,08	0,07	0,12	0,15	0,1	0,01	0,17	0,12	0,11	0,1	0	0,02		94,3	88,16	93,42	92,54	89,47	93,42
N	AF178654.1	0,03	0,01	0,13	0,14	0,07	0,07	0,18	0,13	0,13	0,12	0,06	0,07	0,06		87,28	99,12	98,25	87,28	99,12
O	KJ647284.1	0,15	0,13	0,14	0,09	0,14	0,12	0,18	0,14	0,14	0,14	0,12	0,13	0,12	0,13		86,84	85,96	85,09	86,84
P	EU439429.2	0,02	0	0,12	0,13	0,06	0,07	0,18	0,12	0,13	0,12	0,07	0,08	0,07	0,01	0,13		99,12	87,28	100
Q	MG976794.1	0,03	0,01	0,13	0,13	0,07	0,08	0,19	0,13	0,14	0,13	0,07	0,09	0,07	0,02	0,14	0,01		86,4	99,12
R	JX969001.1	0,14	0,13	0,03	0,14	0,16	0,11	0,17	0,03	0,02	0,01	0,11	0,12	0,11	0,13	0,15	0,13	0,14		87,28
S	PTK45/86	0,02	0	0,12	0,13	0,06	0,07	0,18	0,12	0,13	0,12	0,07	0,08	0,07	0,01	0,13	0	0,01	0,13	

1.AB012132*: вируспарагриппчеловека (humainparainfluenza)

2.EU439428**, EU439429**: вируспарагриппасвиней (swineparainfluenzavirus).

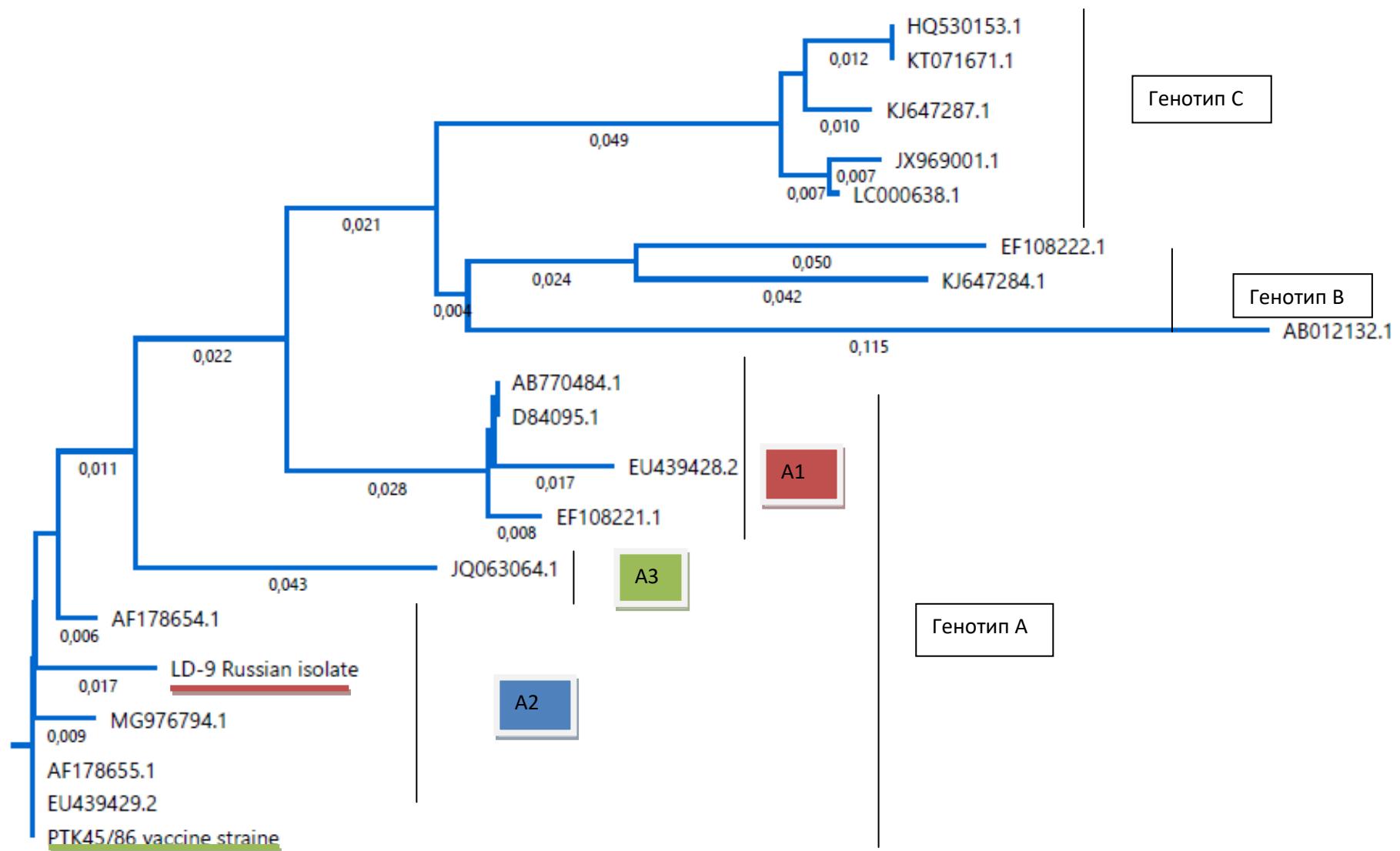


Рис 22- Филогенетический анализ на основе фрагмента *M* гена.

Нуклеотидные последовательности в области кодирования *M* гена парагриппа-3 крупного рогатого скота штамма ЛД-9 (таблица 8) имело 98,25% идентичности с SF (AF178655) и РТК-45/86, 97,37% - с американским штаммом Kensas (AF178654) и LE017-1(MG976794) из Уругвая.

Идентичность *M* гена составила 90.79 - 91.67% между нашим изолятом и BPIV-3-A1субгенотип, включая BN-1, 910N и JCU, когда китайский штамм NM09 (JQ063064) обладал 92.98% симметрией, 85.09-85.53% - генотипом *B* (EF108222, KJ647284) и 84.4-86,84% для генотипа *C*, включая референтный штамм SD0835 (HQ530153) из Китая, NX9 (KT07671), американский штамм TVMDL (KJ647287), штамм из Южной Кореи 12Q61 (JX969001) и японский штамм HS9 (LC000638). Изолят ЛД-9 вируса парагриппа крупного рогатого скота на 89,71% аналогичен с штаммом ISU (EU439428), 98,25% для Texas-81 штамма (EU439429), где они сгруппированы с нашим изолятом и вакцинным штамм в одном подгенотипе.

Авторы Dan Qiao, Bruce H. Janke, Subbiah Elankumaran в 2009 году установили, что штаммы Tx81 и ISU 92, выделенные от свиней являются вариантами ПГ-3, которые передаются свиньям от крупного рогатого скота. Они доказали, что эти штаммы обладают низкой патогенностью для крупного рогатого скота на основе аминокислоты Tx81, которая считалась доминирующей в передаче вируса от крупного рогатого скота к свиньям. Однако в дальнейшем было установлено, что штамм ISU рассматривался как подвид и приспособился к свиньям. Самое низкое сходство по нуклеотидной последовательности наблюдалось у вируса парагриппа человека (AB012132) - 81.14%.

Филогенетический анализ проводили с использованием программного обеспечения MegAlign PRO, основываясь на фрагментах нуклеотидных последовательностей *M* гена по сравнению с другими референтными штаммами, полученными из GenBank.

В результате было установлено, что оба наших исследуемых штамма (ЛД-9 и РТК-45/86) относятся к генотипу *A*, как и референтный штамм SF-4.

Генотип *A* вируса ПГ-3 может быть далее разделен на субгенотипы в зависимости от степени дивергенции, которая указана на филогенетическом дереве (рис.22): субгенотип *A1* представлен штаммами ISU-92 (EU439428), BN-1 (AB770484), JCU(EF108221) и 910N (D84095), субгенотип *A2* включил в себя русский изолят ЛД-9 и вакцинный штамм PTK45/86, LEO17(MG976794), Texas-81 (EU439429), Kensas (AF178654) и SF-4 (AF178655), в то время как китайский штамм NM09 (JQ063064) формирует третий субгенотип -*A3*. Софи, N. M. (2017) указывает, что египетский штамм (KP757872) также относится к этой группе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вирус парагриппа-3 крупного рогатого скота является одним из основных агентов респираторных болезней крупного рогатого скота, который вызывает спорадические вспышки в разных регионах страны и продолжает наносить серьезный экономический ущерб животноводству.

Несмотря на то, что вирус ПГ-3 в России был выделен еще в 1968 году, данные о генотипическом разнообразии возбудителя, циркулирующего на территории страны отсутствуют.

Идентификацию вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота в Республике Татарстан до настоящего времени проводили только вирусологическими и серологическими методами исследований. Молекулярно-генетическая характеристика вируса ПГ-3 в Республике Татарстан не проводилась.

Использованный в исследованиях кодирующий матричный белок *M* ген играет важную роль в сборке вириона, установлении персистирующей инфекции и вирусного патогенеза. Поэтому он считается подходящей мишенью для осуществления молекулярно-генетических исследований на его основе.

К сожалению, в международных базе данных GenBank до настоящего времени не было зарегистрировано ни одной нуклеотидной последовательности вируса ПГ-3 из России. Известно, что в Америке распространен генотип *A*, в Австралии генотип *B*, а генотип *C*, встречается в основном в Азии. Ранее было не известно какой генотип циркулирует в России, вызывая вспышки заболеваний среди животных.

Применяемые вакцины в России против вируса бычьего парагриппа-3 были разработаны на основе референтного штамма принадлежащего к генотипу *A* вируса ПГ-3. Перекрестная защита таких вакцин от парагриппа-3 вызванного генотипами *B* и *C*, остается неясной.

Генетическая характеристика циркулирующих штаммов может способствовать разработке более эффективных методов диагностики, а также профилактики болезни.

В связи с вышеизложенным, перед нами была поставлена задача провести генетический анализ изолятов парагриппа-3 крупного рогатого скота, циркулирующих на территории Республики Татарстан.

На первом этапе экспериментальных исследований мы изучали клинико-эпизоотическую обстановку опытного хозяйства по респираторным болезням молодняка.

У телят при клиническом обследовании наблюдали развивающую лихорадку примерно через 2 дня после заражения, которая начиналась с подъема температуры от $40,9^0$ до $41,4^0\text{C}$ и продолжалась до 7-10 дней. При этом отмечали кашель, отсутствие аппетита, выделения из носа и глаз с гиперемией носового зеркальца, что указывало на ринит.

Установленные патоморфологические изменения в легких телят в виде хронической межуточной бронхопневмонии, сопровождаемой компенсаторной хронической альвеолярной эмфиземой, образованием из эпителия альвеол многоядерных симпластов и многоклеточных синцитиев, а также смешанных цитопатических форм респираторного эпителия - симпластов-синцитий являются характерными цитологическими признаками проявления хронической парагриппозной инфекции. Обнаружение локальных утолщений стенок бронхов вследствие пролиферации многорядного эпителия и инфильтрации его подслизистой основы лимфоидными клетками сужением профилей просвета, также подтверждает парагриппозную этиологию возникших изменений в легких. Отмеченные проявления бронхопневмонии проявлялись с максимальной выраженностью в наиболее вентилируемых сердечных и особенно диафрагмальных долях легких больных телят.

Хронический воспалительный процесс в легких при парагриппе осложнялся фибринозным плевритом, а также пери- и эндокардитами,

миокардиодистрофией с нарушением структуры кардиомиоцитов и атипичных клеток сердца.

В легочных лимфатических узлах больных парагриппом телят отмечали умеренно выраженную гиперплазию клеток лимфоидной ткани с наличием вторичных лимфатических узелков, отдельные из которых имели выраженную структуру темной клеточной периферии и широкую насыщенную клетками герминативную зону.

У телят второй группы с острым течением катарально-гнойной бронхопневмонии обнаружить вышеуказанные цитопатические изменения в воздухоносных путях и респираторном отделе легких не удалось. Патологические изменения в легких носили преимущественно экссудативный характер в виде серозного альвеолита, местами катарально-гнойной бронхопневмонии с преимущественным поражением передних и сердечных долей органа. Непродолжительное течение болезни сопровождалось слабым уровнем пролиферации клеток лимфоидной ткани в легочных лимфатических узлах.

С установлением клинических признаков у телят приступили к серодиагностике по выявлению титра антител в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (ИФА). В ИФА были выявлены антитела против вирусов парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита, адено-вирусной инфекции, респираторно-синцитиальной инфекции и вирусной диареи. При этом зарегистрирован большой процент случаев парагриппа-3 в 68 пробах из 71, что составило 25% от общего поголовья исследованных животных.

С целью выделения этиологического агента в суспензиях патологического материала, взятых от больных телят и вынужденно убитых животных, инфицировали культуру клеток ПЭК. На втором пассаже был изолирован цитопатогенный агент (ЛД-9), который вызывал дегенеративные изменения в монослое культуре клеток в течение 98-124 часа. ЦПД изолята на монослое культуры клеток характеризовалось образованием синцития и вакуолей. В

последующих пассажах срок наступления цитопатического эффекта сократился до 72 часов.

Дальнейшую идентификацию изолята осуществляли физико-химическими методами в сравнении с вакцинным и референтным штаммами вируса парагриппа-3. Так, при определении резистентности вирусов к эфиру и хлороформу, наблюдали инактивацию и снижение термостабильности в течение 25 – 30 минут.

На втором этапе наших исследований провели флуоресцентное детектирование изучаемых вирусов методом ПЦР в реальном времени. Результаты кривых накоплений флуоресцентного сигнала анализировали с помощью программного обеспечения в соответствии с инструкцией к прибору.

Учет результатов ПЦР-РВ проводили по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линии. Флуоресцентное детектирование ПЦР в реальном времени показало присутствие вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота. При этом ПЦР в реальном времени позволила определить начальное количество целевой РНК, присутствующих в образцах.

Исходя из вышеизложенного, следует заключить, что полимеразная цепная реакция в реальном времени, основанная на обнаружении генетического материала возбудителя, является надежным, точным и быстрым методом диагностики парагриппа-3 и при этом не требует выделения и культивирования самого вируса.

На заключительном этапе наших исследований провели характеристику генома исследуемых штаммов по участку М гена путем секвенирования. С этой целью, для получения фрагмента М гена вируса размером 328 п.н., была проведена ПЦР со специфическими праймерами. Полученные ампликоны подверглись расшифровке нуклеотидных последовательностей. Секвенирование позволяет отследить генетические мутации возбудителя, точно описать индуцированные геномные модификации.

Секвенирование генома состоит в определении нуклеотидной последовательности ДНК, присутствующей в микроорганизме. В наших исследованиях мы использовали метод Сэнгера (Sanger), основанный на использовании дидеоксинуклеотидов (dideoxynucleotides) для секвенирования ДНК ферментативным синтезом по технологии BigDyeTerminator (BDT) с использованием резонансной системы передачи энергии между двумя флуорохромами, зафиксированными на одном и том же ddNTP и соединенными между собой связующим звеном.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей показал, что российский изолят ЛД-9 и вакциновый штамм ПТК-45/86 принадлежат генотипу *A*, так же, как и референтный штамм SF-4. Вакциновый штамм ПТК-45/86 в свою очередь входит в состав живой вакцины «Тривак» для профилактики инфекционного ринотрахеита, парагрипп-3, вирусной диареи крупного рогатого скота. В тоже время эти последовательности демонстрируют мутацию штамма ЛД-9 в части *M* гена, но для полной уверенности в этом необходимо провести более глубокие исследования с полным геномом вируса ПГ-3.

Выделенный изолят по генотипу близок к американскому и уругвайскому штаммам, а по географической принадлежности он должен относиться к европейскому штамму, однако этого мы не наблюдаем.

Последовательность участка *M* гена изолята ЛД-9 зарегистрирована в GenBank под номером MW524841.

Полученные данные позволяют сформулировать следующие выводы:

1. В животноводческих фермах Республики Татарстан циркулируют вирусы респираторных болезней парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита, адено-вирусной инфекции, респираторно-синцитиальной инфекции и вирусной диареи. При этом доля вируса ПГ-3 в общей этиологии респираторных болезней крупного рогатого скота составляет 25%.

2. Изолят ЛД-9 вируса парагриппа-3 способен вызывать дегенеративные изменения в монослое культур клеток в течение 98-124 часов, а также вступать в специфическую реакцию в титре антител 1:32 в РН и 1:4 в РДП.
3. Полимеразная цепная реакция является подходящим методом экспресс индикации и идентификации вируса ПГ-3, не требующим выделения и культивирования самого вируса.
4. Нуклеотидная последовательность участка *M* гена вирусного изолята ЛД-9, показала высокую степень гомологичности с последовательностями американского и уругвайского штаммов,
5. Изолят ЛД-9 (MW524841) и вакцинный штамм ПТК-45/86 вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота принадлежат одному и тому же генотипу *A*, и находятся в том же кластере, что и эталонный штамм SF-4.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Результаты экспериментальных исследований вошли во временные правила по генотипированию вируса ПГ-3, утвержденные научно-техническим советом ФГБОУ ВО «Казанская ГАВМ».
2. Нуклеотидная последовательность участка *M* гена изолята ЛД-9 вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота зарегистрирована в GenBank под номером MW524841.
3. Внедрить методы генотипирования в ветеринарную практику для идентификации выделенных изолятов вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота.
4. Научные положения, выводы диссертационной работы предлагаются к использованию в учебном процессе высших учебных заведений биологического и ветеринарного профиля, а также при написании учебников и учебных пособий.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Таблицы:

1. Температурно-временной режим амплификации на ДТ-96.
2. Область и размеры ампликона.
3. Характеристика штаммов ПГ-3 крупного рогатого скота полученных из GenBank для филогенетического анализа.
4. Титры антител сыворотки крова телят к вирусу парагриппа-3 крупного рогатого скота.
5. Идентификация вирусного изулята ЛД-9 серологическими методами.
6. Биологические и физико-химические свойства штаммов вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота.
7. Анализ по номеру цикла по видам штамма.
8. Сравнительный анализ идентичности в нуклеотидных последовательностях области 328 bpМгена изолята ЛД-9 и контрольных штаммов парагриппа-3 крупного рогатого скота.

Рисунки:

1. Схема основных этапов исследования.
2. Поражение легких с участками уплотнения.
3. Гиперемия слизистой оболочки трахеи.
4. Интерстициальная пневмонии. Хроническая альвеолярная эмфизема. Окраска гематоксилином и эозином. X 140
5. Локальные утолщения многорядного эпителия бронхов. Окраска гематоксилином и эозином. X 480.
6. Образование симпластов в альвеолах. Окраска гематоксилином и эозином. X 1000.
7. Образование синцитий и симпластов в альвеолах. Окраска гематоксилином и эозином. X 1000.
8. Отек миокарда. Дистрофия, атрофия кардиомиоцитов и атипичных клеток. Окраска гематоксилином и эозином. X 480

9. Гнойный экссудат в просвете бронхиолы. Окраска гематоксилином и эозином. X 480.
10. Иммуноферментный анализ проб сыворотки крови телят
11. График амплификации по флуорофору НЕХ вирусного изолята ЛД-9 вириуса парагриппа-3 крупного рогатого скота.
12. График амплификации по флуорофору НЕХ вакцинного штамма ПТК45/86 вириуса парагриппа-3 крупного рогатого скота.
13. График амплификации по флуорофору НЕХ референтного штаммаSF-4 вириуса парагриппа-3 крупного рогатого скота.
14. Цитопатический эффект изолята ЛД-9 и контрольных штаммов парагриппа-3 крупного рогатого скота в клетках MDBK.
15. Электрофорез продуктов амплификации М гена в ПЦР.
16. Электрофорез продуктов амплификации М гена в ПЦР.
17. Нуклеотидные последовательности М генавириусного изолята ЛД-9(MW24841) парагриппа-3 крупного рогатого скота,
18. Нуклеотидные последовательности М гена вакцинного штамма ПТК-45/86 вириуса парагриппа-3 крупного рогатого скота.
19. Нуклеотидные последовательности М гена вириусного изолята ЛД-9(MW524841) и вакцинного штамма ПТК-45/86парагриппа-3 крупного рогатого скота.
20. Хроматография ДНК М гена вириусного изолята ЛД-9(MW24841).
21. Хроматография ДНК М гена вакцинного штамма ПТК-45/86.
22. Филогенетический анализ на основе фрагмента М гена.

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АПК- агропромышленный комплекс.

АТ- антитела.

БДУ-5- бромдезоксиуридин-5.

ВД- вирус диареи.

ДНК-дезоксирибонуклеиновая кислота.

ИФА - иммуноферментный анализ.

КРС- крупный рогатый скот.

ЛЭК- легкие эмбриона коровы.

ПГ-3- парагриппа-3.

ПЦР- полимеразная цепная реакция.

ПЦР-РВ- полимеразная цепная реакция в реальном времени.

ПЭК- почки эмбрионы крови.

РГА- реакция гемагглютинации.

РДП- реакция диффузионной преципитации.

РН- реакция нейтрализации.

РНГА- реакция непрямой гемагглютинации.

РНК-рибонуклеиновая кислота .

РСВ-респираторно-синцитиальный вирус.

ИРТ- инфекционный ринотрахеит.

РТГА- реакции торможения гемагглютинации.

ЦПЭ-цитопатический эффект.

ЭМС-эритроциты морской свинки.

BCV- bovincoronavirus.

BPIV-3- bovinparainfluenzavirus 3.

BPIV-3a –bovineparainfluenzavirus type -3 genotypeA.

BPIV-3b –bovineparainfluenzavirus type-3 genotypeB

BPIV-3c –bovineparainfluenzavirustype-3 genotype C.

BRSV- bovinerespiratorysyncytialvirus.

BVDV-bovineviraldiarrheavirus.

DNTP-désoxyribonucléosidetriphosphate.

MDBK-madin-darbybovinekidney.

NGS-next-generation sequencing.

RT-PCR-real-time polymerase chain reaction.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аликаев, В.А. Болезни дыхательной системы /В.А. Аликаев, И.Г. Шарабрин, Л.Г. Замарин и др. // Внутренние незаразные болезни с.-х животных. М. 1986. С. 441-447.
2. Алимов, А.М. Индикация и дифференциация возбудителей респираторных вирусных инфекций крупного рогатого скота мультиплексной ПЦР /А.М.Алимов // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны», г. Санкт-Петербург, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины. 2020г. С.214-215.
3. Барышников, П.И. Ветеринарная вирусология. Учебное пособие /П.И. Барышников // Барнаул. Изд-во АГАУ . 2006. С. 113.
4. Белов, Л.Г. Современные принципы доказательной диагностики инфекционных болезней в ветеринарии/ Л.Г. Белов // Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных. –г. Ульяновск. 2006. С.31-37.
5. Бессарабов, Б.Ф. Инфекционные болезни животных/Б.Ф. Бессарабов, А.А. Ващутин, Е.С. Воронин и др.; под.ред. А.А. Сидорчука.-М: Колос, 2007. С. 671.
6. Букринская, А.Г., Зайдес В.М. Молекулярная биология парамиксовирусов, М., 1978, библиогр.; Лабораторная диагностика вирусных и риккетсиозных заболеваний, под ред. Э. Леннета и И. Шмидта, пер. с англ. 1974. С. 349.
7. Бурнадзе, Т.П. Острые респираторные вирусные инфекции крупного рогатого скота в хозяйствах Республики Коми и усовершенствование системы противоэпизоотических мероприятий / Т.П. Бурнадзе. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук // Екатеринбург. 2007. С. 24.

8. Вечеров, А.Е. Использование молекулярно-биологических методов для дифференциации вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота / А.Е. Вечеров, П.К.Аянов, А.М.Тютина и др.// Ветеринарная патология. 2005. С. 8-41.
9. Власова, Н.Н. Перспективы создания диагностических наборов нового поколения на основе генно-инженерных технологий. Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных/ Н.Н. Власова, О.Н. Жигалева, О.В. Капустина, Б.В. Новиков, С.Ж. Цыбанов. // Ульяновск. 2006. С.39-42.
10. Высокопоясный, А.И. Респираторные болезни телят на Кубани /А.И.Высокопоясный, Н.Ю.Басова, А.Г. Шахов, А.Г.Щипицы // Ветеринария. 2000. №2. С. 8-11.
11. Гаффаров, Х.З. Моно- и смешанные инфекционные диареи новорожденных телят и поросят /Х.З.Гаффаров, А.В.Иванов, Е.А Непоклонов и др.- Казань: Изд-во «Фэн», 2002. С. 592.
- 12.Галиуллин, А.К. Гистологический анализ легких и легочных лимфоузлов у телят респираторной формой болезни /А.К.Галиуллин, И.Н.Залиялов, В.Г.Гумеров, Ашуак, Гериши др./Ученые записки Казанской ГАВМ, - 2021. Т.246(II), С.28-38.
13. Гериш, Ашуак. Изучение биологических и физико-химических свойств изолята вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота/Ашуак, Гериш, В.Г.Гумеров, А.К.Галиуллин и др. // Ученые записки КГАВМ, 2020. Т.241(1), С.66-70.
14. Гериш,Ашуак. ПЦР в реальном времени для диагностики парагриппа-3 крупного рогатого скота / Ашуак, Гериш, А.К. Галиуллин, В.Г. Гумеров, И.Г. Каримуллина // Ученые записки КГАВМ, 2020. Т.241(1). С. 62-66.
15. Гериш,Ашуак. Участие вируса парагриппа-3 в респираторных болезнях молодняка крупного рогатого скота. Международная научно-практическая конференция «Сельское хозяйство и продовольственная безопасность;

- технологии, инновации, рынки, кадры» /Ашуак, Гериш, А.К. Галиуллин, В.Г. Гумеров, И.Г. Каримуллина, А.Ю.Шаева // Самара-Казань,2019. С. 447-454.
16. Глотов, А.Г. Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота (Урал и Сибирь)/А.Г.Глотов, О.Г.Петрова, Т.И.Глотова, А.В.Нефедченко и др./Ветеринария.-2002.-№3.- С.17-21.
17. Глотов, А.Г. Этиология бронхопневмонии крупного рогатого скота на молочных комплексах/А.Г.Глотов, Т.И.Глотова, О.В.Семенова, К.В.Войтова // Ветеринария. 2014. №4. С.7-11.
18. Глотов, А.Г. Вирусные заболевания крупного рогатого скота в Сибири и на Урале // Методические рекомендации. /А.Г.Глотов, О.Р.Петрова, А.Н. Сергеев и др./ Новосибирск. 2001. С. 36.
19. Глотов, А.Г. Инфекционный ринотрахеит у быков производителей / А.Г.Глотов, А.В. Нефедченко //Аграрная Россия. 2001. №3. С. 30 -33.
20. Глотов, А.Г.Вирусные болезни крупного рогатого скота при интенсивном ведении молочного животноводства /А.Г. Глотов, И.Я. Строганова // Красноярск. 2010. С. 188.
21. Глотова, Т.И. Инфекционный ринотрахеит и вирусная диарея крупного рогатого скота (диагностика, молекулярно-биологические свойства возбудителей, эффективность противовирусных препаратов): Автореф. дис. д-ра биол. наук Т.И.Глотова.-Новосибирск,2006.-39 с.
22. Госманов, Р.Г. Ветеринарная вирусология / Учебное пособие // Р.Г.Госманов, Н.М.Колычев. Изд-во «Лань», Санкт-Петербург-2006.
23. Госманов, Р.Г. Ветеринарная вирусология / Учебное пособие. // Р.Г. Госманов, Н. М. Колычев, В. И. Плешакова. Изд-во «Лань», Санкт-Петербург-2018.
24. Гребенникова, Т.В. Молекулярная диагностика инфекционных болезней крупного рогатого скота (туберкулез, сибирская язва, лептоспироз, вирусная диарея,парагрипп, инфекционный ринотрахеит) /Т.Б. Гребенникова // Комплексная программа НПО НАРВАК по диагностике, профилактике и

- лечению инфекционных и инвазионных болезней крупного рогатого скота. Матер. семинара.-Москва. 2018.
25. Респираторные и желудочно-кишечные инфекции крупного рогатого скота. 2005. С. 37-42.
26. Гумеров, В.Г. Сероиммунологический мониторинг крупного рогатого скота /В.Г. Гумеров // Ученые записки КГАВМ. 2019. Т.237(1). С.60-66.
27. Гумеров, В.Г. Эпизоотологический и серологический мониторинг смешанных респираторно-кишечных инфекций крупного рогатого скота/В.Г. Гумеров и др. // Ученые записки КГАВМ.-2019. Т. 237(1). С. 56-60.
28. Гумеров, В.Г. Диагностика и специфическая профилактика респираторных и желудочно-кишечных инфекций крупного рогатого скота, 2016.
29. Дарочева, А.Н. Болезни животных вирусной этиологии / А.Н.Дарочева, Г.М. Фирсов //Учебное пособие. Волгоградский ГАУ, 2016. С. 63-70.
30. Ефанова, Л.И. Противовирусный колостральный иммунитет и респираторные болезни у телят первого месяца жизни /Л.И. Ефанова и др.// Актуальные вопросы ветеринарной биологии. - №3 (19). 2013. С. 30-36. ?
31. Забережный, А.Д. Современные методы лабораторной диагностики инфекционных болезней крупного рогатого скота /А.Д. Забережный // Комплексная программа НПО НАРВАК по диагностике, профилактике и лечению инфекционных и инвазионных болезней крупного рогатого скота. Материалы семинара.-Москва-2005. С.29-36.
32. Задорина, И.И. Антигенная и молекулярно-генетическая оценка стабильности вакционного сибиреязвенного штамма Ланге после длительного хранения. Автореферат диссертации. 2020.-С.29-30.
33. Зоткин, Г.В. Проявление эпизоотического процесса при микст-инфекциях(ИРТ и ПГ-3) крупного рогатого скота/Г.В. Зоткин, З.Я. Косорукова и др. // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. Журнал № 2. 2014. С. 72-74.

34. Иванов, А.В. Этиопатогенез респираторно-генитальных инфекций крупного рогатого скота, проблемы и перспективы их диагностики, профилактики и борьбы с ними / А.В.Иванов, Х.З. Гаффаров // Ж. Ветеринарный врач. 2008. №4.С. 2-7.
35. Имбаби, Т. А. Иммунобиологическая реактивность крупного рогатого скота при специфической профилактике инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 /Т.А. Имбаби, М. Шапан. 2018.
36. Киселев, М.Ю. Оптимизация способов определения противовирусных антител в молозиве и молоке коров /М.Ю.Киселев, В.В.Думова, А.В.Мищенко, В.А.Мищенко, А.А.Нестеров //Ж.Ветеринария и кормление. - 2011. №6. С.24-25.
37. Конопаткин, А.А. Эпизоотология и инфекционные болезни сельскохозяйственных животных / А.А. Конопаткин // Учебник. - 1984. С. 296-297.
38. Костыркин, Ю. А. Эффективность инактивированной вакцины при факторных респираторных болезнях телят /Ю.А. Костыркин, В.А. Мищенко, В.В. Думова, В.В. Лисицын, Т.Б.Никешина, О.В. Кухаркина, А.В. Кононов//Ветеринарнаяпатология. 2005. №3. С 72-75.
39. Красиков, А.П. Комплексная диагностика инфекционных болезней крупного рогатого скота / Красиков А.П., Алексеева И.Г. //Электронный научно-методический журнал Омского ГАУ. - 2015. - №1(1) апрель-июнь.
40. Красиков, А.П. Вирусные болезни крупного рогатого скота / А.П Красиков, В.И. Плешакова, И.Г. Алексеева, Н.А. Лещева. Учебное пособие, Омск, 2017.
41. Красникова, Е.С. РНК-содержащие вирусы, вирусология и биотехнология. Краткий курс лекций для студентов 3 курсапо специальности 36.05.01/Е.С. Красникова //ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ.- Саратов.2016.
42. Красочко, П.А. Современные подходы к конструированию вакцин для профилактики вирусных респираторных и желудочно-кишечных инфекций

- телят, актуальные проблемы биотехнологии в агропромышленном комплексе / П.А. Красочко и др. 2015. С. 37-44.
43. Куриленко, А.Н. Инфекционные болезни молодняка сельскохозяйственных животных /А.Н.Куриленко, В.Л.Крупальник //М., Колос.- 2000. -144 с.
44. Куриленко, А.Н. Бактериальные и вирусные болезни молодняка животных/А.Н Куриленко. В.Л.Крупальных, Н.В Пименов.-М.: Колос С. 2005. С 296.
45. Латыпов, Д.Г. Справочник по патологоанатомической диагностике заразных болезней крупного рогатого скота / Д.Г.Латыпов, О.Т.Муллахаев // Учебное пособие. 2019. С. 230-233.
46. Лартон Р.Р. Инфекция и дифференциация возбудителей респираторных вирусных инфекций крупного рогатого скота мультиплексной ПЦР /Р.Р. Лартон, А.М. Алимов //Мат. Международная научн. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины АПК» г. Санкт-Петербург. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государст, университет вет. мед. 19-20 ноября 2020.
47. Магдеева, Э.А. Биологические свойства инактивированной липосомальной вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота. Автореферат докторской диссертации. 2016.
48. Магдеева, Э.А. Испытание вакцины против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота инактивированной липосомальной в производственных условиях/Э.А. Магдеева, А.К. Галиуллин, В.Г. Гумеров //Материалы международной научной конференции «Современные проблемы ветеринарной и аграрной науки и образования». Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана. 2016. Т.226(2). С. 114-117.
49. Магдеева, Э.А. Клинико-биохимические показатели крови кроликов вакцинированных инактивированной липосомальной вакциной против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота/Э.А.

Магдеева//Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы и перспективы развития ветеринарной медицины, зоотехнии и аквакультуры», 22-24 марта 2016, издательство «Научная книга», г. Саратов. 2016. С.103-106.

50. Магдеева, Э.А. Липосомы – транспортеры вакцины парагриппа-3/Э. А. Магдеева, А.К. Галиуллин, В.Г. Гумеров //Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана.- 2015. Т.222(2).- С. 142-144.
51. Магдеева, Э.А. Липосомы в сочетании с прополисом и ассоциированной вакциной для профилактики парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита и хламидиоза крупного рогатого скота/Э.А.Магдеева, В.Г. Гумеров, А.К. Галиуллин, В.В. Евстифеев//Научная жизнь. 2016.№. С. 138-146.
52. Матвеева, И.Н. Промышленные технологии изготовления компонентов моно- и комплексных диагностикумов инфекционных заболеваний животных/И.Н. Матвеева//Автореф. дис. докт. биол. наук: Щелково,2008.- 53с.
53. Мищенко, В.А. Анализ заболеваемости молодняка крупного рогатого скота молочных пород респираторными инфекциями/В.А. Мищенко, В.В. Думова и др.///Ветеринария Кубани. 2008. №6.С.2.
54. Мищенко, В.А. Полевая эффективность противовирусных вакцин для крупного рогатого скота /В.А.Мищенко, Д.К.Павлов, А.В.Кононов и др./// Ж. Ветеринарная патология. 2007. №2(21). С. 235-238.
55. Искандарова, Н.И. Выделение и характеристика парагриппа типа 3 у водных буйволов./Н.И.Искандарова,О.Г Петрова, Е.С.Одегов// Биология. Биотехнологии. Аграрный вестник Урала.-2018.- №03(170).-С.21.28.
56. Наталия, А.К. Анализ эпизоотической ситуации при респираторных заболеваниях крупного рогатого скота инфекционной этиологии в предприятиях Уральского региона // Аграрная наука Евро Северо Востока.- 2013. С 49-50.

57. Непоклонов, Е.А. Совершенствование ветеринарно-диагностических мероприятий в Российской Федерации / Е.А.Непоклонов // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов. Материалы международной научно-практической конференции 24 – 25 апреля 2003 года. Щелково. 2003. С.3-5.
58. Нестеров, А.А. Определение вируснейтрализующих антител против вируса инфекционного ринотрахеита в сыворотках крови жвачных в реакции нейтрализации микрометодом / А.А.Нестеров, В.А.Мищенко, В.В.Думова и др.// «Задачи ветеринарной науки в реализации доктрины продовольственной безопасности РФ» Материалы Международной науч-практ.конференции. -Покров, 2011. С.115-120.
59. Олейник, А.В. Инфекционные болезни и воспроизведение /А.В. Олейник // Ветеринария с.- х. животных. 2010. № 1. С.42-45.
60. Осянин К.А. Мультиплексная ПЦР для индикации и дифференциации вирусных инфекций крупного рогатого скота/К.А. Осянин, Р.Р. Лартон, А.М. Алимов, Т.Х. Фанзов //Ученые записки Казанской ГАВМ – 2020. Т.244. №4. С.111-115.
61. Петрова, О.Г. Особенности эпизоотического процесса инфекционногоринотрахеита крупного рогатого скота /О.Г.Петрова, М.И.Барашкин и др. // Аграрный вестник Урала.-2019.- №6(185).
62. Петрянкин, Ф.П. Болезни молодняка животных /Ф.П.Петрянкин, О.Ю.Петрова// Учебник. 2014. С. 258-285..
63. Плешакова, В.И. Вирусные болезни крупного рогатого скота. /В.И. Плешакова, И.Г.Алексеева и др.// Учебное пособие. – 2017.
64. Плешакова В.И.Короновирусные инфекции у сельскохозяйственных и домашних животных/В.И.Плешакова, Т.И.Лоренгель, Н.А.Лещева//В сборнике: актуальные вопросы ветеринарии. Материалы конференции. Омск. 2020. С. 273-283.
65. Плешакова В.И. Проблемы инфекционного атрофического ринита в свиноводстве и пути его решения / В.И.Плешакова, Н.А.Лещева,

А.А.Кузницова//В сборнике: цифровое сельское хозяйство региона: основные задачи, перспективные направления и системные эффекты. Сборник материалов Международной научно-практической конференции, посвященной 70-летию экономического факультета. 2019. с. 232-235.

66. Прасолова, О.В. Молекулярно-генетический анализ возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота в Северо-Западном регионе РФ, 2017.
67. Пчельников, А.В. Этиология, возрастная и сезонная динамика вирусных респираторных болезней телят в племенных хозяйствах /Диссертация ,2017. С. 49-50.
68. Пчельников, А.В. Некоторые результаты изучения этиологии респираторных болезней телят в хозяйствах Московской области / А.В. Пчельников и др.//Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. №1. 2015. С. 16-18.
69. Самуйленко, А.Я. Инфекционная патология животных / А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Е.А. Непоклонов и др. //М-Академкнига. - 2006. -Т.1. -С. - 214-215,242-248.
70. Синица. Н. В. Диагностика, лечение, профилактика и меры борьбы с респираторными болезнями молодняка крупного рогатого скота инфекционной этиологии: рекомендации /Н. В. Синица и др.- Витебск : ВГАВМ. 2019. С. 56.
71. Стroganova, И.Я. Распространение парагриппа-3 крупногорогатого скота в животноводческих хозяйствах Восточной Сибири /И.Я.Строганова // Вестник КрасГАУ. № 6 . 2011. С. 155-120.
72. Сухинин, А.А. Методические рекомендации по профилактике и лечению стрептококков у крупного рогатого скота и птиц /А.А.Сухинин, А.В., Дмитриев, А.А. Стекольников, И.Г. Идиатулин, В.В. Крючкова, Л.И. Смирнова, Е.И., Приходько, Ю.Ю. Ильясов, М.В. Виноходова, О.Г.

- Кузьмина, Д.О. Виноходов, Н.П., Тулева, В.А. Бакулин, И.В. Белкина. - Санкт-Петербург. 2012. С. 78.
73. Сюрин, В.Н. Вирусные болезни животных /Сюрин В.Н./Учебник. - 1998. С. 246.
74. Тяпша, Ю.И. Полимеразная цепная реакция для детекции вируса парагриппа-3. /Ю.И.Тяпша, О.В.Дубаневич//Актуальные проблемы биотехнологии в аграрно-промышленном комплексе. 2015. С. 205-208.
75. 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.
76. Якупов, Т.Р. Молекулярная биотехнология. Биоинженерия. Учебное пособие / Т.Р.Якупов. – Казань: ФГБОУ ВО КГАВМ, 2016 .С. 138 .
77. AckermannM.R. InnateImmunology of Bovine Respiratory Disease/M.R. Ackermann, R. Derscheid, J.A. Roth// Vet Clin North Am Food AnimPract. – 2010. №26(2). P. 215–228.
78. Asuka Kumagai . Phylogenetic and antigenic analysis of bovine parainfluenza virus type-3 isolated in japan between 2002and 2019/ Asuka Kumagai , Toru Kanno, Kyoko Kawauchi , Katsuki Tanaka, Ryoko Ishihara et al.///Veterinary microbiology..2020 .№ 247.
79. Bart Pardon. Bovine Respiratory Disease Diagnosis / Bart Pardon, Sébastien Buczinski //Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice. 2020. №36(2). P. 425-444.
80. Bhupesh kamdi. Immunofluorescence and molecular diagnosis of bovine respiratory syncytial virus and bovine parainfluenza virus in the naturally infected young cattle and buffalos from India./Bhupesh kamdi,Rajendra Singh, Vidya singh et al./// Microbial pathogenesis. 2020. №145.

81. Bieth Eric. Mise au point d'une méthode de séquençage de nouvelle génération pour le diagnostic génétique de la déficience intellectuelle/ Bieth Eric//Biologie médicale. 2019 P. 49-75.
82. Brian W. J. Desk Encyclopedia of animal and bacterial virology./ Brian W. J and Marc. H .V./VAN Regenmortel, Paramyxoviruses of Animals USA. 2008.P. 176-183.
83. CummingsC.A. The Role of Next-Generation Sequencing in Enabling Personalized Oncology Therapy/CA Cummings, E Peters, L Lacroix, F Andre et al//*Clin Transl Sci.* 2016 . № 9(6). P. 283–292.
84. Caroline, Mille. Amelioration du dosagedes protéines par un contrôle des propriétés de surface duuits de dosage / Caroline Mille //*These*. 2010.
85. Cecile, Garnaude. Detection de mutation associees a la resistance aux antifongique chez Candida spp par pyrosequencage haut debit. 2013. P.146.
86. Chalvet, Virgile. Validation de méthode du dosage en ELISA de la concentration de la lipoprotéine lipase en laboratoire de biologie medicale selon la norme /Chalvet, Virgile//*thèse*. 2018.
87. Cisse O.H. De novo assembly of the pneumocystis jirovecii genome from a single bronchoaleolar lavage fluid specimen from a patient / Cisse OH, Pagni M,Hauser PM// *MBio*. 2012. № 4(1). P. 412-428.
88. Coste A. A. Mutation in Tac1p, a transcription factor regulating CDR1 and CDR2, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in candida albicans / Coste A, Turner V, Ischer F et al// *Genetics*. 2006. № 172(4). P. 2139-2156.
89. Coste A. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential candida albicans isolates / Coste A, Selmecki A, Forche A et al// *Eucaryot. Cell* . 2007. № 6(10). P. 1889-1904.
90. Dan Qiao. Molecular characterization of glycoprotein genes and phylogenetic analysis of two swine paramyxoviruses isolated from United States./ Dan Qiao, Bruce H, Janke, Subbiah Elankumaran // *Virus Genes*.2009. № 39. P. 53–65.

91. Douglas L. Step. Bovine respiratory disease / Douglas L. Step, Amelia R. Woolums //Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice. 2020. № 36(20).
92. Dudley DM. Low cost ultra wide genotyping using Roche/454 pyrosequencing for surveillance of FIV drug resistance ./Dudley DM, Chin EN, Bimber BN et al// Plos One. 2012. № 7(5). P. 364-394.
93. Dupant M.J. Etablissement et exploitation d'une ligne cellulaire de gliome canin pour la recherche therapeutique ./Dupant M.J// these pour obenir grade docteur veterinaire f l'universite de Claude Bernard-Lyon 1.-2014.-P. 27-30.
94. Elcio Leal. Isolation of a Divergent Strain of Bovine Parainfluenza Virus Type 3(BPIV3) Infecting Cattle in China/ Elcio Leal .Cun Liu. Zhanzhong Zha//Viruses. 2019. №1. P 489.
95. Elias Salem. Bronchopneumonies infectieuses des jeunes bovins: de la complexité dumicrobiome aux particularités évolutives et cliniques de virus respiratoiresencore méconnus / Elias Salem //institut national polytechnique de toulouse .-2018.
96. FrankG. H. Parainfuenza type-3/G.H.Frank//In: veterinary diagnostic virology: A Practitioners Guide. 1992 . P.114-116.
97. Fulton R.W. Detection and cattle characteriation of viruses of bovin as fields and vaccine strains in feedlot cattle with bovine respiratory disease./ Fulton R.W, Doffay J.M et al// vaccine . 2016. № 34. P. 3478-3492.
98. Geoffrey Truchetti. Etude retrospective des gaz sanguins comme marqueurs pronostiques chez des veaux hospitalises avec une affection respiratoire / Geoffrey Truchetti // these. 2009.
99. Gershwin L.J. Single Pathogen Challenge with Agents of the Bovine Respiratory Disease Complex/ Gershwin L.J, Alison, L Van Eenennaam et al// PLoS One. 2015. №10(11). P.1-23.
100. Gortran, Sonet. Using next-generation sequencing to improve DNA barcoding: lessons from a small-scale study of wild bee species (Hymenoptera ,

Halictidae) Gontran Sonet , Alain Pauly , Zoltán T Nagy , Massimiliano Virgilio et al//Apidologie.-2018. №49(5). P. 671–685 .

101. Gueriche, Achouak. the etiological role of parainfluenza-3 virus in the respiratory pathology of young cattle / Achouak, Gueriche, A. K.Galiulin V. G.Gumerov et al// Bio web of conference. 2020. №(17).
102. Harun Albayrak. characterisation of the first bovine parainfluenza virus 3 isolate detected in cattle in turkey /Harun Albayrak, Zafer Yazici, Emre Ozan, Cuneyt Tamer et al// vet. sci. 2019. №6.
103. Horwood P.F. Identification of two distinct bovine parainfluenza virus type 3 genotypes./ Paul Francis horwood, Jennifer Lilian Gravel and Timothy john Mahony // Journal of general virology . 2008. № 83.P. 1643-1648.
104. Jean-Louis Serre. Diagnostic techniques in genetic / Jean-Louis Serre .-2006. P. 4-11.
105. John D. Identification and genome characterization of genotype b and genotype c bovine parainfluenza type 3 viruses isolated in the united states./John D. Neill, Julia F. Ridpath et al// BMC Veterinary Research. 2015. №112.
106. John M.S Bortell. PCR Protocols (second edition) / John M.S Bortell, David Stirling// Methods in molecular biology . 2010. volume 226.- P. 56-64.
107. Kenri T. Complete genome sequence of Mycoplasma pneumonia type 2a strain 309 isolated in Japan / Kenri T, Horino A, Matsui M// J. Bacteriol. 2012. № 194(5). P. 1253.
108. Khalid, Masoodi. Polymerase chain reaction (PCR) /Khalid Masoodi, Sameena Maqbool Lone, Rovidha S. Rasool //Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology.-2021.- DOI: 10.1016/B978-0-12-824449-4.00019-0.
109. Konishi M. Complete genome sequence of the first isolate of genetype c bovine parainfluenza virus type 3 in Japan. / Konishi M, Okhura T, Shimizu M et al// Genome announc. 2014. №2. P.12-14.
110. Lamoril, J. A. Les techniques de séquencage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie DNA sequencing technologies: A revolution in motion.

- Part one/ Lamoril. J. A, Ameziane B, P. Bouizegarènea , M. Bogard/ Immuno-analyse et biologie spécialisée . 2008. № 23.P. 260-279.
111. Leister, L.A. Oxygen Therapy/ Leister, L.A // Pediatric Respirator Disease.- 1993.
112. Lotfi, Bounaadja. Developpement d'une PCR en temps reel pour la detection des Brucella et la relation avec le genre ACHROBACTERIUM/ Lotfi Bounaadja// thèse. 2010. P. 125-132.
113. Maclachlan N James . Fenner's Veterinary Virology 5th edition .N James Maclachlan and Edzard J Dubovi . 2011. P. 300-310.
114. Madias, N.E. /Lactic Acidosis // Kidney international. 1986. №29(3). P.752-774. 40.
115. Masseau, Isabelle. Radiographic Detection of Thoracic Lesions in Adult Cows: A Retrospective Study of 42 Cases/ Masseau Isabelle, Gilles Fecteau, luc Breton et al// The Canadian Veterinary Journal. 2008. №49(3).
116. Maidana S.S. Isolation and characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from water buffloes (*Bubalusbubalis*) in Argentina./ Maidana S.S, Lomonaco P.M et al // BMC .Vet Res.-. № 8.-.P.83.
117. Maxam, A. M. A. New method of sequencing DNA / Maxam. A. M, Gilbert W. A// Proc Natl Acad Sci USA. 1977. № 74. P. 560-564.
118. Maxime, Bruto. Etude de la platicite genomique chez streptomyces ambofacins: Assemblage et analyse comparative du genome des souche ATCC23877 et DSM40697/ Maxime Bruto//these. 2018. P.1-4.
119. Mehmet, O. T. Identification and Molecular Characterization of Bovine Parainfluenza Virus-3 and Bovine Respiratory Syncytial Virus - First Report from Turkey / Ozkan, Mehmet Timurkan,Hakan Aydin,Ahmet Sait// journal of Veterinary Research.-.2019. № 63(2). P.167-173.
120. Melissa, M. R.Fetal pathology in an aborted Holstein fetus infected with bovine parainfluenza virus-3 genotype A / Melissa M. R; Santiago Mirazo, Francisco. A. U et al // SAGE journal; veterinary journal. 2019. №56(2).P. 277-281.

121. Michan, Clemence. Optimization d'une methode de PCR quantitative en temps reel pour le detection de tous les genotypes BK polymavirus humain/ Michan Clemence// thèse d'étude spécialisées de biologie medical. 2018. P.27.
122. Mohamed, Felshal. Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to elisa/ Mohamed Felshal,. Philip Mccoyjr// national heart, lung, and blood institute, nih bethesda, md20892 methods. 2006. № 38(4). P. 317–323.
123. Mohammed, Ali Al-Hammadi Serological Surveillance of Infectious Bovine Rhinotracheitis virus, Bovine viral diarrhea virus and Bovine Parainfluenza-3 virus in Saudi Arabia/ Mohammed Ali AlHammadi//Alexandria Journal of Veterinary Sciences . 2016. №51 (1). P. 48-53.
124. Muriel, Dubasson. mise au point d'une PCR en temps reel pour le diagnostic de kratites a *ACANTHAMOEBA* spp/ Muriel Dubasson// these de doctorat l'université de Joseph Fourier. 2011. P.34-35.
125. Nader, M. Isolation and complete genome sequence of bovine parainfluenza virus type 3 in Egyptian cattele./ Nader M. Sophy, Sunil k. M, Iman M . B et al // International journal of veterinary science and medicine. 2017. №5. P. 8-13.
126. Nefertiti, C. Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with Elisa: determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants/ Nefertiti C. Dupont A., Kehui Wang et al // Nelson journal of reproductive immunology. 2005. №66. P.175-191.
127. Oem, J K. Molecular characterization of a Korean bovine parainfluenza virus type 3 isolate / Oem JK, Lee EY, Lee KK, et al// Vet Microbial. 2013. №162. P.224-227.
128. Pascal, Pugniere. Contribution a l'amélioration de la quantification des acides nucléiques par qPCR et RT- qPCR / Pascal Pugniere // thèse. 2012. P. 8-14.
129. Pelin,Tuncer. Serological detection of infection dynamics for respiratory viruses among dairy calves/ PelinTuncer et al// veterinary microbiology. 2015. № 180.P.180-185.

130. Prado-Jean A. Combined use of an antigen and antibody detection ELISA for cysticercosis as tools in an epidemiological study of epilepsy in Burundi./ Prado-Jean A, Kanobana K., Druet-Cabanac M et al// *Trop Med Int Health.*-2007.- №12(7). P.895-901.
131. Qiao, D. Molecular characterization of glycoprotein genes and phylogenetic analysis of two swine paramyxovirus isolated from United Statesvirus / Qiao D, JankeB. H, Elakumaran. S// *genes.* 2009. №39. P.53-65.
132. Alexander, C.S. Bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3) fusion and hemagglutinin Neuramidase glycoproteine make an important contribution to the restricted replication of BPIV3 in primates./ Alexander C.S, Josephine M. M, Anne Huang, Sonja R. S// *journal of virology.* 2000. № 74(19). P. 8922-8929.
133. Raquel, A. L. Molecular characterization of brazilian wild type strains bovine respiratory syncytial virus reveals genetic diversity and putative new subgroup of the virus / Raquel Arruda Leme, Alais Maria Dallangol, Amauri Alcindo Alfieri et al. // *VETERINARY QUARTERLY.*-2020. № 1. P. 83-96.
134. Robert, A. Smith. Bovine respiratory disease / Robert A. Smith, Douglas L. Step, Amelia R. Woolums // *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice.* 2020. №6(2). P.239-251.
135. Rodrego, de Almeida Vaucher. RT-PCR for the detection of bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV-3)/ Rodrego de Almeida Vaucher, Amouri Braga Simonete, Paulo Michel Roeche// *Acta Sientiae Veterinariae.* 2008. №36(3). P. 215-220.
136. Rodrigo, de almeida voucher. Polygenetic characterization of bovine parainfluenza 3 from contamination cell cultures and field isolates from Brazil, Diogenes Dazen et al// *Brazilian Journal of Microbiology.* 2011. №42(4). P. 1440-1444.
137. Sameh, Baghezza. Pathological study and detection of Bovine parainfluenza 3 virus in pneumonic sheep lungs using direct immunofluorescence antibody technique/ Sameh Baghezza1, Bakir Mamache1, Omar Bennoune, Khireddine Ghougal2// *Comparative Clinical Pathology.* 2016.

138. Sanger, F. A. Rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase./ Sanger F, Coulson A.R.//J. Mol. Biol. 1975. № 94. P.441-448.
139. Sanger, F. DNA sequencing with chain terminating inhibitors./ Sanger F, Coulson A. R, Nicklen S.//Proc Natl Acad Sci USA. 1977. № 74. P. 5463-5467.
140. Shendure, J. Next generation DNA sequencing ./Shendure J, Ji H.// Nat. Biotechnol. 2008. № 26(10). P.1135-1145.
141. Snowder, G.D. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic, and economic factors. / G.D. Snowder et al.//J.anim sci. 2006. №84. P. 1999-2008.
142. Stratton, M. R. The cancer genome / Stratton M. R, Campbell P. J and Futreal P. A.// Nature . 2009. № 458. P. 719-724.
143. Su Z. Next generation sequencing and its applications in molecular diagnostic./ Su Z, Ning B, Fang H et al.// Expert Rev Mol Diagn. 2011. №11(3). P.333-343.
144. Tagu, Denis. Principe des techniques de biologie moleculaire 2eme revue et augmentée/ Tagu. Denis, Moussad C. 2003.P. 187.ISSN: 1144-7605.
145. Takashi, Ohkura. Complete genome sequences of bovine parainfluenza virus type 3 strain BN-1 and vaccine strain BN-CE / Takashi Ohkura, Takehiro Kokuh, Misako Konishi, Ken-ichiro Kameyama, Kaoru Takeuchia // genomea.asm.org. 2013. № 1.- doi:10.1128/genomeA.00247-12.
146. Taylor, J.D. The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors/ Taylor J.D. et al.// Can Vet J. 2010. 51. P. 1095-1102.
147. Thomas Vannier. Dynamique de la structure des génomes et de leur biogéographie dans l'océan: analyses comparatives des données métagénomiques du projet tara oceans pour l'étude de la microalgue bathycoccus et des communautés planctoniques globales./ thomas vannier// These. 2017. P.50-58.
148. Torelli, R. The ATP binding cassette transporter encoding gene CgSNQ2 is contributing to the CgPDR1- dependent azoleresistance of *Candida glabrata*.//

- Torelli R, Posteraro B, Ferrari S et al.// Mol. Microbial. 2008. № 68(1). P. 186-201.
149. Uhel, F. Nouvelles techniques de biologie moléculaire/ F. Uhel · L. Zafrani // New Techniques in Molecular Biology/ / Méd. Intensive Réa.-2019.-DOI 10.3166.
150. Veljovic, Ijubisa. Isolation and molecular detection of bovine parainfluenza virus types 3 in catte in Serbia/ Veljovic Ijubisa, Knezevic Aleksandra, Milic Nenod et all.// Acta Veterinaria Beograd. 2016. №66(4). P.509-519.
151. Victor, H. S. Microbial diversity involved in the etiology of bovine respiratory disease outbreak in a dairy calf rearing unit./ Victor H. S, Alais M. D, Juliana T.T et al.// comparative Immunology microbiology and infectious diseases. 2020. № 71.
152. Wafa, Ibrahim. Mise au point et évaluation d'une technique de PCR permettant la détection et ce typage des enterovirus directement a partir de produis pathologique ou échantillons enviromenntaux / Wafa Ibrahim// thèse.- 2014. P. 98-100.
153. Wen, Y.J. Phylogenetic analysis of the bovine parainfluenzavieus type 3 from cattle herds reveling the existence of a genotype a strain in China./ Wen YJ, Shi XS et al.// Virus genes. 2012. № 45. P. 542-547.
154. Wojciech, Socha. Shedding course of bovine respiratory syncytial virus and bovine parainfluenza 3 virus in calves vaccinated intranasally /Wojciech Socha, Jerzy Rola, Dariusz Bednarek, Renata Urban-Chmiel, Jan F. Żmudziński//Bull Vet Inst Pulawy . 2013. №57.P. 479-483.
155. Xiaobo, Wen. Identification and genetic characterization of bovine parainfluenza virus type 3 genotype c strain isolated from cattle in western china./ Xiaobo WEN, Jinhua SUN, Yao ZHANG, Si CAO, Xuhua RAN, Hongbo N.// turkish journal of veterinary and animal sciences. 2017. № 41. P.180-186.
156. Yuan- Mao. Isolation and genetic characterization of bovine parainfluenza virus type 3 cattle in China./ Yuan- Mao,Hong-Fei Shi, Yu-Ran Gao et al.// veterinary microbiology. 2011. № 149. P.446-451.

157. Yuko Sakai. Nucleotide sequence of the bovine parainfluenza 3 virus genome: its 3' end and the genes of NP, P, C and M proteins./ Yuko Sakai, Shinya Suzu, Tatsuo Shioda and Hirochi Shibota.// Nucleic Acids Research. 1987. № 15(7). P. 2927-2940.
158. Zhu, YM. Isolation and genetic characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from cattle in China./ Zhu YM, Shi HF, Gao YR et al.//.Vet Microbial. 2011, №149. P.446-451.

ПРИЛОЖЕНИЯ

**НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ УЧАСТКА МАТРИЧНОГО
ГЕНА ШТАММА ЛД-9 ВИРУСА ПАРАГРИППА-3 КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА, ДЕПОНИРОВАННАЯ В GENBANK**

**Bovine respirovirus 3 isolate LD-9 matrix
protein (M) gene, partial cds**

GenBank: MW524841.1

FASTAGraphics

Go to:

LOCUS MW524841 329 bp cRNA linear VRL 29-MAR-2021
DEFINITION Bovine respirovirus 3 isolate LD-9 matrix protein (M) gene, partial cds.
ACCESSION MW524841
VERSION MW524841.1
KEYWORDS .
SOURCE Bovine respirovirus 3
ORGANISM Bovine respirovirus 3
Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Negarnaviricota;
Haploviricotina; Monjiviricetes; Mononegavirales; Paramyxoviridae;
Orthoparamyxovirinae; Respirovirus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 329)
AUTHORS Gueriche,A., Galiullin,A.K., Gumerov,V.G. and Shaeva,A.Y.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (22-JAN-2021) Department of Microbiology, Kazan State
Academy of Veterinary Medicine, Sibirsky Tract, 35, Kazan,
Tatarstan 420029, Russia
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..329
/organism="Bovine respirovirus 3"
/mol_type="viral cRNA"
/isolate="LD-9"
/host="cattle"
/db_xref="taxon:11215"
/lab_host="MDBK"
/country="Russia"
/collection_date="2018"
/PCR_primers="fwd_seq: agtgatcttagatgatgatcca, rev_seq:
gttattgatccaattgctgt"
/note="genotype: A"
gene<1..>329
/gene="M"
CDS<1..>329
/gene="M"
/codon_start=1
/product="matrix protein"
/protein_id="QTF66027.1"
/translation="SDLDDDP SYK VCG SGLPL GLARY TGNDQELL QAA T KLDIEVRR
TVKATEMIVYTVQNIKPELYPWSSRLRKGM LF DANKVALAPQCLPLDGGIKFGVIFVN
CTAIGSIT"
ORIGIN
1 agtgatctag atgatgatcc aagtacaag gtttgcgtt ctggatcatt gccacttggg

61 ttggctagat acactggaaa tgatcaggaa ctcctacagg ctgcaaccaa gctcgatata
121 gaagtaagaa gaactgtaaa ggctacggag atgatagttt acactgtgca aaacatcaa
181 cctgaactat atccatggtc cagtagatta agaaaaggga tgttatttga cgctaacaag
241 gttgctcttg ctcctcaatg tcttccacta gatggaggga taaaattcgg ggtgatttt
301 gtgaactgca cagcaattgg atcaataac

Приложение 2
Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной
медицины имени И.Э. Баумана»

УТВЕРЖДАЮ

Ректор федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Казанская
государственная академия ветеринарной
медицины имени И.Э. Баумана»
профессор Ильин - Р.Х. Равилов

« 12 » марта 2021 г.

**ВРЕМЕННЫЕ ВЕТЕРИНАРНЫЕ ПРАВИЛА
по генотипированию вируса парагриппа-3
крупного рогатого скота**

Казань – 2021 г

Разработчики: заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, профессор ГалиуллинА.К., аспирант кафедры ГеришАшуак, ст. преподаватель ШаевА.Ю., вед.н.с. ГумеровВ.Г., профессор АлимовА.М., аспирант ЛартонР.Р.

Генотипирование вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота. Временные ветеринарные правила. ФГБОУ ВО«Казанская ГАВМ имени Н.Э. Баумана», 2021 г.

Рассмотрено Научно-техническим советом ФГБОУ ВО «Казанская ГАВМ имени Н.Э. Баумана» от 11 марта 2021 года, протокол № 1.

Временные ветеринарные правила предназначены для лабораторных работников, ветеринарных специалистов, магистров и аспирантов, интересующихся вопросами молекулярной биологии.

Рецензенты:

доктор биологических наук, профессор Ахметов Т.М.

доктор ветеринарных наук, профессор Фаизов Т.Х.

Общие положения

Парагрипп-3 крупного рогатого скота (инфекционный бронхит, бронхопневмония, острый катар верхних дыхательных путей, транспортная лихорадка, парainфлуэнца-3) – острое контагиозное заболевание крупного рогатого скота (преимущественно молодняка до 6-месячного возраста), характеризующееся катарально-гнойным поражением органов дыхания, лихорадкой, общим угнетением, приступами сухого, болезненного кашля, катаральным конъюнктивитом. Болезнь регистрируется во всех странах, где развито скотоводство. Развитию болезни способствуют неблагоприятные факторы - скученное содержание, неполноценное кормление и высокая загазованность животноводческих помещений.

Парагрипп-3 КРС по своему клиническому проявлению идентичен множеству респираторных заболеваний (ИРТ, РСИ, ВД, адено-вирусная инфекция и др.). Сложность диагностики увеличивает из-за постоянного смешанного течения болезни (осложнение сальмонеллезом, стафилококкозом, пастереллозом).

Предположительный диагноз ставят на основе оценки эпизоотической ситуации (наличие случаев болезни в предыдущие годы, завоз скота из неблагополучных регионов) и внешних признаков окончательный диагноз — по результатам вирусологических, серологических и молекулярно-биологических исследований.

Лабораторная диагностика парагриппа-3 КРС основана на выявлении вирусных антигенов в отделяемых клетках слизистой оболочки носовой полости больных или в эпителиальных клетках трахеи и бронхов павших животных, изоляции и идентификации вируса, а также на выявлении прироста специфических антител в парных сыворотках животных-реконвалесцентов. В настоящее время большая роль в диагностике и дифференциации прагриппа-3 крупного рогатого скота от других похожих вирусных инфекций отводится молекулярно-биологическим методам.

Молекулярная биология - изучение явлений жизни на молекулярном уровне - стала возможной благодаря использованию методов различных наук в

исследовании живых систем. Применение методов химии, физики, генетики, биохимии и микробиологии в изучении структуры и функции клеток и тканей позволили определить роль и значение белков и нуклеиновых кислот в жизненных явлениях.

Предложенный в 1983 году американским биохимиком Кэрри Мюллисом метод **полимеразной цепной реакции (ПЦР)** в корне изменил подход в молекулярной диагностике наследственных и инфекционных заболеваний, судебно-медицинской экспертизе вещественных доказательств, установлении родства и анализа родословных, систематике организмов, растений, животных и т.д. За изобретение ПЦР К. Мюллис в 1993 году был удостоен Нобелевской премии. В настоящее время ПЦР широко используется для диагностики многих инфекционных болезней животных. Применение ПЦР занимает значительное место и в диагностике парагриппа-3 крупного рогатого скота.

Ещё одним методом, широко применяемым в молекулярной биологии, является **секвенирование**, то есть расшифровка нуклеотидной последовательностей нуклеиновых кислот. Первым методом прямого ферментативного секвенирования ДНК стал метод, предложенный Ф. Сэнгером и Д. Коулсоном в 1975 году. В основе метода лежал принцип ферментативного построения комплементарной цепи ДНК по существующей одноцепочечной матрице при происходящем в разных местах цепи ДНК ингибировании ее дальнейшего роста. Данный способ секвенирования получил название "плюс-минус" метод. В 1977 г. автор "плюс-минус" метода предложил еще один способ ферментативного секвенирования, получивший название метода термирующих аналогов трифосфатов. Более мощный и более технологичный, этот способ, несколько модифицированный, применяется до сих пор. За время, прошедшее со дня разработки метода ферментативного секвенирования ДНК по Сэнгеру с помощью дезокситерминаторов, он претерпел многочисленные модификации и всевозможные улучшения. В той или иной степени изменениям подверглись практически все составляющие этого процесса (А.В. Чемерис с соавт., 1999).

В 1976 г. А. Максамом и У. Гилбертом был разработан метод секвенирования, названный также методом химической деградации. В основе метода лежит ограниченное расщепление меченого фрагмента ДНК под действием реагентов, специфичных к определенному типу оснований нуклеотидов. Несмотря на относительно низкую производительность метода секвенирования ДНК путем химической деградации по Максам-Гилберту, этот метод в настоящее время все же продолжает использоваться и в отдельных случаях почти незаменим.

Необходимость получения информации о последовательности нуклеотидов в ДНК во все возрастающих масштабах заставила исследователей заняться автоматизацией процесса секвенирования ДНК, поскольку применявшиеся до этого только ручные методы уже не справлялись с такими большими объемами.

В последние десять лет были достигнуты большие успехи в разработке и коммерциализации новых технологий секвенирования, сгруппированных под термином секвенирование нового поколения «Next Generation Sequencing» (NGS).

Технологии NGS позволили значительно сократить стоимость базового секвенирования и значительно сэкономить время по сравнению с техникой Сэнгера. В результате разработки NGS, секвенирование стало экономически выгодным для многих исследований. В микробиологии и вирусологии технология секвенирования нового поколения особенно применима для расшифровки всего или частичного генома.

Как правило, результаты секвенирования используют в дальнейшем для выполнения **филогенетического анализа**. Задачей филогенетического анализа является установление, реконструкция эволюционной истории – родственных связей, отношений между формами жизни – и датирование эволюционных событий, моментов дивергенции. Первым этапом филогенетического анализа является идентификация вставок и делеций, имевших место в эволюционной истории анализируемой группы последовательностей. Эту процедуру называют выравниванием последовательностей. Оно направлено на выявление гомологичных позиций анализируемых последовательностей, установление

наиболее вероятного, то есть требующего наименьшего числа эволюционных событий, сценария эволюции анализируемой группы. В филогенетических исследованиях эволюционные отношения между формами жизни представляют в виде филогенетических, или эволюционных, деревьев.

По данным зарубежных исследователей, в настоящее время на основе филогенетического анализа выявлено три генотипа вируса парагриппа-3: *A* (BPIV-3a), *B* (BPIV-3b) и *C* (BPIV-3c). Генотип *A* впервые был выделен в США, затем в Египте, Китае и Японии. Генотип *B* впервые был описан в Австралии. Выделение генотипа *C* было проведено в Китае, Южной Корее и Японии. В Аргентине были зарегистрированы все три генотипа вируса парагриппа-3.

В России, наряду с другими лабораторными методами, большое значение имеет ПЦР-диагностика парагриппа-3, основанная на обнаружении в исследуемом материале фрагментов генов возбудителя. Однако до настоящего времени отсутствовала информация о генотипическом разнообразии вируса парагриппа-3 на территории Российской Федерации. В данных «Временных правилах...» пошагово описан способ генотипирования вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота (на примере собственных результатов авторов), который может быть использован другими исследователями.

Материалы и оборудование, необходимые для работы (с указанием производителей):

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Термостат для пробирок типа «Эплендорф» от 25 до 100°C (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эплендорф» до 16 тыс об/мин (например, «Elmi», Латвия, «Hettish», Германия).
4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).

6. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).

7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Axygen», США).

8. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и до 1000мкл (например, «Axygen», США).

9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 10 и 200 мкл (например, «Axygen», США).

10. Одноразовые полипропиленовые микропробирки объемом 0,2 (0,5) мл.

11. Штативы для наконечников (например, «Axygen», США) и микропробирок объемом 0,2 (0,5) мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).

12. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Axygen», США).

13. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.

14. Отдельный халат и одноразовые перчатки.

15. Емкость с дезинфицирующим раствором

16. Комплект реагентов для выделения тотальной РНК/ДНК из клинического материала – например, «РИБО-преп» («AmpliSens», Россия).

17. Комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК – например, «РЕВЕРТА-L» («AmpliSens», Россия).

18. Комплект реагентов для ПЦР: смесь dNTP, H₂O, Taq ДНК-полимераза, праймеры (M₁ и M₂) («SibEnzyme», Россия).

19. Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле – например, «ЭФ» («AmpliSens», Россия).

20. Программируемый амплификатор для пробирок объемом 0,5 мл (например, «Терцик», ООО «НПОДНК-Технология», Россия); для пробирок объемом 0,2 мл (например, GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, США, или MaxyGene, Axygen, США,) – при постановке ПЦР с электрофоретической детекцией.

21. Камера для горизонтального электрофореза объемом не более 400 мл (например, «SE-2», «Хеликон», Россия).

22.Источник постоянного тока с напряжением 150–460 В (например, «Эльф-4», «ДНК-Технология», Россия).

23.Ультрафиолетовыйтрансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей (например, «Биоком», Россия).

Последовательность работы

1.Выделение нуклеиновой кислоты вируса

Вирус парагриппа-3 содержит РНК, поэтому для выделенияРНК из собранных образцов тканей (мазки из носа, легочной ткани и лимфатические узлы) подходит коммерческий набор РИБО-преп(AmpliSens, Россия). Очистка РНК выполняется согласно инструкции производителя. Все выделенные пробы перед тестированием хранят при температуре -20 ° С.

1.Раствор для лизиса (если реагенты хранились при t от 2°С и более) прогреть при 65° С в термостате до полного растворения кристаллов.

2.Приготовить необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая контрольные пробирки).

3.В пронумерованные пробирки внести по 300 мкл раствора для лизиса и по 100 мкл раствораподготовленных проб, используя наконечники с аэрозольным барьером.

4.Содержимое пробирок тщательно встряхнуть на вортексе и центрифугировать в течение 5 секунд на микроцентрифугедля удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть 5 мин при 65° С в термостате.

5.Добавить в пробирки по 400мкл раствора для преципитации и вновь перемешатьна вортексе.

6.Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 5 мин при 13 тыс об/мин.

7.Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок.

8. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора для отмычки, плотно закрыть крышки, рсторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

9. Процентрифугировать при 13 тыс об/мин в течение 1-2 мин на микроцентрифуге.

10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость.

11. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора для отмычки, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

12. Процентрифугировать при 13 тыс об/мин в течение 1-2 мин на микроцентрифуге.

13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя ваккуумный отсасывать и отдельный наконечник на 10 мкл для каждой пробы.

14. Поместить пробирки в термостат при температуре 65° С на 5 мин (при этом крышки пробирок должны быть открыты).

15. Добавить в пробирки по 50 мкл РНК-буфера. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65° С на 5 мин.

16. Процентрифугировать пробирки при 13 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции.

2. Обратная транскрипция

Поскольку для постановки ПЦР нужна ДНК, а вирус ПГ-3 – РНК-содержащий, вирусную РНК необходимо подвергнуть обратной транскрипции. Для этой цели подходит комплект «РЕВЕРТА-Л»(AmpliSens, Россия). Работа выполняется в соответствии с инструкцией изготовителя:

1. Отобрать необходимое количество микропробирок объёмом 0,2 (0,5) мл.

2. Приготовить реакционную смесь на 12 реакций. Для этого в пробирку с RT-mix внести 5 мкл RT-G-mix-1, тщательно перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.

3. К полученному раствору добавить 6 мкл ревертазы (ММIV), пипетировать 5 раз, перемешать на вортексе. Осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.

4. Внести в микропробирки по 10 мкл готовой реакционной смеси.
5. Используя наконечники с аэрозольным барьером, добавить по 10 мкл РНК-пробы в пробирки с реакционной смесью. Осторожно перемешать пипетированием.
6. Поставить пробирки в амплификатор (термостат) с температурой 37° С на 30 мин.

7. Полученную в реакции обратной транскрипции кДНК для последующей постановки ПЦР развести в 2 раза ДНК-буфером, аккуратно перемешать пипетированием 10 раз.

3. Полимеразная цепная реакция

В качестве мишени для выполнения ПЦР используется участок матричного гена (M гена) вируса парагриппа-3 длиной 328 п.н. В таблице 1 указаны праймеры и размер ампликона.

Таблица 1. Праймеры и размеры ампликона

Вирус	Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Размер
Вирус ПГ-3	Matrix	M ₁	AGTGATCTAGATGATGATCCA	328bp
		M ₂	GTTATTGATCCAATTGCTGT	

ПЦР проводят в объеме 20 мкл. Для этого отбирают необходимое количество микропробирок объемом 0,5(0,2) мл. Протокол реакции описан в таблице 2.

Таблица 2. Протокол ПЦР (*M* ген вируса ПГ-3)

Реактивы	Исходная концентрация	Рабочая концентрация	1 проба (мкл)	10 проб (мкл)
dH ₂ O			13,09	130,9
dNTPs	2,5 мМ	0,25 мМ	2	20
Буфер для Таq ДНК полимеразы	10×	1×	2	20
Taq ДНК полимераза	5 ед	1 ед	0,2	2
Праймер«M ₁ »	21мкМ	0,5 мкМ	0,48	4,8
Праймер«M ₂ »	43,5 мкМ	0,5 мкМ	0,23	2,3
Проба ДНК			2	
ВСЕГО			20	
Праймер«M ₁ »: 5'-AGTGATCTAGATGATGATCCA-3'				
Праймер«M ₂ »: 5'-GTTATTGATCCAATTGCTGT-3'				

После приготовления реакционной смеси пробирки помещают в термоциклер для проведения амплификации. С этой целью используют твердотельный амплификатор «Терцик» фирмы ДНК-технология (Россия) или др.

Режим амплификации:

1× 96⁰С – 6 мин.

40× 94⁰С – 60 сек, 50⁰С – 60 сек, 72⁰С – 60 сек.

1× 72⁰С – 10 мин.

По окончании процесса, по 10 мкл полученных продуктов амплификации подвергают электрофорезу 1,5-1,7% агарозном геле. Электрофорез осуществляют при 200 В в течение 40 мин. Детекцию результатов проводят на трансиллюминаторе с длиной волны 312 нм. Наличие специфической полосы, соответствующей размеру 328 п.н., рассматривают как положительный результат. В качестве ориентира для определения размера полученного амплификата используют маркерную лестницу (рисунок 1).

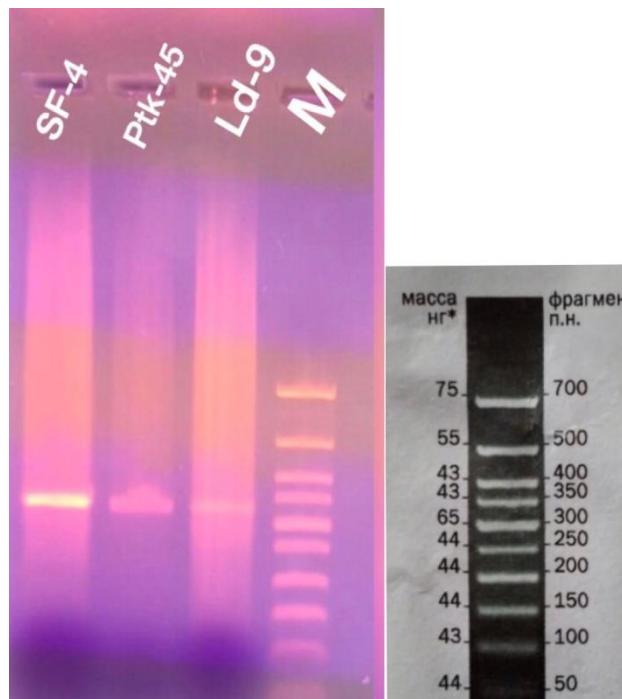


Рисунок 1 – Результаты амплификации фрагмента М гена вруса ПГ-3 (продукт 328 п.н.)

4. Секвенирование

Положительные образцы (продукты амплификации) подвергаются секвенированию. Для расшифровки нуклеотидной последовательности небольших фрагментов ДНК, как в данном случае, обычно используют метод Сэнгера. Для секвенирования необходим секвенатор, комплект реагентов и соответствующие условия. В связи со специфичностью метода и высокой стоимостью оборудования, как правило, секвенирование осуществляется в учреждениях, оказывающих такие услуги. Например, заказать секвенирование можно в:

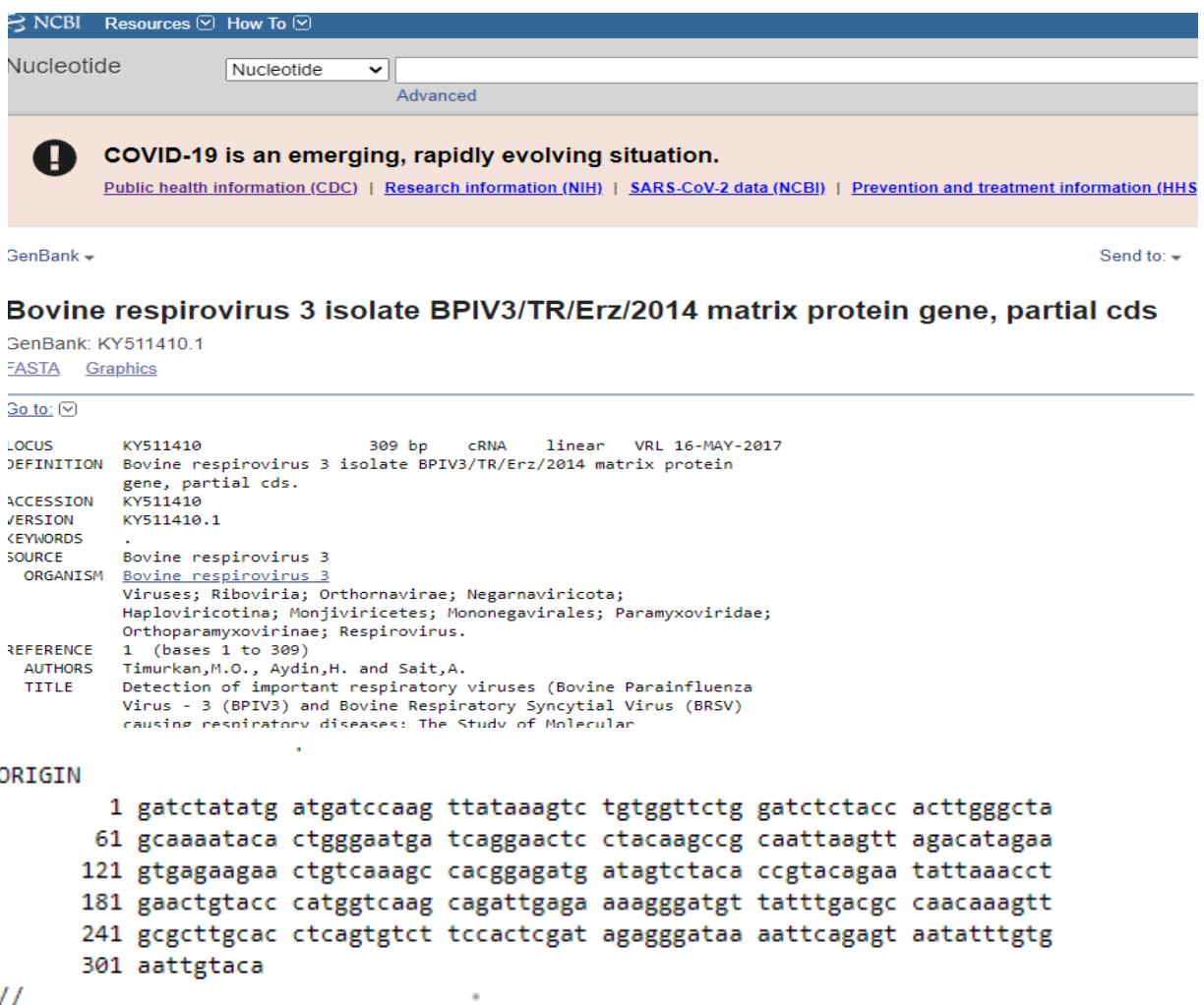
- Междисциплинарном центре протеомных исследований КФУ (Казань),
- Научно-производственной компании СИНТОЛ (Москва) и др.

5. Выравнивание последовательностей

Первый этап филогенетического анализа – выравнивание нуклеотидных последовательностей. Выравнивание – это биоинформационический метод, основанный на размещении двух или более исследуемых последовательностей

фрагментов ДНК, РНК или белков друг под другом таким образом, чтобы легко увидеть сходные участки в этих последовательностях. Сходство первичных структур двух молекул может отражать их функциональные, структурные или эволюционные взаимосвязи.

Полученные в результате секвенирования по Сэнгеру нуклеотидные последовательности подвергают множественному выравниванию с гомологичными (родственными) последовательностями вируса парагриппа-3, представленными в международной базе данных GenBankNCBI. В настоящее время в GenBank содержится около 3 тысяч последовательностей различных участков генома вируса ПГ-3, полученных из разных стран (однако последовательности из России отсутствуют) (рис. 2).



NCBI Resources How To

Nucleotide Nucleotide Advanced

COVID-19 is an emerging, rapidly evolving situation.

Public health information (CDC) | Research information (NIH) | SARS-CoV-2 data (NCBI) | Prevention and treatment information (HHS)

GenBank Send to:

Bovine respirovirus 3 isolate BPIV3/TR/Erz/2014 matrix protein gene, partial cds

GenBank: KY511410.1

FASTA Graphics

Go to: ▾

LOCUS KY511410 309 bp cRNA linear VRL 16-MAY-2017

DEFINITION Bovine respirovirus 3 isolate BPIV3/TR/Erz/2014 matrix protein gene, partial cds.

ACCESSION KY511410

VERSION KY511410.1

KEYWORDS .

SOURCE Bovine respirovirus 3

ORGANISM [Bovine respirovirus 3](#)

Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Negarnaviricota; Haplomiricotina; Monjiviricetes; Mononegavirales; Paramyxoviridae; Orthoparamyxovirinae; Respirovirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 309)

AUTHORS Timurkan,M.O., Aydin,H. and Sait,A.

TITLE Detection of important respiratory viruses (Bovine Parainfluenza Virus - 3 (BPIV3) and Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) causing respiratory diseases: The Study of Molecular

ORIGIN

```
1 gatctatatg atgatccaag ttataaagtc tgtggttctg gatctctacc acttgggcta
 61 gcaaaaataca ctggaaatga tcaggaactc ctacaaggccg caattaagtt agacatagaa
121 gtgagaagaa ctgtcaaaacg cacggagatg atagtctaca ccgtacagaa tattaaacct
181 gaactgtacc catggtaag cagattgaga aaagggatgt tatttgacgc caacaaagtt
241 gcgcttgcac ctcagttgtct tccactcgat agagggataa aattcagagt aatatttg
301 aattgtaca
```

//

Рисунок 2 – Пример нуклеотидной последовательности частичного М гена вируса ПГ-3, депонированной в GenBankNCBI в формате FASTA

Одной из наиболее эффективных и часто используемых программ для множественного выравнивания последовательностей является программа Clustal в вариантах ClustalW и ClustalX. Программой можно пользоваться как на персональном компьютере, так и на ряде сайтов Интернета, используя быстродействующие компьютеры. Кроме того, для выравнивания можно использовать ряд других программ: MUSCLE, T-Coffee, MAFFT, MANGO.

Практически все методы анализа последовательностей биологических полимеров принимают последовательности в формате FASTA (рис. 2).

Программы для выравнивания (ссылки):

- Clustal - <http://www.clustal.org/omega/>
- MUSCLE - <https://www.drive5.com/muscle/>
- T-Coffee - <http://tcoffee.crg.cat/>
- MAFFT - <https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>
- MANGO - <http://www.bioinfo.org.cn/mango/>

6. Филогенетический анализ

Реконструкция эволюционных отношений между формами жизни на основании сравнения их наследственной информации, построение филогенетического дерева путем анализа генетических последовательностей, является математической задачей. Среди программ для филогенетического анализа нет одной доминирующей программы. В значительной степени это связано с разнообразием имеющихся методов построения филогенетических деревьев, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки.

На протяжении многих лет наиболее распространенной программой для филогенетического анализа была программа PHYLIP, это пакет из нескольких десятков взаимосвязанных подпрограмм и модулей. На русском языке бесплатно распространяется система UGENE, позволяющая строить деревья по алгоритмам PHYLIP, визуализировать и сохранять их.

Надежной, удобной в пользовании программой для филогенетического анализа, рекомендуемой, в частности, для начинающего исследователя, является программа MEGA.

Одной из наиболее полных филогенетических программ, в плане возможности использования различных филогенетических подходов, является программа PAUP.

Хороший результат филогенетического анализа показала программа MegAlignPro от DNASTAR. Сама программа платная, но при регистрации на сайте дается 14-дневная бесплатная версия.

Кроме вышеперечисленных программ, для филогенетического анализа также предназначены программы: TREE-PUZZLE, SplitsTree и другие.

Программы для филогенетического анализа (ссылки):

- PHYLIP - <https://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>
- UGENE - <http://ugene.net/download.html>
- MEGA - <https://www.megasoftware.net/>
- MegAlignPro - <https://www.dnastar.com/software/lasergene/megalign-pro/>
- PAUP - <http://paup.phylosolutions.com/>
- TREE-PUZZLE - <http://www.tree-puzzle.de/>
- SplitsTree - <https://uni-tuebingen.de/fakultaeten/mathematisch-naturwissenschaftliche-fakultaet/fachbereiche/informatik/lehrstuehle/algorithms-in-bioinformatics/software/splitstree>

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

на основе полученных собственных результатов

Генотипическому исследованию подверглись:

- вакцинный штамм ПТК- 45/86,
- изолят ЛД-9, полученный от теленка из Лайшевского района Республики Татарстан.

Полученные нами в результате ПЦР специфичные фрагменты *M* гена вируса парагриппа-3 КРС (328 п.н.) были подвергнуты секвенированию в

Междисциплинарном центре протеомных исследований КФУ на секвенаторе NextSeq 500 (Illumina).

Результаты секвенирования были проанализированы с помощью программ UGENE и MegAlignPro (бесплатная демо-версия) (рис. 3 и 4).



Рисунок 3 - система UGENE от Унипро

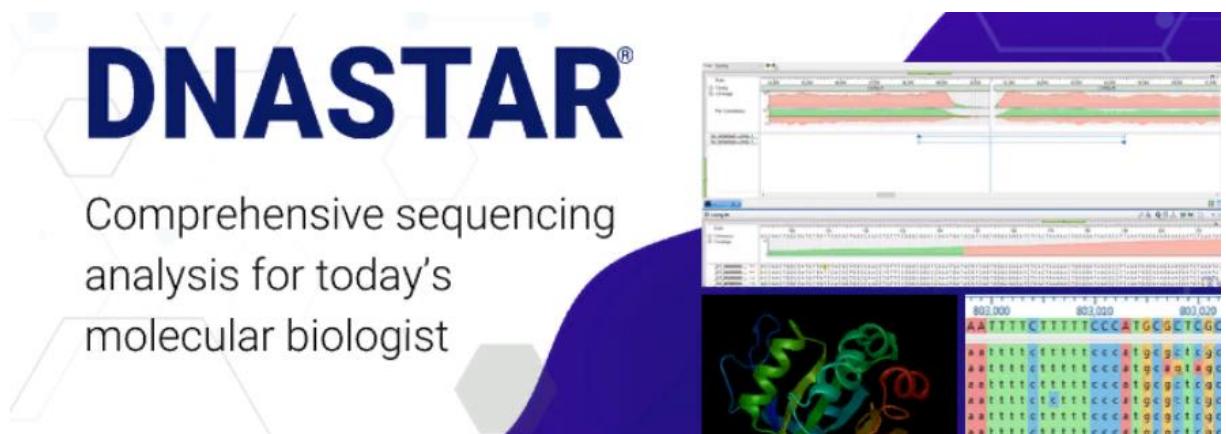


Рисунок 4 – система MegAlignPro от DNASTAR.

Для выравнивания было использовано несколько нуклеотидных последовательностей (в том числе, несколько полногеномных) различных штаммов вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота, депонированных в GenBank в формате FASTA (табл. 3).

Таблица 3. Штаммы вируса ПГ-3 крупного рогатого скота из GenBank, использованные для филогенетического анализа

Вирус	Номер в GenBank	Страна	Генотип	Длина генома
SF-4	AF178655	USA	a	15456
NM09	JQ063064	China	a	15456
JCU	EF108221	Australia	a	697
BN-1	AB770484	Japan	a	15480
ISU	EU439428	USA	a	15480
910N	D84095	JAPAN	a	15480
Kansas	AF178654	USA	a	15454
BP4158	EF108222	Australia	b	697
Q5592	EU277658	Australia	b	15498
TVMDL15	KJ647284	USA	b	15474
SD0835	HQ530153	China	c	15498
SD0811	HQ530159	China	c	697
NX49	KT071671	China	c	15474
TVMDL20	KJ647287	USA	c	15474
HS9	LD000638	Japan	c	15474
12Q061	JX969001	Korea	c	15474

Множественное выравнивание последовательностей осуществлялось в системе MegAlignPro с использованием программы ClustalW (рис. 5 и 6).



Рисунок 5 -Общий результат множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей

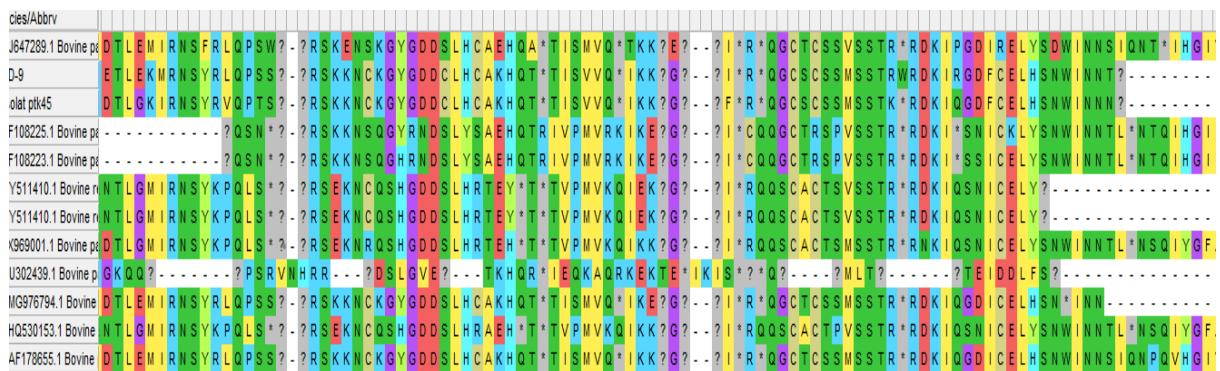


Рисунок 6 -Результаты множественного выравнивания аминокислотных последовательностей

Филогенетический анализ полученных нами последовательностей по фрагменту *M* гена вируса парагриппа-3 КРС также был проведен с помощью программы MegAlignPro. Полученные результаты показали, что российский изолят LD-9 (временный номер MW52481) и вакцинный штамм PTK45/86 отнесены к генотипу А вируса парагриппа-3.

В результате выравнивания последовательностей российский изолят LD-9 показал 98,3% идентичность с референтным штаммом SF-4, относящимся к генотипу А, тогда как российский вакцинный штамм ПТК 45/86 был на 100% идентичен референтному штамму SF-4 (рис. 7).

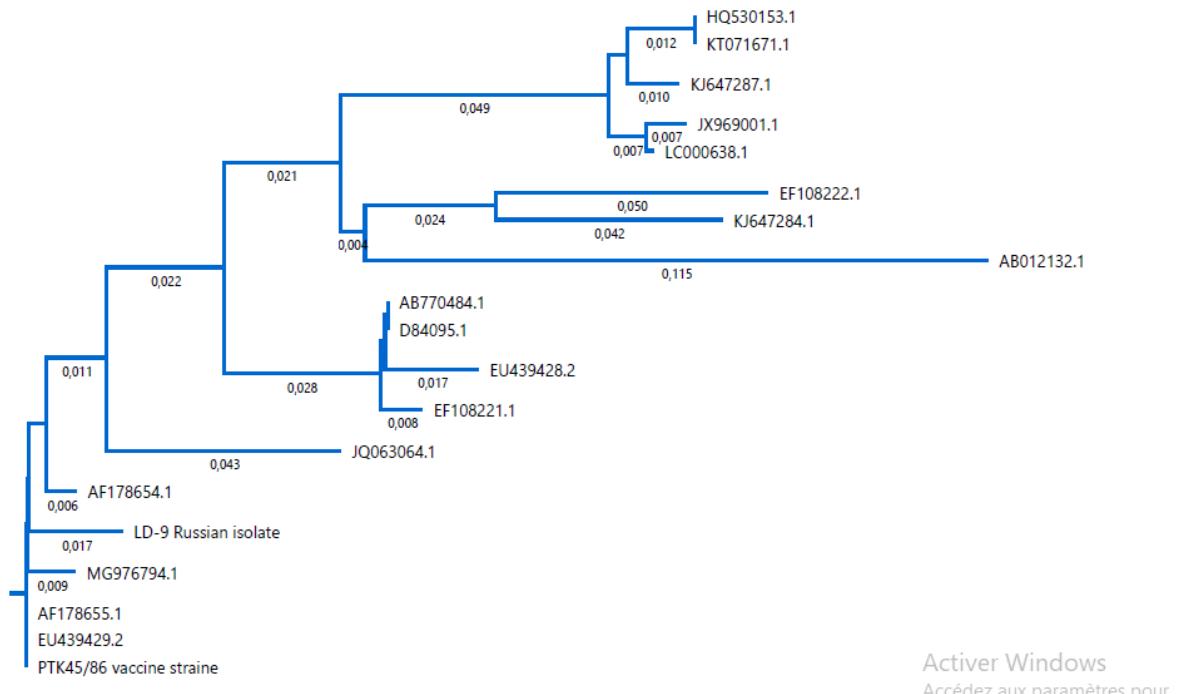


Рисунок 7 -Филогенетический анализ штаммов вируса ПГ-3 на основе фрагментов М гена.

По данным зарубежных исследователей известно, что генотип Авируса ПГ-3 наиболее распространен в Америке, в Австралии; генотип *C* встречается в основном в Азии, генотип *B* - в Австралии. До настоящего времени не было информации о том, какой генотип вируса циркулирует на территории Российской Федерации.

Вакцины, используемые в России против вируса парагриппа крупного рогатого скота-3, были разработаны на основе референтного штамма, принадлежащего генотипу *A*. Перекрестная защита таких вакцин от парагриппа-3, вызванного генотипами *B* и *C*, остается неясной, поэтому следует оценить необходимость разработки альтернативных диагностических тестов и вакцин для профилактики. Генетическая характеристика циркулирующих штаммов возбудителя может способствовать разработке более эффективных методов диагностики и профилактики данной инфекции.

Приложение 3

«УТВЕРЖДАЮ»
Проектарь по научной
работе, кандидат экон. наук,
доктор

Новиков Ю.И.



25.03. 2021.

Карта обратной связи

Информационное письмо по материалам диссертации Гераш Ашук на тему: «Иногенерализация вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота, выделенного в Республике Татарстан» внедрено в учебный процесс и принято в разработках при выполнении ПИР на кафедре ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней ФГБОУ ВО «Омский ГАУ».

Материалы рассмотрены и одобрены на заседании кафедры ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней.

Протокол № 10 от «31» марта 2021г.

Заведующий кафедрой ветеринарной
микробиологии, инфекционных и
инвазионных болезней, доктор
ветеринарных наук, профессор

В.И.Плешакова

БХ № 15509 л.1 Апп. опт.

Приложение 4

УТВЕРЖДАЮ



Проректор по учебной работе ФГБОУ ВО
«Башкирский ГАУ», канд.
докт. наук, доцент
П.М.Юнусбаев

» 03 2021г.

Карта обратной связи

Информационное письмо по материалам диссертации Гермин Ашук на тему: «Исследование вируса парагрипа-3 крупного рогатого скота, выделенного в Республике Татарстан» внедрено в учебный процесс и принято в разработках при выполнении НИР на кафедре инфекционных болезней, зоогигиены и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО «Башкирский ГАУ».

Материалы рассмотрены и одобрены на заседании кафедры инфекционных болезней, зоогигиены и ветсанэкспертизы. Протокол № 8 от «19» марта 2021 г.

Заведующий кафедрой инфекционных
болезней, зоогигиены и ветсанэкспертизы,
доктор биологических наук, профессор

 А.В.Андреева