

На правах рукописи



ЛАРТОН РОСТИСЛАВ РУСТАМОВИЧ

**РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНО-ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ (ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ) ДЛЯ
ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ РЕСПИРАТОРНЫХ
ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ (ИНФЕКЦИОННЫЙ РИНОТРАХЕИТ,
ВИРУСНАЯ ДИАРЕЯ, ПАРАГРИПП-3)**

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

Автореферат

на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Казань – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э.Баумана»

Научный руководитель: **Алимов Азат Миргасимович**
доктор ветеринарных наук, профессор,
заслуженный деятель науки РТ, лауреат
премии Правительства РФ в области науки и
техники

Официальные оппоненты: **Капустина Ольга Владимировна**
доктор ветеринарных наук, ведущий
научный сотрудник лаборатории
иммунологии ФГБНУ «Федеральный
научный центр - Всероссийский научно-
исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии имени К.И.
Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН»

Александрова Наталья Михайловна
кандидат биологических наук, старший
научный сотрудник НИЛ «Структурная
биология» Института фундаментальной
медицины и биологии ФГАОУ ВО
«Казанский (Приволжский) федеральный
университет»

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский
государственный университет ветеринарной
медицины»

Защита состоится «30» июня 2022 года в 13⁰⁰ часов на заседании
диссертационного совета Д 220.034.01 при ФГБОУ ВО «Казанская
государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»
(420029, г. Казань ул. Сибирский тракт, 35)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО
«Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э.
Баумана» на сайтах <http://www.vak.ed.gov.ru> и <https://kazanveterinary.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2022 года

Ученый секретарь диссертационного совета

А.М. Ежкова

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Патология органов дыхания молодняка КРС остается наиболее главной причиной экономических потерь в сфере животноводства, которые складываются из нарушений воспроизводства, отставания в росте и развитии телят, их гибели и недополучения продукции от больных и переболевших животных, а также затрат на профилактику и терапию (Брылин 2013., Гаффаров., 2014, Петрова., 2020).

В отдельных хозяйствах гибель телят в совокупности с вынужденным убоем достигает 40 - 55%, а окупаемость корма у больных и переболевших животных снижается в 2 - 3 раза (Мищенко, 2003).

Успешная борьба с респираторными инфекциями КРС во многом зависит от быстрой и правильно проведенной диагностики, основанной на применении высокоспецифичных тест - систем, создания высокоактивных моно - ассоциированных вакцин с учетом современных достижений науки биотехнологии.

Следовательно, разработка и усовершенствование средств и методов лабораторной диагностики и специфической профилактики респираторно-кишечных инфекций крупного рогатого скота, а также внедрение их в ветеринарную практику все еще остаются в центре внимания современного научного поиска (Брылин 2013., Мищенко., 2003., Схатум., 2016).

В связи с этим весьма актуальным является разработка новых и совершенствование существующих методов лабораторной диагностики инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3 и вирусной диареи крупного рогатого скота.

Это обусловлено тем, что профилактику и лечение любого инфекционного заболевания значительно облегчает ранняя и точная идентификация возбудителя. С этой целью разработаны и широко применяются иммунологические и вирусологические исследования. Однако они имеют ряд существенных недостатков: трудоемкость, длительность, невысокая специфичность и т.д.

Благодаря достижениям молекулярной биотехнологии появилась возможность обнаружения и выявления геномов возбудителей методом ПЦР, которая обладает высокой специфичностью и чувствительностью. Появилась возможность амплификации специфических фрагментов геномов не только отдельных возбудителей, но и одновременно нескольких.

Мультиплексная ПЦР позволяет выявить наличие геномов нескольких возбудителей одновременно за 2-4 часа. Однако данная технология для индикации и идентификации возбудителей ИРТ, ВД И ПГ-3 остается недостаточно разработанной и не получила практического применения, т.к. отсутствуют соответствующие праймеры, не разработаны режимы проведения амплификации.

С учетом изложенного изыскание олигонуклеотидных праймеров для одновременной индикации и дифференциации геномов возбудителей наиболее часто регистрируемых респираторных вирусных инфекций мультиплексной

полимеразно-цепной реакцией является одной из первостепенных задач для быстрого принятия мер по профилактике и лечению возникших инфекций.

Цель и задачи исследования. Целью исследования явилась разработка мультиплексной полимеразно-цепной реакции (обратная транскрипция) для лабораторной диагностики респираторных вирусных инфекций (инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея, парагрипп-3).

Для достижения поставленной цели были выдвинуты следующие задачи:

1. Провести анализ нуклеотидных последовательностей геномов возбудителей легочных заболеваний (ИРТ, ПГ-3, ВД) животных и изыскание специфичных мультикопийных маркерных участков их геномов.

2. Конструирование видоспецифичных праймеров и зондов к вышеуказанным возбудителям, имеющих единую температуру «отжига» и режим амплификации.

3. Создание ПЦР тест-систем для индикации искомых геномов возбудителей респираторных инфекций крупного рогатого скота.

4. Определить специфичность и чувствительность мультиплексной ПЦР при индикации геномов ИРТ, ПГ-3, ВД.

5. Провести лабораторные испытания мультиплексных ПЦР тест-систем, позволяющих одновременно выявлять в биологических пробах геномов вышеперечисленных возбудителей.

Научная новизна. На основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей исследуемых вирусов установлены наиболее консервативные локусы у каждого вида возбудителя, которые могут быть использованы в качестве маркерных фрагментов.

Разработаны оптимальные условия проведения режима мультиплексной ПЦР. Установлено, что каждый из этих локусов обеспечивает проведение ПЦР с положительным эффектом для используемых возбудителей респираторных вирусных инфекций.

Разработана технология проведения мультиплексной ПЦР, обеспечивающая одновременную индикацию возбудителей респираторных инфекций (ИРТ, ПГ-3, ВД) в биологических объектах.

Теоретическая и практическая значимость. Впервые разработаны технологии проведения мультиплексной ПЦР, обеспечивающей одновременное выявление наличия геномов возбудителей ИРТ, ПГ-3 и ВД у крупного рогатого скота.

Результаты исследований расширяют существующие представления по амплификации геномов возбудителей респираторных вирусных инфекций и могут быть использованы в индикации и идентификации возбудителей, а так же в учебном процессе при изучении курса ветеринарной медицины в животноводстве.

Результаты исследований представляют теоретическую и практическую ценность, так как дают возможность повышать эффективность и экспресс диагностику респираторных вирусных инфекций крупного рогатого скота.

Апробация работы. Материалы ежегодных исследований были доложены при работе семинаров и научных конференций:

1. 2-ая Всероссийская школа-конференции молодых ученых, г. Казань КФУ, (7 - 9 ноября 2019 г).

2. Международная научная конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. (Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны) 24-25 ноября 2020, г. Санкт Петербург, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины.

Участие в научных проектах, грантах:

1. Участие в конкурсе «50 лучших инновационных идей в республике Татарстан» 2019, 2020 г.;

2. Внутривузовский конкурс на соискание молодежных научно-исследовательских грантов ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, 2020, 2021 г.;

3. Конкурс на получение стипендии молодых ученых и аспирантов МСХиП РТ, 2020 г. (Стипендия присвоена).

Личный вклад соискателя. Соискатель принимал непосредственное участие в планировании и постановке научных экспериментов, получении, обработке и интерпретации экспериментальных данных, анализе научной литературы, подготовке публикаций по выполненной работе.

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.

Основные положения, выносимые на защиту.

- впервые выявлены последовательности нуклеотидов наиболее консервативных локусов геномов возбудителей респираторных инфекций крупного рогатого скота (ИРТ,ПГ-3,ВД), пригодные для амплификации в качестве маркерных локусов при их индикации и идентификации.
- созданы соответствующие праймеры и зонды, оптимизированны условия и режим проведения мультиплексной ПЦР, обеспечивающей одновременную индикацию и идентификацию геномов возбудителей (ИРТ,ПГ-3,ВД) в биологических объектах в реальном времени.
- разработана мультиплексная ПЦР, обеспечивающая одновременное выявление 3-х возбудителей в исследуемых пробах с чувствительностью 1 геном-эквивалент в 0,1 мкл плазмидной ДНК.
- в биологических жидкостях и патологоанатомическом материале от больных и павших животных выявлялось смешанное течение респираторных инфекций.

Объем и структура диссертационной работы. Диссертационная работа изложена на 106 страницах компьютерного текста, включает: введение, обзор литературы, собственные исследования, заключение, практические предложения, список использованной литературы, приложения. Список литературы включает 178 источника, в т.ч. 85 отечественных и 93 иностранных. Диссертация иллюстрирована 7 рисунками и 5 таблицами.

2.1 Материалы и методы исследований

Научно-исследовательская работа проводилась с 2017 по 2021 гг. на кафедре биологической химии, физики и математики ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана».

Тест-система предназначена для выявления и идентификации ИРТ, ПГ-3, ВД-БС в биологическом материале (крови, молоке КРС, паренхиматозных органах и культуре клеток).

В работе использовали возбудителей – вирусной диареи (штамм ВК1), парагриппа3 (штамм АД-3), инфекционного ринотрахеита (штамм ТК-А)

Отбор материала для исследования

При отборе материала, а также при подготовке проб для исследования соблюдали меры, предупреждающие обсеменение объектов внешней среды и обсеменение исследуемых образцов, руководствуясь при этом действующими правилами и инструкциями по данному вопросу.

Все работы по сбору, транспортированию и подготовке проб клинического и секционного материала осуществляют в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.1285 – 03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

Материал от каждого животного отбирали отдельными стерильными инструментами.

Для проведения исследований использовали следующие биологические материалы.

- Артериальная кровь в количестве от 3х до 5 мл. Забор крови проводили в вакуумные пробирки типа Vacuette®, с 6%-ным раствором ЭДТА из расчета 50 мкл ЭДТА на 1 мл крови. Закрытую пробирку с кровью, после взятия несколько раз аккуратно переворачивали, для равномерного распределения антикоагулянта и перемешивания содержащегося консерванта.
- Молоко крупного рогатого скота - без термической обработки.
- Патологический материал из паренхиматозных органов и лимфоузлов для проведения ПЦР отбирали у животных в количестве 1-2 г
- При исследовании культур клеток инфицированных возбудителем осуществляли отбор материала объемом около 1мл.

Биологический материал доставляли в лабораторию в термосе со льдом в течение суток. Поступивший материал в замороженном состоянии хранили при температуре минус 20°C. При необходимости производилось однократное замораживание-оттаивание материала.

Предварительная обработка материала:

Все манипуляции, связанные с подготовкой проб, проводили с использованием стерильных ступок, пестиков, инструментов (ножниц, пинцетов, скальпелей), пипеточных дозаторов переменных объемов, одноразовых наконечников с аэрозольным барьером, одноразовых полипропиленовых пробирок на 1,5 мл и 10,0 мл.

Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) сбрасывали в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 5%-ный раствор

хлорамина Б или 5% раствор едкого натрия. Затем их утилизировали. Ступки, пестики и инструменты обрабатывали согласно СП 1.3. 1285–03.

Пробы крови непосредственно перед исследованием гомогенизировали, далее подвергали дальнейшему исследованию (выделение ДНК и РНК).

Из проб молока подвергали выделению нуклеиновых кислот после обезжиривания. Паренхиматозные органы и лимфоузлы тщательно растирали в гомогенизаторах или с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, добавляли равный объем (не менее 100 мкл) стерильного физиологического раствора и тщательно перемешивали.

Суспензию выдерживали при комнатной температуре в течение 2-3 мин, затем верхнюю фазу переносили в пробирки вместимостью 1,5 мл и использовали для окончательной обработки (выделение ДНК и РНК). Инфицированные вирусом культуры клеток использовали для выделения нуклеиновых кислот в нативном виде.

Выделение нуклеиновых кислот.

Для выделения нуклеиновых кислот использовали набор «Рибо-сорб» или «Рибо-преп» изготовитель (ИнтерЛабСервис) или другим аналогичным способом выделения РНК.

Экстракцию ДНК И РНК проводили в соответствии с рекомендациями производителей наборов.

Оборудование и расходные материалы.

ПЦР-анализ проводился в два этапа в отдельных помещениях (зонах):

- a) подготовка проб и выделение НК;
- b) постановка ПЦР.

Зона 1 - для выделения НК из исследуемого материала:

- комплект реактивов для проведения ПЦР (Taq-полимераза, смесь dNTP, MgCl₂, ПЦР-буфер, праймеры.

- набор реактивов для секвенирования BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

- ламинарный бокс (класс биологической безопасности II тип А).

- твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.

- вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надсадочной жидкости.

- микроцентрифуга для микропробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин.

- вортекс.

- набор электронных или механических дозаторов переменного объема.

- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 100 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл.

- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл.

- одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся микропробирки на 1,5 мл.

- штативы для микропробирок объемом 1,5 мл и наконечников.
- холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
- спец.одежда и одноразовые перчатки.

Зона 2 - для проведения амплификации НК:

амплификатор («RotorGene» 3000/6000, «Corbett Research», Австралия; «iCycler iQ» или «CFX96», «Bio-Rad» , США; детектирующий амплификатор ДТ 96 «ДНК-технологии» Россия).

- ПЦР-бокс.
- набор электронных или механических дозаторов переменного объема.
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 100 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл.
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл.
- штативы для наконечников.
- холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
- спец. одежда и одноразовые перчатки.

Программное обеспечение и удаленные сервисы

На различных этапах биоинформационного анализа и дизайна олигонуклеотидных последовательностей использовали следующее программное обеспечение и удаленные сервисы: «CFX Manager»; «Vector NTI» с имеющимися аналитическими инструментами; ресурсы NCBI (nucleotide, gene, genome); ресурсы BLASTN.

2.2 Анализ нуклеотидной последовательности геномов возбудителей легочных заболеваний

Для анализа генетического полиморфизма и поиска консервативных участков геномов возбудителей инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, и вирусной диареи (болезни слизистых крупного рогатого скота) был создан собственный банк геномов выше указанных вирусов, включающий соответственно 7, 10 и 14 изолятов каждого вида вируса.

В результате выравнивания олигонуклеотидных последовательностей геномов каждого из вирусов выявили консервативные участки. У возбудителя инфекционного ринотрахеита в геноме HV тип 1 штамм Соорер консервативный локус находился на участке генома соответствующего 4716 - 4846 пар оснований нуклеотида (bp).

У вируса парагриппа-3, изолят Egypt2014 консервативный локуса находился на участке генома соответствующего 2820 - 2910 bp. Для вируса вирусной диареи (болезни слизистых крупного рогатого скота), изолят Carlito

консервативный локус находился на участке генома соответствующего 84 - 204 bp.

Установление локализации последовательностей консервативных локусов генов актуально для варианта «Consensus», при выравнивании нуклеотидных последовательностей.

В результате дизайна праймеров и зондов для ПЦР были определены нуклеотидные последовательности в рамках указанных выше консервативных локусов, которые представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Нуклеотидный состав для наиболее перспективных последовательностей для исследуемых возбудителей

Наименование возбудителя	Нуклеотидная последовательность
Парагрипп-3	Acaagtaagaaaaacttaggattaacgggaattatccaatccgga gacggaggagacaatccagaatccacccacgaccaaccaaac aaagattcatggaaaacaatgctaaagacaatcaatcatggattc ttgggaagagggatcaggagacaagtcattctgacatctcatcggc cctcgacatc
Вирусная диарея	agcgaaggccgaaaaagaggcuagccaugcccuuaguaggac uagcaaaacaaggagggguagcaacaguggugaguucguug gauggcugaagcccugaguacagggguagucgucagugguu cgacgcuuugugcgacaagccucgagaugccacguggacga gggcaugcccacagcacauua
Инфекционный ринотрахеит	ctgtgcccgtgcgtgtagacaggcaagtagcggctcatggcctc ggcgacgatgcccttgagcgtgggg

Нуклеотидные последовательности созданных праймеров и зондов обобщены в таблице 2.

Таблица 2 - Нуклеотидная последовательность разработанных праймеров и зондов для генетической идентификации возбудителей вирусных респираторных заболеваний к.р.с. (ИРТ, ПГ-3, ВД)

Условные обозначения праймеров	Последовательность 5' -> 3'
BPG31F	Ttcccaagaatccatgatttgatagt
BPG31R	Aacaaataagaaaaacttaggattaacgga
BPG31Z	Fam-atgtcgagggccgatgagatgtcagatg-BHQ1
BPG32F	Cagaaaggcgattacattattacaga
BPG32R	Tcttcgatgcagtatccgcatt
BPG32Z	Fam-cattcgccacacacacaactctcttgcttg-BHQ1
BVDV1F	Cgaaggccgaaaaagaggcta

BVDV1R	Cgaaccactgacgactaccctg
BVDV1Z	R6G-agtggtgagttcgttgatggctgaag-BHQ2
BVDV2F	Agcggcgggagcatgtggat
BVDV2R	Cacacaggccacaagggaacg
BVDV2Z	R6G-cgatgcaacgcgaagaaccttacctggg- BHQ3
BHV11F	Ctgtgcccgtgcgtgtagac
BHV11R	Cccacgctcaagggcatc
BHV11Z	CY5-tagcggctcatggcctcggcg-BHQ3
BHV12F	Aggctgtcggcaggacga
BHV12R	Tgcggctgcccgtagc
BHV12Z	CY5-ccaaacacgtagggcgcgggcag-BHQ3
BkappaF	Cttggcaggcacagtatttgaca
BkappaR	Attactaccaacagaaaccagttgcac
BkappaZ	CY5-ttgaagaatttgggcaggtgacctaacctg-BHQ3

Кроме этого производили дизайн праймеров и зондов для возможного использования в качестве внутреннего контроля амплификации.

Экспериментально была установлена оптимальная температура отжига для всех праймеров, которая составляла 56°C, что позволило реализовать возможность сочетания тест-систем в мультиплексном формате.

2.3 Создание ПЦР тест-систем для индикации геномов возбудителей респираторных заболеваний к.р.с. вирусной природы

Создание ПЦР тест-систем подразумевало попытку практического применения созданных нами олигонуклеотидных затравок для индикации геномов возбудителей респираторных заболеваний к.р.с. вирусной природы в реальных условиях.

Для осуществления этой конструкции необходимо наличие ДНК-матрицы, на нуклеотидной последовательности которой возможен отжиг созданных праймеров и синтез комплементарной цепи ДНК в требуемых для ПЦР-РВ параметрах (возможность практического осуществления ПЦР реакции).

Для получения такой ДНК-матрицы самым точным методом является создание искусственной молекулы ДНК в нуклеотидной последовательности, которой содержится искомым нами генетический код (модифицированная плазмидная ДНК).

Другими словами для создания ПЦР тест-систем пригодных для индикации геномов возбудителей респираторных заболеваний к.р.с. вирусной природы необходимо иметь специфичные олигонуклеотидные затравки, компоненты реакции (в правильной пропорции), заведомо положительную ДНК-матрицу и оптимальную программу амплификации. Идеальное исполнение всех указанных пунктов являлось основой для создания тест-системы.

На основании экспериментов для контроля амплификации был произведен дизайн, и осуществлен синтез кольцевых молекул ДНК (плазмид), включающих в себя амплифицируемые последовательности ДНК.

Опытным методом были определены реакционная смесь и условия проведения реакции, обессточивающие эффективное накопление продуктов амплификации для всех исследуемых возбудителей вирусов.

В окончательном варианте они были следующие.

1) Реакционная смесь, в расчёте на одну пробирку:

- dNTP - 1,5 мкл;
- 10*ПЦР буфер Б - 1,5 мкл;
- Syn Taq ДНК-полимераза – 0,5 мкл;
- MgCl₂ – 1,5 мкл;
- dd H₂O – 3,5 мкл;
- флуоресцентный зонд (типа Taq Man), 10 пкмоль/мкл – 0,5 мкл;
- смесь праймеров, 10 пкмоль/мкл каждого – 0,5 мкл;
- MMLV ревертаза – 0,2 мкл;
- Образец ДНК – 5 мкл.

2) Условия проведения ПЦР состояли из следующих этапов:

1. 37°C – 30 мин
2. 95°C - 300 сек
3. 95°C - 5 сек
4. 56°C - 30 сек, детекция, переход на шаг №3 (40 повторов)

Таким образом были установлены все условия и пропорциональный состав ПЦР тест-систем для индикации каждого из изучаемых биопатогенов методом одиночной ПЦР в режиме реального времени с одновременной обратной транскрипцией вирусной РНК, в той же реакционной смеси.

В проведенных опытах установлено, что тест-системы не дают положительной (неспецифической) реакции с ДНК крупного рогатого скота, в ресурсах национально центра биологической информатизации гомологичных с амплифицируемыми последовательностями локусов не обнаружено.

Чувствительность тест-систем определялась путем десятикратных разведений препарата плазмидной ДНК для индикации вирусной диареи КРС, инфекционного ринотрахеита и парагриппа3. Стабильная амплификация наблюдалась при разведении 1:10¹², что составило 1-10 геном эквивалент на реакцию.

2.4 Лабораторные испытания одиночных ПЦР тест систем

При конструировании мультиплексной ПЦР, предварительно были проведены опыты по отработке системы в условиях одиночных ПЦР. Для этого были выделены наиболее консервативные участки локусов исследуемых возбудителей. К ним относились BPG32; BVDV1 и BHV11 соответственно.

Исходя из выше описанных действий, реакционная смесь имела следующий состав:

- dNTP - 1,5 мкл;

- 10*ПЦР буфер Б - 1,5 мкл;
- Syn Taq ДНК-полимераза – 0,5 мкл;
- MgCl₂ – 1,5 мкл;
- dd H₂O – 3,5 мкл;
- флуоресцентный зонд (Taq Man), 10 пкмоль/мкл – 0,5 мкл;
- для каждого искомого вируса индивидуальный праймер, – 0,5 мкл;
- MMLV ревертаза – 0,2 мкл(для Рнк содержащих возбудителей);
- Образец ДНК – 5 мкл.

Условия проведения ПЦР, аналогичны описанным выше. На рисунках 1,2,3 результаты одиночных ПЦР в реальном времени.

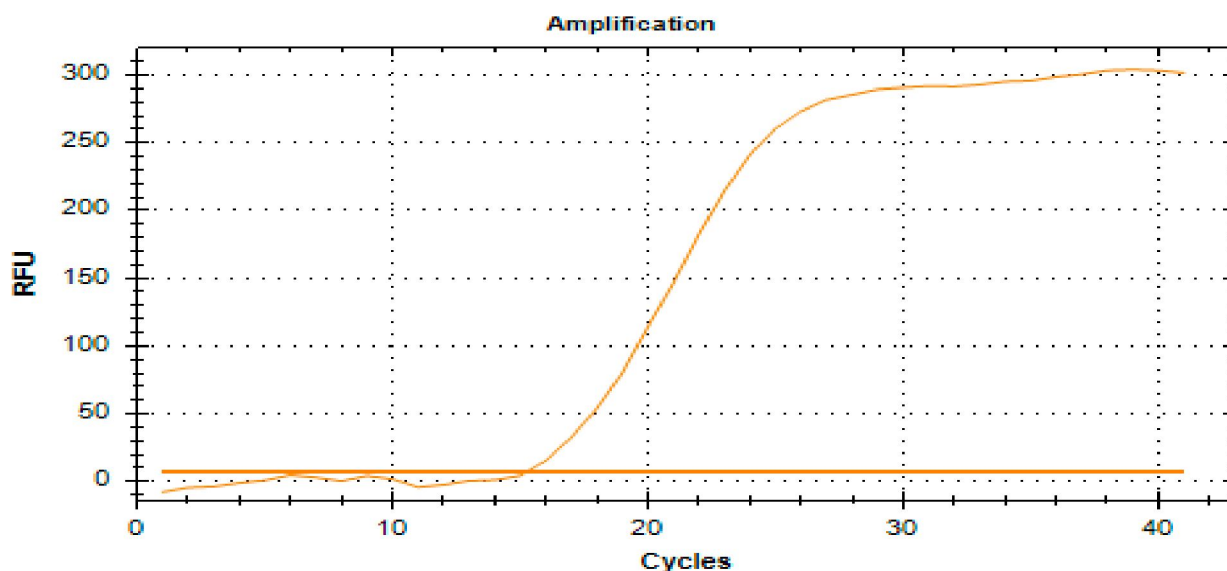


Рисунок 1 - Накопление продуктов амплификации на канале Cy5.

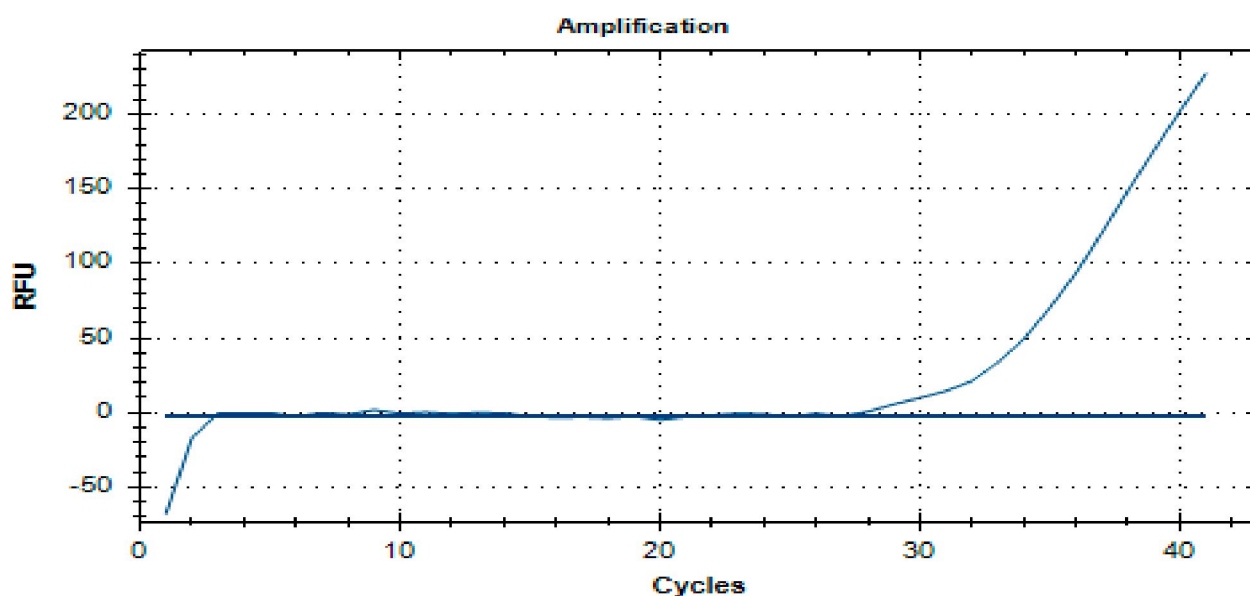


Рисунок 2 - Накопление продуктов амплификации на канале R6G.

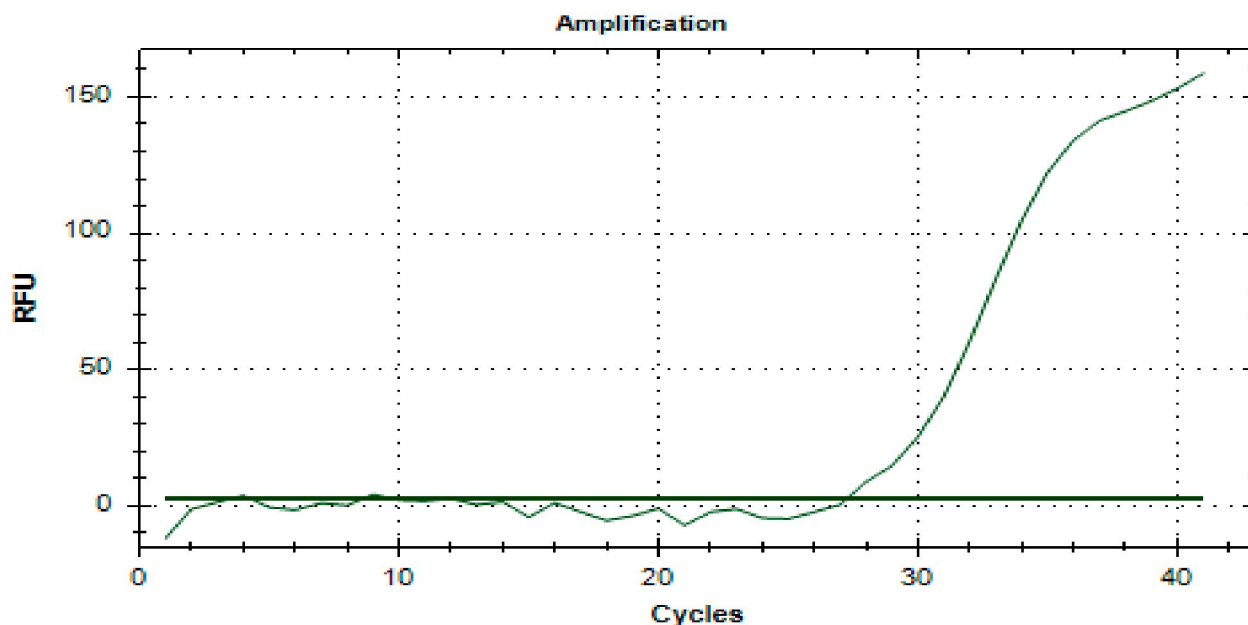


Рисунок 3 - Накопление продуктов амплификации на канале FAM.

Каналу Cy-5 соответствовала флуоресцентная метка возбудителя вируса инфекционного ринотрахеита, каналу R6G возбудитель вирусной диареи, каналу FAM возбудитель парагриппа-3 соответственно.

Анализируя полученный результат приступили к созданию мультиплексной ПЦР.

2.5 Создание и лабораторные испытания мониторинговых мультиплексных ПЦР тест-систем

Основываясь на результатах создания моно-тест-систем для индикации вирусов ИРТ, ВД, и ПГ-3 было выявлено, что максимальной эффективностью амплификации ДНК мишени обладали следующие комплексы олигонуклеотидных затравок: BPG32; BVDV1 и BHV11 соответственно.

Успешность объединения тест-систем в мультиплексный формат зависило от правильного соотношения компонентов реакционной смеси, при этом реакционная смесь состояла из общих компонентов и специфических.

Общие компоненты реакционной смеси применялись в неизменных соотношениях, а именно, в расчёте на одну пробирку:

- 2.5 mM dNTP - 1,5 мкл;
- 10*ПЦР буфер Б - 1,5 мкл;
- Syn Taq ДНК-полимераза – 0,5 мкл;
- 25 mM MgCl₂ – 1,5 мкл;
- dd H₂O – 1,5 мкл;
- MMLV ревертаза – 0,2 мкл;

Соотношение специфических компонентов подбирались эмпирическим путем. Так наиболее удачное соотношение олигонуклеотидных затравок, для выявления одного из искомых вирусов, обозначено в таблице 3.

Таблица 3 - Соотношение количества олигонуклеотидных затравок для амплификации ДНК-матриц респираторных вирусов к.р.с. в мультиплексном варианте

выявляемая инфекция	Прямой праймер, мкл	обратный праймер, мкл	зонд, мкл
вирусная диарея к.р.с.	0,2	0,2	0,3
парагрипп 3	0,3	0,3	0,4
инфекционный ринотрахеит	0,3	0,3	0,4

В приготовленную реакцию смесь вводили 5 мкл препарата нуклеиновых кислот. Условия проведения ПЦР были те же, что и для отдельной ПЦР.

В проведенных опытах установлена специфическая амплификация с использованием целевых праймеров на ДНК-матрице положительного контрольного образца в мультипраймерной реакционной смеси (в качестве ДНК-матрицы выступала нуклеиновая кислота на один из искомым возбудителей). Результаты одной из амплификаций представлены на рисунке 4.

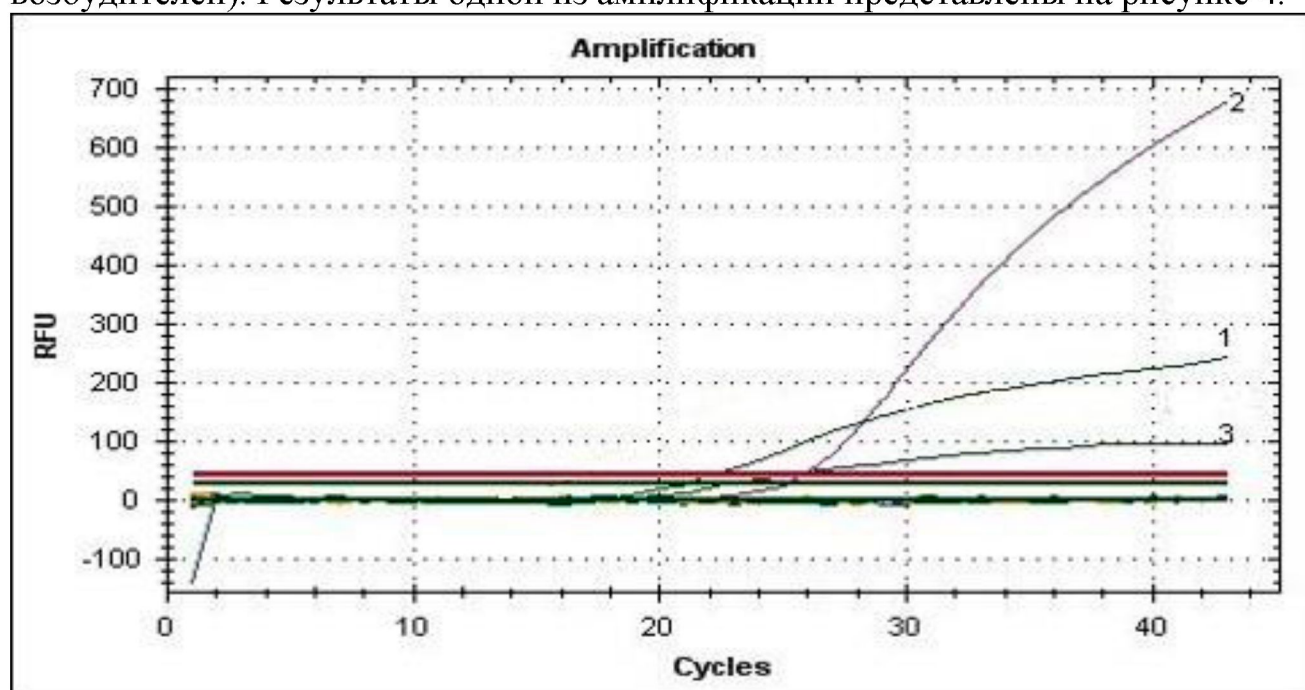


Рисунок 4 - Амплификация ДНК-маркеров легочных заболеваний к.р.с. вирусной природы в режиме реального времени

Обозначения: 1 мультиплексная реакционная смесь, в качестве ДНК-матрицы выступает плазмидная ДНК со вставкой специфичного локуса вируса парагриппа-3; 2 мультиплексная реакционная смесь, в качестве ДНК-матрицы выступает ДНК вируса инфекционного ринотрахеита; 3 мультиплексная реакционная смесь, в качестве ДНК-матрицы использовалась плазмидная ДНК со вставкой специфичной для вирусной диареи к.р.с.;

В ПЦР установлено, что смесь олигонуклеотидных затравок при взаимодействии с одним из ДНК-маркеров не препятствует накоплению специфических продуктов амплификации. Каждому биологическому патогену соответствовала индивидуальная флуоресцентная метка: для возбудителя вирусной диареи к.р.с. это канал R6G, для возбудителя парагриппа3 канал Fam и для возбудителя инфекционного ринотрахеита канал Cy5.

Таким образом, нами продемонстрирована возможность проведения одновременной ПЦР для выявления геномов искомым возбудителей.

2.6 Лабораторные испытания мультиплексных ПЦР тест-систем для установления их специфичности и чувствительности при единовременной индикации геномов ИРТ, ПГ-3, ВД

Для установления их специфичности и чувствительности мультиплексных ПЦР тест-систем при единовременной индикации геномов ИРТ, ПГ-3, ВД было необходимо изначально определить: какой итоговый состав должна иметь тест-система. Порядок использования данной тест-системы и интерпретация полученных результатов заключалось в следующем:

Определили конечный состав компонентов тест-системы для индикации геномов возбудителей ИРТ, ПГ-3, и ВД к.р.с. методом ПЦР-РВ.

1) Разработанная тест-система имела следующий состав:

- комплект для выделения РНК и ДНК из проб
- комплект для ПЦР-амплификации НК в режиме реального времени.
- комплект контрольных образцов.

Комплект для ПЦР-амплификации НК в режиме реального времени состоит из следующих компонентов:

ПЦР-смесь 1,	10 пробирок (по 10 реакций, каждая)
ПЦР-смесь 2,	10 пробирок (по 10 реакций, каждая)
Буферная смесь	2 пробирки (по 100 реакций, каждая)
Ферментная смесь	1 пробирка, на 200 реакций

Комплект контрольных образцов, состоит из следующих компонентов:

ПКО1 ДНК маркерной области возбудителей ИРТ и ВД, 1 пробирка 0,17 мл.;

ПКО2 ДНК маркерной области возбудителей ПГ-3, 1 пробирка 0,17 мл.;

ОКО (отрицательный контрольный образец), 1 пробирка 0,2 мл.

Для определения специфичности был произведен следующий порядок действий: определение всех маркерных последовательностей для анализа на специфичность «in silico» как олигонуклеотидные, так и продукты амплификации; определение характера гибридизации олигонуклеотидных затравок в программе «Vector NTI 9.1»; определение специфичности выбранных маркеров в программе «BLASTN 2.7.1+»; ПЦР-РВ с гетерологичными нуклеиновыми кислотами респираторных заболеваний к.р.с. Так «in silico», была определена специфичность каждого из праймеров, и их комбинаций, на предмет неспецифических реакций с геномом любого микро- и макро-организма. Так же проведена ПЦР с нуклеиновыми кислотами не искомым возбудителей респираторных заболеваний крупного рогатого скота, из

того же списка респираторных инфекций (ИРТ, ПГ-3 и ВД). Проведенные опыты не выявили возможности для амплификации гетерологичных нуклеиновых кислот, а создаваемая тест-система специфически амплифицирует лишь искомые нуклеиновые кислоты (ИРТ, ПГ-3 и ВД).

Определение чувствительности реакции проводили по следующему порядку действий: установление копийности плазмидной ДНК, исходя из физической массы данного препарата и его величины; приготовление серии десятикратных разведений и практическое определение чувствительности тест-системы в реакции ПЦР-РВ. На основании проведенных аналитических манипуляций и расчетов установили, что чувствительность тест-системы для индикации геномов возбудителей ИРТ, ПГ-3 и ВД к.р.с. методом ПЦР-РВ, составила 5 ДНК копий в реакционной смеси, что является достаточно высокой.

2.7 Оценка эффективности мультиплексной ПЦР тест системы для индикации возбудителей респираторных инфекций к.р.с. в биологическом материале

Для определения эффективности и чувствительности созданной нами тест-системы, была проведена апробация мультиплексной ПЦР с использованием в качестве материала культуры клеток почки эмбрионов телят инфицированных вирусами инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и парагриппа-3 соответственно. Так же использовались носовые истечения исследованные ранее с содержанием смешанных инфекций и культура клеток ПЭТ инфицированная патологическим материалом от павшего теленка. На рисунке 5 обобщены результаты одного из опытов амплификации.

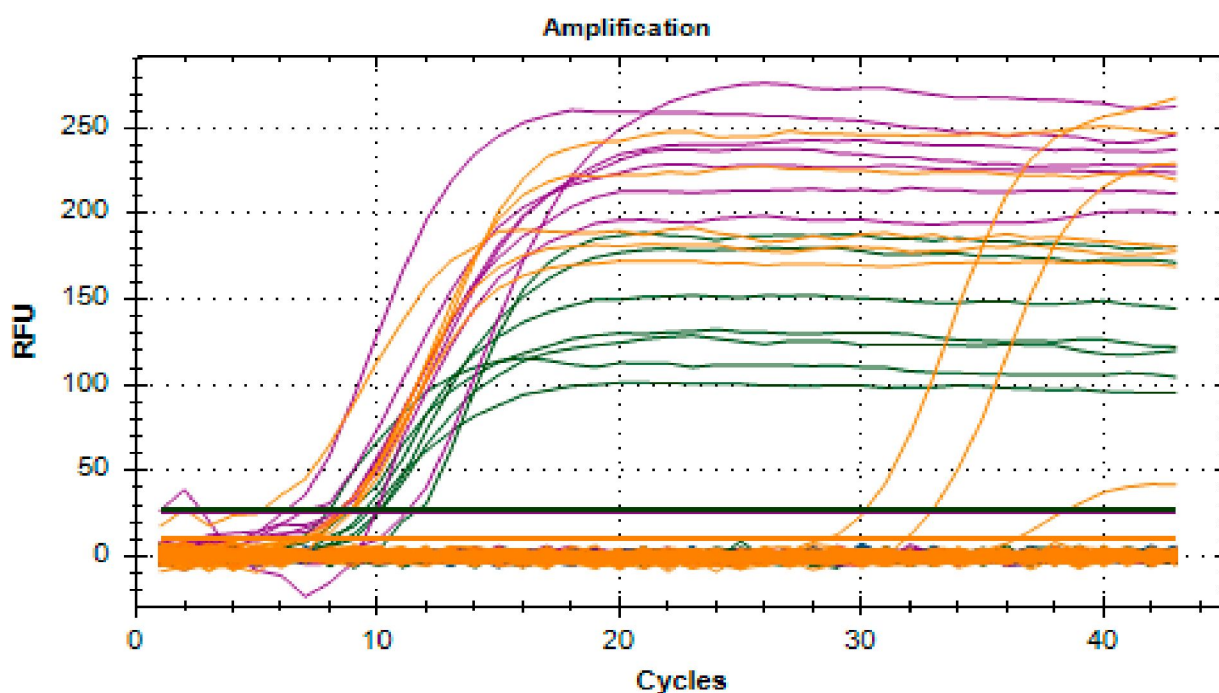


Рисунок 5 - Накопление продуктов амплификации в мультиплексной ПЦР в режиме реального времени

К каналу FAM/Green относился возбудитель инфекционного ринотрахеита, накопление продуктов на канале ROX/Purple относится возбудитель вирусной диареи и на канале R6G/Yellow вирус парагриппа-3 соответственно.

Результат амплификации состоит в следующем:

К первым относился положительный контроль соответствующих возбудителей. Ко 2 каналу культура клеток ПЭТ инфицированная возбудителями. К 3 каналу идут культура клеток ПЭТ инфицированная патологическим материалом от павшего теленка. С 4 по 7 каналы были использованы носовые истечения заболевших телят.

Для тестирования тест системы были использованы пробы из неблагополучных по респираторным инфекциям хозяйств. Материал состоял из носовых истечений, влагалищных истечений, легких, средостенных и мезентериальных лимфоузлов. Проведенные опыты показали, что совместный характер течения болезни при исследовании носовых истечений телят имеют все искомые возбудители. При исследовании влагалищных истечений выявлялись инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи. При исследовании патологического материала легких, так же наблюдали положительный результата амплификации у всех искомых вирусов. Средостенные лимфоузлы содержали в себе вирус инфекционного ринотрахеита, и парагриппа-3. Мезентериальные лимфоузлы дали положительный результат у инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи. Ниже на рисунке 6 приведена диаграмма отображающая количественное соотношение найденных возбудителей в 15 исследуемых биопробах.



Рисунок 6 - Соотношение выявляемых возбудителей в исследуемых пробах.

Исходя из проведенных исследований, можно сделать, вывод, что инфекции респираторного тракта протекают в смешанной форме, о чем свидетельствует одновременное выявление возбудителей в различных материалах. Благодаря одновременной индикации всех искомым вирусом, в будущем возможно принятие быстрых мер по оздоровлению неблагополучных хозяйств.

Анализируя полученные результаты, следует отметить, что при наличии искомым возбудителей накопление продуктов амплификации имело смешанный характер, при этом тест-система позволяла выявлять возбудители безошибочно. Всего было исследовано 72 биопробы, результаты которых отражены в таблице 4.

Таблица 4 - Результаты тестирования биопроб на наличие возбудителей в мультиплексной ПЦР.

№ п/п	Наименование исследуемых материалов	Кол-во проб	Результаты реакции		
			ИРТ	ВД	ПГ-3
1	Культура клеток ПЭК инфицированных ИРТ	10	10	-	-
2	Культура клеток ПЭК инфицированных ВД	10	-	10	-
3	Культура клеток ПЭК инфицированных ПГ-3	12	-	-	12
4	Носовые истечения	15	10	7	9
5	Влагалищные истечения	7	5	3	-
6	Легкие	5	5	2	2
7	Средостенные лимфоузлы	7	5	-	6
8	Мезентериальные лимфоузлы	6	2	3	-

Разработанную мультиплексную тест-систему апробировали при исследовании вышеперечисленных материалов. Анализ полученных данных мультиплексной ПЦР свидетельствует о смешанном течении респираторных инфекций.

Результаты одной из амплификаций влагалищной слизи обобщены в рисунке 7.

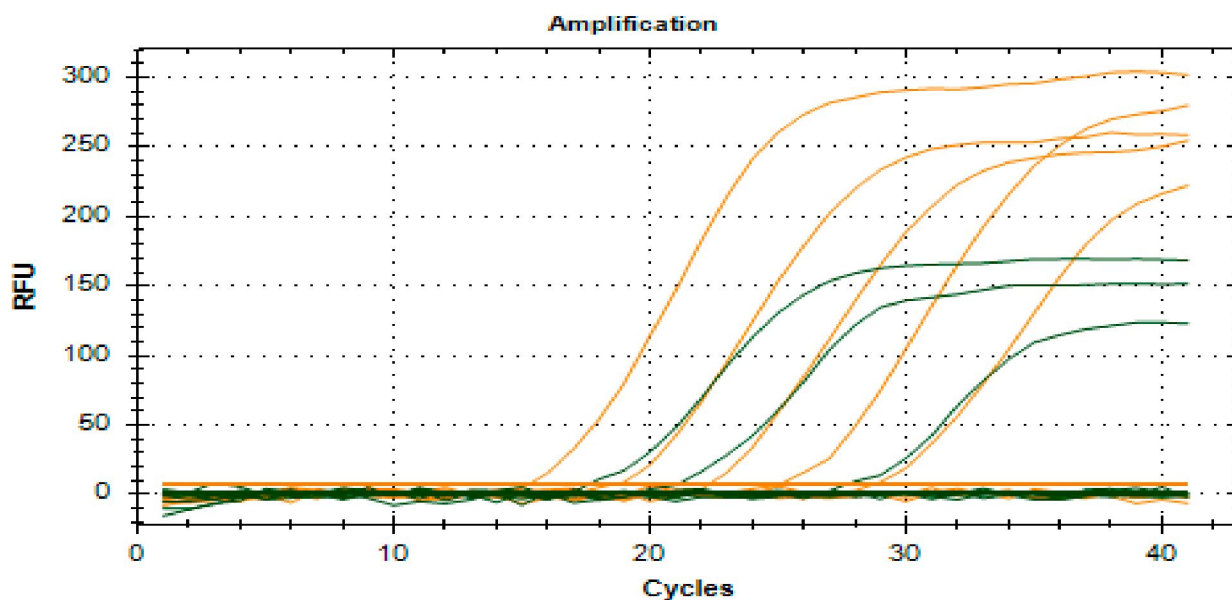


Рисунок 7 - Результаты амплификации при исследовании проб влагалищных истечений.

На канале FAM (желтый цвет) отображены результаты исследования биопроб на выявление возбудителя инфекционного ринотрахеита, на канале ROX(темно-зеленый) отображена реакция возбудителя вирусной диареи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Респираторные инфекции крупного рогатого скота имеют широкое распространение во всем мире и наносят колоссальный экономический ущерб. Особенно широко распространены инфекционный ринотрахеит, парагрипп-3 и вирусная диарея, которые зачастую протекают в виде моно и смешанных инфекций. Возникновению этих инфекций способствует завоз животных – вирусоносителей.

Наличие вирусоносительства и быстрое распространение инфекций, выдвигает необходимость ускоренной экспресс диагностики. В этом аспекте значительный интерес представляет ПЦР, особенно, мультиплексная ПЦР. ПЦР – это способ получения *in vitro* большого числа копий генетического участка ДНК путем многократной амплификации в присутствии термостабильной ДНК-полимеразы, дезоксинуклеотидтрифосфатов, соответствующей буферной системы и олигонуклеотидных затравок-праймеров, определяющих границы амплифицируемого участка.

За последние годы стали разрабатывать методы, позволяющие в одной пробирке амплифицировать сразу несколько различных генетических локусов. Эта методика позволяет сократить время анализа и осуществлять одновременную детекцию многих возбудителей инфекционных болезней, имеющих схожие клинические проявления. Однако до настоящего времени эти методы исследований не получили широкого применения из-за отсутствия соответствующих праймеров для амплификации геномов возбудителей (ИРТ,

ПГ-3, ВД). Для индикации РНК содержащих вирусов, важным является получение ДНК копий искомой РНК с помощью обратной транскриптазы, которая получило название ОТ-ПЦР.

С учетом изложенного целью исследований явилось выявление наиболее консервативных локусов геномов и изыскание олигонуклеотидных праймеров для одновременной амплификации геномов возбудителей наиболее часто регистрируемых респираторных вирусных инфекций КРС мультиплексной полимеразно-цепной реакцией.

Для достижения поставленной цели было необходимо провести анализ нуклеотидных последовательностей геномов возбудителей легочных заболеваний (ИРТ, ПГ-3, ВД) крупного рогатого скота, изыскание специфичных маркерных участков их геномов и оптимизация условий проведения мультиплексной ПЦР. В связи с этим были выдвинуты следующие задачи:

- выявление последовательностей нуклеотидов наиболее консервативных участков геномов возбудителей;
- сконструировать видоспецифичные праймеры и зонды к вышеуказанным локусам возбудителей, имеющих единую температуру «отжига» и амплификации;
- апробировать ПЦР тест-систему для индикации и идентификации искомым геномов возбудителей респираторных инфекций крупного рогатого скота и разработать режим проведения мультиплексной ПЦР;
- провести лабораторные испытания мультиплексной ПЦР тест-системы, позволяющей одновременно выявлять в биологических пробах геномов (ИРТ, ПГ-3, ВД).

В связи с этим проводили анализ нуклеотидных последовательностей исследуемых вирусов по генобанкам и секвенированиям их геномов для установления консервативных участков геномов, что обусловлено достаточно быстрое мутирование их геномов. Для установления генетического полиморфизма и поиска консервативных участков был создан собственный банк геномов. По результатам анализа были выявлены у возбудителя ИРТ – 7, ПГ-3 – 10, ВД – 14 наиболее консервативных участков, которые были апробированы для амплификации в ПЦР.

В качестве мишеней для детекции геномов возбудителей использовали:

- для ИРТ

BHV11	ctgtgcccgtagcgtagac
--------------	----------------------------

- для ПГ-3

BPG32	cagaaagggcgattacattattacaga
--------------	------------------------------------

- для ВД

BVDV1	cgaaggccgaaaagaggcta
--------------	-----------------------------

Следующим этапом исследований явилось создание ПЦР тест-систем с использованием соответствующих олигонуклеотидных затравок. В результате

анализа последовательности нуклеотидов геномов и проведением экспериментов были подобраны соответствующие праймеры обеспечивающие амплификацию специфических участков геномов. Используя подобранные праймеры для каждого возбудителя отработали режим проведения ПЦР. Разработанные условия и режимы амплификации соответствующих локусов геномов при одиночной ПЦР обеспечивали индивидуальное обнаружение исследуемых геномов. В дальнейшем на основании результатов одиночных ПЦР проводили исследования по отработке мультиплексного режима ПЦР в реальном времени.

Для оценки эффективности разработанной тест-системы проводили исследования различных биологических объектов на наличие искомых возбудителей. В качестве биологически проб использовали инфицированных вирусным материалом культуру клеток, биопробы от больных животных (носовые истечения, влагалищная слизь), из патологического материала (легочная ткань, средостенные и мезентериальные лимфоузлы). Всего исследовано 72 пробы биоматериала.

Результаты проведенных исследований показали высокую чувствительность и эффективность разработанной тест-системы.

Анализируя полученные данные установлено смешанное течение ИРТ, ВД, ПГ-3 в пробах биологического материала носовых истечение и легких. Так же наблюдалось смешанное течение ИРТ и ВД в биопробах влагалищных истечений и мезентериальных лимфоузлов. В средостенных лимфоузлах наблюдали сочетанность ИРТ и ПГ-3.

Результаты проведенных исследований позволяют сделать следующие выводы:

1. Впервые выявлены последовательности нуклеотидов наиболее консервативных локусов геномов возбудителей ИРТ, ПГ-3, ВД, пригодные для амплификации в качестве маркерных локусов при их индикации и идентификации.

2. Изысканы соответствующие праймеры и зонды, оптимизированы условия и режим проведения мультиплексной ПЦР, обеспечивающей одновременную индикацию и дифференциация геномов ИРТ, ПГ-3, ВД в биологических объектах в реальном времени.

3. Чувствительность разработанной мультиплексной ПЦР составляет 1 геном-эквивалент в 0,1 мкл плазмидной ДНК.

4. В биологических жидкостях от больных животных и патологоанатомическом материале часто выявлялось сочетанное течение респираторных инфекций, в отдельных пробах обнаруживалось, все три возбудителя и иногда сочетание двух возбудителей, а также единичные случаи.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Для экспресс диагностики респираторных вирусных инфекций крупного рогатого скота и для индикации и идентификации их возбудителей

рекомендуется мультиплексная полимеразно-цепная реакция согласно разработанных нами условий и режима проведения ПЦР.

2. Генотипирование вируса парагриппа-3 рекомендуется проводить согласно «Временным ветеринарным правилам по генотипированию вируса парагриппа-3» одобренных научно-техническим советом академии 11 марта 2021г. (протокол №1) и утвержденных 12 марта 2021 г. ректором ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ Равиловым Р.Х.

Список научных работ опубликованных по теме диссертации

1. Сайфутдинов, Р.Ф. Влияние Стимулина на иммуногенез и резистентность телят при вакцинации ОКЗ / Р.Ф. Сайфутдинов, А.М. Алимов, Р.Р. Лартон // Ученые записки Казанской ГАВМ. – 2017. – Т.230 – С. 126-128*

2. Лартон, Р.Р. Индикация и дифференциация возбудителей респираторных вирусных инфекций крупного рогатого скота мультиплексной ПЦР / Р.Р. Лартон, А.М. Алимов // Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны, г. Санкт Петербург, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины. – 2019. – С. 214-215.

3. Алимов, А.М. Эффективность ПЦР для индикации геномов возбудителей листериоза и респираторных инфекций крупного рогатого скота / А.М. Алимов, Р.Р. Лартон // Материалы 2ой Всероссийской школы-конференции молодых ученых. КФУ. Институт фундаментальной медицины и биологии. – 2019. – С. 131-133.

4. Осянин, К.А. Мультиплексная ПЦР для индикации и дифференциации возбудителей респираторных вирусных инфекций / А.М. Алимов, Т.Х. Фаизов, Р.Р. Лартон // Ученые записки Казанской ГАВМ. – 2020. – Т.244(IV) – С. 111-115*

5. Identification and molecular characterization of bovine parainfluenza virus type 3 isolates – the first report from Russia». Linguisticaantverpiensia, 2021г.Issue-2, с.1086-1096. Achouak Gueriche , A.K. Galilullin, A.Yu. Shaeva, V.G.Gumerov, Mohammed Lamara, I.G. Karimullina, F.M. Nurgaliev, P.V. Sofronov , T.R. Yakupov, A.M. Alimov, E.A. Magdeeva, R.R. Larton

6. Лартон Р.Р., Алимов А.М. Экспресс-индикация возбудителей вирусной диареи, инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3 крупного рогатого скота // Вестник Марийского государственного университета. Серия Сельскохозяйственные науки. Экономические науки.-2022.-№8(1).-С.38-43*

Примечание: *- публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованные ВАК РФ,

**- публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованные Web of Science/Scopus.