

На правах рукописи



ЛАРТОН РОСТИСЛАВ РУСТАМОВИЧ

**РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНО-ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ (ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ) ДЛЯ
ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ РЕСПИРАТОРНЫХ
ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ (ИНФЕКЦИОННЫЙ РИНОТРАХЕИТ,
ВИРУСНАЯ ДИАРЕЯ, ПАРАГРИП-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-З,ВД), пригодные для амплификации в качестве маркерных локусов при их индикации и идентификации.
- созданы соответствующие праймеры и зонды, оптимизированы условия и режим проведения мультиплексной ПЦР, обеспечивающей одновременную индикацию и идентификацию геномов возбудителей (ИРТ,ПГ-З,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), парагриппаз (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 объёмом 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 (Таq-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 «Эплендорф» от 25 до 100 °C.

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

- микр центрифуга для микропробирок типа «Эплендорф» 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 °C.
- 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 °C.
- 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 Cooper консервативный локус находился на участке генома соответствующего 4716 - 4846 пар оснований нуклеотида (bp).

У вируса парагриппа-3, изолят Egypt2014 консервативный локус 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 gacggaggacaaatccagaatccacccacgaccaaccaaacc aaagattcatggaaaacaatgctaaagacaatcaaatcatggattc ttgggaagagggatcaggagacaagtcatctgacatctcatcgac cctcgacatc
Вирусная диарея	agcgaaggccgaaaaagaggcuagcccaugccciuaguaggac uagcaaaacaaggaggguagcaacaguggugagiuucsuiug gauggcugaagcccuugaguacaggguaguucsugcaguggui cgacgssiuugugcacaagccsucgagaugccacguggacga ggcaugcccacagcacausiuia
Инфекционный ринотрахеит	ctgtgcccgtgcgtgttagacaggcaagtagcggctatggcctc 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	Ttcccaagaatccatgatttgatgt
BPG31R	Aacaaataagaaaaacttaggattaacggaa
BPG31Z	Fam-atgtcgagggccgatgagatgtcagatg-BHQ1
BPG32F	Cagaaaggcgattacattttacaga
BPG32R	Tcttcgatcgatccgcatt
BPG32Z	Fam-cattcgccacacacacaactcttgcgtt-BHQ1
BVDV1F	Cgaaggccgaaaagaggcta

BVDV1R	Cgaaccactgacgactaccctg
BVDV1Z	R6G-agtggtagttcggtggatggctgaag-BHQ2
BVDV2F	Agcggcggagcatgtggat
BVDV2R	Cacacaggccacaaggaaacg
BVDV2Z	R6G-cgatgcaacgcgaagaacccttacctggg- BHQ3
BHV11F	Ctgtcccgtagtgcgttagac
BHV11R	Cccacgtcaaggcatc
BHV11Z	CY5-tagcggtcatggcctcgcg-BHQ3
BHV12F	Aggctgtcggcaggacga
BHV12R	Tgcggctgcccgttagc
BHV12Z	CY5-ccaaacacgttagggcgccggcag-BHQ3
BkappaF	Cttggcaggcacagtatttgaca
BkappaR	Attactaccaacagaaaccagtgcac
BkappaZ	CY5-ttgaagaatttggcaggtgacctaactg-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 искомый 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, обесточивающие 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 вириуса 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.

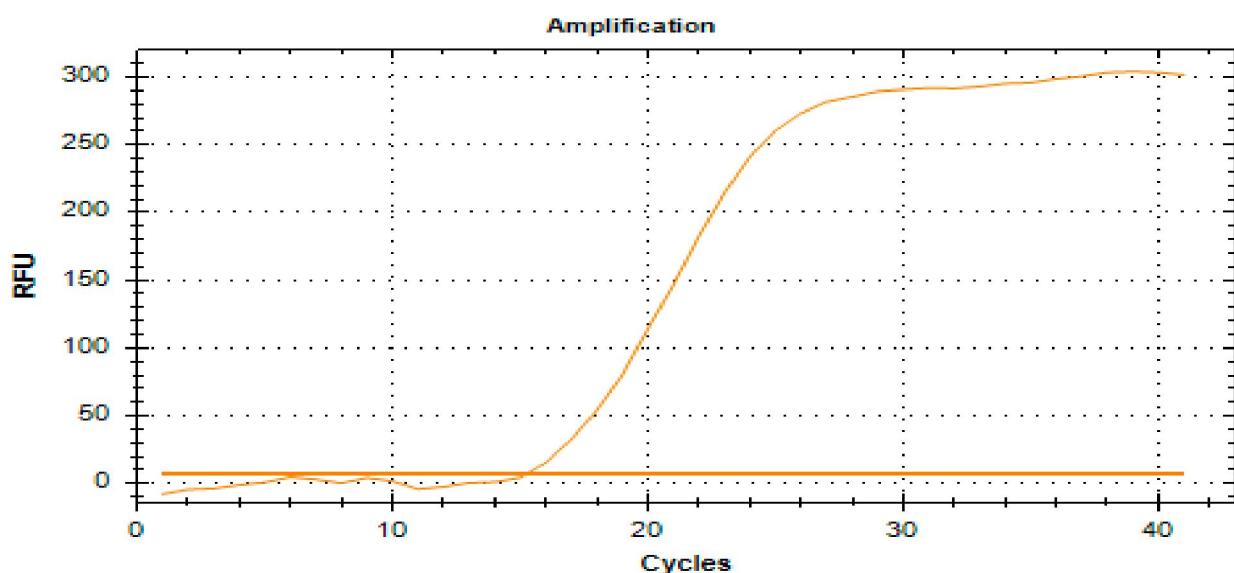


Рисунок 1 - Накопление продуктов амплификации на канале Cy5.

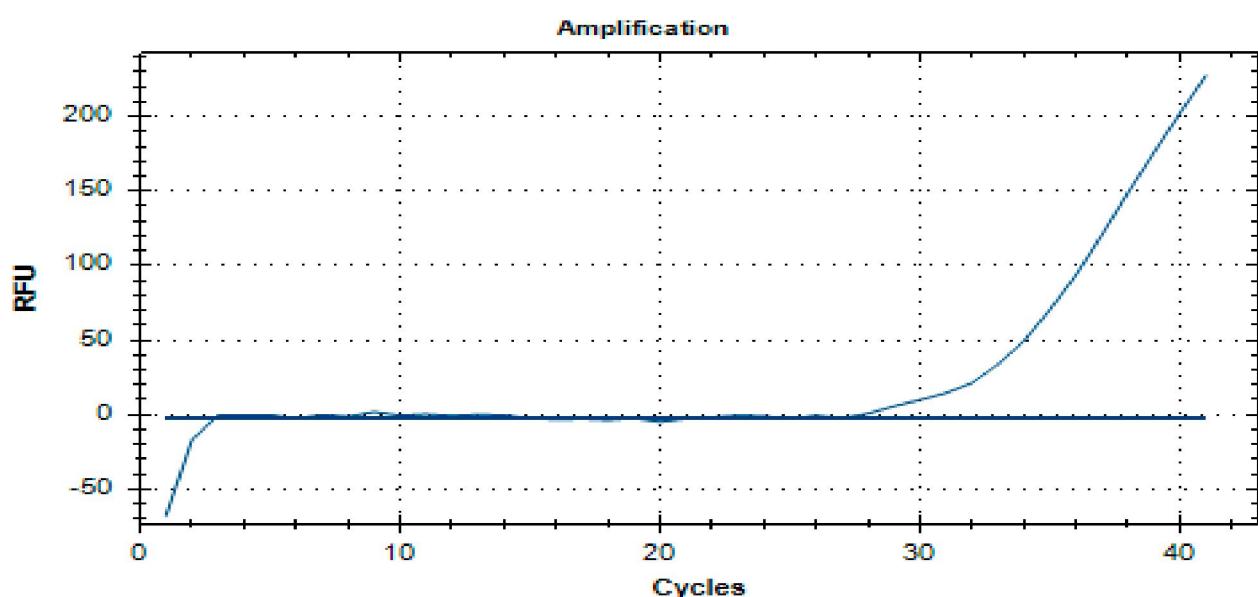


Рисунок 2 - Накопление продуктов амплификации на канале R6G.

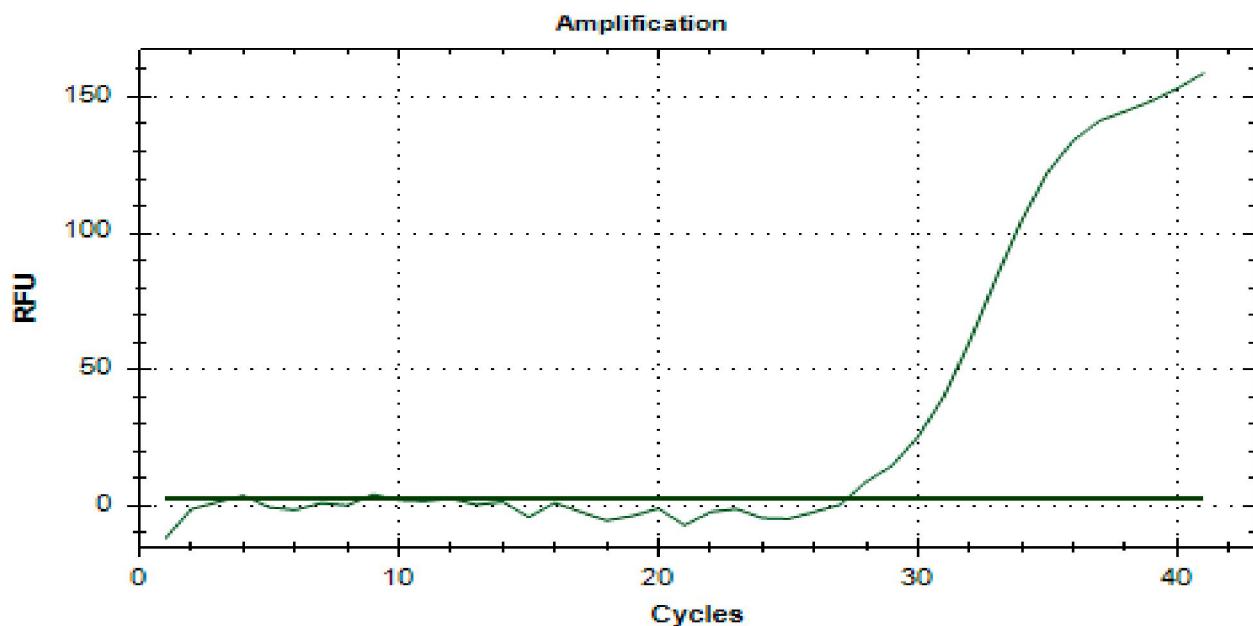


Рисунок 3 - Накопление продуктов амплификации на канале FAM.

Каналу Су-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 зависело 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 реакционную 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 искомых возбудителей). Результаты одной из амплификаций представлены на рисунке 4.

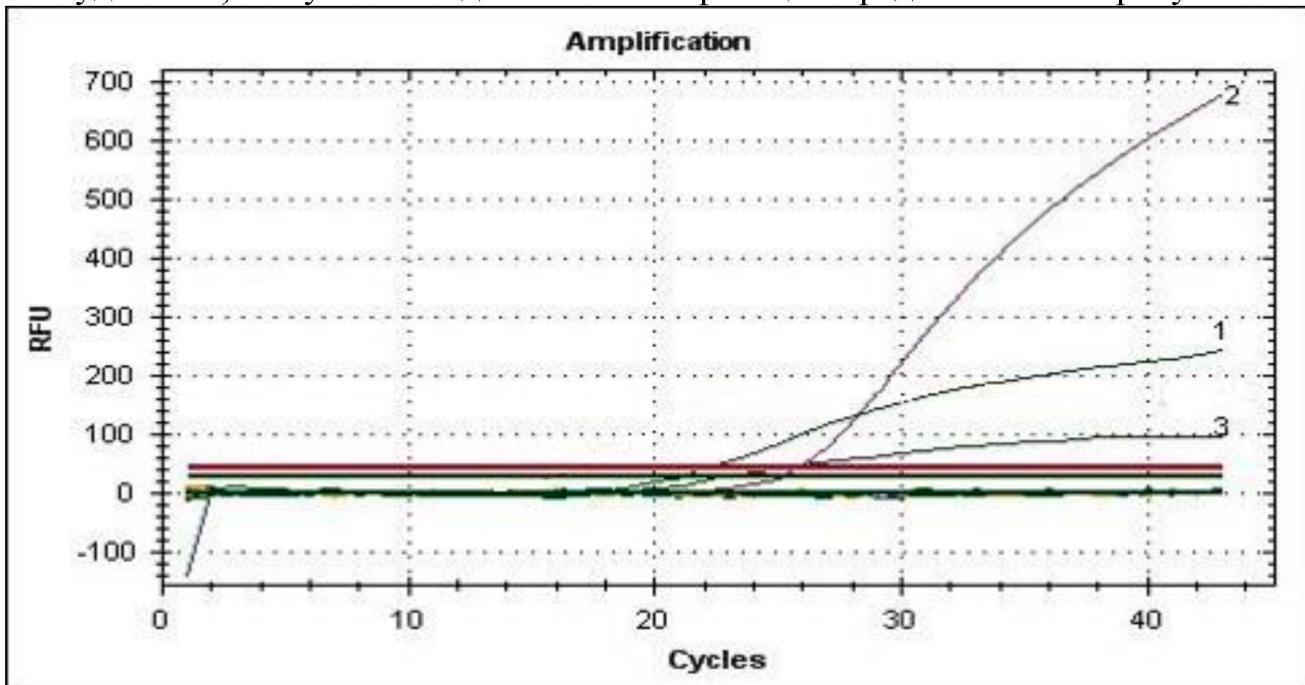


Рисунок 4 - Амплификация ДНК-маркеров легочных заболеваний к.р.с. вирусной природы в режиме реального времени

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 искомых 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 искомых 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 использование 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.

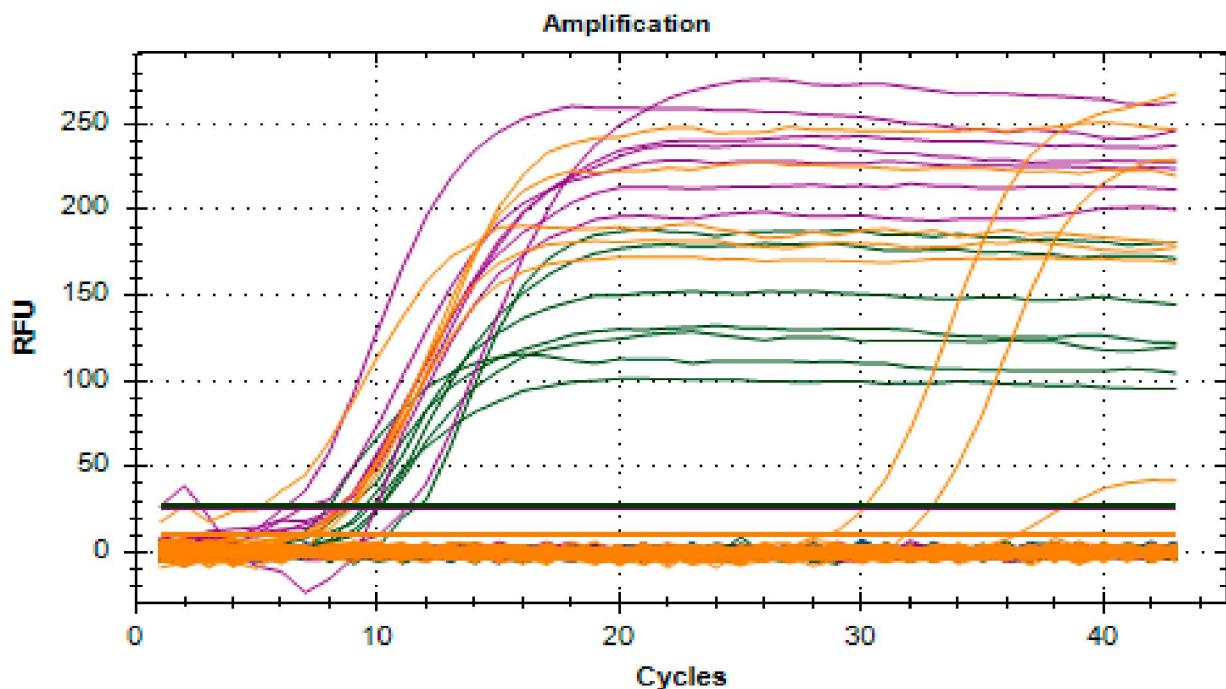


Рисунок 5 - Накопление продуктов амплификации в мультиплексной ПЦР в режиме реального времени

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 искомых вирусов, в будущем возможно принятие быстрых мер по оздоровлению неблагополучных хозяйств.

Анализируя полученные результаты, следует отметить, что при наличии искомых 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.

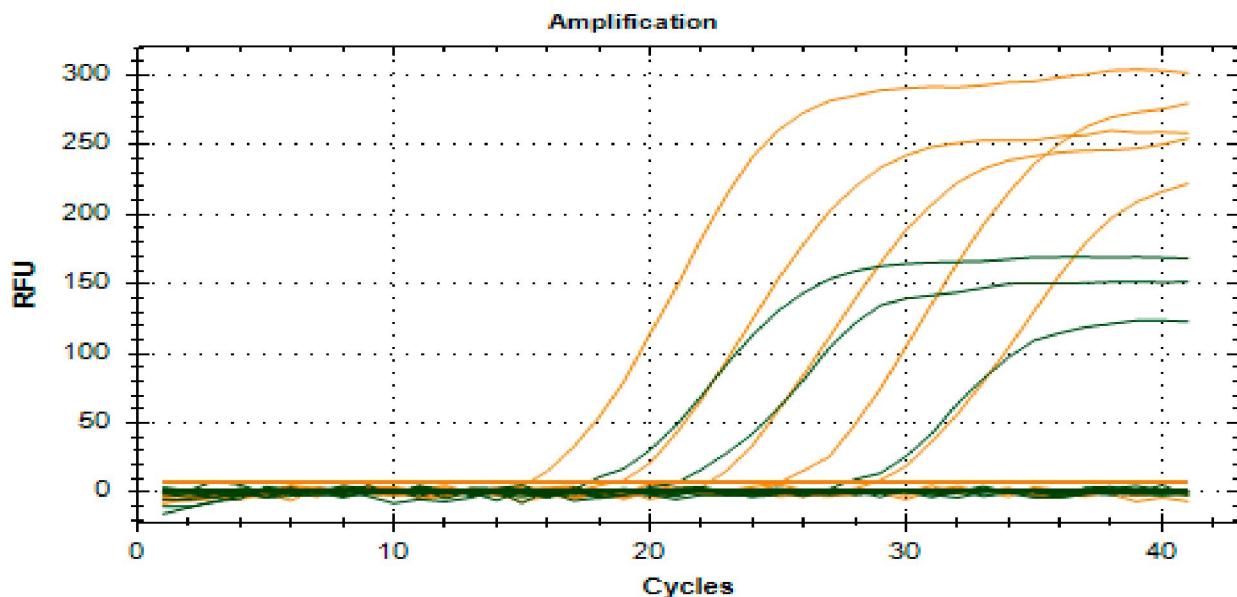


Рисунок 7 - Результаты амплификации при исследовании проб влагалищных истечений.

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 колосальный 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 полимеразной 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 искомых 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

ctgtgccgtgcgttagac

- для ПГ-3

BPG32

cagaaaggcgattacattattacaga

- 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 биологических 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 истечений 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 дифференциацию 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.