

Прасолова Ольга Владимировна

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВОЗБУДИТЕЛЯ  
ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ХОЗЯЙСТВАХ  
СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО РЕГИОНА РФ

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук

Санкт-Петербург - 2017

Работа выполнена на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГАВМ).

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
**Сухинин Александр Александрович**

**Официальные  
оппоненты:** **Косовский Глеб Юрьевич**  
доктор биологических наук, профессор РАН,  
Врио директора Федерального  
государственного бюджетного научного  
учреждения «Научно-исследовательский  
институт пушного звероводства и  
кролиководства имени В.А. Афанасьева  
(ФГБУ НИИПЗК)

**Кононов Александр Владимирович**  
кандидат ветеринарных наук, заведующий  
Референтной лабораторией болезней крупного  
рогатого скота Федерального государственного  
бюджетного учреждения «Федеральный центр  
охраны здоровья животных» (ФГБУ  
«ВНИИЗЖ»)

**Ведущая организация** – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии» – МВА имени К.И. Скрябина

Защита состоится «16» марта 2018г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.059.03 при ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская д. 5, тел/факс (812) 388-36-31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» по адресу: 196084, г. Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5 и на сайте <https://spbgavm.ru/academy/scince/dissertationalcouncil/d-220-059-03//>

**Автореферат разослан:** «        » \_\_\_\_\_ 2018г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Белова Лариса Михайловна

## 1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Вирусная диарея крупного рогатого скота широко распространена в мире и является одной из наиболее сложных проблем инфекционной патологии промышленного животноводства, причиняющей серьёзный ущерб воспроизводству животных в таких странах, как Канада, Голландия, Дания, Франция, Германия, Австрия, Венгрия и США [Booth E.R., 2013]. В этих странах заболевание носит эндемичный характер, а серопозитивность взрослого скота достигает 50-90% [Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., 2007].

На территории нашей страны ВД КРС наиболее часто регистрируется в регионах с высоким уровнем ведения племенного молочного животноводства [Петрова О.Г., 2014; Шилова Е.Н., 2014; Глотов А.Г., 2017], По данным А.Е.Верховской [2008] – 90,9 % обследованных животных в 15 регионах РФ являются серопозитивными.

Вирус, повреждая защитные механизмы дыхательной и пищеварительной систем, облегчает проникновение различных бактерий (*Escherichia coli*, *Proteus*, *Mycoplasma*, *Chlamydiaceae* и др.), которые в значительной степени определяют тяжесть течения болезни [Плешакова В.И., 2012] и играют важную роль в возникновении иммунодефицитов у животных [Галиуллин А.К., 2014].

Основной причиной появления данной инфекции в РФ является ввоз племенного поголовья КРС из эндемичных стран так, как до 2015 года исследование на вирусную диарею крупного рогатого скота не входило в перечень диагностических исследований при перемещении животных между государствами. Решение о необходимости такого исследования было принято в рамках Решения Комиссии Таможенного союза от 18.06.2010 г. № 317 (ред. от 14.07.2015 г.) «О применении ветеринарно-санитарных мер в Евразийском экономическом союзе», но только в отношении племенных не вакцинированных животных и семенного материала. На момент вступления в силу данного решения в РФ наиболее распространенные диагностикумы, используемые в рутинной работе лабораторий, могли выявлять вирус ВД, но не определять его генотипы, что необходимо для изучения молекулярной эпизоотологии болезни в рамках Кодекса здоровья наземных животных МЭБ [2016]. Особое значение имеет идентификация атипичных форм вируса ВД, в том числе при производстве вакцин и культивировании культур клеток [Stahl K., 2010; Palomares R.A., 2013].

Однако существующие методы идентификации вируса ВД имеют некоторые недостатки. Использование полимеразно-цепной реакции, для идентификации вируса, даже в мультиплексном варианте, не может быть эффективной из-за сложной генетической структуры генома. Поэтому актуальным является необходимость изучения генетической вариабельности

вируса ВД по нескольким генам, циркулирующего на территории каждого региона и проведение филогенетического анализа в каждом конкретном случае.

**Степень разработанности.** Интенсивная работа по профилактике и оздоровлению животноводческих хозяйств от вирусной диареи проводится во многих странах, в том числе странах ЕС. При этом мнение о целесообразности использования вакцин неоднозначно. Учитывая положительный, так называемый скандинавский опыт оздоровительных мероприятий, Дания, Финляндия и другие страны в основу планов борьбы положили исключительно метод выявления и удаления из стада животных, зараженных вирусной диареей. Это решение возникло в результате опыта, показавшего, что противозпизоотические мероприятия, акцентированные только на применении вакцин, недостаточно эффективны. Проводимые в «неблагополучных» по ВД КРС хозяйствах РФ мероприятия до недавнего времени сводились к вакцинации маточного поголовья и молодняка различными поли- или моновалентными вакцинами [Гулюкин М.И., 2007; Юров К.П., 2015], с помощью которых достигался временный эффект, но в целом проблема оставалась нерешенной.

Исследования М.И.Шульпина (2004 г.) предусматривают проведение филогенетического анализа генома только по 5'UTR области генома. В работе А.Г.Южакова (2009 г.) предлагается проводить секвенирование вакцинных и вирулентных штаммов пестивирусов (вирус КЧС и ВД). К сожалению в данных исследованиях не изучался вирус ВД, выделенный в хозяйствах Северо-Западного региона и не предусматривалась идентификация атипичных форм вируса, который выявлен в 2010 году в Италии.

**Цель и задачи работы.** Целью данной работы являлось проведение молекулярно-генетического анализа вируса вирусной диареи крупного рогатого скота по нескольким генам в Северо-Западном регионе РФ, осуществление филогенетического анализа выявленных генотипов, разработка схемы оздоровительных мероприятий.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести мониторинговые исследования этиологической структуры смешанных респираторных инфекций крупного рогатого скота в условиях Северо-Западного региона РФ;
2. Выделить вирус ВД КРС на чувствительной культуре клеток;
3. Изучить строение его генома и выбрать диагностически значимые гены для исследования. Подобрать универсальные праймеры на данные гены, для идентификации всех генотипов вируса, в том числе атипичных, оптимизировать условия ПЦР, создать положительные контроли. Определить специфичность и аналитическую чувствительность методики. Осуществить её метрологическую экспертизу;

4. Провести секвенирование генома и филогенетический анализ идентифицированных образцов вируса вирусной диареи крупного рогатого скота;
5. Разработать схему оздоровления хозяйств в Северо-Западном регионе РФ.

**Научная новизна.** Определена этиологическая структура смешанных респираторных инфекций крупного рогатого скота в условиях Северо-Западного региона РФ.

Предложены оригинальные праймеры на диагностически значимые гены для амплификации и генотипирования всех возможных типов вируса вирусной диареи крупного рогатого скота. Разработана методика эффективной лабораторной идентификации вируса, обладающая 100 % специфичностью и высокой аналитической чувствительностью.

В результате секвенирования показано, что нуклеотидные последовательности вирусов, выделенные из хозяйств, отличаются от последовательностей штаммов, входящих в состав отечественных и зарубежных вакцин, используемых для профилактики вирусной диареи КРС на территории РФ.

При проведении филогенетического анализа установлено, что нуклеотидные последовательности вируса ВД КРС, выделенные из хозяйств Северо-Западного региона РФ, являются вакциноподобными и относятся к генотипу 1 подтипу «а».

Разработана схема оздоровительных мероприятий при вирусной диарее крупного рогатого скота.

**Практическая значимость и реализация результатов исследований.**

Проведены мониторинговые исследования этиологической структуры смешанных респираторных инфекций крупного рогатого скота в условиях Северо-Западного региона РФ.

Выделены изоляты вируса вирусной диареи у крупного рогатого скота на изучаемой территории и изучены особенности его генетической variability.

Результаты проведенных исследований апробированы и оформлены в виде практических и учебно-методических рекомендаций: «Применение молекулярно-генетических методов исследований в ветеринарии» – СПб, 2017 г. (одобрены и рекомендованы к изданию методическим советом Санкт-Петербургской государственной академии ветеринарной медицины); «Методические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике вирусной диареи крупного рогатого скота» - СПб., 2017 г. (одобрены и рекомендованы к изданию секцией зоотехнии и ветеринарии отделения сельскохозяйственных наук РАН); «Методические рекомендации по проведению оздоровительных мероприятий при вирусной диарее крупного рогатого скота в хозяйствах Ленинградской области» - СПб, 2017 г. (одобрены и рекомендованы к изданию комитетом

по агропромышленному и рыбохозяйственному комплексу Ленинградской области).

Разработана и используется в лабораторной практике «Методика генетической идентификации вируса вирусной диареи крупного рогатого скота на основе секвенирования фрагментов генома», подвергнута метрологической экспертизе (регистрационный номер экспертного заключения МЭ 1/0013 от 16 ноября 2016 г.) и утверждена директором ФГБУ «ВГНКИ» от 30 декабря 2016 г. (регистрационный № 154/4 от 19 января 2017 г.).

Результаты молекулярно-генетического анализа возбудителя вирусной диареи крупного скота в хозяйствах Северо-Западного региона РФ послужили основой для усовершенствования мероприятий по борьбе с данной болезнью.

**Методология и методы исследований.** Методология проведенных исследований включает стандартные процедуры с использованием различных материалов. В работе использовали серологические (РНГА), вирусологические (культивирование, вирусвыделение), физико-химические (составление растворов необходимой концентрацией вещества), молекулярно-генетические (ПЦР, ОТ-ПЦР, секвенирование, клонирование) методы исследования.

**Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Этиологическая структура респираторных болезней крупного рогатого скота в хозяйствах Северо-Западного региона РФ;
2. Молекулярно-генетический анализ полученных последовательностей вируса вирусной диареи крупного рогатого скота;
3. Генетическая идентификация вируса вирусной диареи крупного рогатого скота на основе секвенирования фрагментов генома;
4. Оздоровление хозяйств при вирусной диарее крупного рогатого скота.

**Степень достоверности и апробация работы.** Достоверность полученных данных обоснована значительным объемом исследований, использованием методов вариационной статистики по программе MS Excel 2010. Достоверность экспериментальных исследований подтверждена соответствующими испытаниями и проведенной независимой метрологической экспертизой разработанной методики. Материалы диссертации доложены и обсуждены на ежегодных отчетных научных и учебно-методических конференциях профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов Санкт-Петербургской государственной академии ветеринарной медицины (Санкт-Петербург, 2014, 2015, 2016). Основные результаты диссертационной работы доложены на научных конференциях: 7-м Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием – 2015 (Москва); II международном Ветеринарном Конгрессе International VETistanbul Group Congress-2015 (Санкт-Петербург); Международной научной конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи, посвященной 85-летию

зоотехнического образования в Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э.Баумана, 2015, (Казань); Межведомственной научно-практической конференции «Инфекционные болезни – актуальные проблемы, методы борьбы и профилактика», 2015 (Москва); Международной научно-практической конференции молодых ученых «МОЛОДЕЖЬ И ИННОВАЦИИ–2015» УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия», (Горки) 2015; Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы морфологии и биотехнологии», 2015 (Кинель); Всероссийской научно-практической конференции «Новые методы экспресс-диагностики микроорганизмов в медицине, фармации, ветеринарии и экологии», 2015 (Санкт-Петербург); 7 International Conference Global Science and Innovation», 2016 (Чикаго, США); 4-ом Европейском конгрессе Европейской ассоциации ветеринарной лабораторной диагностики (EAVLD), 2016 (Прага, Чехия); 4 Международной научной конференции «Достижения молодых ученых в ветеринарную практику», посвященной 55-летию аспирантуры ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2016 (Владимир); IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (Москва).

**Публикации.** Материалы диссертации легли в основу 16 научных работ, 4 из которых опубликованы в изданиях, включенных ВАК Минобрнауки РФ в перечень российских рецензируемых научных журналов для опубликования основных научных результатов диссертации.

**Личный вклад соискателя.** Диссертационная работа является результатом исследования автора в период с 2013 по 2017 годы. Исследования были осуществлены под руководством доктора биологических наук, профессора А.А.Сухинина. Научный руководитель оказывал организационно-методическую помощь в работе. Соискатель самостоятельно выполнила большую часть научных исследований, в том числе экспериментальных, систематизировала и проанализировала полученные результаты. Соавторы научных публикаций не возражают против использования в диссертации материалов совместных исследований О.В.Прасоловой.

**Объем и структура диссертации.** Материалы диссертационной работы изложены на 165 страницах компьютерного текста. Включая введение, обзор литературы, собственные исследования (материалы и методы, результаты, обсуждение), заключение, список сокращений и условных обозначений, список литературы, приложения.

Библиографический перечень содержит 191 источник, в том числе 106 отечественных и 85 иностранных. Диссертация иллюстрирована 35 рисунками (фотографиями/диаграммами/графиками), 15 таблицами.

## 2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в период с 2013 по 2017 год на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины».

*Объект исследования.* Крупный рогатый скот (вакцинированный против ВД и не вакцинированный) и телята. Подопытные и контрольные группы формировали по принципу аналогов.

При взятии и подготовке для исследований клинических образцов соблюдали меры, предупреждающие обсеменение патогенами объектов внешней среды, руководствуясь соответствующими правилами и инструкциями. Об эффективности применяемого лечения судили по количеству заболевших и павших животных, продолжительности течения болезни.

*Для выделения нуклеиновых кислот* применяли наборы производства Интерлабсервис (Россия): «АмплиПрайм Рибо-преп» (для выделения ДНК вируса ИРТ КРС); «АмплиПрайм Рибо-сорб» (для выделения РНК вируса ВД КРС); «АмплиПрайм Сорб-В» (для выделения ДНК микоплазм и хламидий).

ПЦР проводили наборами ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Россия): «ВД» для идентификации вируса ВД КРС (детекция в режиме реального времени); «РИНОКОР» для идентификации вируса ИРТ КРС (детекция в режиме реального времени); «МИК-КОМ» для идентификации микоплазм (детекция в агарозном геле); «ХЛА-КОМ» для идентификации хламидий (детекция в агарозном геле).

*Обратную транскрипцию и амплификацию* в режиме реального времени осуществляли в приборе «Rotor-Gene» (Corbett Research, Австралия).

Результаты ПЦР при электрофоретической детекции продуктов амплификации учитывали с помощью видеосистемы Gel Imager и программного обеспечения Gel Analyzer.

*Для серологического исследования* поголовья использовали «Набор эритроцитарного диагностикума для серодиагностики вирусной диареи крупного рогатого скота в реакции непрямой гемагглютинации», изготовленного компанией Агровет (Россия).

*Выделение вируса* вирусной диареи крупного рогатого скота осуществляли на культуре клеток коронарных сосудов телят (КСТ) общепринятым методом. Преимущество этой культуры в том, что она пригодна для первичного выделения вируса ВД из патологического материала при проведении диагностических исследований.

*Для генотипирования вируса*, на основе известных нуклеотидных последовательностей, доступных через базу данных GenBank, подбирали



праймеры и зонды с помощью интернет ресурса «BLAST». Структуру олигонуклеотидов оптимизировали с использованием программ Oligo ([www.oligo.net](http://www.oligo.net)), «Primer Premier 5.0» и Vector NTI (<http://www.invitrogen.com>). Концентрацию и выбор оптимального режима амплификации проводили, исходя из длины амплифицируемого фрагмента и рассчитывали с помощью олигокалькулятора (Oligo Calc:Oligonucleotide Properties Calculator).

Все ампликоны (по 10 мкл) анализировали с помощью электрофореза в 1,5-2,0 % агарозном (горизонтальный) геле с последующим окрашиванием в растворе бромистого этидия с концентрацией 1 мг/мл (Маниатис Т. и соавт., 1984). В качестве маркера молекулярных масс использовали GeneRuler, фирмы «Thermo Scietic».

Молекулярное клонирование продуктов ПЦР проводили с использованием коммерческого набора InsTAclone PCR cloning kit («Fermentas», Латвия), процедуру осуществляли в соответствии с инструкцией изготовителя.

Секвенирование осуществляли с использованием реактивов «BigDye Terminator 3.1.» и «5x Sequencing buffer» («Applied Biosystems», США) на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems Genetic Analyzer 3130 («Applied Biosystems», США) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Анализ результатов осуществляли с помощью программы «Sequencing Analysis 5.2».

Филогенетический анализ. Для построения филогенетического дерева использовали метод присоединения ближайших соседей и эволюционную двухпараметрическую модель Кимуры.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Этиологическая структура респираторных болезней крупного рогатого скота в хозяйствах Северо-Западного региона РФ

При анализе анамнестических данных установили, что вспышкам респираторных заболеваний в обследованных хозяйствах предшествовало воздействие на животных абиогенных факторов. У коров, как правило, болезни органов дыхания регистрировали непосредственно после отела. У молодняка респираторные болезни возникали неожиданно и проявлялись в острой и сверхострой формах.

В 70 % исследованных проб с помощью ПЦР обнаружили различные ассоциации микроорганизмов. Чаще всего обнаруживали ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma*+ДНК возбудителя ИРТ (Bovine herpes virus 1) в 55,3 %, ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma*+*Chlamydiaceae* в 18,4 %, ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma*+*Chlamydiaceae*+ДНК возбудителя ИРТ (Bovine herpes virus 1) в 15,8 %, ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma*+*Chlamydiaceae*+ РНК возбудителя ВД (Bovine viral diarrhea virus) в 10,5 % случаев. Среди бактериальных агентов чаще всего идентифицировали микоплазмы (их обнаружили в 96 % случаев) (Рис. 1).

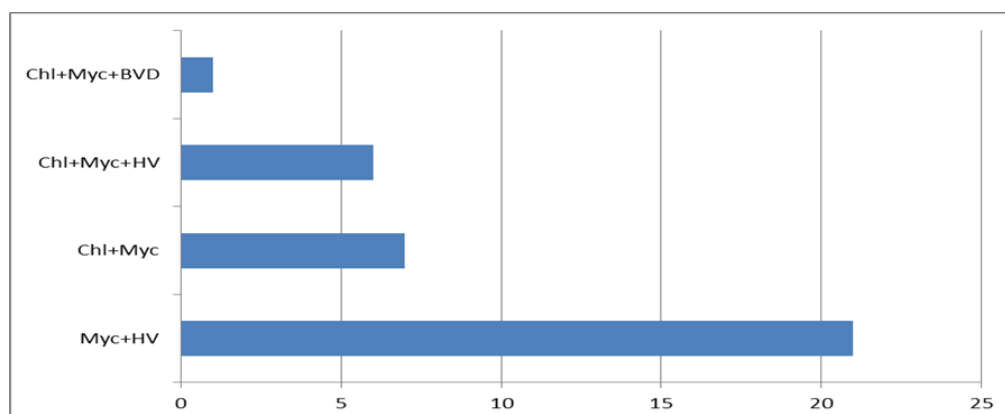


Рисунок 1. Выявленные ассоциации микроорганизмов

Несмотря на наши предположения о высокой инцидентности ВД, возбудитель болезни с помощью ПЦР обнаруживали только в единичных случаях, поэтому было решено провести серологический мониторинг. В результате проведенных исследований у всех животных определяли антитела к данному вирусу в различных титрах (от 1:32 до 1:256).

#### **Выделение вируса на культуре клеток.**

При проведении серологического мониторинга и молекулярно-генетического исследования стада, нами выявлено наличие недиагностического титра антител (в соответствии с инструкцией по применению набора) и отрицательный результат в ПЦР у нескольких животных с признаками поражения респираторного тракта. Нами было решено провести отбор материала (смывы с миндалин и носа) и выделить вирус на чувствительной культуре клеток – коронарных сосудов телят (КСТ).

Используемую культуру проверили на контаминацию микроорганизмами рода *Mycoplasma* и Bovine viral diarrhea virus (коммерческие наборы для ПЦР). Контаминации выявлено в опыте не было.

В хозяйстве установлена циркуляция вируса ВД КРС, не идентифицируемого изначально коммерческими тест-системами. Нами поставлена задача разработать методику идентификации вируса по нескольким генам с применением метода ОТ-ПЦР, провести исследования вакцин и биологического материала от животных методом секвенирования продуктов реакции и осуществить филогенетический анализ полученных данных.

#### **Методика молекулярно-генетической идентификации вируса вирусной диареи крупного рогатого скота**

Проведена оценка комплементарности и специфичности выбранных праймеров путем сравнения с базой нуклеотидных последовательностей NCBI с использованием BLAST алгоритма поиска родственных последовательностей. Установлена гомологичность выбранных праймеров только с последовательностями штаммов и изолятов вируса вирусной диареи

КРС. Таким образом, предложенные праймеры, исходя из теоретических расчетов, должны обладать 100 % специфичностью.

Для определения специфичности, согласно рекомендациям МЭБ, использовали панель образцов биоматериала, включающую в себя заведомо положительные (живые вакцины против вирусной диареи крупного рогатого скота, содержащих один и два генотипа вируса) и отрицательные образцы (инактивированные вакцины, живые вакцины против классической чумы свиней, ТЕ-буфер).

В результате экспериментов доказано наличие специфической амплификации в образцах, содержащих РНК вируса ВД и отсутствие неспецифической амплификации гетерологичных штаммов и ДНК генома крупного рогатого скота. Таким образом доказана 100 % специфичность методики.

Определение аналитической чувствительности и предел обнаружения (LOD) методики проводили с использованием десятикратных разведений рекомбинантных плазмид с известной концентрацией. За аналитическую чувствительность принимали наименьшую концентрацию ПКО, дающую воспроизводимый положительный сигнал при ПЦР. В результате исследований доказано, что аналитическая чувствительность ПЦР высокая, (90, 70 и 30 копий целевой ДНК соответственно для 5', Npro, E2 участков генома), однако LOD составляет не более 0,1 %, что соответствует критериям.

В качестве положительных контролей ПЦР (ПКО) использовали образец плазмиды (разведение  $10^{-6}$ ) на основе вектора pVAX-1 (Invitrogen), содержащий генно-инженерные конструкции, имеющих различные целевые вставки соответствующего гена-мишени. размером 288, 428 и 820 п.н . соответственно.

Для оценки эффективности ПЦР проводили амплификацию с рядом логарифмических разведений целевой плазмидной ДНК в двух повторах каждое. По результатам реакции строили график зависимости  $St$  от логарифма условной концентрации ДНК матрицы, принимая за единицу неразведенную ДНК. Определяли наклон линейной области (slope). Для 5' области эффективность составила 96 %, slope – 3,4; для Npro – 101 %, slope 3,2 для E2 – 95 %, slope 3,4. Таким образом нами доказано, что эффективность ПЦР для трех пар праймеров находится в необходимом диапазоне измерений.

### **Филогенетический анализ вируса ВД КРС.**

В большинстве случаев все нуклеотидные последовательности, полученные для образцов из одного хозяйства в одно время, совпадали между собой. Гомология нуклеотидных и аминокислотных последовательностей по каждому из трех фрагментов генома составила 98,9-100 %. Первоначальный филогенетический анализ проводили по 5'UTR области, так как результаты молекулярной эволюции, полученные для консервативных областей генома, обладают большей достоверностью.

Регион 5'UTR общий для всех pestiviruses и предназначен для их обнаружения. Однако эти фрагменты могут быть слишком маленькими и их часто недостаточно и для детального филогенетического анализа. Для исследования генетических связей внутри рода возможно дополнительно использовать фрагменты генов Npro и E2. При анализе использовали полученные нами нуклеотидные последовательности вируса ВД КРС, представленные в базе данных GenBank.

Вакцинный штамм идентифицирован как NADL, уровень гомологии составил 100 %, на всей протяженности генома, как и заявлено производителем, что подтверждает правильность выбранных последовательностей праймеров.

Однако расшифровать abi файл после секвенирования вакцины, содержащей два аттенуированных штамма вируса вирусной диареи (NADL и 53637) не удалось. Осуществить ручную обработку не представилось возможным из-за наложения пиков друг на друга, соответственно, с помощью предлагаемой методики, возможно только обнаружение штаммов в реакции ОТ-ПЦР, но идентифицировать их с помощью классического секвенирования по Сенгеру, не представляется возможным.

Также необходимо отметить, что при исследовании инактивированных вакцин, результат ОТ-ПЦР всегда был отрицательным.

В связи с вышеизложенным, для контроля качества вакцин, содержащих инактивированные штаммы вируса ВД или несколько штаммов в одной вакцине, необходимо использовать другие методы контроля.

В результате секвенирования образцов из хозяйств показано, что нуклеотидные последовательности вируса ВД КРС из образца отличаются от последовательностей штаммов, входящих в состав отечественных и зарубежных вакцин, применяемых для профилактики болезни на территории нашей страны. Нами идентифицирован нецитопатогенный штамм Deeg и цитопатогенный штамм strain KS86-1 ср, которые относятся к первому генотипу, подтипу «а».

Кроме описанных образцов, нами исследован вирус, выделенный на культуре клеток КСТ. Анализ последовательности нуклеотидов фрагмента 5 UTR и Npro области показал, что изучаемый изолят отличается от вакцинного. От ближайшего соседа AB019679strain 90 на три нуклеотида, от U97449M557A-90 на четыре нуклеотида. При секвенировании по гену E2 получен отрицательный результат, что может говорить о мутации вируса.

Данные изоляты относятся к циркулирующим в хозяйствах вакциноподобным штаммам 1 генотипа подтипа «а».

### **Схема оздоровления хозяйства.**

#### *Ретроспективный анализ состояния стада.*

Для анализа состояния стада было проведено эпизоотологическое обследование хозяйства с применением, клинических, патологоанатомических, бактериологических, вирусологических,

молекулярно-генетических и иммунологических методов. Особое внимание уделено изучению общего санитарного состояния хозяйства, рассмотрен рацион кормления, а также показатели воспроизводства.

При анализе ветеринарной отчетности нами не было выявлено вспышек респираторных болезней, но наблюдался падеж молодняка первого года жизни, снижение удоя и единичные случаи абортотв.

#### *Лабораторные исследования.*

У новорожденных телят с признаками диспепсии проводили забор крови для клинического исследования и анализ состава микрофлоры. При расшифровке лейкограммы нами выявлен лейкоцитоз (увеличение количества лейкоцитов в два раза, по сравнению с нормой), резко выраженная лимфопения и снижение уровня нейтрофилов в 1,5 раза. Данные результаты говорят не только о нарушениях в системе иммунитета, но и об ослаблении иммунного ответа, возникающего обычно при инфекционном процессе.

При исследовании микрофлоры фекалий новорожденных телят нами обнаружена энтеропатогенная *E. Coli*, снижение уровня *Bifidobacteria* и *Lactobacilli* более чем в два раза.

#### *Система оздоровления стада.*

Для всех групп животных было улучшено содержание и кормление – введены в рацион легкоусвояемые корма, добавлены витамины, минеральные вещества.

Для лечения телят применяли следующую схему:

- в возрасте до 1 месяца выпаивали препарат «Лактофторхин», составными компонентами которого являются: ацидофильная симбиотическая культура микроорганизмов (ТУ 9197-001-0047941-97), энрофлоксацин и масло твин - 80. Кратность дачи препарата 1 раз в день. Курс – 5 дней;

- в случае заболевания в возрасте 1-3-х месяцев применяли норсульфазол (20,0 г), уротропин (60,0 г), стрептомицин внутримышечно 1 раз в день три дня подряд. Дополнительно в рацион включили «ацидофильное молоко» (молоко+муравьиная кислота, сутки настаивали при комнатной температуре, выпаивали в охлажденном виде по 0,5 л).

Программа оздоровительных мероприятий, предлагаемых для хозяйств Ленинградской области включала несколько этапов:

**I этап** - Ретроспективный анализ эпизоотической ситуации по вирусной диарее крупного рогатого скота (BVD) и эпизоотологический мониторинг по районам и хозяйствам Ленинградской области с учётом результатов лабораторной диагностики (учитываются ветеринарные и зоотехнические показатели эпизоотического состояния стада КРС по BVD в конкретном хозяйстве).

**II этап** - Организационные мероприятия (проводится ежегодный мониторинг эпизоотического состояния стада хозяйства по BVD).

**III этап** - Включает мероприятия по профилактике BVD в благополучных хозяйствах всех форм собственности, включая племяцентр (племпредприятия).

**IV этап** - Ветеринарно-санитарные, зоогигиенические и организационно-хозяйственные мероприятия по оздоровлению от BVD крупного рогатого скота в неблагополучных хозяйствах.

**V этап** - Проводится разделение неблагополучных по BVD хозяйств на группы в зависимости от уровня инфицированности - % BVD.

### **Серологический мониторинг**

1. Исследование новорожденных телят на персистентное инфицирование (вынужденный убой или повторное исследование методом ИФА – подтверждение тестом). При подтверждении – телята немедленно удаляются, как основной источник вируса BVD.
2. Коровы, у которых персистентно инфицирован приплод, но они не являются сероположительными в ИФА по вирусу BVD – могут не выбраковываться.

### **Необходимость разработки стратегии эрадикации вирусной диареи КРС для разработки основной программы оздоровления**

1. Перевод в основное стадо животных, исключительно серонегативных в ИФА по вирусу BVD по персистентному инфицированию. Телята, их матери, а также нетели должны быть отрицательными в ИФА по вирусу BVD по персистентному инфицированию перед переводом в основное стадо.
2. Принять для каждого конкретного хозяйства определённый набор диагностических тестов на BVD. Закрепить их в программе, согласовывая с ветеринарной лабораторией.
3. Перед осеменением тестируются нетели, абортировавшие коровы, коровы с неподтверждённой стельностью, потерявшие телят по различным причинам (ранее не тестированные).
4. Глубокостельные (сухостойные коровы) переводятся в основное стадо после тестирования телёнка (отрицательные по персистентному инфицированию). Телята (нетели, тёлки старших возрастов) также тестируются перед переводом в основное стадо.
5. Разработка вакцинопрофилактики в хозяйстве, необходимость вакцинации быков-производителей, бычков для передачи на элвер при необходимости рассматриваются отдельно.

## **3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

1. Молекулярно-генетический анализ вируса ВД КРС в хозяйствах Северо-Западного региона проведен с помощью метода ОТ-ПЦР с последующим секвенированием трех фрагментов генома. Подобраны и

синтезированы праймеры на диагностически значимые гены вируса. Подтверждена их чувствительность и специфичность. Созданы положительные контроли. Качественность методики доказана метрологической экспертизой.

2. При проведении мониторинговых исследований этиологической структуры смешанных респираторных инфекций крупного рогатого скота в условиях Северо-Западного региона РФ выявлены вирусно-бактериальные ассоциации микроорганизмов. Чаще всего обнаруживали следующие: Мус +HV в 55,3 %, Chl+Мус в 18,4 %, Chl+Мус+HV в 15,8 %, Chl+Мус+ BVD в 10,5 % случаев.
3. В результате секвенирования образцов из хозяйств показано, что нуклеотидные последовательности вируса ВД КРС из образцов отличаются от последовательностей штаммов, входящих в состав отечественных и зарубежных вакцин, применяемых для профилактики болезни на территории нашей страны. Нами идентифицирован нецитопатогенный штамм Deeg и цитопатогенный штамм strain KS86-1 ср, которые относятся к первому генотипу, подтипу «а».
4. При филогенетическом анализе изолята, выделенного на культуре клеток, по фрагменту 5 UTR и Npro области показал, что изучаемый образец отличается от вакцинного. От ближайшего соседа AB019679strain 90 на три нуклеотида, от U97449M557A-90 на четыре нуклеотида. При секвенировании по гену E2 получен отрицательный результат, что может говорить о мутации вируса. При построении дендрограммы нами определена принадлежность данного образца к вакциноподобным штаммам 1 генотипа подтипа «а».
5. Разработана схема лечебно-профилактических мероприятий при вирусной диарее крупного рогатого скота.

#### Практические предложения

1. Разработана и используется в лабораторной практике «Методика генетической идентификации вируса вирусной диареи крупного рогатого скота на основе секвенирования фрагментов генома», подвергнута метрологической экспертизе (регистрационный номер экспертного заключения МЭ 1/0013 от 16 ноября 2016 г) и утверждена директором ФГБУ «ВГНКИ» от 30 декабря 2016 года (регистрационный №154/4 от 19 января 2017 г.). Подана заявка на патент.
2. Материалы работы послужили основой для разработки «Методических рекомендаций по диагностике, лечению и профилактике вирусной диареи крупного рогатого скота» - СПб: Издательство ФГБОУ ВО СПбГАВМ, 2017 г., 24 с. (одобрены и рекомендованы к изданию секцией зоотехнии и ветеринарии отделения сельскохозяйственных наук РАН протокол №3 28 августа 2017 г.);

3. По результатам исследований опубликованы «Методические рекомендации по проведению оздоровительных мероприятий при вирусной диарее крупного рогатого скота в хозяйствах Ленинградской области» (одобрены и рекомендованы к изданию комитетом по агропромышленному и рыбохозяйственному комплексу Ленинградской области от 29 августа 2017 г.);
4. Материалы научных исследований использованы при составлении методических рекомендаций «Применение молекулярно-генетических методов исследований в ветеринарии» – СПб: Издательство ФГБОУ ВО «СПбГАВМ», 2017 г., 42 с. (одобрены и рекомендованы к изданию методическим советом Санкт-Петербургской государственной академией ветеринарной медицины протокол №1 от 18 января 2017 г.).
5. При ввозе на территорию РФ крупного рогатого скота необходимо не только учитывать эпизоотический статус страны-экспортера, но и проводить в период карантина молекулярно-генетическое исследование для идентификации вируса вирусной диареи. В рамках Решения Комиссии Таможенного союза от 18.06.2010 № 317 (ред. от 14.07.2015 г.) «О применении ветеринарно-санитарных мер в таможенном союзе» (вместе с «Положением о Едином порядке осуществления ветеринарного контроля на таможенной границе таможенного союза и на таможенной территории таможенного союза», «Положением о едином порядке проведения совместных проверок объектов и отбора проб товаров (продукции), подлежащих ветеринарному контролю (надзору)», «Едиными ветеринарными (ветеринарно-санитарными) требованиями».
6. Материалы диссертационной работы имеют практическое значение в усовершенствовании лечебно-профилактических мероприятий при болезнях КРС.
7. Результаты серологического мониторинга респираторных болезней КРС и молекулярно-генетического анализа вируса ВД используются в качестве информационного материала в учебном процессе курса «Ветеринарная микробиология и иммунология» на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «СПбГАВМ».

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

##### **Статьи в журналах, внесенных в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ**

1. Сухинин, А.А., Испытания универсального лабораторного метода диагностики микоплазмозов животных / А.А.Сухинин, С.А.Макавчик, М.В.Виноходова, О.В.Прасолова // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2015. – № 1. – С. 40–46.



2. Сухинин, А.А., Сорбционная экстракция нуклеиновых кислот с магнитными частицами в лабораторной диагностике инфекционных болезней / А.А.Сухинин, С.А.Макавчик, О.В.Прасолова // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2015. – № 3 – С. 70–74.
3. Сухинин, А.А., Этиологическая структура респираторных болезней крупного рогатого скота в Северо-Западном регионе / А.А.Сухинин, С.А. Макавчик, С.В.Герасимов, О.В.Прасолова // Ветеринария – 2015. – № 12. – С. 21–24.
4. Сухинин, А.А., Положительные и отрицательные аспекты диагностического использования мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени (REAL-TIME PCR) / А.А.Сухинин, С.А. Макавчик, О.В. Прасолова // Международный вестник ветеринарии. – 2016. – № 1. – С 41–46.

#### **Статьи, опубликованные в сборниках научных трудов и материалах конференций**

1. Сухинин, А.А., Генетическое типирование вируса вирусной диареи крупного рогатого скота/ А.А.Сухинин, С.А. Макавчик, О.В. Прасолова // 7 Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням с международным участием: сб. мат, Москва, 2015. – том 13, С. 326–327.
2. Сухинин, А.А., Перспективы применения мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени (Real - time PCR) в ветеринарии / А.А.Сухинин, С.А.Макавчик, О.В.Прасолова // международный Ветеринарный Конгресс International VETistanbul Group Congress–2015., сб. мат. – СПб, 2015. – С. 344.
3. Прасолова, О.В., Идентификация вируса вирусной диареи КРС в респираторном симптомокомплексе/ О.В.Прасолова, А.А.Сухинин // Международная научная конференция студентов, аспирантов и учащейся молодежи, посвященная 85-летию зоотехнического образования в Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э.Баумана «Актуальные проблемы и тенденции развития агропромышленного комплекса», сб. мат., – Казань, 2015. – С. 148–151.
4. Сухинин, А.А., Аспекты применения полимеразной цепной реакции (Real-time PCR) для лабораторной диагностики инфекционных болезней/ А.А.Сухинин, С.А.Макавчик, С.В.Герасимов, О.В.Прасолова // Межведомственная научно-практическая конференция «Инфекционные болезни – актуальные проблемы, методы борьбы и профилактика», сб. мат., – Москва, 2015. – С. 59.
5. Прасолова, О.В., Особенности профилактических мероприятий при вирусной диарее КРС в хозяйствах Ленинградской области / О.В.Прасолова // Международная научно-практическая конференция

- молодых ученых «Молодежь и инновации – 2015», сб. мат. Республика Беларусь, г. Горки, 2015. – часть 2, С. 115–117.
6. Прасолова, О.В., Современные методы лабораторной диагностики вирусной диареи крупного рогатого скота/ О.В.Прасолова // Международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы морфологии и биотехнологии», сб. мат. – Кинель, 2015. – С. 187–190
  7. Сухинин, А.А., Мультиплексная ПЦР в реальном времени, как экспресс-метод лабораторной диагностики инфекционных болезней животных / А.А.Сухинин, С.А. Макавчик, О.В. Прасолова // Всероссийская научно-практическая конференция «Новые методы экспресс-диагностики микроорганизмов в медицине, фармации, ветеринарии и экологии», сб. мат. – СПб, 2016. – С. 253–254.
  8. Sukhinin, A.A., Sector recovery system at respiratory disease of cattle/ A.A.Sukhinin, V.I.Smolensky, E.I.Prihodko, O.V.Prasolova // Material of 7 International Conference «Global Science and Innovation», сб. мат. – Чикаго, США, 2016. – С. 280–282.
  9. Davydova, E., Development and validation of Real-time PCR methods for the detection of GM ingredients in feed products in Russian Federation/ E. Davydova, I.Soltynskaya, O.Prasolova, M.Gergel, I.Kramarenko // 4-й Европейский конгресс Европейской ассоциации ветеринарной лабораторной диагностики (EAVLD), сб. мат. Прага, Чехия, 2016. – С.85;
  10. Soltynskaya, I., Validation of the method of the species identification based on mitochondrial genomes sequencing/ I.Soltynskaya, E.Davydova, O.Prasolova, N.Kirsanova, I.Timofeeva, M.Gergel, I.Kramarenko// 4-й Европейский конгресс Европейской ассоциации ветеринарной лабораторной диагностики (EAVLD), сб. мат. Прага, Чехия, 2016. – С.106
  11. Сухинин, А.А., Молекулярно-генетический анализ вируса вирусной диареи крупного рогатого скота в хозяйствах Северо-Западного региона / А.А.Сухинин, С.А.Макавчик, О.В.Прасолова // IV Международная научная конференция «Достижения молодых ученых в ветеринарную практику», посвященная 55-летию учреждения аспирантуры для подготовки научных работников в ФГБУ «ВНИИЗЖ», сб. мат., Владимир, 2016. – С. 88–93.
  12. Крылова Е.В., Разработка и использование генетических тестов для выявления мутаций, ассоциированных с наиболее распространенными наследственными патологиями крупного рогатого скота голштинской породы / Е.В.Крылова, Е.Е.Давыдова, И.В.Солтынская, О.В.Прасолова, Б.Ю.Ветошникова, А.С.Минайлова, О.О.Головко, М.А.Плескачева, Е.С.Корниенко // IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2017», сборник трудов, Москва, 2017. – С. 404–405.