

На правах рукописи

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 ознакомится 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 противоэпизоотические 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 5UTR 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 вариабельности.

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 (культтивирование, вирусыыделение), 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 объёмом 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 Scienceand 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 Минобразования и науки 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 вириуса ИРТ КРС); «АмплиПрайм Рибо-сорб» (для выделения РНК вириуса ВД КРС); «АмплиПрайм Сорб-В» (для выделения ДНК микоплазм и хламидий).

ПЦР проводили наборами ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Россия): «ВД» для идентификации вириуса ВД КРС (детекция в режиме реального времени); «РИНОКОР» для идентификации вириуса 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 вириусной диареи крупного рогатого скота в реакции непрямой гемагглютинации», изготовленного компанией Агровет (Россия).

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

Для генотипирования вириуса, 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), «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 (Olico 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).

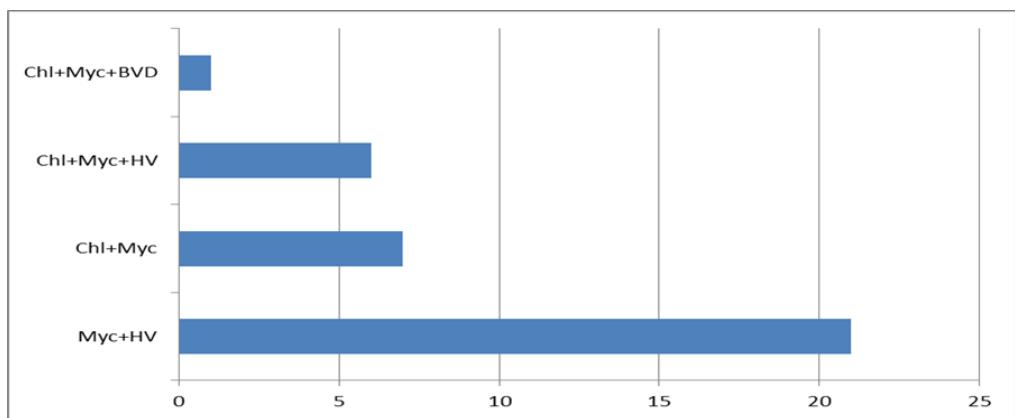


Рисунок 1. Выявленные ассоциации микроорганизмов

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 теленка (КСТ).

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

В хозяйстве установлена циркуляция вируса ВД КС, 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 Ct 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 5UTR 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 Deer 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 случаиabortов.

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 племцентр (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 перsistентное инфицирование (вынужденный убой или повторное исследование методом ИФА – подтверждение тестом). При подтверждении – телята немедленно удаляются, как основной источник вируса BVD.
2. Коровы, у которых перsistентно 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 перsistентному инфицированию. Телята, их матери, а также нетели должны быть отрицательными в ИФА по вирусу BVD по перsistентному 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 перsistентному 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 элевер 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: Mys +HV в 55,3 %, Chl+Mys в 18,4 %, Chl+Mys+HV в 15,8 %, Chl+Mys+ 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 Deer 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 тенденция 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.