

Министерство образования и науки Кыргызской Республики
Кыргызский национальный аграрный университет
им. К.И.Скрябина

Диссертационный совет Д.06.16.538

На правах рукописи
УДК:619:578.822.9

Толубаева Майрамкул Толубаевна

**«ВЫЯВЛЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА
РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСОВ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ
МЕТОДОВ»**

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

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Бишкек-2017

Работа выполнена в Кыргызском научно-исследовательском институте ветеринарии имени А. Дуйшеева лаборатории вирусологии и биотехнологии

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, член-корреспондент НАН КР, профессор
Нургазиев Рысбек Зарылдыкович

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Раимбеков Доктурбек

доктор ветеринарных наук
Абишов Абдикалык Абдижапарович

Ведущая организация: РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН
МОН Республики Казахстан

Защита диссертации состоится «21» июня 2017г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета Д.06.14.489 при Кыргызском национальном аграрном университете имени К.И. Скрябина по адресу: 720005, г. Бишкек, ул. Медерова, 68. E-mail: knau-info@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Кыргызского национального аграрного университета (720005, г. Бишкек, ул. Медерова, 68).

Автореферат разослан « » ____ 2017 г.

**Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук,
доцент**

Крутская Е.Д.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. На современном этапе технологического прогресса в животноводстве сложились условия, позволяющие комплексно решать вопросы увеличения производства продуктов животного происхождения при минимальных затратах труда и средств. Однако интенсивные технологии ведения животноводства, специфика применяемой технологии содержания и кормления животных существенно изменили среду их обитания. Сегодня в условиях фермерских, кооперативных хозяйств на ограниченных площадях, как правило, концентрируется большое поголовье разных по виду и возрасту групп животных. В этих условиях практически все виды возбудителей болезней могут приобрести патогенные свойства. Вследствие этого наряду с желудочно-кишечными заболеваниями новорожденных телят остро встает проблема респираторных заболеваний молодняка крупного рогатого скота (КРС) в послеотъемный период.

Респираторные заболевания молодняка КРС получили достаточно широкое распространение, как в Кыргызстане, так и за рубежом. Наибольшую опасность среди респираторных болезней крупного рогатого скота (КРС) вирусной этиологии представляют инфекционный ринотрахеит (ИРТ), аденовирусная инфекция (АВ), парагрипп-3 (ПГ-3), вирусная диарея (ВД), респираторно-синцитиальная инфекция (РС). Ситуация с заболеваемостью молодняка ПГ-3 в хозяйствах Кыргызской Республики становится крайне сложной. По данным Республиканской государственной ветеринарной лаборатории пораженность молодняка респираторными инфекциями с каждым годом растет: от 9,2% в 1994 г. до 41,7 % в 2004 г. По наблюдениям Нургазиев Р. З. этот показатель в ряде хозяйств Чуйской области достигает 87 %. Респираторные болезни являются одной из основных причин экономических потерь в скотоводстве, так как особенность респираторных болезней - это их высокая контагиозность. Они негативно влияют на здоровье телят, вызывают их гибель, слабое и позднее развитие, а, следовательно, недополучение продукции от них в зрелом возрасте.

В Кыргызстане изучением респираторных болезней и разработкой мер борьбы с ними занимались ученые Нургазиев Р. З., Биримкулова А. Т., Абдыкеримов Н. К., Акматова Э. К., Зиядинов И.К., Узакбаев Т. М. Однако проблема борьбы с респираторными инфекциями остается актуальной, поскольку биология вирусов сложная и многогранная. Одни вирусы вызывают только респираторный синдром (риновирус, респираторно-синцитиальный, реовирус); другие наравне с респираторным синдромом вызывают поражение кишечника, генитальной, нервной системы (парвовирус, вирусная диарея, инфекционный ринотрахеит); третья группа обладает иммунодепрессивным действием (вирусная диарея и аденовирус I и II серовары). Зачастую эти вирусы действуют в ассоциации, в виде смешанной инфекции, вследствие чего может произойти изменение генома.

Это подтверждается тем, что в сыворотке крови больного животного серологическими реакциями в диагностических титрах выделяется 2-4 разных антигена. Выделение и идентификация респираторных вирусов по видам может ускорить и повысить результативность диагностики и снизить частоту неоправданного назначения противовирусных препаратов.

Связь темы диссертации с основными научными программами. Диссертационная работа выполнена на базе лаборатории вирусологии и биотехнологии КНИИВ в рамках проекта «Разработка и совершенствование серологических и молекулярно-биологических методов диагностики особо опасных вирусных болезней сельскохозяйственных животных» (2015-2018), № гос. Регистрации 0007146.

Цель и задачи исследования. Целью научной работы является выделение и идентификация вирусов, респираторных болезней доминирующих в Кыргызской Республике, оптимизация молекулярно-биологической тест-системы ПЦР для выявления генома вируса. В процессе исследований необходимо было решить следующие задачи:

- по регионам Кыргызской республики провести эпизоотологический мониторинг по респираторным инфекциям КРС;
- изучить межвидовую миграцию респираторных вирусов КРС;
- выделить из биоматериала и изучить чувствительность респираторных вирусов КРС на перевиваемых культурах клеток;
- изучить устойчивость выделенного аденовируса на влияние факторов внешней среды;
- оптимизировать условия постановки ПЦР анализа на выявление вируса аденовирусной инфекцией и парагриппа-3.

Научная новизна. Изучена эпизоотическая ситуация по респираторным болезням и межвидовая миграция вирусов в регионах республики. Адаптирован штамм аденовируса на перевиваемой культуре клеток Vero и MDBK с высоким инфекционным титром. Подобраны олигонуклеотидные праймеры для выявления геномной ДНК аденовирусов и вирусов парагриппа-3, оптимизированы параметры постановки ПЦР реакции диагностики респираторных вирусных инфекций. Оптимизированный метод характеризуется высокой точностью и мобильностью постановки диагноза.

Практическая значимость полученных результатов. Данные эпизоотической ситуации по респираторным инфекциям указывают на необходимость создания ассоциированных вакцин против респираторных инфекций. Оптимизированные молекулярно-биологические методы позволят быстро и эффективно проводить лабораторные исследования. Разработана рекомендация по диагностике, профилактике и лечению парагрипп-3 крупного рогатого скота (утверждена 23 декабря 2013 года). Выделенные вирусы после паспортизации будут использоваться для изготовления диагностических наборов и вакцин.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- эпизоотологический мониторинг хозяйств на территории Кыргызской Республики по респираторным инфекциям КРС;
- межвидовая миграция респираторной инфекции (аденовирусной инфекции и парагриппа-3) среди КРС, яков и дзо;
- адаптация возбудителя аденовируса на перевиваемых культурах клеток Vero, MDBK и изучение устойчивости к различным факторам внешней среды;
- подбор олигонуклеотидных праймеров, оптимизация состава реакционных смесей и температурно-временных параметров ПЦР.

Личный вклад соискателя. Соискателем самостоятельно проведен сбор первичного биологического материала и их обработка. Проведены лабораторные исследования аденовируса, парагриппа-3 с применением РН, ИФА и ПЦР, а также культивирование вирусов. Анализ и обобщение экспериментальных данных проведен самостоятельно под руководством профессора Нургазиева Р.З.

Апробация результатов исследований. Материалы диссертации доложены и обсуждены на научно-практической конференции на тему «Новейшие достижения агараной науки», посвященной 95-летию со дня рождения выдающегося ученого, почетного академика НАН КР, д.в.н., профессора Алдашева Абдулхая Алдашевича и 70-ти летнему юбилею Аманбаева Жумгалбека Бексулановича – государственного и политического деятеля Кыргызской Республики, на заседаниях ученого совета Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии им. А. Дуйшеева.

Полнота отражения результатов диссертации в публикациях. По материалам диссертации опубликовано 6 научных работ, одна рекомендация.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 121 страницах компьютерного текста и включает перечень условных обозначений, символов и терминов, оглавление, введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения, список использованных источников литературы и приложения. Работа иллюстрирована 24 рисунками, 15 таблицами. Список использованных источников литературы включает 127 наименований, из которых 42 иностранных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации и необходимость выделения и идентификации вирусов, респираторных болезней доминирующих в Кыргызской Республике, оптимизация молекулярно-биологической тест-системы ПЦР для выявления генома вируса.

В главе 1 «Обзор литературы» по литературным источникам отечественных и зарубежных публикаций даны общие сведения об аденовирусной инфекции и парагриппе-3, роль респираторных вирусов в респираторных и кишечных заболеваниях молодняка крупного рогатого

скота. Охарактеризованы традиционные методы диагностики респираторных вирусов.

В главе 2 «Материалы и методы исследований» дана характеристика объектов исследований и методических подходов к выполнению исследовательской работы. Проанализирована эпизоотическая ситуация в хозяйствах - ГПЗ «Сокулукский», КХ «Чабрец» Сокулукского и ОАО «МИС» и «Ветка» Ыссык-Атинского районов, в частных хозяйствах Московского и Жайылского района, Нарынской и Ыссык-Кульской областях. Эпизоотологический мониторинг проводили с применением клинических, серологических и молекулярно-биологических методов, проводили патологоанатомическое вскрытие павших животных. Научная работа выполнялась на базе лаборатории вирусологии и биотехнологии Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии им. А. Дуйшеева.

Проведены исследования парных сывороток крови телят и коров. Исследование проводили с помощью респираторного пентавалентного набора для непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) (BoHV-1, BVDV, BRSV, BPI-3, Adenovirus-3).

Проведена адаптация вируса и накопление его в необходимых титрах методом пассирования на культурах клеток MDBK, Vero. Идентификацию вируса проводили методом ПЦР.

Для поиска последовательностей генов, к которым необходимо было подобрать праймеры использовали биоинформационную базу данных NCBI.

Выделение ДНК проводили набором «Ахуген». Для постановки реакции ПЦР использовали амплификатор Applied Biosystems 2720. Учет реакции проводили методом электрофореза в агарозном геле.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В главе 3 «Результаты собственных исследований» приведены данные эпизоотологического мониторинга по респираторным инфекциям крупного рогатого скота по регионам республики с применением серологических и молекулярно биологических методов. Установлена межвидовая миграция респираторных вирусов. Представлены результаты выделения и адаптации аденовируса от яков на перевиваемой культуре клеток Vero и MDBK.

Эпизоотический мониторинг по респираторным инфекциям в хозяйствах Чуйской, Нарынской и Иссык-Кульской областях

В период 2013–2016 гг. были проведены обследования хозяйств Чуйской, Нарынской и Иссык-Кульской областей Кыргызской Республики для изучения, эпизоотической ситуации по респираторным инфекциям крупного рогатого скота. В результате мониторинга были выделены хозяйства, где обстановка по респираторным инфекциям наиболее

неблагополучная, вспышки респираторных инфекций регистрировались на протяжении нескольких лет.



- частные хозяйства
- ▲ крестьянские хозяйства

Рис. 1. Места отбора проб

При клиническом осмотре молодняка крупного рогатого скота выявили телят с выраженными клиническими признаками респираторных инфекций. Наибольшую группу риска составляли телята в возрасте 1 - 6 месяцев. Они теряли аппетит, состояние было угнетенным, наблюдался кашель, затрудненное дыхание, а также повышение температуры. У отдельных телят наблюдался конъюнктивит, истечения из носа и диарея. У телят более раннего возраста болезнь протекала остро, они теряли в весе, отставали в росте, а наиболее слабые погибали.

Клиническая картина при патологоанатомическом вскрытии проявлялась однотипно. Телята были истощены. Кожа возле анального отверстия запачкана жидкими каловыми массами. Подкожная клетчатка слабо развита, патологические изменения локализуются, в основном, в органах дыхания, катаральное воспаление слизистой оболочки верхних дыхательных путей. Слизистая оболочка отечна, гиперемирована, в полостях носа и околоносовых пазух слизисто-гнойный экссудат. В трахее наблюдаются кровоизлияния. Также изменения наблюдались в легких, пораженные участки темно-красного цвета, резко контрастируют со здоровыми участками. Слизистая оболочка кишечника отечная с кровоизлияниями (рис. 2-5).



Рис. 2. Павший теленок



Рис. 3. Пораженные участки легких темно-красного цвета, резко контрастируют со здоровыми участками

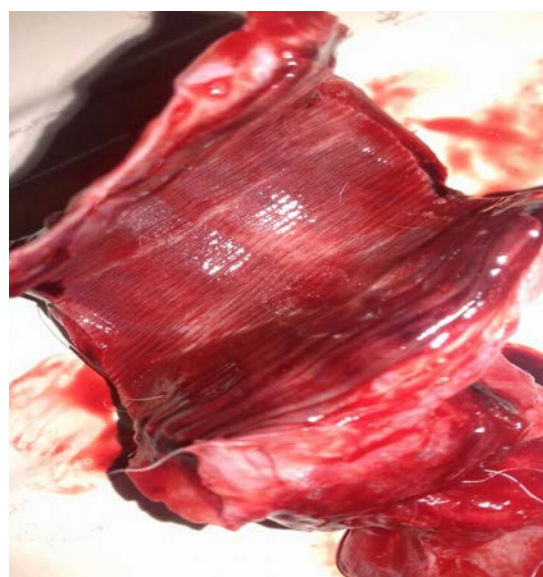


Рис. 4. В трахее наблюдаются кровоизлияния



Рис. 5. Кишечник отечный, с кровоизлияниями

Серологический мониторинг респираторных инфекций

При исследовании парных сывороток крови животных из обследованных хозяйств выявлены специфические антитела к респираторным вирусам. Наиболее часто среди респираторных заболеваний крупного рогатого скота регистрируются аденовирусная инфекция и парагрипп-3 в ассоциации с инфекционным ринотрахеитом, вирусной диареей и вирусной респираторно-синцитиальной инфекцией. Наличие сероконверсии в ИФА среди невакцинированных животных свидетельствует о естественной циркуляции эпизоотических штаммов вирусов. Антитела к респираторным вирусам выявлены как у молодняка крупного рогатого скота, так и у взрослых животных (табл. 1). Это свидетельствует об активной циркуляции вируса как при остром течении респираторных заболеваний, так и в скрытой форме.

Таблица 1 - Результаты исследования сыворотки крови у телят различных возрастных групп.

№	Возраст	ИРТ	ВД	ВРСИ	ПГЗ	АДЕНЗ
1	до 1 мес.	8	8	5	8	7
2	до 3 мес.	2	6	4	7	12
3	до 6 мес.	-	1	3	6	7
	Итого	10	15	12	21	26

В раннем возрасте болезнь протекает особенно тяжело, гибель телят достигает 50-60 %. Результаты серологических исследований указывают на циркуляцию вирусов в крови животных разных возрастных групп, при этом телята до 3 месяцев наиболее подвержены заражению инфекцией

Так, в результате проведенного серомониторинга 84 парных сывороток крови телят были выявлены специфические антитела к возбудителям 5-ти респираторных заболеваний: инфекционного ринотрахеита (ИРТ) - в 33,3%

случаев, вирусной диареи (ВД) - в 50%, респираторно-синцитиальной болезни (РС) - в 40%, парагриппа-3 (ПГ-3) - в 70%, аденовирусной инфекции (АВ) - в 86,6% исследуемых проб (рисунок 6).

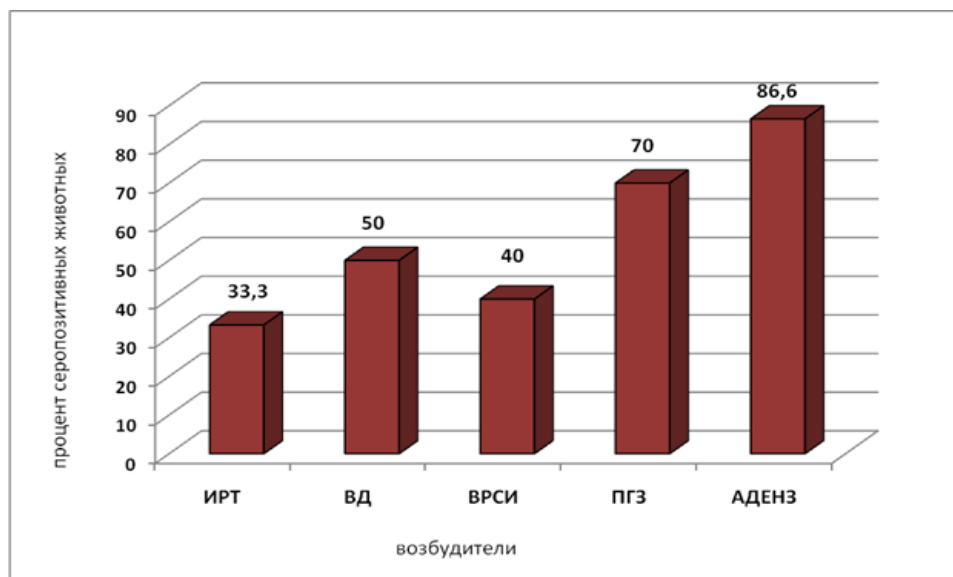


Рис. 6. Процентное соотношение респираторных инфекций

В результате лабораторных исследований выявлено наибольшее количество серопозитивных животных к аденовирусу крупного рогатого скота в ОАО «МИС» - 83,3%, КХ «Ветка» - 82,3%, ГПЗ «Сокулукский» - 78,5%, КХ «Чабрец» - 59,7%, немного меньше к парагриппу -3 - ОАО «МИС» - 72,2%, КХ «Ветка» - 76,4%, ГПЗ «Сокулукский» - 64,2%, КХ «Чабрец» - 46,5%. Результаты представлены на рисунке 7. Большой процент серопозитивности животных наблюдался в осеннее-зимний и весенний период.

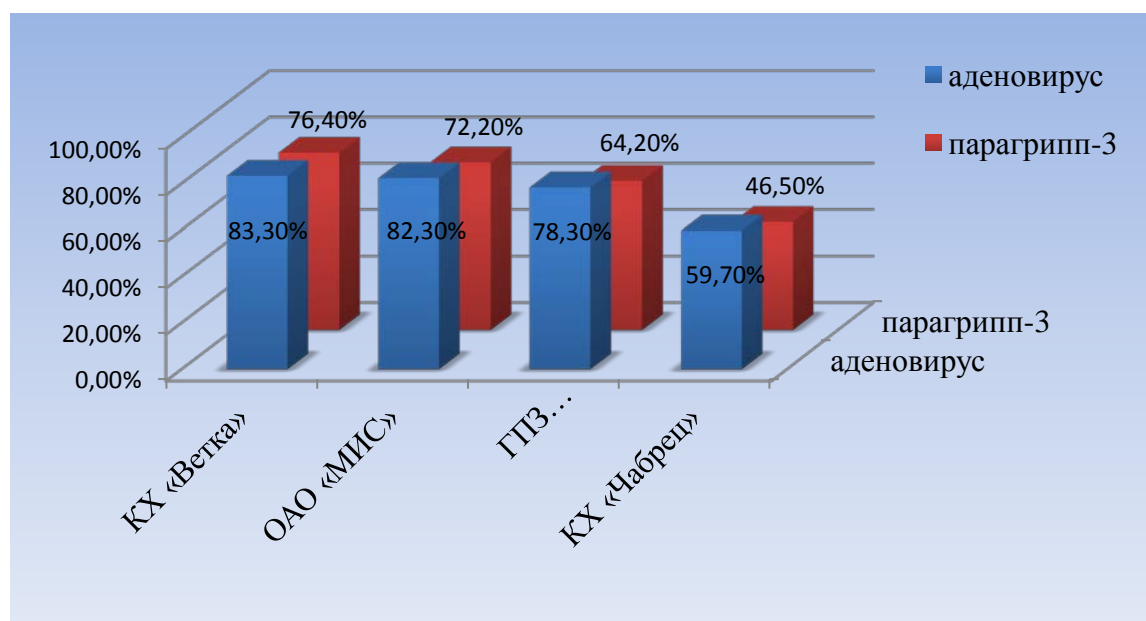


Рис. 7. Степень серопозитивности животных к респираторным инфекциям в обследованных хозяйствах.

Таким образом, проведенные нами исследования указывают на достаточно высокую зараженность скота респираторными инфекциями. Одновременное обнаружение антител к нескольким возбудителям свидетельствует о смешанном течении заболевания. Изучение распространенности респираторных болезней обуславливает необходимость разработки средств профилактики этой патологии. При планировании противоэпизоотических мероприятий крайне необходимо проводить весь комплекс диагностических исследований (вирусологических и бактериологических) с целью установления этиологической структуры конкретной вспышки респираторных заболеваний крупного рогатого скота и выявления этиологической роли каждого инфекционного агента.

Межвидовая миграция респираторных вирусов

Для изучения возможной межвидовой миграции респираторных вирусов была исследована сыворотка крови крупного рогатого скота, яков и дзо. Нами проведены серологические исследования сывороток крови на наличие специфических антител к пяти видам респираторных вирусов. Для этого в хозяйствах Кара-Кужурской долины Нарынской области, а также в селе Ак-Шийрак Иссык-Кульской области были обследованы и выделены больные животные с признаками респираторных вирусов. У больных животных был пониженный аппетит, вялость, понос, истечение из носа. У больных и подозрительных крупного рогатого скота и яков содержащихся совместно, взят патологический материал (носовые смывы, пробы крови). По данным анамнеза сведений о вакцинации животных не было. Также сбор информации показал, что животные круглый год содержатся в общих загонах и выпасаются на общих естественных пастбищах.

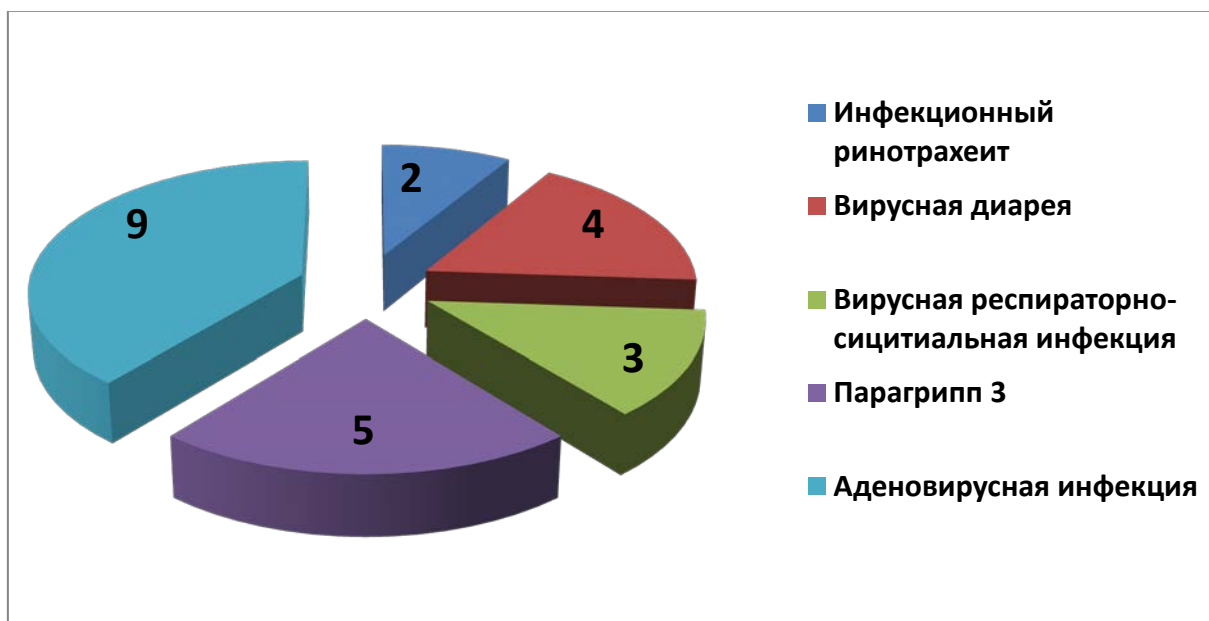


Рис. 8. Количество положительных проб сыворотки крови телят и яков к респираторным вирусам

Исходя из данных рисунка 8, преобладающими вирусами в крови телят и яков являются аденовирусы и парагрипп-3, несколько меньше вирусной диареей, инфекционным ринотрахеитом и респираторно-синцитиальной инфекцией. У яков, совместно содержащихся с КРС, были обнаружены специфические антитела к аденовирусу, что говорит о межвидовой миграции вируса.

Серологическими исследованиями крупного рогатого скота и дзо установлено, что специфические антитела обнаруживались к нескольким вирусам. Это говорит о том, что респираторные вирусные болезни чаще всего протекают по типу смешанных инфекций. Проведенные нами исследования свидетельствуют о чувствительности вышеперечисленных животных к респираторным инфекциям, особенно молодняк. Это указывает на необходимость проведения комплексных профилактических мероприятий, включающих проведение общих ветеринарно-санитарных мероприятий, вакцинацию против наиболее значимых возбудителей не только КРС, но и дзо и яков.

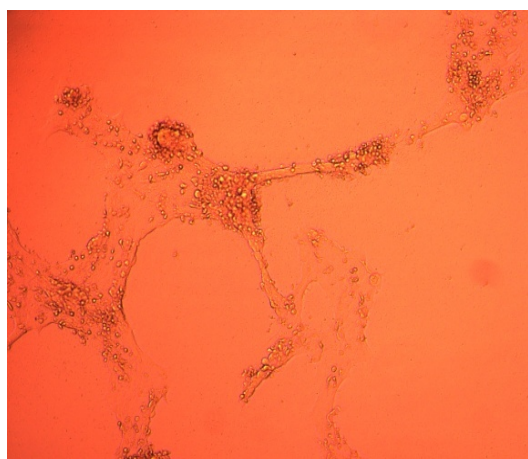
Выделение и адаптация респираторных вирусов на культуре клеток.

Следующим этапом наших исследований было выделение вирус из патматериала для подтверждения и его идентификации. Адаптацию к культурам клеток проводили с использованием методического приема: «слепые» пассажи в культуре клеток.

Готовили 10% суспензию из биоматериала, привезенного из Нарынской области от больных яков, культивировали на перевиваемой культуре клеток. ЦПД наблюдали с первого пассажа на 2-е сутки после заражения. В начале клетки увеличились в объеме и стали обретать округлую форму. Затем клетки стали собираться в конгломераты (рис.5.б), клеточный монослой терял свою форму. К концу культивирования монослой культуры клеток полностью терял свою первоначальную структуру. Микроскопированием было отмечено скопление клеток в конгломераты, образование пустот. Аналогичных изменений в контролях не наблюдалось (рисунок 9 а.).



а



б

Рис. 9. Культура клеток MDBK а) незараженная, б) зараженная аденовирусом

Нами проведено культивирование аденовирусов на перевиваемой культуре клеток Vero. Культуру клеток выращивали в пластиковых матрасах. Монослой культуры клеток образовывался на 2-3 сутки.

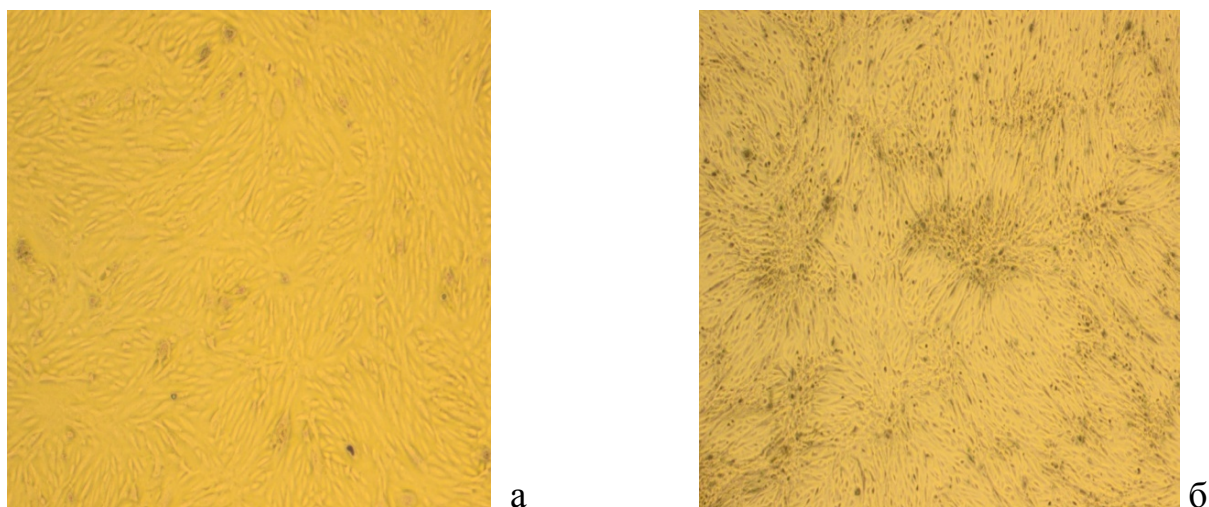


Рис. 10. а) монослой культуры клеток Vero, б) ЦПД на 2-е сутки после заражения культуры клеток

Уже на вторые сутки наблюдали ЦПД на 30 % поверхности посевного материала. Клетки начали округляться и собираться в конгломераты. Образование «стерильных пятен», т.е. зоны деструкции монослоя, наблюдали на 7-е сутки, ЦПД составило 60%.

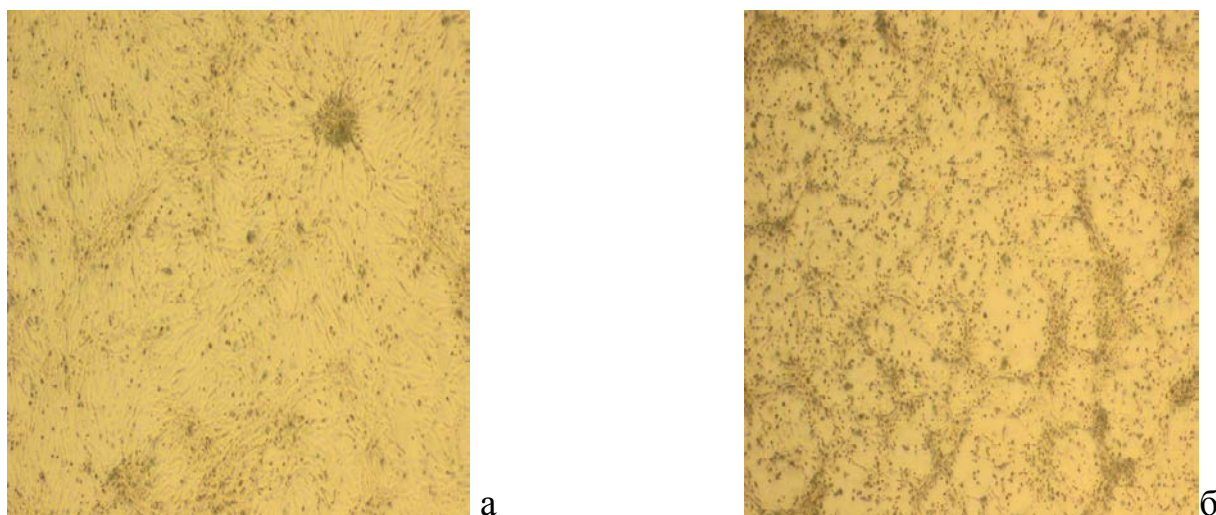


Рис. 11. а) ЦПД на 7-е сутки после заражения, б) ЦПД на 10-е сутки после заражения

На 10-е сутки площадь «стерильных пятен» увеличилась, образованные конгломераты были в виде гроздьев винограда.

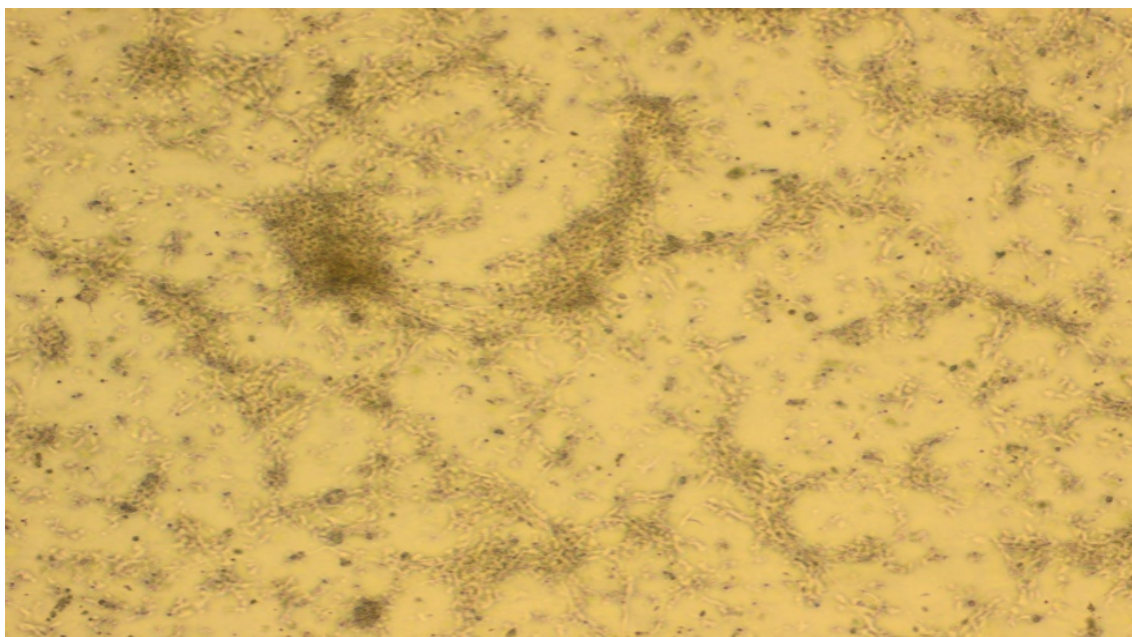


Рис. 12. ЦПД на 11-е сутки после заражения

На 11-е сутки были четко видны конгломераты. Площадь ЦПД составила 80 % поверхности культуры. Спустя 11 суток зараженную культуру клеток консервировали и в дальнейшем использовали для постановки ПЦР.

Опытами установлено, что перевиваемые линии клеток Vero, MDBK оказались чувствительными к респираторным вирусам. Цитопатические изменения наблюдали в виде сбоя пораженных клеток и конгломератов, напоминающих «гроздь винограда», и последующее отторжение их от стекла. В культуре клеток Vero вирус размножался с характерными изменениями клеток. Полевые изоляты с 1го пассажа вызывали в культуре клеток характерные для аденовирусов внутриклеточные изменения. Выделенные изоляты хорошо репродуцировали в клетке Vero; их титр достигал $4,5 \log$ ТЦД 50/мл.

Выделенные изоляты характеризовались выраженными патогенными свойствами в отношении зараженной культуры клеток. Вирус репродуцировался с высоким титром $4,5 \log$ ТЦД 50/мл, активно накапливался на перевиваемой культуре клеток. Перевиваемая линия клеток, инфицированная изолятом, в каждом препарате имела клетки с ядрами, заполненными мелкими зелеными гранулами. Инфицированные изолятом клетки были на различных стадиях формирования включений: в ядрах мелкие гранулы, в ядрах центроядерное включение, в ядрах несколько крупных включений. Как показали результаты наших исследований, полевые изоляты при пассировании в культуре клеток Vero проявили ЦПД на протяжении нескольких пассажей и имели внутриядерные включения.

Включения, образующиеся при репродукции изолятов, были сходны между собой и не отличались от описаний в литературе. Вначале они были в ядре небольшими и многочисленными группами, а затем увеличивались в

размере. В отличие от ряда других мнений в наших исследованиях при репродукции изолятов не выявлены включения других типов аденовирусов.

Таким образом, аденовирусы крупного рогатого скота (выделенные изоляты) не различаются по морфологии включений.

Влияние различных факторов на устойчивость аденовирусов

В последующих этапах была исследована устойчивость выделенного изолята аденовируса к температурным отклонениям. Опытами установлено, при температуре 4 °С вирус сохранял свою инфекционность в течение 7 месяцев, после чего начиналось постепенное снижение титра. Снижение инфекционного титра у изолятов при хранении – 20 °С наблюдалось через 20 месяцев; 10-ти кратное замораживание изолятов при температуре -80°С и оттаивание в водяной бане при 37 °С не снижало инфекционный титр. Полную инактивацию вируса наблюдали через 30 дней при температуре 37 °С. Исследования проведенные при использовании более высоких температур показали, что инактивация вируса происходила в течение 5-7 минут при 60 °С и 1-2 минуты при 70 °С.

При воздействии УФ-лучами вирус инактивировался в течение часа. Также изучили устойчивость вируса при воздействии формалином различной концентрации. Результаты исследования приведены в таблице 2.

Таблица 2 - Инактивация аденовируса формалином различной концентрации

Концентрация формалина	1й день	2й день	3й день	4й день	5й день	6й день	7й день	8й день	9й день
1:500	-	-	+						
1:1000	-	-	-	-	+				
1:2000	-	-	-	-	-	-	+		
1:4000	-	-	-		-	-	-	-	+

Таким образом, проведенные исследования указали на устойчивость аденовирусов к некоторым физико-химическим факторам, в частности, к действию формалином. Из таблицы 2 видно, что высокие концентрации формалина 1:500 инактивируют вирус спустя 3 суток, а самые низкие концентрации 1:4000 нейтрализуют спустя 9 суток.

Молекулярно-биологическая диагностика респираторных вирусов КРС

Выделение ДНК представляет собой первоначальный этап ПЦР-диагностики. Выделение ДНК и РНК проводили набором фирмы «Ахуген», по предложенному протоколу.

Выделение ДНК и РНК проводили из патологического материала носовых смывов от клинически больных животных и проб органов от павших животных. В связи с тем, что парагрипп-3 является РНК содержащим вирусом, нам необходимо было получить комплементарную ДНК (кДНК).

Обратную транскрипцию проводили набором Quanti Test Reverse Transcription Kit Cat:№ 205311 согласно приложенной инструкции.

С этой целью брали компоненты тест системы Qiagen, 1й этап которого включал: Buffer 7x - 2 µl, ddH₂O - 4 µl, RNA - 8 µl; 2й этап: RT buffer5x - 4 µl, RT Primer mix - 1 µl, RT polimer - 1 µl.

Реакционную смесь амплифицировали Aplid Biosystem, используя следующие температурные параметры: **1й этап** - 42 °C (3 мин); **2й этап** – 42 °C (30мин), 95°C (3мин), 4°C (∞)

Полученную комплементарную ДНК хранили при -20°C в течение 1 недели.

Выбор праймеров для постановки ПЦР

Важным условием в постановке полимеразной цепной реакции является подбор структуры олигонуклеотидных праймеров, для успешной реализации которого необходим опыт работы с информационной базой данных. Предстояло подобрать специфический фрагмент генома ДНК или РНК исследуемого вируса так, чтобы два его концевых участка отличались бы генетической консервативностью, которая отсутствует в ДНК других возбудителей и специфична только для данного вируса.

Учитывая требуемые параметры при выборе праймера, в результате лабораторных испытаний были подобраны следующие праймеры:

Таблица 3 - Последовательность подобранной системы праймеров

Последовательность нуклеотидной системы парамикров		
Название	Последовательность 5'-3'	П.н.
для выявления вируса парагриппа-3		
PI3P1F	TCCATGGTCCAGTAGATTAAGAAA	100
PI3P2R	TCACCCTGAATTTTATCCCTCT	
PIV3m1	AGAGCCGTTACCACTCAAGG	140
PIV3m2	ATTGAGGAGCAAGTGCACC	
QPI3Fu1	GGCTTTTCTAGGTGGTGCTG	178
QPI3Fu2	CACAAACGCGTATCGTGGTA	
QPI3HN1	ATTACCCAGGGCTGTCAAGA	150
QPI3HN2	AATAGTGCAAGGGAGCAGGA	
для выявления аденовируса		
E1A	GAG ATG GAT GTG AAC AGC GA	644
E2A	ACA TTC TGA TGC TGG TAC TG	
H1	TTGTCGGGGGTTCAGAT	563
H2	TTAACAGTGGCCCCATCG	

Разработка и апробация контрольных образцов реакционной смеси для ПЦР

Для контроля проведения ПЦР были разработаны отрицательный контрольный образец (ОКО) и положительные контрольные образцы (ПКО) – на детектируемый вирус.

ОКО содержит все компоненты реакционной смеси кроме целевой вирусной ДНК/кДНК. Вместо него вносили соответствующее количество деионизированной воды, не содержащей исследуемый ДНК.

ПКО это препараты рекомбинантной ДНК, содержащие нуклеотидные последовательности для гибридизации праймеров, включая все компоненты реакционной смеси.

В процессе лабораторных исследований было установлено, что для выявления аденовирусной инфекции КРС методом ПЦР состав компонентов тест – системы должен быть следующим: ddH₂O - 7.2 µl, buffer 5x - 4 µl, dNTP mix10x- 0.4 µl, MgCl 25 mM - 1.2 µl, Pr1 (5µM) и Pr2 (5µM) - 2 µl, Tag polymerase 5U/1 µl – 0,2 µl, DNA 40ng/ µl - 3 µl. Общий объем 20 µl

Для постановки реакции ПЦР использовали амплификатор Applied Biosystems 2720, установив следующие параметры: начальная денатурация - 94 °С (2 мин) - 1 цикл; денатурация - 94 °С (40 с), отжиг - 55 °С(45 с), элонгация - 72 °С (60 с) - 35 циклов; завершающая элонгация - 72 °С (5 мин) - 1 цикл.

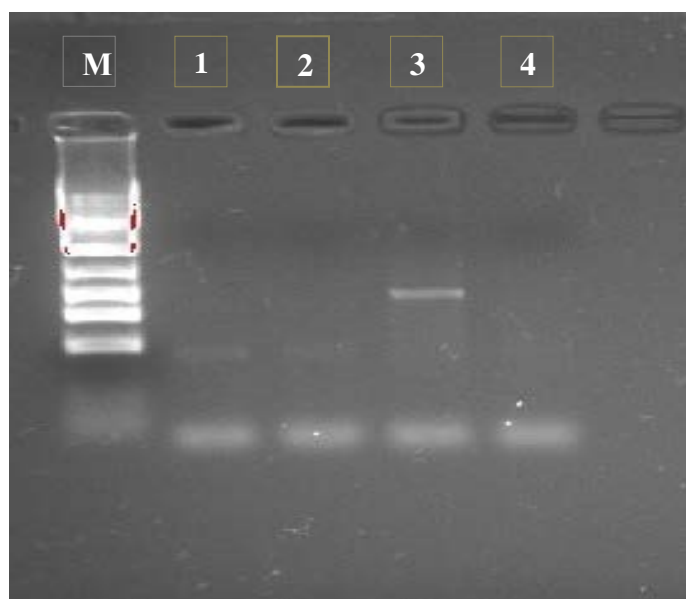


Рис. 13. Выявление фрагмента аденовируса:

М – маркер, 1 – отрицательный контроль, 2 – праймер №2, 3 – праймер №1

Учет реакции амплифицированного продукта проводили методом электрофореza в агарозном геле. Для этого готовили 2,5% агарозный гель. В 70 мл 1x ТАЕ буфера растворяли 1,75 г агарозы.

В лунки агарозного геля вносили по 5 мкл амплифицированного продукта. Электрофорез проводили при напряжении 120 В/см длины геля в течение 20 минут. Для визуализации результата пользовались гель документирующей машиной.

Экспериментом установлено, праймер №1, размер амплифицированного продукта которого составлял 644 пар нуклеотид, оказался специфичным по отношению геномной ДНК аденовируса. Эта позволяет использовать праймер №1 для дальнейшей диагностики аденовирусной ДНК.

Программа амплификации вирусной ДНК парагриппа-3 включала следующие этапы: начальная денатурация - 94 °С (3 мин) - 1 цикл; денатурация - 95 °С (45 с), отжиг - 55 °С (50 с), элонгация - 72 °С(60 с) -35 циклов; завершающая элонгация - 72°С (5 мин) -1 цикл.

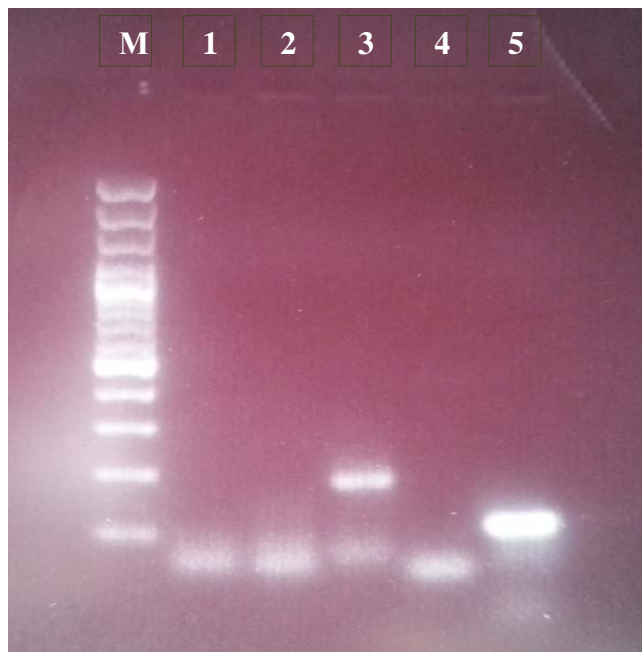


Рис. 14. Результаты ПЦР по выявлению вируса парагриппа-3:

М – маркер, 1 – отрицательный контроль, 2 - праймер №4, 3- праймер №3, 4 - праймер №2, 5 - праймер №1.

Для детекции геномной ДНК парагриппа-3 были отобраны 4 праймера с различным размером амплифицируемого продукта. Праймер №3 и №5 оказались специфичными. Размер ожидаемого продукта для праймера №3 составлял 178 пар нуклеотид и 100 пар нуклеотид для праймера №5. Учет результатов реакции проводили в агарозном геле. (Рис. 14.)

Проведенная нами проверка специфичности подобранных четырех праймеров показала, что два из них строго специфичны, что позволяет нам использовать эти праймеры для диагностики вируса парагриппа-3.

Выявление возбудителей парагриппа-3 и аденовирусной инфекции с помощью оптимизированного метода ПЦР

Подобранные нами праймеры были испытаны в лабораторных условиях на большом фактическом материале. Для выявления геномной ДНК аденовируса и вируса парагриппа-3 было исследовано 375 проб из Чуйской и Нарынской областей. Патологический материал взят от крупного рогатого скота с подозрением на респираторные инфекции в возрасте от 2 недель до 5

лет. В каждой из 30 проб был обнаружен один из респираторных вирусов. Анализ 87 проб носовых смывов показал циркуляцию аденовируса и вируса парагриппа-3 одновременно.

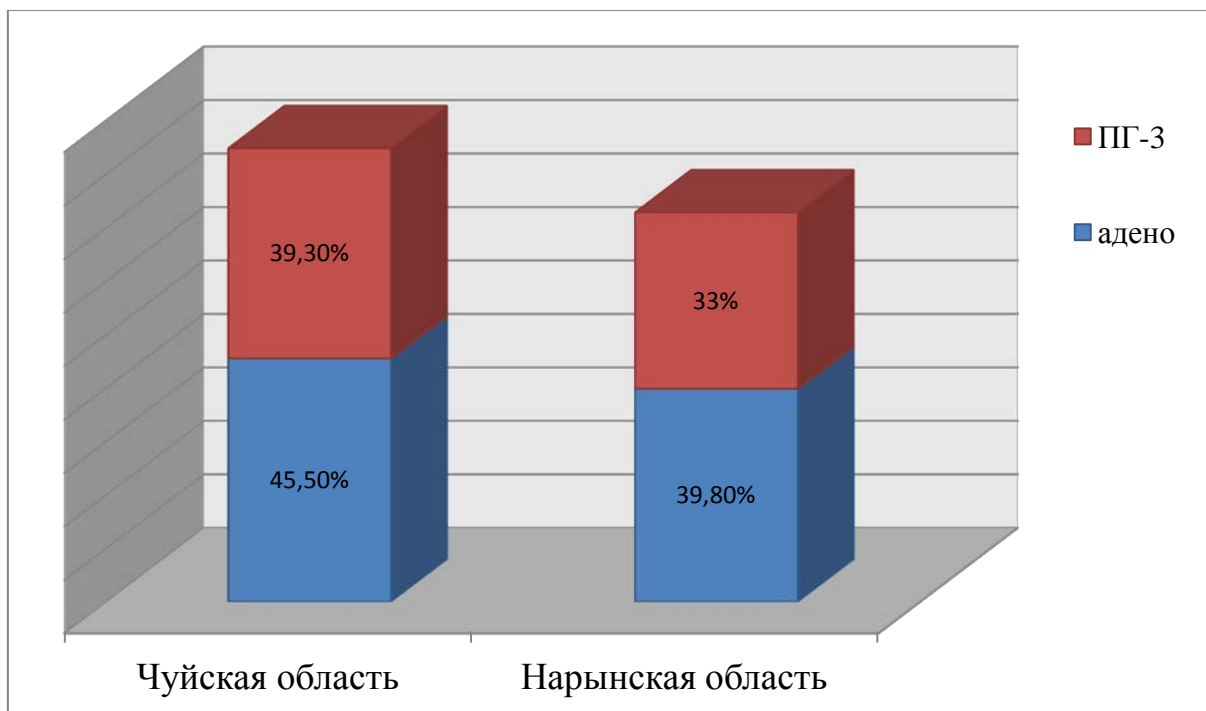


Рис. 15. Уровень зараженности респираторными вирусами

Из Чуйской области было исследовано всего 257 проб, из них 117 проб (45,5%) показали положительный результат на аденовирус и 101 проба (39,3%) на вирус парагриппа – 3. В Нарынской области циркуляция респираторных вирусов оказалась ниже из 118 исследованных проб 47 (39,8%) положительных на аденовирусы и 39 (33%) на вирус парагриппа-3.

Нами были проведены исследования по изучению аденовирусной инфекции и парагриппа-3 у животных различных возрастных групп.

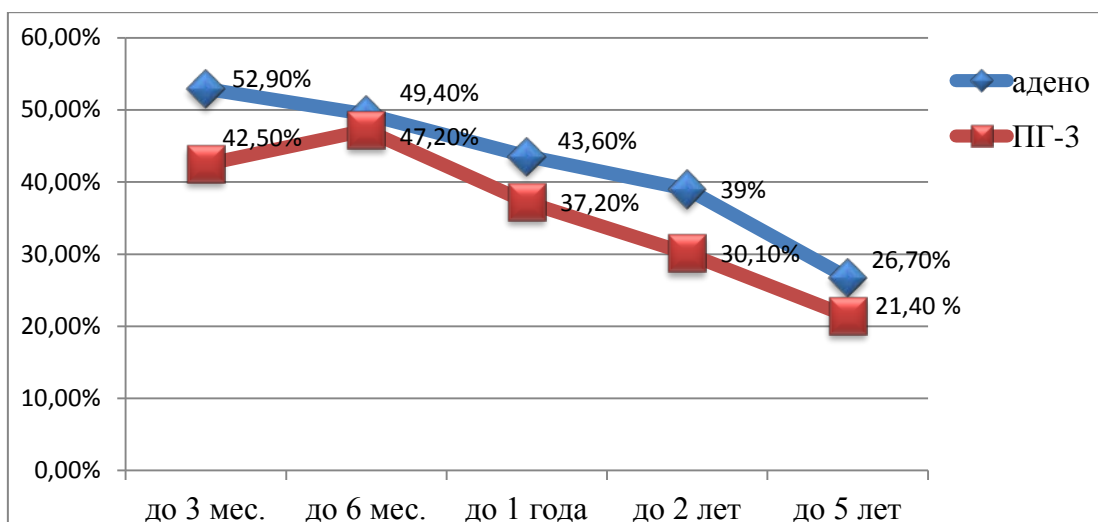


Рис. 16. Наличие возбудителей в крови животных разного возраста

Как показано в диаграмме, вспышки заболеваний с респираторным симптомокомплексом, в основном, вызваны аденовирусами и вирусами парагриппа-3, которые протекали в ассоциации с другими возбудителями болезней. Аденовирусная инфекция была выделена в основном у телят до 3 месяцев - 52,9%, тогда как вирус парагриппа-3 у телят до 6 месяцев – 49,4%. Проведенные нами исследования показывают, что обе инфекции поражают животных любого возраста, но более подвержен молодняк до 1 года. Среди взрослых животных болезнь встречается реже - 26,7% случаев по аденовирусной инфекции и 21,4% - вирус парагриппа-3.

Также нами проведены исследования по определению частоты выявления вируса из биоматериала павших животных.

Таблица 3 - Выявление аденовируса и вируса парагриппа-3 методом ПЦР в патологическом материале различных органов.

№ п/п	Вид биоматериала	Количество исследованных проб	Из них положительных проб	Процент положительных проб от числа исследованных
1	Носовые выделения	20	10	50%
2	Выделения из конъюнктивы	17	9	53%
3	Экссудат из трахеи, бронхов, носовых синусов	7	5	71%
4	Легкие	7	3	43%
5	Бронхи	7	2	29%
Всего:		58	29	50%

Из данных таблицы 3 следует, что вирусы респираторных болезней чаще всего локализуются в экссудате из трахеи, бронхов, носовых синусов (71%), в конъюнктиве глаз (53%), носовых выделениях (50%) и меньше в легких (43%) и бронхах (29%). При вспышках респираторных заболеваний оптимальным материалом для быстрой диагностики рекомендуем использовать выделения из конъюнктивы глаз и носовые истечения. Для выявления генома вируса необходимо произвести отбор и транспортировку проб биоматериала с соблюдением правил.

ВЫВОДЫ

1. Установлена широкая циркуляция аденовируса и вируса парагриппа-3 среди крупного рогатого скота соответственно: по Чуйской 72,9 % и 64 %, Нарынская 69 % и 46,1 % и Иссык-Кульской областях 61,3 % и 58,8 %.
2. Впервые в условиях Нарынской области из биоматериала от яков выделен возбудитель аденовирусной инфекции, что указывает на межвидовую миграцию вируса так как наблюдается совместное содержание яков, крупного рогатого скота и дзо на горных пастбищах. Зараженность яков составляет 62,5 %
3. Установлено, что перевиваемые культуры клеток Vero, MDBK являются чувствительными к выделенному аденовирусу. Вирус репродуцировался с высоким титром 5 log ТЦД 50/мл на перевиваемой культуре клеток MDBK и 4,5 log ТЦД 50/мл на культуре клеток Vero.
4. Установлено, что высокие концентрации формалина 1:500 инактивируют вирус спустя 3 суток, а самые низкие концентрации 1:4000 нейтрализуют спустя 9 суток. При 4 °С инфекционность вируса сохраняется в течение 7 месяцев, при 70 °С инактивируется за 1-2- минуты.
5. Подобраны олигонуклеотидные праймеры и оптимизированы состав реакционных смесей и температурно-временные параметры ПЦР для выявления геномной ДНК аденовируса и вируса парагриппа-3.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Разработана рекомендация по диагностике, профилактике и лечению парагриппа-3 крупного рогатого скота (утверждена ГИВФБ при Правительстве КР 23 декабря 2013 года).
2. Оптимизированы условия постановки тест-системы ПЦР для выявления генома вируса в различных органах и тканях больных животных. Методика постановки тест-системы ПЦР может использоваться ветеринарными диагностическими центрами для более точной и быстрой диагностики респираторных вирусных инфекций (акт внедрения от 5 октября 2016 года).
3. Материалы диссертации используются в лекциях для студентов факультета ветеринарной медицины и биотехнологии по молекулярно-биологическим методам диагностики респираторных вирусов (справка от 17 марта 2016 года).

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Толубаева, М.Т. Респираторные болезни крупного рогатого скота [Текст] / М.Т. Толубаева // Вестник сельскохозяйственных наук. Бишкек. 2013. С.138-140.
2. Толубаева, М.Т. Распространение респираторно-кишечной инфекции в хозяйствах Чуйской области и их диагностика [Текст] / М.Т. Толубаева,

- Р.З. Нургазиев // Вестник КНАУ, посвященного 95-летию со дня рождения выдающегося ученого-ветеринара, Почетного академика НАН КР, д.в.н., профессора Алдашева А.А. –Бишкек. 2014. – С. 21-24.
3. Толубаева, М.Т. Эпизоотическая ситуация по возбудителям респираторных заболеваний в хозяйствах Чуйской области [Текст] / М.Т. Толубаева // Вестник НГАУ. - Новосибирск. 2015.- № 4 (37). – С.142-146.
 4. Толубаева, М.Т. Межвидовая миграция респираторных вирусов крупного рогатого скота [Текст] / М.Т. Толубаева, Р.З. Нургазиев, А.Р. Нургазиева // Вестник КНАУ. Материалы научно-практической конференции, посвященной 70-летию юбилею Аманбекова Ж.Б.-государственного и политического деятеля КР, Бишкек. 2016 – стр.-148-152.
 5. Толубаева, М.Т. Культивирование аденовирусов крупного рогатого скота в перевиваемой культуре клеток [Текст] / М.Т. Толубаева, Р.З. Нургазиев // Вестник АГАУ. - №5 (139), май. – Алтай. 2016 – стр.117-121.
 6. Толубаева, М.Т. Серологический мониторинг респираторных инфекций крупного рогатого скота / М.Т. Толубаева, Е.Д. Крутская, А.Р. Нургазиева, Ж.Ч. Орозов // Вестник КНАУ. - Бишкек – 2017. – С. 78-82.
 7. Рекомендация по диагностике, профилактике и лечению парагриппа-3 крупного рогатого скота. – Бишкек. 2013. – 6 с.

**Толубаева Майрамкул Толубаевнанын «Молекулярдык биологиялык ыкмаларды колдонуу менен ийри мүйүздүү малдардын респиратордук вирустарын табуу, идентификациялоо жана мүнөздөө» темасында
06.02.02 – ветеринардык микробиология, вирусология, эпизоотология, микология менен бирге микотоксикология жана иммунология адистиги боюнча ветеринария илимдеринин кандидаты даражасын коргоочу
диссертациясынын
КОРУТУНДУСУ**

Негизги сөздөр: бодо малдардын респиратордук вирустары, аденовирустук инфекция, парагрипп-3, музоо, топоз, аргындар, изолят, клетка өстүрмөсү, полимераздык чынжырлуу реакциясы, иммуноферменттик анализ.

Изилдөөнүн объектиси: бодо мал, топоз, аргын, патологиялык материал.

Иштин максаты: Кыргыз Республикасында үстөмүк кылган респиратордук ылаңдарынын вирустарын табуу жана идентификациялоо, вирустардын геномдорун табуу үчүн полимераздык чынжырлуу

реакциясынын молекулярдык биологиялык тест-системаларын оптимизациялоо.

Изилдөөнүн ыкмалары: клиникалык-эпизоотологиялык, серологиялык, вирусологиялык, молекулярдык-биологиялык.

Алынган натыйжалар жана алардын жаңылыгы: Кыргыз Республикасында биринчи жолу Нарын облусунун аймагындагы топоздордон алынган патологиялык материалдарынан аденовирустук инфекция бөлүнүп алынган. Vero, MDBK көчүрмө өстүрмө клеткаларында изоляттын сезгичтиги жана ар түрдүү факторлордун таасирлерине туруктуулугу изилденген. Парагрипп-3 жана аденовирустук инфекцияларынын козгогучтарын табуу үчүн олигонуклеотиддик праймерлер тандалып алынган, полимераздык чынжырлуу реакциясынын реакциондук аралашманын составын жана температуралык убакыттын параметрлери оптимизацияланган.

Колдонуу чөйрөсү: вирусологиялык жана ветеринардык практика.

РЕЗЮМЕ

диссертации Толубаевой Майрамкул Толубаевны на тему: «Выявление, идентификация и характеристика респираторных вирусов у крупного рогатого скота с использованием молекулярно-биологических методов» на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02. – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Ключевые слова: респираторные вирусы крупного рогатого скота, аденовирусная инфекция, парагрипп-3, телята, яки, дзо, изолят, культура клеток, полимеразная цепная реакция (ПЦР), ИФА

Объект исследования: крупный рогатый скот, яки, дзо, патологический материал

Цель работы: выделение и идентификация вирусов, респираторных болезней доминирующих в Кыргызской Республике, оптимизация молекулярно-биологической тест-системы ПЦР для выявления генома вируса.

Методы исследования: клинко-эпизоотологические, серологические, вирусологические, молекулярно-биологические.

Полученные результаты и их новизна. Впервые в Кыргызской Республики в условиях Нарынской области из патологического материала, взятых от яков выделена аденовирусная инфекция. Изучены чувствительность изолята на перевиваемых культур клеток Vero, MDBK и его устойчивость на влияние различных факторов. Подобраны олигонуклеотидные праймеры, оптимизированы состав реакционных смесей и температурно-временные параметры ПЦР для выявления возбудителей аденовирусной инфекции и парагриппа-3.

Область применения: вирусология, ветеринарная практика

SUMMARY

Tolubaeva Mairamkul Tolubaevna dissertation on the theme: “Detection, identification and characterization of respiratory viruses in cattle using molecular biological methods” for the degree of candidate of veterinary sciences, specialty 06.02.02. - Veterinary microbiology, virology, epizootology, mycology with mycotoxicology and immunology

Keywords: Respiratory viruses of cattle, adenovirus infection, parainfluenza-3, calves, yaks, dzo, isolate, cell culture, polymerase chain reaction (PCR), ELISA

Object of research: Cattle, yaks, dzo, pathological material

Aim of the work: isolation and identification of viruses, respiratory diseases dominant in the Kyrgyz Republic, optimization of the molecular-biological PCR test system for detection of the virus genome.

Methods of research: clinical-epizootological, serological, virological, molecular-biological.

The obtained results and their novelty: For the first time in the Kyrgyz Republic, in the conditions of the Naryn oblast, an adenovirus infection was isolated from pathological material taken from yaks. The sensitivity of the isolate on transplantable Vero cell cultures, MDBK and its resistance to the influence of various factors was studied. The oligonucleotide primers were selected, the composition of the reaction mixtures and the temperature-time parameters of the PCR were optimized to detect pathogens of adenovirus infection and parainfluenza-3.

Field of application: virology and veterinary practice.