

УДК 619:616.98:577.2.083

А.Г. Глотов, доктор ветеринарных наук, профессор
Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (г. Новосибирск, Россия)
E-mail: glovov_vet@mail.ru

Т.И. Глотова, доктор биологических наук, профессор
Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (г. Новосибирск, Россия)
E-mail: t-gloтова@mail.ru

Е.Б. Никитин, доктор ветеринарных наук, профессор
Инновационный Евразийский университет (г. Павлодар, Республика Казахстан)
E-mail: yevgeniynikitin1964@gmail.com

Т.И. Урюмцева, кандидат ветеринарных наук, доцент
Инновационный Евразийский университет (г. Павлодар, Республика Казахстан)
E-mail: vbh2@mail.ru

Выявление вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции

***Аннотация.** Статья посвящена актуальной проблеме дифференциальной диагностики заболеваний вирусной этиологии у сельскохозяйственных животных. Вирусные заболевания на настоящий момент имеют широкое распространение, занимают ведущее место в инфекционной патологии сельскохозяйственных животных, нанося огромный экономический ущерб. С учетом масштабов вакцинопрофилактики животных, для повышения эффективности противозoonотических мер остро стоит вопрос разработки методов быстрого и эффективного выявления и дифференциации полевых и вакцинных штаммов вируса инфекционного ринотрахеита у крупного рогатого скота. Рассматривается возможность применения полимеразной цепной реакции для идентификации и дифференциации вакцинного штамма от эпизоотических штаммов и изоляторов вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. В процессе исследований разработан метод ПЦР-ПДРФ анализа для обнаружения вируса ИРТ в испытуемом материале. Метод ПЦР-ПДРФ анализа применяли для идентификации и дифференциации вакцинного штамма ТК-А от эпизоотических штаммов и изоляторов вируса ИРТ крупного рогатого скота. Принцип ПЦР, основанный на многократном повторении циклов ДНК, отжига и синтеза, что приводит к увеличению количества специфических фрагментов ДНК возбудителя, позволяет учитывать результаты ПЦР в агарозном геле. Время анализа около 30 часов. Чувствительность обнаружения вирусной ДНК составляет 1-10 пикограмм (10^2 ТЦД). Благодаря таким характеристикам, как относительная простота и скорость реакции, высокая чувствительность, специфичность и воспроизводимость, в последнее время ПЦР получила широкое распространение в фундаментальных и прикладных исследованиях в различных областях биологической науки, включая ветеринарную вирусологию. Результаты, полученные при проведении исследований, показывают, что применение ПЦР-ПДРФ позволяет дифференцировать полевые и вакцинные штаммы и изоляты вируса ИРТ с высокой степенью достоверности. Использование ПЦР-ПДРФ анализа повышает эффективность и информативность исследований в области молекулярной эпизоотологии ИРТ крупного рогатого скота, поскольку позволяет не только идентифицировать ДНК разных штаммов вируса независимо от их природы, но и проводить дифференциацию между ними, в том числе дифференцировать штамм ТК-А, используемый для производства аттенуированных вакцин от эпизоотических штаммов и изолятов вируса.*

***Ключевые слова:** полимеразная цепная реакция, инфекционный ринотрахеит, диагностика, изолят, штамм, маркер.*

Введение. Инфекционный ринотрахеит (ИРТ) является экономически значимым инфекционным заболеванием, характеризующимся развитием инфекций дыхательных путей, конъюнктивита, менингоэнцефалита, артрита и инфекций половых путей у крупного рогатого скота. Возбудителем является герпесвирус типа 1 (BHV-1), принадлежащий к семейству Herpesviridae, семейству Alphaherpesvirinae.

После первого заболевания появляется скрытая форма инфекции, при которой вирус сохраняется в нервных ганглиях вблизи места первичного размножения и периодически реактивно выделяется в окружающую среду. Кроме того, он может циркулировать в иммунной популяции. Стойкость вакцинных штаммов также возможна. В этом случае могут быть полевые штаммы со сниженной вирулентностью, которые вызывают слабую клиническую картину, но сохраняют способность к образованию скрытой формы инфекции. Не исключается возможность одновременного появления штаммов, несущих вакцину и маркеры вакцины, поскольку между ними существует теоретическая «гибридизация». Латентность создает значительные проблемы в борьбе с этим заболеванием.

Во многих странах, включая Казахстан и Россию, основой мер по борьбе с ИРТ крупного рогатого скота является специальная профилактика в сочетании с комплексом ветеринарных и экономических мер. Моно- и сопутствующие вакцины на основе аттенуированного штамма «ТС-а» широко используются в России.

Учитывая масштабы вакцинации животных, для повышения эффективности противозпизоотических мер стоит необходимость разработки методов быстрого и эффективного выявления и дифференциации полевых и вакцинных штаммов вируса ИРТ у крупного рогатого скота.

Важным диагностическим инструментом в ветеринарной вирусологии является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Среди его преимуществ - высокая специфичность и скорость анализа. Используя этот метод, можно обнаружить низкие концентрации вирусной ДНК, которые не наблюдаются методами точечной или блот-гибридизации. Эти преимущества делают ПЦР незаменимым при диагностике персистирующих вирусных инфекций, характеризующихся низкими концентрациями вируса в тканях и жидкостях организма на латентной стадии заболевания. К таким инфекциям относятся заболевания, вызванные вирусом герпеса у животных. При амплификации вирус может быть быстро обнаружен в выделениях из носовой полости коров и телят, в фетальной сыворотке, а также в сперме быков, что очень важно для выявления носителей вируса у животных на племенных предприятиях. Чувствительность к обнаружению BHV-1 с помощью ПЦР может достигать 3-х фемтог вирусных ДНК [1, 2, 3].

Учитывая наличие геномных вариантов вируса, полученных на основе рестрикционного анализа, существует необходимость в филогенетическом анализе патогенных штаммов [4]. Для этого в настоящее время широко используются методы ПЦР- полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ анализа).

Материалы и методы. Метод ПЦР-ПДРФ анализа используется для идентификации и дифференциации вакцинного штамма ТК-А от эпизоотических штаммов и изоляторов вируса ИРТ крупного рогатого скота. Метод ПЦР основан на многократном повторении циклов ДНК, отжига и синтеза, что приводит к увеличению количества специфических фрагментов ДНК возбудителя, это позволяет учитывать результаты ПЦР в агарозном геле. Время анализа около 30 часов. Чувствительность обнаружения вирусной ДНК составляет 1-10 пикограмм (10^2 ТЦД).

Далее проводится анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Используя этот метод, при воздействии соответствующих эндонуклеаз рестрикции на фрагмент, полученный в результате амплификации, можно выявить структурные различия в ДНК родственных вирусов. ПДРФ определяется наличием или отсутствием сайта рестрикции во фрагменте геномной ДНК [5, 6].

Таким образом, разработанный способ предполагает обнаружение ДНК вируса ИРТ у крупного рогатого скота независимо от природы штамма. При необходимости вакцинные штаммы ТК-А можно дифференцировать от эпизоотических штаммов и изолятов с помощью ПДРФ-анализа.

Для этого проводят амплификацию ДНК вируса в диагностической ПЦР, а для определения различий между вакцинным и эпизоотическими штаммами и изолятами вируса проводят рестрикционный анализ продуктов диагностической ПЦР с использованием эндонуклеазы рестрикции Sac II. Данный метод может быть включен в систему мероприятий по профилактике и борьбе с ИРТ крупного рогатого скота при оценке эффективности специальных мероприятий.

Метод предназначен для обнаружения ДНК вируса ИРТ крупного рогатого скота в образцах биологического материала от крупного рогатого скота.

Для прижизненной диагностики заболевания исследуют:

- образцы носовых выделений теленка (объем не менее 1 мл);
- образцы спермы быков-производителей (не менее 2-3 гранул);
- образцы вагинальных и маточных выделений (не менее 1 мл) от коров с гинекологической патологией, в том числе абортировавших, а также котиледоны плаценты.

В случае падежа или вынужденного в диагностических целях образцы слизистых оболочек носа и трахеи, срезов легких, легочных лимфатических узлов, а также абортплодов - головного мозга, легких, печени и почек берут не позднее, чем через два часа после гибели животного. Образцы патологического материала объемом не менее 2 см³ направляются для исследования.

Метод эффективен при диагностике острых заболеваний животных с инфекционным ринотрахеитом (респираторная и генитальная формы), а также при выявлении вирусносителей, больных ИРТ крупного рогатого скота, в латентной форме, в частности, быков-производителей на станциях искусственного осеменения. Кроме того, при необходимости ПДРФ-анализ можно использовать для дифференциации между вакцинными штаммами ТС-А и полевыми штаммами, и изоляторами вируса.

При постановке реакции из доставленных образцов биоматериала готовят 5-10 % суспензию на физиологическом растворе. Затем суспензию каждого образца в объеме 0,25 мл помещают в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл и добавляют по 30 мкл 10х ТЕ-буфера, по 30 мкл 10 %-го SDS (SDS может быть в виде кристаллического вещества. Для получения раствора необходимо пробирку с SDS поместить в водяную баню или суховоздушный термостат при температуре +65 °С) и по 15 мкл раствора протеиназы К. Пробирки закрывают крышкой и выдерживают в термостате при температуре +56 °С 2 час или при +37 °С 4 час.

Далее готовят насыщенный ТРИСом фенол до pH 8,0. Емкость с фенолом (ТУ 6-09-5303-86) помещают в водяную баню при температуре 70-90 °С и выдерживают до полного растворения фенола. 50 мл расплавленного фенола переливают в колбу вместимостью 200 мл, добавляют 50 мл воды, перемешивают и оставляют для насыщения фенола водой и разделения фаз на 2-3 ч. После чего осуществляют титрование верхней водной фазы ТРИСом (трис-оксиметил-аминометан, хч, ТУ 6-09-4292-76) для создания буферного раствора: к смеси присыпают маленькую порцию (на кончике скальпеля) сухого ТРИС, перемешивают и оставляют до разделения фаз, затем в верхней водной фазе измеряют уровень pH. Данный этап повторяют неоднократно, пока pH водной фазы не станет около 8. Фенол, насыщенный буфером, можно хранить в течение нескольких недель при температуре 4 °С.

После этого проводят фенольную экстракцию остатков белков из раствора ДНК: в пробирки добавляют по 0,3 мл (равный объем) фенола, насыщенного буфером до pH 8,0, и осторожно встряхивают их несколько раз до образования эмульсии. Центрифугированием (2 мин, 12000 об/мин) отделяют водную фазу от фенольной, переносят верхний водный слой в чистые пробирки. Затем вносят равный объем смеси фенола и хлороформа (по 0,15 мл), плавню перемешивают и центрифугируют 2 мин при 12000 об/мин и переносят водную фазу в чистую пробирку. Далее добавляют равный объем (0,3 мл) смеси хлороформ: изоамиловый спирт (24:1 по объему) и проводят дальнейшую экстракцию хлороформом. Для этого пробирки повторно встряхивают до образования эмульсии в смеси, затем центрифугированием (2 мин, 12000 об/мин) отделяют водную фазу от хлороформа. Конечный водный слой переносят в чистые пробирки и приливают 1/10 объема (30 мкл) 3М ацетата натрия и 2,5 объема (0,8 мл) охлажденного этанола, перемешивают и оставляют смесь в морозильной камере при -20 °С на 2 часа или на ночь для формирования осадка ДНК. После центрифугирования (10 мин, 12000 об/мин) осадок ДНК (его почти не видно) промывают 70 % этанолом и высушивают при наклонном положении пробирки при +56 °С в течение 30-40 минут. Осадки ДНК растворяют в 20-30 мкл стерильной деионизированной воды или в 10xTE-буфере. Этот метод позволяет получить высокоочищенную ДНК, пригодную для дальнейшего исследования.

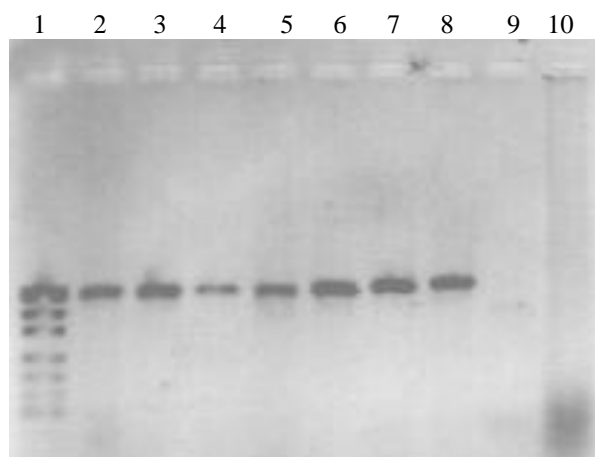
Для типирования штаммов и изолятов вируса ИРТ КРС с помощью ПЦР использовали праймеры, синтезированные к области высоко консервативного гена ICP 18,5, кодирующего гликопротеин В вируса ИРТ КРС [7]. Праймер В1 соответствует фрагменту 24002-24021 н., праймер В2 – фрагменту 24464-24445 н. (обратный) генома ВHV-1 (нумерация нуклеотидов приводится по полной последовательности генома ВHV-1 штамма Соорет).

Полимеразную цепную реакцию проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2,5 мкл буфера для Taq-ДНК полимеразы, 2,5 мкл 2mM dNTP mix - смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов, по 2,5 мкл каждого праймера (прямой и обратный) с концентрацией 2mM, 2,5 ед. активности термостабильной Taq ДНК-полимеразы. В смесь добавляют 0,03 μ геномной ДНК (5 мкл).

Пробирки с ПЦР-смесью помещали в амплификатор со следующей программой температурно-временных циклов: T_{ден} 95 °С – 5 мин; (T_{ден} 95 °С – 1 мин, T_{отж} 54 °С – 1 мин, T_{элон} 72 °С – 1,5 мин) – 35 циклов; T_{элон} 72 °С – 3 мин.

Через минуту после запуска программы, когда температура в ячейках амплификатора достигла 95 °С, ставят программу на паузу, помещают пробирки в ячейки, убирают паузу и ждут окончания реакции (примерно 2 ч 30 мин). После амплификации продукты ПЦР анализировали в 2 % агарозе (горизонтальный электрофорез). 5x TBE-буфер разводили в 10 раз (к 100 мл буфера добавляют 900 мл бидистиллированной воды). 100 мл полученного 0,5x TBE-буфера наливали в стеклянную колбу из термостойкого стекла объемом 250 мл, засыпали туда 2 г агарозы, добавляли 12,5 мкл раствора бромистого этидия и плавляли ее на электроплитке до полного растворения. Затем агарозу охлаждали до 45-50 °С, заливали в форму (толщина 5-6 мм) и помещали гребенки на расстоянии не менее 4 см друг от друга. По истечении получаса, после полного застывания геля, гребенки осторожно вынимали, не повредив лунки. Готовый гель помещали в электрофорезную камеру лунками в сторону отрицательного электрода. Наливали 0,5x TBE буфера столько, чтобы он закрыл гель на 5 мм. Из-под слоя масла отбирали 12,5 мкл амплификата, смешивали с 1-3 мкл буфера для нанесения образца (бромфеноловый синий) и вносили на дно лунки. Для определения размера полученного ампликона, использовали стандартные маркеры – наборы фрагментов ДНК известной длины, в частности, MspI, гидролизат плазмиды pUC19. Подключит камеру к источнику тока, соблюдая полярность (направление движения образцов в геле от минуса к плюсу). Электрофорез проводили при силе тока 50 мА до тех пор, пока краситель пройдет от старта не менее половины геля (примерно 30 мин). Результаты электрофореза учитывали, просматривая гель в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на приборе «Трансиллюминатор». Амплифицированные фрагменты ДНК выявляются в виде светящихся желтых полос.

Результаты. Если исследуемый образец содержит вирус ИРТ КРС, в геле имеются полосы размером 464 н.п. (рисунк 1).



1 – маркер молекулярного веса, MspI гидролизат плазмиды pUC19;
2-8 – ампликоны штаммов и изолятов вируса ИРТ КРС;
9-10 – отрицательные пробы.

Рисунок 1 – Результаты электрофореза продуктов амплификации генома вируса ИРТ КРС праймерами В1-В2

Если имеется положительный результат в диагностической ПЦР на герпесвирус крупного рогатого скота 1-го типа, при необходимости проводили рестрикцию ампликонов для дифференциации вакцинного штамма ТК-А и полевых изолятов.

Ранее было проведено сравнение нуклеотидных последовательностей фрагментов генома BHV-1 штамма ТК-А и штамма Соорег [7]. На участке амплифицированного фрагмента В1-В2 были проанализированы нуклеотидные замены, характерные для штамма ТК-А и отличающие его от референтного штамма Соорег. На основании этих данных были выбраны рестриктазы так, что при замене одного нуклеотида на другой сайт узнавания фермента либо появлялся, либо, наоборот, исчезал. Это дает возможность проводить ПДРФ-типирование штаммов и изолятов по набору рестрикционных фрагментов на дорожках геля при электрофорезе.

В пробирку объемом 0,5 мл вносят следующие компоненты реакционной смеси для рестрикции: буфер В (1) – 2 мкл; рестриктаза Sac II – 1 мкл (10 е.а.); вода деионизованная – 12 мкл; амплифицированная ДНК – 5 мкл.

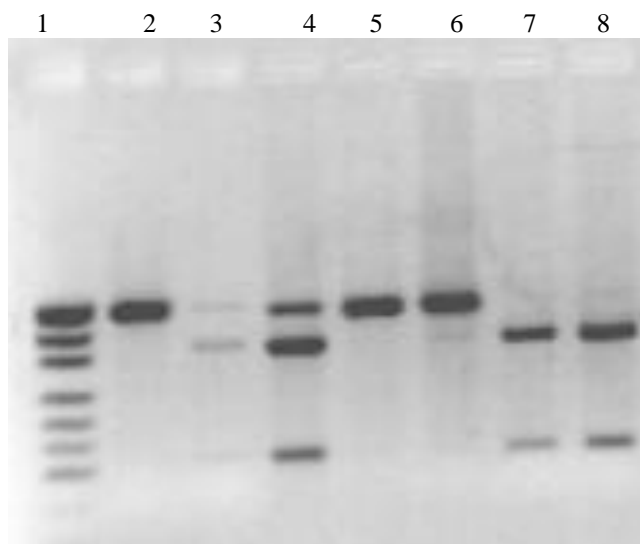
При проведении рестрикции ставят 2 контроля – продукты амплификации ДНК штаммов «Оренбург» (эпизоотический штамм) и ТК-А (вакцинный штамм). Реакцию проводят в микротермостате при +37 °С в течении 2 часов. После амплификации полученные продукты ПЦР анализируют в 2 % агарозном геле.

Ставят пробирки в штатив последовательно. Продукты рестрикции смешивают с 1-3 мкл буфера для нанесения образца (бромфеноловый синий) и вносят на дно лунки все содержимое пробирки (20 мкл). В каждом геле обязательно должны присутствовать продукты рестрикции амплифицированной ДНК штаммов «Оренбург» (эпизоотический) и «ТК-А» (вакцинный).

Подключают камеру к источнику тока, соблюдая полярность (направление движения образцов в геле от минуса к плюсу). Электрофорез проводят при силе тока 35 мА до тех пор, пока краситель пройдет от старта 3-3,5 см (примерно 40-50 мин).

Если проба после рестрикции содержит одну полосу ДНК, и она находится на таком же расстоянии от старта, что и полоса штамма «ТК-А» (464 н.п.), то выявленный изолят вируса ИРТ считают вакцинным.

Если проба содержит 2 или 3 полосы ДНК и нижние из них соответствуют размеру 343 и 121 н.п. для рестриктазы SacII и они совпадают с фрагментами штамма «Оренбург», то выявленный изолят вируса ИРТ считают полевым. Результаты рестрикции представлены на рисунке 2.



1 – маркер молекулярного веса, MspI гидролизат плазмиды pUC19;
 2 – штамм «ТК-А»;
 3-7 – изоляты вируса ИРТ КРС;
 8 – штамм «Оренбург».

Рисунок 2 – Результаты рестрикции эндонуклеазой SacII ампликонов штаммов и изолятов вируса ИРТ КРС

Из результатов электрофореза продуктов рестрикции видно, что 2 изолята (треки 5, 6), аналогично штамму «ТК-А», не имеют сайта рестрикции и образуют одну полосу размером 464 н.п. и имеют, соответственно, вакцинную природу. В треке 7 содержится 2 полосы размером 343 и 121 н.п., поэтому данный изолят можно отнести к эпизоотическому. Для оставшихся изолятов (треки 3 и 4) характерно наличие полос, свойственных штаммам «ТК-А» (вакцинный) и «Оренбург» (эпизоотический) одновременно.

Обсуждение. В процессе исследований разработан метод ПЦР-ПДРФ анализа для обнаружения вируса ИРТ в испытуемом материале. Благодаря таким характеристикам, как относительная простота и скорость реакции, высокая чувствительность, специфичность и воспроизводимость, в последнее время ПЦР получила широкое распространение в фундаментальных и прикладных исследованиях в различных областях биологической науки, включая ветеринарную вирусологию. Результаты, полученные при проведении исследований, показывают, что применение ПЦР-ПДРФ позволяет дифференцировать полевые и вакцинные штаммы и изоляты вируса ИРТ с высокой степенью достоверности.

Заключение. Использование ПЦР-ПДРФ анализа повышает эффективность и информативность исследований в области молекулярной эпизоотологии ИРТ крупного рогатого скота, поскольку позволяет не только идентифицировать ДНК разных штаммов вируса независимо от их природы, но и проводить дифференциацию между ними, в том числе дифференцировать штамм ТК-А, используемый для производства аттенуированных вакцин от эпизоотических штаммов и изолятов вируса.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Santurde G. Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus 1 genome in clinical samples / G. Santurde, N. Da Silva, R. Villres et al. // *Vet. Microbiol.* – 1996. – Vol. 49, N 1-2. – P.81-92.
- 2 Engelenburg F.A. Excretion of bovine herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation / F.A. van Engelenburg, F.W. Van Schie, F.A. Rijsewijk, J.T. Van Oirschot // *J. Clin. Microbiol.* – 1995. – Vol. 33, N 2. – P. 308-312.
- 3 Wiedmann M. Detection of BHV-1 in bovine semen by a nested PCR assay / M. Wiedmann, R. Brandon, P. Wagner et al. // *J. Virol. Methods.* – 1993. – Vol. 44, N 1. – P.129-139.
- 4 Ros C., Belak S. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine, and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification // *J. Clin. Microbiol.* – 1999. – Vol. 37 (№ 5). – P. 1247-1253.
- 5 Анализ генома. Методы / Под ред. К. Дейвиса. – М.: Мир, 1990. – 246 с.
- 6 Молекулярная клиническая диагностика. Методы / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – М.: Мир, 1999. – 728 с.

7 Тикунова Н.В., Орешкова С.Ф., Мишин В.П. и др. Структура области перекрывания генов ICP18.5 и gB герпесвируса крупного рогатого скота 1-го типа, штамм ТК-А // Вопросы вирусологии. – 2001. – № 3 – С. 42-46.

REFERENCES

1 Santurde G. Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus 1 genome in clinical samples / G. Santurde, N. Da Silva, R. Villres et al. // Vet. Microbiol. – 1996. – Vol.49, N 1-2. – P. 81-92.

2 Engelenburg F.A. Excretion of bovine herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation / F.A. van Engelenburg, F.W. Van Schie, F.A. Rijsewijk, J.T. Van Oirschot // J. Clin. Microbiol. – 1995. – Vol. 33, N 2. – P. 308-312.

3 Wiedmann M. Detection of BHV-1 in bovine semen by a nested PCR assay / M. Wiedmann, R. Brandon, P. Wagner et al. // J. Virol. Methods. – 1993. – Vol. 44, N 1. – P. 129-139.

4 Ros C., Belak S. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine, and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification// J. Clin. Microbiol. – 1999. – Vol. 37 (№ 5). – P. 1247 – 1253.

5 Анализ генома. Методы [Genome analysis. Methods] (1990) / Под ред. К. Девиса. – М.: Мир, 246 [in Russian].

6 Молекулярная клиническая диагностика. Методы. [Molecular clinical diagnostics. Methods] (1999). / Под ред. С. Херрингтона, Д. Макги. – М.: Мир, 728 [in Russian].

7 Tikunova N.V., Oreshkova S.F., Mishin V.P. i dr. (2001). Struktura oblasti perekryvaniya genov ICP18.5 i gB herpesvirusa krupnogo rogatogo skota 1-go tipa, shtamm TK-A [Structure of the gene overlap region ICP18.5 i gB bovine herpes virus type 1] // Voprosy virusologii – Virology Issues, 3, 42-46 [in Russian].

А.Г. Глотов, ветеринария ғылымдарының докторы, профессор

Сібір және Қиыр Шығыс эксперименттік ветеринария институты (Новосибирск қ., Ресей)

E-mail: glotov_vet@mail.ru

Т.И. Глотова, биология ғылымдарының докторы, профессор

Сібір және Қиыр Шығыс эксперименттік ветеринария институты (Новосибирск қ., Ресей)

E-mail: t-glотова@mail.ru

Е.Б. Никитин, ветеринария ғылымдарының докторы, профессор

Инновациялық Еуразия университеті (Павлодар қ., Қазақстан Республикасы)

E-mail: yevgeniyunitin1964@gmail.com

Т.И. Урюмцева, ветеринариялық ғылым кандидаты, доцент

Инновациялық Еуразия университеті (Павлодар қ., Қазақстан Республикасы)

E-mail: vbh2@mail.ru

Ірі қара малдың жұқпалы ринотрахеит вирусын полимеразды тізбекті реакция әдісімен анықтау

Мақала ауылиаруашылық жануарларындағы вирустық этиологиялы аурулардың дифференциалды диагностикасының өзекті мәселесіне арналған. Қазіргі уақытта вирустық аурулар кең таралған, ауылиаруашылық жануарларының жұқпалы патологиясында жетекші рөл атқарады және үлкен экономикалық зиян келтіреді. Малға қарсы вакциналардың алдын-алудың үлкен мөлшерін ескере отырып, эпизоотияға қарсы шаралардың тиімділігін арттыру үшін, ірі қара малда жұқпалы ринотрахеит вирусының өріс және вакциналық штамдарын жедел және тиімді анықтау және саралау әдістерін әзірлеу өзекті мәселе болып табылады. Ірі қара малдың жұқпалы ринотрахеит вирусының изоляторынан вакциналық штамды анықтау және саралау үшін полимеразды тізбекті реакцияны қолдану мүмкіндігі қарастырылады. Зерттеу процесінде тест материалында IRT вирусын анықтау үшін ПТР-RFLP талдау әдісі жасалды. ТК-А вакциналық штамдарын эпизоотиялық штаммдардан және IRT вирусының изоляторларынан анықтау және саралау үшін ПТР-RFLP талдау әдісі қолданылды. Патогеннің нақты ДНҚ фрагменттерінің санының көбеюіне әкелетін ДНҚ циклдерінің, күйдіру мен синтездердің қайталануына негізделген ПТР принципі агарозды геледе ПТР нәтижелерін ескеруге мүмкіндік береді. Талдау уақыты – шамамен, 30 сағат. Вирустық ДНҚ-ны анықтауға сезімталдығы 1-10 пикограмма (102 TCD) құрайды. Салыстырмалы қарапайымдылық пен реакция жылдамдығы, жоғары сезімталдық, ерекше және репродуктивтілік сияқты сипаттамалардың арқасында ПТР соңғы уақытта биологиялық ғылымның әртүрлі салаларында, соның ішінде ветеринарлық вирусологияда іргелі және қолданбалы зерттеулерде кең таралды.

Зерттеу барысында алынған нәтижелер ПТР-RFLP қолдану жоғары сенімділік дәрежесімен IRT вирусының өріс және вакциналық штамдары мен изоляттарын ажыратуға мүмкіндік беретіндігін көрсетеді. ПТР-RFLP анализін қолдану ІҚМ ІҚМ-нің молекулалық эпизоотологиясындағы зерттеулердің тиімділігі мен ақпараттылығын арттырады, өйткені бұл әр түрлі вирустық

штамдардың ДНҚ-ны олардың табиғатына қарамастан анықтауға ғана емес, сонымен қатар олардың арасындағы айырмашылықты, соның ішінде ТК-А штамдарын саралауға мүмкіндік береді. эпизоотиялық штамдар мен вирустың изоляттарына қарсы жойылған вакциналарды жасау үшін.

Түйін сөздер: полимеразды тізбекті реакция, жұқпалы ринотрахеит, диагностика, тұз, штамм, маркер.

A.G. Glotov, doctor of Veterinary Sciences, Professor
Institute of Experimental Veterinary Medicine of Siberia and the Far East (Novosibirsk, Russia)
E-mail: glotov_vet@mail.ru

T.I. Glotova, doctor of Biological Sciences, Professor
Institute of Experimental Veterinary Medicine of Siberia and the Far East (Novosibirsk, Russia)
E-mail: t-glotova@mail.ru

E.B. Nikitin, doctor of Veterinary Sciences, Professor
Innovative University of Eurasia (Pavlodar, Kazakhstan Republic)
Email: yevgeniynikitin1964@gmail.com

T.I. Uryumtseva, candidate of Veterinary Science, Associate Professor
Innovative University of Eurasia (Pavlodar, Kazakhstan Republic)
E-mail: vbh2@mail.ru

The detection of the virus of infectious rhinotracheitis in cattle by polymerase chain reaction

The article is devoted to the current problem of differential diagnosis of diseases of viral etiology in farm animals. Viral diseases are currently widespread, occupy a leading role in the infectious pathology of farm animals, causing enormous economic damage. Given the magnitude of animal vaccine prophylaxis, in order to increase the effectiveness of antiepidemiological measures, the urgent issue is the development of methods for the rapid and effective detection and differentiation of field and vaccine strains of the infectious rhinotracheitis virus in cattle. The possibility of using a polymerase chain reaction to identify and differentiate a vaccine strain from epizootic strains and isolators of the cattle infectious rhinotracheitis virus is considered. In the process of research, a PCR-RFLP analysis method was developed to detect the IRT virus in the test material. The PCR-RFLP analysis method was used to identify and differentiate the vaccine strain TK-A from epizootic strains and isolators of the cattle IRT virus. The principle of PCR, based on repeated repetition of DNA cycles, annealing and synthesis, which leads to an increase in the number of specific DNA fragments of the pathogen, allows you to take into account the results of PCR in an agarose gel. Analysis time is about 30 hours. The sensitivity of detecting viral DNA is 1-10 picograms (10² TCD). Due to characteristics such as relative simplicity and reaction rate, high sensitivity, specificity and reproducibility, PCR has recently become widespread in basic and applied research in various fields of biological science, including veterinary virology.

The results obtained during the studies show that the use of PCR-RFLP allows to differentiate field and vaccine strains and isolates of the IRT virus with a high degree of reliability. The use of PCR-RFLP analysis increases the efficiency and informativeness of studies in the molecular epidemiology of cattle RTI, as it allows not only to identify the DNA of different virus strains regardless of their nature, but also to differentiate between them, including differentiating the strain TK-A used for the production of attenuated vaccines against epizootic strains and isolates of the virus.

Keywords: polymerase chain reaction, infectious rhinotracheitis, diagnosis, isolate, strain, marker.