

На правах рукописи

Гериш Ашуак

**ГЕНОТИПИЗАЦИЯ ВИРУСА ПАРАГРИППА-3 КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА, ВЫДЕЛЕННОГО В РЕСПУБЛИКЕ ТАТАРСТАН**

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Казань-2021

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»

Научный руководитель **Галиуллин Альберт Камилович**
доктор ветеринарных наук, профессор

Официальные оппоненты **Мищенко Владимир Александрович**
доктор ветеринарных наук, профессор,
главный научный сотрудник лаборатории
профилактики болезней свиней и рогатого
скота ФГБУ «Федеральный центр охраны
здоровья животных»

Сухинин Александр Александрович
доктор биологических наук, профессор,
заведующий кафедрой микробиологии,
вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО
«Санкт-Петербургский государственный
университет ветеринарной медицины»

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Сибирский
федеральный научный центр
агробиотехнологий Российской академии
наук

Защита диссертации состоится 25 ноября 2021 года в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.034.01 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» по адресу: 420029, г. Казань, Сибирский тракт, 35.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и на сайте <https://kazanveterinary.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2021 года и размещен на сайтах: <http://www.vak.ed.gov.ru> и <https://kazanveterinary.ru>

Ученый секретарь диссертационного
совета, доктор биологических наук,
профессор

Асия Мазетдиновна Ежкова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Болезни респираторных органов крупного рогатого скота имеют многофакторный и многоэтиологический характер, в котором, наряду с вирусами и бактериями, задействованы факторы риска, связанные с окружающей средой. К этиологическим факторам респираторных болезней относятся, такие возбудители, как респираторно-синцитиальный вирус, вирус диареи, вирус парагриппа-3, вирус инфекционного ринотрахеита и др., которые являются одной из основных причин возникновения болезни среди крупного рогатого скота во всем мире, вызывая серьезные экономические потери Глотов А.Г. (2014), Гумеров В.Г. (2019).

Вирус парагриппа крупного рогатого скота тип-3, входящий в эту группу является одним из основных возбудителей респираторных болезней, особенно у молодняка Taylor J. D. (2010).

К респираторным болезням восприимчивы более 80% молодняка крупного рогатого скота до 1 года и 7,2-15,6 % телят переболевают повторно. Причиной широкого распространения болезни на территории Российской Федерации, является массовый завоз племенного скота в 70-е и 80-е годы прошлого столетия из европейских стран Имбаби, Т. А. (2018).

На сегодняшний день на основе филогенетического анализа описаны три генотипа парагриппа-3, обозначенные как *A* (BPIV-3a), *B* (BPIV-3b) и *C* (BPIV-3c) Gershwin L. J. и др. (2015). Однако из литературных источников не ясно какой же тип парагриппа крупного рогатого скота циркулирует в Республике Татарстан, генотип *A* или генотипы *B* и *C*, как изолированные варианты данной линии ПГ-3.

Поэтому актуальным является необходимость проведения молекулярно-генетического анализа вируса ПГ-3, с целью установления его геномной принадлежности

Степень разработанности темы. Изучение вопросов диагностики и профилактики респираторных болезней молодняка крупного рогатого скота в нашем регионе проводили Гаффаров Х.З. и др. (2014), Осянин К.А. и др. (2020), Лартон Р.Р., Алимов А.М. (2020).

В последние годы в диагностике и идентификации возбудителей инфекционных болезней достигнуты большие успехи в плане внедрения в производственную практику новых технологий, как секвенирование методами Сэнгера и «Next – Génération Sequencing». Технологии секвенирования позволили значительно сократить стоимость базового секвенирования и значительно сэкономить время для индикации вируса и диагностики болезни.

В связи с этим, изучение генома респираторных вирусов, как вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота, представляет научный и практический интерес. При анализе литературных данных имеются единичные работы по генотипированию респираторных вирусов крупного рогатого скота. Сухинин А.А. и др. (2017) дали молекулярно-генетическую

характеристику возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота на территории Северо-Западного региона.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы явилось генотипирование эпизоотического штамма вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота, выделенного в Республике Татарстан.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота в отдельно взятых хозяйствах на территории Республики Татарстан.

2. Изучить биологические свойства изолятов вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота, выделенных на территории РТ.

3. Определить пригодность коммерческих праймеров для ПЦР в дифференциации изолятов вируса парагриппа-3.

4. Провести секвенирование частичного матричного гена и филогенетический анализ изолята изучаемого вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота.

Научная новизна работы. Впервые проведено секвенирование фрагмента *M* гена изолята вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота, выделенного на территории РТ. Также показано его отличие от последовательности генома штамма ПТК-45/86, используемого для профилактики парагриппа-3 крупного рогатого скота на территории Российской Федерации. Филогенетический анализ показал, что вирусный изолят ЛД-9 (MW524841) вируса ПГ-3 крупного рогатого скота, выделенный в РТ, относится к генотипу *A*.

В результате проведенных комплексных клинико-эпизоотологических, гистологических, серологических и вирусологических исследований выделен и изучен полевой изолят ЛД-9 вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота от больных респираторными заболеваниями телят. При этом получены новые данные о степени его распространения в неблагополучных хозяйствах региона.

Показана эффективность метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) для индикации вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота, не требующего выделения и культивирования самого вируса.

Расшифрованные последовательности генома изолята ЛД-9 вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота зарегистрированы в GenBank под номером (MW524841).

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведены клинико-эпизоотологические исследования респираторных болезней крупного рогатого скота в отдельно взятых хозяйствах на территории Республики Татарстан. В результате комплексных вирусологических, серологических, гистологических исследований выделен и идентифицирован изолят вируса ПГ-3 крупного рогатого скота и проведено его генотипирование. Геном изолята ЛД-9 вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота зарегистрирован в GenBank под номером (MW524841).

Результаты проведенных исследований вошли во «Временные правила по генотипированию вируса ПГ-3», утвержденные научно-техническим советом ФГБОУ ВО «Казанская ГАВМ», 12 марта 2021г.

Методология и методы исследований. Методологической основой проведенных исследований явилось обоснование возможности применения молекулярно-генетических методов для установления генотипа эпизоотического штамма вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота в Республике Татарстан.

С целью выполнения поставленных задач были использованы клинико-эпизоотологические, физико-химические, гистоморфологические, серологические (РН, РНГА, РТГА), иммунохимические (ИФА), вирусологические и молекулярно-генетические методы (ПЦР, секвенирование).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Клинико-эпизоотологический анализ респираторных болезней крупного рогатого скота в РТ. В животноводческих фермах республики в основном выделяются вирусы парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита, аденовирусной инфекции, респираторно-синцитиальной инфекции и вирусной диареи.

2. Идентификация изолята вируса ПГ-3 крупного рогатого скота на основе изучения физико-химических, биологических свойств и молекулярно-генетического анализа. Выделенный изолят вызывает дегенеративные изменения в монослое культуры клеток в течение 98-124 часов и вступает в специфическую реакцию в титре антител 1:32 и 1:4 в реакции диффузной преципитации (РДП).

3. Генетическая идентификация выделенного изолята ЛД-9 вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота на основе секвенирования фрагментов *M* гена возбудителя. Изолят ЛД-9 и вакцинный штамм ПТК-45/86 вируса парагриппа-3 принадлежат одному и тому же генотипу *A* и находятся в том же кластере, что и эталонный штамм SF-4.

Степень достоверности и апробации результатов. Материалы диссертации доложены, обсуждены и одобрены: на Международной научно-практической конференции «Сельское хозяйство и продовольственная безопасность: технологии, инновации, рынки, кадры», посвящённой 100-летию аграрной науки, образования и просвещения в Среднем Поволжье (г. Казань, 2019); в конкурсе на предоставление грантов в форме субсидий на реализацию научных исследований и разработок в области агропромышленного комплекса в 2020 году «Молекулярно-генетический анализ вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота, циркулирующего в Республике Татарстан» (г. Казань, 2020).

Для статистической обработки полученных результатов использовали Microsoft Excel 2010. Выравнивание геномов проводили методом Muscle в программах MegAlign Pro, Mega 5.0 и Ugene.

Личный вклад соискателя. Планирование, подготовка и проведение экспериментов, статистическая обработка результатов, а также

формулирование выводов, основных положений выносимых на защиту и оформление диссертации проведены лично автором. Доля участия диссертанта в выполнении работ составляет 85%.

Публикации результатов исследований. Научные положения диссертации, и ее основные результаты исследований опубликованы в 6-ти печатных работах, в том числе 3 статьи – в изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации, одна статья – в изданиях, включённых в базу данных Web of Science и изолят ЛД-9 депонированный в GenBank под номером (MW524841).

Структура и объём работы. Диссертационная работа изложена на 125 страницах компьютерного текста, включает: введение, обзор литературы, собственные исследования, заключение, практические предложения, список использованной литературы, приложения. Список литературы включает 158 источников, в т.ч. 76 отечественных и 82 иностранных. Диссертация иллюстрирована 22 рисунками и 8 таблицами.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» с 2018 по 2021гг., отдельные исследования осуществляли в ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» и Междисциплинарном центре протеомных исследований Института фундаментальной медицины и биологии Казанский (Приволжский) федеральный университет.

2.1.1 Материалы исследования

1. SF-4 - референтный штамм вируса ПГ-3, инфекционная активность на перевиваемой линии культуры клеток легкого эмбриона коровы (ЛЭК) – 7,25 lg ТЦД 50/мл, гемагглютинирующий титр 1:32 в РГА с 1% эритроцитами морской свинки, был использован для более глубокого изучения генотипа вируса.

2. ПТК-45/86 - вакцинный штамм вируса ПГ-3, инфекционная активность на перевиваемой линии культуры клеток ЛЭК - 6,75 lg ТЦД 50/мл, гемагглютинирующий титр 1:16 в РГА с 1% эритроцитами морской свинки (ЭМС), был использован для контроля.

3. ЛД-9 - вирусный изолят, выделен из патологического материала больного респираторным заболеванием теленка, инфекционная активность на перевиваемой линии культуры клеток ЛЭК - 6,25 lg ТЦД 50/мл.

Диагностические наборы:

- набор реагентов «ПЦР-парагрипп-3 КРС-ФАКТОР» для выявления РНК вируса ПГ-3 крупного рогатого скота (Bovine parainfluenza virus 3) в биологическом материале методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Россия).

- набор диагностикума парагриппа-3 крупного рогатого скота в реакции торможения гемагглютинации, изготовленный в ФГУ «Курская биофабрика, фирма «БИОК».

- набор для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-L», («AmpliSens», ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

- комплект реагентов «РИБО-преп», предназначенный для выделения тотальной РНК/ДНК из клинического материала для последующего анализа методом обратной транскрипции в полимеразной цепной реакции «AmpliSens» (Россия).

- комплект реагентов для ПЦР: смесь dNTP, H₂O, Taq ДНК полимеразы, праймер (M₁ и M₂); «Sib Enzyme» (Россия).

- комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле «ЭФ»; «AmpliSens» (Россия).

- набор для секвенирования: Big Dye Terminator v3.1 cycle Sequencing kit (Thermo Fisher SCIENTIFIC).

2.1.2 Методы исследования

Отбор проб: у телят и коров с тяжелой клинической формой респираторного характера было отобрано 38 образцов носовой слизи, а у павших животных легочной ткани и лимфатические узлы. Возраст животных в данном исследовании варьировал от 1 месяца до 2 лет.

Гистологический анализ: изготовленные гистологические срезы изучали при помощи светооптического микроскопа Carl Zeiss Jena выбранные участки фотографировали фотокамерой Sony Cyber-shot.

Биологические и физико-химические методы: идентификацию выделенного цитопатогенного агента проводили путем определения типа нуклеиновой кислоты в его геноме. В качестве ингибитора синтеза ДНК использовали 5-бромдезоксисуридин (5-БДУ).

Серологический анализ: в иммуноферментном анализе (ИФА) проведены исследования 272 проб сыворотки крови крупного рогатого скота разных половозрастных групп на выявление антител к респираторным вирусам. Серологическую идентификацию вирусного изолята осуществляли в реакциях нейтрализации (РН) с постоянной дозой вируса (100 ТЦД 50/см³) и диффузионной преципитации (РДП) по общепринятым методам. В РТГА в парных пробах сыворотки крови выявляли нарастающий титр антител к вирусу ПГ-3.

Вирусологические методы: с целью выделения предполагаемых возбудителей респираторной патологии молодняка КРС, от больных и вынужденно убитых животных, вирусосодержащим материалом заражали культуру клеток почки эмбриона коровы (ПЭК).

Молекулярно-генетический анализ: определяли эффективность полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) со специфическими праймерами для детекции вируса ПГ-3.

Секвенирование: образцы ПЦР с наиболее четкими вирусоспецифическими полосами подвергались секвенированию. Секвенирование проводили методом Сэнгера.

Филогенетический анализ: частичная геномная последовательность полевого изолята, а также вакцинного ПТК45/86и референтного штамма были выровнены с последовательностями репрезентативных штаммов парагриппа-3, полученных из GenBank с использованием neighbourjoiningметода в системе ClustalW программы Meg Align Pro (DNASTAR).



Рисунок 1- Схема основных этапов исследования

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1 Анализ производственной деятельности опытного хозяйства

В неблагополучных хозяйствах (Альметьевского, Чистопольского, Лаишевского районов Республики Татарстан), где были зарегистрированы вспышки респираторных заболеваний телят, провели исследования половозрастного состава животных, их размещение и характер ведения животноводства. При этом учитывали данные о ранее зарегистрированных заболеваниях в данном хозяйстве.

Вирус ПГ-3 крупного рогатого скота изолировали в хозяйстве Лаишевского района РТ.

2.2.2 Клинико-эпизоотологические и патологоанатомические исследования респираторных болезней в опытном хозяйстве

На основании общих клинических исследований у телят наблюдали лихорадку, которая достигала пика от 40,9⁰ до 41,4⁰С, в течение 4-5 дней и продолжался до 7-10 дней.

В основе клинического проявления болезни отмечали присутствие ринита, проявляющегося слизисто-гнойным экссудатом в полости носа.

При вскрытии павших животных наблюдали макроскопическое повреждение легких в виде их сращения и ателектаза. Легкие воздухонаполнены с красно-пурпурными твердыми участками, которые выделяют слизисто-фиолетовый экссудат из дыхательных путей. На поверхности разреза легких наблюдали грудной отек. Лимфатические узлы в грудной клетке увеличены и отечны.

2.2.3 Гистологический анализ легких и легочных лимфоузлов у телят респираторной формой болезни

Установлены патоморфологические изменения в легких телят в виде хронической межучной бронхопневмонии, сопровождаемой компенсаторной хронической альвеолярной эмфиземой, образованием из эпителия альвеол многоядерных симпластов и многоклеточных синцитиев, а также смешанных цитопатических форм респираторного эпителия - симпластов-синцитий, что явилось характерным цитологическим признаком проявления хронической парагриппозной инфекции.

Хронический воспалительный процесс в легких при парагриппе осложнялся фибринозным плевритом, а также пери- и эндокардитами, миокардиодистрофией с нарушением структуры кардиомиоцитов и атипичных клеток сердца.

В легочных лимфатических узлах больных парагриппом телят отмечали умеренно выраженную гиперплазию клеток лимфоидной ткани с наличием вторичных лимфатических узелков, отдельные из которых имели выраженную структуру темной клеточной периферии и широкую насыщенную клетками герминативную зону.

2.2.4 Серодиагностика проб сыворотки крови крупного рогатого скота

Методом иммуноферментного анализа (ИФА) проведены исследования 272 проб сыворотки крови крупного рогатого скота. Результаты исследований представлены на рисунке 2.

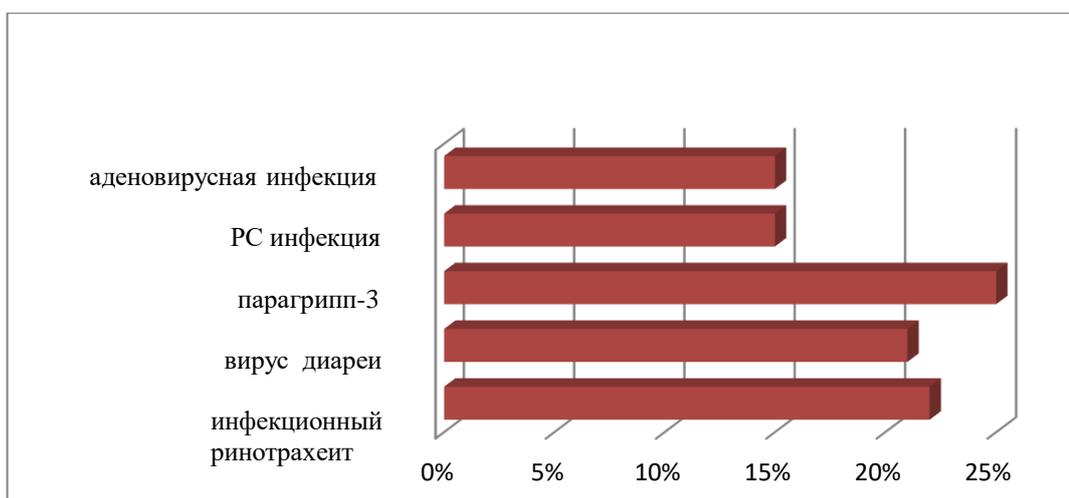


Рисунок 2 - Иммуноферментный анализ проб сыворотки крови телят

На рисунке 2 показан процент положительных результатов по вирусным респираторным заболеваниям крупного рогатого скота. При этом обнаружены антитела к следующим возбудителям: парагрипп-3 - в 68 из 71 (25%), ИРТ в 61 из 77 (22%), респираторно-синцитиальной инфекции 15%, аденовирусной инфекции в 59 из 73 (15%) и вирусной диареи 20%.

Далее определили титра антител сыворотки крови у телят 1, 2, 3-х месячного возраста против ПГ-3 в РТГА. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Титры антител сыворотки крови телят к вирусу ПГ-3

№ п/п	№ животных	Возраст телят	Титры гемагглютинирующих антител в РТГА	
			больные	переболевшие
1	347	1 месяц	1:20	1:80
2	335		1:10	1:160
3	356		1:20	1:80
4	361		1:20	1:80
5	241	2 месяца	1:5	1:80
6	229		1:5	1:80
7	244		0	1:40
8	235	3 месяца	1:10	1:160
9	118		0	1:40
10	126		1:5	1:80
11	115		1:5	1:80
12	110		0	1:80

Исследования сыворотки крови телят 1- 3-х месячного возраста, больных и переболевших респираторными заболеваниями, показали широкий диапазон титра колостральных антител против парагриппа-3. Телята в возрасте 1 месяца в начальной стадии имели титр антител 1:20 против парагриппа-3, что указывало о пассивном иммунитете. В этот период важно наличие колострального иммунитета, так как отсутствие

последнего способно привести к серьезным инфекциям, приводящим к гибели животного.

2-3 месячные телята имели титр антител в интервале от 0 до 1:5, что свидетельствовало о постепенном снижении титра антител к вирусу парагриппа-3.

После выздоровления у телят 3-х месячного возраста наблюдали увеличение титра антител 1:40 и 1:80, это объясняется развитием иммунной системы телят (приобретенный иммунитет).

2.2.4 Вирусологический анализ патологического материала

Выделения этиологического агента в суспензиях патологического материала, взятых от больных и вынужденно убитых телят, проводили заражением культуры клеток ПЭК. Следует отметить, что уже на втором пассаже был изолирован цитопатогенный агент (ЛД-9), который вызывал дегенеративные изменения в монослое в течение 98-124 часа.

Идентификацию вирусного изолята проводили в реакции нейтрализации на культуре клеток и диффузионной преципитации на агаре Дифко. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Идентификация вирусного изолята серологическими методами

Эталонные сыворотки к вирусу:	Штамм	Титры антител (\log_2)	
		Реакция нейтрализации	Реакция диффузионной преципитации
инфекционного ринотрахеита	«ТК-А (ВИЭВ)-В2»	0	0
парагриппа-3	ЛД-9	5,0	2,0
респираторно-синцитиальный	«Rondal»	0	0
вирусной – диареи	«ВК-1»	0	0
аденовирус-1	«Bovina -10»	0	0

Анализ результатов исследований показал, что изолят ЛД-9 реагирует со специфической сывороткой к вирусу ПГ-3 в титре 1:32 в РН и в титре 1:4 в РДП. С другими вирусными агентами специфической реакции не происходила.

2.2.5 Биологические и физико-химические свойства вирусного изолята

Инфекционную активность вирусного изолята ЛД-9 определяли путем обработки 5-бромдезоксисуридином, который способен ингибировать синтез ДНК. Достоверность ожидаемых результатов контролировали с использованием вакцинного ПТК-45/86 и референтного SF-4 штаммов вируса ПГ-3. Результаты исследований вирусного изолята представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Биологические и физико-химические свойства штаммов вируса парагриппа-3 КРС (п=4)

№ п/п	Виды исследований	Единица измерений	Вакцинный штамм ПТК-45/86 вируса ПГ-3	Референтный штамм SF-4 вируса ПГ-3	Вирусный изолят ЛД-9
1	Инфекционная активность на культуре клеток	Ig ТЦД 50/мл	6,75	7,25	6,25
2	Чувствительность к 5-БДУ	Ig ТЦД 50/мл	6,5	7,0	6,0
3	Резистентность к эфиру	Ig ТЦД 50/мл	0	0	0
4	Резистентность к хлороформу	Ig ТЦД 50/мл	0	0	0
5	Инактивация при Т +56 ⁰	минута	25	30	25
6	Чувствительность: к рН 8,0 к рН 5,0 к рН 3,0	Ig ТЦД 50/мл	6,5 5,0 1,0	7,0 5,5 1,5	6,0 4,5 0,5
7	Способность агглютинировать эритроциты: кр. рог.скота барана кролика морской свинки.	Титр в РГА	1:8 1:2 1:2 1:16	1:16 1:4 1:4 1:32	1:8 1:2 1:2 1:8
8	Способность адсорбировать эритроциты: кр. рог.скота барана кролика морской свинки	Визуальная оценка (+)	+++ ++ + ++++	+++ ++ ++ ++++	+++ + + ++++

В опыте по определению типа нуклеиновой кислоты у изолята ЛД-9 установлено, что после обработки препаратом 5-БДУ всех 3-х испытуемых штаммов выявлено лишь незначительное (на 0,25 Ig) снижение инфекционной активности. Данное обстоятельство свидетельствовало о том, что все они являются РНК-содержащими вирусами.

При постановке реакции гемагглютинации вирусный изолят ЛД-9, также как референтный и вакцинный штаммы ПГ-3, агглютинировал эритроциты морской свинки и КРС в титре 1:8, а также 1:2 эритроциты барана и кролика.

2.2.6 Молекулярно-генетическая детекция изолята вируса ПГ-3

Учет результатов ПЦР-РВ проводили по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией. На рисунках 3, 4, 5 представлены полученные нами графики амплификации.

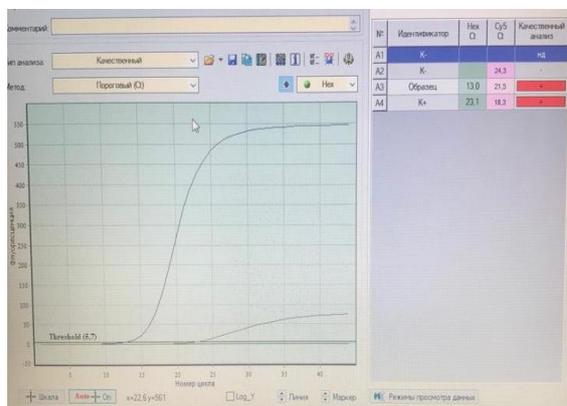


Рисунок 3 – График амплификации по флуорофору HEX изолята ЛД-9 вируса ПГ-3 КРС

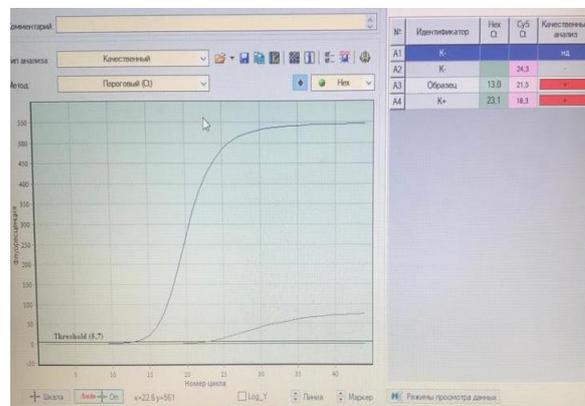


Рисунок 4 – График амплификации по флуорофору HEX вакцинного штамма ПТК-45/86 вируса ПГ-3

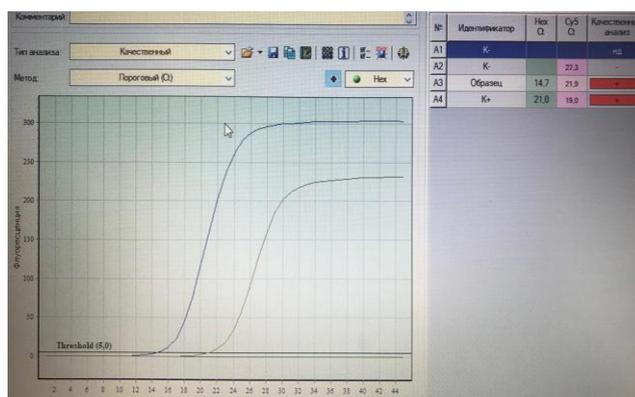


Рисунок 5 – График амплификации по флуорофору HEX референтного штамм SF-4 вируса ПГ-3 КРС

На рисунках показаны графики накопления флуоресценции при постановке ПЦР-РВ со штаммами вируса ПГ-3. Сигналы флуоресценции исследуемых образцов во всех трёх случаях появлялись значительно раньше, чем в положительных контролях, что указывало на изначально более высокую концентрацию вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота в пробах. В соответствии с вышеизложенным, испытуемый изолят и контролируемые штаммы, показали присутствие вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота в пробах.

Расшифровка графиков с указанием номеров циклов, начала сигнала флуоресценции представлена в таблице 4.

Таблица 4 - Анализ по номеру цикла по видам штамма

№ п/п	Штамм	Идентификатор	СТ	Качественный анализ
1	Вирусный изолят ЛД-9	К-	-	-
		Образец	13,0	+
		К ⁺	23,1	+
2	Вакцинный штамм ПТК-45/86	К-	-	-
		Образец	12,1	+
		К ⁺	20,4	+
3	Референтный штамм SF-4	К-	-	-
		Образец	14,7	+
		К ⁺	21,0	+

Примечание: К⁻ - отрицательный контроль; К⁺ -положительный контроль; СТ - номер цикла.

Результаты исследований показали, что значения СТ контрольных образцов находятся в пределах нормы (СТ<31), значит наблюдается экспоненциальный рост сигнала по НЕХ, образец считается положительным, РНК вирус парагриппа-3 крупного рогатого скота присутствует.

Таким образом, следует заключить, что полимеразная цепная реакция в реальном времени, основанная на обнаружении генетического материала возбудителя, является надежным, точным и быстрым методом диагностики парагриппа-3 и при этом не требует выделения и культивирования самого вируса.

В дальнейшем все образцы (ЛД-9, ПТК-45/86 и SF-4) подверглись полимеразной цепной реакции с электрической детекцией. В качестве мишени амплификации использовали участок *M* гена вируса ПГ-3 крупного рогатого скота размером 328 п.н. В результате из всех трех образцов были получены специфичные продукты амплификации.

Специфический фрагмент для матричного гена (*matrixgene*) размер 328 bp визуализирован с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле (рис.6 и 7).

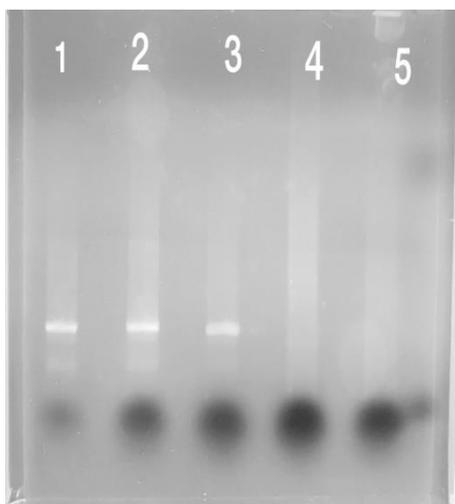


Рисунок 6 - Электрофорез амплификации ПЦР.

1,2,3 – положительный результат амплификации соответствующего участка М гена штаммов SF-4, ПТК-45/86 и ЛД-9 вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота.

4,5 - отрицательный результат амплификации соответствующе участка М гена

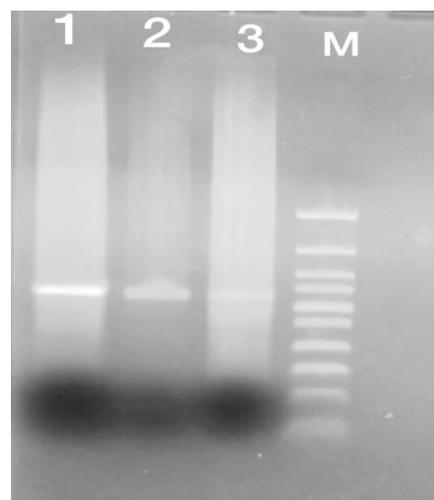


Рисунок 7 - Электрофорез амплификации ПЦР.

М - маркер молекулярных масс.

1.2.3 - положительный результат амплификации соответствующего участка М гена штаммов SF-4, ПТК-45/86 и ЛД-9 вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота

2.2.7 Секвенирование и филогенетический анализ изолята ЛД-9

Секвенирование генома состоит в определении нуклеотидной последовательности ДНК, присутствующей в каждой клетке данного организма. В исследованиях использовали метод Сэнгера (Sanger), основанный на применении дидеоксинуклеотидов (dideoxynucleotides) для секвенирования ДНК ферментативным синтезом по технологии BigDye Terminator (BDT) с использованием резонансной системы передачи энергии между двумя флуорохромами, зафиксированными на одном и том же ddNTP и соединенными между собой связующим звеном. Результаты секвенирования были проанализированы с помощью системы UGENE.

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности фрагмента М гена изолята ЛД-9 и вакцинного штамма ПТК-45/86 представлены на рисунке 8 и 9. Выравнивание нуклеотидных последовательностей участка М гена изолята ЛД-9 и вакцинного штамма ПТК-45/86 с другими последовательностями, представителями в базе данных GenBank, показало 100% идентичность данных участков вакцинного и референтного штамма SF-4.

Изолят ЛД-9 имеет некоторые отличия от референтного штамма в последовательности исследуемого фрагмента М гена (98% идентичности).

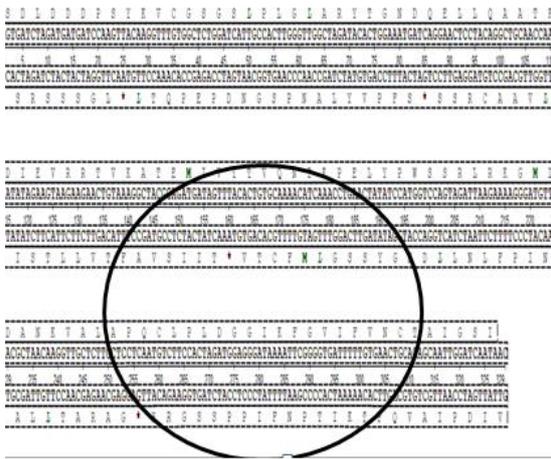


Рисунок 8 - аминокислотные последовательности *M* генома парагриппа-3 крупного рогатого скота, вирусного изолята ЛД-9.

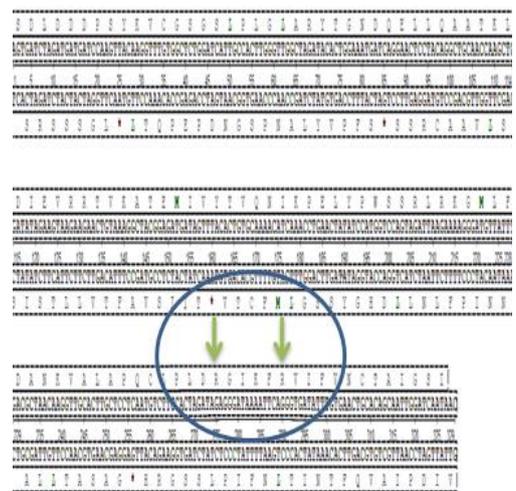


Рисунок 9 - аминокислотные последовательности *M* генома парагриппа-3 крупного рогатого скота, вакцинного штамма ПТК-45/85.

Meg Align PRO используется для выравнивания нуклеотидных последовательностей и построения филогенетического дерева, 17 референтных штаммов, полученных из GenBank, были выровнены с изолятом ЛД-9. Геном изолята ЛД-9 зарезервирован в GenBank под номером MW524841, что показано на рисунке 10.

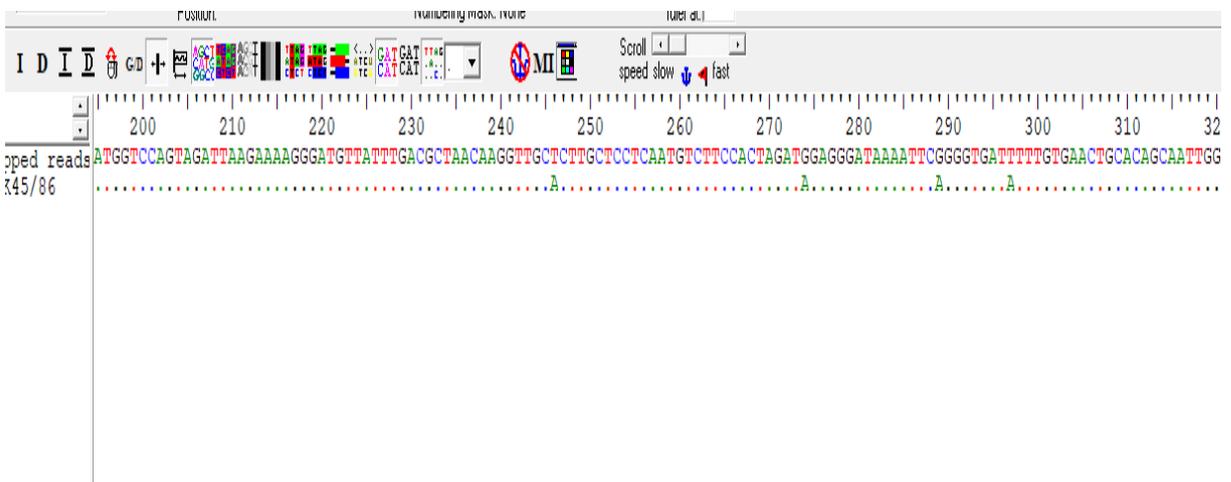


Рисунок 10 - Нуклеотидные последовательности *M* генома вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота, вирусного изолята ЛД-9 (MW524841) и вакцинного штамма ПТК-45/86.

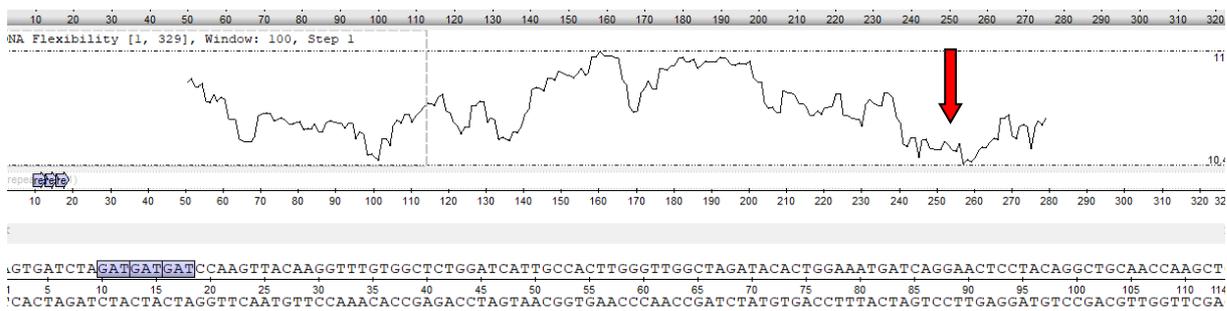


Рисунок 11 - Хроматография ДНК М гена, вирусного изолята ЛД-9(MW24841).

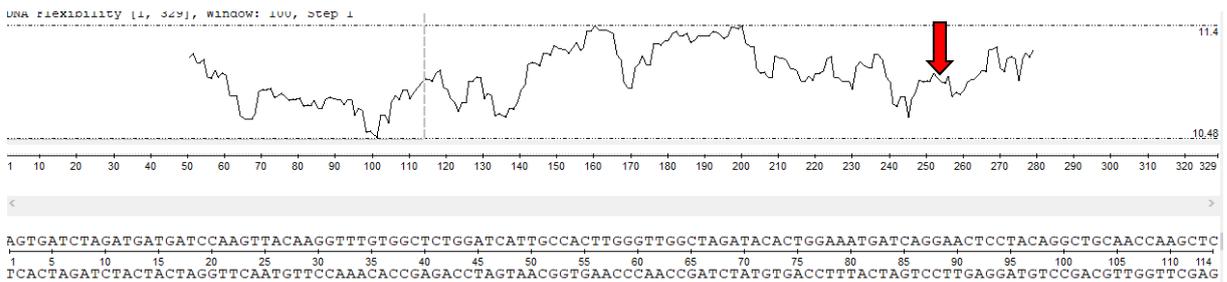


Рисунок 12 - Хроматография ДНК М гена, вакцинного штамма ПТК-45/86.

На рисунке 11 и 12 стрелкой показано место мутации изолята ЛД-9 по отношению к вакцинному штамму ПТК-45/86 крупного рогатого скота и к эталонному штамму SF-4.

В таблице 5 представлен сравнительный анализ последовательностей участка М гена представителей вируса ПГ-3 депонированных в GenBank, с исследуемыми штаммами (изолят ЛД-9 и вакцинный штамм ПТК- 45/86) по результатам выравнивания.

Нуклеотидные последовательности в области кодирования М гена парагриппа-3 крупного рогатого скота штамма ЛД-9 (таблица 5) имели 98,25% идентичности с SF (AF178655) и ПТК-45/86, 97,37% - с американским штаммом Kansas (AF178654) и LE017-1(MG976794) из Уругвая.

Идентичность М гена составила 90,79 – 91,67% между нашим изолятом и ВРIV-3-А1 субгенотип, включая VN-1, 910N и JCU, когда китайский штамм NM09 (JQ063064) обладал 92,98% симметрией, 85,09-85,53% - генотипом В(EF108222, KJ647284) и 84,4-86,84% для генотипа С, включая референтный штамм SD0835 (HQ530153) из Китая, NX9 (KT07671), американский штамм TVMDL (KJ647287), штамм из Южной Кореи 12Q61 (JX969001) и японский штамм HS9 (LC000638).

Изолят ЛД-9 вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота составил 89,71% и аналогичен со штаммом ISU (EU439428), 98,25% для Texas-81 штамма (EU439429), где они сгруппированы с нашим изолятом и вакцинным штаммом в одном подгенотипе.

Филогенетический анализ проводили с использованием программного обеспечения Meg Align PRO, основываясь на фрагментах нуклеотидных

последовательностей *M* гена по сравнению с другими рефератными штаммами, полученными из GenBank.

В результате было установлено, что оба русских штамма (ЛД-9 и ПТК-45/86) относятся к генотипу *A*, как и референтный штамм SF-4.

Генотип *A* вируса ПГ-3 может быть далее разделен на субгенотипы в зависимости от степени дивергенции, которая указана на филогенетическом дереве (рис.13): субгенотип *A1* представлен штаммами ISU-92 (EU439428), VN-1 (AB770484), JCU(EF108221) и 910N(D84095), субгенотип *A2* включил в себя русский изолят ЛД-9 и вакцинный штамм ПТК-45/86, LEO17(MG976794), Texas-81 (EU439429), Kansas (AF178654) и SF-4 (AF178655), в то время как китайский штамм NM09 (JQ063064) формирует третий субгенотип-*A3*. Софи, N. М. (2017) указывает, что египетский штамм (KP757872) также относится к этой группе.

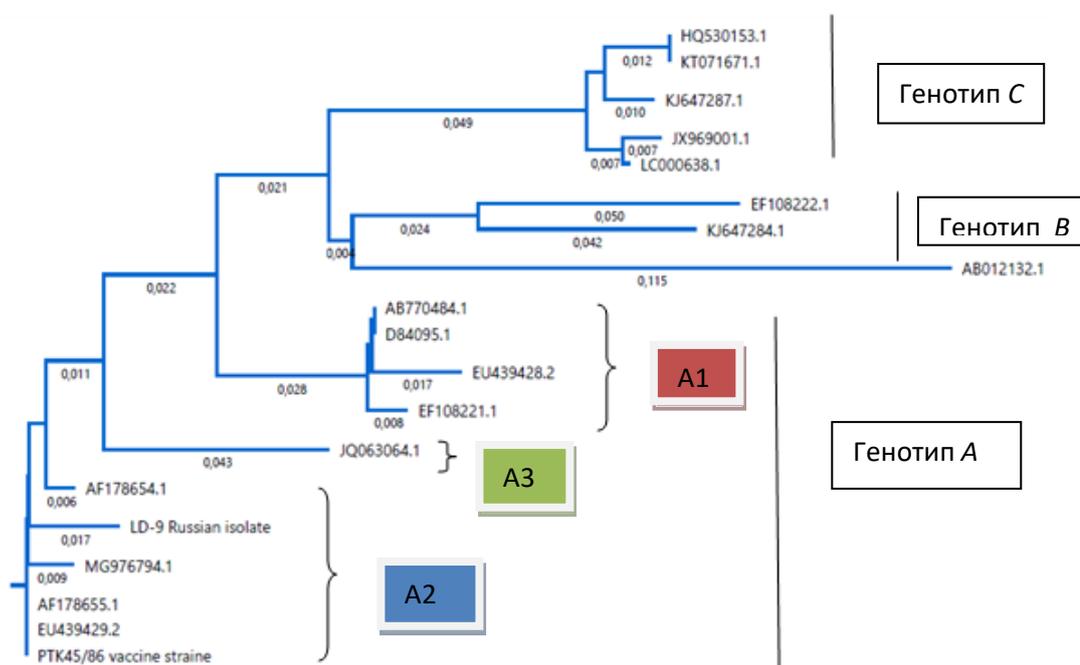


Рис 13- Филогенетический анализ на основе фрагмента *M* гена.

Таблица 5 - Сравнительный анализ идентичности в нуклеотидных последовательностях области 328-бр М гена изолята ЛД-9 и некоторых штаммов парагриппа-3 крупного рогатого скота

1. АВ012132* :вирус парагриппа человека (humain parainfluenza virus)

	штамм	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
A	ЛД-9		98,3	86,4	85,53	92,98	90,79	81,14	86,4	85,96	86,84	91,67	89,91	91,67	97,37	85,09	98,25	97,37	85,96	98,25
B	AF178655.1	0,02		87,72	87,28	94,3	92,54	81,58	87,72	87,28	88,16	93,42	91,67	93,42	99,12	86,84	100	99,12	87,28	100
C	HQ530153.1	0,14	0,12		88,6	85,09	88,16	81,14	100	97,81	96,93	88,16	86,4	88,16	86,84	86,4	87,72	86,84	96,93	87,72
D	EF108222.1	0,14	0,13	0,11		85,53	84,65	81,58	88,6	87,28	86,4	84,65	83,77	84,65	86,4	90,79	87,28	87,28	86,4	87,28
E	JQ063064.1	0,07	0,06	0,15	0,14		89,91	81,14	85,09	85,09	85,09	89,91	88,16	89,91	93,42	85,96	94,3	93,42	84,21	94,3
F	EF108221.1	0,09	0,07	0,12	0,15	0,1		82,46	88,16	89,47	89,47	99,12	97,37	99,12	93,42	88,16	92,54	91,67	88,6	92,54
G	AB012132*.1	0,19	0,18	0,19	0,18	0,19	0,18		81,14	82,02	82,89	83,33	82,46	83,33	81,58	81,58	81,58	80,7	83,33	81,58
H	KT071671.1	0,14	0,12	0	0,11	0,15	0,12	0,19		97,81	96,93	88,16	86,4	88,16	86,84	86,4	87,72	86,84	96,93	87,72
I	KJ647287.1	0,14	0,13	0,02	0,13	0,15	0,11	0,18	0,02		98,25	89,47	87,72	89,47	87,28	85,96	87,28	86,4	98,25	87,28
J	LC000638.1	0,13	0,12	0,03	0,14	0,15	0,11	0,17	0,03	0,02		90,35	88,6	90,35	88,16	85,53	88,16	87,28	99,12	88,16
K	AB770484.1	0,08	0,07	0,12	0,15	0,1	0,01	0,17	0,12	0,11	0,1		98,25	100	94,3	88,16	93,42	92,54	89,47	93,42
L	EU439428.2	0,1	0,08	0,14	0,16	0,12	0,03	0,18	0,14	0,12	0,11	0,02		98,25	92,54	87,28	91,67	90,79	87,72	91,67
M	D84095.1	0,08	0,07	0,12	0,15	0,1	0,01	0,17	0,12	0,11	0,1	0	0,02		94,3	88,16	93,42	92,54	89,47	93,42
N	AF178654.1	0,03	0,01	0,13	0,14	0,07	0,07	0,18	0,13	0,13	0,12	0,06	0,07	0,06		87,28	99,12	98,25	87,28	99,12
O	KJ647284.1	0,15	0,13	0,14	0,09	0,14	0,12	0,18	0,14	0,14	0,14	0,12	0,13	0,12	0,13		86,84	85,96	85,09	86,84
P	EU439429.2	0,02	0	0,12	0,13	0,06	0,07	0,18	0,12	0,13	0,12	0,07	0,08	0,07	0,01	0,13		99,12	87,28	100
Q	MG976794.1	0,03	0,01	0,13	0,13	0,07	0,08	0,19	0,13	0,14	0,13	0,07	0,09	0,07	0,02	0,14	0,01		86,4	99,12
R	JX969001.1	0,14	0,13	0,03	0,14	0,16	0,11	0,17	0,03	0,02	0,01	0,11	0,12	0,11	0,13	0,15	0,13	0,14		87,28
S	PTK45/86	0,02	0	0,12	0,13	0,06	0,07	0,18	0,12	0,13	0,12	0,07	0,08	0,07	0,01	0,13	0	0,01	0,13	

2. EU439428**, EU439429** : вирус парагриппа свиней (swine parainfluenza virus).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные позволяют сформулировать следующие выводы:

1. В животноводческих фермах Республики Татарстан циркулируют вирусы респираторных болезней парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита, аденовирусной инфекции, респираторно-синцитиальной инфекции и вирусной диареи. При этом доля вируса ПГ-3 в общей этиологии респираторных болезней крупного рогатого скота составляет 25%.

2. Изолят ЛД-9 вируса парагриппа-3 способен вызывать дегенеративные изменения в монослое культур клеток в течение 98-124 часов, а также вступать в специфическую реакцию в титре антител 1:32 в РН и 1:4 в РДП.

3. Полимеразная цепная реакция является оптимальным методом экспресс индикации и идентификации вируса ПГ-3, не требующим выделения и культивирования самого вируса.

4. Нуклеотидная последовательность участка М гена вирусного изолята ЛД-9, показала высокую степень гомологичности с последовательностями американского и уругвайского штаммов.

5. Изолят ЛД-9 (MW524841) и вакцинный штамм ПТК-45/86 вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота принадлежат к одному и тому же генотипу А, и находятся в том же кластере, что и эталонный штамм SF-4.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Результаты экспериментальных исследований вошли во временные правила по генотипированию вируса ПГ-3, утвержденные научно-техническим советом ФГБОУ ВО «Казанская ГАВМ».

2. Нуклеотидные последовательности участка М гена изолята ЛД-9 вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота зарегистрирован в GenBank под номером MW524841.

3. Внедрить методы генотипирования в ветеринарную практику для идентификации выделенных изолятов вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота.

4. Научные положения, выводы диссертационной работы предлагаются к использованию в учебном процессе высших учебных заведений биологического и ветеринарного профиля, а также при написании учебников и учебных пособий.

Список статей, опубликованных по теме диссертации

1. Гериш, Ашуак Участие вируса парагриппа-3 в респираторных болезнях молодняка крупного рогатого скота / Ашуак Гериш, А.К. Галиуллин, В.Г. Гумеров, И.Г. Каримуллина, А.Ю. Шаева // Научные труды международной научно-практической конференции «Сельское хозяйство и продовольственная безопасность: технологии, инновации, рынки, кадры», посвященной 100-летию аграрной науки, образования и просвещения в Среднем Поволжье, 13-14 ноября 2019 г. Казань, - С.447-454.

2. Gueriche, Achouak The etiological role of parainfluenza-3 virus in the respiratory pathology of young cattle / Achouak Gueriche, A. K. Galiullin, V. G. Gumerov et al // International Scientific-Practical Conference “Agriculture and Food Security: Technology, Innovation, Markets, Human Resources” (Kazan, Russia, November 13-14, 2019) // BIO Web of Conferences». 2020. Vol. 17. FIES 2019. режим доступа: https://www.bioconferences.org/articles/bioconf/full_html/2020/01/bioconf_fies2020_00080/bioconf_fies2020_00080.html.
3. Гериш, Ашуак Изучение биологических и физико-химических свойств изолята вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота / Ашуак Гериш, В.Г. Гумеров, А.К. Галиуллин и др. // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2020. Т.241(І). С. 66-70.
4. Гериш, Ашуак ПЦР-РВ с флуоресцентной детекцией вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота / Ашуак Гериш, В.Г. Гумеров, А.К. Галиуллин и др. // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2020. Т.241(І). С 70-76.
5. Галиуллин, А.К. Гистологический анализ легких и легочных лимфоузлов у телят респираторной формой болезни / А.К. Галиуллин, И.Н. Залялов, В.Г. Гумеров, Ашуак Гериш и др. // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2021. Т.246 (ІІ). С. 28-38.
6. Публикации в глобальной электронной базе данных GenBank NCBI: - National center for biotechnology information (электронный ресурс): NCBI GenBank (A/N: MW524851-Bovine respirovirus 3 isolate LD-9 matrix protein (M) gene, partial cds / A. Guerich, A.K. Galiullin, V.G. Gumerov and A.Y. Shaeva – электронные данные - GenBank (NCBI), Bethesda MD, USA, 2021.-режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MW524841>.