

в различных элементах сетки-нейтрофилах, эозинофилах, лимфоцитах, моноцитах, макрофагах, эпителиальных клетках.

Динамика, которую мы наблюдаем в типах лейкоцитов, полностью биологически жизнеспособна, так как желудочно-кишечный фактор иммунитета более распространен, чем гуморальный фактор. Следовательно, в первые часы и дни выживания телят доля нейтрофилов выше, чем у других лейкоцитов. Эта ситуация сохраняется до тех пор, пока сам организм не начнет активно растворяться.

Таким образом, нейтрофильная лейкоцитарная нейтрофильная группа (71,1% всех лейкоцитов) и количество лимфоцитов ( $58,9 \pm 2,71$ ) увеличились в первые дни новорожденных телят.

#### **RESUME**

Factors of natural resistance are also transmitted to the reproductive organs of the colon. The key role here is the lizard. According to some data, breast milk is not only the main nutrient necessary for the development of children, but also a reliable source of immunodeficiency factors. The role of the mammary gland secretary in mammals plays a special role in the formation of immunity in newborns. In the crust, there are three classes of immunoglobulins and lysozyme, and their concentration decreases with each milking time and with each milking. The secretion of bovine breast was found in various elements of the grid - neutrophils, eosinophils, lymphocytes, monocytes, macrophages, epithelial cells.

The dynamics that we observe in leukocyte types are completely biologically viable, since the gastrointestinal immunity factor is more common than the humoral factor. Consequently, in the first hours and days of survival of calves, the proportion of neutrophils is higher than that of other leukocytes. This situation persists until the body itself begins to actively dissolve.

Thus, the neutrophilic leukocyte neutrophilic group (71.1% of all leukocytes) and the number of lymphocytes ( $58.9 \pm 2.71$ ) increased in the first days of newborn calves.

УДК 619:616.98:578.835.2:616-036.22(574)

**Садуакасова М.А.**, заведующая лабораторией вирусологии, Ph.D докторант

**Карабасова А.С.**, старший лаборант, Ph.D докторант

**Маукиш А.**, старший лаборант, магистрант

**Сермагамбетова С.У.**, старший лаборант, магистр

ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт», г.Алматы, Республика Казахстан

#### **РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ГЕН - СПЕЦИФИЧНЫХ РЕАЛ - ТАЙМ ОТ – ПЦР ТЕСТ - СИСТЕМ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСА ЯЩУРА**

##### **Аннотация**

В статье приведены данные о разработке молекулярно-генетических тест-систем (реал-тайм ОТ-ПЦР) для индикации и идентификации генетической линий G-VII, A/ASIA/Sea-97, O/ME-SA/Ind-2001, O/ME-SA/PanAsia и PanAsia-2, O/SEA/Mya-98 и O/CATHAY вируса ящура.

Диагностическую специфичность и чувствительность разработанных ОТ-ПЦР тест-систем, для обнаружения и характеристики генетических линии G-VII, Sea-97, Ind-2001, PanAsia и PanAsia-2, /Mya-98, CATHAY вируса ящура, оценивали с помощью панели из 48 образцов РНК с использованием пан-серотипного ОТ-ПЦР анализа в качестве эталонного теста.

На примере A/ASIA/G-VII тест-системы было показано, что специфичный для этой линии ОТ-ПЦР анализ, является чувствительным и правильно идентифицирует все вирусы принадлежащие к генетической линии A/ASIA /G-VII с значениями Ct ниже, чем у пан-серотипного теста, который основан на обнаружении 3D участка кодирования вируса ящура. Кроме того, генетический материал из других линий вируса ящура, изученные в этом исследовании, не были амплифицированы, что указывает на диагностическую специфичность анализа. А также, G-VII-ген-специфичная rOT-ПЦР тест-система, способна обнаруживать геном вируса ящура при более высоких разведениях, чем 3D пан-серотипный анализ, что

указывает на высокую аналитическую чувствительность. Поэтому применение A/ASIA/G-VII-ген-специфичного анализа обеспечивает надежный метод быстрой характеристики линии A/ASIA/G-VII. Тем не менее, рекомендуется, чтобы все ген-специфичные анализы использовались в сочетании с пан-серотипным диагностическим тестом. G-VII-ген-специфичный ОТ-ПЦР анализ нацелен на наиболее изменчивую область генома, что позволяет со временем изменить область мишени, изменяя специфичность и чувствительность тест-системы. Таким образом, важно отслеживать эффективность анализа, специфичного для линии, с течением времени. Состав и термальный профиль G-VII-специфичного и 3D пан-серотипного анализов были разработаны с одинаковыми характеристиками, так что оба они могут выполняться в одно и то же время и параллельно с использованием одного и того же циклирующего инструмента.

Применение ген-специфических анализов обеспечивает относительно доступный метод определения характеристик линии вируса ящура для лабораторий, где оборудование по секвенированию ограничено либо вообще недоступно для той или иной страны. Разработка A/ASIA/G-VII-специфичного анализа расширяет портфолио (набор молекулярных инструментов) ген-специфичных ОТ-ПЦР анализов, что позволяет национальным лабораториям в эндемических условиях быстро и точно характеризовать генетические линии вируса ящура.

***Ключевые слова:** ящур, вирус, индикация, идентификация, ОТ-ПЦР, геномная линия, специфичность, чувствительность.*

**Введение.** Высокая контагиозность ящура, тенденция к глобальному распространению, широкий спектр восприимчивых животных, множество иммунологических серотипов и топотипов возбудителя, разнообразие путей его выделения и распространения, способность длительное время сохраняться во внешней среде, отсутствие в ветеринарной лабораторной практике высокоэффективного экспресс-диагностикума для обнаружения и характеристики вируса ящура, генетически специфичная ПЦР тест-система дает возможность подбирать вакцины с соответствующими иммунизирующими антигенными компонентами.

Оценка современного состояния по ящуру показывает, что последние официально зарегистрированные вспышки ящура в Республике Казахстан отмечались в 2013 году на территории Восточно-Казахстанской области. История болезни показывает, что ящур до этого времени появлялся и в Алматинской (2010, 2012 г.), Жамбылской (2012 г.) и Кызылординской (2011 г.) областях. Были отмечены вспышки болезни в Западно-Казахстанской области (2009). Во всех этих случаях неблагополучия установлено, что этиологией вспышек являлся возбудитель, который проник из территории сопредельных стран, таких как: Китайская Народная Республика, Кыргызская Республика, Узбекская Республика. Проникновению возбудителя болезни способствовали совместные или близкие пастбища восприимчивых животных с животными сопредельных стран, эндемично неблагополучных по ящуру, не легальное перемещение животных через границу, отсутствие или слабость заградительных мер по недопущению проникновения болезни, отсутствие качественной вакцины и др [1-6].

Общее число стран-членов МЭБ – 178 стран мира. Из них около 66 стран являются свободными от ящура без вакцинации; 2 страны свободны от ящура с вакцинацией; 12 стран имеют свободные зоны от ящура с вакцинацией и 8 стран имеют свободные зоны от ящура без вакцинации [7].

Но, более 100 стран все еще эндемичны по ящуру или поражаются спорадически (в том числе приграничные области Республики Казахстан).

Высокая контагиозность ящура и способность длительное время сохраняться как во внешней среде, так и в организме животных, - обуславливает ряд сложных проблем ветеринарно-санитарного и экономического характера. Вынужденные карантинные меры по ликвидации ящура нарушают нормальную хозяйственно-экономическую деятельность сельскохозяйственных и перерабатывающих предприятий, затрагивают общественные, экономические и межгосударственные связи. Эпизоотии ящура не знают географических границ и могут распространяться в короткое время на огромные территории.

Экономический ущерб складывается из 100% заболеваемости животных, потери упитанности, молока у коров, а также от снижения качества продукции. Эпизоотии ящура

препятствуют нормальной хозяйственной деятельности целых районов, областей и даже государств.

По данным МЭБ, ежегодно неблагополучными по ящуру являются 55-70 государств Азии, Африки, Южной Америки и Европы. В последние десятилетия ящур не регистрировался лишь в странах Северной Америки, Австралии и Океании. Наиболее напряженная эпизоотическая ситуация сохраняется на азиатском континенте, где циркулирует вирус ящура 4 типов (О, А, С и Азия 1). Сложной остается эпизоотическая ситуация и на африканском континенте, на котором выделяли вирус ящура 7 типов: О,А,С,САТ-1,САТ-2,САТ-3 и Азия-1 [8-12].

**Материалы и методы исследования.** Ящур является эндемичным заболеванием во многих частях Азии, Африки, Среднего Востока и Южной Америки. В Африке циркуляция вируса в популяции африканских буффало делает искоренение этого заболевания почти невозможным. Северная Америка, Новая Зеландия, Австралия, Гренландия, Исландия и большинство европейских стран признаны свободными от данного заболевания. В США последняя вспышка ящура зарегистрирована в 1929 году.

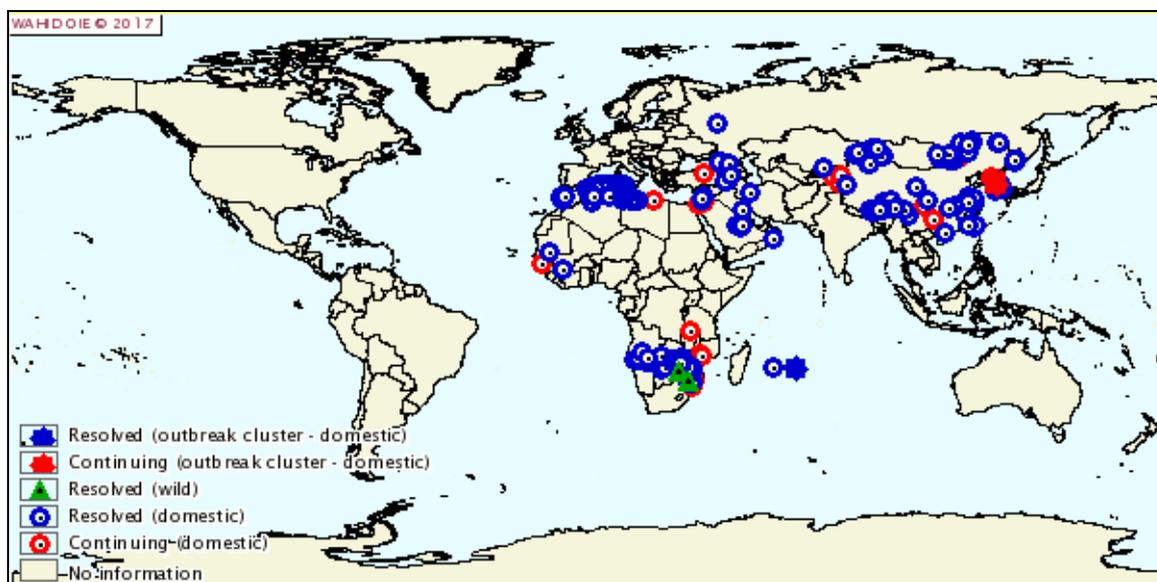


Рисунок 1 - Вспышки ящура в мире с 2013 по 2017 гг. - изменение эпидемиологического статуса

Для проведения диагностических исследований и специфической профилактики болезни необходимые препараты закупаются государством из зарубежных производителей. Собственные средства диагностики и специфической профилактики ящура в республике отсутствуют. Отсутствие требуемых отечественных препаратов осложняет или делает дорогостоящей мероприятия по диагностике болезни.

Исходя из приведенных сведений разработка и использование в лабораторной практике диагностики ящура молекулярно-генетических тест-систем, основанных на индикации и идентификации генома возбудителя, является актуальным направлением исследований.

Анализ проявившихся случаев заболевания за последние годы в зарубежных странах показывает, что ряд административно-территориальных единиц областного и районного масштабов Республики Казахстан постоянно находятся в угрожаемых регионах по ящуру. Такая напряженная обстановка требует постоянного мониторинга эпизоотической ситуации по ящуру в пределах и за пределами страны и применять соответствующие диагностические методы по индикации и идентификации возбудителя болезни.

Для экспрессной диагностики ящура разработаны и применяют методы выявления антигена и антител с помощью ИФА и ДНК/РНК – в ПЦР с использованием соответствующих тест-систем. Последний метод является наиболее чувствительным и специфичным. При этом методе не требуются типоспецифические сыворотки на различные антигенные варианты вируса, как при использовании других методов. Идентификация с помощью анализа генома

возбудителя дает возможность подбирать вакцины с соответствующими иммунизирующими антигенными компонентами.

Опытные образцы молекулярно-генетической ПЦР тест-системы для обнаружения и характеристики вируса ящура изготовлены из штаммов и типовых вариантов вируса ящура выделенных в процессе возникновения эпизоотий в различных регионах Азии, представляющих эпизоотическую угрозу для Республики Казахстан, то есть тест-системы были разработаны для специфического обнаружения: A/ASIA/Sea-97, O/ME-SA/Ind-2001, O/ME-SA/PanAsia и PanAsia-2, O/SEA/Mya-98, а также для обнаружения и характеристики генетической линий, а также O/CATNAY ориентируясь на специфические участки генома вируса ящура. ОТ-ПЦР в реальном времени являются полезными лабораторными инструментами для быстрой и чувствительной характеристики вирусов ящура, которые присутствуют в широком диапазоне образцов. ОТ-ПЦР в режиме реального времени ставится на Real-Time ПЦР оборудовании при соответствующих условиях термоциклирования. Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка нуклеиновой кислоты ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (in vitro). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. С помощью ПЦР амплифицируются короткие участки РНК. Специфичность ПЦР основывается на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами, короткими синтетическими олигонуклеотидами длиной 18—30 оснований. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двуцепочечной матрицы и будет ограничивать начало и конец амплифицируемого участка.

В лабораторных исследованиях использовали не менее 5 г стенки и содержимого афт на слизистой оболочке языка (у крупного рогатого скота), на пяточке (у свиней), на коже венчика и межпальцевой щели (у крупного и мелкого рогатого скота, свиней, верблюдов). Для выявления антигена вируса из тканей кожи готовили 20% суспензию на растворе Хенкса путем растирания в фарфоровой ступке со стерильным нейтральным стеклом, затем эту суспензию очищали центрифугированием при 3000 g в течение 30 минут. Очищенную надосадочную жидкость использовали в качестве вирусосодержащей суспензии для выявления антигена и репродуктивного вируса.

**Результаты исследований и их обсуждение.** После анализа уникальные области кодирующей нуклеотидные последовательности VP1 были идентифицированы как мишени для праймеров и зондов. Все олигонуклеотиды были синтезированы Сигма-Олдрич (США), и все зонды были помечены BHQ-1 (Black Hole Quencher-1) и FAM на 3'- и 5'-концах соответственно.

По меньшей мере два набора олигонуклеотидов (праймеры и пробы) были сконструированы для каждой тест-системы и оценивались во множестве возможных комбинаций для выявления гомологичного серотипа. Наилучший олиго был выбран нами для каждого из соответствующих анализов.

Опытные образцы молекулярно-генетической ПЦР тест-системы для индикации и идентификации были изготовлены из штаммов и типовых вариантов вируса ящура, представляющих эпизоотическую угрозу для Республики Казахстан. Для испытания тест-системы серотипа Asia 1 были использованы нижеследующие изоляты вируса ящура (таблица 1).

Таблица 1 – Изоляты вируса ящура, использованные для испытания тест-системы серотипа Asia 1

| Серотип | Топотип | Генетическая линия | Название образца |
|---------|---------|--------------------|------------------|
| Asia 1  | ASIA    | Sindh 08           | TUR/37/2014      |
| Asia 1  | ASIA    | Sindh 08           | TUR/2/2015       |
| Asia 1  | ASIA    | Sindh 08           | TUR/7/2015       |
| Asia 1  | ASIA    | Sindh 08           | IRN/2/2015       |
| Asia 1  | ASIA    | Sindh 08           | IRN/20/2015      |
| Asia 1  | ASIA    | Sindh 08           | ПАК/27/2015      |
| Asia 1  | ASIA    | Sindh 08           | ПАК/28/2015      |
| Asia 1  | ASIA    | Sindh 08           | ПАК/29/2015      |
| Asia 1  | ASIA    | Sindh 08           | ПАК/33/2015      |

Для испытания тест-системы серотипа А использованы изоляты вируса ящура, указанные в таблице 2.

Таблица 2 - Изоляты вируса ящура, использованные для испытания тест-системы серотипа А

| Серотип | Топотип | Генетическая линия | Название образца |
|---------|---------|--------------------|------------------|
| А       | ASIA    | Iran-05            | TUR/31/2014      |
| А       | ASIA    | Iran-05            | TUR/35/2014      |
| А       | ASIA    | Iran-05            | TUR/13/2015      |
| А       | ASIA    | Iran-05            | TUR/14/2015      |
| А       | ASIA    | Sea-97             | TAI/24/2015      |
| А       | ASIA    | Sea-97             | MYA/3/2015       |
| А       | ASIA    | Sea-97             | MYA/2/2015       |
| А       | ASIA    | Sea-97             | MYA/4/2015       |
| А       | ASIA    | G-VII              | SAU/7/2015       |
| А       | ASIA    | G-VII              | SAU/8/2015       |
| А       | ASIA    | G-VII              | SAU/14/2015      |
| А       | ASIA    | G-VII              | SAU/15/2015      |
| А       | ASIA    | G-VII              | SAU/15/2016      |

Для испытания тест-системы серотипа О использованы нижеследующие изоляты вируса ящура (таблица 3).

Таблица 3 - Изоляты вируса ящура, использованные для испытания тест-системы серотипа О

| Серотип | Топотип | Генетическая линия | Название образца |
|---------|---------|--------------------|------------------|
| О       | SEA     | Mya-98             | MYA/1/2015       |
| О       | SEA     | Mya-98             | MYA/5/2015       |
| О       | SEA     | Mya-98             | TAI/9/2015       |
| О       | ME-SA   | PanAsia-2          | TUR/17/2015      |
| О       | ME-SA   | Ind-2001           | NEP/15/2015      |
| О       | ME-SA   | Ind-2001           | NEP/15/2015      |
| О       | ME-SA   | Ind-2001           | NEP/23/2015      |
| О       | ME-SA   | Ind-2001           | NEP/24/2015      |
| О       | ME-SA   | Ind-2001           | NEP/1/2015       |
| О       | ME-SA   | Ind-2001           | NEP/3/2015       |
| О       | ME-SA   | Ind-2001           | NEP/4/2015       |

Диагностическую специфичность и чувствительность ОТ-ПЦР тест-систем в реальном времени, специфичных для генетических линии А/ASIA/G-VII, А/ASIA/Sea-97, О/ME-SA/Ind-2001, О/ME-SA/PanAsia и PanAsia-2, О/SEA/Mya-98, а также для обнаружения и характеристики генетической линии О/CATHAY, оценивали с помощью панели из 48 образцов РНК с использованием пан-серотипного ОТ-ПЦР анализа в качестве эталонного теста.

В 96 лучничном панели из типичных образцов вируса ящура, собранных из эндемичных пулов 1 и 3, и включала последующие генетические линии: А/ASIA/G-VII, А/ASIA/Sea-97, Asia1/ASIA/Sindh-08, О/CATHAY, О/ME-SA/PanAsia-2<sup>ANT-10</sup>, О/ME-SA/Ind-2001d, О/SEA/Mya-98, А/ASIA/Iran-05<sup>SIS-10</sup> и А/ASIA/Iran-05<sup>FAR-11</sup> (Table 1).

Все образцы, ранее характеризованные филогенетическими анализами VP1-кодирующей последовательности, принадлежащей к линии А / ASIA / G-VII (n = 23), дали положительный результат в ОТ- ПЦР (значение Ct) как в ген-специфичной так и в 3D пан-серотипной ОТ-ПЦР. Значения Ct для ген-специфичного анализа А/ASIA/G-VII были в среднем ниже на 3.01 ( $t_{1,22}=11.14$ ,  $p=0.000$ ), чем те результаты, которые были получены при 3D-пан-серотипном анализе (таблица 2).

Кроме того, были протестированы 25 образцов РНК, представляющих линии вируса ящура, отличающиеся от А/ASIA/G-VII и циркулирующие в схожих географических областях

(в пулах 1 и 3), для оценки анализа диагностической специфичности. Все эти образцы дали положительный результат в пан-серотипном анализе, но показали отрицательный результат Ст в А/ASIA/G-VII ген-специфичном анализе (таблица 4).

Аналитическая чувствительность. Относительный предел обнаружения для специфической ОТ-ПЦР А/ASIA/G-VII оценивали путем проведения десятикратной серии разведений двух образцов РНК (IRN/8/2016 и SAU/15/2016) в двух экземплярах и параллельно с 3D-пан-серотипным анализом. Для этих двух образцов, вирус был обнаружен до семи разведений с помощью А/ASIA/G-VII тест-системы, тогда как только до шести разведений были обнаружены с 3D-пан-серотипным анализом. Эффективность А/ASIA /G-VII анализа составило 100,9% и 96,4% для IRN/8/2016 и SAU/15/2016, тогда как эффективность 3D пан-серотипного анализа составило только 98% и 73,9%, что показывает более высокую чувствительность А/ASIA/G-VII тест-системы (рисунок 1).

Таблица 4 - Диагностическая чувствительность и специфичность G-VII-специфичной тест-системы

| Название образца | Серотип/топотип | Генетическая линия | Тип образца | 3D Значение Ст | G-VII Значение Ст |
|------------------|-----------------|--------------------|-------------|----------------|-------------------|
| IRN/8/2015       | A/ASIA          | G-VII              | OS          | 16.47          | 14.57             |
| IRN/18/2015      | A/ASIA          | G-VII              | OS          | 16.21          | 15.00             |
| IRN/12/2015      | A/ASIA          | G-VII              | BTy1        | 11.33          | 6.73              |
| IRN/14/2015      | A/ASIA          | G-VII              | BTy1        | 12.27          | 9.11              |
| IRN/21/2015      | A/ASIA          | G-VII              | BTy1        | 12.43          | 9.47              |
| IRN/1/2016       | A/ASIA          | G-VII              | BTy1        | 9.83           | 9.87              |
| IRN/8/2016       | A/ASIA          | G-VII              | BTy1        | 11.03          | 7.68              |
| IRN/11/2016      | A/ASIA          | G-VII              | BTy1        | 11.40          | 7.11              |
| IRN/11/2016      | A/ASIA          | G-VII              | OS          | 20.99          | 19.10             |
| IRN/12/2016      | A/ASIA          | G-VII              | BTy1        | 11.51          | 8.19              |
| IRN/23/2016      | A/ASIA          | G-VII              | OS          | 22.11          | 19.89             |
| IRN/20/2016      | A/ASIA          | G-VII              | BTy1        | 11.86          | 7.78              |
| IRN/39/2016      | A/ASIA          | G-VII              | BTy1        | 16.87          | 15.28             |
| IRN/4/2017       | A/ASIA          | G-VII              | BTy1        | 17.24          | 16.30             |
| SAU/3/2015       | A/ASIA          | G-VII              | BTy1        | 14.81          | 12.51             |
| SAU/4/2015       | A/ASIA          | G-VII              | OS          | 20.19          | 16.58             |
| SAU/8/2015       | A/ASIA          | G-VII              | BTy1        | 14.21          | 8.79              |
| SAU/9/2015       | A/ASIA          | G-VII              | BTy1        | 12.37          | 8.92              |
| SAU/14/2015      | A/ASIA          | G-VII              | BTy1        | 19.44          | 16.11             |
| SAU/15/2015      | A/ASIA          | G-VII              | BTy1        | 24.76          | 21.47             |
| SAU/16/2015      | A/ASIA          | G-VII              | BTy1        | 14.18          | 10.81             |
| SAU/17/2015      | A/ASIA          | G-VII              | BTy1        | 15.74          | 10.78             |
| SAU/21/2015      | A/ASIA          | G-VII              | BTy1        | 18.66          | 15.14             |
| SAU/15/2016      | A/ASIA          | G-VII              | BTy1        | 11.39          | 7.83              |
| SAU/15/2016      | A/ASIA          | G-VII              | OS          | 36.32          | 27.96             |
| SAU/19/2016      | A/ASIA          | G-VII              | BTy1        | 18.88          | 17.29             |
| SAU/20/2016      | A/ASIA          | G-VII              | BTy1        | 18.98          | 16.90             |

продолжение таблицы 4

|             |             |                             |      |       |       |
|-------------|-------------|-----------------------------|------|-------|-------|
| SAU/22/2016 | A/ASIA      | G-VII                       | BTy1 | 16.88 | 14.67 |
| SAU/40/2016 | A/ASIA      | G-VII                       | BTy1 | 12.89 | 10.94 |
| AFG/5/2013  | A/ASIA      | Iran-05 <sup>FAR-11</sup>   | OS   | 21.68 | No Ct |
| PAK/31/2015 | A/ASIA      | Iran-05 <sup>FAR-11</sup>   | OS   | 19.27 | No Ct |
| TUR/31/2014 | A/ASIA      | Iran-05 <sup>SIS-10</sup>   | OS   | 25.84 | No Ct |
| IRN/9/2015  | A/ASIA      | Iran-05 <sup>SIS-10</sup>   | OS   | 20.82 | No Ct |
| MAY/15/2014 | A/ASIA      | Sea-97                      | OF   | 29.98 | No Ct |
| VIT/9/2015  | A/ASIA      | Sea-97                      | BTY1 | 28.86 | No Ct |
| VIT/10/2015 | A/ASIA      | Sea-97                      | BTY1 | 27.63 | No Ct |
| AFG/6/2016  | Asia 1/ASIA | Sindh-08                    | OS   | 24.83 | No Ct |
| AFG/10/2016 | Asia 1/ASIA | Sindh-08                    | OS   | 32.39 | No Ct |
| AFG/21/2016 | Asia 1/ASIA | Sindh-08                    | OS   | 24.50 | No Ct |
| NEP/29/2015 | O/ME-SA     | Ind-2001d                   | OF   | 26.54 | No Ct |
| MUR/1/2016  | O/ME-SA     | Ind-2001d                   | OS   | 27.13 | No Ct |
| MUR/3/2016  | O/ME-SA     | Ind-2001d                   | OF   | 31.58 | No Ct |
| NEP/5/2016  | O/ME-SA     | Ind-2001d                   | OF   | 34.49 | No Ct |
| AFG/4/2016  | O/ME-SA     | PanAsia-2 <sup>ANT-10</sup> | OS   | 28.65 | No Ct |
| AFG/17/2016 | O/ME-SA     | PanAsia-2 <sup>ANT-10</sup> | OS   | 27.25 | No Ct |
| AFG/19/2016 | O/ME-SA     | PanAsia-2 <sup>ANT-10</sup> | OS   | 25.68 | No Ct |
| HKN/2/2016  | O/CATHAY    | -                           | OS   | 31.59 | No Ct |
| HKN/3/2016  | O/CATHAY    | -                           | OS   | 30.21 | No Ct |
| HKN/6/2016  | O/CATHAY    | -                           | OS   | 33.64 | No Ct |
| HKN/7/2016  | O/CATHAY    | -                           | OS   | 36.18 | No Ct |
| MYA/7/2016  | O/SEA       | Mya-98                      | OS   | 32.02 | No Ct |
| MYA/9/2016  | O/SEA       | Mya-98                      | OS   | 27.98 | No Ct |
| MYA/10/2016 | O/SEA       | Mya-98                      | OS   | 30.05 | No Ct |
| TAI/33/2016 | O/SEA       | Mya-98                      | OF   | 30.71 | No Ct |

Диагностическая чувствительность была протестирована с использованием следующих образцов, относящихся к генетической линии A/ASIA/G-VII (n=23); A/ASIA/Sea-97 (n=3), Asia 1/ASIA/Sindh-08 (n=3), O/CATHAY (n=4), O/ME-SA/PanAsia-2<sup>ANT-10</sup> (n=3), O/ME-SA/Ind-2001d (n=4), O/SEA/Mya-98 (n=4), A/ASIA/Iran-05<sup>SIS-10</sup> (n=2) and A/ASIA/Iran-05<sup>FAR-11</sup> (n=2).

\*BTy - бычья тиреоидная клеточная линия; \*OS-исходная суспензия; \*OF-исходная жидкость; ME-SA - Ближний Восток-Южная Азия; SEA - Юго-Восточная Азия.

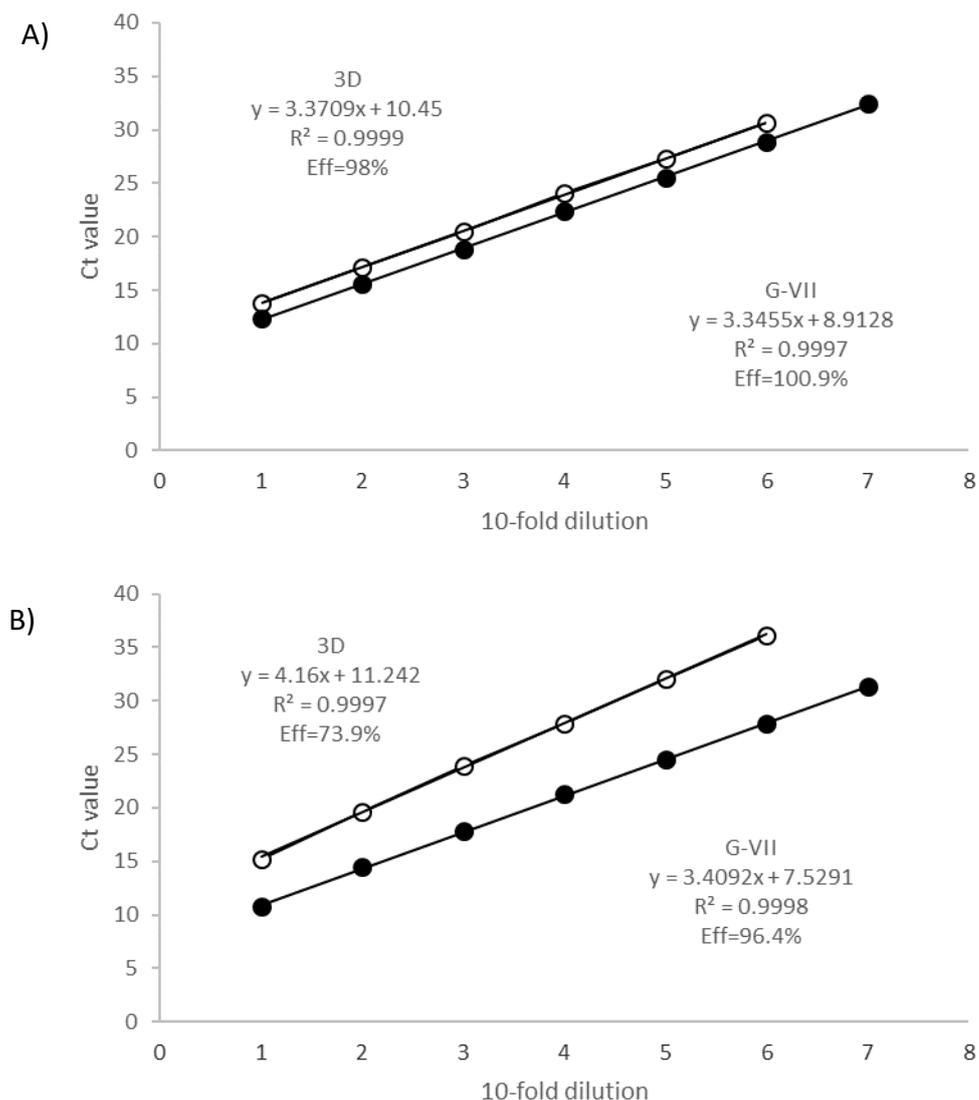


Рисунок 1 - Сравнительный предел обнаружения A/ASIA/G-VII- и 3D пан-серотипной ОТ-ПЦР анализов

Два разных РНК образца (A) IRN/8/2016 и (B) SAU/15/2016, которые являются представителями генетической линии A/ASIA/G-VII, были протестированы в 3D пан-серотипным анализе (○) и G-VII ген-специ после вторжения генетической линии A/ASIA/G-VII на Ближний Восток в 2015 году линия быстро распространилась во многих странах (Саудовская Аравия, Армения, Иран и Турция) и, несмотря на усилия контроля вирус продолжает распространяться в этом географическом районе. Недавно было опубликовано аналогичное эпидемиологическое событие для линии O/ME-SA/Ind-2001d, которая также появилась на индийском субконтиненте и продолжает свое распространение в Азии и на Ближнем Востоке. Поэтому необходимо быстро и точно идентифицировать образцы, которые содержат линию A/ASIA/G-VII, и дифференцировать их от других циркулирующих линий вируса ящура.

Учитывая, что VP1 участок кодирования варьирует в зависимости от серотипа и линии вируса ящура, филогенетические сравнения кодирующих последовательностей VP1 участка обычно используются для эпидемиологической характеристики полевых вирусов. Это знание ранее использовалось для генерации анализов ОТ-ПЦР, которые могут обнаруживать современные линии вируса ящура, циркулирующие на Ближнем Востоке и в Западной Евразии: O/ME-SA/PanAsia-2, A/ASIA / Iran-05, Asia 1/ASIA / Group1, 2, 6 и 7, Восточная Африка:

A/AFRICA/G-I, O/EA-2, O/EA-4, SAT1/I и SAT2/IV (Bachanek-Bankowska и др., 2016a), а также для выявления отдельных линий: SAT2/VII и O / ME-SA / Ind-2001. Было показано, что специфичный для A/ASIA/G-VII ОТ-ПЦР анализ, является чувствительным и правильно идентифицирует все вирусы принадлежащие к генетической линии A/ASIA /G-VII с значениями Ct ниже, чем у пан-серотипного теста, который основан на обнаружении 3D участка кодирования вируса ящура. Кроме того, генетический материал из других линий вируса ящура, изученные в этом исследовании, не были амплифицированы, что указывает на диагностическую специфичность анализа. А также, G-VII-ген-специфичная гОТ-ПЦР тест-система, способна обнаруживать геном вируса ящура при более высоких разведениях, чем 3D пан-серотипный анализ, что указывает на высокую аналитическую чувствительность. Поэтому применение A/ASIA/G-VII-ген-специфичного анализа обеспечивает надежный метод быстрой характеристики линии A/ASIA/G-VII. Тем не менее, рекомендуется, чтобы все ген-специфичные анализы использовались в сочетании с пан-серотипным диагностическим тестом. G-VII-ген-специфичный ОТ-ПЦР анализ нацелен на наиболее изменчивую область генома, что позволяет со временем изменить область мишени, изменяя специфичность и / или чувствительность тест-системы. Таким образом, важно отслеживать эффективность анализа, специфичного для линии, с течением времени. Состав и термальный профиль G-VII-специфичного и 3D пан-серотипного анализов были разработаны с одинаковыми характеристиками, так что оба они могут выполняться в одно и то же время и параллельно с использованием одного и того же циклирующего инструмента.

Применение ген-специфических анализов обеспечивает относительно доступный метод определения характеристик линии вируса ящура для лабораторий, где оборудование по секвенированию ограничен либо вовсе недоступен для той или иной страны.

По результатам исследований и испытаний в лаборатории ПЦР диагностиком признан как перспективный для диагностики ящура животных в Республике Казахстан. В связи с этим будет составлена и зарегистрирована нормативно-техническая документация на изготовление, контроль и применение молекулярно-генетической тест-системы для индикации и идентификации вируса ящура в ПЦР в государственном реестре ветеринарных препаратов согласно действующим правилам и требованиям МСХ Республики Казахстан.

**Выводы.** Разработаны и изготовлены молекулярно-генетические тест-системы (реал-тайм ОТ-ПЦР) для индикации и идентификации генетической линий G-VII, A/ASIA/Sea-97, O/ME-SA/Ind-2001, O/ME-SA/PanAsia и PanAsia-2, O/SEA/Mya-98 и O/CATNAУ .

Диагностическую специфичность и чувствительность разработанных ОТ-ПЦР тест-систем, для обнаружения и характеристики генетических линий G-VII, Sea-97, Ind-2001, PanAsia и PanAsia-2, /Mya-98, CATNAУ, оценивали с помощью панели из 48 образцов РНК с использованием пан-серотипного ОТ-ПЦР анализа в качестве эталонного теста.

На примере A/ASIA/G-VII тест-системы было показано, что специфичный для этой линии ОТ-ПЦР анализ, является чувствительным и правильно идентифицирует все вирусы принадлежащие к генетической линии A/ASIA /G-VII с значениями Ct ниже, чем у пан-серотипного теста, который основан на обнаружении 3D участка кодирования вируса ящура. Кроме того, генетический материал из других линий вируса ящура, изученные в этом исследовании, не были амплифицированы, что указывает на диагностическую специфичность анализа. А также, G-VII-ген-специфичная гОТ-ПЦР тест-система, способна обнаруживать геном вируса ящура при более высоких разведениях, чем 3D пан-серотипный анализ, что указывает на высокую аналитическую чувствительность. Поэтому применение A/ASIA/G-VII-ген-специфичного анализа обеспечивает надежный метод быстрой характеристики линии A/ASIA/G-VII. Тем не менее, рекомендуется, чтобы все ген-специфичные анализы использовались в сочетании с пан-серотипным диагностическим тестом. G-VII-ген-специфичный ОТ-ПЦР анализ нацелен на наиболее изменчивую область генома, что позволяет со временем изменить область мишени, изменяя специфичность и чувствительность тест-системы. Таким образом, важно отслеживать эффективность анализа, специфичного для линии, с течением времени. Состав и термальный профиль G-VII-специфичного и 3D пан-серотипного анализов были разработаны с одинаковыми характеристиками, так что оба они могут

выполняться в одно и то же время и параллельно с использованием одного и того же циклирующего инструмента.

Применение ген-специфических анализов обеспечивает относительно доступный метод определения характеристик линии вируса ящура для лабораторий, где оборудование по секвенированию ограничен либо вовсе недоступен для той или иной страны. Разработка A/ASIA/G-VII-специфического анализа расширяет портфолио (набор молекулярных инструментов) ген-специфических ОТ-ПЦР анализов, что позволяет национальным лабораториям в эндемических условиях быстро и точно характеризовать генетические линии вируса ящура.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Макаров, В.В. Эпизоотологическая методология. - М.: РУДН, 2001. - 224 с.
2. Макаров В.В. Очерки истории борьбы с инфекционными болезнями. - М.: РУДН, 2008. - 220 с.
3. Кузьмин В.А., Софроний П.И. Элементы создания базы данных для контроля хронических инфекционных болезней // Инновации – основа модернизации АПК: матер. междунар. конгресса «Агрорусь-2012». - СПб, 2012. - С.27.
4. Макаров В.В., Сухарев О.И., Кириллов А.К. Современный этап борьбы с инфекционными болезнями. - М.: РАКОАПК, 2009. - 170 с.
5. Березин В.В. Ящур животных: научно-производственный справочник. – М.: ЦНСХБ РАСХН, 2002. - 84 с.
6. Боев Б.В., Гуленкин В.М., Семенов А.В. Ящур: система моделей и компьютерных программ для оперативного анализа и прогноза эпизоотий // Ветеринарная патология. - 2004. - № 4 - С. 73-83.
7. Макаров В.В. Список МЭБ болезней животных и трансграничные инфекции. - М.: РУДН, 2008. - 140 с.
8. Adhikari B.N., Thakuri K.C. Emergence of new FMD virus strains in Nepal // Nepalese Vet. J. – 2005. - № 28. - P. 109-113.
9. Brooksby J.B. Epizootiology of foot-and-mouth disease in developing countries // World Anim. Rev. – 1972. - № 3. – P. 10-13.
10. Chandranaik B.M., Girish V.R., Harish B.R. Isolation of Asia 1 FMD virus from an outbreak in Karnataka // Indian Veterinary Journal. – 2007. - № 84. - P. 434-435.
11. Alexander D. FMD // Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. - Paris: OIE, the World Organisation for Animal Health, 2009. – P. 576-589.
12. Дудников С.А., Гусева Е.В. Анализ риска в ветеринарии. Принципы и методология (Анализ риска заноса на территорию Российской Федерации). - Владимир: ОКНИИиМС, 2001.- 32 с.

### ТҮЙІН

Мақалада аусыл вирусының G-VII, A/ASIA/Sea-97, O/ME-SA/Ind-2001, O/ME-SA/PanAsia, PanAsia-2, O/SEA/Mya-98 және O/CATHAY генетикалық тізбегін индикациялау және идентификациялау мақсатында, нақты уақыт режимінде кері транскрипцияның полимеразды тізбекті реакциясында (КТ-ПТР) молекулярлы-генетикалық тест-жүйені әзірлеу нәтижелері келтірілген.

Аусыл вирусының G-VII, Sea-97, Ind-2001, PanAsia, PanAsia-2, /Mya-98 және CATHAY генетикалық тізбегінің сипаттамасын анықтау үшін, әзірленген КТ-ПТР тест-жүйесінің диагностикалық ерекшелігі мен сезімталдығын, 48 сынамады панельді, пан-серотипті КТ-ПТР анализді эталонды тест ретінде пайдаланып, әзірленген КТ-ПТР тест-жүйесінің диагностикалық ерекшелігі мен сезімталдығы бағаланды.

A/ASIA/G-VII тест-жүйесін мысалға ала отырып, КТ-ПТР анализіне сезімтал тізбек ретінде, St көрсеткішінен төмен A/ASIA /G-VII генетикалық тізбегіне ұқсас вирустарды анықтайды, пан-серотипті тестке қарағанда, себебі пан-серотипті тест аусыл вирусының 3D аймағын кодын анықтауға негізделген. Сонымен қатар, осы зерттеудегі зерттелінген басқада аусыл вирусының тізбектерінің генетикалық материалдары амплификацияланбаған еді, яғни ол

анализдің диагностикалық айырмашылығын меңзеп тұр. Және де G-VII-генді-сезімталды rKT-ПТР тест-жүйесі, жоғарғы араластыруларда да аусыл вирусының геномын анықтай алады, 3D пан-серотипті анализге қарағанда, бұл оның жоғары аналитикалық сезімталдығына байланысты екенін көрсетіп отыр. Сол себепті A/ASIA/G-VII-гендік-спецификалық анализін пайдалану, A/ASIA/G-VII тізбегіне сенімді әрі тез сипаттама алуға мүмкіндік береді. Соған қарамастан, барлық ген-спецификалық анализдерді пан-серотипті диагностикалық тестпен бірге пайдаланғанды ұсынып отыр. G-VII-гендік-спецификалық КТ-ПТР анализін геномның өзгермелі аймағына пайдаланған жөн, себебі уақыт өте пайдалану мақсатын өзгертуге болады, тест-жүйенің спецификалығы мен сезімталдығын өзгерте алады. Сондықтан уақыт өте анализдің тиімділігін бақылау маңызды. Состав и термальный профиль G-VII-спецификалы және 3D пан-серотипті анализдерінің құрамы мен термальді профилі бірдей сипатта дайындалған болатын, сондықтан ол екеуіде бір уақытта және циклденген құрал ретінде параллельді пайдаланыла береді.

Гендік-спецификалық анализдерді пайдалану аусыл вирусының тізбектерін зертхана жағдайында анықтауға мүмкіндік береді, себебі кейбір елдердің зертханаларында секвенирлеуге арналған құралдардың жоқтығы немесе тиімсіздігінің салдарынан. A/ASIA/G-VII-спецификалық анализді әзірлеу, ген-спецификалық КТ-ПТР анализдердің портфолиосын ұлғайтады (молекулярлық құралдардың жиынтығы), яғни ұлттық зертханаларға эндемиялық жағдайларда аусыл вирусының генетикалық тізбектеріне тез және нақты сипаттама беруге мүмкіндік береді.

### RESUME

The article presents data on the development of molecular genetic test systems (real-time RT-PCR) for the indication and identification of genetic lines G-VII, A / ASIA / Sea-97, O / ME-SA / Ind-2001, O / ME-SA / PanAsia and PanAsia-2, O / SEA / Mya-98 and O / CATHAY of foot and mouth disease virus.

The diagnostic specificity and sensitivity of test systems developed by OT-PCR to detect and characterize the genetic lines FMDV G-VII, Sea-97, Ind-2001, PanAsia and PanAsia-2, / Mya-98, CATHAY were evaluated using a panel of 48 samples RNA using pan-serotype OT-PCR analysis as a reference test.

Using the example of A / ASIA / G-VII test systems, it was shown that the OT-PCR analysis specific to this line is sensitive and correctly identifies all viruses belonging to the genetic line A / ASIA / G-VII with Ct values lower than that of pan-serotype test, which is based on the detection of the 3D encoding area of FMD virus. In addition, genetic material from other FMDV lines studied in this study was not amplified, which indicates the diagnostic specificity of the assay. Using the example of A / ASIA / G-VII test systems, it was shown that the OT-PCR analysis specific to this line is sensitive and correctly identifies all viruses belonging to the genetic line A / ASIA / G-VII with Ct values lower than that of pan-serotype test, which is based on the detection of the 3D encoding area of FMD virus. In addition, genetic material from other FMDV lines studied in this study was not amplified, which indicates the diagnostic specificity of the assay. Also, the G-VII gene-specific rOT-PCR test system is capable of detecting the genome of the FMDV virus at higher dilutions than 3D pan-serotype analysis, which indicates high analytical sensitivity. Therefore, the use of A / ASIA / G-VII-gene-specific analysis provides a reliable method for quickly characterizing the A / ASIA / G-VII line. However, it is recommended that all gene-specific assays be used in conjunction with a pan-serotype diagnostic test. G-VII-gene-specific OT-PCR analysis is aimed at the most variable region of the genome, which allows you to change the target area over time, changing the specificity and sensitivity of the test system. Thus, it is important to track the effectiveness of the line-specific analysis over time. The composition and thermal profile of the G-VII-specific and 3D pan-serotype analyzes were developed with the same characteristics, so that both can be performed at the same time and in parallel using the same cycling instrument.

The use of gene-specific assays provides a relatively affordable method for determining the characteristics of a FMDV line for laboratories where sequencing equipment is limited or completely unavailable for a given country. The development of an A / ASIA / G-VII-specific assay expands the

portfolio (set of molecular tools) of gene-specific OT-PCR assays, which allows national laboratories to quickly and accurately characterize the genetic lines of FMD virus under endemic conditions.

УДК 636.631.08.03

**Сейдалиев Н.Б.**<sup>1</sup>, кандидат сельскохозяйственных наук

**Джунусова Р.Ж.**<sup>2</sup>, магистр технических наук

**Мұқа Ш.Б.**<sup>1</sup>, магистр ветеринарных наук

**Майкотов А.Н.**<sup>2</sup>, магистр ветеринарных наук

<sup>1</sup>ТОО «Казахский научно – исследовательский институт животноводства и кормопроизводства», г. Алматы, Республика Казахстан

<sup>2</sup>НАО «Казахский национальный аграрный университет», г. Алматы, Республика Казахстан

## **ЭФФЕКТИВНЫЕ ПРИЕМЫ ПОВЫШЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТЬ КОРОВ В МОЛОЧНОМ СКОТОВОДСТВЕ**

### **Аннотация**

Причины возникновения акушерско-гинекологических заболеваний обусловлены, в первую очередь, ослаблением общей резистентности организма и нарушением обмена веществ. Основным, предрасполагающим к заболеванию фактору, является несбалансированность рациона по кислотно-щелочным эквивалентам, минеральным веществам и витаминам, а также условия содержания и уровень продуктивности коров. Нарушение обмена веществ, в свою очередь, вызывает эндокринную недостаточность и гормональные нарушения, что приводит к расстройству нейрогуморальной регуляции половых функций и создаются благоприятные условия для развития в половых органах патогенной микрофлоры, вызывающей воспалительные процессы.

В целях повышения фертильности маточного поголовья скота разработаны и испытаны три схемы стимуляции охоты с использованием стимулирующих гормонов (прогестерона, эстрадиола, ФСГ, ЛГ, CIDR и др) и определена эффективность схемы, где был использован гормональный препарат CIDR. При этом количество коров, пришедших в охоту было на 8,3 и 23,3% больше, чем при использовании других схем стимуляции. При применении предложенного приема стимуляции, количество пришедших в охоту коров от обработанного количества составило 92-95,4%, в испытанных базовых хозяйствах. Кроме того отработаны методы лечения коров от гипофункции и кисты яичников с использованием гормональных препаратов (фертагил, сурфагон и др.) При сравнении двух схем гормональной стимуляции при применении гормона CIDR фертильность коров повысилась на 5,9%.

**Ключевые слова:** *воспроизводство, молочное скотоводство, фертильность, мониторинг, лактация, гипофункция, синхронизации.*

**Введение.** Эффективность разведения молочного скота во многом определяется воспроизводительными способностями маточного поголовья [1].

В настоящее время неинтенсивно используются природные возможности коров воспроизвести себе подобных. Не редко отсутствует ветеринарные специалисты в хозяйствующих субъектах, которые занимались вопросами устранения нарушения воспроизводительной функции коров. В результате высокий процент яловости, бесплодие коров и недополучения планового теленка [2].

Поэтому необходимо будет заниматься профилактикой и лечением коров от акушерских и гинекологических заболеваний. С повышением специализации и концентрации молочного поголовья ужесточились условия его содержания [3].

Ряд исследователей считают основной причиной снижения воспроизводительной функции коров отрицательную взаимосвязь продуктивности с плодовитостью [4,5].

При этом нуждается в совершенствовании способы и приемы повышения репродукционной функции, схемы лечения, организации и проведении профилактических мероприятий [6].