

*Усольцев К.В., Хаммадов Н.И., Осянин К.А., Фаизов Т.Х.*

## **Способ одновременной экспресс диагностики лейкоза и вирусного иммунодефицита крупного рогатого скота на основе метода мультиплексной ПЦР**

Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, г. Казань, Россия

Возбудитель лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС) и возбудитель иммунодефицита крупного рогатого скота (ВИ КРС) относятся к семейству *Retroviridae*. ВИ КРС вызывает латентную инфекцию путем воздействия на лимфоциты, моноциты и нейтрофилы и приводит к нарушению иммунного ответа организма на различные инфекционные агенты. Кроме того, ВИ КРС при смешанной инфекции с вирусом лейкоза КРС может усиливать патогенное действие вируса лейкоза на организм животного. Также в силу определенного антигенного свойства ВЛ КРС и ВИ КРС, существует вероятность перекрестного взаимодействия антигена вируса лейкоза из набора для проведения РИД с исследуемой сывороткой крови, содержащей антитела к ВИ КРС. В связи вышесказанным важной задачей является разработка способа одновременной диагностики лейкоза и вирусного иммунодефицита КРС на основе метода мультиплексной ПЦР.

**Цель.** Одновременная экспресс диагностика лейкоза и иммунодефицита крупного рогатого скота.

**Материалы и методы исследования.** При проведении данного исследования применялся метод ПЦР в режиме реального времени. Химический состав ПЦР на 1 реакцию: 10 кратный ПЦР буфер – 1,5 мкл; 2,5 мМ НТФ – 1,5 мкл, 25 мМ  $MgCl_2$ ; Taq полимеразы (5 ед/мкл) – 0,5 мкл; 10 пМ раствор прямого праймера ВЛ КРС – 0,5 мкл; 10 пМ раствор обратного праймера ВЛ КРС – 0,5 мкл; 10 пМ раствор олигонуклеотидного зонда ВЛ КРС – 0,5 мкл; 10 пМ раствор прямого праймера ВИ КРС – 0,5 мкл; 10 пМ раствор обратного праймера ВИ КРС – 0,5 мкл; 10 пМ раствор олигонуклеотидного зонда ВИ КРС – 0,5 мкл; ДНК – 7 мкл. Общий объем реакционной смеси – 15 мкл. Программа ПЦР: 1 цикл. 95° - 3 мин; 2 цикл. 95° - 15 сек; 60° - 30 сек (детекция по каналам ROX и R6G). 2 цикл - 42 повтора. В исследовании использованы образцы ДНК, выделенные из крови КРС.

**Результаты.** Был осуществлен поиск полногеномных нуклеотидных последовательностей на интернет-ресурсе NCBI по базе данных: genome со следующими поисковыми запросами «bovine leukemia virus» и «bovine immunodeficiency virus». В найденном массиве данных нами были выбраны следующие полногеномные нуклеотидные последовательности: 1. KO 2120, bovine leukemia virus, complete genome;

2. NC\_001413.1, bovine immunodeficiency virus, complete genome. В выбранных последовательностях были определены участки характерные только для геномов ВИ КРС и ВЛ КРС. Для ВЛ КРС это ген, кодирующий капсидный белок p24, а для ВИ КРС составной ген *env*. Далее к этим участкам провирусной ДНК были подобраны следующие олигонуклеотиды для постановки ПЦР: прямой праймер ВЛ КРС 5'-cggcccatgaccagccta-3'; обратный праймер ВЛ КРС 5'-gttctaggtcagcaggagtagggtcg-3'; зонд ВЛ КРС ROX-cggcgttgggctgagctgattg-BHQ2; прямой праймер ВИ КРС 5'-caactatggatcaggacctagaccgc-3'; обратный праймер ВИ КРС 5'-aacccaataaaggcataattgaaacatta-3'; зонд ВИ КРС R6G-aacgcggggaaagggaggaggatc-RTQ1. С помощью онлайн утилиты NCBI BLAST доказана высокая внутривидовая и гетерогенная специфичность подобранных олигонуклеотидов. С использованием вышеуказанных праймеров и зондов был разработан метод мультиплексной ПЦР для одновременной индикации ВИ КРС и ВЛ КРС в одном исследуемом образце, и доказана работоспособность данного способа при исследовании 23 образцов ДНК, выделенных из крови КРС, положительно реагирующего в РИД. В результате установлено наличие провирусной ДНК ВЛ КРС во всех 23 пробах, ВИ КРС в 5 образцах ДНК коров.

**Заключение.** Разработан метод мультиплексной ПЦР для одновременной индикации провирусной ДНК возбудителей лейкоза и иммунодефицита крупного рогатого скота и доказана его работоспособность.