

Данный факт свидетельствует о возможности применения методики LAMP с колориметрической детекцией как экспресс-метода диагностики болезней животных и подходит для первичных скрининговых исследований.

### Библиографический список

1. Полуян, О. С. Реакция транскрипционной амплификации как новый этап в развитии технологий клинично-лабораторного молекулярно-биологического исследования / О.С. Полуян, С. А. Костюк, Т. В. Глинкина // Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі. – 2011. – № 3. – С. 119-123.
2. Bohorquez, J. A., Lanka, S., Rosell, R., Pérez-Simó, M., Alberch, M., Rodriguez, F., Ganges, L., & Maddox, C. W. Efficient detection of African Swine Fever Virus using minimal equipment through a LAMP PCR method. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2023, 13.
3. Deiman, B. Characteristics and applications of nucleic acid sequence based amplification (NASBA) / B. Deiman // *Mol. Biotech.* – 2007. – Vol. 20. – P. 163-179.
4. Jomoui, W., Srivorakun, H., Chansai, S., & Fucharoen, S. (2022). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) colorimetric phenol red assay for rapid identification of  $\alpha 0$ -thalassemia: Application to population screening and prenatal diagnosis / W. Jomoui // *PloS one*. – 2022. – Vol. 17(4),
5. Li, J., Macdonald, J., & von Stetten, F. (2018). Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification. / J. Li // *The Analyst*. – 2018. – Vol. 144(1). – P. 31–67.
6. Navarro, F. M, Federici, F. Colorimetric LAMP/RT-LAMP Protocol / F. M Navarro//[protocols.io](https://www.protocols.io/view/colorimetric-lamp-rt-lamp-protocol) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.protocols.io/view/colorimetric-lamp-rt-lamp-protocol> 5qrvor3x7v4o/v1y. – Заглавие с экрана. – (Дата обращения: 30.05.2023.).
7. Padzil, F, Mariatulqabtiah, A.R, Tan, W.S, Ho, K.L, Isa, N.M, Lau, H.Y, Ab, J, Chuang, K.P. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) as a Promising Point-of-Care Diagnostic Strategy in Avian Virus Research / F. Padzil // *Animals (Basel)*. - 2021 Dec 30;12(1):76.

УДК 636.09: 615.371

### СКРИНИНГ ЖИВЫХ ВИРУСНЫХ ВАКЦИН ДЛЯ КРУПНОГО И МЕЛКОГО РОГАТОГО СКОТА НА НАЛИЧИЕ МИКОПЛАЗМ И ВИРУСНЫХ КОНТАМИНАНТОВ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ПЦР

*Долинская К.Г., специалист отдела генодиагностики инфекционных болезней животных ФГБУ «ВГНКИ», [k.dolinskaya@vgnki.ru](mailto:k.dolinskaya@vgnki.ru)*

*Горбачева Н.С., научный сотрудник отдела генодиагностики инфекционных болезней животных ФГБУ «ВГНКИ», [gorbacheva@vgnki.ru](mailto:gorbacheva@vgnki.ru)*

*Брюсова М.Б., ведущий научный сотрудник отдела генодиагностики инфекционных болезней животных ФГБУ «ВГНКИ», [m.bryusova@vgnki.ru](mailto:m.bryusova@vgnki.ru)*

**Козлова А.Д.**, ведущий научный сотрудник отдела генодиагностики инфекционных болезней животных ФГБУ «ВГНКИ», [adkozlova@vgnki.ru](mailto:adkozlova@vgnki.ru)

**Яценчук С.П.**, заведующий отделом генодиагностики инфекционных болезней животных ФГБУ «ВГНКИ», доцент МГАВМиБ-МВА имени К.И. Скрябина, [pcr-lab@vgnki.ru](mailto:pcr-lab@vgnki.ru)

**Красникова М.С.**, ведущий научный сотрудник отдела генодиагностики инфекционных болезней животных ФГБУ «ВГНКИ», [m.krasnikova@vgnki.ru](mailto:m.krasnikova@vgnki.ru)

**Аннотация:** Проведен скрининг 10 образцов вакцинных препаратов для крупного и мелкого рогатого скота на наличие контаминации посторонними инфекционными агентами методом полимеразной цепной реакции. По результатам исследования в 4 образцах обнаружена контаминация микоплазмами и пестивирусами.

**Ключевые слова:** вакцины, контаминанты, КРС, МРС, посторонние агенты, ПЦР

Вакцинация представляет собой наиболее экономически эффективный способ профилактики, контроля инфекционных заболеваний животных, является ключевым фактором в улучшении благополучия сельскохозяйственных животных и снижении затрат на их выращивание. Требования к качеству, безопасности и эффективности вакцин постоянно растут. Однако риск контаминации посторонними агентами характерен для всех биологических препаратов, производство которых предполагает использование материалов животного происхождения, таких как культуры клеток, фетальная сыворотка и др. Использование данных материалов в процессе производства вакцин может привести к загрязнению вакцинных препаратов посторонними агентами – вирусами, бактериями, грибами.

Последствия вакцинации загрязненной вакциной могут быть различными. Их тяжесть связана с типом вакцины, количеством загрязнителя, его патогенностью и жизнеспособностью. Следствием загрязнения может стать заражение и развитие клинической или субклинической инфекции реципиента, серологическая реакция на загрязнитель, а также появление сероконверсии у невакцинированных животных, что затруднит последующее проведение диагностических и эпиднадзорных мероприятий.

Вакцинные препараты в России проходят многоступенчатый контроль качества и безопасности по методам, заложенным в Государственную Фармакопею. Наряду с другими способами анализа лекарственных средств, в статье 1.7.2.0013.15 Государственной фармакопеи для анализа биологических лекарственных препаратов описан метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения животных (ВОЗЖ) и Европейской Фармакопеи, метод ПЦР также может использоваться для выявления посторонних агентов в иммунологических лекарственных средствах для ветеринарного применения наравне с традиционными методами.

В рамках данной работы было проведено исследование 10 образцов

живых вирусных вакцин для крупного и мелкого рогатого скота (КРС и МРС). Из них 7 образцов вакцин разных наименований (3 отечественного производства и 4 – зарубежного производства), 3 образца - параллельные серии вакцин:

1. Вакцина против парагриппа 3 и инфекционного ринотрахеита КРС – 1 образец.
2. Вакцина против оспы овец и заразного узелкового дерматита КРС (производитель 1) – 2 образца разных серий.
3. Вакцина против оспы овец и заразного узелкового дерматита КРС (производитель 2) – 1 образец.
4. Вакцина против респираторно-синцитиальной инфекции КРС – 1 образец.
5. Вакцина против инфекционного ринотрахеита КРС – 1 образец.
6. Вакцина против возбудителей инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3 и респираторно-синцитиальной инфекции – 1 образец.
7. Вакцина против возбудителей инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции и лептоспироза – 3 образца разных серий.

На основе анализа литературных данных и доступных методик ПЦР был сформирован перечень актуальных контаминантов для исследования вакцин для профилактики болезней КРС и МРС. С помощью коммерческих ПЦР-наборов отечественных производителей, а также собственных методик вакцины исследовали на наличие генетического материала посторонних агентов (микоплазм, аденовирусов, вирусов герпеса КРС 1, 4 и 6 типов, вируса оспы овец и коз, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia chaffeensis*, пестивирусов групп А, В, С, D и Н, ротавирусов группы А, коронавируса КРС, вируса Блютанга, вируса парагриппа 3 КРС, вируса респираторной синцитиальной инфекции, вируса Шмалленберга, кобувируса КРС).

Выделение нуклеиновых кислот (НК) из образцов вакцин проводили с использованием наборов «ДНК-сорб-В» и «Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). Для контроля выделения НК использовали эндогенный или экзогенный ВКО. Амплификацию специфических фрагментов проводили в двух повторах для каждого образца вакцины.

В результате исследования в четырех образцах трех вакцин (одна из вакцин в двух сериях) обнаружены посторонние агенты. В четырех вакцинах (шести образцах) контаминантов обнаружено не было. Результаты исследования вакцин приведены в таблице 1.

Таблица 1

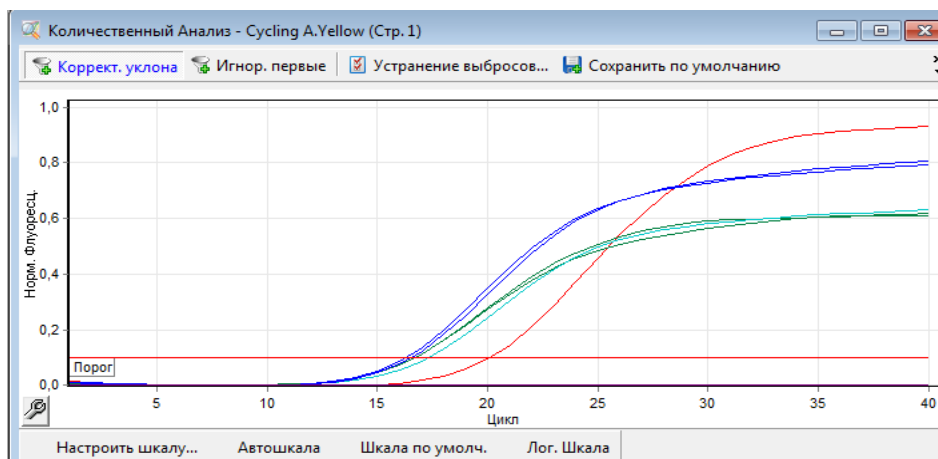
**Результаты исследования вакцин для профилактики болезней КРС и МРС на наличие контаминантов**

№ п/п	Выявляемый контаминант	Методика	Количество контаминированных вакцин
1	Микоплазмы	ГОСТ 56140-2014	3

2	Пестивирусы А,В,С,D,Н	Методика ФГБУ «ВГНКИ»	2
3	Вирус герпеса КРС 1 типа	Тест-система «РИНОКОР» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии)	-
4	Ротавирус группы А	Набор ООО «Вет фактор»	-
5	Вирус оспы овец и коз	Набор ООО «Фрактал Био»	-
6	Вирус Блютанга	Набор ООО «Вет фактор»	-
7	Коронавирус КРС	Набор ООО «Вет фактор»	-
8	Вирус парагриппа 3	Набор ООО «Вет фактор»	-
9	<i>Anaplasma phagocytophilum, Ehrlichia muris, Ehrlichia chaffeensis</i>	Набор АО «Вектор-Бест»	-
10	Вирус Шмалленберга	Тест-система «SBV» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии)	-
11	Вирус респираторной синцитиальной инфекции	Методика ФГБУ «ВГНКИ»	-
12	Аденовирус	Методика ФГБУ «ВГНКИ»	-
13	Вирус герпеса КРС 4 типа	Методика ФГБУ «ВГНКИ»	-
14	Вирус герпеса КРС 6 типа	Методика ФГБУ «ВГНКИ»	-
15	Кобувирус КРС	Методика ФГБУ «ВГНКИ»	-

При исследовании вакцин на наличие контаминации микоплазмами в трех вакцинах (четыре образцах) была обнаружена ДНК *Mycoplasma spp.*, для остальных образцов получен отрицательный результат. Было проведено секвенирование выявленных фрагментов ДНК *Mycoplasma spp.* и показана 100% гомология анализируемых последовательностей образцов с последовательностью *Mycoplasma arginini*.

В результате исследования образцов вакцин на наличие контаминации пестивирусами с помощью методики ФГБУ «ВГНКИ» РНК пестивирусов была обнаружена в двух вакцинах (трех образцах) (рисунок 1). При этом, РНК вирусов рода *Pestivirus* была выявлена в образцах, контаминированных микоплазмами.



**Рис. 1** Графики накопления флуоресцентного сигнала амплификации РНК вирусов рода *Pestivirus* групп А,В,С,Д,Н (методика ФГБУ «ВГНКИ»), где Красная кривая – положительный контроль ПЦР, Синие, голубые и зеленые кривые – образцы вакцинных препаратов в двух повторах.

При подтверждении положительных результатов с помощью набора «ВД» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии), выявляющего вирус диареи 1 и 2 типа (по современной классификации - пестивирусов групп А и В) положительный результат был получен только для одного образца. Остальные два положительных результата были подтверждены с помощью набора LSI VetMAX™ BVDV 4ALL Detection Kit (Thermo Fisher Scientific), позволяющего детектировать РНК пестивирусов групп А, В, D и Н, что говорит о наличии в этих двух образцах пестивирусов групп D или Н (к которым относят вирус пограничной болезни и вирус диареи 3 типа – NoBi-like Pestivirus).

При исследовании вакцин для КРС и МРС на наличие контаминации аденовирусами, вирусами герпеса КРС 1, 4 и 6 типов, вирусом оспы овец и коз, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia chaffeensis*, ротавирусами группы А, коронавирусом КРС, вирусом Блютанга, вирусом парагриппа 3 КРС, вирусом респираторной синцитиальной инфекции, вирусом Шмалленберга, кобувирусом КРС все образцы показали отрицательный результат. Прохождение ВКО во всех образцах вакцин говорит о хорошем качестве выделения НК и отсутствии ингибирования ПЦР.

В литературе [7] показано, что источником контаминации *M. arginini* обычно является фетальная сыворотка крови КРС, которую широко используют в качестве питательной добавки при выращивании культур клеток. Контаминация иммунобиологических препаратов пестивирусами также является большой проблемой и широко освещена в литературе [1, 3, 5, 6].

Наши результаты в целом подтверждают литературные данные, в соответствии с которыми наиболее частыми контаминантами иммунобиологических препаратов являются микоплазмы и пестивирусы [1-7].

С учетом развития молекулярно-биологических технологий и появления информации о новых вирусах, выявляемых как у человека, так и у животных, представляется актуальным совершенствование методов контроля иммунобиологических лекарственных средств для ветеринарного применения с использованием современных молекулярно-биологических методов.

### Библиографический список

1. Asín, J. An outbreak of abortions, stillbirths and malformations in a Spanish sheep flock associated with a bovine viral diarrhoea virus 2-contaminated orf vaccine / M. Hilbe, R. de Miguel // *Transbound Emerg Dis.* – 2021 Mar – 68(2) – p. 233-239.
2. Chernov, V.M. Mycoplasma Contamination of Cell Cultures: Vesicular Traffic in Bacteria and Control over Infectious Agents / Chernov V.M., O.A. Chernova, J.T. Sanchez-Vega // *Acta Naturae* – 2014 Jul – 6(3) – p. 41-51.
3. Oliveira, T.F.P. Constant testing for Pestivirus in cell lines reveals different routes of contamination / Oliveira T.F.P., A. F. Júnior A, A.M. Oliveira // *An Acad Bras Cienc* – 2023 May – 1. – 95(1).
4. Uphoff C.C. Detection of mycoplasma contaminations /Uphoff C.C., H.G. Drexler // *Methods Mol Biol.* – 2013 – v. 946 – p.1-13.
5. Урываев, Л.В. Анализ контаминации клеточных культур пестивирусом BVDV и микоплазмами / Урываев Л. В., К. С. Ионова [и др.] // *Вопросы вирусологии* – 2012. – №5 – С. 15-21.
6. Черных, О.Ю. Проблема контаминации противовирусных вакцин в мире и России / Черных О. Ю., А. В. Мищенко [и др.] // *Ветеринария Кубани.* – 2019. – № 3. – С. 3-6.
7. Шалунова, Н.В. Микоплазмы - контаминанты клеточных культур / Шалунова Н. В., Р.А. Волкова [и др.] // *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* – 2016. – № 3 (9) – С. 151-160.

УДК 597.8:591.111.1

### DIAGNOSTICS OF HEMOPARASITES OF AMPHIBIANS

*Elchev Boris Igorevich, laboratory assistant of The Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy (RSAU – MTAА), Department of Veterinary Medicine, Moscow, [boris.elchev@mail.ru](mailto:boris.elchev@mail.ru)*

**Abstract.** *This article presents the results of complex clinical, laboratory examination of a series of clinical cases of haemoparasites spread in the experimental and control group of amphibians of the pond frog species *Pelophylax lessonae*, caught on 7.05.2022. On the basis of the obtained results, the dependence of haemoparasites spread on conditions and period of keeping was revealed. The judgment that the longer the group of individuals is in artificial keeping conditions, the higher it has indicators on extensiveness, an average intensity of an invasion and an index of abundance of parasites.*

**Keywords:** *haemogregarins, haemoparasites, amphibians, *Hepatozoon magna*, *Pelophylax lessonae**

In the trend of terrariumistics, it is common to trap many species of reptiles and amphibians from the wild and then move them to man-made environments in order to breed, sell or add to the terrarium keeper's personal collection. Often the owner is not