

УДК 619

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2020-338-5-28-34>Тип статьи: Оригинальное исследование  
Type of article: Original research

Преображенская А.С.<sup>1</sup>,  
Девришова З.С.<sup>1</sup>,  
Лобова Т.П.<sup>1</sup>,  
Михайлова В.В.<sup>1</sup>,  
Варенцова А.А.<sup>1</sup>,  
Аmineва Э.М.<sup>2</sup>,  
Гилев В.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ ЦНМВЛ МИЛ111622, Россия, г. Москва, ул. Оранжевой,  
д. 23E-mail: a.pcrvet@gmail.com, zul3646@yandex.ru,  
t.lobova@mail.ru, vera.mihaylova.74@mail.ru,  
staffilokokk@yandex.ru<sup>2</sup> ООО «Квадрос-Био»127287, Россия, г. Москва, Петровско-Разу-  
мовский пр., д. 29, стр. 4E-mail: elmira@qvadrosbio.ru,  
gva@qvadrosbio.ru

**Ключевые слова:** вирусная диарея  
крупного рогатого скота (ВД КРС),  
полимеразная цепная реакция (ПЦР),  
BVDV-1, BVDV-2, ОТ-ПЦР тест-система.

**Для цитирования:** Преображенская А.С.,  
Девришова З.С., Лобова Т.П.,  
Михайлова В.В., Варенцова А.А.,  
Аmineва Э.М., Гилев В.А. Лабораторные  
испытания ОТ-ПЦР тест-системы Vet-  
MAX BVDV Screening для обнаружения  
генома вируса вирусной диареи крупного  
рогатого скота фирмы ThermoFisher.  
*Аграрная наука.* 2020; 338 (5): 28–34.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2020-338-5-28-34>**Конфликт интересов отсутствует**

Anastasia S. Preobrazhenskaya<sup>1</sup>,  
Zelikha S. Devrishova<sup>1</sup>,  
Tatyana P. Lobova<sup>1</sup>,  
Vera V. Mikhailova<sup>1</sup>,  
Alisa A. Varentsova<sup>1</sup>,  
Elmira M. Amineva<sup>2</sup>,  
Vladimir A. Gilev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Institution "Central  
Scientific and Methodological Veterinary  
Laboratory" (FSBI CNMVL)

23, Orangereynaya st., Moscow, Russia, 111622

E-mail: a.pcrvet@gmail.com, zul3646@yandex.ru,  
t.lobova@mail.ru, vera.mihaylova.74@mail.ru,  
staffilokokk@yandex.ru<sup>2</sup> Quadros-Bio LLC29 b. 4, Petrovsko-Razumovskiy pr., Moscow,  
Russia, 127287E-mail: elmira@qvadrosbio.ru,  
gva@qvadrosbio.ru

**Key words:** bovine viral diarrhea (BVD),  
polymerase chain reaction (PCR), BVDV-1,  
BVDV-2, RT-PCR test system.

**For citation:** Preobrazhenskaya A.S.,  
Devrishova Z.S., Lobova T.P., Mikhailova V.V.,  
Varentsova A.A., Amineva E.M., Gilev V.A.  
Laboratory tests of the VetMAX BVDV  
Screening RT-PCR test system for detecting  
the genome of the bovine viral diarrhea virus  
by ThermoFisher. *Agrarian Science.* 2020;  
338 (5): 28–34. (In Russ.)

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2020-338-5-28-34>**There is no conflict of interests**

## Лабораторные испытания ОТ-ПЦР тест-системы VetMAX BVDV Screening для обнаружения генома вируса вирусной диареи крупного рогатого скота фирмы ThermoFisher

### РЕЗЮМЕ

**Актуальность.** В настоящее время ВД КРС распространена практически во всех странах мира с интенсивным ведением животноводства. Особая актуальность проблемы заключается в большом экономическом ущербе, который складывается из снижения удоя во время болезни, гибели молодняка от серозной пневмонии, недополучения привесов живой массы у молодняка, потери продуктивности и воспроизводства животных и, как следствие, абортос и мертворождений, рождения нежизнеспособных телят, а также проведения профилактических, карантинных и ликвидационных мероприятий. Важным звеном в недопущении распространения вирусной диареи крупного рогатого скота остается оперативное проведение лабораторных исследований. Одним из самых технологичных методов диагностики является полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.

**Методика.** Оценку диагностической значимости тест-системы ОТ-ПЦР VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher) проводили по показателям чувствительности, специфичности и прецизионности в условиях повторяемости и воспроизводимости. Для определения повторяемости проводили исследование 5-ти образцов культуры клеток ПТ-80, зараженной эталонным штаммом «Орегон 24» и 7 образцов культуры клеток ПТ-80, зараженной изолятом «Ресса», в десятикратных разведениях от  $10^{-1}$  до  $10^{-7}$ , одним оператором в трех параллельных исследованиях на одном оборудовании. Для определения воспроизводимости и чувствительности — тех же образцов тремя операторами в разные дни на одном оборудовании. Для определения специфичности проводили исследования 3 образцов, не содержащих вирус вирусной диареи — аденовирус КРС 1 типа, штамм Bovina — 10, вирус ринотрахеита КРС, штамм «Оренбург» и вирус парагриппа, 3 штамм ЗКСМ.

**Результаты.** После математической обработки результатов постановки ПЦР для оценки воспроизводимости получены следующие результаты: коэффициент вариации (CV) для тест-системы VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher) составлял 1,0–4,0%; коэффициент вариации (CV) при оценке повторяемости — 1–3%. Специфичность тест-систем VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher) составляла 100%. Тест-система VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher) чувствительна в отношении обнаружения генома вируса вирусной диареи КРС. Так, при постановке ПЦР проб изолята «Ресса» в разведении  $10^{-7}$  значения Ct определились на 38,18–39,24 циклах, эталонного вируса ВД «Орегон 24» в разведении  $10^{-5}$  — на 37,85–39,45 циклах амплификации.

## Laboratory tests of the VetMAX BVDV Screening RT-PCR test system for detecting the genome of the bovine viral diarrhea virus by ThermoFisher

### ABSTRACT

**Relevance.** Currently, BVD is widespread in almost all countries of the world with intensive livestock farming. The special relevance of the problem lies in the large economic damage that consists of a decrease in milk yield during the disease, the death of young animals from serous pneumonia, the loss of live weight gain in young animals, the loss of productivity and reproduction of animals and, as a result, abortions and stillbirths, the birth of non-viable calves, as well as preventive, quarantine and liquidation measures. An important link in preventing the spread of viral diarrhea in cattle remains the rapid conduct of laboratory research. One of the most technologically advanced diagnostic methods is real-time polymerase chain reaction.

**Methods.** The diagnostic significance of the VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher) RT-PCR test system was assessed by sensitivity, specificity, and precision in conditions of repeatability and reproducibility. To determine repeatability, 5 samples of PT-80 cell culture infected with the reference strain "Oregon 24" and 7 samples of PT-80 cell culture infected with Ressa isolate were studied in ten-fold dilutions from  $10^{-1}$  to  $10^{-7}$ , by one operator in three parallel studies on the same equipment. To determine reproducibility and sensitivity, 5 samples of PT-80 cell culture infected with the reference strain "Oregon 24" and 7 samples of PT-80 cell culture infected with «Ressa» isolate were studied in ten-fold dilutions from  $10^{-1}$  to  $10^{-7}$ , by three operators on different days on the same equipment.

To determine the specificity, studies were conducted on 3 samples that did not contain the virus of viral diarrhea — bovine adenovirus type 1 strain Bovina — 10, rhinotracheitis virus of cattle strain "Orenburg" and parainfluenza virus 3 strain ZKSM.

**Results.** After mathematical processing of the results of PCR formulation for the assessment of reproducibility, the following results were obtained: the coefficient of variation (CV) for the VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher) test system was from 1.0–4.0 %; the Coefficient of variation (CV) for the assessment of repeatability was 1–3 %. The specificity of the test systems VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher) was 100%. The VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher) test system is sensitive to detecting the genome of the bovine viral diarrhea virus. So when setting up PCR samples of the Ressa isolate in the  $10^{-7}$  dilution, the CT values were determined at 38.18–39.24 cycles, and the reference VD virus "Oregon 24" in the  $10^{-5}$  dilution at 37.85–39.45 amplification cycles.

Поступила: 6 мая  
После доработки: 10 мая  
Принята к публикации: 12 мая

Received: 6 may  
Revised: 10 may  
Accepted: 12 may

## Введение

Вирусная диарея крупного рогатого скота (ВД КРС) — инфекционное заболевание, вызывающее широкий диапазон клинических проявлений у различных половозрастных групп животных. Инфекция может носить субклиническую форму или развиться в серьезную болезнь с летальным исходом.

Возбудитель ВД КРС вызывает респираторные и репродуктивные заболевания крупного рогатого скота, патологии желудочно-кишечного тракта. Способность вируса проникать через плаценту на ранних сроках беременности может привести к неудачному оплодотворению или эмбриональным и фетальным инфекциям, в результате чего могут иметь место аборт, мертворождение, тератогенные отклонения или рождение персистентно инфицированных телят. Персистентно инфицированные животные, как правило, являются гораздо более эффективными переносчиками ВД КРС, чем временно или остро инфицированные животные, несмотря на то что продолжительность их жизни значительно меньше и до наступления взрослого возраста высокий процент животных погибает [1].

Геном BVDV представлен одноцепочной, линейной, положительно-полярной нитью РНК длиной около 12,5 т.п.н. [1].

Согласно современной классификации, вирус ВД КРС принадлежит роду *Pestivirus* семейства *Flaviviridae* (1), включающий два генотипа вирусной диареи КРС (BVDV-1 и BVDV-2) и близкородственные вирусы классической чумы свиней и пограничной болезни овечьих [2]. BVDV-1 и BVDV-2 представлены цитопатогенным и нецитопатогенным биотипами и демонстрируют значительное биологическое, а также антигенное разнообразие [3].

Кроме того, существует вид *Pestivirus*, предварительно названный NoBi-like (BVDV3), или атипичный *Pestivirus*, который был идентифицирован в эмбриональной телячьей сыворотке, импортируемой из Бразилии в Европу. Эти вирусы генетически и антигенно связаны с BVDV-1 и 2 и вызывают заболевание, сходное с тем, которое традиционно ассоциируется с инфекци-

ями ВД КРС. NoBi-like — подобные вирусы не могут быть обнаружены обычными методами диагностики ВД КРС. Эти вирусы были выявлены в Бразилии, Юго-Восточной Азии и Европе [4].

Дифференциация генотипов возбудителя ВД КРС друг от друга и от других представителей рода *Pestivirus* возможна посредством моноклональных антител, направленных на основные гликопротеины E2 и ERNS, или посредством генетического анализа нуклеотидной последовательности консервативной области нетранслируемого региона геномной РНК 5'UTR. Кроме того, для типирования вирусов используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [5, 6].

В настоящее время ВД КРС распространена практически во всех странах мира с интенсивным ведением животноводства. Штаммы BVDV-1 преобладают в большей части мира, в то время как BVDV-2 был признан причиной тяжелой острой геморрагической болезни в Северной Америке [7].

Особая актуальность проблемы заключается в большом экономическом ущербе, который складывается из снижения удоя во время болезни (до 50–60%); гибели молодняка от серозной пневмонии (20%); недополучения привесов живой массы у молодняка (50–70%), потери продуктивности и воспроизводства животных и, как следствие, абортов и мертворождений (5–30%), снижения на 5–10% выхода телят на 100 коров, рождения нежизнеспособных телят (около 10%), увеличения на 30% коров с многократными неоплодотворенными осеменениями, а также проведения профилактических, карантинных и ликвидационных мероприятий [8].

Важнейшей задачей любых диагностических исследований является получение достоверных результатов на основе использования надежных, стабильных тест-систем. Одним из самых востребованных методов в диагностике вирусных болезней животных является полимеразная цепная реакция. Применение ПЦР позволяет получить результат в течение нескольких часов, что становится важным при остром течении заболевания. Также одним из значительных преимуществ ПЦР-диагностики является независимость метода от клеточных

Таблица 1.

Результаты определения чувствительности наборов VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher) и «ВД» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора)

Table 1. The results of determining the sensitivity of the sets VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher) and "VD" (FBUN Central Research Institute of Epidemiology Rosпотребнадзор)

№ п/п	Наименование образца	Постановка ПЦР набором VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher)			Постановка ПЦР набором «ВД» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора)		
		1 постановка	2 постановка	3 постановка	1 постановка	2 постановка	3 постановка
		Значения Ct должны быть <45			Значения Ct должны быть <33		
1	Эталонный штамм «Орегон 24» 10 <sup>-1</sup>	25,49	27,00	26,42	18,94*	18,01*	19,23*
2	Эталонный штамм «Орегон 24» 10 <sup>-2</sup>	28,87	29,40	29,61	22,67*	22,10*	22,38*
3	Эталонный штамм «Орегон 24» 10 <sup>-3</sup>	31,74	32,54	32,45	26,19*	26,04*	25,90*
4	Эталонный штамм «Орегон 24» 10 <sup>-4</sup>	36,50	36,15	40,02	NEG	28,30*	27,96*
5	Эталонный штамм «Орегон 24» 10 <sup>-5</sup>	38,97	37,85	39,45	NEG	NEG	NEG
6	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-1</sup>	23,96	23,74	23,94	16,41*	15,76*	16,32*
7	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-2</sup>	26,59	27,44	26,76	20,38*	19,30*	20,43*
8	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-3</sup>	29,77	30,27	30,40	25,49*	23,39*	25,32*
9	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-4</sup>	32,70	33,09	34,55	27,94*	27,90*	26,86*
10	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-5</sup>	35,46	37,42	38,01	NEG	29,46*	NEG
11	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-6</sup>	36,67	37,49	38,39	29,95*	NEG	NEG
12	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-7</sup>	38,18	39,60	39,24	NEG	29,21*	NEG

\* — для корректного сравнения ПЦР тест-систем от ФБУН ЦНИИ ЭР и Thermo Fisher необходимо к отмеченным значениям Ct прибавить 10, так как программа амплификации к набору «ВД» от ФБУН ЦНИИ ЭР содержит дополнительное циклирование, состоящее из 10 циклов.

культур, применяемых для вирусыведения в ветеринарных лабораториях, в связи с чем нередко случаи получения ложноположительного результата, поскольку могут использоваться культуры клеток, контаминированные вирусом ВД КРС [9].

Специалисты ФГБУ ЦНМВЛ на регулярной основе проводят испытания диагностических тест-систем и оборудования, представленных на российском рынке. В рамках выполнения данной работы проведена оценка тест-системы ОТ-ПЦР VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher) для обнаружения генома вируса вирусной диареи КРС по показателям чувствительности, специфичности, воспроизводимости, повторяемости полученных результатов.

### Материалы и методы

Для проведения исследований использовали коммерческие тест-системы: тест-систему ОТ-ПЦР VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher) в реальном времени,

предназначенную для обнаружения генома вируса вирусной диареи КРС (1 и 2 типа) и вируса пограничной болезни (1–6 тип), и тест-систему «ВД» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), предназначенную для выявления РНК вируса вирусной диареи КРС.

Для выделения РНК вируса ВД использовали комплект реагентов для выделения «РИБО — преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

В качестве стандартных (контрольных) положительных образцов использовали культуральный материал, содержащий эталонный вирус вирусной диареи «Орегон 24», выделенный на перевиваемой культуре клеток почки телят ПТ-80, с инфекционной активностью 3,85–4,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, а также вируссодержащую перевиваемую культуру клеток почки телят ПТ-80, содержащую вирус ВД КРС изолят «Ресса», с инфекционной активностью 5,85–6,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Для культивирования возбудителя ВД КРС использовали питательную среду ИГЛА-МЕМ, фетальную сыворотку крови телят

**Таблица 2.** Результаты вычислений стандартного отклонения и коэффициента вариации в условиях воспроизводимости (тест-система VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher))

*Table 2.* Calculation results of standard deviation and coefficient of variation under reproducibility conditions (VetMAX BVDV test system Screening (Thermo Fisher))

№ п/п	Наименование образца	X	Среднее арифметическое значение всех определений, $\bar{x}$	Разница между каждым и средним арифметическим определением, $x - \bar{x}$	Квадрат разницы $(x - \bar{x})^2$	Стандартное отклонение S	Коэффициент вариации Cv, %
1	Эталонный штамм «Орегон 24» 10 <sup>-1</sup>	25,49	26,3	-0,8	0,64	0,755	3
		27,00		0,7	0,49		
		26,42		0,1	0,01		
2	Эталонный штамм «Орегон 24» 10 <sup>-2</sup>	28,87	29,1	-0,2	0,04	0,286	1
		29,40		0,3	0,11		
		28,95		-0,1	0,02		
3	Эталонный штамм «Орегон 24» 10 <sup>-3</sup>	31,74	32,3	-0,5	0,27	0,453	1
		32,54		0,3	0,08		
		32,51		0,2	0,06		
4	Эталонный штамм «Орегон 24» 10 <sup>-4</sup>	36,50	36,1	0,4	0,19	0,480	1
		36,15		0,1	0,01		
		35,55		-0,5	0,27		
5	Эталонный штамм «Орегон 24» 10 <sup>-5</sup>	38,97	37,9	1,0	1,05	0,983	3
		37,85		-0,1	0,01		
		37,01		-0,9	0,87		
6	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-1</sup>	23,96	23,9	0,1	0,01	0,122	1
		23,74		-0,1	0,02		
		23,94		0,1	0,00		
7	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-2</sup>	26,59	26,9	-0,3	0,12	0,450	2
		27,44		0,5	0,26		
		26,76		-0,2	0,03		
8	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-3</sup>	29,77	30,1	-0,4	0,14	0,333	1
		30,27		0,1	0,02		
		30,40		0,3	0,06		
9	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-4</sup>	32,70	33,4	-0,7	0,56	0,975	3
		33,09		-0,4	0,13		
		34,55		1,1	1,22		
10	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-5</sup>	35,46	37,0	-1,5	2,26	1,335	4
		37,42		0,5	0,21		
		38,01		1,0	1,10		
11	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-6</sup>	36,67	37,5	-0,8	0,72	0,860	2
		37,49		0,0	0,00		
		38,39		0,9	0,76		
12	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-7</sup>	38,18	39,0	-0,8	0,68	0,738	2
		39,60		0,6	0,35		
		39,24		0,2	0,05		

Таблица 3.

Результаты вычислений стандартного отклонения и коэффициента вариации в условиях воспроизводимости (тест-система «ВД» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора))

Table 3. Calculation results of standard deviation and coefficient of variation under reproducibility conditions ("VD" test system FBUN Central Research Institute of Epidemiology Rospotrebnadzor)

№ п/п	Наименование образца	X	Среднее арифметическое значение всех определений, $\bar{x}$	Разница между каждым и средним арифметическим определением, $x - \bar{x}$	Квадрат разницы $(x - \bar{x})^2$	Стандартное отклонение S	Коэффициент вариации Cv, %
1	Эталонный штамм «Орегон 24» 10 <sup>-1</sup>	18,94*	18,7	0,2	0,05	0,637	3
		18,01*		-0,7	0,51		
		19,23*		0,5	0,25		
2	Эталонный штамм «Орегон 24» 10 <sup>-2</sup>	22,67*	22,4	0,3	0,08	0,285	1
		22,10*		-0,3	0,08		
		22,38*		0,0	0,00		
3	Эталонный штамм «Орегон 24» 10 <sup>-3</sup>	26,19*	26,0	0,1	0,02	0,145	1
		26,04		0,0	0,00		
		25,90		-0,1	0,02		
4	Эталонный штамм «Орегон 24» 10 <sup>-4</sup>	NEG	28,1	-	-	_**	_**
		28,30		0,2	0,03		
		27,96		-0,2	0,03		
5	Эталонный штамм «Орегон 24» 10 <sup>-5</sup>	NEG	_**	-	-	_**	_**
		NEG		-	-		
		NEG		-	-		
6	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-1</sup>	16,41	16,2	0,2	0,06	0,352	2
		15,76		-0,4	0,16		
		16,32		0,2	0,02		
7	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-2</sup>	20,38	20,0	0,3	0,12	0,638	3
		19,30		-0,7	0,54		
		20,43		0,4	0,15		
8	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-3</sup>	25,49	24,7	0,8	0,57	1,166	5
		23,39		-1,3	1,80		
		25,32		0,6	0,34		
9	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-4</sup>	27,94	27,6	0,4	0,14	0,612	2
		27,90		0,3	0,11		
		26,86		-0,7	0,50		
10	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-5</sup>	NEG	_**	-	-	_**	_**
		29,46		-	-		
		NEG		-	-		
11	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-6</sup>	29,95	_**	-	-	_**	_**
		NEG		-	-		
		NEG		-	-		
12	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-7</sup>	NEG	-	-	-	-	-
		29,21*		-	-		
		NEG		-	-		

\* — для корректного сравнения ПЦР тест-систем от ФБУН ЦНИИ ЭР и Thermo Fisher необходимо к отмеченным значениям Ct прибавить 10, так как программа амплификации к набору «ВД» от ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора содержит дополнительное циклирование, состоящее из 10 циклов.

\*\* — не рассчитывается, так как проба прошла как отрицательная.

Ну Clon. Для культивирования вирусов на перевиваемой культуре клеток ПТ-80 использовали метод серийного пассирования, с адсорбцией вирусов на клеточный монослой в течение 60 минут при температуре 37 °С в термостате при 5% CO<sub>2</sub> и заменой ростовой питательной среды на поддерживающую с 2%-ной фетальной сывороткой, и последующим культивированием в течение 2–4 дней. В конце периода инкубации инфицированную культуру замораживали и оттаивали, чтобы разрушить структуру клеток и обеспечить полный выход вируса. Заражающая доза составляла 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Накопленные вирусы определяли титрованием в культуре клеток по общепринятой методике. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в lgТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Оценку диагностической значимости тест-системы ОТ-ПЦР VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher) проводили по показателям чувствительности, специфичности и прецизионности в условиях повторяемости и воспроизводимости. Сравнительные испытания тест-системы «ВД» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) проводили по критериям чувствительности, специфичности и воспроизводимости.

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости и воспроизводимости вычисляли стандартное отклонение SD (или S) и коэффициент вариации CV по следующим формулам:

$$S = \sqrt{\frac{\sum n_{i-1}(x - \bar{x})^2}{n-1}}; \quad CV = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100\%,$$

Таблица 4.

Результаты вычислений стандартного отклонения и коэффициента вариации в условиях повторяемости (тест-система VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher))

Table 4. Calculation results of standard deviation and coefficient of variation under repeatability conditions (VetMAX BVDV Screening test system (Thermo Fisher))

№ п/п	Наименование образца	X	Среднее арифметическое значение всех определений, $\bar{x}$	Разница между каждым и средним арифметическим определением, $x - \bar{x}$	Квадрат разницы $(x - \bar{x})^2$	Стандартное отклонение S	Коэффициент вариации Cv, %
1	Эталонный штамм «Орегон 24» 10 <sup>-1</sup>	25,09	25,8	-0,8	0,57	0,682	3%
		26,02		0,2	0,03		
		26,42		0,6	0,33		
2	Эталонный штамм «Орегон 24» 10 <sup>-2</sup>	29,42	29,2	0,2	0,05	0,314	1%
		28,83		-0,4	0,13		
		29,31		0,1	0,02		
3	Эталонный штамм «Орегон 24» 10 <sup>-3</sup>	32,54	32,1	0,4	0,17	0,367	1%
		31,84		-0,3	0,08		
		32,00		-0,1	0,02		
4	Эталонный штамм «Орегон 24» 10 <sup>-4</sup>	36,98	36,7	0,3	0,11	0,370	1%
		36,25		-0,4	0,16		
		36,72		0,1	0,00		
5	Эталонный штамм «Орегон 24» 10 <sup>-5</sup>	38,98	38,9	0,1	0,01	0,393	1%
		38,46		-0,4	0,18		
		39,23		0,3	0,12		
6	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-1</sup>	23,86	23,8	0,1	0,00	0,161	1%
		23,63		-0,2	0,03		
		23,94		0,1	0,02		
7	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-2</sup>	26,78	26,9	-0,1	0,01	0,297	1%
		26,67		-0,2	0,05		
		27,23		0,3	0,11		
8	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-3</sup>	29,68	29,8	-0,1	0,02	0,168	1%
		29,75		-0,1	0,00		
		30,00		0,2	0,04		
9	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-4</sup>	32,93	33,4	-0,5	0,26	0,579	2%
		33,32		-0,1	0,01		
		34,07		0,6	0,40		
10	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-5</sup>	35,58	36,6	-1,0	1,05	1,218	3%
		36,28		-0,3	0,10		
		37,95		1,3	1,81		
11	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-6</sup>	36,99	38,1	-1,1	1,18	0,950	2%
		38,49		0,4	0,17		
		38,75		0,7	0,45		
12	Изолят вирусной диареи Ресса 10 <sup>-7</sup>	38,15	39,1	-0,9	0,85	0,819	2%
		39,34		0,3	0,07		
		39,72		0,6	0,42		

где  $\bar{x}$  — среднее арифметическое значение всех определений; S — стандартное отклонение; n — общее число измерений.

Для определения повторяемости проводили исследование 5 образцов культуры клеток ПТ-80, зараженной эталонным штаммом «Орегон 24» и 7 образцов культуры клеток ПТ-80, зараженной изолятом «Ресса», в десятикратных разведениях от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-7</sup>, одним оператором в трех параллельных исследованиях на одном оборудовании.

Для определения воспроизводимости и чувствительности проводили исследование 5 образцов культуры клеток ПТ-80, зараженной эталонным штаммом «Орегон 24» и 7 образцов культуры клеток ПТ-80, зараженной изолятом «Ресса», в десятикратных разведениях от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-7</sup>, тремя операторами в разные дни на одном оборудовании.

Для определения специфичности проводили исследование 3 образцов, не содержащих вирус вирусной

диареи — аденовирус КРС 1 типа штамм Bovina — 10, вирус ринотрахеита КРС штамм «Оренбург» и вирус парагриппа 3 штамм ЗКСМ.

Получение и обработку результатов проводили с помощью прибора для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q и программного обеспечения Software v2.3.1.48.

#### Результаты исследований

Результаты определения чувствительности наборов VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher) и «ВД» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, обе ПЦР тест-системы оказались чувствительными в отношении обнаружения генома вируса вирусной диареи КРС. Так, при постановке ПЦР проб изолята «Ресса» набором VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher) в разведении 10<sup>-7</sup> значения Ct определились на 38,18–39,24 цикла, эталонного

вируса ВД «Орегон 24» в разведении  $10^{-5}$  — на 37,85–39,45 циклах амплификации. Предел чувствительности тест-системы «ВД» от ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора оказался ниже на три порядка.

В результате исследований установлено, что чувствительность тест-системы VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher) составила 100%.

Сопоставляли результаты чувствительности метода титрования вирусов в перевиваемой культуре клеток ПТ-80 — изолята «Ресса» и эталонного вируса ВД «Орегон 24» — и результаты чувствительности использованных ПЦР тест-систем. Данные, полученные ПЦР методом, коррелировали с данными метода титрования вирусов на культуре клеток ПТ-80. Так, инфекционная активность изолята «Ресса» составляла  $5,85-6,0 \text{ lgTCID}_{50}/\text{см}^3$ , инфекционная активность вируса «Орегон 24» —  $3,85-4,5 \text{ lgTCID}_{50}/\text{см}^3$ .

При исследовании критериев специфичности при постановке проб, не содержащих вируса вирусной диареи, отмечен отрицательный результат. Специфичность тест-систем VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher) и «ВД» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) составляла 100%.

Следующим этапом испытаний тест-систем была оценка воспроизводимости данных методик. В таблицах 2, 3 представлены данные математической обработки результатов стандартного отклонения и коэффициента вариации для оценки воспроизводимости двух ПЦР тест-систем.

Как видно из таблиц 2, 3, обе тест-системы отвечали критерию воспроизводимости, где коэффициент вариации (тест-система VetMAX BVDV Screening) для эталонного штамма «Орегон» составлял от 1,0–3,0%, для изолята вирусной диареи Ресса — от 1,0–4,0%. По данным валидационного отчета компании Thermo Fisher Scientific на тест-систему VetMAX BVDV Screening CV должен быть меньше 10%.

Коэффициент вариации (тест-система «ВД» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) для эталонного штамма «Орегон» составлял от 1,0–3,0%, для изолята вирусной диареи Ресса — от 1,0–5,0%.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Khodakaram-Tafti A., Farjanikish G.H., Persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in cattle herds. Iran. J Vet Res. Summer. 2017;18(3):154–163.
2. Simmonds P., Becher P., Collett M.S. et al. Family Flaviviridae. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. (Eds.). Virus Taxonomy: Ninth report of the International Committee on taxonomy of viruses. Elsevier Science. 2011;1003–1020.
3. Ridpath J.F. Bovine viral diarrhoea virus. In: Mahy B.W.J., Regenmortel M.H.V. (Eds.). Encyclopedia of virology. Oxford (UK): Elsevier, 2008;374–380.
4. Schirrmeyer H., Strebelt G., Depner K., Hoffmann B., Beer M. Genetic and antigenic characterization of an atypical Pestivirus isolate, a putative member of a novel Pestivirus species. J. Gen. Virol. 2004; 85:3647–3652.
5. Котенева С.В., Глотова Т.И., Глов А.Г., Южаков А.Г. Генетический полиморфизм возбудителя вирусной диареи, выявленного у телят при вспышках респираторных болезней// Ветеринария. 2018;(4):25–31. [Koteneva S.V., Glotova T.I., Glotov

## ОБ АВТОРАХ:

**Преображенская Анастасия Сергеевна**, научный сотрудник отдела молекулярных исследований, <https://orcid.org/0000-0003-0864-3230>

**Девришова Зелиха Султановна**, зав. отделом молекулярных исследований

**Лобова Татьяна Петровна**, старший научный сотрудник отдела вирусных болезней животных, кандидат биологических наук

**Михайлова Вера Владимировна**, зав. отделом вирусных болезней животных

В таблице 4 представлены данные математической обработки результатов стандартного отклонения и коэффициента вариации для оценки повторяемости ПЦР тест-системы VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher).

Из результатов, приведенных в таблице 4, для испытуемой тест-системы VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher) повторяемость абсолютна. Коэффициент вариации (CV) составил 1–3%. По данным валидационного отчета компании Thermo Fisher Scientific на тест-систему VetMAX BVDV Screening коэффициент вариации в условиях повторяемости должен быть меньше 5% (CV <5%).

При всех постановках проб тест-системами от ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора и Thermo Fisher все контроли (В-, К-, ПКО, ВКО) прошли корректно и в пределах допустимых значений, согласно инструкциям производителей.

## Выводы

Лабораторные испытания тест-системы ОТ-ПЦР VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher) в соответствии с прилагаемыми инструкциями производителя показали, что данная методика отвечает критериям чувствительности, специфичности, повторяемости, воспроизводимости в условиях постановки одним и несколькими операторами, на одном оборудовании в разные дни, в одной лаборатории.

Тест-система «ВД» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) также отвечает критериям чувствительности, специфичности, воспроизводимости, но в данном эксперименте показала меньшую чувствительность при исследовании последних трех испытуемых разведений вирусосодержащего материала.

## Заключение

Таким образом, тест-система ОТ-ПЦР VetMAX BVDV Screening (Thermo Fisher) показала хорошие аналитические характеристики и может быть рекомендована для использования в рутинной лабораторной практике для выявления генома возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота.

A.G. Yuzhakov A.G. Genetic polymorphism of the pathogen of viral diarrhoea detected in calves during outbreaks of respiratory diseases. Veterinary medicine. 2018;(4):25–31. (In Russ.)

6. OIE Terrestrial Manual 2018; Chapter 3.4.7. Bovine viral diarrhoea; p.1075–1096.

7. Pellerin C, Vandenhurk J, Lecomte J, Tijssen P. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. Virology. 1994. P.260–268.

8. Пчельников А.В. Этиология, возрастная и сезонная динамика вирусных респираторных болезней телят в племенных хозяйствах. 2017. [Pchelnykov A.V. Etiology, age and seasonal dynamics of viral respiratory diseases of calves in breeding farms. 2017. (In Russ.)]

9. Шулыгин М.И. Выявление возбудителя вирусной диареи КРС с помощью полимеразной цепной реакции и генотипирование изолятов, циркулирующих на территории Российской Федерации. 2004. [Shulygin M. I. Identification of the causative agent of viral diarrhoea of cattle using polymerase chain reaction and genotyping of isolates circulating in the territory of the Russian Federation. 2004. (In Russ.)]

**Варенцова Алиса Алексеевна**, начальник отдела координации научно-исследовательских работ, кандидат биологических наук

**Аминова Эльмира Муллагалиевна**, руководитель направления «Ветеринария», <https://orcid.org/0000-0001-6674-9864>

**Гилев Владимир Алексеевич**, ведущий специалист направления «Ветеринария», <https://orcid.org/0000-0003-0474-0164>

**ABOUT THE AUTHORS:**

**Anastasia S. Preobrazhenskaya**, Researcher of the Department of Molecular Studies,

<https://orcid.org/0000-0003-0864-3230>

**Zelikhha S. Devrishova**, Head of the Department of Molecular Studies

**Tatyana P. Lobova**, Senior Researcher of the Department of Virology, Cand. Sci. (Biologiy)

**Vera V. Mikhailova**, Head of the Department of Virology

**Alisa A. Varentsova**, Head of the Department of coordination of research works, Cand. Sci. (Biologiy)

**Elmira M. Amineva**, Head of Veterinary department,

<https://orcid.org/0000-0001-6674-9864>

**Vladimir A. Gilev**, Senior specialist of Veterinary department,

<https://orcid.org/0000-0003-0474-0164>

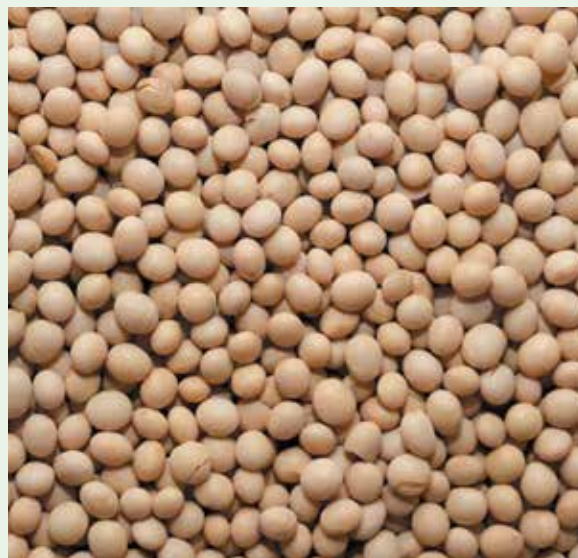
**НОВОСТИ • НОВОСТИ • НОВОСТИ • НОВОСТИ • НОВОСТИ •****В Удмуртии будет разработан селекционно-генетический индекс для племенного стада КРС**

Удмуртская Республика одной из первых в России приступила к разработке селекционно-генетического индекса для молочного стада КРС. В результате серьезной и кропотливой деятельности ученых в РФ будет создана первая в молочном животноводстве уникальная региональная база генотипов и фенотипов коров.

Для расчета племенной ценности будут оцениваться не только индивидуальное развитие с учетом кормления и содержания животных, экстерьер и конституция, но и происхождение и качество потомства, продуктивность, состав молока, состояние здоровья, генетические болезни и даже способность давать гипоаллергенное молоко А2. Данные будут внесены в геномный паспорт каждой коровы, содержащейся в племенных хозяйствах республики. Для получения максимально достоверной оценки хозяйственно-полезных признаков будет применяться метод BLUP – лучший линейный несмещенный прогноз.

Оптимальный селекционно-генетический индекс для племенного стада КРС республики будет разработан поэтапно в течение 5 лет. В первый год ученые планируют разработать геномный индекс, включающий данные по продуктивности, – это удой, содержание жира и белка в молоке, продуктивное долголетие коров. Во второй год – индекс, дополнительно включающий данные по фертильности (уровень отелов). Затем исследователям предстоит разработка отдельных индексов, включающих данные по сложности отела, здоровью КРС и по линейным признакам.

В настоящее время Удмуртия планирует продвигать свою генетику не только в России, но и за ее пределами, поставляя высокоценных племенных животных на экспорт.

**Упрощенный ввоз в Россию ГМО-сои отменен не будет**

Минсельхоз не поддержал предложение губернаторов трех регионов Черноземья отменить ранее принятое постановление Правительства России, упрощающее ввоз в страну генно-модифицированных сои и шрота.

Речь идет об освобождении от госрегистрации ввозимого в Россию соевого сырья с ГМО-линиями для изготовления животных кормов. При этом послабление коснулось продуктов, которые подтвердили свою безопасность для животных и человека.

Позиция министерства основывается на том, что российскому животноводству необходимы относительно недорогие соевые бобы и шрот, а отмена поставок создаст предпосылки для дефицита кормовой базы и роста цен на животноводческую продукцию.

При этом в Минсельхозе не исключают возможности пересмотра условий ввоза сои из других стран, когда российский уровень ее производства достигнет необходимых значений. В последнее время производство российской сои неуклонно наращивается. Если в 2019 году ее урожай составил 4,36 млн т, то к 2022 году этот показатель планируется довести до 5,6 млн т.

С другой стороны, по мнению ряда российских производителей сои и переработчиков кормов, не исключена ситуация, когда облегченный доступ на рынок импортной ГМО-продукции сможет затормозить отечественное производство.