

Красочко П.П., доктор биологических наук, доцент¹
Красочко В.П., кандидат ветеринарных наук¹
Зубовская И.В., кандидат ветеринарных наук, доцент²
Черноков А.И., аспирант¹

¹УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

²РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского, г. Минск, Республика Беларусь

ПОДБОР ПРАЙМЕРОВ И ОПТИМИЗАЦИЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *MORAXELLA BOVIS* И *MORAXELLA BOVOCULI*

Резюме

Разработан мультиплексный метод ПЦР в режиме реального времени для одновременной детекции и дифференциации возбудителей инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота – *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi*. Метод основан на использовании оригинальных праймеров и зондов к консервативным генам цитотоксинов *MbxA* и *MbvA*, что обеспечивает его высокую специфичность. Проведенная оптимизация показала чувствительность метода $3,8 \times 10^3$ КОЕ/мл для *M. bovis* и $6,5 \times 10^3$ КОЕ/мл для *M. bovoculi*, что позволяет эффективно выявлять как моно-, так и микст-инфекцию в клиническом материале.

Ключевые слова: инфекционный кератоконъюнктивит, крупный рогатый скот, *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi*, ПЦР, праймеры, диагностика.

Summary

A multiplex real-time PCR method has been developed for the simultaneous detection and differentiation of infectious agents of bovine keratoconjunctivitis - *Moraxella bovis* and *Moraxella bovoculi*. The method is based on the use of original primers and probes to the conserved genes of cytotoxins *MbxA* and *MbvA*, which ensures its high specificity. The optimization showed a sensitivity of $3,8 \times 10^3$ CFU/mL for *M. bovis* and $6,5 \times 10^3$ CFU/mL for *M. bovoculi*, which allows effective detection of both mono- and mixed-infection in clinical material.

Keywords: infectious keratoconjunctivitis, cattle, *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi*, PCR, primers, diagnostics.

Поступила в редакцию 01.12.2025 г.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционный кератоконъюнктивит (ИКК) крупного рогатого скота (КРС) является широко распространенной и экономически значимой болезнью, наносящей существенный ущерб животноводству во многих странах мира, включая Республику Беларусь и Российскую Федерацию [7]. Заболевание характеризуется острым контактиозным воспалением конъюнктивы и роговицы, приводящим к слезотечению, светобоязни, серозно-гнойным истечениям, помутнению, изъязвлению роговицы и, в конечном итоге, к частичной или полной потере зрения [5, 7]. Масштаб экономических потерь обуславливает необходимость разработки более эффективных мер контроля данной патологии. Экономические потери складываются из снижения молочной и мясной продуктивности, затрат на лечение,

а также преждевременной выбраковки животных [2, 8].

Этиологическая структура ИКК сложна и может включать различные инфекционные и инвазионные агенты. Однако, как показали многочисленные исследования, ведущая роль в возникновении типичных вспышек болезни принадлежит грамотрицательным бактериям рода *Moraxella*, в частности видам *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi* [5, 7, 8]. При этом часто отмечаются случаи смешанной инфекции, что дополнительно осложняет диагностику. *Moraxella bovis* долгое время считалась основным возбудителем ИКК, однако в 2007 г. был описан новый вид – *Moraxella bovoculi*, который также является высокопатогенным для КРС [8]. По данным исследований в хозяйствах Республики Беларусь в 90 % случаев ИКК выделя-

ются возбудители рода *Moraxella*, причем *Moraxella bovoculi* обнаруживается в 65 % случаев, а в 25 % – в ассоциации с *Moraxella bovis* [2]. Аналогичные данные получены и в Российской Федерации, где в 76 % обследованных хозяйств ИКК был вызван *M. bovoculi*, а в остальных – *M. bovis* [7].

Традиционная бактериологическая диагностика моракселлеза затруднена в связи с медленным ростом возбудителей на питательных средах, их низкой биохимической активностью, а также частой контаминацией проб сопутствующей микрофлорой [4, 6]. Это приводит к значительной задержке получения результата и снижает эффективность лечебно-профилактических мероприятий. Стандартные биохимические тесты, например на анализаторе VITEK 2 COMPACT, часто не позволяют провести видовую дифференциацию *M. bovis* и *M. bovoculi* [4]. В связи с этим наиболее точными методами идентификации признаны молекулярно-генетические методы (ПЦР) и масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) [4, 7]. В существующих в Республике Беларусь системах эпизоотологического учета ИКК часто не регистрируется ввиду отсутствия повсеместной лабораторной диагностики, что не отражает истинной распространенности патологии [4].

Как подчеркивают многие исследователи, бактерии рода *Moraxella* играют ведущую роль в этиологии инфекционного кератоконъюнктивита КРС, что обуславливает высокую экономическую значимость данной болезни и необходимость совершенствования мер по ее контролю. Ключевым элементом в системе контроля является точная и быстрая лабораторная диагностика, позволяющая идентифицировать патоген до вида. Существующие схемы лечения ИКК, в частности применение лечебного препарата или вакцины, могут продемонстрировать эффективность [1, 3], однако их успешное применение и контроль распространения инфекции в первую очередь зависят от своевременной и точной этиологической диагностики, позволяющей дифференцировать *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi* [4]. Низкие точность и скорость традиционных бактериологических методов, а также отсутствие в Республике Беларусь зарегистрированных средств специфической профилактики [5] создают устойчи-

вую потребность в разработке современных высокочувствительных инструментов молекулярной диагностики.

Таким образом, необходимость в разработке и внедрении высокоспецифичных, быстрых и точных методов диагностики ИКК, а также эффективных средств специфической профилактики является актуальной задачей современной ветеринарной науки и практики. Настоящее исследование посвящено подбору специфических праймеров и оптимизации мультимплексной ПЦР для одновременной детекции и дифференциации *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi*, а также определению аналитической чувствительности метода и оптимизации условий постановки мультимплексной ПЦР. Это позволит усовершенствовать систему диагностики и эпизоотологического мониторинга инфекционного кератоконъюнктивита КРС.

Цель исследования – разработать мультимплексный метод ПЦР для специфического выявления *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась на базе НИИ ПВМиБ УО ВГАВМ. В качестве ДНК-матрицы использовали ДНК из идентифицированных изолятов *M. bovis* и *M. bovoculi*, полученных от КРС с клиническими признаками кератоконъюнктивита. Идентификация изолятов была подтверждена масс-спектрометрией (MALDI-TOF).

Для подбора праймеров использовали нуклеотидные последовательности генов цитотоксина MbxA (для *M. bovis*) и MbvA (для *M. bovoculi*) из базы данных GenBank. Подбор олигонуклеотидов проводили с использованием программного обеспечения Primer3 и SnapGene. Для подбора олигонуклеотидов к *Moraxella bovis* использовали геномы штаммов SAM102599, SAM57954, Epp63, NCTC9426, SAM109237, SAM57947, SFS9a, а для *Moraxella bovoculi* – 2471-2, 4785, SFS9a, 371, 58069, 22581.

Выделение ДНК проводили с использованием набора «АртМагнит Вет». ПЦР в режиме реального времени ставили с использованием премикса «АртМикс ДНК-полимераза» и амплификатора Gentier 96. Оценку специфичности проводили с ДНК гетерологичных микроорганизмов

(вирус ИРТ КРС, хламидии, *E. coli*, *S. aureus* и др.). Чувствительность определяли методом серийных десятикратных разведений ДНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ключевой задачей являлся целенаправленный подбор праймеров, обеспечивающих специфичную детекцию каждого вида. Для этого в качестве мишеней были выбраны гены цитотоксинов MbxA (для *M. bovis*) и MbvA (для *M. bovoculi*) как высококонсервативные в пределах вида и вариабельные между видами. Для каждого гена с помощью биоинформатических методов было сконструировано по три кандидатных набора праймеров и зондов, из которых по результатам сравнительного ана-

лиза был выбран один оптимальный для каждого вида. Критериями для сравнительного анализа и итогового выбора служили:

- длина ампликона – приоритет отдавался наиболее коротким продуктам для сокращения времени амплификации;

- температура плавления – выбирались пары праймеров со схожей температурой плавления в диапазоне 58–62 °C для совместимости в мультиплексном формате;

- содержание GC – оптимальным считался уровень 45–60 % для обеспечения стабильной гибридизации.

Характеристики трех кандидатных наборов олигонуклеотидов представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Последовательности праймеров к гену MbxA у *M. bovis*

Шифр	Последовательность	Температура плавления	GC, %	Длина продукта, п.н.
Mb1-1	gcatttcacttcgcctttgt	60	45	184
Mb1-2	gccttctgtctcggtacac	60	60	
Mb1-3	gcaggaactgaatcacgtga	59	50	
Mb2-1	aacgcattaagagcggaaaa	59	40	159
Mb2-2	acaaggcggaagtgaatgc	60	45	
Mb2-3	ggcaagaaagttgaagctgg	59	50	
Mb3-1	tggtgacgaccgcttgttt	60	53	63
Mb3-2	aatcatcgcttcatctccag	57	48	
Mb3-3	gtcgatcggtgcctttaccacc	59	55	

Таблица 2 – Последовательности праймеров к гену MbvA у *M. bovoculi*

Шифр	Последовательность	Температура плавления	GC, %	Длина продукта, п.н.
Mbo1-1	cttgctgggcaaggtaaaa	60	45	185
Mbo1-2	ctggcggttcacaacttca	59	45	
Mbo1-3	gtagacggcacacatgcaac	60	55	
Mbo2-1	cgtacagtggttaaagggtgata	57	45	105
Mbo2-2	tctcaattcataatcacgatactcaag	55	33	
Mbo2-3	gccaaagatactgcggtaggtaaacg	61	52	
Mbo3-1	tcggtgagttggcaggtatt	60	50	227
Mbo3-2	acttatgcgttcgcgagatt	59	45	
Mbo3-3	agtgaggccggtgtaata	59	50	

По совокупности критериев (минимальная длина ампликона, совместимые температуры плавления и оптимальное содержание GC) для дальнейшей работы и оптимизации мультиплексной ПЦР для *M. bovis* был выбран набор Mb3, а для *M. bovoculi* – набор Mbo2.

Специфичность отобранных олигонуклеотидов была проверена в серии перекрестных ПЦР. Реакции с ДНК *M. bovis* давали положительный сигнал только с набором Mb3, а с ДНК *M. bovoculi* – только с набором Mbo2, что подтвердило отсутствие

перекрестной реактивности и возможность их совместного использования в мультиплексном формате. Для оптимизации температуры отжига ПЦР проводили в диапазоне температур 58–62 °С. Анализ показал, что температура 58 °С является оптимальной для обоих наборов, поскольку при ней регистрировался максимальный относительный уровень флуоресценции (1693 у.е. для *M. bovis* и 1339 у.е. для *M. bovoculi*) при минимальном пороговом цикле (Ct). Данные по оптимизации температуры отжига приведены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3 – Результаты оптимизации температуры отжига для *M. bovis*

Температура отжига, °С	Наличие амплификации (C _t)	Пороговый цикл	Относительный уровень флуоресценции
58	положительно	19,4	1693
59,3	положительно	19,5	1642
60,2	положительно	19,6	1560
61,2	положительно	19,6	1592
62	положительно	19,6	1608

Таблица 4 – Результаты оптимизации температуры отжига для *M. bovoculi*

Температура отжига, °С	Наличие амплификации (C _t)	Пороговый цикл	Относительный уровень флуоресценции
58	положительно	19,6	1339
59,3	положительно	19,7	1285
60,2	положительно	19,8	1235
61,2	положительно	19,8	1215
62	положительно	19,9	1186

Настроенная мультиплексная ПЦР надежно детектировала как моно-, так и микст-инфекцию в одной реакции. Результаты тестирования мультиплексного формата представлены в таблице 5.

Аналитическую чувствительность определяли методом серийных десятикратных разведений ДНК, выделенной из сус-

пензий бактерий с известной концентрацией (подтверждена чашечным методом).

Установленный предел детекции составил $3,8 \times 10^3$ КОЕ/мл для *M. bovis* и $6,5 \times 10^3$ КОЕ/мл для *M. bovoculi*. Подробные результаты определения чувствительности приведены в таблице 6.

Таблица 5 – Результаты выявления генома моракселл в мультиплексной ПЦР

Образец ДНК	Результат выявления генома	
	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovoculi</i>
<i>M. bovis</i>	положительно	отрицательно
<i>M. bovoculi</i>	отрицательно	положительно
<i>M. bovis</i> + <i>M. bovoculi</i>	положительно	положительно

Таблица 6 – Чувствительность ПЦР при выявлении генома моракселл

<i>M. bovis</i>		<i>M. bovoculi</i>	
концентрация, КОЕ/мл	результат ПЦР	концентрация, КОЕ/мл	результат ПЦР
$3,8 \times 10^8$	положительно	$6,5 \times 10^8$	положительно
$3,8 \times 10^7$	положительно	$6,5 \times 10^7$	положительно
$3,8 \times 10^6$	положительно	$6,5 \times 10^6$	положительно
$3,8 \times 10^5$	положительно	$6,5 \times 10^5$	положительно
$3,8 \times 10^4$	положительно	$6,5 \times 10^4$	положительно
$3,8 \times 10^3$	положительно	$6,5 \times 10^3$	положительно
$3,8 \times 10^2$	отрицательно	$6,5 \times 10^2$	отрицательно
$3,8 \times 10^1$	отрицательно	$6,5 \times 10^1$	отрицательно
$3,8 \times 10^0$	отрицательно	$6,5 \times 10^0$	отрицательно

Аналитическую специфичность оценивали, тестируя разработанную систему на панели ДНК гетерологичных микроорганизмов. Отрицательные результаты были получены с ДНК вируса ИРТ КРС, хламидий, а также ряда бактерий (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Bacillus subtilis* и других коагулазо-негативных стафилококков и стрептококков), что доказывает высокую специфичность метода и отсутствие ложноположительных результатов. Полные данные по оценке специфичности представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Оценка специфичности разработанного метода выявления генома моракселл

Наименование возбудителя	Результат ПЦР	Наименование возбудителя	Результат ПЦР
<i>M. bovis</i>	положительно	<i>Staphylococcus aureus</i>	отрицательно
<i>M. bovoculi</i>	положительно	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	отрицательно
ИРТ КРС	отрицательно	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	отрицательно
Хламидии	отрицательно	<i>Staphylococcus cohnii</i>	отрицательно
<i>Escherichia coli</i>	отрицательно	<i>Staphylococcus sciuri</i>	отрицательно
<i>Streptococcus sanguinus</i>	отрицательно	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	отрицательно
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	отрицательно	<i>Bacillus subtilis</i>	отрицательно

В результате сравнительного анализа для каждого вида был выбран один оптимальный набор, наилучшим образом отвечающий всем критериям:

- для *M. bovis* – праймеры Mb3-1 (5'-tggtgacgaccgcttggtt-3'): Tm = 60 °C, GC = 53 % и Mb3-2 (5'-aatcatcgcttcattccag-3'): Tm = 57 °C, GC = 48 %, зонд Mb3-3 (5'-gtcgatcggtgcctttaccacc-3'): Tm = 59 °C, GC = 55 % с флуорофором флуоресцин (FAM). Длина ампликона – 63 п.н.;

- для *M. bovoculi* – праймеры Mbo2-1 (5'-cgtacagtggctaaagtgata-3'): Tm = 57 °C, GC = 45 % и Mbo2-2 (5'-tctcaattcataatcacgatactcaag-3'): Tm = 55 °C,

GC = 33 %, зонд Mbo2-3 (5'-gccaagatactgcggtaggtaaacg-3'): Tm = 61 °C, GC = 52 % с флуорофором гексахлорфлуоресцеин (HEX). Длина ампликона – 105 п.н.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного исследования был успешно разработан и оптимизирован мультиплексный метод ПЦР в режиме реального времени для одновременной детекции и дифференциации *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi*. Ключевым этапом работы стал целенаправленный подбор высокоспецифич-

ных праймеров и зондов к консервативным генам цитотоксинов MbxA и MbvA, который обеспечил отсутствие перекрестных реакций как между целевыми видами, так и с рядом других патогенов, вызывающих конъюнктивиты у КРС.

Экспериментальная оптимизация показала, что метод обладает высокой аналитической чувствительностью ($3,8 \times 10^3$ КОЕ/мл для *M. bovis* и $6,5 \times 10^3$ КОЕ/мл для *M. bovoculi*) и позволяет надежно выявлять как моно-, так и микст-инфекцию в рамках одной реакции. Установленная оптимальная температура отжига (58 °C)

обеспечивает максимальную эффективность амплификации для обоих наборов праймеров в мультиплексном формате.

Разработанная тест-система представляет собой быстрый, специфичный и чувствительный инструмент, который существенно расширяет возможности диагностики и эпизоотологического мониторинга инфекционного кератоконъюнктивита КРС. Его внедрение в практику позволит повысить точность этиологической диагностики и обоснованность проводимых лечебно-профилактических мероприятий.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Бактерии рода *Moraxella* – возбудители инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота / Г. Н. Спиридонов, Л. Ш. Дуплева, А. Ф. Махмутов [и др.] // Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки продукции сельского хозяйства : материалы Междунар. науч.-практ. конф., Йошкар-Ола, 20–21 марта 2025 г. – Йошкар-Ола : Марийский государственный университет, 2025. – С. 662–665. – EDN RTHHDR.
2. Инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота в хозяйствах Республики Беларусь / М. А. Ананчиков, О. Н. Новикова, И. В. Зубовская [и др.] // Эпизоотология Иммунобиология Фармакология Санитария. – 2025. – № 1. – С. 21–25. – EDN JOVBJA.
3. Коба, И. С. Оценка терапевтической эффективности лекарственного препарата Тула-трин при инфекционном кератоконъюнктивите у крупного рогатого скота / И. С. Коба, Ю. В. Козлов, Д. Г. Решетникова // Ветеринария и кормление. – 2022. – № 3. – С. 48–50. – DOI 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2022-3-12. – EDN ECWWZB.
4. Красочко, В. П. Идентификация бактерий рода Моракселла / В. П. Красочко // Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и болезней пчел в современных условиях : материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 95-летию со дня рождения доктора ветеринарных наук, профессора Смирновой Нины Ивановны и Дню белорусской науки, Витебск, 07–08 декабря 2023 г. – Витебск : Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2024. – С. 103–105. – EDN UDOSLS.
5. Красочко, В. П. Роль бактерий рода Моракселла при инфекционном кератоконъюнктивите / В. П. Красочко // Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и болезней пчел в современных условиях : материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 95-летию со дня рождения доктора ветеринарных наук, профессора Смирновой Нины Ивановны и Дню белорусской науки, Витебск, 07–08 декабря 2023 г. – Витебск : Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2024. – С. 101–102. – EDN AAAUJS.
6. Тучков, Н. С. Эпизоотические культуры *Moraxella bovis*, их биологические свойства и вирулентность выделенных культур для телят / Н. С. Тучков, В. Н. Карайченцев, Н. П. Зуев // Молодые ученые – науке и практике АПК : Материалы Междунар. науч.-практ. конф. аспирантов и молодых ученых, Витебск, 25–26 апреля 2024 г. – Витебск : Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2024. – С. 484–487. – EDN ZCHFVN.
7. Этиология и клинично-эпизоотологические аспекты инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота / Г. Н. Спиридонов, Л. Ш. Дуплева, А. С. Зарипов, И. Т. Хусаинов // Ученые записки Учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». – 2018. – Т. 54, № 4. – С. 133–137. – EDN YUNYQX.
8. Этиология, способы профилактики и лечения при инфекционном кератоконъюнктивите крупного рогатого скота / С. Н. Семенов, А. Н. Лопанов, В. Н. Карайченцев [и др.] // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2024. – № 6 (236). – С. 55–60. – DOI 10.53083/1996-4277-2024-236-6-55-60. – EDN IBNHWT.