

Красочки П.П., доктор биологических наук, доцент<sup>1</sup>

Красочки В.П., кандидат ветеринарных наук<sup>1</sup>

Зубовская И.В., кандидат ветеринарных наук, доцент<sup>2</sup>

Черноков А.И., аспирант<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», 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 какmono-, 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 контактно-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 демонстрировать 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 мультиплексной ПЦР для одновременной детекции и дифференциации *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi*, а также определению аналитической чувствительности метода и оптимизации условий постановки мультиплексной ПЦР. Это позволит усовершенствовать систему диагностики и эпизоотологического мониторинга инфекционного кератоконъюнктивита КРС.

**Цель** исследования – разработать мультиплексный 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 «АртMix 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 мишней 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 биоинформационических 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 – 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 | gcatttcacttcgccttgt    | 60                    | 45    | 184                  |
| Mb1-2 | gccttctgtctcggtcacac   | 60                    | 60    |                      |
| Mb1-3 | gcaggaactgaatcacgtga   | 59                    | 50    |                      |
| Mb2-1 | aacgcattaaagagcggaaaa  | 59                    | 40    | 159                  |
| Mb2-2 | acaaaggcgaagtgaaatgc   | 60                    | 45    |                      |
| Mb2-3 | ggcaagaaagttaagctgg    | 59                    | 50    |                      |
| Mb3-1 | tggtgacgaccgcttgttt    | 60                    | 53    | 63                   |
| Mb3-2 | aatcatgcgccttcatctccag | 57                    | 48    |                      |
| Mb3-3 | gtcgatcggtgccttaccacc  | 59                    | 55    |                      |

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

| Шифр   | Последовательность          | Температура плавления | GC, % | Длина продукта, п.н. |
|--------|-----------------------------|-----------------------|-------|----------------------|
| Mbo1-1 | ctttgctggcaaggtaaaa         | 60                    | 45    | 185                  |
| Mbo1-2 | cttggcgttcacaaacctca        | 59                    | 45    |                      |
| Mbo1-3 | gtagacggcacacatgcaac        | 60                    | 55    |                      |
| Mbo2-1 | cgtacagtggctaaagggtata      | 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 | agtggaggccgggttaata         | 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 °C. Анализ показал, что температура 58 °C 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, °C | Наличие амплификации (C <sub>t</sub> ) | 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, °C | Наличие амплификации (C <sub>t</sub> ) | 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 вириуса 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'-tggtgacgaccgttgttt-3'): Tm = 60 °C, GC = 53 % и Mb3-2 (5'-aatcatgccttcatctccag-3'): Tm = 57 °C, GC = 48 %, зонд Mb3-3 (5'-gtcgatcggtgccttaccacc-3'): Tm = 59 °C, GC = 55 % с флуорофором флуоресцин (FAM). Длина ампликона – 63 п.н.;

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

GC = 33 %, зонд Mbo2-3 (5'-gccaagatactgcggtagtaacg-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 ( $58^{\circ}\text{C}$ )

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 : Мариийский 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 JOVBIA.
3. Коба, И. С. Оценка терапевтической эффективности лекарственного препарата Тулатрин 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. Красочки, В. П. Идентификация бактерий рода *Moraxella* / В. П. Красочки // 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. Красочки, В. П. Роль бактерий рода *Moraxella* при инфекционном кератоконъюнктивите / В. П. Красочки // 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 клинико-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.