



ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

УДК: 615.37:578.825.1:578.831.1:578.831.31

DOI:10.52419/issn2072-2419.2025.4.15

СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУСНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ СТАНДАРТИЗАЦИИ УСЛОВИЙ ПРОИЗВОДСТВА ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РЕСПИРАТОРНЫХ БОЛЕЗНЕЙ НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ

Хаммадов Н.И.^{1,2*} – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0001-5669-1486); Горбунова М.Е.¹ – канд. биол. наук, науч. сотр. (ORCID 0000-0002-0707-2117); Тарасова Е.Ю.¹ – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-9056-5798); Шангареев Р.И.¹ – канд. ветеринар. наук., науч. сотр. (ORCID 0000-0003-3689-1442); Дуплева Л.Ш.¹ – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. (ORCID 0000-0003-0915-3989); Усольцев К.В.¹ – канд. ветеринар. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0001-5279-9836); Ефимова М.А.^{1,2} – д-р биол., наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0001-8786-1310)

¹ ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»

² ФГБОУ ВО Казанский ГАУ Институт "Казанская академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана"

* nikhammadov@mail.ru

Ключевые слова: телята, крупный рогатый скот, вакцина, геном, вирус, инфекционный ринотрахеит, парагрипп-3, респираторно-синцитиальная инфекция, количественная полимеразная цепная реакция.

Keywords: calves, cattle, vaccine, genome, virus, infectious rhinotracheitis, parainfluenza-3, respiratory syncytial infection, quantitative polymerase chain reaction.

Поступила: 16.06.2025

Принята к публикации: 05.12.2025

Опубликована онлайн: 26.12.2025



РЕФЕРАТ

Основными критериями оценки вакцин являются их иммуногенность, специфическая активность и безопасность. Целью данной работы являлась разработка ПЦР в реальном времени для выявления и количественной оценки вирусных нуклеиновых кислот для стандартизации условий производства интраназальной вакцины против респираторных болезней новорожденных телят. Сконструированы комбинации праймеров и зондов (для каждого патогена индивидуально) позволяющие идентифицировать участок гликопротеина G респираторно-синцитиального вируса (РСВ) размером 97 п.н. расположенного в области от 4849 до 4945 п.н.; участок 130 п.н Р-гена возбудителя ПГ-3 в области от 2856 до 2985 п.н.; локус 171 п.н вируса ИРТ в области от 8271 по 8341 п.н.. Создан и синтезирован положительный контрольный образец (ПКО), представляющий собой замкнутую в кольцо двухцепочную молекулу ДНК (5618 п.н.), содержащую нуклеотидную последовательность,

состоящую из сконструированных праймеров и зондов для индикации вирусов ИРТ, ПГ-3 и РСВ. С использованием ПКО определены оптимальные условия постановки количественной ПЦР-РВ и состав реакционной смеси. Минимальная концентрация плазмидной ДНК, при которой регистрировалась успешная амплификация составила 5 аг/мкл, что соответствовало разведению 10^{-10} , при котором в 1 мл раствора содержалось 826 молекул плазмидной ДНК. По результатам амплификации вирусосодержащего материала установлены следующие концентрации патогенов: ИРТ – 0,7-1,5 млн копий ДНК/мл, ПГ-3 – 0,1-0,5 млн копий РНК/мл и РСВ – 20-80 тыс. копий РНК/мл. Разработанный способ определения количественного содержания вирусных НК на основе ПЦР-РВ благодаря своим характеристикам является перспективным подходом при организации производства вакцины для профилактики респираторных инфекций молодняка, а также обеспечивает соответствие конечного продукта стандартам качества.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Респираторные заболевания крупного рогатого скота – это комплекс заболеваний, вызываемых многочисленными вирусными и бактериальными патогенами [1]. Среди основных вирусных патогенов, ассоциированных с данной группой заболеваний, следует выделить вирус герпеса крупного рогатого скота типа 1, также известный как вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (ИРТ), вирус парагриппа крупного рогатого скота-3 (ПГ-3) и респираторно-синцитиальный вирус крупного рогатого скота (РСВ) [2]. Данные патогены, обладая высокой контагиозностью и патогенностью, представляют собой серьезную угрозу для здоровья и продуктивности животных, особенно в условиях современного интенсивно развивающегося животноводства. В результате инфицирования указанными вирусами наблюдаются значительные потери новорожденных телят и молодняка более старшего возраста, что влечет за собой существенные экономические убытки для молочного и мясного скотоводства [3].

Инфекционный ринотрахеит (ИРТ) – остро протекающая контагиозная болезнь крупного рогатого скота характеризуется лихорадкой, катарально-некротическим воспалением верхних дыхательных путей, поражением глаз, центральной нервной системы, а также органов репродуктивной системы. ИРТ часто протекает субклинически. После выздоровления животные становятся пожизненными латентными носителями вируса [4]. Возбудителем

инфекции является альфагерпесвирус 1-го типа (BoAHV-1), относящийся к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Alphaherpesvirinae* и роду *Varicellovirus*. Данный вирус имеет диаметр около 150 нм и заключён в икосаэдрический капсид, который содержит двухцепочечную ДНК и кодирует около 73 различных белков [5]. На основании антигенных и генетических характеристик штаммы ИРТ делятся на подтипы 1.1, 1.2a, 1.2b и 1.3 [6].

Вирус, вызывающий ПГ-3 относится к семейству *Paramyxoviridae*, роду *Paramyxovirus* и является наиболее часто встречающимся этиологическим агентом, эндемичным для популяций крупного рогатого скота во всем мире. Вирион вируса состоит из двух основных компонентов: внутреннего рибонуклеопротеида (нуклеокапсида), который содержит одноцепочечную несегментированную РНК, и матриксного белка. Нуклеокапсид окружён липопротеиновой оболочкой. На сегодняшний день учеными описаны три генотипа возбудителя ПГ-3: А (классический), В и С. Вакцины, используемые в России против вируса ПК-3 крупного рогатого скота, были разработаны на основе референтного штамма, принадлежащего генотипу А. Перекрестная защита таких вакцин от ПГ-3, вызванного генотипами В и С, остается неясной, поэтому разработки альтернативных диагностических тестов и вакцин для профилактики остается актуальной задачей [7].

Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) крупного рогатого скота относится к семейству *Pneumoviridae*, роду *Orthopneumovirus*. Респираторно-

синцитиальная инфекция (РСИ) регистрируется во всех странах мира, где развито интенсивное животноводство и в первую очередь поражает молодых телят во время повторяющихся сезонных вспышек. Клинически заболевание характеризуется лихорадкой, кашлем и тахипноэ, часто быстро прогрессирующими до одышки. Геном вируса около 15 тыс. нуклеотидов, представлен одноцепочечной, несегментированной, отрицательной РНК. На основании антигенных свойств из-за различий в структуре белка G и других белков РСВ делится на две серогруппы А и В [8].

Вспышки респираторных заболеваний часто затрагивают телят в возрасте всего нескольких недель. Следует отметить, что представленные выше вирусные инфекции не только снижают общую резистентность организма животных, но и создают благоприятные условия для вторичной бактериальной колонизации, что усугубляет течение болезни и повышает риск летальных исходов [9]. Поэтому важно, чтобы вакцинация быстро индуцировала защиту от заболевания. Большинство телят в возрасте до 3 месяцев имеют циркулирующие материнские антитела, приобретенные через молозиво, которые не обеспечивают должной защиты от заболеваний, но могут влиять на эффективность системной вакцинации. При этом именно интраназальная вакцинация является методом, с помощью которого может быть быстро вызван иммунитет (обходя возможное влияние материнских антител) [10]. Установлено, что телята в возрасте от 3 до 8 дней способны формировать иммунный ответ слизистой оболочки, даже при наличии материнских антител [11]. Многочисленные исследования продемонстрировали эффективность интраназальной вакцинации в условиях материнских антител после заражения вирусами респираторных инфекций [12, 13]. В связи с вышеизложенным, разработка живой импортозамещающей высокоиммуногенной вакцины из аттенуированных штаммов возбудителей ИРТ, ПГ-3 и РСВ является актуальной задачей современной биотехнологии.

Целью данной работы являлась разработка ПЦР в реальном времени для выявления и количественной оценки вирусных нуклеиновых кислот для стандартизации условий производства интраназальной вакцины против респираторных болезней новорожденных телят.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Нуклеотидные последовательности изолятов вирусов ИРТ, ПГ-3 и РСВ определены путем поисковых запросов из базы данных GenBank ресурсов NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Множественное выравнивание, дизайн олигонуклеотидов и положительного контрольного образца ПКО осуществляли с использованием программы Vector NTI 9.1 (Invitrogen Corporation) как было описано ранее [14, 15]. Олигонуклеотидные праймеры, зонды, ПКО синтезированы в ЗАО «Евроген» (Россия).

В работе использовали штаммы вирусов ИРТ («ТК-А(ВИЭВ)-В2») и ПГ-3 («ПТК-45/86»), полученные из Государственной коллекции микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», и вакцинный штамм Lum-56 (живой аттенуированный вирус РСИ крупного рогатого скота, входящий в состав вакцины «Назим» «Laboratorios Hipra, S.A.», Испания; лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций и для интраназального применения; каждая иммунизирующая доза вакцины (2 мл) содержит живой аттенуированный вирус РСИ КРС («штамм Lum-56») в количестве 104,7-6,5 ССІD50*. (*ССІD50: 50% инфицирующая доза для культуры клеток). Для получения вирусосодержащего субстрата для репродукции вирусов ИРТ и ПГ-3 использовали перевиваемую линию культуры клеток легкого эмбриона коровы (ЛЭК), возбудителя РСИ – ЛЭК и перевиваемую линию культуры клеток почки телят (Т-1). Нарработку биомассы вирусов осуществляли методами стационарного культивирования в стеклянных флаконах (матрасах) вместимостью 200 и 1500 см³ с выходом вирусосодержащей суспензии в объеме 20-30 см³ и 120-150 см³ соответственно. Зараже-

ние 2-3 суточной культуры клеток (после формирования монослоя) штаммами вирусов проводили после смены ростовой среды на поддерживающую. Для заражения использовали вирусы ИРТ и ПГ-3 с инфекционными титрами $6,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно, вирус РС – $10^{4,7-6,5} \text{CCID}_{50}$ соответственно. Инфицированные культуры клеток инкубировали при температуре $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, ежедневно просматривали под микроскопом на наличие характерных морфологических (цитопатических) изменений клеток. Определение контаминации используемых культур клеток вирусом диареи крупного рогатого скота (ВД) и микоплазмами, проводили методом ПЦР-РВ с использованием разработанной ранее комбинации олигонуклеотидов и ПКО [16].

Оценку качества репликации вирусов ИРТ, ПГ-3 и РСИ на клеточных линиях оценивали путем определения инфекционных титров согласно общепринятой методике L. Reed и H. Muench [17] по прямому цитопатическому действию вируса на клетки и выражали в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (50%-ная тканевая цитопатическая доза). Нуклеиновые кислоты (НК) выделяли из образцов культур клеток с помощью набора РИБО-преп (AmpliSens, Россия), согласно инструкции производителя. Вирусная РНК (ПГ-3 и РСВ) подвергалась обратной транскрипции с помощью MMLV – обратной транскриптазы (ЗАО «Евроген», Россия) в соответствии с инструкцией изготовителя. При поставке ПЦР-РВ применяли готовую реакционную смесь «5x qPCRmix-HS SYBR» (ЗАО «Евроген», Россия). Для расчета количества НК в образце подготовили серию образцов с 10-кратными разведениями разработанного положительного контрольного образца (которые при амплификации считали стандартами). Пересчет концентрации ДНК в количество копий молекулы проводили с использованием интернет ресурса MolBiol.ru (http://molbiol.ru/scripts/01_07.html). Количество НК вирусов в образцах определяли по показателям амплификатора (основанном

на сопоставлении Ct анализируемого образца с Ct стандартных образцов).

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации (ОФС.1.7.7.0004.15) все стадии процесса изготовления вакцин должны быть валидированны. В процессе разработки вакцин основополагающим этапом является использование рабочих посевных серий микроорганизмов, которые должны демонстрировать те же характеристики, что и штамм, из которого получена исходная посевная серия, а методы культивирования сохранять иммуногенные свойства вакцинных штаммов, обеспечивать безопасность препарата и предотвращать загрязнение посторонними вирусами, бактериями, грибами и микоплазмами. Данный подход гарантирует сохранение стабильности производственного процесса, а также обеспечивает соответствие конечного продукта стандартам качества и безопасности.

Идентификация штаммов, как правило, осуществляется с использованием комплекса молекулярно-биологических методов, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР), и секвенирование. В рамках настоящей работы была исследована возможность разработки способа ПЦР-РВ для количественного определения вирусных нуклеиновых кислот при стандартизации условий производства интраназальной вакцины против респираторных болезней новорожденных телят таких как ИРТ, ПГ-3 и РСИ.

При конструировании олионуклеотидов для индикации РСВ из базы данных GenBank были загружены 83 нуклеотидные последовательности различных штаммов и генов данного вируса: OR426499.2, OM362454.1, AY910763.1, JN619455.1, AF188596.1, AY910765.1, OM362411.1, JN619434.1, AY507925.1, OM372493.1, AY910760.1, OM362457.1, PQ061836.1, MH133326.1, OM362455.1, JN619447.1, AF188602.1, AF188603.1, KF501152.1, OM362441.1, AY910755.1, KF501150.1, OP137023.1, AF188593.1, OP137027.1, OM362437.1, JN619433.1,

MN316655.1, JN619446.1, JN619435.1, OR426505.2, AY910764.1, MH133327.1, KY753468.1, OR426503.2, JN619450.1, KY753469.1, OM362409.1, AY910756.1, AY910758.1, JN619442.1, OP137018.1, MW711880.1, JN619441.1, MW711879.1, AY910757.1, JN619431.1, OM362419.1, JN619428.1, AF188601.1, AF188598.1, AF188591.1, AY910761.1, KY660261.1, AF188589.1, FJ543090.1, AF188595.1, KY753447.1, OM362456.1, KF501170.1, OP137028.1, OP137017.1, OM362442.1, MW892046.2, JN619452.1, MW892045.1, AF188597.1, AF188604.1, JN619436.1, JN619448.1, OP137021.1, OP137026.1, JN619426.1, OP137022.1, JN619427.1, JN619432.1, AF188594.1, JN619451.1, AF188588.1, JN619445.1, KY680329.1, OM372492.1, AF295543. По результатам множественного выравнивания указанных выше нуклеотидных последовательностей с целью подбора маркерного локуса, пригодного для выявления РСВ методом ПЦР, определили участок размером 97 п.н. расположенный в области от 4849 до 4945 п.н. гликопротеина G (обозначение относительно штамма ATCC 51908 (GeneBank ID AF295543)). Данный белок необходим для прикрепления РСВ к клетке-мишени и играют значимую роль для инфекционного процесса [18].

Для подбора маркерных локусов пригодных для выявления возбудителя ПГ-3 из базы данных GenBank были сохранены 57 нуклеотидных последовательностей: LC493020.1, LC493764.1, LC493017.1, LC493763.1, LC493022.1, LC493791.1, LC493001.1, LC493781.1, LC170484.1, LC493768.1, LC493021.1, LC493784.1, LC493024.1, LC506030.1, LC493012.1, LC170485.1, LC493782.1, LC493002.1, LC493789.1, LC493790.1, LC493011.1, LC493027.1, LC493014.1, LC493758.1, LC493025.1, LC506035.1, LC493004.1, LC493786.1, LC493015.1, LC493013.1, LC506036.1, LC170483.1, LC493787.1, LC493771.1, LC493762.1, LC170479.1, LC170480.1, LC493760.1, LC493793.1, LC506029.1, LC493792.1, LC493794.1, LC493016.1, LC493000.1, LC493007.1,

LC493003.1, LC493783.1, LC493005.1, LC493026.1, LC493788.1, LC170482.1, LC493767.1, LC493779.1, LC506033.1, LC493019.1, LC506034.1., LC200422.1. В результате проведенного множественного выравнивания был идентифицирован специфический участок Р-гена (фосфопротеин) размером 130 п.н. в области от 2856 до 2985 п.н. (обозначение относительно штамма Tottori3c (GeneBank ID LC200422.1)). Р-ген является одним из шести открытых рамок считывания (ORFs) в геноме вируса ПГ-3 крупного рогатого скота. Есть данные, что, что открытая рамка считывания гена Р не только транслирует фосфопротеин, но также кодирует три неструктурных белка (V/C/D), которые непосредственно ингибируют выработку интерферона клеткой-хозяином [19].

Для подбора генов и локусов ДНК, пригодных для использования при индикации вируса ИРТ из базы данных GenBank были сохранены 91 нуклеотидная последовательность возбудителя, со следующими идентификационными номерами: PP236081.1, PP236080.1, PP236079.1, PP236078.1, PP236077.1, PP236076.1, PP236075.1, PP236074.1, PP236073.1, PP211010.1, PP211009.1, PP211008.1, PP211007.1, PP211006.1, PP211005.1, PP211004.1, PQ044364.1, PQ044363.1, PQ044362.1, PQ044361.1, PQ044360.1, PP341419.1, PP336330.1, PP336329.1, PP336328.1, PP336327.1, PP336320.1, OR765832.1, OR514873.1, OR567256.1, OQ784261.1, OQ784259.1, OQ656377.1, OQ656376.1, OQ161993.1, OQ161992.1, OP874961.1, OP594301.1, OP594300.1, OQ784260.1, OQ784263.1, OM803183.1, OQ784262.1, OR567257.1, OR574959.1, OR514871.1, OR514872.1, PP336321.1, PP336322.1, PP336323.1, PP336324.1, PP336325.1, PP336326.1, PP785375.1, PP785374.1, PP752093.1, PP752092.1, PP785376.1, PP785377.1, PQ044356.1, PQ044357.1, PQ044358.1, PQ044359.1, PQ044365.1, PQ044366.1, PQ408652.1, PQ408653.1, PQ408654.1, PQ539466.1, PP211003.1, PP211015.1, PP211014.1, PP277992.1, PP277990.1, MK919465.1,

PP952089.1, PP211012.1, PP211011.1, PP952088.1, PV533951.1, PP277989.1, PP277988.1, МК919466.1, PP211013.1, PP277991.1, PP211016.1, PP236068.1, PP236069.1, PP236070.1, PP236071.1, PP236072.1. Детальный анализ нуклеотидных последовательностей позволил выполнить дизайн олигонуклеотидных затравок для ПЦР-РВ, амплифицируемый участок размером 171 п.н локализовался в области от 8271 по 8341 п.н. (относительно isolate Moscow 1 deoxyuridine triphosphatase (UL50) gene, partial cds (GenBank: PQ044356.1)).

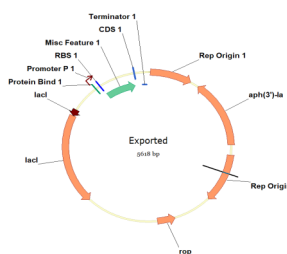
В пределах установленных специфических локусов для вирусов ИРТ, ПГ-3 и РСВ сконструировали олигонуклеотидные праймеры и зонды, представленные в таблице 1.

По результатам BLAST-анализа представленные в таблице 1 нуклеотидные последовательности праймеров и зондов не имели гомологии с ДНК крупного ро-

гатого скота и основными вирусами, участвующими в этиологии респираторных болезней такими как вирус вирусной диареи, коронавирусы, риновирусы. При разработке ПКО была использована нуклеотидная последовательность, которая представляет собой чередование сконструированных праймеров и зондов для индикации вирусов ИРТ, ПГ-3 и РСВ. Схематично данная вставка имеет следующую структуру: «5'- RSV F, BGY F, RSV P, BGY P, комплиментарная последовательность (с) RSV R, сBGY R, BPIV3 F, BPIV3 P, сBPIV3 R -3'». Данная последовательность была синтезирована и клонирована в вектор рЕТ28а(+) в компании «Евроген» (г. Москва). В результате конструирования длина вектора, содержащего маркерные последовательности для индикации всех определяемых вирусов, составила 5618 п.н. Характеристика сконструированной плазмиды и генетической вставки представлены на рисунке 1.

Таблица 1 – Сконструированные олигонуклеотиды, для проведения ПЦР-РВ

Вирус	Название праймера	Последовательности 5`- 3`	Положение в геноме, п.н.
ИРТ	BGY F	gacgatcagccccgaagg	8271-8289
	BGY R	cggcagacgcccacgct	8325-8341
	BGY P	(Cy5)accaaacacgtaggcgcgca(BHQ3)	8304-8325
ПГ-3	BPIV3 F	ttacagaaggcgattacattacaga	2856-2885
	BPIV3 R	ttcgatcgcatatcgcattgtt	2963-2985
	BPIV3 P	(R6G)cattcgccacacayacaactcttct(BHQ2)	2929-2957
PCB	RSV F	ataacctgacatcactgctacataacagc	4849-4877
	RSV R	gtgtttgttgatggttggttgg	4922-4945
	RSV P	(Rox)agtgtgggaaatgctaaagccaagcc(BHQ2)	4892-4916



```

4901  CCGCAGCAC  CCGACTCTGTG  GCGCCGGTGA  TCGCGGCGAC  GATCGCTCCG  GCGTATAGGA  TCGAGATCTC  GATCGCGGCA  AATTATAGCG  ACTCACTATA
CGGTCGTTG  CCGTGGACAC  CCGGGCCACT  ACGCCGGGTG  CTACCGAGCG  CCGATCTCCT  AGCTCTAGAG  CTAGGGGCGT  TTAATTAGCG  TGAGTATAT

REV F SEQ:
5001  GGGGATTTGT  GAGCGGATTA  CAAITTCGCT  CTAGAAATTA  TTTTGTTTTA  CTTTAAAGAG  GAGATATACC  ATGGATACCC  TTGATACAC  TCGTCTAAC
CCGCTTAAAC  CTGGCTATT  GTTAGGGGA  GATCTTATT  AAACAAAT  GAAATCTTC  CTCTATATGG  TACCTATGG  AACTGGGCT  TTAATTAGCG  AGGATTTG

REV R SEQ:
5101  AGCGACATC  AGCCCCCGAA  GAGTGTGGG  AATGCTAAA  CCGACGCGAC  CAACACGTA  GGGCGGCGCA  CCGAACCCAC  CATCCACAAA  ACACAGCGTG
TCGCTGCTAG  TCGGGGGCTT  CCTCACCCC  TTTACGATTT  CGTTGCGTG  GTTTGCGAT  CCGCGCGCGT  GATTGCTTG  GTAGTTGTT  TGTGTGCGAC

REV P SEQ:
5201  GGGTCTGGC  GTTAGGAAA  GCGCATTTTC  ATATTAGAG  AGAGTAATC  GGGAGGAGG  TCGCGAGGC  CCGAGAGGG  CTAGCTCAA  TATCATGCC
CCGACAGGG  CAATGCTTT  CCGGTAATG  TAAATATGC  TCGCTATTG  CCGCTCTCC  ACCGCTCCG  GCTTTTCCG  ATGCGATT  AGGATAGG

REV F SEQ:
5301  TCTTACAGT  GCGATTGCG  ACACACAAA  CTCTTTGTC  TAAACAGTGT  GAGTTCATG  GATGGCAGAA  GGTACAAGA  GAAGCGAGT  GGTGACAGG
AGATGCTCA  CCGTACGCG  TGTGTGTT  GAGAGACAG  ATTGTCACA  CTCAGTATAC  CTACGCTCT  CCGATTTCT  CTTCGCTCA  CCGATCTCC

REV R SEQ:
5401  AATGTGCTAA  TGGTTACAA  AGATGTGGA  TATGTCTG  AGCTTGGG  CCGCTGTG  GCGACGAC  CAGTACT  GAGATGCG  TCGTCTAAA
TTACAGATT  ACCAAGTGT  TGTAGCTCT  ATGACGTAC  TTGAGAGCC  GCGGTGAGCT  CGTGGTGTG  GTGGTGTGA  CTTCAGGCC  AGGATTTT

REV P SEQ:
5501  CCGCGAAGG  AACTGAGTT  GCGTGTGCG  AGCTTGGAG  AATGATAGC  ATACCGCTT  GGGCGCTTA  ACGGGTCT  GGGGGTTT  TTGCTAAG
GCGCTTCC  TTGACTCAA  CCGACAGGG  TGGGACTG  TTAATTAG  TATTGGGAA  CCGCGAGAT  TTGCCAGAA  CTCCCAAAT  AAGCATTC
    
```

Рисунок 1 – Структура плазмидного вектора рЕТ28а(+), содержащего маркерные последовательности для индикации вирусов ИРТ, ПГ-3 и РСВ.

С использованием ПКО провели серию экспериментов для оптимизации протокола ПЦР-РВ индикации вирусов ИРТ, ПГ-3 и РСВ, индивидуально для каждого генетического маркера. Оптимизированный состав реакционной смеси для индикации каждого из вирусов включал следующие компоненты в расчете на одну пробу (15 мкл): 5x gPCRMix HS SYBR – 3 мкл, праймеры и зонды по 0,5 мкл каждого (концентрация 10 пМ), ПКО – 5 мкл, H₂O – 5,5 мкл. Температурно-временной протокол проведения реакции амплификации был следующим: денатурации при 95 °С – 5 мин; 7 циклов: денатурацию ДНК – 94 °С 30 с, отжиг праймеров при 60 °С – 30 с; 35 циклов: денатурацию ДНК – 94 °С 30 с, отжиг праймеров при 60 °С – 30 с (детекция по каналам R6G, Cy5 и ROX, соответственно флуоресцентной метке, указанной в таблице 1);

Для приготовления стандартных растворов плазмидной ДНК (ПКО) готовили растворы в десятикратных разведениях, от исходной концентрации 50 нг/мкл до концентрации 50 зг/мкл, с пересчетом концентрации ДНК в количество копий молекулы (таблица 2).

Минимальная концентрация плазмидной ДНК, при которой регистрировалась успешная амплификация составила 5 аг/мкл, что соответствовало разведению 10¹⁰, при котором в 1 мл раствора содержалось 826 молекул плазмидной ДНК. При этом эффективность амплификации составила 3-6 положительных реакций из 8 повторов. При определении concentra-

ции нуклеиновых кислот выявляемых вирусов использовали (в виде стандартов для определения количественных показателей реакции) 8 десятикратных разведений с содержанием от 0,8 копий до 8 млн копий в 1 мкл раствора плазмидной ДНК (т.к. инфекционный титр исследуемых вирусов составлял от 4 до 6 lg ТЦД50/см³). Для ПЦР-РВ индикации штаммов вирусов ИРТ, ПГ-3 и РСВ применяли реакцию индивидуально для каждого генетического маркера с описанными ниже параметрами реакции. Состав реакционной смеси для индикации ПГ-3 и РСВ включал следующие компоненты в расчете на одну пробу (15 мкл): 5x gPCRMix HS SYBR – 3 мкл, праймеры и зонды по 0,5 мкл каждого (концентрация 10 пМ), MMLV revertase – 0,3 мкл, ПКО – 5 мкл, H₂O – 5,5 мкл; для ИРТ: 5x gPCRMix HS SYBR – 3 мкл, праймеры и зонды по 0,5 мкл каждого, ПКО – 5 мкл, H₂O – 5,5 мкл. Температурно-временной протокол проведения реакции амплификации для ИРТ был следующим: денатурации при 95 °С – 5 мин; 7 циклов: денатурацию ДНК – 94 °С 30 с, отжиг праймеров при 60 °С – 30 с; 35 циклов: денатурацию ДНК – 94 °С 30 с, отжиг праймеров при 60 °С – 30 с (детекция по каналу Cy5); для ПГ-3 и РСВ состоял из обратной транскрипции при 37 °С в течение 10 мин; денатурации при 95 °С – 5 мин; 7 циклов: денатурацию ДНК – 94 °С 30 с, отжиг праймеров при 60 °С – 30 с; 35 циклов: денатурацию ДНК – 94 °С 30 с, отжиг праймеров (детекция по каналам R6G и ROX соответственно).

Таблица 2 – Количество копий ДНК в растворах стандартов для количественной ПЦР

Концентрация ДНК	Показатель разведения	Количество молекул плазмидной ДНК	Концентрация ДНК	Показатель разведения	Количество молекул плазмидной ДНК
50 нг/мкл	1	8 258 241 312/мкл	50 пг/мкл	10 ⁻³	8 258 241/мкл
5 пг/мкл	10 ⁻⁴	825 824/мкл	0,5 пг/мкл	10 ⁻⁵	82 582/мкл
50 фг/мкл	10 ⁻⁶	8 258/мкл	5 фг/мкл	10 ⁻⁷	826/мкл
0,5 фг/мкл	10 ⁻⁸	83/мкл	50 аг/мкл	10 ⁻⁹	8/мкл
5 аг/мкл	10 ⁻¹⁰	826/мл	0,5 аг/мкл	10 ⁻¹¹	83/мл
50 зг/мкл	10 ⁻¹²	8/мл			

По результатам амплификации вирус-содержащего материала, который в последующем будет применен для иммунизации лабораторных животных удалось установить следующие концентрации патогенов: ИРТ – 0,7-1,5 млн копий ДНК/мл, ПГ-3 – 0,1-0,5 млн копий РНК/мл и РСВ – 20-80 тыс. копий РНК/мл.

Разработанный способ определения количественного содержания вирусных НК на основе ПЦР-РВ благодаря своим характеристикам является перспективным подходом при организации производства вакцины для профилактики респираторных инфекций молодняка, а также обеспечивает соответствие конечного продукта стандартам качества.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Проведена работа по созданию набора компонентов для выявления и количественного определения вирусных НК при стандартизации условий производства интраназальной вакцины против респираторных болезней новорожденных телят таких как ИРТ, ПГ-3 и РСИ. Сконструированы комбинации праймеров и зондов (для каждого патогена индивидуально) позволяющие идентифицировать участок гликопротеина G вируса РСВ размером 97 п.н. расположенный в области от 4849 до 4945 п.н.; участок Р-гена возбудителя ПГ-3 (фосфопротеин) размером 130 п.н. в области от 2856 до 2985 п.н.; участок вируса ИРТ размером 171 п.н. в области от 8271 по 8341 п.н.. По результатам BLAST-анализа разработанные нуклеотидные последовательности праймеров и зондов не имели гомологии с ДНК крупного рогатого скота и основными вирусами, участвующими в этиологии респираторных болезней такими как вирус вирусной диареи, коронавируса, риновирус. Создан и синтезирован ПКО, представляющий собой замкнутую в кольцо двухцепочную молекулу ДНК (5618 п.н.), содержащая нуклеотидную последовательность, состоящую из сконструированных праймеров и зондов для индикации вирусов ИРТ, ПГ-3 и РСИ. Схематично данная вставка имеет следующую структуру: «5'- RSV F, BGY F, RSV P, BGY P, cRSV R, cBGY R,

BPIV3 F, BPIV3 P, cBPIV3 R -3'». С использованием ПКО определены оптимальные условия постановки количественной ПЦР-РВ и состав реакционной смеси. Минимальная концентрация плазмидной ДНК, при которой регистрировалась успешная амплификация составила 5 аг/мкл, что соответствовало разведению 10^{-10} , при котором в 1 мл раствора содержалось 826 молекул плазмидной ДНК. При этом эффективность амплификации составила 3-6 положительных реакций из 8 повторов.

По результатам амплификации вирус-содержащего материала, который в последующем будет применен для иммунизации лабораторных животных удалось установить следующие концентрации патогенов: ИРТ – 0,7-1,5 млн копий ДНК/мл, ПГ-3 – 0,1-0,5 млн копий РНК/мл и РСВ – 20-80 тыс. копий РНК/мл.

Разработанный способ определения количественного содержания вирусных НК на основе ПЦР-РВ благодаря своим характеристикам является перспективным подходом при организации производства вакцины для профилактики респираторных инфекций молодняка, а также обеспечивает соответствие конечного продукта стандартам качества.

METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF VIRAL NUCLEIC ACIDS FOR STANDARDIZATION OF CONDITIONS FOR PRODUCTION OF AN INTRANASAL VACCINE AGAINST RESPIRATORY DISEASES IN NEWBORN CALVES

Khammadov N.I.^{1,2} – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0001-5669-1486); **Gorbunova M.E.**¹ – Candidate of Biological Sciences, Researcher, (ORCID 0000-0002-0707-2117); **Tarasova E.Yu.**¹ – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0002-9056-5798); **Shangaraev R.I.**¹ – Candidate of Veterinary Sciences, Researcher, (ORCID 0000-0003-3689-1442); **Dupleva L.Sh.**¹ – Candidate of Biological Sciences, Senior researcher (ORCID 0000-0003-0915-3989); **Usoltsev K.V.**¹ – Candidate of Veterinary

Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0001-5279-9836); **Efimova M.A.**^{1,2} – Doctor of Biological Sciences, Leading researcher (ORCID: 0000-0001-8786-1310)

¹ FSBSI «Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety»

² FSBEI HE «Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman»

* nikhammadov@mail.ru

ABSTRACT

The main criteria for evaluating vaccines are their immunogenicity, specific activity, and safety. The aim of this work was to develop real-time PCR for the detection and quantification of viral nucleic acids in order to standardize the production conditions for an intranasal vaccine against respiratory diseases in newborn calves. Combinations of primers and probes (for each pathogen individually) were designed to identify a 97 bp region of glycoprotein G of the respiratory syncytial virus (RSV) located in the range from 4849 to 4945 bp; a 130 bp region of the PI-3 pathogen P-gene in the range from 2856 to 2985 bp; a 171 bp locus. In the region from 8271 to 8341 bp, a PKO was created and synthesized, which is a double-stranded DNA molecule (5618 bp) closed in a ring, containing a nucleotide sequence consisting of engineered primers and probes for the indication of IRT, PI-3 and IBR viruses. Using PCO, the optimal conditions for quantitative PCR-RV and the composition of the reaction mixture were determined. The minimum concentration of plasmid DNA at which successful amplification was observed was 5 pg/μL, which corresponded to a dilution of 10⁻¹⁰, with 826 plasmid DNA molecules per mL of solution. According to the results of amplification of the virus-containing material, the following concentrations of pathogens were established: IBR – 0.7-1.5 million copies of DNA/mL, PI-3 – 0.1-0.5 million copies of RNA/mL, and RSV – 20-80 thousand copies of RNA/mL. The developed method for determining the quantitative content of viral nucleic acids based on RT-PCR is a promising approach for the

production of vaccines for the prevention of respiratory infections in young animals, as it ensures compliance with quality standards.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Акбашев И.Р., Садыкова С.В., Яшагина Л.М., Каримуллина И.Г., Хусаинова Г.И., Гумеров В.Г., Евстифеев В.В. Изучение антигенных свойств ассоциированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидиоза крупного рогатого на кроликах. Ветеринарный врач. 2024; 2: С. 39–42. https://doi.org/10.33632/1998-698X_2024_2_39
2. Karimullina I., Yarullin A., Mukhammadiyev R., Mukhammadiyev R., Mingaleev D., Khusainova G., Sorokina D., Gumerov V. Optimization of conditions for cultivation of pathogens of infectious rhinotracheitis and viral diarrhea. Bio web of conferences. 2024; 116: 06012. <https://doi.org/10.1051/bioconf/202411606012>
3. Красочко П.А., Яромчик Я.П., Красочко И.А., Красочко П.П., Машеро В.А., Понаськов М.А., Притыченко А.В., Кучинский М.П. Оценка антигенной активности аттенуированных штаммов вирусов, используемых для изготовления вакцин для животных. Ученые записки учреждения образования Витебская ордена Знак почета государственная академия ветеринарной медицины. 2022; 58(4): 2-57. <https://doi.org/10.52368/2078-0109-2022-58-4-52-57>.
4. Valas S., Ngwa-Mbot D., Stourm S., Mémeteau S., Tabouret M. A retrospective evaluation of pooled serum ELISA testing in the frame of the French eradication program for infectious bovine rhinotracheitis. Preventive Veterinary Medicine. 2023; 214: 105890. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2023.105890>
5. Barber K.A., Daugherty H.C., Ander S.E., Jefferson V.A., Shack L.A., Pechan T., Nanduri B, Meyer F. Protein composition of the bovine herpesvirus 1.1 virion. Vet. Sci. 2017; 4(1): 11. <https://doi.org/10.3390/vetsci4010011>
6. Rimayanti R., Khairullah A.R., Lestari T.D., Moses I.B., Utama S., Damayanti R., Mulyati S., Raharjo H.M., Kusala MKJ,

- Raissa R., Wibowo S., Abdila S.R., Fauzia K.A., Yanestria S.M, Fauziah I., Siregar J.E. Infectious bovine rhinotracheitis: Unveiling the hidden threat to livestock productivity and global trade. *Open Vet J.* 2024; 14(10): 2525-2538. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2024.v14.i10.3>
7. Галиуллин А.К., Гумеров В.Г., Гильмутдинов Р.Я., Шаева А.Ю., Гериш Ашуак, Магдеева Э.А., Софронов П.В. Молекулярно-генетический анализ геномов вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота. *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана.* 2023; 255(3): 92-99. https://doi.org/0.31588/2413_4201_1883_2_255_92.
8. Коровкин А.С., Горенков Д.В., Волгин А.Р. Профилактика респираторно-синцитиальной вирусной инфекции: современное состояние и перспективы разработки вакцин. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2024; 24(3): 255-269. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-255-26>
9. West K., Petrie L., Konoby C., Haines D.M., Cortese V., Ellis J.A. The efficacy of modified-live bovine respiratory syncytial virus vaccines in experimentally infected calves. *Vaccine.* 1999; 18: 907-919. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(99\)00324-2](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(99)00324-2).
10. Xue W., Ellis J., Mattick D., Smith L., Brady R., Trigo E. Immunogenicity of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhea virus types 1 and 2, infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus when administered intranasally in young calves. *Vaccine.* 2010; 28 (22): P. 3784-3792. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.043>
11. Hill K.L., Hunsaker B.D., Townsend H.G., Griebel P.J. Mucosal immune response in newborn Holstein calves that had maternally derived antibodies and were vaccinated with an intranasal multivalent modified-live virus vaccine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2012; 240: 1231-1240. <https://doi.org/10.2460/javma.240.10.1231>
12. Chamorro M.F., Palomares R.A. Bovine respiratory disease vaccination against viral pathogens. Modified-live versus inactivated antigen vaccines, intranasal versus parenteral, what is the evidence? *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2020; 36: 461-472. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.03.006>
13. McNeff C.A., Robison C.A., Wilson B.K., White F.J., Cauble R., Biggs R., Salak-Johnson J.L., Beck P.A. Modified-live versus inactivated respiratory viral vaccines for revaccinating beef calves at weaning. *Applied Animal Science.* 2023; 39 (1): 1-13.
14. Хаммадов Н.И., Горбунова М.Е., Сальманова Г.Р., Фахрутдинов Н.А., Гулюкин А.М., Галеева А.Г., Громова Е.А. Конструирование специфических праймеров для ПЦР-диагностики классической чумы. *Ветеринарный врач.* 2024; 3: 41-46. https://doi.org/10.33632/1998-698X_2024_3_41
15. Усольцев К.В., Шангараев Р.И., Хаертынов К.С., Горбунова М.Е., Хаммадов Н.И., Осянин К.А., Хамидуллина А.И. Дизайн праймеров для индикации патогенных лептоспир методом гнездовой полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. *Ветеринария, зоотехния и биотехнология.* 2025; 2: 95-106. <https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202502111>
16. Хаммадов Н.И., Горбунова М.Е., Ефимова М.А., Усольцев К.В., Сальманова Г.Р., Шангараев Р.И., Тарасова Е.Ю. Дизайн специфических олигонуклеотидов для выявления контаминации культур клеток возбудителем вирусной диареи и микоплазмами при разработке интраназальной вакцины против респираторных болезней новорожденных телят. *Ветеринарный врач.* 2025; 3: 98-104. https://doi.org/10.33632/1998-698X_2025_3_98
17. Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology.* 1938; 27(3): 493-497.
18. Кривицкая В.З., Синцова К.С., Петрова Е.Р., Сверлова М.В., Сорокин Е.В., Царева Т.Р., Комиссаров А.Б., Фадеев А.В., Писарева М.М., Бузицкая Ж.В., Афанасьева В.С., Суховецкая В.Ф., Сомина А.А. Генетическая и антигенная характеристика штаммов респираторно-

синцитиального вируса, выделенных в Санкт-Петербурге в 2013-2016 гг. Вопросы вирусологии. 2017; 62(6): 273-282. <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-273-282>

19. Ren Y., Chen X., Tang C., Yue H. First isolation and characterization of a bovine parainfluenza virus type 3 genotype C strain from an aborted Holstein fetus. *Front. Vet. Sci.* 2025; 12:1598013. <http://dx.doi.org/10.3389/fvets.2025.1598013>.

REFERENCES

1. Akbashev I.R., Sadykova S.V., Yashagina L.M., Karimullina I.G., Khusainova G.I., Gumerov V.G., Evstifeev V.V. Study of antigenic properties of the associated vaccine against IRT, VD, PI-3 and chlamydia of cattle on laboratory rabbits. *The Veterinarian.* 2024; 2: C. 39–42. https://doi.org/10.33632/1998-698X_2024_2_39. (In Russ.)

2. Karimullina I., Yarullin A., Mukhammadiev R., Mukhammadiev R., Mingaleev D., Khusainova G., Sorokina D., Gumerov V. Optimization of conditions for cultivation of pathogens of infectious rhinotracheitis and viral diarrhea. *Bio web of conferences.* 2024; 116: 06012. <https://doi.org/10.1051/bioconf/202411606012>

3. Krasochko P.A., Yalomchik Ya.P., Krasochko I.A., Krasochko P.P., Mashero V.A., Ponaskov M.A., Pritichenko A.V., Kuchinsky M.P. Evaluation of the antigenic activity of attenuated virus strains used in the design of animal vaccines. *Scientific Notes of the Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine.* 2022; 58(4): 2-57. <https://doi.org/10.52368/2078-0109-2022-58-4-52-57> (In Russ.)

4. Valas S., Ngwa-Mbot D., Stourm S., Mémeteau S., Tabouret M. A retrospective evaluation of pooled serum ELISA testing in the frame of the French eradication program for infectious bovine rhinotracheitis. *Preventive Veterinary Medicine.* 2023; 214: 105890. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2023.105890>

5. Barber K.A., Daugherty H.C., Ander S.E., Jefferson V.A., Shack L.A., Pechan T., Nanduri B, Meyer F. Protein composition of the bovine herpesvirus 1.1 virion. *Vet. Sci.*

2017; 4(1): 11. <https://doi.org/10.3390/vetsci4010011>

6. Rimayanti R., Khairullah A.R., Lestari T.D., Moses I.B., Utama S., Damayanti R., Mulyati S., Raharjo H.M., Kusala MKJ, Raissa R., Wibowo S., Abdila S.R., Fauzia K.A., Yanestria S.M, Fauziah I., Siregar J.E. Infectious bovine rhinotracheitis: Unveiling the hidden threat to livestock productivity and global trade. *Open Vet J.* 2024; 14(10): 2525-2538. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2024.v14.i10.3>

7. Galiullin A.K., Gumerov V.G., Gilmutdinov R.Ya., Shaeva A.Yu., Gerish Ashuak, Magdeeva E.A., Sofronov P.V. Molecular genetic analysis of genomes of bovine parainfluenza-3 virus. *Scientific Notes of the Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman.* 2023; 255 (3): 92-99. https://doi.org/10.31588/2413_4201_1883_2_255_92. (In Russ.)

8. Korovkin A.S., Gorenkov D.V., Volgin A.R. Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection: Current Status and Prospects for Vaccine Development. *BIOPREPARATIONS. Prevention, Diagnostics, Treatment.* 2024;24(3):255–269. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-255-269> (In Russ.)

9. West K., Petrie L., Konoby C., Haines D.M., Cortese V., Ellis J.A. The efficacy of modified-live bovine respiratory syncytial virus vaccines in experimentally infected calves. *Vaccine.* 1999; 18: 907–919. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(99\)00324-2](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(99)00324-2)

10. Xue W., Ellis J., Mattick D., Smith L., Brady R., Trigo E. Immunogenicity of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhea virus types 1 and 2, infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus when administered intranasally in young calves. *Vaccine.* 2010; 28 (22): P. 3784-3792. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.043>

11. Hill K.L., Hunsaker B.D., Townsend H.G., Griebel P.J. Mucosal immune response in newborn Holstein calves that had maternally derived antibodies and were vaccinated with an intranasal multivalent modified-live

- virus vaccine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2012; 240: 1231–1240. <https://doi.org/10.2460/javma.240.10.1231>
12. Chamorro M.F., Palomares R.A. Bovine respiratory disease vaccination against viral pathogens. Modified-live versus inactivated antigen vaccines, intranasal versus parenteral, what is the evidence? *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2020; 36: 461–472. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.03.006>
13. McNeff C.A., Robison C.A., Wilson B.K., White F.J., Cauble R., Biggs R., Salak-Johnson J.L., Beck P.A. Modified-live versus inactivated respiratory viral vaccines for revaccinating beef calves at weaning. *Applied Animal Science.* 2023; 39 (1): 1-13.
14. Khammadox N.I., Gorbunova M.E., Salmanova G.R., Fakhrutdinov N.A., Gulyukin A.M., Galeeva A.G., Gromova E.A. Design of specific primers for PCR diagnosis of classical swine fever. *The Veterinarian.* 2024; 3:41-46. https://doi.org/10.33632/1998-698X_2024_3_41. (In Russ.)
15. Usoltsev K.V., Shangaraev R.I., Khaertynov K.S., Gorbunova M.E., Khammadox N.I., Osyanin K.A., Khamidullina A.I. Design of primers for indication of pathogenic leptospira by nested polymerase chain reaction in real time. *Veterinary, Zootechnics and Biotechnology.* 2025; 2:95-106. <https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202502111>. (In Russ.)
16. Khammadox N.I., Gorbunova M.E., Efimova M.A., Usoltsev K.V., Salmanova G.R., Shangaraev R.I., Tarasova E.Yu. Design of specific oligonucleotides to detect contamination of cell cultures by the causative agent of viral diarrhea and mycoplasmas in the development of an intranasal vaccine against respiratory diseases of newborn calves. *The Veterinarian.* 2025; 3: 98-104. https://doi.org/10.33632/1998-698X_2025_3_98. (In Russ.)
17. Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology.* 1938; 27(3): 493-497.
18. Krivitskaya V.Z., Sintsova K.S., Petrova E.R., Sverlova M.V., Sorokin E.V., Tsareva T.R., Komissarov A.B., Fadeev A.V., Pisareva M.M., Buzitskaya Zh.V., Afanaseva V.S., Sukhovetskaya V.F., Sominina A.A. Genetic and antigenic characteristics of respiratory syncytial virus strains isolated in St. Petersburg in 2013-2016. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal).* 2017; 62(6): 273-282. <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-273-282> (In Russ.)
19. Ren Y., Chen X., Tang C., Yue H. First isolation and characterization of a bovine parainfluenza virus type 3 genotype C strain from an aborted Holstein fetus. *Front. Vet. Sci.* 2025; 12:1598013.