

На правах рукописи

КОТЕНЕВА СВЕТЛАНА ВЛАДИМИРОВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ ВИРУСОВ
РЕСПИРАТОРНОГО КОМПЛЕКСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И
ОСОБЕННОСТИ ИХ ЦИРКУЛЯЦИИ В СИБИРИ**

4.2.3 – Инфекционные болезни и иммунология животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора ветеринарных наук

Новосибирск 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Сибирском федеральном научном центре агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН)

Научный консультант: доктор ветеринарных наук, профессор,
член-корреспондент РАН
Глотов Александр Гаврилович

Официальные оппоненты: **Черных Олег Юрьевич**, доктор ветеринарных наук, профессор, профессор кафедры микробиологии, эпизоотологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет им. И.Т. Трубилина;

Мищенко Алексей Владимирович, доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник рабочей группы (отдела) по выполнению государственного задания в области биотехнологии и вирусологии ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН»;

Ильичёва Татьяна Николаевна, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела зоонозных инфекций и гриппа ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор».

Ведущая организация: **Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук» (ФГБНУ УрФА-НИЦ УрО РАН)**

Защита состоится « 10 » июня 2026 г. в «10-00» часов на заседании диссертационного совета 24.1.211.02, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского федерального научного центра агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН) по адресу: 630501, Новосибирская область, Новосибирский район, р.п. Краснообск, ул. Центральная, 7, СФНЦА РАН, а/я 463, тел/факс (383) 348-44-62, E-mail: ds.ievsidv@bk.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Сибирской научной сельскохозяйственной библиотеке и на сайте СФНЦА РАН: <https://sfzca.ru>; автореферат размещен на сайте ВАК: <https://vak.minobrnauki.gov.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, д-р биол. наук

Екатерина Владимировна
Нефедова

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В настоящее время в Российской Федерации активно развивается молочное животноводство, что обусловлено внутренним спросом на молочные продукты, расширением экспортных возможностей и государственными программами поддержки агропромышленного комплекса. Высокая концентрация животных на ограниченных по площади территориях повышает вероятность контактов между особями, что приводит к быстрому распространению патогенов. Кроме того, наличие импортных животных, которые могут быть носителями вирусов без проявления клинических признаков заболевания, увеличивает риск проникновения и распространения новых вирусных штаммов в популяцию (Глотов А.Г., Глотова Т.И., 2008; Донник И.М. и соавт., 2013).

Комплекс респираторных болезней крупного рогатого скота (КРС) – одна из основных причин экономического ущерба в молочном животноводстве, включающего снижение молочной продуктивности, замедление темпов роста, повышение уровня смертности и увеличение затрат на диагностические и лечебно-профилактические мероприятия (Мищенко В.А. и соавт., 2017; Нефедченко А.В. и соавт., 2017).

Этиология респираторных заболеваний носит мультифакторный характер и определяется сложной взаимосвязью инфекционных агентов, абиотических факторов среды и индивидуальных физиологических особенностей организма-хозяина (Werid G.M. et al., 2024; O'Donoghue S. et al., 2025).

Респираторные инфекции КРС характеризуются высокой вариабельностью клинических проявлений и течения, что зависит от вида возбудителя, уровня естественной резистентности и специфического иммунитета животного, условий содержания. Помимо развития респираторной патологии, многие вирусы респираторного комплекса оказывают системное влияние на организм животного, вызывая поражения и нарушения в других органах и системах, таких как пищеварительная, репродуктивная и иммунная. Это способствует развитию осложнений, снижению продуктивности, а также повышает риск вторичных инфекций (Глотов А.Г., Глотова Т.И., 2008).

Основными возбудителями комплекса респираторных заболеваний КРС являются вирусы инфекционного ринотрахеита (ИРТ, Bovine herpesvirus 1, BoHV-1), вирусной диареи-болезни слизистых (ВД-БС, Bovine viral diarrhea virus, BVDV), респираторно-синцитиальной инфекции (РСИ, Bovine respiratory syncytial virus, BRSV), коронавирусной инфекции (КВИ, Bovine coronavirus, BCoV), парагриппа-3 (ПГ-3, Bovine parainfluenza virus 3, BPIV-3), герпеса 4 типа (ГВ-4, Bovine herpesvirus 4, BoHV-4) КРС (Ellis J.A., 2009; Fulton R.W., 2009; Gaudino M. et al., 2022). Они вызывают респираторную патологию у восприимчивых животных как в форме моноинфекции, так и в ассоциации с другими патогенами, что приводит к синергическому взаимодействию между ними и усилению тяжести клинического течения заболевания (Brogden K.A., 2002). Первичное вирусное поражение дыхательных путей у КРС чаще всего сопровождается развитием вторичных бактериальных инфекций. Среди ведущих бактериальных возбудителей, вовлеченных в развитие комплекса респираторных заболеваний, выделяют *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni* и *Mycoplasma bovis* (Griffin D. et al.,

2010; Grissett G.P. et al., 2015), а также *Trueperella pyogenes* и ряд других агентов (Lima S.F. et al., 2016; Yamamoto S. et al., 2024). Эти микроорганизмы обладают способностью вызывать острые и хронические формы бронхопневмонии, осложняя течение заболевания, способствуют иммуносупрессии.

Учитывая многофакторную природу респираторных заболеваний у КРС, особое значение имеет проведение комплексной и точной диагностики, которая является ключевым этапом для разработки и реализации эффективных противоэпизоотических мероприятий. Исследование генетического разнообразия циркулирующих вирусов играет важную роль в понимании механизмов их распространения и совершенствовании стратегий профилактики, включая разработку эффективных вакцин и высокоспецифичных методов диагностики.

Степень разработанности темы. Широкое распространение вирусов респираторного комплекса КРС на территории нашей страны продемонстрировано в работах Н.Н. Крюкова (1972), Н.Ю. Басовой (2002), К.П. Юрова и соавт. (2003), А.Г. Глотова и Т.И. Глотовой (2008), В.А. Мищенко и соавт. (2009, 2011, 2012), И.Я. Строгановой (2011), О.Г. Петровой и соавт. (2015), Е.Н. Шиловой и соавт. (2014), А.В. Нефедченко (2018), В.В. Кирпиченко (2021) и др.

На протяжении последних десятилетий прогресс в области вирусологии был обусловлен разработкой и внедрением широкого спектра молекулярно-генетических методов исследования, которые позволили более детально анализировать молекулярную структуру инфекционных агентов, вызывающих заболевания, изучать их генетическое разнообразие и механизмы распространения.

В настоящее время для диагностики вирусных инфекций широко используется полимеразная цепная реакция (ПЦР). Разработке молекулярных методов диагностики респираторных инфекций КРС посвящены работы многих отечественных исследователей. Так, Т.И. Глотовой (2006) разработан ПЦР-ПДРФ метод для выявления и дифференциации полевых и вакцинных штаммов ИРТ КРС; К.В. Войтовой (2011) - ОТ-ПЦР для выявления BRSV с электрофоретической детекцией результата; А.В. Нефедченко (2018) - ОТ-ПЦР для выявления и генотипирования BVDV-1a, -1b и -2a; А.В. Пчельниковым (2024) – ПЦР в реальном времени для дифференциальной диагностики герпесвирусов крупного рогатого скота 1 и 5 типов в биологическом материале. Также в ветеринарных диагностических лабораториях применяются ПЦР тест-системы компаний ООО «ВЕТ ФАКТОР», ООО «Ветбиохим», ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, АО «Вектор-бест» и др.

Используемые в настоящее время в нашей стране тест-системы на основе ПЦР для диагностики ВД-БС КРС не позволяют выявлять BVDV-3 – новый вид вируса, впервые обнаруженный в 2004 г. в Европе в коммерческой эмбриональной сыворотке КРС, произведенной в Бразилии (Schirrmeier H. et al., 2004).

Поскольку респираторные болезни КРС имеют схожий симптомокомплекс и часто вызываются ассоциациями нескольких этиологических агентов, крайне важно использовать быстрый и удобный метод одновременного обнаружения патогенов. В нашей стране отсутствуют мультиплексные тест-системы для выявления вирусов респираторного комплекса КРС. В публикациях зарубежных исследователей представлены разработки мультиплексных ПЦР тест-систем для одно-

временной детекции нескольких респираторных вирусов (Kishimoto M. et al., 2017; Thonur L. et al., 2019; Zhang J. et al., 2022; Li L. et al., 2025).

Нецитопатогенные штаммы пестивирусов представляют значительный риск в качестве контаминантов различных биологических препаратов (Xia H. et al., 2011; Bauermann F.V. et al., 2014; Giammarioli M. et al., 2015; Pecora A. et al., 2019; Gómez-Romero N. et al., 2021). В России Л.В. Урываев и соавт. (2012) впервые выявили контаминацию культур клеток и коммерческой эмбриональной сыворотки пестивирусами. Важную роль в распространении пестивирусов в популяциях КРС могут играть контаминированные вакцины (Bruschke C.J. et al., 2001; Makoschey B. et al., 2003; Pastoret P.P., 2010; Gómez-Romero N. et al., 2021).

Актуальной проблемой отечественной ветеринарной вирусологии является отсутствие комплексных исследований по определению спектра циркулирующих на территории страны генетических вариантов вирусов КРС. Так, Т.И. Гловой (2006) при использовании ПЦР-ПДРФ анализа штаммов и изолятов BoHV-1 установлено распространение у КРС четырех генетических групп вируса. Г.К. Юровым и соавт. (2013) выявлена циркуляция субтипов BVDV-1a и BVDV-1m в популяциях домашнего скота и лесных бизонов. А.Г. Южаковым (2009) идентифицированы субтипы BVDV-1b, BVDV-1d и BVDV-2 в хозяйствах Сибири. А.В. Нефедченко (2018) выявил циркуляцию семи субтипов BVDV-1 и трех BVDV-2 среди телят с респираторной патологией в Сибири. В доступной литературе отсутствуют сведения об изучении генетического разнообразия BRSV в России. Недостаточно информации о распространении BoHV-4 у КРС на территории нашей страны, а изучение генотипов вируса проводилось только на территории Московской и Тверской областей А.В. Пчельниковым (2024), в результате чего установлена циркуляция среди КРС европейского генотипа BoHV-4. В.А. Кудрявцевым (2004) разработан метод выявления и штаммовой дифференциации BCoV, определена первичная структура переменных фрагментов HE и S генов изолятов коронавируса КРС на территории РФ.

Молекулярно-эпизоотологический мониторинг вирусных инфекций в конкретном регионе необходим для разработки эффективных мер борьбы с возбудителем, в частности, создания надежных диагностических тестов и оптимизации стратегии вакцинации, особенно в случаях, когда генетические типы вакцинных штаммов не соответствуют циркулирующим в популяции животных.

Цель и задачи исследования. Целью исследования являлась разработка методов диагностики на основе ПЦР, определение этиологической структуры респираторных болезней и изучение циркулирующих генетических вариантов основных вирусов респираторного комплекса КРС в хозяйствах Сибири.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать и изучить диагностическую эффективность тест-систем: для выявления BVDV-3 методом ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией результата, для выявления и дифференциации трех видов пестивирусов КРС методом ОТ-ПЦР-РВ, для выявления и количественного определения BRSV методом ОТ-ПЦР-РВ, для выявления BoHV-4 методом ПЦР-РВ, для одновременного выявления 8 вирусов респираторного комплекса КРС методом ОТ-ПЦР-РВ.

2. Определить этиологическую структуру респираторных болезней КРС в хозяйствах Сибири в целом и с учетом наличия/отсутствия ввоза в хозяйства импортных животных, их концентрации, а также изучить особенности их течения.

3. Изучить основные пути распространения вирусов в хозяйствах (контаминация спермы быков-производителей BoHV-1 и BVDV, установление роли спермы в распространении вирусов; контаминация эмбриональных сывороток, клеточных культур пестивирусами КРС).

4. Выявить молекулярно-эпизоотологические особенности распространения BVDV, BRSV, BCoV, BoHV-4, циркулирующих в популяциях КРС на территории Сибири, и оценить степень их генетической variability.

Научная новизна. Разработаны тест-системы на основе ПЦР для выявления вирусов респираторного комплекса КРС: ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией результата для выявления генома BVDV-3, ОТ-ПЦР-РВ для выявления и дифференциации трех видов пестивирусов КРС, ОТ-ПЦР-РВ для выявления и количественного определения BRSV, ПЦР-РВ для выявления BoHV-4, определены их аналитическая чувствительность и диагностическая эффективность. Впервые в РФ разработана мультиплексная ОТ-ПЦР-РВ для одновременного выявления геномов восьми вирусов КРС: BoHV-1, BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3, BRSV, BoHV-4, BCoV, BPIV-3.

С использованием разработанных тест-систем изучена этиологическая структура респираторных болезней КРС и установлено широкое распространение вирусов BoHV-1, BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3, BRSV, BoHV-4, BCoV, BPIV-3 среди животных разных возрастных групп в молочных хозяйствах Сибири.

Впервые в РФ на крупном молочном комплексе выявлена и генетически подтверждена сочетанная инфекция BVDV-1b и BVDV-2a после импорта скота, установлены особенности её клинического течения и тканевая локализация возбудителей.

Впервые в структуре инфекционной патологии КРС в РФ идентифицирован и филогенетически охарактеризован BVDV-3a, установлен факт заноса вируса в ранее благополучные хозяйства с контаминированной вакциной и изучены особенности клинического проявления инфекции.

Установлена контаминация пестивирусами следующих биологических препаратов: эмбриональной сыворотки (BVDV-3a, BVDV-1a, BVDV-1j), перевиваемых культур клеток различного происхождения (BVDV-1a, BVDV-1j) и живой ветеринарной вакцины (BVDV-3a).

Доказана передача BoHV-1 и BVDV при искусственном осеменении коров через сперму инфицированных быков-производителей с последующими вспышками гинекологических болезней в хозяйствах.

Впервые проведен комплексный молекулярный анализ изолятов BVDV, определена генетическая структура популяции BVDV у высокопродуктивных животных. Установлена циркуляция широкого спектра генетических вариантов, включающего восемь субтипов BVDV-1 (1a, 1b, 1c, 1d, 1f, 1i, 1p, 1r) с доминированием 1b – 39,6%, три субтипа BVDV-2 (2a, 2b, 2c) и субтип BVDV-3a. Выявлена специфическая взаимосвязь между генетическими вариантами вируса и клиническими синдромами у больных животных. Определен высокий патогенный потенциал BVDV-2 и BVDV-3 в развитии системных и репродуктивных поражений.

Доказана роль импорта племенного скота как ключевого фактора трансграничного заноса и диссеминации штаммов BVDV. Впервые проведена дифференциация циркулирующих субтипов BVDV по источнику происхождения: выявлены строго экзогенные (импортные) варианты (1a, 1c, 1p, 2c), смешанные, адаптированные к местной популяции (1b, 1f, 1d, 1r, 2a, 2b) и энзоотический субтип 1i, циркуляция которого ограничена популяцией местного скота. Впервые показан риск ятрогенного инфицирования скота BVDV-3a вследствие применения контаминированных биопрепаратов.

Впервые в РФ на основе филогенетического анализа полной нуклеотидной последовательности гена G BRSV генетически дифференцированы штаммы, циркулирующие у молочного скота в Сибири. Штаммы вируса принадлежали к подгруппам II, III и независимой кладе. Данные о первичной структуре гена G семи штаммов BRSV депонированы в базу данных GenBank (номера OR426499 - OR426505).

Установлена значительная генетическая вариабельность изолятов BCoV, идентифицированных у молочного скота в Сибири. На основании филогенетического анализа фрагментов генов S и N доказано одновременное присутствие в регионе представителей европейской и американо-азиатской линий. Последовательности вируса депонированы в базу данных GenBank под номерами OP651999 - OP652028.

Выявлена циркуляция американского (DN 599-like) и европейского (Movar-like) генотипов BoHV-4 на основе филогенетического анализа участка гена gL среди КРС в Сибири.

Научная новизна подтверждена пятью патентами РФ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные расширяют научные знания об этиологической роли вирусов в развитии массовых респираторных патологий КРС и служат теоретическим фундаментом для дальнейшего изучения особенностей патогенеза вирусных инфекций, механизмов формирования смешанных инфекций, а также для оптимизации схем лечебно-профилактических мероприятий в промышленных животноводческих комплексах.

Теоретическая значимость изучения генетического разнообразия циркулирующих штаммов вирусов заключается в углублении представлений о механизмах их эволюции и адаптационном потенциале, а также научном обосновании систем молекулярно-генетического мониторинга эпизоотической ситуации.

Разработанные тест-системы позволяют повысить эффективность выявления вирусов респираторного комплекса. Данные о генетическом полиморфизме штаммов вирусов необходимы для создания эффективных вакцин, обеспечивающих перекрестную защиту против циркулирующих на конкретной территории гетерологичных вариантов.

Таким образом, внедрение комплексного подхода к диагностике болезней респираторного комплекса КРС с применением современных молекулярно-генетических методов в практику ветеринарных лабораторий позволит оптимизировать систему противоэпизоотических мероприятий. Материалы диссертации использованы при разработке двух методических пособий.

Методология и методы исследований. Методология диссертационной работы спланирована в соответствии с ее структурой и задачами исследования, а

выводы сформулированы на основе комплексного анализа и обобщения полученных данных. При выполнении диссертационной работы использованы молекулярно-генетические (выделение нуклеиновых кислот, ПЦР и ОТ-ПЦР с электрофоретической и гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации, секвенирование), вирусологические (культивирование и выделение вирусов), бактериологические и биоинформационные методы анализа со статистической обработкой полученных данных.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Диагностические тест-системы: ОТ-ПЦР для выявления BVDV-3 с электрофоретической детекцией результата, ОТ-ПЦР-РВ для выявления и дифференциации трех видов пестивирусов КРС, ОТ-ПЦР-РВ для выявления и количественного определения BRSV, ПЦР-РВ для выявления BoHV-4, ОТ-ПЦР-РВ для одновременного выявления восьми вирусов респираторного комплекса КРС.

2. Этиологическая структура болезней респираторного комплекса КРС в молочных хозяйствах Сибири с разной концентрацией и продуктивностью животных и наличием/отсутствием завезенного поголовья из-за рубежа.

3. Генетический полиморфизм циркулирующих на молочных комплексах Сибири штаммов BVDV трех видов, BRSV, BCoV и BoHV-4.

Степень достоверности и апробация результатов. Степень достоверности подтверждается проведением исследований на сертифицированном современном оборудовании, статистически значимым количеством исследований в лабораторных, экспериментальных и научно-производственных условиях.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на международных и всероссийских научных конференциях: Международной научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения - 10: новые перспективы подготовки конкурентоспособных кадров и роль науки в формировании индустриально - инновационной политики страны», посвященной 120-летию со дня рождения С. Сейфуллина (Астана, Казахстан, 2014 г.); IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (Москва, 2017 г.); XVIII Всероссийской конференции молодых учёных, посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2018 г.); X юбилейной международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика» (Москва, 2021 г.); научно-практической конференции с международным участием «Научные достижения генетики и биотехнологии в ветеринарной медицине и животноводстве» (Екатеринбург, 2021 г.); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы лечения и профилактики болезней молодняка» (Витебск, Белоруссия, 2022 г.); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы инфекционной патологии животных и пути их решения», посвященной Дню Белорусской науки и 95-летию кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней (Витебск, Белоруссия, 2023 г.); Международной научно-практической конференции «Биотехнология: научные исследования и связь с производством» (Лосино-Петровский, 2024 г.),

Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы лечения и профилактики болезней молодняка» (Витебск, Белоруссия, 2025 г.)

Личный вклад автора. Автор непосредственно принимала участие во всех этапах планирования и проведения диссертационного исследования: научно-информационный поиск, планирование экспериментов, анализ лабораторных данных. Самостоятельно сформулированы цели и задачи, проведено научное обобщение результатов, представленных в работе, выводы, практические рекомендации, подготовлены материалы к публикации.

Соответствие содержания диссертации паспорту специальности. Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 4.2.3 Инфекционные болезни и иммунология животных по п.п. 3, 4, 6 и 7.

Публикации научных исследований. По теме диссертации опубликованы 54 научные работы, из них 20 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и 13 – в международных рецензируемых журналах Scopus и Web of Science, получено 5 патентов на изобретение РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 312 страницах компьютерного текста, содержит разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, практические предложения, список сокращений и условных обозначений, список использованной литературы, приложения. Диссертация иллюстрирована 38 таблицами, 37 рисунками. Список литературы содержит 466 источников, в том числе 378 иностранных авторов.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному консультанту, члену-корреспонденту РАН А.Г. Гловову за неоценимую помощь и поддержку в работе на всех ее этапах, в организации и проведении работ, представленных в диссертации. Автор искренне признателен и благодарен сотрудникам СФНЦА РАН: ведущему научному сотруднику, доктору ветеринарных наук, доценту А.В. Нефедченко и главному научному сотруднику, доктору биологических наук, профессору Т.И. Гловой, а также заведующему лабораторией биохимии и молекулярной биологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, кандидату биологических наук А.Г. Южакову, сотрудникам отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора: ведущему научному сотруднику, кандидату медицинских наук С.А. Бодневу и научному сотруднику, кандидату биологических наук И.А. Драчковой за помощь в выполнении отдельных этапов работы. Участие коллег отражено в совместных публикациях.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

Работа выполнена в 2014-2025 гг. в лаборатории биотехнологии-диагностический центр Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Сибирского федерального научного центра агrobiотехнологий Российской академии наук, хозяйствах Новосибирской, Томской, Кемеровской, Омской, Тюменской, Иркутской областей, Алтайского и Красноярского краев и Республики Казахстан.

Образцы биологического материала. Исследовано 6964 пробы биологического материала от КРС разных возрастных групп с признаками респираторной патологии; 166 проб – от абортированных плодов и мертворожденных телят; 442 пробы – от телят с диареей, 4850 парных проб сыворотки крови от КРС разных возрастных групп из 131 животноводческого хозяйства. Исследовано 13426 проб спермы, полученной в 1985 - 2021 гг. от 274 быков-производителей одного из племпредприятий; 30 образцов эмбриональной сыворотки разных серий и производителей. Пробы органов и тканей гомогенизировали и готовили 10%-ную суспензию на стерильном физиологическом растворе, центрифугировали при 5000 об/мин, 100 мкл супернатанта использовали для выделения нуклеиновых кислот. Пробы спермы разводили стерильным физиологическим раствором 1:3 и использовали для выделения ДНК. Пробы сыворотки крови исследовали без предварительной подготовки.

Культуры клеток. В работе использовали перевиваемые культуры клеток MDBK, KCT, FK-81, FBT, Taurus, RK-13, MF, ТЭБ, Vero, FLK, ВНК-21, CRFK, L929, FS из коллекции ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, первично трипсинизированные культуры клеток тестикул бычков и почки теленка.

Штаммы вирусов. Для определения специфичности ПЦР использовали вирусы: BoHV-1 (Опенбург); BVDV-1 (Oregon C24V); BVDV-2 (Blagodatsky); BRSV (PCB №3); BCoV (КМИЭВ-1); BoHV-4 (Movar 33/63); BPIV-3 (SF-4); CSFV (ЛК); BAdV-1 (BV-10); BRV (SD-1); SuHV-1 (Арский) из коллекции лаборатории ИЭВ-СиДВ СФНЦА РАН.

Вирусологические исследования. Выделение вирусов в культурах клеток, определение инфекционной активности вирусов проводили согласно стандартам МЭБ (OIE, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.4.8. и 2.4.13, 2015-2023).

Выделение нуклеиновых кислот и обратная транскрипция. Выделение ДНК/РНК проводили с использованием наборов «Рибо-преп», «ДНК-сорб-В», а обратную транскрипцию - «Реверта-Л» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) согласно инструкциям производителя.

Подбор праймеров и зондов для ПЦР. Выбор олигонуклеотидных праймеров и зондов осуществляли на основе анализа нуклеотидных последовательностей геномов вирусов, представленных в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/GenBankSearch.html>), при помощи пакета программного обеспечения «Lasergen». Полученные последовательности пар праймеров дополнительно тестировали на специфичность с помощью моделирования ПЦР в программе «Vector NTI Suite».

Постановка ПЦР. Для постановки ПЦР использовали химические реактивы производства ООО «Лаборатория Медиген» (Россия), BIORON GmbH (Германия), «Евроген» (Россия), ООО «Биолабмикс», Россия. Составы реакционных смесей и температурные режимы ПЦР изложены в соответствующих разделах.

Реакцию амплификации проводили с использованием приборов БИС-110 (ООО «БИС-Н», Россия), Терцик (ООО «ДНК-Технология», Россия) и CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США).

Электрофоретический анализ продуктов ПЦР. Амплифицированные фрагменты ДНК разделяли в 2 % агарозном геле в присутствии бромистого этидия в стандартном трис-боратном буфере. Результаты электрофореза учитывали, просматривая гель в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на трансиллюминаторе TSP-20 LM (Viber Lourmat Франция) и фиксируя с использованием системы гельдокументирования «Биотест-1» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия).

Секвенирование. Секвенирование проводили по методу Сэнгера с помощью набора реагентов BigDy v.3.1 на автоматических секвенаторах «ABI Prism 3130xl DNA analyzer» и GeneAmp PCR-system 6700 (Applied Biosystems, США). Полученные нуклеотидные последовательности анализировали при помощи пакетов программ BioEdit 7.0.0, Lasergene 7.1.0, Lasergene 11.1.0 (DNASTAR, США), UGENE (v. 45.1), BioEdit. Выравнивание последовательностей проводили с использованием метода ClustalW. Филогенетические дендрограммы строили с использованием метода максимального правдоподобия в программе MEGA 7.0, MEGA 11.0. Топологию ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа.

Получение положительных контрольных образцов. Положительные контрольные образцы (ПКО) получали методом молекулярной трансформации компетентных бактериальных клеток *Escherichia coli* плазмидами pDrive, pCR2.1 (Invitrogen, США), содержащими специфические ДНК-вставки участков геномов возбудителей. Концентрацию плазмидной ДНК определяли с использованием набора реагентов Quant-iT dsDNA, HS (Invitrogen, США) и флуориметра QUBIT (Invitrogen, США).

Математические расчеты. Достоверность результатов подтверждали путем статистической обработки и определения различий средних значений с помощью критерия Стьюдента. Взаимосвязь между параметрическими и непараметрическими показателями определяли методом корреляционно-регрессионного анализа, а также теста Хи-квадрат. Статистически значимыми считались результаты при уровне значимости $p < 0,05$. При статистической обработке полученных результатов использовали стандартные статистические методы и пакет программ Statistica 10 (Tibco, США).

2.2 Результаты собственных исследований

2.2.1 Разработка диагностических тест-систем на основе ПЦР для выявления геномов основных вирусов респираторного комплекса крупного рогатого скота

2.2.1.1 Тест-система для выявления BVDV-3 методом ПЦР с электрофоретической детекцией

Для выбора праймеров с использованием программы ClustalW проанализированы нуклеотидные последовательности BVDV трех видов, опубликованные в GenBank. Были выбраны праймеры, комплементарные позициям 9202-9218 и 9501-9521 гена NS5A прототипного штамма D32/00_‘HoBi’ (AB871953.1): SEQ ID NO:1 5'-tttgcagccgagcgtag-3', SEQ ID NO:2 5'-cctcctgcatactgtcacctt-3. Размер амплифицированного фрагмента составил 320 п.н.

Состав реакционной смеси для амплификации кДНК BVDV-3: ПЦР-буфер (60 mM Tris-HCl [pH 8.5], 1,5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 10 mM 2-меркаптэтанол, 0,1% Тритон X-100), 0,2 mM dNTP, по 0,1 мкг каждого праймера, 1.25 U Taq-ДНК-полимеразы, 5 мкл кДНК.

Температурный режим проведения ПЦР: 95⁰С – 5мин. - 1 цикл; 95⁰С – 45 сек., 60⁰С – 45 сек., 72⁰С – 1 мин. - 40 циклов; 72⁰С – 5 мин.

При определении специфичности установили, что ПЦР выявляла только кДНК положительного контроля BVDV-3, геномы других вирусов не были выявлены.

Оценку чувствительности реакции проводили, исследуя в ПЦР последовательные десятикратные разведения ПКО в концентрациях от $7,4 \times 10^{10}$ до $7,4 \times 10^0$ копий/мкл в трех повторах. Чувствительность ПЦР составила $7,4 \times 10^1$ копий/мкл.

С помощью разработанной тест-системы в 2016-2019 гг. исследовали 18 образцов коммерческих эмбриональных сывороток КРС зарубежных производителей (Южная Америка, США, Новая Зеландия), используемых для культивирования культур клеток и производства биопрепаратов в ветеринарии, а также 189 проб внутренних органов и 1383 пробы сыворотки крови КРС, 168 проб сыворотки крови северных оленей и 63 – крови маралов.

Геном BVDV-3 был выявлен в семи образцах эмбриональной сыворотки от двух производителей из Южной Америки. В пробах внутренних органов и сыворотки крови от животных BVDV-3 не был выявлен.

По результатам секвенирования и филогенетического анализа установлена высокая гомология всех положительных проб со штаммом D32/00 "HoBi", что подтверждает их принадлежность к итало-бразильской группе BVDV-3a.

2.2.1.2 Тест-система для выявления и дифференциации пестивирусов крупного рогатого скота методом ОТ-ПЦР-РВ

В условиях широкого распространения BVDV-1, BVDV-2 и риска присутствия BVDV-3 в России возникла необходимость в разработке диагностической тест-системы на основе мультиплексной ПЦР-РВ для быстрого одновременного выявления и дифференциации пестивирусов КРС трех видов. В качестве мишени была выбрана область 5'-UTR.

ПЦР проводили в два раунда. В первом выявляли все три вида BVDV (PVsp F 5-ccatrccttagtaggackagc-3; PVsp R 5-tcaactccatgtgccatgtac-3, PVsp Z 5(FAM)-ctcgagatgccaygtggacgagg-3(BHQ1), во втором - проводили дифференциацию видов пестивирусов (для BVDV-1: PVA F 5-ggtagcaacagtggtagtt-3; PVA R 5-cgtccacgtggcatctc-3; PVA Z 5(FAM)-tagtcgtcagtggttcgacgcct-3(BHQ1); для BVDV-2 PVB F 5-ctagcgatgcccttagtag-3; PVB R 5-cgtcgaagcattgacgact-3; PVB Z 5(FAM)-tagcggttagcagtgagttcattggatggcc-3(BHQ1), для BVDV-3: PVsp F5-ccatrccttagtaggackagc-3; PVH R 5-tccttgatgcgtcgaacca-3; PVH Z 5(FAM)-tagtggttagcagtgagctccttgat-3(BHQ1).

Состав реакционной смеси для амплификации кДНК пестивирусов: ПЦР-буфер (60 mM Tris- HCl [pH 8.5], 1,5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 10 mM 2-

меркаптэтанола, 0,1% Тритон X-100), 0,2 мМ dNTP, по 0,2 мкг каждого праймера, по 0,1 мкг каждого зонда, 1.25 U Taq-ДНК - полимеразы, 5 мкл кДНК.

Температурный режим ПЦР для выявления пестивирусов: 95 °С – 5 мин. – 1 цикл; 95 °С – 10 сек, 57 °С – 15 сек., 72 °С – 30 сек. – 45 циклов; для дифференциации: 95 °С – 5 мин. - 1 цикл; 95 °С – 10 сек, 55 °С – 15 сек., 72 °С – 30 сек. – 45 циклов. Измерение флуоресценции осуществляли при температуре 55 °С (для первого раунда) и 57 °С (для второго раунда) на канале FAM. Положительными считали образцы со значением $C_t < 40$.

При определении специфичности разработанная ПЦР выявляла только геномы пестивирусов KPC трех видов.

Аналитическая чувствительность реакции составила, копий/мкл, для BVDV – 32, BVDV-1 – 15, BVDV-2 – 18, BVDV-3 – 3×10^2 . Стандартные отклонения C_t варьировали от 0,12 до 0,55. Средние коэффициенты вариаций значений пороговых циклов не превышали 1,91%, что свидетельствует о высокой повторяемости результатов ОТ-ПЦР.

Для определения диагностической чувствительности реакции исследовали в ПЦР десятикратные разведения референтных штаммов BVDV-1 и BVDV-2 с титрами инфекционной активности 6,2 lg ТЦД₅₀/см³ и 5,6 lg ТЦД₅₀/см³ соответственно. Все исследования проводили в трех повторях. Диагностическую чувствительность реакции со штаммами BVDV-3 не определяли по причине их отсутствия в нашей коллекции. Минимальный титр штамма Oregon C24V (BVDV-1), выявляемый в реакции, составил 1,2 lg ТЦД₅₀/см³, а штамма Blagodatsky (BVDV-2) – 0,6 lg ТЦД₅₀/см³.

Результаты сравнительных испытаний показали, что разработанная ПЦР-тест-система для выявления и дифференциации пестивирусов и метод ПЦР с электрофоретической детекцией обладают идентичной диагностической эффективностью, выявляя целевые патогены в одинаковом количестве проб.

2.2.1.3 Тест-система для выявления и количественного определения BRSV методом ОТ-ПЦР-РВ

Подбор олигонуклеотидных праймеров и зондов проводили на основе нуклеотидных последовательностей штаммов вируса BRSV, представленных в базе данных GenBank.

Были разработаны праймеры и зонд для выявления фрагмента gN BRSV: SEQ ID NO:1 5-atgctgcaggactaggtataatgg-3; SEQ ID NO:2 5-acactgtaattgatgacccattctc-3; SEQ ID NO:3 5-(FAM) atgctgccaaagcatatgcggaacaca-3(BHQ1). В качестве внутреннего контроля использовали праймеры и зонды к мРНК гена GAPDH KPC, разработанные Zhao H. et al. (2016): SEQ ID NO:4 5-gatgggtgaaggctcgagtgtaac-3; SEQ ID NO:5 5-gtcattgatggcgacgatgt-3; SEQ ID NO:6 5(ROX)-ctggctcaccagggtgctt-3(BHQ2).

Состав реакционной смеси для амплификации кДНК BRSV: ПЦР-буфер (60 mM Tris-HCl [pH 8.5], 1,5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 10 mM 2-меркаптэтанола, 0,1% Тритон X-100), 0,2 мМ dNTP, по 0,2 мкг каждого праймера, по 0,1 мкг каждого зонда, 1.25 U Taq-ДНК-полимеразы, 5 мкл кДНК.

Температурный режим ПЦР: 95°C – 5 мин. – 1 цикл; 95°C – 15 сек, 60°C – 1 мин. – 45 циклов. Измерение флуоресценции осуществляли при температуре 60°C на каналах FAM (для BRSV) и Texas Red (для гена GAPDH KPC). Положительными считали образцы со значением Ct <37.

При оценке специфичности реакции положительный результат был получен только с РНК штамма и изолятов BRSV и отсутствовал с РНК других вирусов.

Аналитическая чувствительность ПЦР для выявления gN BRSV составила 2,5 копий/мкл, а гена GAPDH – 1,2 копии/мкл. Коэффициент вариаций для разных разведений находился в пределах 0,32 - 3,57%, что свидетельствует о высокой эффективности реакции.

С помощью тестирования десятикратных разведений контрольного штамма BRSV «PCB №3» определена эффективность реакции для количественной оценки концентрации вирусной РНК. Предел чувствительности реакции составил 10^{0,5} ТЦЦ₅₀/см³, что соответствовало 5 lg ПКО/см³.

Для сравнения диагностической эффективности разработанной ОТ-ПЦР-РВ параллельно провели исследование 273 проб биологического материала с использованием тест-системы с электрофоретической детекцией, разработанной нами ранее (Патент № 2405039). Результаты исследования показали, что вирус присутствовал в 19,4% проб. BRSV выявляли в легких (10,6%), трахеальном и бронхиальном экссудатах (4,0%), носовых выделениях (2,2%), бронхах (1,1%), слизистых оболочках трахеи, бронхов и в легочных лимфатических узлах. Результаты двух ПЦР полностью совпали.

Для определения концентрации вируса в пробах биоматериала сопоставляли значения пороговых циклов разведений ПКО и GAPDH с известной концентрацией со значениями Ct исследуемых проб и выражали в lg BRSV/GAPDH. Самые высокие концентрации вируса отмечались в легочной ткани (1,3±0,5— 4,8±0,47 lg копий РНК BRSV/GAPDH), носовых секретах (1,5±0,75—2,1±0,25 lg копий РНК BRSV/GAPDH) и экссудатах из трахеи, бронхов, носа) (0,3±0,21—2,8±0,15 lg копий РНК BRSV/GAPDH).

2.2.1.4 Тест-система для выявления ВоНВ-4 методом ПЦР-РВ

В качестве мишени для амплификации был выбран ген gL вируса. Подобраны праймеры и зонд: SEQ ID NO:1 5-acatcacattaaacccattggc-3; SEQ ID NO:2 5-actccttctgtgtttaacctatcag -3; SEQ ID NO:3 5(FAM)- caattggaatgtgctgtggt -3(BHQ1).

В качестве ПКО в ПЦР использовали рекомбинантную плазмидную ДНК pCR2.1, содержащую нуклеотидную последовательность фрагмента гена gL.

Амплификацию проводили в 30 мкл реакционной смеси, включавшей набор реагентов БиоМастер UDG HS-qPCR (ООО «Биолабмикс», Россия), 10 pM каждого праймера и зонда, а также 5 мкл ДНК.

Температурный режим ПЦР: 95°C – 5 мин. – 1 цикл; 95°C – 15 сек, 60°C – 20 сек., 72°C – 20 сек. - 10 циклов; 95°C – 15 сек, 57°C – 1 мин. - 35 циклов. Измерение флуоресценции проводили на канале FAM при температуре 57°C. Результат считали положительным при Ct <35.

По результатам анализа ПЦР выявляла только ДНК BoHV-4 и не выявляла генетический материал других вирусов.

Для определения аналитической чувствительности реакции использовали последовательные десятикратные разведения ПКО с концентрациями от $5,3 \times 10^4$ до $5,3 \times 10^0$ копий/мкл. Аналитическая чувствительность реакции составила 5,3 копий/мкл, эффективность амплификации – 94,6%. Коэффициент вариации составил не более 1,78% для внутрисерийной и 2,21% для межсерийной воспроизводимости, что подтверждает высокую воспроизводимую и стабильность полученных результатов.

Для определения эффективности разработанной ПЦР провели исследование 350 проб биоматериала от животных с признаками респираторных, желудочно-кишечных и гинекологических патологий. Геном BoHV-4 был выявлен в 20,7% исследованных проб биоматериала. Чаще вирус выявляли в пробах носовых выделений (60%), легких (40%), бронхиальных лимфатических узлов (30%), слизистой трахеи (26,7%).

2.2.1.5 Тест-система для одновременного выявления восьми вирусов респираторного комплекса крупного рогатого скота методом ОТ-ПЦР-РВ

Для идентификации геномов возбудителей использовали синтетические олигонуклеотидные праймеры и зонды, на которые получен патент № 2798286.

Выявление вирусов проводили в двух параллельных реакциях, в каждой по 4 возбудителя. В первой выявляли геномы BoHV-1, BoHV-4, BPIV-3, BRSV, а во второй – BCoV, BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3. В качестве внутреннего контроля выделения РНК/ДНК и обратной транскрипции использовали праймеры и зонд для выявления гена GAPDH KPC.

ПЦР проводили с использованием набора БиоМастер ОТ-ПЦР-РВ (2х) (Биолабмикс, Россия) в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 0,1 мкл 100мМ раствора каждого праймера, 0,05 мкл 100мМ раствора каждого зонда, 5 мкл выделенных нуклеиновых кислот.

Температурный режим ПЦР: 50°C – 30 мин., 95°C – 5 мин. – 1 цикл; 95°C – 15 сек, 60°C – 1 мин. – 45 циклов.

Измерение флуоресценции проводили при 60°C в первой реакции на канале FAM – для BoHV-1, HEX - BoHV-4, Texas Red - BPIV-3, Cy5 - BRSV, Quasar 750 – GAPDH KPC; во второй реакции на канале FAM – для BCoV, HEX – BVDV-1, Texas Red - BVDV-2, Cy5 – BVDV-3, Quasar 750 – GAPDH KPC. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения амплификатора. Положительными считали образцы со значением $C_t < 37$.

Разработанные системы праймеров и зондов продемонстрировали высокую специфичность, в условиях мультиплексного анализа отсутствовали перекрестные реакции между целевыми последовательностями.

Аналитическую чувствительность мультиплексной ПЦР оценивали путем определения предела обнаружения для каждой мишени с использованием серии десятикратных разведений ПКО, содержащих целевые последовательности геномов вирусов, с концентрацией от 10^6 до 10^1 копий/мкл. Эффективность ПЦР рас-

считывалась автоматически при помощи программного обеспечения амплификатора CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США).

Предел обнаружения для BoHV-1, BoHV-4, BPIV-3, BRSV, BCoV, BVDV-3 составил 10 копий/мкл, BVDV-1 и BVDV-2 – 10^2 копий/мкл, а эффективность амплификации – от 87,9 до 118,9%.

При оценке внутрисерийной воспроизводимости коэффициент вариации не превышал 2,04%, а межсерийной – 2,67%, что подтверждает высокую точность, повторяемость и воспроизводимость анализа.

Для определения сравнительной диагностической эффективности разработанной мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ провели параллельное исследование в ПЦР в моно-формате 255 проб биологического материала от телят с признаками респираторных болезней. Результаты мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ полностью совпали с ПЦР в моно-формате, при этом эффективность выявления BPIV-3 с помощью мультиплексной ПЦР была выше.

Разработанная мультиплексная тест-система на основе ОТ-ПЦР-РВ оптимизирует диагностику, сокращая время анализа одной пробы до 1,5 часов (в 4 раза быстрее моноспецифических аналогов). Одновременная детекция нескольких мишеней минимизирует риск субъективных ошибок и снижает расход реагентов, что обуславливает экономическую эффективность метода при массовом скрининге.

2.2.2 Этиологическая структура болезней респираторного комплекса крупного рогатого скота в молочных хозяйствах Сибири

В 2015-2024 гг. для изучения этиологической структуры респираторных болезней КРС с использованием разработанных тест-систем на основе ПЦР исследовали 6964 пробы биоматериала от животных разных возрастных групп из 131 животноводческого хозяйства Сибири.

В этиологической структуре массовых респираторных болезней в хозяйствах молочного направления лидирующую позицию занимала ВД-БС КРС: вирусы трех видов были выявлены в 20,3% проб биоматериала от животных. При этом геном BVDV-1 был обнаружен в 16,0%, BVDV-2 – в 3,1%, BVDV-3 – в 1,2% проб. BoHV-1 выявили в 14,9%, BoHV-4 – 12,6%, BCoV – 9,4%, BPIV-3 – 6,3%, BRSV – 6,1% проб биоматериала. Из бактериальных агентов в пробах чаще присутствовали *Pasteurella multocida* (28,0%) и *Mannheimia haemolytica* (25,5%), реже - *Histophilus somni*, *Trueperella pyogenes*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumonia* (от 1,5 до 9,0%).

Всего вирусные агенты респираторного комплекса были обнаружены в 69,1%, а бактериальные – в 77,8% проб биологического материала.

2.2.2.1 Этиологическая структура болезней респираторного комплекса крупного рогатого скота в хозяйствах разных категорий

Эпизоотическая ситуация по инфекционным болезням неодинакова в хозяйствах с различной концентрацией животных, молочной продуктивностью, комплектованием поголовья высокопродуктивным импортным скотом. Поэтому изучение особенностей эпизоотической ситуации по респираторным болезням в за-

висимости от концентрации животных, наличия или отсутствия ввода новых животных, циркулирующих вирусных и бактериальных агентов имеет важное значение при планировании профилактических мероприятий.

В данном исследовании молочные хозяйства были разделены на три группы. Первая группа включала 15 крупных молочных комплексов, в которые осуществлялись поставки высокопродуктивного импортного скота. Поголовье составляло 1000 и более дойных коров, а среднегодовая молочная продуктивность более 7000 л молока.

Ко второй группе отнесли 57 крупных хозяйств, в которые не осуществлялся завоз импортного скота. Поголовье составляло более 800 дойных коров со среднегодовой продуктивностью 4000-7000 л молока.

В третью группу включили 59 мелких и средних товарных ферм с поголовьем до 300 дойных коров и продуктивностью 3000 – 4000 л молока, в которых последние несколько лет не происходило ввода новых животных.

Провели исследование проб биоматериала от животных разных возрастов в количестве: в хозяйствах из первой группы – 2280, второй – 2480, третьей – 1629.

Этиологическая структура болезней респираторного комплекса КРС на молочных комплексах с завозом импортного скота представлена на рисунке 1. В 2015–2024 гг. ведущими патогенами являлись BVDV (25,3%) и BoHV-1 (19,5%). Итого, генетический материал вирусов респираторного комплекса выявили в 84,8% проб биоматериала КРС. Бактерии респираторного комплекса выделены из 69,7% исследованных проб биоматериала.

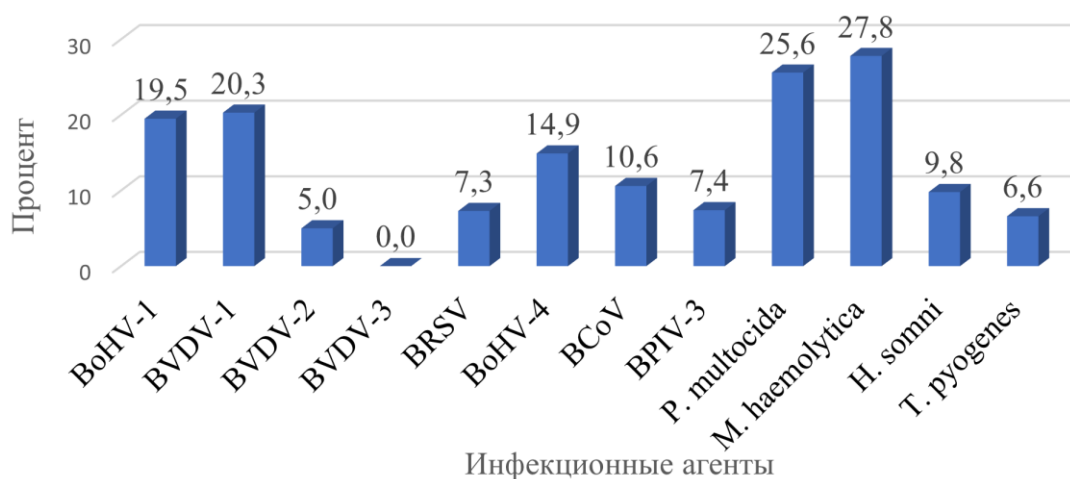


Рисунок 1 – Частота выявления инфекционных агентов при вспышках респираторных болезней КРС на крупных молочных комплексах с импортным скотом, %

На рисунке 2 представлен спектр инфекционных агентов на молочных комплексах, не использующих импортное поголовье. Вирусы респираторного комплекса были выявлены в 68,7% проб биоматериала от больных и павших животных с доминированием BVDV (20,6%) и BoHV-1 (14,1%). Наиболее часто выявляли BVDV-1 (16,3%), реже BVDV-2 (1,5%) и впервые выявлен BVDV-3 (2,8%). Бактерии респираторного комплекса выделены из 79,9% проб биоматериала.

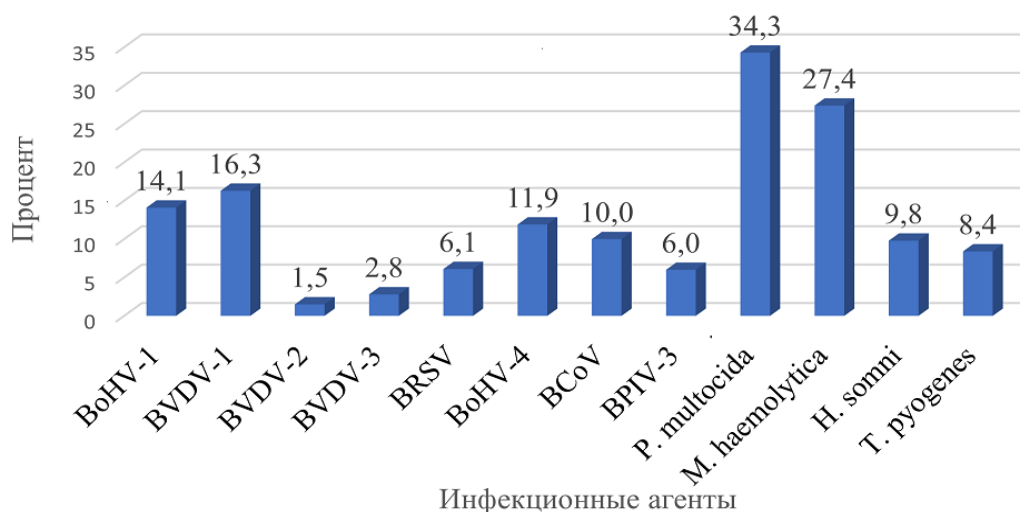


Рисунок 2 – Частота выявления инфекционных агентов при вспышках респираторных болезней КРС на крупных молочных комплексах без импорта, %

У КРС в мелких и средних хозяйствах установили присутствие широкого спектра вирусов респираторного комплекса в 47,1% проб биоматериала, а бактерий – в 88,7% (рисунок 3). Ограниченная численность поголовья и минимизация заноса экзогенных вирусных патогенов на малые предприятия способствуют снижению интенсивности циркуляции вирусов. Дефицит строгого контроля за соблюдением ветеринарных и зоогигиенических регламентов обуславливает превалирование патологий бактериальной этиологии в структуре заболеваемости.



Рисунок 3 – Частота выявления инфекционных агентов при вспышках респираторных болезней КРС на мелких товарных фермах, %

На крупных молочных комплексах с завозом скота из других стран наиболее часто происходила циркуляция вирусно-бактериальных ассоциаций (48,6%); выявление вирусов в моноварианте, согласно нашим исследованиям, составило 25,2%, а бактерий – 13,5%. В структуре выявленных моноинфекций доминировали BoHV-1 (28,6%), BVDV-1 (27,0%) и BRSV (24,6%). Доли BVDV-2, BCoV и BoHV-4 в общей структуре моновариантов составили 8,3, 7,1 и 4,4% соответственно. BPIV-3 выявля-

ли только в ассоциациях с другими возбудителями. Ассоциации вирусов присутствовали в 7,5% исследованных проб. Чаще находили сочетания вирусов: BoHV-1 и BVDV-1 (14,3% от всех вирусных ассоциаций), BVDV-1 и BCoV (12,5%), BVDV и BPIV-3 (12,1%), BoHV-4 и BCoV (11,8 %).

На крупных молочных комплексах без импорта наиболее часто встречались вирусно-бактериальные ассоциации (46,5%). Доля проб биоматериала, содержащих вирусы в моноварианте, составила 18,1%, а бактерий - 20,7%. В структуре моноинфекций превалировал BoHV-1 (23,5%). Доля остальных возбудителей составляла: BVDV-1 - 18,8%, BRSV - 18,6%, BVDV-3 - 11,3%, BoHV-4 - 7,8%, BPIV-3 - 5,8%, BVDV-2 - 2,7%, BCoV - 2,1%. Вирусные ассоциации обнаружили в 4,2% проб, чаще в таких сочетаниях: BCoV и BVDV-1 (14,8%), BoHV-1 и BCoV (14,5%), BoHV-4 и BCoV (12,5%).

На мелких фермах в возникновении респираторных болезней чаще участвовали вирусно-бактериальные ассоциации (37,9%) и бактерии в моноварианте (32,7%), реже - вирусы в моноварианте (4,9%) и ассоциациях (1,1%). В структуре моновирусных инфекций наиболее часто выявляли BRSV (22,5%), реже - BoHV-1 (17,5%), BVDV-1 (16,3%), BVDV-3 (15,0%), BVDV-2 (10,0%), BoHV-4 (10,0%), BCoV (8,8%), а BPIV-3 вирус обнаруживали только в составе ассоциаций с бактериальной микрофлорой. Сочетания двух вирусов выявили в 1,1% проб, преобладали комбинации BCoV с BVDV, BoHV-1 и BoHV-4.

2.2.2.2 Этиологическая структура респираторных инфекций у импортного скота в период адаптации на крупных молочных комплексах

Изучение этиологической структуры респираторных болезней импортированного скота в период адаптации (первые 2-3 года после завоза) проводили на 7 крупных молочных комплексах Западной Сибири.

В первые 6 мес. после поступления на комплексы у нетелей (до 25%) регистрировали нарушения репродуктивной функции (аборты, мертворождения) и респираторную патологию. У рожденных от них телят в возрасте до 30 дней выявляли массовые поражения респираторного и желудочно-кишечного трактов. В последующие циклы воспроизводства наблюдалась негативная динамика показателей фертильности: низкая оплодотворяемость, эмбриональная смертность, пролонгация сервис-периода и рост заболеваемости телят до 6-мес возраста, снижение молочной продуктивности. От больных, павших животных, абортированных плодов и мертворожденных телят исследовали 1400 проб биоматериала и выявили широкий спектр патогенов, включающий вирусы (BVDV, BoHV-1, BRSV, BoHV-4 и BPIV-3,) и бактерии (*P. multocida*, *M. haemolytica*, *H. somni*) (рисунок 4).

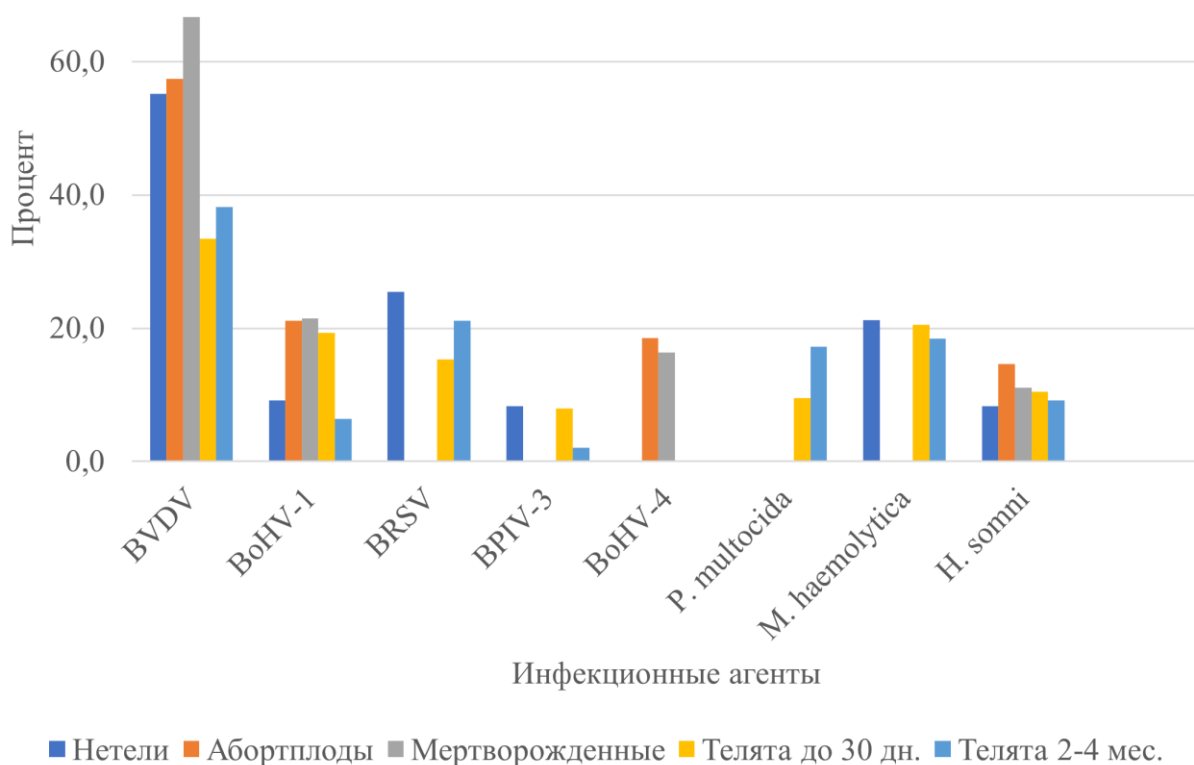


Рисунок 4 – Спектр инфекционных агентов у КРС разного возраста в первые 2-3 года после комплектования импортным поголовьем, %

Результаты исследований свидетельствуют о полиэтиологической природе выявленных патологий с доминированием вирусных агентов.

BVDV являлся основным этиологическим фактором репродуктивных нарушений. Уровень детекции BVDV достигал 68,0% у мертворожденных телят и 57,4% у абортированных плодов. Геном BoHV-1 идентифицировали в различных возрастных группах животных с частотой 6,4-21,5%. BoHV-4 ассоциировался преимущественно с абортами и мертворождениями. Респираторные патогены BRSV и BPIV-3 циркулировали в поголовье, поражая молодняк и нетелей. Чаще всего BRSV выявляли у нетелей (25,5%) и телят в возрасте 2-4 мес. (21,1%).

Для оценки уровня распространения персистентной формы инфекции (ПИ) BVDV на комплексах методом ПЦР исследовали 4850 парных проб сыворотки крови, отобранных с интервалом 4-6 недель от КРС разного возраста (нетели, первотелки, коровы 2-3 лактации и рожденные от них телята). Диагноз на ПИ устанавливали при выявлении РНК вируса в парных пробах сыворотки крови.

В ходе мониторинга выявлено, что доля ПИ нетелей при завозе составляет в среднем 6,4%, а рожденных от них телят – 4,5%. Данные животные могут выступать в роли постоянного эндогенного резервуара вируса для восприимчивого поголовья. По мере увеличения числа животных с иммунитетом к вирусу наблюдалось снижение доли восприимчивых к заражению и инцидентность болезни. Среди коров 2 и 3 лактации доля ПИ животных составляла 3,2 и 1,6% соответственно, а рожденных от них телят – 3,5%. В течение 2-3 лет после импорта скота уровень ПИ животных в среднем составлял 2,5%.

Таким образом, в условиях адаптации к новому региону у импортированного племенного скота, а также у полученного от него потомства наблюдается высокая подверженность манифестации различных патологических состояний, в том числе инфекций респираторного генеза, среди которых ведущая роль принадлежит BVDV с участием BoHV-1, BRSV в сочетании с бактериями *M. haemolytica* и *P. multocida*.

2.2.3 Клинические особенности и молекулярно-генетическая характеристика пестивирусных инфекций крупного рогатого скота

2.2.3.1 Особенности смешанной инфекции BVDV-1 и BVDV-2 у крупного рогатого скота

Во время вспышки заболеваний, проявляющихся абортами, рождением слабого нежизнеспособного молодняка, эрозиями носового зеркала и десен, диареей и респираторными болезнями среди нетелей и телят до 6 мес. на молочном комплексе после завоза импортного скота исследовали 114 проб биоматериала от абортированных плодов и павших телят в возрасте до 10 дней и 3-6 мес. с помощью разработанной тест-системы для выявления и дифференциации пестивирусов КРС. Результаты выявления геномов пестивирусов представлены на рисунке 5.

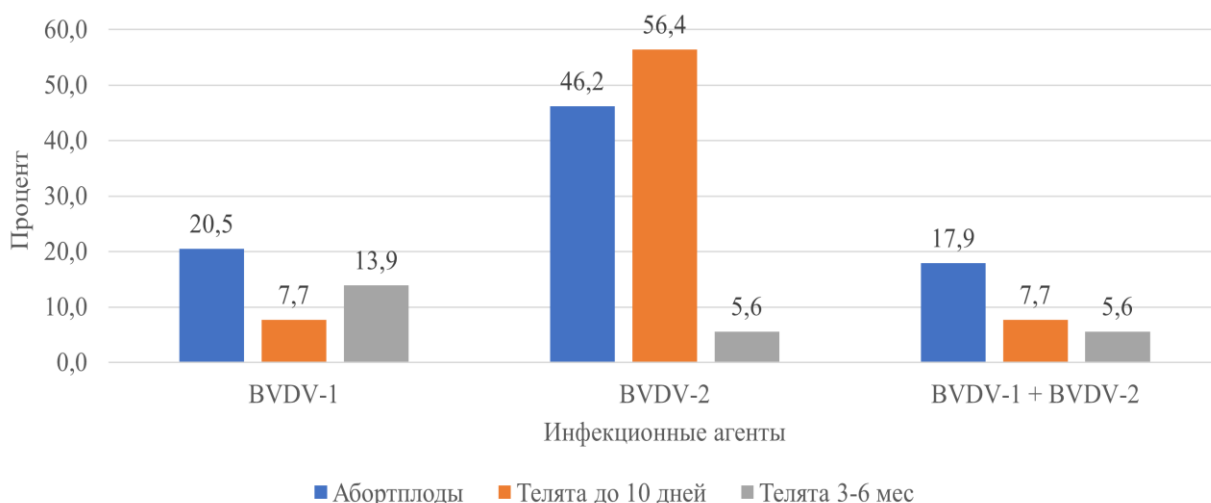


Рисунок 5 – Частота выявления геномов пестивирусов в органах абортированных плодов и телят методом ОТ-ПЦР, %

Геномы BVDV-1 и BVDV-2 детектировали в пробах всех исследованных групп животных. Так, в пробах от абортплодов BVDV-2 выявили в 46,2%, а BVDV-1 – в 20,5% проб биоматериала. BVDV-1 обнаружили в мозжечке, крови, легких, тимусе, лимфатических узлах, селезенке, печени и почках. Геном BVDV-2 выявили также в стволовой части и полушариях головного мозга, слизистой оболочке сычуга, тонкого и толстого отделов кишечника. Одновременно два вируса детектировали в тимусе, лимфатических узлах, селезенке, мозжечке, крови, легких и почках, что составило 17,9% от исследованных проб.

Максимальное распространение BVDV-2 (56,4%) обнаружили у телят в возрасте до 10 дней почти во всех органах и тканях, что свидетельствует о системном

распространении инфекции. BVDV-1 детектировали в тимусе, лимфатических узлах и селезенке телят одновременно с BVDV-2, что составило 7,7%.

У телят в возрасте 3-6 мес. с симптомами респираторного заболевания частота выявления BVDV-1 в легких, лимфатических узлах и селезенке составила 13,9%, а BVDV-2 обнаружили только в легких и селезенке (5,6%). Одновременно два вируса выявили в 5,6% проб.

Результаты нуклеотидного секвенирования и филогенетического анализа идентифицировали выделенные изоляты как BVDV-1b и BVDV-2a.

Таким образом, нами доказана возможность возникновения смешанных инфекций BVDV-1 и BVDV-2 в естественных условиях после завоза животных из-за рубежа. При этом у телят в возрасте 3-6 мес. чаще выявляли BVDV-1, а у абортированных плодов и телят до 10 дней с признаками системной инфекции и диареи - BVDV-2.

Сочетанная циркуляция вирусов BVDV-1 и BVDV-2 в популяции животных приводит к утяжелению клинической картины заболевания, увеличению заболеваемости и смертности. Наличие смешанных инфекций необходимо учитывать при диагностических исследованиях и планировании противоэпизоотических мероприятий с использованием вакцин.

2.2.3.2 Характеристика BVDV-3 инфекции в молочных хозяйствах

В 2019-2021 гг. впервые в России диагностировали BVDV-3 в трех хозяйствах Новосибирской области и Алтайского края, в которых КРС не завозили из других стран или регионов, и изучили особенности проявления инфекции.

Клинические признаки заболевания возникли после вакцинации живой вакциной против нодулярного дерматита (НД) у животных в возрасте от нескольких дней до нескольких лет, проявляясь системной инфекцией, энтеритами, болезнью слизистых оболочек, респираторным синдромом, абортами, снижением оплодотворяемости, активизацией условно-патогенной микрофлоры.

В хозяйстве № 1 геном BVDV-3 детектировали во многих внутренних органах абортплодов и телят разного возраста. В данном хозяйстве болезнь протекала наиболее тяжело и включала несколько синдромов, что может быть связано с вовлечением в инфекционный процесс BoHV-4. Вирус НД КРС в исследованных пробах биологического материала не был обнаружен. В хозяйстве № 2 зарегистрировали смешанную инфекцию BVDV-3 и вируса НД. В хозяйстве № 3 в пробах биоматериала от абортированных плодов выявили геном BVDV-3 в моноварианте.

В трех сериях живой вакцины против НД КРС, которые применяли в данных хозяйствах, выявили геном BVDV-3.

Генетический анализ области 5'UTR установил принадлежность исследуемых полевых изолятов и выделенных из серий вакцины к итало-бразильской группе BVDV-3 (рисунок 6).

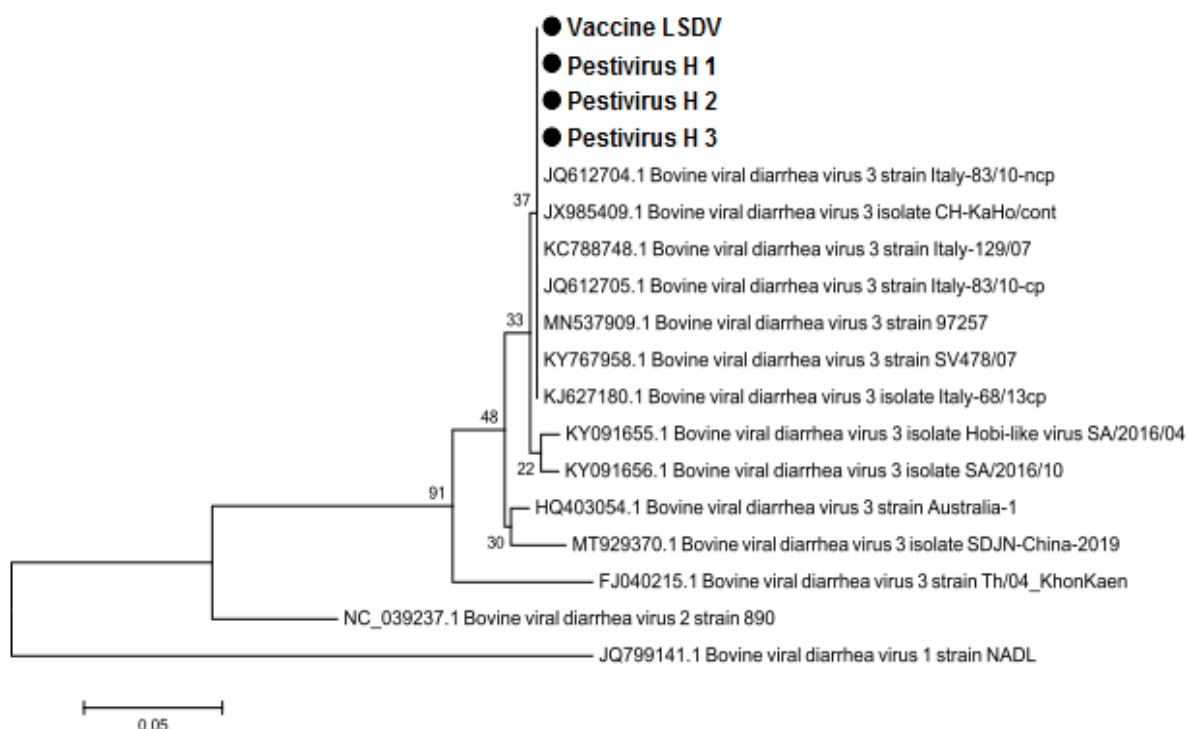


Рисунок 6 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе нуклеотидной последовательности области генома 5'UTR BVDV-3 в программе MEGA 6; значения бутстрэпа указаны для 1000 реплик

2.2.4 Клинические формы и локализация генома BCoV при респираторных и желудочно-кишечных болезнях телят

В период вспышек массовых респираторных и желудочно-кишечных болезней в 2018-2022 гг. в молочных хозяйствах из нескольких областей Сибири провели исследование 1508 проб биоматериала от 116 телят в возрасте до 6 мес.

Геном BCoV выявили в 11,8% исследованных проб биологического материала от телят с респираторным и диарейным синдромами. BCoV детектировали чаще у телят с желудочно-кишечными заболеваниями (16,3%), чем у телят с респираторной патологией (9,9%). При гастроэнтеритах вирус чаще выявляли у телят до 10 дней (9,5%), а при респираторном синдроме – 30-60 дней (6,1%).

Результаты показали дифференцированное распространение генома BCoV: при диарее он присутствовал во всех отделах ЖКТ, брыжеечных лимфатических узлах, крови, реже в паренхиматозных органах, а в респираторном тракте не обнаруживался. При респираторном синдроме доминировало выявление вируса в легких, трахеобронхиальном экссудате, легочных лимфоузлах, крови. Присутствие генома BCoV в кишечнике у телят с бронхопневмонией свидетельствует о коинфекции штаммами с различным тропизмом или о наличии одного штамма на разных стадиях патогенеза болезни.

При диарейном синдроме выявили статистически значимую корреляцию между наличием коронавируса и присутствием ротавируса KРС, *E. coli* и *S. dublin* ($p < 0,05$). Высокая частота совместного обнаружения (коэффициент Пирсона 0,327–0,357) свидетельствует о возможном синергетическом эффекте и участии коронавируса в развитии смешанных инфекций ЖКТ.

При респираторном синдроме наиболее частыми ко-патогенами, ассоциированными с BCoV, являлись *P. multocida* (61,1%) и *M. haemolytica* (44,4%). Кроме того, были обнаружены вирусы ИРТ (33,2%) и ВД-БС (28,3%) КРС, а также *Streptococcus pneumoniae* (33,5%). Выявили достоверную положительную корреляцию между BCoV, *P. multocida* и *M. haemolytica* (0,388 – 0,361 при $p < 0,05$), что подтверждает синергизм между агентами и повышение способности бактерий к колонизации респираторного тракта в присутствии вируса.

Результаты исследования показали, что патогенные штаммы BCoV широко распространены в молочном животноводстве и являются причиной респираторных и желудочно-кишечных заболеваний телят, часто в составе смешанных инфекций.

2.2.5 Контаминация биологической продукции вирусами крупного рогатого скота

Возбудители заболеваний крупного рогатого скота могут распространяться через биопрепараты – в частности, ветеринарные вакцины и интерфероны, при условии их изготовления с использованием инфицированных эмбриональных сывороток, культур клеток или трипсина. Контаминированная сперма и эмбрионы также могут служить путем распространения инфекционных агентов.

2.2.5.1 Роль контаминированной спермы быков-производителей в распространении BoHV-1 и BVDV

Для изучения степени контаминации банка спермы одного из племпредприятий исследовали 13426 проб спермы, полученной в 1985 - 2021 гг. от 274 живых и выбракованных по окончании срока эксплуатации быков-производителей, хранившейся в банке в условиях глубокой заморозки.

Методом ПЦР выявили геном BoHV-1 у 16,4% быков (3,95% серий спермы), а BVDV – у 4,1% быков (0,4% серий спермы), подтверждая наличие данных патогенов в популяции быков-производителей.

В молочных хозяйствах среди коров и нетелей, которых осеменяли контаминированными BoHV-1 и BVDV сериями спермы, регистрировали вспышки гинекологических болезней. При исследовании проб вагинальных выделений от 100 коров и 50 нетелей методом ПЦР BoHV-1 был выявлен в 15,0% проб от коров и 16,0% от нетелей. BVDV обнаружили в 26,0% и в 24,0% проб соответственно.

Результаты ПЦР-ПДРФ анализа показали идентичность рестрикционных профилей ампликонов изолятов BoHV-1, выделенных как из спермы, так и от коров. Установлена принадлежность изолятов к «респираторному» субтипу 1.1, который ассоциируется с высокой частотой абортот у маточного поголовья и патологиями воспроизводства.

Филогенетический анализ выявил три субтипа BVDV – 1a, 1b и 2a, ассоциированных с репродуктивной патологией. Высокая степень гомологии (98,0-99,0%) между вирусными изолятами, полученными от коров и спермы, свидетельствует об их филогенетическом родстве.

Эти данные подтверждают, что инфицированная сперма племенных быков является одним из факторов передачи возбудителей инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи в молочных стадах.

2.2.5.2 Контаминация эмбриональных сывороток и клеточных культур пестивирусами крупного рогатого скота

Для изучения инфицированности пестивирусами КРС провели исследование перевиваемых линий культур клеток из коллекции ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, а также эмбриональных сывороток КРС нескольких производителей, использовавшихся в разные годы при культивировании культур клеток.

Результаты исследования показали, что 80% исследованных перевиваемых линий культур клеток были контаминированы пестивирусами. Из 30 серий эмбриональной сыворотки КРС разных производителей в семи выявили геном BVDV-3, а в шести – BVDV-1.

Для определения субтипов обнаруженных пестивирусов был проведено секвенирование с последующим филогенетическим анализом по участкам генов 5'UTR, N^{pro}, Erns, E1, E2. Изоляты BVDV из культур клеток N/MDBK/06, N/KCT/06, N/CRFK/07, N/RK13/00, N/TEB/10, N/L929/05, N/MF/06, N/BHK21/08, N/Vero/10, N/FS/12 отнеслись к субтипу BVDV-1a, а изолят N/MDBK/08 – к BVDV-1a - по гену 5'UTR и к BVDV-1j по генам N^{pro}, Erns, E1, E2.

Семь изолятов BVDV из эмбриональных сывороток отнеслись к субтипу BVDV-3a, 4 – к BVDV-1a по генам 5'UTR, N^{pro}, Erns, E1, E2, а 2 изолята (R/FBS/96 и SA/FBS/08) – по гену 5'UTR – к BVDV-1a, а N^{pro}, Erns, E1, E2 - BVDV-1j.

Представленные результаты свидетельствуют о необходимости постоянного контроля биологических продуктов, используемых при производстве вакцин для животных и человека и в диагностических лабораториях.

2.2.6 Молекулярная эпизоотология респираторных вирусов, циркулирующих у крупного рогатого скота в Сибири

2.2.6.1 Молекулярно-генетическая вариабельность штаммов BVDV

В результате проведенных исследований с использованием филогенетического анализа области 5'-UTR, а также участков генов N^{pro}, Erns, E1 изолятов BVDV, выделенных из проб биоматериала от КРС, установлена циркуляция 8 субтипов BVDV-1 (1a, 1b, 1c, 1d, 1f, 1i, 1p, 1r), 3 субтипов BVDV-2 (2a, 2b, 2c) и 1 субтипа BVDV-3 (3a) на молочных комплексах разных областей и краев СФО и Республики Казахстан.

Преобладающим субтипом являлся BVDV-1b (39,6%). BVDV-1f выявили в 16,7% секвенированных изолятов, BVDV-1d - 8,3%, BVDV-1a, BVDV-2a и BVDV-3a – по 6,3%, BVDV-1r и BVDV-2b – по 4,2%, BVDV-1c, BVDV-1i, BVDV-1p и BVDV-2c – по 2,1% (рисунок 7).

В распространении субтипов существовали географические различия. Так, на территории Тюменской области отмечена циркуляция наибольшего количества (50,0%) и разнообразия субтипов (7 BVDV-1 и 2 BVDV-2) с преобладанием BVDV-1b (27,1%). Только в Тюменской области зарегистрированы субтипы BVDV-1a (6,3%), BVDV-1c (2,1%), BVDV-1p (2,1%), BVDV-1r (2,1%), BVDV-2c

(2,1%). Также в данной области выявлена циркуляция BVDV-1d и BVDV-1f (по 4,2%), и, кроме того, BVDV-2a (2,1%).

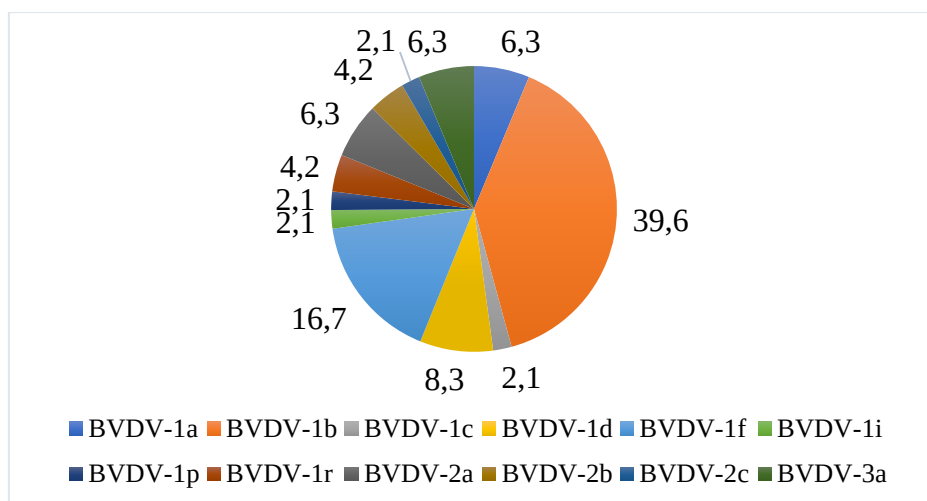


Рисунок 7 – Генетический полиморфизм штаммов BVDV, циркулирующих среди КРС на территории Сибири, %

В Новосибирской области выявлены субтипы всех трех видов ВД-БС КРС, что составило 27,1%. Обнаружены субтипы BVDV-1b (8,3%), BVDV-1d (4,2%), а BVDV-1i и BVDV-1r (по 2,1%) были зарегистрированы только в Новосибирской области. Вирус второго вида был представлен двумя субтипами – BVDV-2a и BVDV-2b (по 4,2%). Также выявлен субтип BVDV-3a (2,1%).

В Красноярском крае установлена циркуляция BVDV-1b и BVDV-1f (по 4,2%), в Республике Казахстан – BVDV-1f (4,2%), в Омской и Иркутской областях – BVDV-1f (по 2,1%), а в Алтайском крае – BVDV-3a (4,2%). Ограниченная генетическая вариативность изолятов в этих регионах может быть связана с исследованием небольшого количества образцов, либо с меньшими масштабами ввоза животных из-за рубежа.

Установлено, что различные субтипы вирусов вызывают специфические клинические синдромы заболевания. Так, субтип BVDV-1a ассоциировался с репродуктивной патологией, BVDV-1b выявлялся чаще у ПИ животных, BVDV-1c, BVDV-1d, BVDV-1i, BVDV-1p, BVDV-1r являлись причиной респираторной патологии, BVDV-1f – персистентной инфекции и респираторной патологии, BVDV-2a, BVDV-2b и 2c – репродуктивной патологии и системной инфекции животных, BVDV-3a – респираторной, репродуктивной патологии и системной инфекции.

Значительное генетическое разнообразие циркулирующих штаммов пестивирусов КРС в хозяйствах Сибири является следствием заноса новых субтипов с импортируемым скотом и использования контаминированных биологических препаратов.

2.2.6.2 Генетический полиморфизм штаммов BRSV

Для амплификации и последующего секвенирования полной нуклеотидной последовательности гена гликопротеина G семи изолятов BRSV разработали две

перекрывающиеся пары праймеров: F1 (gttacatacagatgttggggc) и R1 (gtttgggagttgttggtc); F2 (gggaaatgctaaagccaagcc) и R2 (ccatccttatttgccccag).

Изоляты NSO1 и NSO2 были выделены в 2018 г. из органов дыхания телят в Новосибирской области, Alt3 и Alt4 – в 2020 и 2021 гг. – из органов дыхания теленка и носовых выделений коровы в Алтайском крае, высоковирулентный изолят K18 - в 2008 г. от больных нетелей, завезенных в Республику Казахстан из Канады, при вспышке массового респираторного заболевания. FP5L5HB и FP5L5 – вакцинные штаммы.

Полученные полные нуклеотидные последовательности гена gG зарегистрированы в базе GenBank под номерами OR426499–OR426505. Нуклеотидное сходство 7 исследуемых изолятов варьировало в пределах 87–100% (рисунок 8).

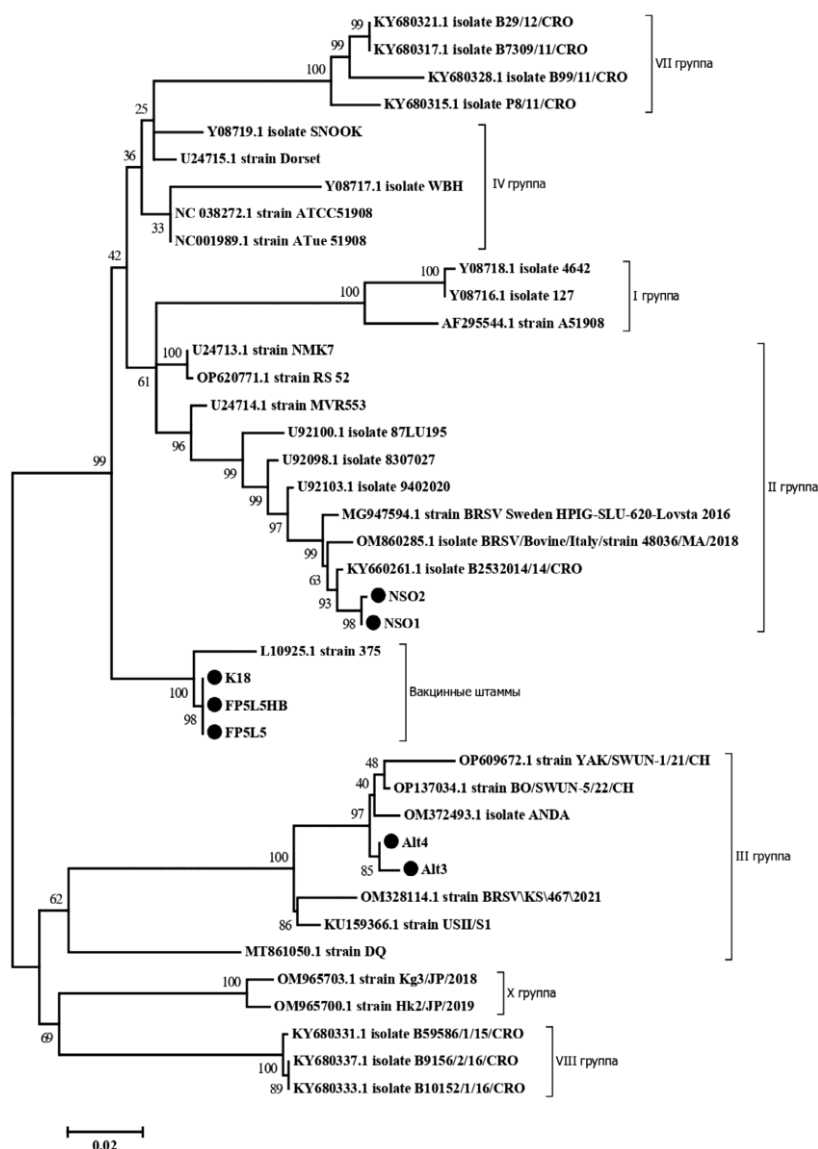


Рисунок 8 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе полной нуклеотидной последовательности гена гликопротеина G BRSV

Филогенетический анализ показал, что изоляты NSO1 и NSO2 образуют одну кладу с европейскими изолятами, относящимися к подгруппе II. Нуклеотидное

сходство со штаммом из Хорватии (B2532014/14/CRO) составило 99,09%, Швеции (HPIG-SLU-620-Lovsta 2016) – 98,44%, Италии – (48036/MA/2018) – 98,31%. В последовательности гена G изолятов NSO1 и NSO2 обнаружены нуклеотидные мутации относительно других представителей подгруппы II, приводящие к ряду уникальных аминокислотных замен 4 (His→Arg), 55 (Val→Ile), 181 (Ala→Thr). Также у изолята NSO2 присутствовала замена 66 (Asn→Lys).

Отдельную кладу образовали изолят K18, образцы вакцин FP5L5HB (вакцина Бови-Шилд Голд), FP5L5 (вакцина Кэтлмастер Голд) и штамм 375 (L10925), входящий в состав разных вакцин. Нуклеотидное сходство между изолятами K18, FP5L5HB и FP5L5 составило 100%, а со штаммом 375 – 98%. Нуклеотидные мутации привели к аминокислотным заменам относительно эталонного штамма 375: 13 (Gly→Leu), 19 (Pro→Ala), 41 (Thr→Lys), 66 (Lys→Asn), 67 (Ser→Ala), 139 (Ala→Thr), 171 (Glu→Val), 213 (Arg→Lys).

Изоляты Alt3 и Alt4 были отнесены к подгруппе III. Наиболее близкими к алтайским изолятам были китайские штаммы BO/SWUN-5/22/CH, YAK/ SWUN-1/21/CH и американский изолят ANDA, нуклеотидное сходство составило 98,73-97,34%. В последовательностях изолята Alt3 обнаружены уникальные замены остатков 39 (Val→Gly) и 42 (Ala→Asp). Относительно других штаммов BRSV у изолятов Alt3 и Alt4 обнаружена аминокислотная замена 116 (Thr→Ile).

2.2.6.3 Генетический полиморфизм штаммов BCoV

Провели нуклеотидное секвенирование фрагментов генов гликопротеина S и нуклеокапсида N 18 изолятов BCoV. Для амплификации фрагмента гипервариабельного участка гена S размером 622 п.н. использовали праймеры S1 (cttataagtgcaccccaactaaat) и S2 (cctactgtgagatcacatgtttg) (Decaro N. et al., 2008), фрагмента гена N размером 454 п.н. - праймеры BCoV1 (cgatgaggctattccgac) и BCoV2 (tgtgggtgcgagttctgc) (Takiuchi E. et al., 2006).

Нуклеотидная идентичность полученных последовательностей составила по гену N 96,1-100%, по гену S – 91,9-100%. Секвенированные последовательности депонированы в базу данных GenBank под номерами OP651999–OP652028.

На основе филогенетического анализа участка последовательности гена S исследуемые изоляты и референтные штаммы разделились на две клады с двумя подкладами в каждой. В первую подкладу первой клады (1.1) вошли 11 изолятов (S16, S22, S24, S25, S26, S27, S29, S34, S35, S36 и S49), а также референтные штаммы из Европы и Израиля (европейская линия). В первой подкладе второй клады (2.1) оказались 6 изолятов (S3, S5, S7, S8, S13 и S20), а также штаммы из США, Китая и Южной Кореи (американо-азиатская линия). Ко второй подкладе (2.2) отнесли один изолят (S46) и штаммы из Южной Кореи, Европы, США (смешанная линия) (рисунок 9).

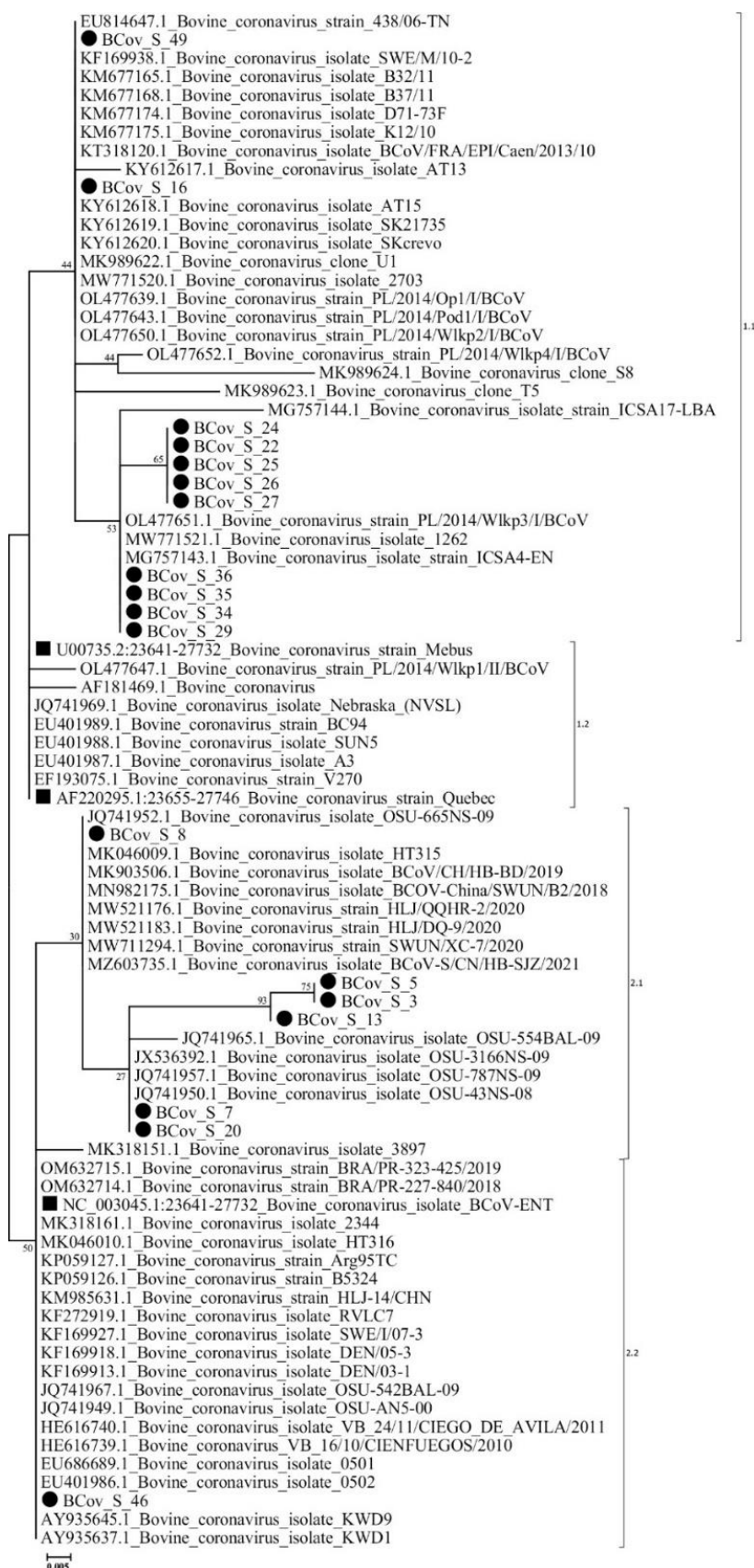


Рисунок 9 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе участка последовательности гена гликопротеина S BCoV. Бутстрэп-поддержка указана около каждого узла дендрограммы.

На основе филогенетического анализа участка последовательности гена N изоляты и референтные штаммы разделились на две клады, одна из них включала две подклады (рисунок 10).

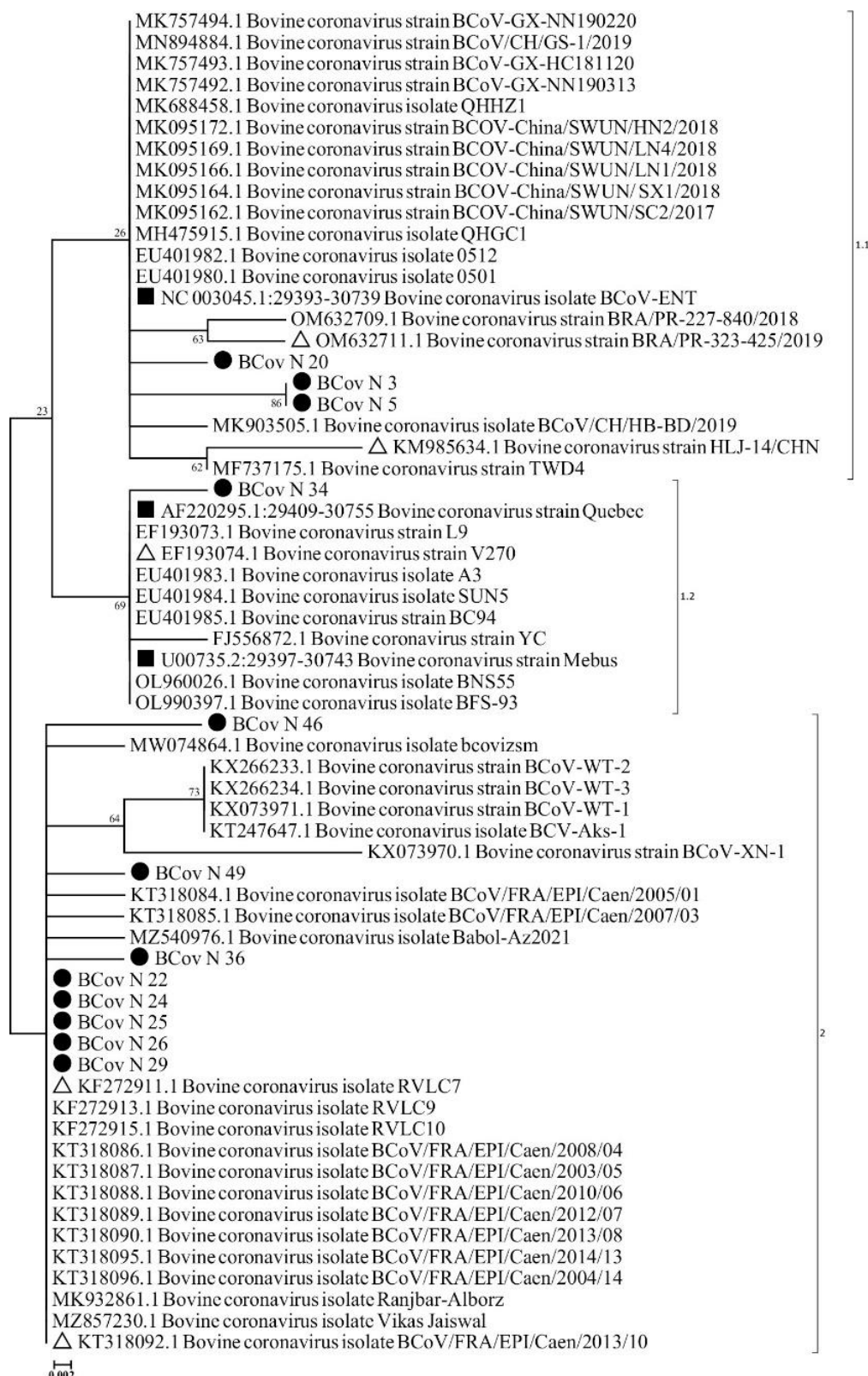


Рисунок 10 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе участка последовательности гена нуклеокапсид N BCoV. Бутстрэп-поддержка указана около каждого узла дендрограммы

В первую подкладу (1.1) вошли 3 штамма (N3, N5 и N20), а также штаммы из Китая, Южной Кореи, Таиланда, США и Бразилии (американо-азиатская линия). Во вторую подкладу (1.2) – один изолят (N34), классические штаммы Квебек и Мёбус, а также штаммы из Германии, Южной Кореи, Китая и Индии (смешанная линия). Во вторую кладу (2) – 8 штаммов (N22, N 24, N25, N26, N29, N36, N46 и N49), а также штаммы из Китая, Европы, Ирана и Индии (смешанная линия).

Респираторные изоляты были выявлены среди животных на крупных молочных комплексах как с наличием, так и отсутствием импортированных животных, а кишечные и респираторно-кишечные – в мелких и средних хозяйствах с местным скотом.

Различий в географическом распространении изолятов вируса не обнаружили. Изоляты, относящиеся к одной кладе, были распространены в различных регионах, не связанных между собой.

2.2.6.4 Генетический полиморфизм штаммов BoHV-4

Филогенетический анализ участка гена gL BoHV-4 показал, что на территории Сибири у КРС встречаются штаммы как Европейской (Movar-like, генотип 1), так и Американской (DN 599-like, генотип 2) ветвей данного вируса. Из 5-ти исследованных образцов 4 изолята были отнесены к Американской ветви и один к Европейской (рисунок 11).

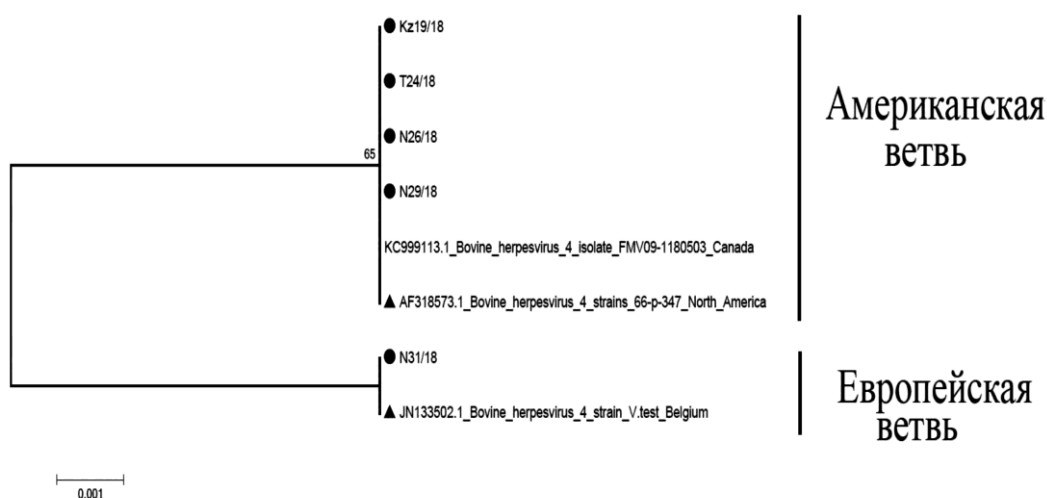


Рисунок 11 – Филогенетическая дендрограмма на основе участка гена gL. Выравнивание последовательностей проведено с использованием ClustalW метода

География циркуляции Американских штаммов включала Республику Казахстан, Тюменскую и Новосибирскую области. В то же время Европейский изолят обнаружили у животных исключительно в Новосибирской области.

Изоляты Европейского генотипа выделены от животных с гинекологической, желудочно-кишечной и респираторной патологией в Новосибирской, Тюменской областях и Республике Казахстан, а Американского – от телят с респираторной патологией в Новосибирской области.

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных можно заключить, что разработанный комплекс тест-систем на основе ПЦР в сочетании с методами секвенирования обеспечивает оперативную детекцию патогенов и объективную оценку эпизоотической ситуации в хозяйствах. Такой комплексный подход позволяет детально изучать молекулярно-генетические характеристики вирусов, циркулирующих в популяциях крупного рогатого скота, что делает методы генетического анализа эффективным инструментом молекулярной эпизоотологии для мониторинга, прогнозирования и контроля инфекционных болезней на молочных комплексах.

По результатам исследований сделаны следующие **выводы**:

1. Разработан комплекс диагностических тест-систем на основе ПЦР и ОТ-ПЦР (в форматах «реального времени», мультиплекс и с электрофоретической детекцией) для идентификации и количественного определения геномов восьми основных вирусов респираторного комплекса КРС (BoHV-1, BRSV, BPIV-3, BoHV-4, BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3, BCoV). Установлена их высокая чувствительность, специфичность и диагностическая эффективность.

2. С использованием разработанных тест-систем установлено широкое распространение возбудителей респираторных вирусных инфекций у КРС в молочных хозяйствах Сибири. Общая частота выявления составила 69,1%, при этом в структуре вирусного комплекса преобладали BVDV-1 (16,0%), BoHV-1 (14,9%) и BoHV-4 (12,6%). Частота детекции BCoV составила 9,4%, BPIV-3 — 6,3%, BRSV — 6,1%, при этом установлена закономерность: ИРТ, ВД-БС и РСИ чаще протекают как моноинфекции, в то время как ПГ-3, КВИ и ВГ-4 КРС – в различных ассоциациях с бактериальными и, реже, вирусными возбудителями. Установлено, что BoHV-1, BVDV и BRSV доминировали в структуре моноинфекций, а BPIV-3, BCoV и BoHV-4 преимущественно регистрировались в ассоциации с бактериальными или вирусными патогенами.

3. Установлена взаимосвязь этиологической структуры респираторных болезней с типом ведения животноводства. На крупных комплексах с импортным скотом вирусы были выявлены в 84,8% проб биоматериала, при этом вирусно-бактериальные ассоциации составили 48,6%. Бактерии выделены в 69,7% проб, а доля вирусных моноинфекций составила 25,2%. На комплексах без завоза животных вирусы выявляли реже — в 68,7% случаев, тогда как бактериальные агенты встречались в 79,9% проб. Частота вирусно-бактериальных ассоциаций составила 46,5%, а вирусных моноинфекций — 18,1%. На мелких товарных фермах установлено присутствие респираторных вирусов в 47,1% проб биоматериала, а бактерий – в 88,7%. При этом частота выявления вирусно-бактериальных ассоциаций составила 37,9%, бактериальных моноинфекций – 32,7%, реже регистрировали вирусы в моноварианте (4,9%).

4. Эпизоотическая ситуация на молочных комплексах в первые 2-3 года после импорта скота характеризуется нестабильностью вследствие заноса генетически гетерогенных штаммов патогенов, отличающихся от стационарных штаммов. Массовые вспышки острых респираторных болезней, возникающие в этот период, вызываются ассоциациями инфекционных агентов, среди которых ведущая роль принадлежит BVDV с участием BoHV-1, BRSV в сочетании с бактериями

M. haemolytica и *P. multocida*. Импортный скот, среди которого доля персистентно-инфицированных особей в первые 2–3 года достигает в среднем 2,5%, служит стабильным эндогенным резервуаром BVDV, создавая постоянную угрозу заражения восприимчивого поголовья.

5. Впервые в России установили смешанную инфекцию на крупном молочном комплексе после импорта животных, вызванную BVDV-1b и BVDV-2a, сопровождающуюся абортами, системной инфекцией, респираторной и желудочно-кишечной патологиями. Оба вируса одновременно присутствовали в 17,9% проб от абортированных плодов, в 7,7% проб телят в возрасте до 10 дней с диареей и системной инфекцией, в 5,6% проб от телят в возрасте 3–6 мес. с респираторной патологией. Установлено, что BVDV-2 обладает более широким тканевым тропизмом, чем BVDV-1.

6. Впервые в РФ среди КРС в трех молочных хозяйствах диагностировали инфекцию, вызванную BVDV-3a итапо-бразильской группы; установили факт заноса вируса в ранее благополучные хозяйства с контаминированной живой вакциной. Клинические проявления инфекции у животных включали системную инфекцию, энтериты, болезнь слизистых оболочек, респираторную и репродуктивную патологии, активизацию условно-патогенной микрофлоры.

7. Определены возможные источники распространения вирусов: сперма быков-производителей, контаминированные вакцины, эмбриональные сыворотки и перевиваемые культуры клеток, используемые для их производства. Многолетний мониторинг выявил BoHV-1 в 3,95% серий от 16,4% быков, а BVDV – в 0,4% серий от 4,1% быков. Установлена контаминация культур клеток BVDV-1a, BVDV-1j, ветеринарной вакцины BVDV-3a и эмбриональных сывороток BVDV-1a, BVDV-1j и BVDV-3a, что подчеркивает необходимость постоянного контроля биологических препаратов, используемых в производстве и диагностических лабораториях.

8. Установлено значительное генетическое разнообразие популяции BVDV. Среди высокопродуктивного поголовья выявлено 12 субтипов вируса, относящихся к трем видам: BVDV-1 (8 субтипов), BVDV-2 (3 субтипа) и BVDV-3 (1 субтип). Доминирующий вид BVDV-1 представлен преимущественно субтипами 1b (39,6%) и 1f (16,7%), доля вариантов 1a, 1c, 1d, 1i, 1p, 1r, 2a, 2b, 2c и 3a варьирует в пределах 2,1–8,3%. Выявлена взаимосвязь субтипов с вызываемыми клиническими синдромами заболевания: BVDV-1a – репродуктивная патология, BVDV-1b – персистентная инфекция, BVDV-1c, BVDV-1d, BVDV-1i, BVDV-1p, BVDV-1r – респираторная патология, BVDV-1f – персистентная инфекция и респираторная патология, BVDV-2a, BVDV-2b и 2c – репродуктивная патология и системная инфекция, BVDV-3a – респираторная, репродуктивная патология и системная инфекция.

9. Импортный скот выступает ключевым фактором трансграничного заноса и последующей диссеминации различных штаммов пестивирусов, что ведет к росту их распространенности в популяции животных. Субтипы BVDV-1a, 1c, 1p, 2c были выявлены только в хозяйствах с импортным скотом; BVDV-1b, 1f, 1d, 1r, 2a, 2b выявили в хозяйствах с наличием импортного и местного скота; BVDV-1i – у местного скота; BVDV-3a – у местного скота в хозяйствах после применения контаминированной вакцины.

10. Филогенетический анализ полной нуклеотидной последовательности гена G BRSV у молочного скота выявил циркуляцию штаммов вируса II и III подгрупп и независимой клады (изолят K18).

11. Частота выявления BCoV в пробах биоматериала от телят составила 16,3% при диарейном и 9,9% при респираторном синдромах. Филогенетический анализ показал значительную вариабельность циркулирующих штаммов. По гену S изоляты разделились на европейскую, американо-азиатскую и смешанную линии. Анализ гена N подтвердил генетическую неоднородность популяции с преобладанием смешанной и американо-азиатской линий. Не выявлено взаимосвязи между клиническими синдромами, географической локализацией и филогенетической принадлежностью изолятов к определенным генетическим линиям.

12. Филогенетический анализ участка гена гликопротеина L BoHV-4 выявил циркуляцию американского (DN 599-like) и европейского (Movar-like) генотипов вируса на молочных комплексах Сибири. Изоляты американского генотипа ассоциировались с широким спектром патологий, включая репродуктивную, желудочно-кишечную и респираторную, у местного и импортированного из-за рубежа скота, а европейского – с респираторной патологией у телят в хозяйстве с завозом импортного скота.

Практические предложения

Материалы диссертации использованы при разработке научно-технической документации:

1. Тест-система для выявления атипичного пестивируса крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции;

2. Тест-система для выявления и дифференциации пестивирусов крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени;

3. Тест-система для выявления вируса респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени;

4. Тест-система для выявления герпесвируса крупного рогатого скота 4-го типа методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени;

5. Тест-система для выявления возбудителей респираторного комплекса крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени;

Методических пособий:

- «Комплексная система диагностических мероприятий при смешанных вирусно-бактериальных инфекциях респираторного тракта крупного рогатого скота», утвержденные Ученым советом ИЭВСиДВ СФНЦА РАН (протокол № 1 от 20.10.2016 г.);

- «Система диагностических мероприятий при основных экономически значимых вирусно-бактериальных инфекциях крупного рогатого скота», утвержденные экспертной комиссией СФНЦА РАН (протокол № 5 от 25.11.2020 г.).

Разработанный комплекс диагностических тест-систем на основе ПЦР может использоваться в ветеринарных диагностических лабораториях для оперативного выявления вирусов респираторного комплекса КРС.

Результаты исследования могут найти применение при проведении молекулярно-эпизоотологического мониторинга и филогенетического анализа циркулирующих штаммов вирусов. Это позволит научно обосновывать и разрабатывать планы противоэпизоотических и профилактических мероприятий и выбирать эффективные вакцинные препараты, наиболее соответствующие циркулирующим полевым штаммам вирусов, вызывающих вспышки массовых заболеваний среди КРС и причиняющих значительный экономический ущерб животноводческим хозяйствам Российской Федерации.

Данные о генетической вариабельности возбудителей болезней респираторного комплекса КРС могут быть использованы при разработке противовирусных вакцин. Учитывая отсутствие в современных вакцинах BVDV-2 и BVDV-3, актуальна разработка эффективных вакцин с включением этих видов вирусов. Для повышения эффективности специфической профилактики следует учитывать генетическое разнообразие циркулирующих штаммов в регионах Российской Федерации.

Результаты исследований подтверждают необходимость внедрения строгого регламента контроля качества биологических препаратов. Особое внимание следует уделять проверке всех серий эмбриональной сыворотки, чтобы предотвратить контаминацию вакцинных препаратов и интродукцию вирусов в новые регионы.

4 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных

ВАК Министерства науки и образования Российской Федерации

1. **Котенева, С.В.** Респираторно-синцитиальная инфекция крупного рогатого скота: особенности клинического проявления, патогенеза и молекулярной эпизоотологии (обзор) / **С.В. Котенева**, А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, А.В. Нефедченко // Ветеринария сегодня. - 2025. - Т. 14. - № 2. - С. 133-139.

2. Глотов, А.Г. Сравнительный филогенетический анализ сибирских изолятов пестивирусов крупного рогатого скота / А.Г. Глотов, А.В. Нефедченко, **С.В. Котенева**, Т.И. Глотова // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. - 2024. - Т. 54. - № 6. - С. 89-100.

3. Семенова, О.В. Вспышка болезни слизистых оболочек у крупного рогатого скота, вызванная *Pestivirus H* / О.В. Семенова, **С.В. Котенева**, А.В. Нефедченко // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. - 2023. - Т. 53. - № 4. - С. 71-80.

4. Глотов, А.Г. Пестивирус H (BVDV-3): роль в патологии крупного рогатого скота (обзор) / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, **С.В. Котенева**, А.В. Нефедченко // Ветеринария. - 2023. - № 10. - С. 3-9.

5. **Котенева, С.В.** Выявление вируса диареи крупного рогатого скота субтипа 1f (BVDV-1f) при вспышке респираторного заболевания у телят / **С.В. Котенева**, А.В. Нефедченко, Т.И. Глотова [и др.] // Ветеринария. - 2023. - № 8. - С. 15-21.

6. Глотова, Т.И. Этиологические агенты, вызывающие патологию воспроизводства у коров на молочных комплексах / Т.И. Глотова, **С.В. Котенева**, А.В. Нефедченко [и др.] // Ветеринария. - 2023. - № 2. - С. 3-8.

7. **Котенева, С.В.** Вспышка коронавирусной инфекции с респираторным синдромом у телят на молочном комплексе / **С.В. Котенева**, Т.И. Глотова, А.В. Нефедченко, А.Г. Глов / Ветеринария. - 2023. - № 1. - С. 16-22.
8. Нефедченко, А.В. Мониторинг инфицированности спермы быков-производителей вирусами на головном племпредприятии / А.В. Нефедченко, **С.В. Котенева**, Т.И. Глотова, А.Г. Глов // Ветеринария. - 2022. - № 9. - С. 18-23.
9. Глов, А.Г. Респираторные болезни у импортного скота в период адаптации на молочных комплексах / А.Г. Глов, Т.И. Глотова, А.В. Нефедченко, **С.В. Котенева** // Ветеринария. - 2022. - № 2. С. 3-8.
10. Нефедченко, А.В. Роль коронавируса в этиологии желудочно-кишечной и респираторной патологии телят на молочных комплексах / А.Г. Глов, Т.И. Глотова, А.В. Нефедченко, **С.В. Котенева** // Ветеринария. -2022. - № 1. - С. 18-23.
11. Глов, А.Г. Инфекция крупного рогатого скота, вызванная пестивирусом Н в молочных хозяйствах / А.Г. Глов, А.В. Нефедченко, **С.В. Котенева**, Т.И. Глотова // Ветеринария. - 2021. - № 8. - С. 17-23.
12. **Котенева, С.В.** Роль респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота в этиологии респираторных болезней на молочных комплексах / С.В. Котенева, А.В. Нефедченко, Т.И. Глотова, А.Г. Глов // Ветеринария сегодня. - 2021. - № 1 (36). - С. 38-43.
13. Нефедченко, А.В. Частота выявления герпесвируса 4-го типа у крупного рогатого скота при вспышках инфекционных болезней на молочных комплексах / А.В. Нефедченко, **С.В. Котенева**, Т.И. Глотова, А.Г. Глов // Ветеринария. - 2020. - № 5. - С. 19-23.
14. Глотова, Т.И. Способ борьбы с персистентной инфекцией при вирусной диарее / Т.И. Глотова, А.А. Никонова, **С.В. Котенева**, А.Г. Глов // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. - 2019. - Т. 49. - № 2. - С. 49-56.
15. Глов, А.Г. Выявление и филогенетический анализ вируса диареи крупного рогатого скота двух видов при вспышке болезни на молочном комплексе / А.Г. Глов, А.В. Нефедченко, **С.В. Котенева**, Т.И. Глотова // Ветеринария. - 2019. - № 9. - С. 13-18.
16. Глов, А.Г. Вспышка заболевания крупного рогатого скота, вызванная вирусом диареи второго вида / А.Г. Глов, Т.И. Глотова, **С.В. Котенева** [и др.] // Ветеринария. - 2019. - № 3. - С. 3-8.
17. **Котенева, С.В.** Генетический полиморфизм возбудителя вирусной диареи, выявленного у телят при вспышках респираторных болезней / С.В. Котенева, Т.И. Глотова, А.Г. Глов, А.Г. Южаков // Ветеринария. - 2018. - № 4. - С. 25-31.
18. Глов, А.Г. Молекулярная эпизоотология вирусной диареи крупного рогатого скота в Сибири / А.Г. Глов, **С.В. Котенева**, Т.И. Глотова [и др.] // Ветеринария. - 2017. - № 12. - С. 14-20.
19. **Котенева, С.В.** Частота выявления генома вируса инфекционного ринотрахеита у крупного рогатого скота при патологии воспроизводства в хозяйствах молочного направления / С.В. Котенева, О.В. Семенова, Т.И. Глотова [и др.] // Ветеринария Кубани. - 2017. - № 5. - С. 8-11.

20. Глотов, А.Г. Выявление генома вируса вирусной диареи у крупного рогатого скота при патологии воспроизводства / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, О.В. Семенова, **С.В. Котенева** // Ветеринария. - 2016. - № 4. - С. 17-23.

*Публикации в изданиях, входящих в базу цитирования
Scopus и Web of Science*

21. Глотов, А.Г. Пестивирусы крупного рогатого скота - контаминанты биологических препаратов (обзор) / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, **С.В. Котенева** [и др.] // Сельскохозяйственная биология. - 2024. - Т. 59. - № 2. - С. 179-193.

22. Глотов, А.Г. Частота выявления от больных животных и генетический полиморфизм сибирских изолятов респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота (Pneumoviridae: Orthopneumovirus; BRSV), выявленных на территориях Уральского и Сибирского федеральных округов РФ и Республики Казахстан / А.Г. Глотов, А.Г. Южаков, Т.И. Глотова, А.В. Нефедченко, **С.В. Котенева** [и др.] // Вопросы вирусологии. - 2024. - Т. 69. - № 1. - С. 76-87.

23. Глотов, А.Г. Генетический полиморфизм сибирских изолятов коронавируса крупного рогатого скота (Coronaviridae: Betacoronavirus-1: Bovine-like Coronaviruses) / А.Г. Глотов, А.В. Нефедченко, А.Г. Южаков, **С.В. Котенева** [и др.] // Вопросы вирусологии. - 2022. - Т. 67. - № 6. - С. 465-474.

24. Глотов, А.Г. Генетический полиморфизм и распространение пестивирусов (Flaviviridae: Pestivirus) крупного рогатого скота в мире и в Российской Федерации / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, А.В. Нефедченко, **С.В. Котенева** // Вопросы вирусологии. - 2022. - Т. 67. - № 1. - С. 18-26.

25. Нефедченко, А.В. Выявление и количественная оценка вирусных и бактериальных возбудителей респираторных болезней крупного рогатого скота при помощи ПЦР в реальном времени / А.В. Нефедченко, А.Г. Глотов, **С.В. Котенева**, Т.И. Глотова // Сельскохозяйственная биология. - 2021. - Т. 56. - № 4. - С. 695-706.

26. Нефедченко, А.В. Разработка и испытание полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для идентификации и количественного определения респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота / А.В. Нефедченко, А.Г. Глотов, **С.В. Котенева**, Т.И. Глотова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 2020. - Т. 38. - № 3. - С. 145-150.

27. Нефедченко, А.В. Выявление пестивирусов крупного рогатого скота при помощи мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / А.В. Нефедченко, **С.В. Котенева**, Т.И. Глотова, А.Г. Глотов // Вопросы вирусологии. - 2020. - Т. 65. - № 2. - С. 95-102.

28. Нефедченко, А.В. Выявление ДНК герпесвируса четвертого типа у крупного рогатого скота при помощи ПЦР в режиме реального времени / А.В. Нефедченко, **С.В. Котенева**, Т.И. Глотова [и др.] // Вопросы вирусологии. - 2019. - Т. 64. - № 4. - С. 178-184.

29. Глотов, А.Г. Филогенетический анализ пестивирусов крупного рогатого скота, выявленных в Сибири / А.Г. Глотов, **С.В. Котенева**, Т.И. Глотова [и др.] // Вопросы вирусологии. - 2018. - Т. 63. - № 4. - С. 185-191.

30. **Котенева, С.В.** Генетический полиморфизм возбудителя вирусной диареи (болезни слизистых оболочек) крупного рогатого скота на молочных комплексах Сибири / С.В. Котенева, А.В. Нефедченко, Т.И. Глотова, А.Г. Глотов // Сельскохозяйственная биология. - 2018. - Т. 53. - № 6. - С. 1238-1246.

31. Глотов, А.Г. О контаминации импортируемой фетальной сыворотки крови крупного рогатого скота пестивирусами как факторе распространения вирусной диареи в условиях глобализации: мини-обзор / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, **С.В. Котенева** // Сельскохозяйственная биология. - 2018. - Т. 53. - № 2. - С. 248-257.

32. **Котенева, С.В.** Идентификация атипичного пестивируса крупного рогатого скота в биологических образцах. / **С.В. Котенева**, Р.А. Максютлов, Т.И. Глотова, А.Г. Глотов // Сельскохозяйственная биология. - 2017. - Т. 52. - № 6. - С. 1259-1264.

33. Глотов, А.Г. Индикаторы циркуляции возбудителя вирусной диареи (болезни слизистых оболочек) крупного рогатого скота на молочных комплексах в условиях Сибири / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, О.В. Семенова, **С.В. Котенева** [и др.] // Сельскохозяйственная биология. - 2016. - Т. 51. - № 4. - С. 483-490.

Патенты РФ

34. Пат. 2798286 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, А61К 31/00. Способ выявления возбудителей респираторных инфекций крупного рогатого скота: BPIV, BRSV, BHV-1, BHV-4, BCoV, BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3, на основе мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) / А.Г. Глотов, А.В. Нефедченко, Т.И. Глотова, **С.В. Котенева**; заявитель и патентообладатель СФНЦА РАН (RU). – № 2022114969; заявл. 01.06.2022; опублик. 21.06.2023, Бюл. № 18.

35. Пат. 2768753 С2 Российская Федерация, МПК G01N 33/50, G01N 33/569, С12Q 1/686, С12Q 1/6876. Набор синтетических олигонуклеотидных праймеров и зондов для выявления вируса респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота и гена GAPDH крупного рогатого скота и способ выявления РНК вируса респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота / А.В. Нефедченко, А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, **С.В. Котенева**; заявитель и патентообладатель СФНЦА РАН (RU). - № 2020125439; заявл. 22.07.2020; опублик. 24.03.2022, Бюл. № 9.

36. Пат. 2731716 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Набор для дифференциации пестивирусов крупного рогатого скота и способ дифференциации пестивирусов крупного рогатого скота / А.В. Нефедченко, А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, **С.В. Котенева**; заявитель и патентообладатель СФНЦА РАН (RU). - № 2019134978; заявл. 30.10.2019; опублик. 08.09.2020, Бюл. № 25.

37. Пат. 2700750 С1 Российская Федерация, МПК С12N 15/00. Набор олигонуклеотидных праймеров и зонда для выявления вируса герпеса крупного рогатого скота 4-го типа (BHV-4) в пробах биоматериала / А.В. Нефедченко, Т.И. Глотова, А.Г. Глотов, **С.В. Котенева**; заявитель и патентообладатель СФНЦА РАН (RU). - № 2018137753; заявл. 25.10.2018; опублик. 19.09.2019, Бюл. № 26.

38. Пат. 2607025 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, С12N 15/11. Синтетические олигонуклеотидные праймеры и способ выявления РНК атипичного

пестивируса крупного рогатого скота / **С.В. Котенева**, Р.А. Максютлов, А.Г. Глотов [и др.]; заявители и патентообладатели СФНЦА РАН и ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (RU). - № 2016120164; заявл. 24.05.2016; опубл. 10.01.2017, Бюл. № 1.

Публикации в других изданиях

39. **Котенева, С.В.** Особенности этиологической структуры респираторных болезней телят на крупных молочных комплексах с завозом импортного скота / **С.В. Котенева**, Т.И. Глотова, А.В. Нефедченко, А.Г. Глотов // Актуальные проблемы лечения и профилактики болезней молодняка: материалы Международ. науч.-практ. конф., Витебск, 04-06 ноября 2025 года. – Витебск: Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2025. - С. 235-239.

40. **Котенева, С.В.** Разработка мультиплексной ПЦР в режиме реального времени для выявления трех видов пестивирусов крупного рогатого скота / **С.В. Котенева**, А.В. Нефедченко, Т.И. Глотова, А.Г. Глотов // Биотехнология: научные исследования и связь с производством: материалы Международ. науч.-практ. конф. Лосино-Петровский, 30-31 октября 2024 года / Под ред. А.Д. Забережного. – Лосино-Петровский: Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, 2024. - С. 120-125.

41. Глотов, А.Г. Основные пути заноса и распространения пестивирусов крупного рогатого скота в молочных хозяйствах Сибири / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, А.В. Нефедченко, **С.В. Котенева** // Актуальные проблемы сельского хозяйства и перспективы развития: материалы Всерос. (национальной) науч.-практ. конф., посвящ. 60-летию НИИ ветеринарии Восточной Сибири - филиала СФНЦА РАН и 300-летию РАН, Чита, 25 октября 2024 года. – Чита: Государственное учреждение дополнительного профессионального образования "Институт развития образования Забайкальского края", 2024. – С. 20-26.

42. **Котенева, С.В.** Вирус герпеса 4-го типа крупного рогатого скота - этиологический агент респираторных заболеваний телят / **С.В. Котенева**, А.В. Нефедченко, Т.Е. Судоргина [и др.] // Актуальные проблемы инфекционной патологии животных и пути их решения: материалы Международ. науч.-практ. конф., посвящ. Дню Белорусской науки и 95-летию кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней, Витебск, 15-16 декабря 2022 года. – Витебск: Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2023. - Витебск, 2023. - С. 57-59.

43. Нефедченко, А.В. Выявление возбудителей респираторного комплекса крупного рогатого скота с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции / А.В. Нефедченко, **С.В. Котенева**, Т.И. Глотова, А.Г. Глотов // Актуальные проблемы инфекционной патологии животных и пути их решения: материалы Международ. науч.-практ. конф., посвящ. дню Белорусской науки и 95-летию кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней, Витебск, 15-16 декабря 2022 года. – Витебск: Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2023. - С. 93-95.

44. Нефедченко, А.В. Коронавирусная инфекция телят на молочных комплексах / А.В. Нефедченко, Т.И. Глотова, А.Г. Глотов, **С.В. Котенева** [и др.] // Актуальные проблемы лечения и профилактики болезней молодняка: материалы Международ. науч.-практ. конф., Витебск, 02-04 ноября 2022 года. – Витебск: Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2022. - С. 106-109.

45. Нефедченко, А.В. Роль пестивирусов в этиологии инфекционных болезней крупного рогатого скота. / А.В. Нефедченко, Т.И. Глотова, А.Г. Глотов, **С.В. Котенева** // Молекулярная диагностика: сб. тр. X юбилейной международ. науч.-практ. конф., Москва, 09-11 ноября 2021 года. – Тамбов: ООО фирма «Юлис», 2021. - С. 175-176.

46. Нефедченко, А.В. Выявление вируса герпеса крупного рогатого скота четвертого типа (BHV-4) / А.В. Нефедченко, Т.И. Глотова, А.Г. Глотов, **С.В. Котенева** // Молекулярная диагностика: сб. тр. X юбилейной международ. науч.-практ. конф., Москва, 9-11 ноября 2021 года. – Тамбов: ООО фирма «Юлис», 2021. - С. 192-193.

47. Глотов, А.Г. Выявление коронавируса крупного рогатого скота у телят в Сибири / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, А.В. Нефедченко, **С.В. Котенева** // Научные достижения генетики и биотехнологии в ветеринарной медицине и животноводстве: сб. материалов науч.-практ. конф. с международным участием, Екатеринбург, 27-28 мая 2021 года. – Екатеринбург: издательство ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, 2021. - С. 43-47.

48. **Котенева, С.В.** Разработка способа выявления атипичного пестивируса крупного рогатого скота в биологических образцах / С.В. Котенева, А.Г. Глотов, Т.И. Глотова // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии: сб. тез. XVIII Всерос. конф. молодых учёных, посвящ. памяти акад. РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева, Москва, 19–20 апреля 2018 года. – Москва: ФГБНУ ВНИИСБ, 2018. - С. 193-194.

49. Семенова, О.В. Особенность циркуляции BVDV и его этиологическая роль в репродуктивных проблемах крупного рогатого скота в молочно - товарных хозяйствах закрытого типа / О.В. Семенова, **С.В. Котенева**, Т.И. Глотова, А.Г. Глотов // Российский ветеринарный журнал. - 2017. - № 7. - С. 9-12.

50. **Котенева, С.В.** ПЦР для выявления РНК атипичного пестивируса крупного рогатого скота / С.В. Котенева, Р.А. Максютлов, Т.И. Глотова, А.Г. Глотов // Молекулярная диагностика. 2017: сб. тр. IX Всерос. науч.-практ. конф. с международ. участием, Москва, 18-20 апреля 2017 года / Под редакцией В.И. Покровского. - Тамбов: ООО фирма «Юлис», 2017. - С. 372.

51. **Котенева, С.В.** Частота выявления генома респираторно-синцитиального вируса у крупного рогатого скота при вспышках бронхопневмоний на молочных комплексах / С.В. Котенева, К.В. Войтова, Т.И. Глотова [и др.] // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. - 2016. - № 3. - С. 18-21.

52. **Котенева С.В.** Выявление вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота при патологии органов воспроизводства / С.В. Котенева,

Т.И. Глотова, А.Г. Готов // Сб. науч. тр. Всероссийского НИИ овцеводства и козоводства. - 2015. - Т. 1. - № 8. - С. 443-445.

53. Готов, А.Г. Вирусные и бактериальные агенты респираторного комплекса, вызывающие патологию у крупного рогатого скота в хозяйствах Сибири / А.Г. Готов, Т.И. Глотова, О.В. Семенова, **С.В. Котенева** [и др.] // Сейфуллинские чтения - 10: Новые перспективы подготовки конкурентоспособных кадров и роль науки в формировании индустриально-инновационной политики страны: сб. материалов Международ. науч.-теоретич. конф., посвящ. 120-летию со дня рождения С. Сейфуллина, Астана, 23-24 октября 2014 года. - Астана: Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, 2014. - С. 96-98.

54. Глотова, Т.И. Выявление ассоциаций вирусов и бактерий респираторного комплекса у импортного скота при острых вспышках бронхопневмоний на молочных комплексах / Т.И. Глотова, О.В. Семенова, **С.В. Котенева**, А.Г. Готов // Сб. науч. тр. Ставропольского НИИ животноводства и кормопроизводства. - 2014. - Т. 2. - № 7. - С. 355-358.