

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(СФНЦА РАН)

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

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
доктора ветеринарных наук

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

Новосибирск 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	18
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	18
1.1 Основные вирусные этиологические агенты респираторных болезней крупного рогатого скота.....	18
1.2 Вирусные респираторные болезни крупного рогатого скота: этиология, эпизоотология, патогенетические и клинические аспекты	21
1.2.1 Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота.....	21
1.2.1.1 Характеристика вируса и строение генома.....	21
1.2.1.2 Эпизоотологические данные.....	23
1.2.1.3 Клинические признаки и патогенез.....	24
1.2.1.4 Роль BoHV-1 в развитии респираторной патологии	26
1.2.2 Вирусная диарея-болезнь слизистых крупного рогатого скота....	27
1.2.2.1 Характеристика вируса и строение генома.....	27
1.2.2.2 Эпизоотологические данные.....	29
1.2.2.3 Клинические признаки и патогенез.....	33
1.2.2.4 Роль BVDV в развитии респираторной патологии.....	36
1.2.3 Респираторно-синцитиальная инфекция крупного рогатого скота.....	38
1.2.3.1 Характеристика вируса и строение генома.....	38
1.2.3.2 Эпизоотологические данные.....	40
1.2.3.3 Клинические признаки и патогенез.....	42
1.2.4 Коронавирусная инфекция крупного рогатого скота.....	45
1.2.4.1 Характеристика вируса и строение генома.....	45
1.2.4.2 Эпизоотологические данные.....	47
1.2.4.3 Клинические признаки и патогенез.....	48
1.2.4.4 Потенциал межвидовой передачи BCoV	51
1.2.5 Инфекции, вызываемые герпесвирусом крупного рогатого скота 4 типа	52
1.2.5.1 Характеристика вируса и строение генома.....	52
1.2.5.2 Эпизоотологические данные.....	53
1.2.5.3 Клинические признаки и патогенез.....	54
1.2.6 Парагрипп-3 крупного рогатого скота	58

1.2.6.1	Характеристика вируса и строение генома.....	58
1.2.6.2	Эпизоотологические данные.....	59
1.2.6.3	Клинические признаки и патогенез.....	60
1.3	Лабораторная диагностика вирусных инфекций крупного рогатого скота.....	62
1.3.1	Традиционные методы лабораторной диагностики.....	62
1.3.2	Молекулярные методы диагностики вирусных респираторных инфекций.....	64
1.4	Изучение генетического разнообразия вирусов респираторного комплекса крупного рогатого скота.....	69
1.4.1	Генетическое разнообразие BoHV-1.....	69
1.4.2	Генетическое разнообразие BVDV.....	70
1.4.3	Генетическое разнообразие BRSV.....	72
1.4.4	Генетическое разнообразие BCoV.....	73
1.4.5	Генетическое разнообразие BoHV-4.....	74
1.4.6	Генетическое разнообразие BPIV-3.....	75
1.5	Заключение по обзору литературы.....	76
2	СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	78
2.1	Материалы и методы исследований.....	78
2.1.1	Материалы.....	78
2.1.2	Методы.....	82
2.2	Результаты собственных исследований.....	88
2.2.1	Разработка диагностических тест-систем на основе ПЦР для выявления геномов основных вирусов респираторного комплекса крупного рогатого скота.....	88
2.2.1.1	Тест-система для выявления генома BVDV-3 методом ПЦР с электрофоретической детекцией.....	88
2.2.1.2	Тест-система для выявления и дифференциации пестивирусов крупного рогатого скота (BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3) методом ПЦР в режиме реального времени.....	93
2.2.1.3	Тест-система для выявления и количественного определения вируса респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота методом ПЦР в режиме реального времени....	99
2.2.1.4	Тест-система для выявления герпесвируса крупного рогатого скота 4-го типа методом ПЦР в режиме реального времени...	105
2.2.1.5	Тест-система для одновременного выявления восьми вирусов респираторного комплекса крупного рогатого скота методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени.....	109
2.2.2	Этиологическая структура болезней респираторного комплекса	

крупного рогатого скота в молочных хозяйствах Сибири.....	120
2.2.2.1 Этиологическая структура респираторных болезней крупно-рогатого скота на молочных комплексах с завозом импортного поголовья.....	123
2.2.2.1.1 Ассоциации респираторных патогенов у крупного рогатого скота на молочных комплексах с завозом импортного поголовья.....	128
2.2.2.1.2 Этиологическая структура респираторных болезней у импортного скота в период адаптации на крупных молочных комплексах.....	130
2.2.2.2 Этиологическая структура респираторных болезней крупного рогатого скота на молочных комплексах без импортного поголовья.....	133
2.2.2.2.1 Ассоциации респираторных патогенов у крупного рогатого скота на молочных комплексах без импортного поголовья.....	137
2.2.2.3 Этиологическая структура респираторных болезней крупного рогатого скота на мелких товарных фермах.....	139
2.2.2.3.1 Ассоциации респираторных патогенов у крупного рогатого скота на мелких товарных фермах.....	143
2.2.3 Клинические особенности и молекулярно-генетическая характеристика пестивирусных инфекций крупного рогатого скота.....	145
2.2.3.1 Особенности смешанной инфекции BVDV-1 и BVDV-2 у крупного рогатого скота	145
2.2.3.2 Характеристика BVDV-3 инфекции в молочных хозяйствах..	149
2.2.4 Клинические формы и локализация генома BCoV при респираторных и желудочно-кишечных болезнях телят.....	152
2.2.5 Контаминация биологической продукции вирусами крупного рогатого скота.....	156
2.2.5.1 Роль контаминированной спермы быков-производителей в распространении BoHV-1 и BVDV-2.....	156
2.2.5.2 Контаминация эмбриональных сывороток и клеточных культур пестивирусами крупного рогатого скота.....	159
2.2.6 Молекулярная эпизоотология респираторных вирусов, циркулирующих у крупного рогатого скота в Сибири	163
2.2.6.1 Молекулярно-генетическая вариабельность штаммов BVDV..	163
2.2.6.1.1 Филогенетический анализ области 5'-UTR изолятов BVDV	163
2.2.6.1.2 Филогенетический анализ генов N ^{pro} , Erns, E1 и E2 изолятов BVDV.....	173
2.2.6.2 Генетический полиморфизм штаммов BRSV.....	180

2.2.6.3	Генетический полиморфизм штаммов ВСоV.....	186
2.2.6.4	Генетический полиморфизм штаммов ВоHV-4.....	192
2.3	Обсуждение результатов	194
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		227
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....		233
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ		235
ПРИЛОЖЕНИЯ		292
	Приложение А – Патенты РФ.....	293
	Приложение Б – ТУ и инструкции на тест-системы.....	298
	Приложение В – Методические рекомендации.....	311

ВВЕДЕНИЕ

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. Это способствует концентрации большого количества животных на ограниченных по площади территориях. Высокая концентрация животных увеличивает 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. В таких условиях значительно возрастает риск распространения вирусных инфекций (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, степени иммунитета животного и 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 способ-

ствуется развитию осложнений, снижению продуктивности, а также увеличению риска возникновения вторичных инфекций (Глотов А.Г., Глотова Т.И., 2008). Пестивирусы, помимо своей способности вызывать заболевания у животных, представляют значительный риск в качестве контаминантов различных биологических препаратов (Gomez-Romero N. et al., 2021).

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., 2009b; Gaudino M. et al., 2022). Они способны вызывать респираторную патологию у восприимчивых животных как моноинфекции, при этом их ассоциации с другими патогенами приводят к синергическому усилению тяжести клинического течения заболевания (Brogden K.A., Guthmiller J.M., 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, осложнять 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 распростра-

нения и повышении эффективности мер профилактики, включая разработку высококачественных вакцин и высокоспецифичных диагностических тестов.

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, 2006), А.Г. Глотова и Т.И. Глотовой (2008), В.А. Мищенко и соавт. (2009, 2011, 2012), И.Я. Строгановой (2011), Е.Н. Шиловой и соавт. (2014), О.Г. Петровой и соавт. (2015), А.В. Нефедченко (2018), В.В. Кирпиченко (2021) и многих других исследователей.

На протяжении последних десятилетий прогресс в области вирусологии был обусловлен разработкой и внедрением широкого спектра молекулярно-генетических методов исследования. Эти методы позволили более детально анализировать генетическую структуру инфекционных агентов, выявлять их генетическое разнообразие и механизмы распространения, а также разрабатывать более точные диагностические тесты и эффективные вакцины для профилактики респираторных инфекций у КРС.

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; А.В. Пчельниковым (2024) – ПЦР в реальном времени для дифференциальной диагностики герпесвирусов крупного рогатого скота 1 и 5 типов в биологическом материале; А.В. Нефедченко (2018) – ОТ-ПЦР для выявления и генотипирования BVDV-1a, -1b и -2a; К.В. Войтовой (2011) – ОТ-ПЦР для выявления BRSV с электрофоретической детекцией результата. 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 выявленный в 2004 г. в Европе в коммерческой эмбриональной сыворотке КРС, произведенной в Бразилии (Schirrmeyer H. et al., 2004). Зарубежными исследователями M. Losurdo (2015), V. Mari et al. (2016) были разработаны ОТ-ПЦР-РВ для эффективной дифференциации BVDV-1, BVDV-2 и BVDV-3.

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 одновременной 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 способны контаминировать биологические продукты, такие как эмбриональная сыворотка, культуры клеток, вакцины, стволовые клетки, сперму быков-производителей, эмбрионы и т.д. (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 V. 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. Глотовой (2006) при использовании ПЦР-ПДРФ анализа штаммов и изолятов BoHV-1 установлено распространение у КРС в нашей стране 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, BVDV1-d и BVDV-2 в хозяйствах Сибири. А.В. Нефедченко (2018) выявил циркуляцию семи субтипов BVDV-1 (1a, 1b, 1c, 1d, 1i, 1f, 1p) и трех BVDV-2 (2a, 2b и 2c) среди телят с респираторной патологией в хозяйствах 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 1 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, выявленных на территории РФ.

Молекулярно-эпизоотологический мониторинг вирусных инфекций в конкретном регионе необходим для разработки успешных 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 на определенных территориях.

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 ВоНВ-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 ВоНВ-1 и ВВДВ, установление роли спермы в распространении вирусов; контаминация эмбриональных сывороток, клеточных культур пестивирусами КРС).

4. Выявить молекулярно-эпизоотологические особенности распространения ВВДВ, BRSV, ВСоV, ВоНВ-4, циркулирующих в популяциях КРС на территории Сибири, и оценить степень их генетической вариабельности.

Научная новизна

Разработаны тест-системы на основе ПЦР для выявления вирусов респираторного комплекса КРС: ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией результата для выявления генома ВВДВ-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 ВоНВ-4, определены их аналитическая чувствительность и диагностическая эффективность. Впервые в РФ разработана мультиплексная ОТ-ПЦР-РВ для одновременного выявления геномов восьми вирусов КРС: ВоНВ-1, ВВДВ-1, ВВДВ-2, ВВДВ-3, BRSV, ВоНВ-4, ВСоV, ВPIV-3.

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

Впервые в РФ на крупном молочном комплексе выявлена и генетически подтверждена сочетанная инфекция ВВДВ-1b и ВВДВ-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-2 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 под-

группам 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 гибридизационно-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. Глотову за неоценимую помощь и поддержку в работе на всех ее этапах, в организации и проведении работ, представленных в диссертации.

ции. 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. Глотовой, 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.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Основные вирусные этиологические агенты респираторных болезней крупного рогатого скота

Респираторные болезни КРС являются одной из наиболее важных причин экономического ущерба в индустрии молочного и мясного скотоводства во всем мире, приводя к падежу, снижению скорости роста, затратам на лечение, диагностические и профилактические мероприятия (Глотов А.Г. и соавт., 2008; Fulton R.W., 2009). Болезни, поражающие дыхательные пути КРС, были сгруппированы в общую категорию, известную как «комплекс респираторных болезней крупного рогатого скота» (Kumar P. et al., 2018). Несмотря на широкое использование вакцин и антибиотиков, смертность от респираторных болезней неуклонно растет с середины 1990-х годов (Loneragan G.H. et al., 2001). По оценкам, затраты на лечение и профилактику респираторных болезней молодняка КРС в США составляют от 800 миллионов до 1 миллиарда долларов в год (USDA/Agriculture Research Service, 2011). Комплекс респираторных болезней КРС приносит экономике Великобритании ежегодные расходы в размере около 80 миллионов фунтов стерлингов даже при ежегодной профилактической вакцинации. Несмотря на достижения, современные вакцины демонстрируют ограниченную эффективность, о чем свидетельствует развитие клинического заболевания даже у вакцинированных животных (Lemon J.L., McMenamy M.J., 2021).

Возникновение комплекса респираторных болезней обусловлено сложным взаимодействием патогенов, факторов окружающей среды (условия содержания и кормления животных, плотность животных на единицу площади, уровень молочной продуктивности и т.д.) и особенностей организма животного (возраст, иммунный статус и т.д.).

Массовые респираторные болезни возникают после стрессов, связанных с транспортировкой животных, в период после отъема, кастрации, перегруппировки животных. Наиболее подвержены инфицированию телята в возрасте до 6 месяцев

в период между снижением уровня пассивного и началом выработки активного иммунитета.

Вспышки бронхопневмоний чаще происходят после ввода новых животных в стадо. С импортируемым скотом происходит занос новых генетических вариантов вирусов и бактерий, которыми инфицируются неиммунные животные основного стада. Импортируемый скот может инфицироваться возбудителями, стационарно присутствующими на ферме (Глотов А.Г., Глотова Т.И., 2008).

Вирусы играют важную роль в развитии комплекса респираторных болезней, поскольку они предрасполагают паренхиму легких животного к бактериальной инфекции, вызывая прямое повреждение слизистой оболочки дыхательных путей и подавляя защитный механизм животного против бактерий, которые являются комменсальными в верхних дыхательных путях (Taylor J.D., 2010). Основными вирусами, вызывающими комплекс респираторных болезней, являются вирус герпеса крупного рогатого скота 1 типа (BoHV-1), вирус парагриппа-3 крупного рогатого скота (BPIV-3), респираторно-синцитиальный вирус крупного рогатого скота (BRSV), вирус вирусной диареи крупного рогатого скота (BVDV) и коронавирус крупного рогатого скота (Ellis J.A., 2009; Fulton R.W., 2009 b; Gaudino M. et al, 2022), поскольку они способны вызвать у восприимчивых животных респираторные болезни в моноварианте, а сочетание с другими патогенами приводит к значительному усилению тяжести их течения (Brogden K.A., Guthmiller J.M., 2002). BVDV был признан основным патогеном, связанным с развитием респираторного комплекса (Griffin D. et al., 2010). Кроме того, аденовирус (BAdV-1) и вирус гриппа D (IDV) КРС также были идентифицированы как вирусные патогены, участвующие в развитии данной патологии (Gay E., Barnouin J., 2009). Еще один вирус, участие которого в возникновении респираторных заболеваний доказано некоторыми исследователями – вирус герпеса крупного рогатого скота 4 типа (BoHV-4) (Gagnon C.A. et al., 2017; Kumagai A. et al., 2024).

Вирусы могут вызывать первичное заболевание как в моноварианте, так и в сочетании с другими вирусами (Fulton R.W., 2009 b). Заражение может

происходить одновременно двумя и более возбудителями («ассоциированная», «коинфекция») или новая инфекция может наслаиваться на уже имеющееся заболевание («суперинфекция»). Сочетание нескольких респираторных патогенов, как правило, приводит к более тяжелому течению инфекционного процесса. Вирусы, за исключением BoHV-1 и BVDV, вызывают преимущественно поверхностные инфекции эпителиальных клеток дыхательных путей от слизистой оболочки носоглотки до легких. BoHV-1 и BVDV часто связаны с системным распространением вируса, что проявляется внутриутробными инфекциями и репродуктивной патологией у восприимчивых животных (Fulton R.W., 2009 b).

Многочисленные исследования показали, что первичная вирусная инфекция предрасполагает крупный рогатый скот к вторичной бактериальной инфекции, во многих случаях вызванной бактериями, уже присутствующими в дыхательных путях крупного рогатого скота. Бактериальные патогены, участвующие в развитии комплекса респираторных болезней, включают *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni* и *Mycoplasma bovis* (Griffin D. et al., 2010; Grissett G.P. et al., 2015). Другие бактериальные патогены, ассоциированные с респираторным комплексом, включают *Arcanobacterium pyogenes*, *Bibersteinia trehalosi*, а также другие виды пастереллы и микоплазмы (Griffin D. et al., 2010).

Респираторным инфекциям свойственно значительное разнообразие характера течения и клинического проявления. Помимо респираторной патологии, вирусы респираторного комплекса оказывают воздействие на другие системы животного. Так, герпесвирусы являются причиной заболеваний репродуктивной системы, кератоконъюнктивитов, абортов, энцефалитов и генерализованного заболевания у новорожденных; BVDV обладает тропностью ко многим тканям и вызывает болезни репродуктивной, пищеварительной систем, геморрагический синдром, болезнь слизистых, аборт, персистентную инфекцию. BCoV также вызывает поражение пищеварительной и респираторной систем. BRSV и BPIV-3 оказывают прямое действие на респираторный тракт.

Учитывая многофакторную природу, респираторные болезни КРС требуют комплексного подхода для эффективной диагностики, профилактики и лечения.

Смешанные респираторные инфекции встречаются часто, и вовлечение патогена невозможно диагностировать на основе клинической картины. Точная идентификация патогенов, вовлеченных в вспышку респираторного заболевания, является важным условием для определения мер борьбы с заболеванием (Fergusson M. et al., 2024).

Далее будут рассмотрены основные характеристики вирусов - возбудителей респираторных болезней, особенности эпизоотологии, патогенеза, клинические признаки болезней и современные подходы к их диагностике.

1.2 Вирусные респираторные болезни крупного рогатого скота: этиология, эпизоотология, патогенетические и клинические аспекты

1.2.1 Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота

1.2.1.1 Характеристика вируса и строение генома

Вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (герпесвирус КРС 1 типа, Bovine herpesvirus 1, BoHV-1), переименованный в 2022 г. в *Varicellovirus bovinealpha1*, относится к семейству Orthoherpesviridae, подсемейству Alphaherpesvirinae, роду Varicellovirus (https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202401440&taxon_name=Varicellovirus%20bovinealpha1#release_40).

Вирус является возбудителем различных тяжелых заболеваний дыхательной и репродуктивной систем КРС, включая инфекционный ринотрахеит (ИРТ) и инфекционный пустулезный вульвовагинит/баланопостит (ИПВ/ИБП) КРС (Waldeck H.W.F. et al., 2021).

Впервые ИРТ КРС описали R.J. Schroeder и D.M. Mous в 1954 г. в США, Калифорния, а вирус впервые был выделен в 1956 г. из носовых выделений телят с респираторным синдромом (Madin S.H. et al., 1956). В СССР BoHV-1 впервые был выделен в 1969 г. Н.Н. Крюковым от больных телят в Тамбовской области (Крюков Н.Н., 1972).

Вирионы ВоHV-1 состоят из ядра, содержащего линейную двухцепочечную ДНК, и икосаэдрического капсида диаметром около 100 нм, содержащего 162 капсомера. Капсид окружен тегументом, который заключен в липопротеиновую оболочку с многочисленными небольшими гликопротеиновыми шипами (Roizman B. et al., 2007). Молекула ДНК состоит из длинного уникального сегмента U1 (около 100 т.п.н.), внутренних повторов IR (11 т.п.н.), короткого уникального сегмента US (13 т.п.н.) и терминальных повторов TR. Геном ВоHV-1 кодирует 33 структурных белка, 13 из которых, вероятно, связаны с оболочкой, а 10 из них потенциально кодируют гликопротеины (Barber K.A. et al., 2017).

Герпесвирусы проникают в клетки, сливаясь с цитоплазматической мембраной. Исследования показывают, что для проникновения вируса необходимы гликопротеины gB, gC, gD, gE, gH, gK и gL (Muylkens B. et al., 2007). Подтипы ВHV-1.1 и ВHV-1.2 различаются по эпитопам gC, что может отражаться на степени прикрепления вируса и объяснить различия в вирулентности у штаммов разных подтипов (Rijsewijk F.A. et al., 1999). Белки клетки-хозяина, необходимые для проникновения ВоHV-1, до конца не изучены. Вирус связывается с гепарансульфатом на поверхности клетки через белки gB и gC и соединяется с рецепторами клеточной поверхности (Byrne K.M. et al., 1995).

После проникновения в клетку-хозяина ВоHV-1 транспортируется по микротрубочкам в ядро для репликации с использованием белков клетки-хозяина. Вирус покрывается оболочкой, а затем транспортируется внутри внутриклеточных везикул к цитоплазматической мембране и высвобождается из клетки. Репликация ВHV-1 начинается в течение 2 часов после заражения крупного рогатого скота с сопутствующей экспрессией антигена клеточной поверхности в течение 3–4 часов после инфекции. Выход и распространение вируса начинаются через 8 часов после заражения (Biswas S. et al., 2013).

Все штаммы ВоHV-1 делятся на три подтипа: ВоHV-1.1, -1.2a и -1.2b. Все подтипы способны вызывать респираторные заболевания, но штаммы подтипов 1.2a и 1.2b считаются менее вирулентными. Изоляты вируса подтипа 1 являются

возбудителями ИРТ КРС и обычно обнаруживаются в дыхательных путях и абортированных плодах. Инфекции подтипа 2a связаны с широким спектром клинических симптомов в дыхательных и половых путях (ИПВ, ИБП и абортами). Подтип 2b связан с респираторными заболеваниями, ИПВ и ИПБ, но не с абортами (Barber K.A. et al., 2017; Ostler J.B., Jones C., 2023). Первоначально выделяли еще один подтип ВоНВ-1 – 1.3, но затем он был классифицирован как ВоНВ-5, вызывающий герпесвирусный энцефалит КРС (Kumar N. et al., 2020).

1.2.1.2 Эпизоотологические данные

Инфекции ВоНВ-1 встречаются во всем мире, хотя существуют различия в распространенности и заболеваемости (Ostler J.B., Jones C., 2023; Petrini S. et al., 2024). В Европейском союзе (ЕС) ряд стран или регионов считаются свободными от ВоНВ-1 после внедрения одобренных ЕС программ по ликвидации, включая Австрию, Германию, Чехию, Данию, Финляндию, Швецию, Джерси (Великобритания), Норвегию, Швейцарию, а также некоторые провинции Италии (Waldeck H.W.F. et al., 2021). Заболеваемость и распространенность ИРТ КРС сильно различаются в зависимости от географического положения и методов ведения животноводства (Nandi S. et al., 2009). Распространенность заболевания низкая в Словении — 0,1%, в связи с продолжающимися программами ликвидации (Hostnik P. et al., 2021), а в Испании — самая высокая — 99,92% (Dias J.A. et al., 2013). Серопревалентность в Китае по данным метаанализа составляет 40,00% (Chen X. et al., 2018), в Колумбии - 57,5%, Бразилии - 71,30 %, Мексике - 76,32%, Эфиопии - 25,6 (Rashmi L. et al., 2024).

Заболевание получило широкое распространение на территории нашей страны после массового завоза племенного скота в 70-е и 80-е годы прошлого столетия (Глотов А.Г. и соавт., 2006). В настоящее время ИРТ КРС регистрируется во многих регионах РФ (Юров К.П. и соавт., 2003; Петрова О.Г. и соавт., 2005, 2008; Кушнир Н.И., 2008; Строганова И.Я., 2011; Глотов А.Г. и соавт., 2013, Нефедченко А.В., 2018, Красочко П.П. и соавт., 2021 Пчельников А.В., 2024).

По данным А.В. Пчельникова (2024), вирус ИРТ КРС циркулирует в 30% обследованных животноводческих хозяйств Московской области и 47% Тверской области. Доля ввезенного на территорию России в 2012-2021 гг. из стационарно неблагополучных по ИРТ КРС стран составила 87 %. Поэтому риск заноса новых эпизоотических штаммов возбудителя инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота на территорию России при осуществлении импортных операций оценивается как очень высокий.

КРС является основным хозяином вируса в природе. Антитела к вирусу ИРТ КРС выявляются в пробах других домашних и диких парнокопытных, благородных оленей, ланей (Rola J. et al., 2017), лосей, косуль (Пчельников А.В., 2024). ВоHV-1 был выделен от диких буйволов (Hedayat N. et al., 2020), овец и коз (Muylkens B. et al., 2007) .

В естественных условиях к ВоHV-1 восприимчив КРС всех пород и возрастов. У молодняка заболевание протекает тяжелее, чем у взрослых животных, у мясного скота тяжелее, чем у молочного (Глотов А.Г. и соавт., 2006).

ИРТ КРС характеризуется высокой контагиозностью, заболеваемость может составлять от 15-50% до 100%. Летальность составляет 2-15%, а при осложнении секундарной микрофлорой или при поражении центральной нервной системы может достигать 50-100% (Глотов А.Г. и соавт., 2006).

Передача вируса происходит воздушно-капельным, контактным, половым путем и при искусственном осеменении. Непрямая передача происходит через контаминированные корма или воду, кормушки, при машинном доении. Человек может быть механическим переносчиком при заносе и последующем распространении на предприятии (Глотов А.Г. и соавт., 2006).

1.2.1.3 Клинические признаки и патогенез

Вирус вызывает инфекционный ринотрахеит КРС (ИРТ КРС), конъюнктивиты, инфекционный пустулезный вульвовагинит, инфекционный

пустулезный баланопостит и аборт у взрослых животных, а также энцефалит, энтерит и генерализованную инфекцию у телят (Biswas S. et al., 2013)

У телят заболевание проявляется чаще в респираторной форме (Глотова Т.И., 2006), отмечают различной формы риниты, ринотрахеиты с образованием дифтеритических наложений и язв, фарингиты, катаральную, реже крупозную пневмонию (Крюков Н.Н. и соавт., 1984), реже диагностируют менингоэнцефалиты (Roels S. et al., 2000). У взрослых животных чаще регистрируют генитальную форму инфекции: у коров – аборт, эндометриты, маститы, бесплодие, снижение массы тела и удоев, у быков – баланопоститы, орхиты, снижение качества спермы (Muylkens B. et al., 2007; Khaneabad A. et al., 2023).

В эпизоотологическом отношении наиболее опасна генитальная форма ИРТ КРС, так как выделение вируса при этой форме носит более длительный характер, а инфицированные коровы служат постоянным источником возбудителя инфекции для телят (Глотов А.Г. и соавт., 2002).

Первичная репликация вируса наблюдается в месте его проникновения – в слизистой оболочке носа или половых органов. Во время первоначальной репликации в месте проникновения вирусы герпеса могут проникать в аксоны местных нервных клеток. Посредством внутриаксонального транспорта вирусы достигают тел нейронов в региональных ганглиях, где устанавливают латенцию (Nandi S. et al., 2009). Генерализация инфекции осуществляется тремя путями: вирусемией, невральным распространением и пассированием вируса от клетки к клетке через межклеточные мостики (Biswas S. et al., 2013).

Вирусемия развивается после первичной инфекции и продолжается до появления антител, а также при рецидивах. Ею можно объяснить заражение и гибель плода, так как вирус может преодолевать плацентарный барьер, а также редкие случаи энцефалита (Ostler J.V., Jones C., 2023). После транзиторной вирусемии происходит инфицирование пищеварительного тракта, вымени, плода и яичников. ВоHV-1 может инфицировать моноциты крови, где возможна ограниченная репликация и высвобождение вируса. (Righi C. et al., 2023).

При невральном распространении вирус, интенсивно размножаясь в месте первичного проникновения, контаминирует периферические нервы и достигает центральной нервной системы, что может приводить к энцефалитам.

Заражение BoHV-1 снижает устойчивость к вторичным бактериальным инфекциям, таким как *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, что приводит к подавлению клеточного иммунитета и последующей летальности (Biswas S. et al., 2013)

После первичной инфекции BoHV-1 животные становятся скрытыми вирусоносителями. BoHV-1 устанавливает пожизненную латентность с персистенцией вируса в нервных ганглиях вблизи места первичного размножения: тройничном при респираторной и сакральном - при половой форме (El-Mayet F., Jones C., 2024). Также латенция может поддерживаться в лимфоидных клетках респираторного тракта.

На тяжесть заболевания влияют вирулентность штамма BoHV-1, факторы устойчивости хозяина, особенно возраст, а также бактериальная инфекция. (Muylkens B. et al., 2007). У коров после респираторной формы могут происходить аборт. Распространение вируса среди неиммунных животных происходит быстро, и обычно все животные стада заболевают в течение 3-4 недель. После появления гинекологических заболеваний у коров заболевают телята. Чаще признаки острой формы ИРТ выявляют у телят до 6 мес. При осложнении бактериальной инфекцией летальность среди телят может достигать 90% (Muylkens B. et al., 2007; Глотов А.Г., Глотова Т.И., 2008).

1.2.1.4 Роль BoHV-1 в развитии респираторной патологии

Вирус ИРТ КРС является одним из основных этиологических агентов комплекса респираторных болезней, вызывая иммуносупрессию (Biswas S. et al., 2013). Разрушая клетки эпителия, он создает благоприятные условия для репликации бактерий и снижает активность различных специфических и неспецифических бактериостатических механизмов в легких. Иммуносупрессия выражается в нарушении функций макрофагов, полиморфно-ядерных

нейтрофилов и лимфоцитов, снижении экспрессии рецепторов интерлейкина-2, снижения митогенной стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови, количества циркулирующих Т-лимфоцитов (Jones С., 2019). Эффект иммуносупрессии частично опосредован гликопротеином G, хемокин-связывающим белком широкого спектра действия, который блокирует связывание и активность хемокинов (Bryant N.A. et al., 2003). BHV-1 также инфицирует Т-клетки CD4+, вызывая потерю экспрессии CD4 с последующим апоптозом этих клеток (Lovato L. et al., 2003).

1.2.2 Вирусная диарея – болезнь слизистых крупного рогатого скота

1.2.2.1 Характеристика вируса и строение генома

Вирус вирусной диареи КРС (BVDV) наносит серьезный экономический ущерб животноводству и является одним из важнейших вирусных патогенов жвачных животных во всем мире (Ridpath J.F., 2010; Walz P.H. et al., 2020). BVDV вызывает широкий спектр симптомов, которые включают иммуносупрессию, персистентную инфекцию, болезнь слизистых оболочек, респираторные синдромы, репродуктивную дисфункцию.

Кроме того, BVDV могут являться контаминантами биологических препаратов (эмбриональной сыворотки, перевиваемых линий культур клеток, вакцин для медицины и ветеринарии, интерферонов, трипсина, биотехнологических препаратов, эмбрионов, стволовых клеток, спермы быков-производителей и др.) (Урываев Л.В. и соавт., 2012; Giangaspero M., 2013).

BVDV являются представителями рода *Pestivirus* семейства *Flaviviridae* и подразделяются на три патогенных для КРС вида: *Pestivirus bovis* (ранее известный как вирус вирусной диареи крупного рогатого скота 1 типа; BVDV-1; *Pestivirus A*), *Pestivirus tauri* (вирус вирусной диареи крупного рогатого скота 2 типа; BVDV-2; *Pestivirus B*), *Pestivirus brasilense* (вирус вирусной диареи крупного рогатого скота 3 типа; BVDV-3; HoBiPeV; *Pestivirus H*). (<https://ictv.global/report/chapter/flaviviridaereport/flaviviridaereport/flaviviridae/pestiviru>).

Реклассификация названий видов является новой и до сих пор широко не используется, поэтому для удобства здесь будет применена прежняя номенклатура.

BVDV - это относительно небольшой (40–60 нм) оболочечный сферический вирус. Геном представляет собой одноцепочечную положительно заряженную РНК, состоящую примерно из 12 500 пар оснований, которая окружена 5'- и 3'-нетранслируемыми областями (UTR). (Chi S. et al., 2022; Hong T. et al., 2023). 5'-UTR участвует в репликации РНК и образует внутренний сайт входа рибосомы. 3'-UTR содержит структурные элементы для репликации РНК BVDV (Becher P. et al., 2020).

Геном имеет одну открытую рамку считывания (ORF) длиной около 4000 кодонов, которая кодирует четыре структурных (С, Erns, E1, E2) и восемь неструктурных белков (N^{pro}, P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (Ridpath J.F., 2010; Mirosław P., Polak M., 2019; King J. et al., 2021). Из них неструктурные белки аутопротеаза N^{pro}, E2, а также 5' UTR нетранслируемый регион чаще всего используются для диагностики и для генетической классификации новых вирусных изолятов (Vilcek S. et al., 2001).

Белки Erns, E1, E2 участвуют в прикреплении вируса и его проникновении в клетки-мишени. Гетеродимеры E1-E2 необходимы для проникновения вируса и его инфекционности. E2 является наиболее важным структурным белком, поскольку он взаимодействует с рецепторами клеточной поверхности, которые определяют клеточный тропизм, и вызывают нейтрализующие антитела и цитотоксические реакции Т-лимфоцитов. (Wang F.I. et al., 2015).

N^{pro} – белок с молекулярной массой около 20 кДа, уникальный для пестивирусов. Кроме того, N^{pro} – это аутопротеаза, которая может автокатализировать расщепление полипротеинов для получения белка BVDV С (Chi S. et al., 2022). N^{pro} может регулировать выработку или ингибирование интерферона I типа (IFN-I) и влиять на способность вируса к репликации, что приводит к подавлению врожденного иммунитета инфицированных животных (Kozasa T. et al., 2015).

Белок P7 – полипептид массой 6-7 кДа, он участвует в формировании инфекционных частиц BVDV и способствует высвобождению вируса, однако механизм, лежащий в основе этой функции, остается неясным.

NS2 представляет собой цистеиновую протеазу, содержащую 450 аминокислот. Она состоит из гидрофобной N-концевой полужакопленной белковой мембраны и общего домена структуры С-концевой протеазы. NS3 содержит 680 аминокислот и является многофункциональным белком и регулирует эффективность репликации вирусной РНК (Chi S. et al., 2022). NS4A – белок массой 10 кДа, состоящий из N-концевого трансмембранного домена (TM), центрального пептида, изогнутой структуры и С-концевого цитоплазматического домена. NS4B – гидрофобный белок массой 35 кДа с активностью NTPase, который участвует в геномной репликации BVDV и является интегральным мембранным белком аппарата Гольджи (Weiskircher E. et al., 2009). NS4B является основной мишенью для диагностики заболеваний, разработки вакцин и лечения инфекций. NS5A представляет собой гидрофильный фосфорилированный белок массой около 58 кДа, который является компонентом вирусной репликазы. NS5B имеет размер около 77 кДа, катализирует синтез вирусной РНК и участвует в процессе перестройки мембраны инфицированной вирусом клетки. Он играет важную роль в репликации РНК, но его специфичность относительно низкая (Chi S. et al., 2022).

1.2.2.2 Эпизоотологические данные

Как и другие РНК-содержащие вирусы, BVDV обладает высокой генетической изменчивостью, что приводит к появлению новых вариантов и повышению риска новых вспышек. В настоящее время в мире доказана циркуляция следующих субтипов пестивирусов КРС: BVDV-1 (1a–1x) (Deng M. et al., 2020; Rivas J. et al., 2022), BVDV-2 (2a–2e) (De Oliveira P.S.B. et al., 2022) и BVDV-3 (3a–3e) (Giammarioli M. et al., 2015; Kalaiyarasu S. et al., 2022).

BVDV-1 является наиболее распространенным видом пестивирусов в популяции крупного рогатого скота в мире, достигая 88 % обнаруженных штаммов (Yeşilbag K. et al., 2017). При этом чаще всего встречается BVDV-1b, затем 1a и 1c. Чаще выявляется в европейских странах, а наибольшее генетическое разнообразие (21 субтип) отмечено у КРС в Италии (Luzzago C., Decaro N., 2021) и Китае (Zhang K. et al., 2022).

BVDV-2 широко распространен в США (Evermann J.F., Ridpath J.F., 2002), Бразилии (Silveira S. et al., 2017), Японии (Yamamoto T. et al., 2008), а также выявляется в Канаде (Carman S. et al., 1998), Аргентине (Pecora A. et al., 2014), Уругвае (Silveira C.S. et al., 2020), некоторых странах Европы: Германии (Tajima M. et al., 2001), Франции (Jackova A. et al., 2008), Италии (Luzzago C., Decaro N., 2021) и Азии: Южной Корее (Oem J.K. et al., 2009) и Монголии (Ochirkhuu N. et al., 2016). Зараженная эмбриональная сыворотка или другие биологические продукты, вероятно, способствовали проникновению BVDV-2 в Европу, где он циркулирует с меньшей скоростью, чем BVDV-1 (Yeşilbag K. et al., 2017). BVDV-2 считается наиболее вирулентным и преобладает в США и Канаде, достигая 50% от всех выделенных штаммов (Ridpath JF., 2010).

BVDV-3 впервые был выделен в 2004 г. в Европе из партии эмбриональной сыворотки КРС, импортированной из Бразилии (Stalder H.P. et al., 2005). Первый изолят был назван NoBi_D32/00 (Schirrmeyer H. et al., 2004). Далее в Бразилии было выделено еще несколько изолятов: BrazBuf9 - из материала от буйволов (массовая гибель произошла в конце 1990-х (Stalder H.P. et al., 2005); изоляты из абортированных плодов КРС (аборты 2002 и 2004 гг.) (Cortez A. et al., 2006); изолят SV713/09 был выявлен в образце коммерческой спермы быка после нескольких случаев рождения слепых телят в стадах при использовании спермы этого быка для осеменения; изоляты SV241/10 и SV311/10 были обнаружены в сыворотках крови от животных стада с нарушением репродукции (Bianchi E. et al., 2011). В Таиланде из сыворотки крови теленка был выделен изолят Th/04_Khonkaen (Liu L. et al., 2009), отличающийся от изолятов BVDV-3 из Бразилии. В Италии в 2009-2010 гг. выделили изоляты Италия- 1/10-1 и Италия-

1/10-2 из легких телят во время вспышки респираторного заболевания, а в 2011 – от абортплодов. При этом нуклеотидное сходство E2 гликопротеина и 5'- UTR области было выше, чем 99%, со штаммом Italy-1/10-1, который был изолирован в одном стаде во время предыдущей вспышки респираторных заболеваний (Decaro N. et al., 2011, 2012a). Клиническая картина заболевшего крупного рогатого скота одинакова с BVDV-1 и BVDV-2 (Khodakaram-Tafti A., Farjanikish G.H., 2017).

Существует две гипотезы происхождения BVDV-3. Согласно одной гипотезе, вирусы возникли в Южной Америке и были завезены в другие страны и континенты через контаминированную эмбриональную сыворотку КРС (Ståhl K. et al., 2007). По второй гипотезе, появление BVDV-3 у КРС является результатом передачи от буйволов. Это объясняет наличие вирусов в регионах с большим поголовьем буйволов, таких как Бразилия и Таиланд (Bauermann F.V. et al., 2013).

В нашей стране ВД-БС КРС впервые описал К.Н. Бучнев в 1967 г. В.Г. Макаревич и Назаров В.П. в 1967 г. определили спектр чувствительных культур клеток к вирусу. Изучению ВД-БС КРС посвящены работы многих исследователей (Юров К.П. и соавт., 2003; Глотова Т.И., 2006; Глотов А.Г., Глотова Т.И., 2008; Верховская А.Е. и соавт., 2009; Кунгурцева О.В., 2010; Шилова Е.Н. и соавт., 2014; Петрова О.Г. и соавт., 2012; Черных О.Ю. и соавт., 2016; Нефедченко А.В., 2018; Мищенко А.В. и соавт., 2023 и др.)

К настоящему времени инфекция BVDV широко распространена среди КРС на территории РФ. Инфицированность КРС составляет 60-80% в зависимости от региона и повышается при наличии в стаде ПИ животных (Глотов А.Г. и соавт., 2002, 2016; Шилова Е.Н. и соавт., 2014).

У гетерологичных животных BVDV вызывает аналогичные с КРС симптомы. Так, в 2015 г. в Испании вспышка заболевания у овец, сопровождающаяся абортами, была вызвана BVDV-2 (Partida L.E. et al., 2017). В Иране доказана роль BVDV в возникновении абортов у овец, коз, бубалинов и верблюдовых (Dehkordi S.F., 2011). В исследовании, проведенном в юго-западном Китае, у больных коз с диареей, инфекцией дыхательных путей и болезнью

слизистых обнаружили антиген и РНК BVDV (Deng Y. et al., 2018), подтверждая ранее выявленное распространение BVDV1b среди коз в Китае (Мао L. et al., 2016). Было выявлено, что BVDV широко распространен у свиней в Китае и был обнаружен у 137/511 свиней из 11 провинций, у которых наблюдались клинические признаки лихорадки, диареи, абортос или смертности поросят (Deng Y. et al., 2012). Актуальным является выявление гетерологичных ПИ хозяев, которые могут служить резервуаром вируса в дикой природе.

Все три вида BVDV классифицируются на цитопатогенные (ЦП) и нецитопатогенные (НЦП) биотипы в зависимости от их способности проявлять цитопатическое действие во время репликации вируса в клеточной культуре. Большинство (до 90%) полевых изолятов представлено НЦП штаммами вируса, которые способны вызывать персистентную инфекцию, а также чаще, чем ЦП штаммы, вызывают репродуктивные нарушения у коров и острые инфекции (Roshanzamir A. et al., 2025). ЦП штаммы появляются почти исключительно из-за из НПЦ штаммов посредством мутации и/или рекомбинаций в геноме (Darweesh M.F. et al., 2015). Рекомбинация происходит в геномной области, кодирующей неструктурный белок NS2/3 НЦП штамма BVDV, и приводит к вставке либо собственной, либо чужеродной РНК в кодирующую область NS2-3. Рекомбинация приводит к тому, что большой белок NS2/3 НЦП штамма вируса разделяется на два меньших белка: NS-2 и NS-3. NS-3 считается молекулярным маркером ЦП вируса и причиной цитопатогенного действия. Также происходит возврат ЦП биотипа BVDV обратно к НЦП биотипу. Полученные НЦП штаммы BVDV обычно теряют способность экспрессировать белок NS3, но были идентифицированы некоторые НЦП штаммы, которые сохраняют экспрессию белка NS3, не вызывая цитопатогенного эффекта в культивируемых клетках (Houe H. et al., 2006).

1.2.2.3 Клинические признаки и патогенез

Вирус ВД-БС КРС вызывает острую, персистентную формы инфекции и болезнь слизистых оболочек. Острая форма регистрируется как у телят, так и у взрослого скота, и вызывается ЦП или НЦП биотипом любого вида BVDV. Вирус может вызывать респираторные, кишечные и/или репродуктивные болезни (Lanyon S.R. et al., 2014). Тяжесть заболевания варьирует от клинически бессимптомного до летального и зависит от вирулентности вирусного штамма, иммунного статуса и возраста животного, экологических факторов и коинфицирования другими патогенами.

У телят острая форма может проявляться лихорадкой, образованием язв в ротовой полости, пищеводе и кишечнике, диареей с примесью крови, высокой смертностью (Глотов А.Г., Глотова Т.И., 2008).

Острые инфекции BVDV у неиммунного крупного рогатого скота в 90 % случаев протекают субклинически. Заболеваемость может быть высокой, а летальность низкой. Клинические признаки либо отсутствуют, либо включают легкую лихорадку, выделения из носа, диарею и лейкопению. Последствием таких инфекций является иммуносупрессия, которая предрасполагает животное к инфекциям другими патогенами. Снижение надоев молока, высокое содержание соматических клеток в молоке и повышенный риск клинического мастита у молочных коров, связанные с инфекциями BVDV, также считаются вызванными иммуносупрессивным эффектом (Kampa J., 2006).

Животные, переболевшие острой формой ВД-БС КРС, приобретают пожизненный иммунитет к инфицирующему субтипу вируса, но восприимчивы к другим его генетическим вариантам (Fulton R.W. et al., 2006).

Заражение взрослых животных НЦП штаммом BVDV приводит к системной инфекции, которая может быть связана с острыми респираторными и желудочно-кишечными заболеваниями, иммуносупрессией и репродуктивными проблемами (Su A. et al., 2021).

НЦП BVDV способен проникать через плацентарный барьер и вызывать инфицирование плода, что приводит к его гибели, аборт или рождению персистентно инфицированных (ПИ) телят. ПИ животные выделяют вирус в течение всей жизни и являются наиболее важными источниками распространения вирусов (Darweesh M.F. et al., 2015). ПИ телята очень чувствительны к заражению другими вирусными и бактериальными агентами, часто погибают в возрасте до 6 мес., однако 17 – 50 % из них достигают репродуктивного возраста и могут передать вирус потомству (Houe H., 1992). По данным Lindberg A.L.E. (2003), превалентность ПИ животных в общей популяции крупного рогатого скота колеблется от 0,13 до 3,3% и зависит от размера стад, плотности размещения скота на единицу площади, частоты ввода новых животных, уровня молочной продуктивности и внутривоспитательного движения поголовья (Ridpath J.F., 2010).

НЦП штаммы BVDV-2 более вирулентны и могут вызывать тяжелые формы инфекции с образованием язв в ротовой полости, эрозий в межкопытной щели и на венчике, диареей, сильной тромбоцитопенией и лейкопенией, кровотечением и внезапной смертью телят и взрослых животных (Bolin S.R., Ridpath J.F., 1992).

Основным путем передачи вируса в инфицированных стадах является прямой контакт с ПИ животными. Напротив, было показано, что животные, подвергнутые первичной инфекции BVDV, являются плохими переносчиками вируса (Niskanen R., 2000). Горизонтальная передача BVDV происходит путем вдыхания или проглатывания зараженных вирусом материалов (Lindberg A.L.E., 2003), вертикальная – при инфицировании плода до 125 дня внутриутробного развития. Важную роль в распространении вируса играют персистентно инфицированные вирусом быки-производители (Givens M.D. et al., 2003).

В первом триместре беременности инфекция BVDV может привести к гибели плода, за которым следует аборт или мумификация. Все плоды, выжившие в этот период, рождаются ПИ, со специфической иммунотолерантностью к персистирующему вирусу. Заключительные стадии органогенеза нервной системы и глаз происходят во втором триместре и подвержены нарушению, вызванному репликацией вируса. Возникающие в результате врожденные

дефекты включают помутнение хрусталика, слепоту, дисплазию сетчатки, катаракту, гипоплазию мозжечка и гидроцефалию. Мертворожденный теленок является еще одним последствием врожденной инфекции во втором триместре. После 125 дней беременности иммунная система плода развивается и может вырабатывать нейтрализующие антитела и устранять вирус. При рождении иммунокомпетентные телята являются вирус-отрицательными и антитело-положительными (Капра J., 2006).

ПИ КРС подвержен риску развития болезни слизистых оболочек. Она возникает, когда животное, персистентно инфицированное НЦП вирусом, суперинфицируется гомологичным цитопатогенным биотипом вируса. ЦП штамм вируса может иметь экзогенное происхождение (экспериментальное заражение или вакцинация) или может возникнуть из НЦП штамма в результате его генетического изменения (Капра J., 2006). Болезнь слизистых оболочек характеризуется высоким уровнем летальности (100%), падеж происходит обычно в течение 1-2 недель после появления клинических признаков. Течение болезни может быть либо острым, с продолжительностью от 2 дней до 3 недель, либо хроническим. При остром течении наблюдаются лихорадка, анорексия, массивные эрозии слизистой оболочки по всему желудочно-кишечному тракту и обильная диарея, приводящая к прогрессирующему истощению и смерти. В хронических случаях у животных проявляются похожие симптомы, но в более затяжной форме. Кроме того, помимо желудочно-кишечных симптомов, таких как прерывистая диарея и хроническое вздутие живота, могут развиваться дерматологические симптомы - эрозивные поражения кожи и ламинит (Baker J.C., 1995). ЦП биотип всегда обнаруживается вместе с гомологичным НЦП биотипом.

Острая форма ВД-БС КРС приводит к развитию транзитной лейкопении и истощению лимфоидных тканей, снижению количества В-лимфоцитов, CD4+, CD8+ Т-лимфоцитов и нейтрофилов. (Silflow R.M. et al., 2005). Вирус приводит к значительному снижению экспрессии рецептора Fc (FcR) и рецептора комплемента (C3R) в альвеолярных макрофагах, которые необходимы для фагоцитарной активности. Кроме того, НЦП BVDV подавляет экспрессию МНС-

I, МНС-II и CD86 на поверхности Мо-DC, что может объяснять иммуносупрессию и персистирующую инфекцию, вызванную НЦП BVDV. Заражение ЦП BVDV значительно снижает экспрессию 9 белков МНС-I и 6 белков МНС-II в моноцитах крупного рогатого скота. Истощение Т-клеток CD4 + у телят, подвергшихся воздействию нср BVDV, приводит к увеличению вирусной нагрузки в крови и увеличению продолжительности виремии (Pang F. et al., 2023).

Иммуносупрессия, вызванная BVDV, повышает восприимчивость хозяина к другим патогенам и может усиливать патогенность коинфицирующего агента (Bolin S.R., Grooms D.L., 2005).

1.2.2.4 Роль BVDV в развитии респираторной патологии

Способность BVDV вызывать первичное респираторное заболевание на протяжении десятилетий была спорным вопросом. Иммуносупрессивное действие BVDV считалось определяющим в содействии вторичным инфекциям с потенциальными патогенами дыхательных путей, такими как BPIV-3, BoHV-1 или *Pasteurella haemolytica* (Potgieter L.N.D., 1995).

Доказательства основной роли BVDV в развитии респираторных болезней включают: 1) идентификацию вируса из легких или сероконверсию в парных пробах сыворотки крови во время респираторного заболевания; 2) увеличение заболеваемости и смертности от респираторных болезней у КРС, контактировавшего с ПИ животными; 3) макроскопическая или микроскопическая респираторная патология у КРС, экспериментально зараженного BVDV; 4) тяжелое респираторное заболевание у КРС, зараженного BVDV, в сравнении с контрольными животными, зараженными другим агентом (Walz P.H. et al., 2020).

В развитии респираторных болезней играет роль как иммуносупрессия, так и первичная инфекция респираторного тракта, вызванная BVDV. Считается, что BVDV является центральным возбудителем в комплексе массовых респираторных болезней, несмотря на участие многочисленных вирусов и бактерий.

Механизмы иммуносупрессивного действия BVDV при респираторных заболеваниях включают изменения, связанные с уменьшением пролиферации лимфоцитов, тяжелым истощением лимфоидных тканей, снижением хемотаксиса и фагоцитарной активности, увеличением продукции простагландина E₂, увеличением синтеза оксида азота в ответ на липополисахарид, нарушением продукции провоспалительных цитокинов (Risalde M.A. et al., 2013).

Гликопротеин вирусной оболочки E₂ является важнейшим фактором, определяющим клеточный тропизм вируса BVDV (El Omari K. et al., 2013). Он опосредует прикрепление вируса путем связывания с клеточным рецептором, мембранным кофакторным белком (CD46) (Maurer K. et al., 2004). Эпителий дыхательных путей служит местом проникновения вируса и его локальной репликации с последующим эффективным высвобождением вируса, тем самым способствуя распространению на других животных (Confer A.W. et al., 2005). После воздействия первоначальное инфицирование происходит в слизистой оболочке ротовой полости и носа и миндалинах. После преодоления эпителиального барьера вирус получает доступ к региональным лимфатическим узлам для дальнейшего распространения посредством чувствительных к BVDV лимфоцитов и моноцитов, что приводит к системному распространению (Pedrera M. et al., 2012). Высокие титры вируса также были зарегистрированы в легких, где вирус обнаружен в лимфоидной ткани, связанной с бронхами. Репликация BVDV в лимфоидной ткани может нарушать нормальные местные и системные иммунные функции, тем самым ослабляя механизмы иммунной защиты и усиливая процессы заболевания, вызванные респираторными патогенами (Marshall D.J. et al., 1996).

BVDV является синергетическим агентом при смешанных инфекциях дыхательных путей. Вирусные патогены, наиболее часто связанные с BVDV при респираторных заболеваниях, включают BoHV-1, BPIV-3 и BRSV (Walz P.H. et al., 2020). Эти вирусы были выделены совместно с BVDV из легких или, как было показано серологическими тестами, заражают КРС одновременно с BVDV в полевых условиях. По сравнению с заболеванием, вызванным одним патогеном,

смешанные инфекции с BRSV, BHV-1 и *Mannheimia haemolytica* вызывают более тяжелое течение болезней, замедленный и сниженный гуморальный иммунный ответ, большую диссеминацию вируса, более длительное выделение вируса и более серьезные поражения. Одновременное инфицирование телят BRSV и BVDV приводит к более выраженному изменению популяций лейкоцитов в лимфоидной ткани (Risalde M.A. et al., 2013; Hou Z. et al., 2025).

В совокупности полевые и экспериментальные данные указывают на то, что вклад BVDV в респираторные заболевания заключается в изменении или ослаблении местных и системных защитных механизмов, что способствует коинфицированию другими патогенами (Hou Z. et al., 2025).

1.2.3 Респираторно-синцитиальная инфекция крупного рогатого скота

1.2.3.1 Характеристика вируса и строение генома

Респираторно-синцитиальная инфекция крупного рогатого скота (РСИ КРС) – широко распространенное заболевание преимущественно телят, характеризующееся поражением респираторного тракта (Da Silva Barcelos, L. et al., 2024).

Согласно современной классификации, возбудитель РСИ КРС – вирус *Orthopneumovirus bovis* (прежнее название Bovine respiratory syncytial virus, BRSV) – относится к семейству Pneumoviridae, роду Orthopneumovirus (https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202401650&taxon_name=Orthopneumovirus%20bovis), (Walker P.J. et al., 2022). Здесь и далее будет приведена историческая терминология, чтобы сохранить согласованность с источниками литературы.

BRSV - оболочечный вирус, содержащий одноцепочечную РНК с отрицательной полярностью длиной примерно 15000 п.н., которая кодирует 11 белков. Вирусные частицы либо плеоморфные, округлой формы, диаметром 35 - 150 нм, либо нитевидные длиной до 5 мкм и диаметром 60 -100 нм (Valarcher J.F., Taylor G., 2007).

Липидная оболочка BRSV состоит из трех гликопротеинов (F, G, SH). (Sarmiento-Silva R.E. et al., 2012). Белок присоединения G и белок слияния F

являются количественно доминирующими. Вирус проникает в клетку в результате слияния вирусной оболочки с клеточной мембраной. При этом G-белок играет роль вирусного рецептора. F-белок участвует в присоединении вируса к клетке, обеспечивает слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной, а также мембран соседних инфицированной и неинфицированной клеток. В результате процессов слияния как *in vitro* (в культуре клеток), так и *in vivo* (в эпителии респираторного тракта) образуются многоядерные гигантские клетки – синцитии (Lamb R. A., Parks G. D., 2007).

Белок F вызывает выработку вируснейтрализующих антител и обеспечивает резистентность к инфекции BRSV. Гены F и G играют важную роль в вирусной инфекционности и являются основными мишенями иммунной системы (Valarcher J.-F., Taylor G., 2007). Белок SH - короткий интегральный мембранный белок, который может играть роль в вирусно-опосредованном слиянии клеток, взаимодействуя с белком F. Нуклеокапсид состоит из нуклеопротеина (N), фосфопротеина (P), РНК-полимеразы (L) и геномной РНК. Кроме того, имеется матричный белок М, транскрипционный антитерминационный фактор М2-1, РНК-регуляторный белок М2-2 и два неструктурных белка, NS1 и NS2. Белок N присутствует в больших количествах в вирионе. В сочетании с P, L и, возможно, М2-2, белок N является основным элементом нуклеокапсида. Белок P действует как фактор регуляции для вирусной транскрипции и репликации. Полимераза L является РНК-зависимой РНК-полимеразой и отвечает за вирусную транскрипцию и репликацию. Белок М расположен на внутренней поверхности вирусной оболочки и участвует в образовании вирусоподобных частиц. Белок М2-1 является антитерминационным фактором, который способствует удлинению транскрипционной цепи и увеличивает частоту прочтения на стыках генов. Белок М2-2 опосредует регуляторный переход от транскрипции к репликации РНК. Белки NS1 и NS2 являются ингибиторами транскрипции и репликации вирусной РНК и играют важную роль в устойчивости вируса к воздействию α и β интерферона, в патогенезе инфекции и взаимодействии вируса и организма животного (Valarcher J.-F., Taylor G., 2007).

В настоящее время BRSV подразделяется на четыре антигенные подгруппы (А, В, АВ, нетипируемая) (Sarmiento-Silva R.E. et al., 2012) и десять генетических подгрупп (Valarcher J.F. et al., 2000; Krešić N. et al., 2018; Kumagai A. et al., 2021).

1.2.3.2 Эпизоотологические данные

Вирус BRSV впервые был зарегистрирован в 1969 г. в Швейцарии во время вспышки тяжелого респираторного заболевания у телят. Вирус распространен по всему миру и был выделен от крупного рогатого скота в Европе, Америке и Азии (Werid G.M. et al., 2024).

Впервые в нашей стране РСИ КРС была зарегистрирована В.В. Гуненковым и соавт. в 1975 г. Изучению особенностей распространения инфекции, свойств вируса, разработке диагностических методов посвящены работы Г.А. Халенева (1976), Г.Д. Метревели (1989), Т.Ю. Кочиш (2004), А.Г. Глотова и соавт. (2010, 2011, 2021), Т.И. Глотовой и соавт. (2010), К.В. Войтовой (2011), В.А. Мищенко и соавт. (2011), И.Я. Строгановой (2011а), А.Д. Алексеева (2016), Е.А. Журавлевой (2018), В.В. Кирпиченко (2021) и других исследователей.

Сведения об эпизоотической ситуации по РСИ КРС в России ограничены, что обусловлено отсутствием планомерных лабораторных исследований. По данным И.Я. Строгановой (2011а), антитела к BRSV присутствуют в сыворотках крови в диапазоне 50,8-71,9% КРС разных возрастных групп в 16 субъектах РФ. В регионе Сибири геном вируса присутствует в 15,4% исследованных проб биоматериала при вспышках респираторных болезней. Е.А. Журавлевой (2018) диагностирована инфекция в 3 из 24 хозяйств Центрального региона и еще в 7 отмечено повышение титра антител к РСВ в сыворотке крови животных после вспышки респираторного заболевания. В.В. Кирпиченко (2021) при исследовании методом ПЦР биоматериала от животных с респираторной патологией из 7 субъектов РФ выявил присутствие генома BRSV в 8,93% проб.

BRSV проявляет близкое родство с респираторно-синцитиальным вирусом человека (HRSV) и вызывает у телят клинические симптомы и патологические изменения, сходные с таковыми у детей (Valarcher J.-F., Taylor G., 2007).

КРС является основным резервуаром BRSV. Серопревалентность КРС к вирусу составляет в среднем 30-70% (Sarmiento-Silva R.E. et al., 2012).

Частота вспышек инфекций BRSV очень высока, вирус может быть причиной более 60% эпизоотических респираторных заболеваний, наблюдаемых в молочных стадах и до 70% в мясных стадах. Частота вспышек коррелирует с плотностью популяции КРС и возрастом животного. Вспышки болезни регистрируются чаще в осенне-зимний период, очень редко летом (Valarcher J.-F., Taylor G., 2007). К вирусу восприимчив КРС всех пород и возрастов. Во время вспышек клинические признаки редко наблюдаются у телят младше двухнедельного возраста, тяжелее всего болеют телята в возрасте от 1 до 5 месяцев. В некоторых случаях вспышки болезни регистрируют у взрослого скота, что бывает связано с заносом вируса в неиммунное стадо или реинфицированием. Более высокая устойчивость к вирусу у взрослых животных по сравнению с телятами может быть связана с уровнем специфического иммунитета после частого воздействия вируса (Larsen L.E., 2000a).

Вирус передается воздушно-капельным путем. Заболеваемость может достигать 60-80%, а летальность 5-10%, иногда при тяжелых вспышках – до 20% (Larsen L.E., 2000a; Sarmiento-Silva R.E. et al., 2012).

Факторы риска, влияющие на распространенность инфекции, включают возраст животного, размер стада, концентрацию животных на единицу площади, ввоз новых животных, сезонность, высокую молочную продуктивность, снижение естественной резистентности животных, зоотехнические факторы (Werid G.M. et al., 2024). Тем не менее, даже в стадах с отличными условиями содержания могут возникать серьезные вспышки, что позволяет предположить, что BRSV может вызывать заболевание без предрасполагающих факторов окружающей среды (Larsen L.E., 2000a).

Не установлены окончательно механизмы, отвечающие за выживание вируса в популяции КРС. Вирус может циркулировать на очень низком уровне среди серопозитивных коров, у которых он может периодически реактивироваться. Повторное появление вируса в закрытых стадах также может быть объяснено персистенцией, поскольку попытки реактивировать BRSV путем лечения кортикостероидами ранее инфицированных телят вызывали четырехкратное увеличение титров специфических антител BRSV (Larsen L.E., 2000a). Клинически больные животные считаются наиболее вероятными источниками инфекции, и поэтому наиболее вероятным объяснением рецидивирующих инфекций является повторное введение вируса в стадо до возникновения новой вспышки.

Молекулярно-генетические исследования показали циркуляцию идентичных вирусов среди животных в пределах одних и тех же стад, особенно во время возникновения вспышек. При повторных вспышках вирусные штаммы значительно различаются (до 11%), что предполагает циркуляцию различных вирусных вариантов BRSV в пределах стада. В результате из-за вирусной эволюции новые генетические варианты вируса становятся доминирующими и распространяются от одного или нескольких животных при каждой новой вспышке. Можно предполагать, что вспышки BRSV являются результатом внедрения новых вирусных штаммов в популяцию (Larsen L.E. et al., 2000b).

Гетерогенность вирусного генома и его низкая точность репликации – основные механизмы, обеспечивающие выживание и персистенции в организме. (Sarmiento-Silva R.E. et al., 2012).

1.2.3.3 Клинические признаки и патогенез

Инкубационный период РСИ КРС составляет 2-5 дней. Инфекция может протекать бессимптомно, ограничиваться верхними дыхательными путями или поражать как верхние, так и нижние дыхательные пути. Заболевание верхних дыхательных путей характеризуется кашлем с серозно-слизистыми выделениями

из носа и глаз. При более тяжелых инфекциях у животных наблюдается депрессия и анорексия, снижение молочной продуктивности, гипертермия, полипноэ и абдоминальная одышка. При аускультации легких выслушиваются признаки бронхопневмонии или бронхиолита. У животных может развиваться тяжелая дыхательная недостаточность, они дышат открытым ртом с высунутым языком, вытянув шею и опустив голову. У этих животных диагностируют эмфизему и отек, в некоторых случаях подкожную эмфизему (Valarcher J.-F., Taylor G., 2007; Sacco R.E. et al., 2014).

При вскрытии может наблюдаться интерстициальная пневмония. Краниоventральные части легких консолидируются, в больших и малых бронхах содержится слизисто-гнойный экссудат. Каудо-дорсальные части легких часто растянуты из-за междольковых, дольковых и субплевральных эмфизематозных поражений, легкие увеличены. Трахеобронхиальные и средостенные лимфатические узлы могут быть увеличены, отечны и иногда геморрагичны. При бактериальных суперинфекциях регистрируется фибриновая или гнойная бронхопневмония (Valarcher J.-F., Taylor G., 2007; Глотов А.Г. и соавт., 2021).

BRSV, проникнув в организм, остается в месте входных ворот на слизистых верхних дыхательных путей, в эпителии носа и инфицирует эпителиальные клетки верхних дыхательных путей. Затем распространяется в нижние дыхательные пути и достигает бронхиол, где репликация вируса становится более эффективной (Kaler J. et al., 2023). Реснитчатые клетки бронхиального эпителия и пневмоциты 2 типа в альвеолах являются первичными клетками, на которые нацелена РСВ-инфекция (Collins P.L. et al., 2013).

После начала репликации BRSV эпителиальные клетки дыхательных путей подвергаются серьезному разрушению, в результате капилляры становятся более проницаемыми, происходит увеличение секреции провоспалительных клеток (гистамин, ИЛ1, ИЛ-6, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы и естественные клетки-киллеры (NK), лейкотриены C4 и D4) (Blodörn K. et al., 2015; Carvajal J.J. et al., 2019), что вызывает утечку белков плазмы из альвеолярного пространства, приводя к генерализованному интерстициальному отеку, а также ингибированию

функции пневматоцитов I типа и угнетению синтеза легочного сурфактанта (Battles M.B., McLellan J.S., 2019). Вследствие избыточной активности клеток воспаления происходит деструкция легочной ткани, что, в свою очередь, приводит к диссеминации патогена (Кривицкая В.З., 2013). У телят младшего возраста цитокиновые профили выше, чем у взрослого скота, что объясняет более тяжелое течение болезни в раннем возрасте (Antonis A.F.G. et al., 2010).

Вирус обладает мощным иммуномодулирующим потенциалом. Большая часть повреждения дыхательных путей опосредована иммунным ответом, а не самой репликацией вируса (Shang Z. et al., 2021). Доказательством вовлечения иммунной системы в патологические процессы при РСИ служит то, что наиболее тяжелые симптомы заболевания и повреждение легочной ткани наблюдаются не в период интенсивной вирусной репродукции в клетках респираторного эпителия (3-5-е сут. заболевания), а значительно позднее, уже после элиминации инфекционного агента из организма (Lukacs N.W. et al., 2010). Тяжелое течение инфекции может быть связано также с гиперактивностью иммунитета. Иммунные механизмы, индуцированные вирусом, могут оказывать как защитное, так и патогенное действие (Кривицкая В.З., 2013).

Для неосложненного течения РСИ характерно превалирование Th1-опосредованного иммунного ответа. Такой тип воспаления является протективным и приводит к быстрому выздоровлению. Осложненное течение РСИ ассоциировано с активацией Th2-зависимых процессов, что влечет за собой патологические проявления (бронхиальную гиперреактивность и обструкцию дыхательных путей), развивающиеся в результате чрезмерной активности главным образом Th2-опосредованных цитокинов (ИЛ 4, 5, 10, 11 и 13) (Кривицкая В.З., 2013).

Белки NS1 и NS2 являются основными участниками иммуносупрессии, ингибируя ответ интерферона типа 1 и других компонентов иммунной системы (Shang Z. et al., 2021), в результате чего у животных снижается выработка противовирусного иммунитета и фагоцитарная активность в легких, что способствует развитию бронхопневмоний (Глотов А.Г. и соавт., 2021).

Угнетение иммунной системы под действием BRSV увеличивает риск бактериальных суперинфекций. Исследования показали, что вирус вызывает усиление адгезии *S. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mannheimia haemolytica*, *P. multocida*, *Trueperella pyogenes* к эпителиальным клеткам дыхательных путей (Agnes J.T. et al., 2013; Hendaus M.A. et al., 2015; McGill J.L. et al., 2016; Headley S.A., 2017; Sudaryatma P.E. et al., 2019, 2020; Shang Z. et al., 2021; Yamamoto S. et al., 2024). На поверхности инфицированных вирусом клеток респираторного эпителия увеличивается уровень экспрессии молекул, используемых бактериями в качестве рецепторов (ICAM-1, CEACAM-1, PAF) (Avadhanula V. et al., 2006).

По данным Sudaryatma P.E. et al. (2019), культуры клеток из нижних дыхательных путей (bBEC и bLEC) были значительно более восприимчивы к BRSV, чем клетки, полученные из верхних дыхательных путей (bTEC). Предварительное инфицирование bBEC и bLEC BRSV увеличивало адгезию *P. multocida*, этого не было в случае с bTEC. Эти результаты показывают, что BRSV может лучше размножаться в нижних дыхательных путях и способствовать прикреплению бактерий.

1.2.4 Коронавирусная инфекция крупного рогатого скота

1.2.4.1 Характеристика вируса и строение генома

Коронавирусная инфекция крупного рогатого скота (КВИ КРС) – острое контагиозное заболевание, характеризующееся поражением желудочно-кишечного тракта и органов дыхания.

Коронавирусы крупного рогатого скота (BCoV) относятся к порядку Nidovirales, семейству *Coronaviridae*, подсемейству *Orthocoronavirinae*, роду *Betacoronavirus* и подроду *Embecovirus*. С 2008 года коронавирусы крупного рогатого скота объединены в один вид *Betacoronavirus 1* вместе с другими коронавирусами (человеческие HCoV-229E и HCoV-OC43; вирус гемагглютинирующего энцефаломиелита свиней; коронавирус лошадей;

респираторный коронавирус собак), а в 2020 г. этот вид переименован в *Betacoronavirus gravedinis* (Woo P.C.Y. et al., 2024), (https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202401861&taxon_name=Betacoronavirus%20gravedinis). Таким образом, BCoV рассматриваются как варианты диапазона хозяев или квазивиды (Hodnik J.J. et al., 2020).

BCoV – оболочечные вирусы, содержащие положительно заряженную РНК длиной примерно 26,4–31,7 т.п.н. Вирусные частицы плеоморфные, округлой формы, диаметром 65-210 нм. BCoV кодирует пять основных структурных белков: — нуклеокапсид (N), шип (S), мембранный (M), оболочечный (E) и белки гемагглютинин-эстеразы (HE), а также 16 неструктурных белков (nsp1-16) (Kostanic V. et al., 2024).

Белок N расположен внутри оболочки вируса и связан с вирусной РНК. Он участвует сборке вириона (Hurst K.R. et al., 2017). Белок N наиболее гомологичен между различными BCoV и используется для молекулярной характеристики и диагностики BCoV. Белок M играет важную роль в сборке вируса (Satarker S., Namroothiri M., 2020). Белок E участвует в сборке вируса, почковании, формировании оболочки и патогенезе (Sen S. et al., 2021). HE действует как фермент, разрушающий рецепторы (эстераза) для обратной гемагглютинации. Белок S опосредует адсорбцию клеток и слияние вируса с мембраной (Huang Y. et al., 2020), что связано с вирулентностью вируса и распознаванием тканевых рецепторов, а также является фактором, определяющим круг хозяев вирусной инфекции (Millet J.K. et al., 2021). Белок S состоит из субъединицы S1, содержащей доминантные нейтрализующие эпитопы, и субъединицы S2, опосредующей слияние вирусных мембран.

BCoV связан с диарейным синдромом у телят и комплексом респираторных заболеваний, поражающих КРС, а также тесно связан с человеческим коронавирусом. Подобно другим коронавирусам, BCoV демонстрирует значительную генетическую и биологическую изменчивость (Zhang F. et al., 2024).

1.2.4.2 Эпизоотологические данные

С.А. Mebus et al. в 1973 г. впервые выявили и охарактеризовали коронавирус КРС, вызвавший тяжелую диарею у телят в США. В 1984 г. M.S. McNulty et al. выделили BCoV из легкого теленка с бронхопневмонией; этот штамм был способен вызывать симптомы инфекции верхних дыхательных путей.

В настоящее время BCoV широко распространен среди КРС всех возрастов на всех континентах (Voileau M.J., Kapil S., 2010; Toftaker I. et al., 2017; Орлянкин Б.Г. и соавт., 2022). Исследования серологической распространенности показывают, что более 90% КРС подвергались воздействию вируса в течение своей жизни (Vlasova A.N., Saif L.J., 2021).

В нашей стране изучению КВИ КРС посвящены работы Л.Н. Соколовой (1982), Г.Ф. Коромыслова (1995), В.А. Кудрявцева (2004), В.А. Мищенко и соавт. (2005, 2009, 2010), В.В. Думовой и соавт. (2006), Л.С. Кашко и П.П. Красочко (2014), А. Батомункуева и соавт. (2020).

Проведенные отечественными учеными диагностические исследования показали широкое распространение BCoV на территории РФ. Так, Л.Н. Соколовой (1982) был выделен, адаптирован и идентифицирован коронавирус, а также установлена его роль в развитии диареи новорожденных телят. В.А. Мищенко и соавт. (2005, 2009, 2010) установили участие BCoV в этиопатогенезе респираторных болезней молодняка, зимней дизентерии у взрослых животных. Серопревалентность коров молочных пород к вирусу составила 51-100%, мясных пород – 61%.

BCoV вызывает такие клинические синдромы, как неонатальная диарея телят, зимняя дизентерия, проявляющаяся геморрагической диареей у взрослого скота, и респираторная инфекция, о которой сообщается все чаще (Глотов А.Г., Глотова Т.И., 2020; Vlasova A.N., Saif L.J., 2021; Rahe M.C. et al., 2022 ; Socha W. et al., 2022; Zhang F. et al., 2024).

1.2.4.3 Клинические признаки и патогенез

Инфекция передается фекально-оральным и воздушно-капельным путем. У взрослого скота вирус может сохраняться в виде субклинических инфекций и под действием стресс-факторов выделяться с носовыми выделениями или фекалиями. Вирус передается горизонтально от коров-матерей новорожденным телятам или от клинически или хронически инфицированных телят здоровым. Вертикальная передача отсутствует (Voileau M.J., Kapil S., 2010). Между стадами заражение происходит при завозе новых животных или через зараженные fomиты (Oma V.S. et al., 2018).

Продолжительность выделения вируса достигает 932 дня после заражения, обнаруженного с помощью гнездовой ПЦР в носовых выделениях, и 1058 дней в фекалиях согласно исследованиям Kanno T. et al. (2018). Роль хронически/субклинически инфицированных животных обсуждается, поскольку обнаружение вируса распространено у клинически здоровых взрослых особей и телят (Hodnik J.J. et al., 2020).

BCoV - пневмоэнтеральный вирус, который реплицируется в энтероцитах кишечного тракта и эпителии верхних дыхательных путей (Park S.J. et al., 2007). Существует две версии того, где происходит первоначальная репликация вируса. Одни исследователи считают, что первоначальная репликация осуществляется в дыхательных путях, а затем большое количество вируса, защищенного слизью, проглатывается и заражает кишечник (Saif L.J., 2010), другие – что сначала заражается желудочно-кишечный тракт, а вирус достигает дыхательных путей с вирусемией (Park S.J. et al., 2007; Voileau M.J., Kapil S., 2010). Независимо от первоначального места репликации, BCoV выделяется как с фекалиями, так и с носовыми выделениями (Park S.J. et al., 2007).

Вирус поражает тонкий и толстый кишечник, разрушает ворсинки и приводит к тяжелой, иногда кровавой диарее и смертности. BCoV реплицируется в тонком кишечнике, затем распространяется по толстому кишечнику, вызывая мальабсорбционную диарею. Инфицированные вирусом клетки кишечника

отмирают, отслаиваются и заменяются незрелыми клетками. Компенсаторная гиперплазия крипт и повышенная секреция жидкости еще больше усугубляют диарею. Утрата зрелых клеток значительно снижает абсорбционную, метаболическую и секреторную способность кишечного тракта. Повреждения и последствия наиболее серьезны у молодых животных (Vlasova A.N., Saif L.J., 2021).

В респираторном тракте вирус реплицируется в эпителии носовой полости, трахеи и легких (Park S.J. et al., 2007; Kalkanov I. et al., 2019). Анализ патогенности показал, что BCoV может вызывать различные степени респираторных и кишечных поражений у КРС, но проявляет более сильный кишечный тропизм (Zhu Q. et al., 2022). Park S.J. et al. (2007) выявили РНК BCoV в сыворотке крови телят, что доказало виремию после орального инфицирования. Yilmaz S.G. et al. (2024) обнаружили геном BCoV в головном мозге теленка, павшего во время вспышки болезни с симптомами диареи, респираторных и неврологических расстройств.

Тяжесть заболевания помимо инфицирующего штамма связана с такими факторами, как иммунологический статус животного, температура окружающей среды, вторичные бактериальные инфекции и т.д. (Voileau M.J., Kapil S., 2010).

Неонатальная диарея телят. BCoV играет важную роль в развитии диареи в течение первых 3 недель жизни как в мясных, так и в молочных стадах (Vlasova A.N., Saif L.J., 2021). Инкубационный период составляет 1–7 дней (Mebus C.A. et al., 1973). Вскоре после заражения и до двух недель телята начинают выделять большие количества вируса как с фекалиями, так и с носовыми выделениями. У телят наблюдается диарея со слизью и сгустками крови, обезвоживание, гипотермия. Снижение потребления корма и потеря электролитов приводят к метаболическому ацидозу и гипогликемии (Gomez D.E., Weese J.S., 2017). В тяжелых случаях смертность высокая. У некоторых телят, инфицированных BCoV, может развиваться синдром пневмоэнтерита, при котором присутствуют как диарея, так и легкие признаки заболевания дыхательных путей (Voileau M.J., Kapil S., 2010). По данным Castells M. et al. (2019), в зимние месяцы частота обнаружения вируса выше.

Зимняя дизентерия – острое диарейное заболевание преимущественно молочного и редко мясного скота, характеризующееся водянистой диареей с кровью, обезвоживанием, анорексией, лихорадкой, снижением молочной продуктивности (Boileau M.J., Kapil S., 2010; Abuelo A., Perez-Santos M., 2016). Инкубационный период составляет 2-8 дней (Boileau M.J., Kapil S., 2010). Заболевание проявляется в основном в зимний период, что связано с повышением уровня выделения вируса в окружающую среду на 50-60 % при более низких температурах (Vlasova A.N., Saif L.J., 2021). Вирус выделяется с фекалиями и носовыми выделениями (Abuelo A., Perez-Santos M., 2016). Заболеванию больше подвержены коровы в послеродовой период (Natsuaki S. et al., 2007). Заболеваемость очень высокая, до 100%, но смертность низкая, менее 2% (Takiuchi E. et al., 2009). Животные хорошо реагируют на поддерживающее лечение и обычно выздоравливают через 2–3 дня (Akgül G. et al., 2013). Поражения локализуются в основном в толстом кишечнике и сходны с таковыми при диарее у телят (Natsuaki S. et al., 2007). Предполагается, что взрослые особи КРС являются носителями BCoV, и клинические признаки появляются из-за экологических стрессоров (Abuelo A., Perez-Santos M., 2016).

Респираторная инфекция. BCoV является одним из наиболее часто выявляемых вирусов у телят с респираторными симптомами и ассоциируется с легким респираторным заболеванием (кашель, ринит) или пневмонией. Клинические признаки включают кашель, лихорадку, ринит и одышку, часто с сопутствующей диареей. BCoV был выделен из мазков из носа и глотки, а также из смывов легких инфицированных телят (Saif L. J., Jung K., 2020; Soules K.R. et al., 2022). Установлено, что BCoV является одним из важных патогенов, участвующих в развитии комплекса респираторных болезней КРС (Decaro N. et al., 2008a; Saif L. J., Jung K., 2020; Castells M. et al., 2019). Исследования многих ученых продемонстрировали высокие показатели обнаружения вируса у КРС с респираторными заболеваниями, как в моноварианте, так и в сочетании с другими патогенами (Park S.J. et al., 2007; Decaro N. et al., 2008a; Saif L. J., 2010; Oma V.S. et al., 2016; Pardon B. et al., 2020; Ridpath J.F. et al., 2020; Zhang M.D. et

al., 2021; Li S. et al., 2024). По данным R. O'Neill et al. (2014), при респираторных патологиях ВСoV в 60,7% случаев выявляется совместно с другими вирусами. W. Fahkrajang et al. (2015) в своих исследованиях показали, что инфекция ВСoV усиливает адгезию *Pasteurella multocida* к клеткам верхних и нижних дыхательных путей путем повышения экспрессии клеточных рецепторов эпителиальных клеток дыхательных путей. Инфицирование сочетанием вирусов и комменсальными бактериями может приводить к тяжелым фибринозным пневмониям (Saif L.J., Jung K.J., 2020).

1.2.4.4 Потенциал межвидовой передачи ВСoV

Высокая скорость мутаций и рекомбинаций генома коронавируса могут способствовать расширению круга хозяев (Zhu Q. et al., 2022). ВСoV, помимо крупного рогатого скота, способен инфицировать и распространяться у домашних жвачных животных (буйволы, овцы, козы, ламы, альпаки и верблюды); диких жвачных животных (олени, бизоны); жвачных животных зоопарков (антилопы, жирафы); и даже нежвачных (собаки), а также у людей (Hasoksuz M. et al., 2007; Chung J.-Y. et al., 2011; Harms N.J. et al., 2019; Savard C. et al., 2022; Smith, F.L. et al., 2022; Zhu Q. et al., 2022). Недавно он также был зарегистрирован у грызунов (Xu L. et al., 2023). В РФ В.А. Мищенко и соавт. (2010) выявили антитела к ВСoV у овец (37 % от исследованных проб), коз (19 %), верблюдов (84 %), диких жвачных животных, таких как лоси, олени, изюбры, косули (7-25%).

НСoV-OC43, вероятно, произошел от общего с ВСoV предка в 1890-е годы. Наличие делеции 290 нуклеотидов (соответствующей отсутствию ВСoV ns4.9 и ns4.8) в штамме НСoV-OC43 относительно генома ВСoV является подтверждением межвидовой передачи от КРС человеку (Vijgen L. et al., 2005). Бета-коронавирусы могут подвергаться повторной межвидовой передаче, что подтверждается выявлением НСoV-OC43 у шимпанзе (Patrono L.V. et al., 2018). В 1994 г. Zhang X.M. et al. выделили штамм НСoV-4408 от ребенка с острой диареей, который генетически более тесно связан с ВСoV, чем с НСoV-OC43, что

позволило считать его вариантом BCoV, инфицирующим людей. Было показано, что штамм NECoV-4408 заражает телят-гнотобионтов и вызывает диарею и поражения кишечника, а также обеспечивает полный перекрестный иммунитет против вирулентного кишечного штамма BCoV-DB2, подтверждая близкое сходство этого штамма с BCoV (Han M.G. et al., 2006).

Между BCoV и другими коронавирусами может происходить рекомбинация. Так, респираторный коронавирус собак (CRCoV-k37) может быть получен в результате генетической рекомбинации между BCoV и CRCoV-BJ232 (Lu S. et al., 2017), тогда как штамм HCoV-OC43, который тесно связан с BCoV, может быть получен в результате рекомбинационного события между BCoV и вирусом гемагглютинирующего энцефаломиелита свиней (Vijgen L. et al., 2005).

Исследование, последовавшее за появлением SARS-CoV1 и MERS-CoV, подтвердило зоонозное происхождение этих бета-коронавирусов и их эффективную адаптивность. Вышеуказанные исследования подтверждают, что крупный рогатый скот потенциально может выступать в качестве зоонозного источника передачи BCoV (Salem E. et al., 2020).

1.2.5 Инфекции, вызываемые герпесвирусом крупного рогатого скота 4 типа

1.2.5.1 Характеристика вируса и строение генома

Герпесвирус крупного рогатого скота 4 типа (BoHV-4) в 2022 получил новое таксономическое название - *Rhadinovirus bovinegamma4*. Вирус принадлежит к семейству *Orthoherpesviridae*, подсемейству *Gammaherpesvirinae* и роду *Rhadinovirus*

https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202401508&taxon_name=Rhadinovirus%20bovinegamma4).

BoHV-4 широко распространен среди крупного рогатого скота во многих странах мира (Verna A.E. et al., 2012; Мищенко В.А. и соавт., 2013; Kruger E.R. et al., 2015; Gagnon C.A. et al., 2017; Dağalp S.B. et al., 2020; De Brun L. et al., 2020; Lin J. et al., 2021; Kumagai A. et al., 2024).

Геном ВоHV-4 состоит из линейной двухцепочечной молекулы ДНК размером около 144 т.п.н., которая содержит уникальную центральную последовательность (L-ДНК) длиной около 108 т.п.н. с низким содержанием G+C, фланкированную двумя полиповторяющимися областями ДНК (prDNA). Вирусный геном содержит не менее 79 открытых рамок считывания (ORF), 17 из которых специфичны для ВоHV-4 (Во1–Во17). Как и у других герпесвирусов, геном ВоGHV4 заключен и защищен икосаэдрическим капсидом, который включает 162 капсомера. Оболочка состоит из 12 вирусных белков и гликопротеинов, закрепленных в липидном бислое. (Romeo F. et al., 2024).

Основными гликопротеинами ВоHV-4 являются gB, gH, gL, gp180 и gM (Lété C. et al., 2012), из которых gB, gH и gL необходимы для проникновения герпесвирусов в клетку. Гликопротеин gp180 играет решающую роль во взаимодействии вируса и клеток-хозяев. В частности, он участвует в связывании вируса с клеточными рецепторами, что является критическим этапом в процессе вирусной инфекции.

ВоHV-4 не имеет тесной биологической или вирусологической связи с другими известными герпесвирусами, заражающими представителей семейства Bovidae (Dewals B. et al., 2006).

1.2.5.2 Эпизоотологические данные

ВоHV-4 был впервые выделен A. Vartha et al. в 1963 г. в Венгрии от телят с респираторными заболеваниями и кератоконъюнктивитом. Выделенный штамм получил название Movar 33/63. В 1971 году ВоHV-4 был выделен S.B. Mohanty et al. в США бычка с клиническими признаками респираторного заболевания.

Представители семейства Bovidae являются естественными хозяевами ВоHV-4. Предполагается, что исходным естественным резервуаром вируса были африканские буйволы, серопревалентность которых составляет 68 % (Dewals B. et al., 2006). Репликация большинства гаммагерпесвирусов ограничена их естественными видами-хозяевами. ВоHV-4 является одним из немногих

исключений из этого правила. Было показано, что ВоHV-4 способен реплицироваться в широком диапазоне видов-хозяев как *in vivo*, так и *in vitro*. Помимо КРС, вирус также был выделен от различных видов животных, включая американского бизона, овец и кошек. Экспериментально было показано, что ВоHV-4 заражает коз, кошек, морских свинок и кроликов (Russo L. et al, 2023).

In vitro ВоHV-4 способен реплицироваться в первичных клеточных культурах или клеточных линиях различных видов животных, таких как КРС, овцы, козы, свиньи, кошки, собаки, кролики, норки, лошади, индейки, хорьки, куры, хомяки, крысы, мыши и обезьяны. Кроме того, предварительные исследования показали, что некоторые линии человеческих клеток поддерживают репликацию ВоHV-4, что привело к гипотезе о том, что этот вирус может представлять риск для здоровья человека (Gillet L. et. al., 2004).

В нашей стране выделение вируса впервые было описано Н.Н. Крюковым и соавт. в 1971 г., а выявление его генома при помощи ПЦР – Л.Б. Прохвятиловой и соавт. (2001).

1.2.5.3 Клинические признаки и патогенез

Передача ВоHV-4 происходит горизонтальным и вертикальным путем. Горизонтальная передача возникает при прямом и непрямом контакте через выделения и fomиты. Выделения из носа, полости рта или половых органов являются источниками инфекции для других животных. Первичное размножение ВоHV-4 происходит в эпителиальных клетках слизистой оболочки носа, полости рта и половых органов, затем вирус диссеминирует по организму в макрофагах и лимфоцитах. Во время острой фазы инфекции вирус реплицируется в лимфоцитах, причем массовое размножение происходит через 7–8 недель после заражения. Как и другие герпесвирусы, ВоHV-4 обладает способностью устанавливать латентную инфекцию, при этом лимфоидные клетки являются основным местом латенции для гаммагерпесвирусов. Другими потенциальными местами персистенции вируса являются тройничные ганглии (Campos F.S. et. al.,

2014). Латентно инфицированные животные являются потенциальными источниками передачи вируса в стаде и могут периодически выделять вирус (Morán P. E. et al, 2015).

BoHV-4 не признан этиологическим агентом определенной патологии (Gagnon C.A. et al., 2017; Romeo F. et al., 2024). Роль BoHV-4 в инфекциях дыхательных и половых путей изучалась несколькими исследовательскими группами. Модели эксплантатов *ex vivo* показали, что BoHV-4 может реплицироваться и проникать в слизистые оболочки половых органов коров и эпителиальные клетки дыхательных путей (Yang B. et al., 2017, 2019). Сообщалось, что вирус ответственен за послеродовой и хронический метрит, отдельно или в сочетании с другими патогенами (Monge A. et al., 2006). Вирусная геномная ДНК и антигены BoHV-4 были обнаружены в эпителии млечных протоков и синусов тканей молочной железы, отобранных у коровы с клиническим маститом (Miyano H. et al., 2004). BoHV-4 также был выделен из образцов вагинальных выделений у коров с послеродовым метритом, при этом у коров были выявлены нейтрализующие антитела, специфичные для BoHV-4 (Nikolin V.M. et al., 2007). S. Klamminger et al. (2017) выделили BoHV-4 у 11,0% коров с клиническим эндометритом, у 4,8% коров с субклиническим эндометритом и 3,6% здоровых коров. Кроме того, инфекция BoHV-4 увеличила вероятность внутриутробного заражения *Trueperella pyogenes*. Недавнее исследование показало, что коровы с послеродовым метритом выделяют BoHV-4 с вагинальными выделениями, носовыми экссудатами и молоком, что указывает на то, что горизонтальная передача может происходить в стадах, положительных по BoHV-4 (Díaz J.M. et al., 2019). F.A. Osorio, D.E. Reed (1983) при экспериментальном заражении коров доказали персистенцию BoHV-4 в лимфоидных тканях и выявили длительную виремию, связанную с мононуклеарными клетками. Имеются доказательства, что BoHV-4 влияет на снижение фертильности (Izumi Y. et al., 2006; Gür S. et al., 2010).

BoHV-4 обнаруживается в различных тканях абортированных плодов, что доказывает трансплацентарную передачу вируса. A.E. Verna et al. (2012) пришли к

выводу, что обнаружение ВоНВ-4 в качестве единственного агента дает косвенные доказательства участия вируса в абортах у КРС.

Таким образом, имеющиеся на сегодняшний день данные свидетельствуют о том, что инфекции ВоНВ-4 довольно часто встречаются у молочных коров. Вирус сам по себе, вероятно, не вызывает клинического заболевания матки, но он может реактивироваться из латентного состояния в эндометрии после отела, а затем действовать вместе с бактериальными патогенами, такими как *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Streptococcus spp.* и *Histophilus somni*, увеличивая риск заболевания матки, нарушая врожденный иммунитет и механизмы репарации матки (Klamminger S. et al., 2017).

Доказана передача вируса со спермой быков, используемой для искусственного осеменения (Nikolin V. et al., 2008). Изолят ВоНВ-4, выделенный у быка с признаками орхита, вызывал поражения здоровых животных после интратестикулярной инокуляции (Dubuisson J. et al., 1989).

ВоНВ-4 был выделен из спинного мозга коровы с астазией (Yamamoto Y. et al., 2000).

В настоящее время все еще неясно, играет ли ВоНВ-4 основную роль в патологических процессах у больных животных или может усиливать клинические проявления, связанные с инфекцией другим патогеном. В целом опубликованные данные свидетельствуют о том, что патогенный потенциал вируса низок. Однако ВоНВ-4 может усугублять клиническое воздействие только тогда, когда он присутствует с другими инфекционными патогенами, которые могут вызывать реактивацию ВоНВ-4 из латентного состояния (Ali H. et al., 2011; Chastant-Maillard S., 2015). В настоящее время ВоНВ-4 рассматривается как кофактор развития заболевания, обычно вызываемого бактериями (Fabian K. et al., 2008; Chastant-Maillard S., 2015). Тем не менее, имеется мало информации о роли ВоНВ-4 в инфекциях КРС и о клиническом значении коинфекции ВоНВ-4 и другими вирусами животных (Gagnon C.A. et al., 2017).

ВоНВ-4 оказывает иммунодепрессивное действие и способствует развитию заболевания, стимулируя воспалительные реакции (Dağalp S.B. et al., 2020). O. Szenci

et al. (2016) сообщили, что локальное размножение *Histophilus somni* может производить определенные химические вещества (PGE₂), которые реактивируют латентный BoHV-4 из некоторых местных макрофагов, в то время как размножение реактивированного вируса снижает эффективность функций местных макрофагов, что еще больше способствует локальному размножению бактерий.

Bauermann F.V. et al. (2022) для изучения патогенеза провели экспериментальное заражение серонегативных телят изолятами BoHV-4 SD16-38 и SD16-49, выделенными при респираторной и репродуктивной патологии. Было установлено, что инокуляция обоих вирусов сопровождалась транзиторной репликацией, виремией и выделением вируса с носовыми выделениями и субклинической форме инфекции. Изолят SD16-49 реплицировался с более высокой эффективностью в дыхательных путях, чем изолят SD 16-38, хотя он был изолирован при репродуктивной патологии. ДНК BoHV-4 выявили в тройничных ганглиях и заглочном лимфатическом узле. Эти результаты подтверждают, что интраназальная инокуляция BoHV-4 приводит к эффективному инфицированию и установлению латентной инфекции в нейрональных и лимфоидных тканях. Исследователи полагают, что BoHV-4 может выступать в качестве вторичного фактора в возникновении заболевания.

Egyed L.A., Vartha A.S. (1996) изучали распространение вируса BoHV-4 в органах экспериментально инфицированных телят с помощью гнездовой ПЦР, выделения вируса и иммуногистохимии. По их результатам, нервная система и мышцы не содержали вирусную ДНК. Печень и кишечные лимфатические узлы содержали небольшое количество вируса (менее двух копий/мкг клеточной ДНК). Ткани кишечника, миндалин, тимуса и почек содержали больше копий вирусной ДНК (от 5 до 50 копий/мкг клеточной ДНК). Наибольшее количество ДНК BoHV-4 (от 50 до 500 копий/мкг клеточной ДНК) было обнаружено в селезенке, легких, трахее и носовом эпителии.

Исследование Gagnon C.A. et al. (2017), в котором выявлены более высокие титры антител к BoHV-4 у больных по сравнению со здоровыми животными,

подтверждает предположение о том, что этот вирус является частым фактором риска или вторичным фактором в инфекциях КРС.

В 2020 г. в Японии произошла вспышка респираторного заболевания среди телят, вызванная BoHV-4. У большинства животных заболевание протекало в легкой форме. Вирус был выделен из пробы носового смыва от теленка с пневмонией и диареей. Никакие другие вирусы и бактерии выявлены не были (Kumagai A. et al., 2024). Примерно в это же время респираторный BoHV-4 был выделен в других странах, включая Аргентину (Pérez S. et al., 2020), Турцию (Dağalp S.B. et al., 2021) и Китай (Lin J. et al., 2021).

1.2.6 Парагрипп-3 крупного рогатого скота

1.2.6.1 Характеристика вируса и строение генома

Парагрипп-3 (ПГ-3) КРС – острая контагиозная вирусная болезнь, главным образом телят, характеризующаяся поражением органов дыхания (Сюрин В.Н. и соавт., 1998). Вирус ПГ-3 КРС (Bovine Parainfluenza Virus Type 3; BPIV-3) в 2016 в 2022 г. получил новое таксономическое название – *Respirovirus bovis*. Вирус является представителем рода *Respirovirus* семейства *Paramyxoviridae* (https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202401621&taxon_name=Respirovirus%20bovis). Респировирусы также включают генетические и антигенно родственные вирусы рода парагриппа человека типов 1 и 3 (HPIV-1 и HPIV-3) (Ellis J.A., 2010).

BPIV-3 – оболочечный плеоморфный вирус диаметром 150-300 нм. Геном представляет собой отрицательно заряженную РНК длиной приблизительно 15000 нуклеотидов, кодирующую шесть структурных белков: нуклеопротеин (N), фосфопротеин (P), большой белок (L), матричный белок (M), гемагглютинин-нейраминидазу (HN) и белок слияния (F), а также три неструктурных белка (С, D и V) (Ellis J.A., 2010).

Белки HN и F являются поверхностными гликопротеинами, обнаруженными во всех вирусах парагриппа. Существуют значительные различия в количестве участков гликозилирования HN среди вирусов парагриппа и даже среди штаммов

в пределах одного типа, что может быть частью стратегии избегания обнаружения иммунной системой. Белок F играет важную роль во взаимодействии вируса с хозяином и участвует в слиянии мембран, что позволяет вирусному нуклеокапсиду проникать в клетку-хозяина и инфицировать ее. Консервативный, негликозолированный матричный белок М взаимодействует с поверхностными гликопротеинами (HN и F), направляя их вставку и агрегацию в определенных участках клеточной мембраны. Белки L, P и N тесно связаны с вирусной РНК. Неструктурные белки, включая белок V и белок С, кодируются геном Р. Белки V, С и N регулируют репликацию вируса (Sobhy N.M. et al., 2017; Li L. et al., 2022).

ВРIV-3 имеет два типа антигена: рибонуклеопротеидный (S-АГ) и поверхностный (V-АГ). Антигенной вариабельности штаммов не установлено. Все выделенные штаммы идентичны по антигенной структуре и соответствуют прототипному штамму SF-4, выделенному в США (Верховская А.Е. и соавт., 2021).

1.2.6.2 Эпизоотологические данные

ВРIV-3 был впервые выделен в 1959 году в США (Hoerlein A.V. et al., 1959). В нашей стране вирус был впервые обнаружен у больного теленка З.Ф. Зудилиной, Н.Н. Крюковым (1970). Многими исследователями установлено широкое распространение ПГ-3 КРС в животноводческих хозяйствах нашей страны (Мищенко В.А. и соавт., 2012; Строганова И.Я., 2011с; Гунашев Ш.А., 2011; Петрова О.Г. и соавт., 2015; Гериш А., 2021).

Серопозитивность к вирусу взрослых животных в стаде может достигать 100% (Глотов А.Г., Глотова Т.И., 2008). В.А. Мищенко и соавт. (2012) установили широкую циркуляцию ВРIV-3 среди домашних и диких жвачных животных и доказали межвидовую передачу. Авторы выявили более высокий уровень вируснейтрализующих антител у КРС молочных пород. У высокопродуктивных коров и нетелей вирус вызывал респираторную патологию, а у диких жвачных инфицирование вирусом протекало без клинических признаков.

Установлено, что BPIV-3 является эндемичным для популяций мясного и молочного скота в Европе, Азии, Африке, Северной и Южной Америке. Сообщения об инфекции BPIV-3 у КРС имеются во многих странах мира (Valarcher J.F., Hogghund S. et al., 2006; Yesibag K., Gungor B., 2008; Ellis J.A., 2010; Sobhy N.M. et al., 2017; Li L. et al., 2022; Ren Y. et al., 2023; Milićević V. et al., 2024).

BPIV-3 способен инфицировать широкий спектр млекопитающих (Maidana S.S. et al., 2012).

Передача вируса происходит воздушно-капельным путем, а также, возможно, пероральным и половым, так как вирус был выделен из молока, фекалий и вагинальных выделений (Верховская А.Е. и соавт., 2021).

Чаще болеют телята в возрасте от 10 дней до года, реже – более старший молодняк. У взрослых животных болезнь чаще протекает бессимптомно (Глотов А.Г., Глотова Т.И., 2008).

1.2.6.3 Клинические признаки и патогенез

BPIV-3 оказывает прямое действие на респираторный тракт. При попадании в носовую полость или другие участки дыхательной системы вирус проникает в эпителиальные клетки и быстро размножается. Вирионы выделяются на поверхность слизистых оболочек и разрушают защитный барьер, что создает благоприятные условия для развития секундарной микрофлоры. Движение слизи и воздуха способствует распространению вирусных частиц по респираторному тракту (Сюрин В.Н. и соавт., 1998).

BPIV-3 оказывает иммуносупрессивное действие на лейкоциты животного, что приводит к снижению фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов и пролиферации лимфоцитов, а также разрушению эпителиальных клеток верхнего респираторного тракта. Иммуносупрессивное действие может быть связано с влиянием на способность альвеоцитов второго порядка вырабатывать сурфактант и повреждать базальную мембрану эпителиальных клеток в бронхиолах.

У КРС клинические признаки, связанные с инфекцией ВРІV-3, варьируют от отсутствия (субклиническое течение) до острого респираторного заболевания, характеризующегося лихорадкой, выделениями из носа и кашлем (Newcomer B.W. et al., 2017). При неосложненной инфекции клиническая картина наблюдается 3-4 дня и заканчивается полным выздоровлением. В случаях инфицирования двумя вирусами или дополнительно бактериальными агентами развивается интерстициальная пневмония с преимущественным поражением вентральных долей легких. У стельных коров инфекция может привести к внутриутробному заражению плода, абортam или рождению нежизнеспособных телят (Сюрин В.Н. и соавт., 1998).

ВРІV-3 часто участвует в патогенезе комплекса респираторных заболеваний КРС, где его основная роль заключается в предрасположенности инфицированных животных к вторичным инфекциям (Newcomer B.W. et al., 2017).

Инфекция ВРІV-3 может изменять реактивность гладкой мускулатуры дыхательных путей. Через четыре дня после экспериментальной интратрахеальной инокуляции вируса парагриппа-3 морским свинкам G. Folkerts et al. (1990) наблюдали увеличение на 45% вызванного гистамином сокращения гладких мышц трахеи, а количество воспалительных клеток в дыхательных путях было в 1,5 раза выше, чем в контрольной группе. Гиперреактивность трахеи также была связана с увеличением воспалительных бронхоальвеолярных клеток. Аналогичным образом, через 6 дней после аэрозольном инфицировании телят ВРІV-3 наблюдалось увеличение содержания гистамина в тучных клетках (Ogunbiyi P.O. et al., 1988). Эти реакции, обычно связанные с реакциями гиперчувствительности 1 типа, предполагают воспалительные реакции на инфекцию ВРІV-3, которые в конечном итоге могут оказывать неблагоприятное воздействие на дыхательный клиренс и способствовать колонизации легких бактериями (Hodgins D.C. et al., 2002).

1.3 Лабораторная диагностика вирусных инфекций крупного рогатого скота

1.3.1 Традиционные методы лабораторной диагностики

Лабораторные методы диагностики вирусных респираторных инфекций КРС включают вирусологические, серологические и молекулярно-генетические методы.

Для лабораторной диагностики отбирают пробы носовых, глазных, вагинальных выделений, пробы слизистой оболочки носа, трахеи, миндалин, легких, пробы паренхиматозных органов абортрованного плода. Пробы сыворотки крови отбирают двукратно – в острый период и через 21 день после взятия первой пробы.

Выделение вируса в культуре клеток – классический метод диагностики вирусных инфекций. Для выделения вируса используют различные культуры клеток: первичные и субкультуры почки телят, легких или тестикул, клеточные штаммы, происходящие из легких плода, трахеи, а также перевиваемые клеточные линии (Nandi S. et al., 2009). Наличие вируса в образцах определяется по цитопатическому действию. Выявление НЦП изолятов BVDV требует исследования культуры клеток на присутствие НЦП штамма вируса методом ИФА, иммунопероксидазного окрашивания монослоя культуры клеток или ОТ-ПЦР (Lindberg A.L.E., 2003; Saliki J.T., Dubovi E.J., 2004). Выделение BRSV затруднено ввиду его чрезвычайной лабильности и возможно только на ранней стадии инфекции, а вероятность выделения вируса снижается с появлением признаков заболевания (Сюрин В.Н. и соавт., 1998). Вирусологическая диагностика BCoV малоэффективна, так как в исследуемой пробе часто присутствуют вирусы, обладающие более высокой способностью к репликации в культуре клеток, вследствие чего репликация BCoV подавляется (Глотов А.Г., Глотова Т.И., 2008). Недостатками метода выделения вируса является длительность и трудоемкость диагностики (Egyed L. A., Bartha A. S., 1996).

Использование электронной микроскопии для выявления вирусных частиц в клиническом материале является быстрым методом диагностики BoHV-1, но его следует применять на ранней стадии заболевания (Nandi S. et al., 2009).

Для выявления антигенов вируса используют методы иммунофлуоресценции, иммуногистохимии и иммуноферментный анализ. Методом иммуногистохимии выявляют антиген BVDV в клетках кожи и различных тканях (Bianchi M.V. et al., 2018), методом ИФА – в плазме и сыворотке крови, молоке (Saliki J.T., Dubovi E.J., 2004; Hill F.I. et al., 2007). К недостаткам этих методов относится более низкая чувствительность и специфичность по сравнению с выделением вируса.

Серологическая диагностика включает реакцию нейтрализации в культуре клеток и различные варианты иммуноферментного анализа. Реакция нейтрализации в культуре клеток широко используется и является золотым стандартом диагностики, по которому оцениваются другие методы (Perrin B. et al., 1994). Эти методы используют для оценки эффективности вакцинации, оценки статуса стада на наличие инфекции ИРТ, ВД-БС КРС, установления ретроспективного диагноза. Первичная инфекция у иммунокомпетентных животных приводит к сероконверсии примерно через три недели после инфицирования с постепенным увеличением титров антител. Реакция нейтрализации для диагностики РСИ КРС применяется редко в связи с трудностями культивирования вируса (Глотов А.Г. и соавт., 2021). В РФ широкое распространение для диагностики РСИ КРС получила реакция непрямой агглютинации (РНГА) (Васильев А.В. и соавт., 1988). Для диагностики КВИ КРС методом гемагглютинации широко применяются диагностические наборы ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко.

Метод ИФА/ELISA используют для выявления антител и ретроспективной диагностики. ИФА является эффективным методом скрининга иммунного статуса инфицированных и вакцинированных животных (Aydin O. et al., 2024). С помощью метода ИФА выявляют антитела в сыворотке крови и молоке (Сюрин В.Н. и соавт., 1998).

1.3.2 Молекулярные методы диагностики вирусных респираторных инфекций

В последние десятилетия активно внедряются в повседневную рутинную диагностику вирусных инфекций КРС молекулярно-генетические методы (молекулярная гибридизация, полимеразная цепная реакция), что позволило повысить выявляемость возбудителей респираторных инфекций по сравнению с традиционными методами (Zhang S. et al., 2011).

Методы молекулярной диагностики ИРТ КРС начали разрабатывать в 80-90-х годах XX века, чему способствовало изучение патогенеза болезней и расшифровка геномов возбудителей. Разработке молекулярных зондов и изучению их диагностической эффективности при ИРТ КРС посвящены работы многих ученых (Belak S. et al., 1988; Vilcek S. et al., 1993a; Xia J.Q. et al., 1995a, b). В России разработкой молекулярных зондов занимались И.А. Морозов и соавт. (1989), В.М. Гаджиев (1991), А.Г. Глотов (1999).

С внедрением тестов амплификации нуклеиновых кислот (ОТ-ПЦР, ПЦР в реальном времени) возможности лабораторных методов диагностики вирусных респираторных инфекций значительно расширились. ПЦР является быстрым и чувствительным методом обнаружения вирусных нуклеиновых кислот. В настоящее время обнаружение и характеристика вирусов, основанные на частичной амплификации геномных сегментов, часто проводятся в формате реального времени, что повышает чувствительность и специфичность по сравнению с обычной ПЦР, где за этапом амплификации следует обнаружение ампликона с помощью гель-электрофореза. В ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) этапы амплификации и обнаружения не только выполняются одновременно (что экономит время и увеличивает производительность), но и происходят в закрытой пробирке, что эффективно исключает риск заражения за счет снижения вероятности случайного рассеивания ранее амплифицированных продуктов в лабораторной среде. ПЦР-РВ позволяет проводить количественную динамику накопления целевого продукта с автоматической регистрацией результатов.

Соответственно, с течением времени появилось множество отчетов, описывающих мультиплексные протоколы ПЦР-РВ для обнаружения генетически различных вирусов в одной пробирке (Parreira R., 2018).

По сравнению с традиционными, молекулярные методы (особенно в мультиплексных форматах) могут одновременно обнаруживать панель вирусных патогенов, увеличивая диагностическую ценность. Другим преимуществом молекулярных методов является возможность количественной оценки вирусных патогенов (Zhang S. et al., 2011).

В настоящее время для диагностики ИРТ КРС широко используется ПЦР. Разработаны ПЦР с праймерами к генам гликопротеинов В, С, D, I и тимидинкиназы (Kibenge F.S. et al., 1994; Xia J.Q. et al., 1995b; Alegre M. et al., 2001). К. Wernike et al. (2011) разработали ПЦР-РВ с праймерами на ген gE для дифференциации полевых и вакцинных штаммов с делецией гена gE. Работы многих исследователей посвящены разработке ПЦР и выявлению с ее помощью ДНК вируса в сперме быков-производителей (Vilcek S. et al., 1993, 1994; Masri S.A. et al., 1996; Xia J.Q. et al., 1995b; Vogel F.S. et al., 2006; Grom J. et al., 2006, Rana S.K., 2011).

Идентификация ВоHV-1 и ВоHV-5 у инфицированных животных не представляется возможной серологическими методами. Поэтому для дифференциации ВоHV-1 и ВоHV-5 разработаны различные варианты ПЦР. Так, F.S. Campos et al. (2009) описали метод гнездовой ПЦР для определения распространенности ВоHV-1 и ВоHV-5 отдельно в одних и тех же образцах. M.P. Claus et al. (2005) разработали мультиплексную ПЦР с электрофоретической детекцией на ген гликопротеина С. I.S. Diallo et al. (2011) разработана дуплексная ПЦР в реальном времени, имеющая предел обнаружения 10 копий ВоHV-1 и 45 копий ВоHV-5. F. Oberto et al. (2023) разработали мультиплексную ПЦР с праймерами на гены gD, gE и gG для дифференциации ВоHV-1, ВоHV-1 и ВоHV-5.

В нашей стране А.В. Пчельниковым (2024) разработана ПЦР-РВ для дифференциальной диагностики ВоHV-1 и ВоHV-5 в биологическом материале. Чувствительность реакции составляет $7,9 \times 10^2$ копий ДНК/мл для ВоHV-1 и

1,3×10⁴ копий ДНК/мл для ВоHV-5, соответственно. Также проведено полногеномное секвенирование очищенного штамма ТК/А ВоHV-1 и его филогенетический анализ. Согласно результатам исследования, штамм ТК/А является ВоHV-5 с наибольшей гомологией штамму ВоHV-5 ISO 97/45, депонированному в GenBank под номером KY549446.1.

Впервые ОТ-ПЦР для обнаружения BVDV был разработан Hertig C. et al. в 1991 году на основе генов р80 и гр53, кодирующих белки NS3 и E2. В настоящее время разработаны тест-системы на основе ПЦР с электрофоретической детекцией и в режиме реального времени с применением флуоресцентно меченных зондов, которые широко используются для обнаружения BVDV в органах животных, сыворотке крови, молоке, сперме КРС (Vilcek et al., 1994, 2001; Sullivan D.G., Akkina R.K., 1995; Letellier C., Kerkhofs P., 2003; Baxi M. et al., 2006; Young N.J. et al., 2006; La Rocca S.A., Sandvik T.A., 2009; LeBlanc N. et al., 2010; Yan L. et al., 2011; Decaro N. et al., 2012; Zhang S.Q. et al., 2014; Losurdo M. et al., 2015; Mari V. et al., 2016). ПЦР признан самым эффективным методом выявления ПИ животных. ОТ-ПЦР способен обнаружить вирус BVDV даже при наличии материнских антител к вирусу, которые влияют на результаты, полученные с помощью реакции нейтрализации и ИФА (Khodakaram-Tafti A. et al., 2017). Большинство ПЦР основаны на обнаружении 5'-UTR или гена гликопротеина E2. В России Нефедченко А.В. (2018) разработал метод идентификации и генотипирования BVDV на основе ПЦР на 5'-UTR область генома, который выявляет и генотипирует РНК вируса субтипов 1a, 1b и 2a, чувствительность ПЦР составляет 10 ТЦД₅₀/мл.

Для диагностики РСИ КРС также широко в настоящее время применяется ПЦР (Voxus M. et al., 2005). Мишенями для амплификации являются участки генов, кодирующих протеины F или G вируса. Были разработаны различные варианты реакции, основанной на обратной транскрипции: в электрофорезном формате, гнездовая ПЦР и ПЦР-РВ. Разработке ПЦР и выявлению генома BRSV посвящены работы многочисленных исследователей (Vilcek S. et al., 1994; Valentova V. et al., 2003; Achenbach J.E. et al., 2004; Voxus M. et al., 2005;

Nakhverdyan M. et al., 2005; Timsit, E. et al., 2010; Chang Y. et al., 2022; Kishimoto M. et al., 2017). Р. Pansri et al. (2020) разработали мультиплексную ОТ-ПЦР-РВ для выявления комплекса патогенов – возбудителей респираторных болезней, в том числе BRSV. В нашей стране разработке ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией посвящена работа К.В. Войтовой (2011).

Молекулярные методы широко используются для диагностики BCoV и показали высокую эффективность. Они включают ОТ-ПЦР, гнездовую ОТ-ПЦР, ОТ-ПЦР-РВ и секвенирование генома (Saif L. J., 2010; Paller T. et al., 2017). Для амплификации используется один из наиболее консервативных участка вирусного генома – открытая рамка считывания OFR1ab или ген белка N, а последовательность белка S — для изучения молекулярной эпизоотологии вируса. Разработке ОТ-ПЦР для выявления BCoV посвящены работы S. Escutenaire et al. (2007), N. Decaro et al. (2008 b), К.М. Asano et al. (2009), Н.М. Amer et al. (2011), S. Li et al. (2024) и других. В нашей стране В.А. Кудрявцевым (2004) разработаны методики выявления генома и штаммовой дифференциации коронавируса КРС из биоматериала на основе ПЦР и секвенирования вариабельной области генов HE и S, с использованием которых был выявлен геном 20 полевых изолятов BCoV в пробах фекалий и слизистой оболочки тонкого кишечника, носовых истечений, смывов трахеи и в легких телят.

Для выявления генома BoHV-4 в пробах биологического материала от больных и павших животных в настоящее время широко применяется ПЦР с праймерами на гены gB, gL и тимидинкиназы (ТК) (Deim Z. et al., 2006; Herlekar D.A. et al., 2013; Campos F.S. et al., 2014; Delooz L. et al., 2017).

Для выявления генома BPIV-3 используется ПЦР (Vaucher R.A. et al., 2008). L. Thonur et al., 2012 разработали ОТ-ПЦР в мультиплексном формате для одновременного выявления BPIV-3, BoHV-1 и BRSV.

Поскольку синдром респираторного заболевания КРС в основном вызывается коинфекцией нескольких этиологических агентов, крайне важно разработать быстрый и удобный метод одновременного обнаружения патогенов, вызывающих респираторный комплекс. До настоящего времени было разработано

множество вариантов мультиплексной ПЦР в реальном времени. Так, Liu C. et al. (2019) разработали анализ ПЦР с использованием наночастиц для обнаружения BRSV, ВоHV-1, BVDV и BPIV3 с пределом обнаружения $1,43 \times 10^2$ копий рекомбинантных плазмид на реакцию. L. Thonur et al. (2012) разработали одношаговый мультиплексный анализ ОТ-ПЦР в реальном времени для обнаружения BRSV, ВоHV-1 и BPIV3. Анализ был быстрым, высоковоспроизводимым, специфичным и имел чувствительность 97% при обнаружении 10² копий BRSV, ВоHV-1 и BPIV3. V. Mari et al. (2016) разработали мультиплексный анализ ОТ-ПЦР в реальном времени для BVDV-1, BVDV-2 и BVDV-3. Анализ оказался чувствительным, специфичным и воспроизводимым, гарантируя обнаружение всего лишь 10^0 - 10^1 копий вирусной РНК. J. Zhang et al. (2022) разработали одношаговую мультиплексную ПЦР-РВ, способную одновременно обнаруживать пять вирусных патогенов (ВоHV-1, BVDV, BRSV, BIPV-3, IDV). Предел обнаружения составил ~10 копий/реакцию для одиночной ПЦР-РВ и 100 копий/реакцию для мультиплексной ПЦР-РВ.

Секвенирование является мощным инструментом изучения молекулярной эпизоотологии, комплексной диагностики и интенсивного мониторинга инфекционных заболеваний в ветеринарной медицине. Для определения последовательностей нуклеотидов используют секвенирование по методу Сэнгера и высокопроизводительное NGS секвенирование (Suminda G.G.D. et al., 2022).

Новое направление в молекулярной генетике – метагеномика - активно развивается в последние годы. Наиболее очевидны и значительны перспективы разработок и внедрения метагеномного анализа взамен узкоспециализированной ПЦР для диагностики и дифференциальной диагностики полиэтиологичной инфекционной патологии, смешанных, хронических, оппортунистических, скрытых, атипичных, условно-патогенных процессов (Макаров В.В., 2014).

1.4 Изучение генетического разнообразия вирусов респираторного комплекса крупного рогатого скота

Изучение молекулярной эпизоотологии вирусов респираторного комплекса может предоставить бесценную информацию о разнообразии вирусов в популяции, генетическом родстве между вирусами, выявлении изолятов вирусов, циркулирующих в отдельных странах или во всем мире. Поскольку респираторные вирусы склонны к антигенному дрейфу из-за генетических точечных мутаций и реассортации, важно идентифицировать эти изменения в вирусных геномах (Ferreira R.C. et al., 2024).

1.4.1 Генетическое разнообразие BoHV-1

На основании рестрикционного и геномного анализов идентифицировано три генетических подтипа BoHV-1 (1.1, 1.2a и 1.2b) (D'Offay J. et al., 2019). Кроме того, был также опубликован список референтных геномных последовательностей BoHV-1 (D'Offay J. et al., 2019; Guo W. et al., 2022; Dagalp S.B. et al., 2020; Chothe, S.K. et al., 2018; Fulton, R.W. et al., 2013).

J.D'Offay et al. (2019) были определены полные последовательности генома девяти модифицированных живых вакцинных вирусов BoHV-1 (MLV) из имеющихся в продаже вакцин, а также полные последовательности генома более 40 полевых изолятов BoHV-1, выделенных от КРС при респираторных заболеваниях, инфекциях половых путей, системных инфекциях у новорожденных телят и от абортированных плодов.

Штаммы подтипа 1.1 распространены в Европе, Северной и Южной Америке, Индии. Подтип 1.2a распространен в Бразилии и Европе. Подтип 1.2b широко распространен в Австралии, Европе и Китае. (Zhou Y. et al., 2020; Righi C., et al., 2023; Rashmi L. et al., 2024).

Согласно исследованиям И.А. Морозова (1991 a,b), на территории России циркулируют все генетические подтипы BoHV-1. Т.И. Гловой (2006) при

использовании ПЦР-ПДРФ анализа штаммов и изолятов BoHV-1 установлено распространение у КРС в нашей стране четырех генетических групп вируса: «Соорег-подобные» (респираторные); «ТК-подобные» (генитальные); «ТК-А-подобные» (вакцинные); смешанные, имеющие рестрикционный профиль респираторной и вакцинной генетических групп.

1.4.2 Генетическое разнообразие BVDV

Филогенетический анализ частичных и полных геномных последовательностей используют для идентификации видов и субтипов BVDV. Чаще исследуют регион 5'-UTR, являющийся высококонсервативной областью, а также участок гена E2 (наиболее вариабельный участок) и участки генов E_{gns} и N^{pro}. Необходимость исследования нескольких фрагментов связана с рекомбинациями (Глотов А.Г. и соавт., 2024).

Результаты молекулярно-эпидемиологического исследования последних лет подтвердили широкое разнообразие генетических вариантов внутри видов BVDV. Распространенность субтипов варьирует в зависимости от региона. Доказано, что в разных странах преобладают различные субтипы BVDV.

Самым распространенным в мире считается BVDV-1b, затем 1a и 1c. Субтип BVDV-1b является преобладающим субтипом в Америке, Азии и Европе. Напротив, согласно опубликованным данным, почти все (95,9%) полевых изолятов из Австралии были классифицированы как BVDV-1c. На Африканском континенте преобладает 1a, но общее количество исследованных изолятов было небольшим (Yeşilbag K. et al., 2017).

BVDV-2a является наиболее распространенным субтипом BVDV-2 на всех континентах. BVDV-2c был обнаружен только в Европе и Америке (Yeşilbag K. et al., 2017). Так, в Бразилии 80% изолятов представлены BVDV-1a, BVDV-2b и BVDV-3a, также циркулируют BVDV-1b, 1d, 1e, 2c и новый генотип 2e (De Oliveira P.S.B. et al., 2022; Vaumbach L.F. et al., 2023). В Уругвае выявили BVDV-1a и BVDV-2b у телят с клиническими признаками заболеваний (Da Silva

Silveira C. et al., 2020). В Аргентине клинические случаи заболевания были вызваны BVDV-1a, BVDV-1b, BVDV-2a и BVDV-2b (Pescora A. et al., 2014), в Чили и Перу - BVDV-1a, BVDV-1b и BVDV-1c (Pizarro-Lucero J. et al., 2006; Ståhl K et al., 2009).

В США были выявлены три основных субтипа (BVDV-1a, 1b и BVDV-2a). В Турции преобладает 1l, также циркулируют 1a, 1b, 1c, 1d, 2a и BVDV-3 Yeşilbag K. et al., 2017, Timurkan M.Ö., Aydın H., 2019). В Китае обнаружены субтипы 1a, 1b, 1c, 1d, 1m, 1o, 1p, 1q, 1u и 1v и 1w; из них 1a, 1c и 1m встречаются чаще (Deng M. et al., 2020). В Индии доминирует новый субтип BVDV-3e, также циркулирует 3a (Kalaiyarasu S. et al., 2022). В Польше при исследовании изолятов вируса 2015 – 2018 гг. выявили циркуляцию 1b, 1g, 1f, 1d, 1r, 1s и 1e с преобладанием 1b и 1g (Mirosław P., Polak M., 2019). Во Франции BVDV классифицированы на субтипы 1e, 1b, 1d, 1x, 1l, 1r и 1s, причем 1e и 1b наиболее распространены (Rivas J. et al., 2022). По данным R.E. Booth et al. (2013), в Великобритании циркулируют субтипы 1b, 1e и 1i, доминирует 1a. В Словении BVDV представлены субтипами 1b, 1d, 1f, 1g, 1e (Toplak I. et al., 2016). Италия характеризуется самым высоким генетическим разнообразием пестивирусов крупного рогатого скота в мире. BVDV1 представлен 15 субтипами: 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g, 1h, 1j, 1k, 1l, 1r, 1s, 1t, 1u, чаще встречаются 1b и 1e; BVDV2 – двумя субтипами: наиболее распространенный 2a, а также 2c (Luzzago C., Decaro N., 2021). В Новой Зеландии доминирует субтип 1a, реже встречается 1c (Dunowska M. et al., 2024).

Интересно, что субтипы BVDV-1m, -1n, -1o, -1p и -1q были обнаружены до сих пор исключительно в Азии. Аналогично, подгенотипы BVDV -1f, -1g, -1h, -1k, -1l, -1r, 1s и -1t не были зарегистрированы в странах за пределами Европы. (Yeşilbag K. et al., 2017).

Естественные инфекции BVDV-3 в Европе были выявлены только в Италии в 2010 г. (Decaro N. et al., 2011), хотя ретроспективный анализ архивных образцов датирует его распространение в этой стране в 2007 г. (Decaro N., et al., 2013). Штаммы BVDV-3 в дальнейшем не были обнаружены в этой стране.

В РФ в последние годы ведутся исследования по распространению видов и субтипов BVDV. Так, М.И. Шульпин и соавт. (2003) установили широкое распространение BVDV-1 среди КРС в Центральном регионе РФ и циркуляцию субтипа 1a и неидентифицированного субтипа. Г.К. Юровым и соавт. в 2013 г. выявлены 2 антигенно различающихся штамма вируса (1a и 1m) в популяциях домашнего скота и лесных бизонов. А.Г. Южаков (2009) при исследовании трех нецитопатогенных изолятов от КРС из хозяйств Сибири установил их принадлежность к субтипам 1b, 1d и BVDV-2. А.В. Нефедченко (2018) выявил циркуляцию семи субтипов BVDV-1 (1a, 1b, 1c, 1d, 1i, 1f, 1p) и трех BVDV-2 (2a, 2b и 2c).

1.4.3 Генетическое разнообразие BRSV

Вследствие своей генетической и антигенной гетерогенности белки G, F и N используются в качестве мишеней для классификации вирусных штаммов BRSV. Филогенетические исследования выявили десять генетических подгрупп BRSV (Valarcher J.F. et al., 2000; Krešić N. et al., 2018; Kumagai A. et al., 2021). Подгруппа I включает генотипы, идентифицированные до 1980 года в Европе. Штаммы подгруппы I регистрировались у КРС последний раз в Бельгии в 1997 году; с 2000-х годов о подгруппе I не сообщалось. Подгруппа II включает генотипы, обнаруженные в странах Северной Европы, таких как Дания, Швеция и Норвегия; некоторые из генотипов BRSV, обнаруженных в Японии, также относятся к подгруппе II (Aydin O. et al., 2024). Подгруппа III до недавнего времени включала только штаммы из США, недавно в нее включили штаммы из Италии, Китая и Турции (Bertolotti, L. et al., 2018; Aydin O. et al., 2024; Chang Y. et al., 2022). Y. Chang et al. (2022) определили доминирование штаммов III подгруппы в Китае. Подгруппа IV включает два подкласса - IA и IB. В подгруппу IV IA входят штаммы, выделенные в Англии в 1971 и 1976 годах, а в IB – выделенные в Нидерландах в 1980-х годах. Подгруппы V и VI были обнаружены в странах Европы (Valarcher, J.F. et al., 2000). Подгруппы VII и VIII выявлены в Хорватии в

2018 г. (Krešić N. et al., 2018). Недавно идентифицировали еще две подгруппы – IX в Бразилии (Leme R.A. et al., 2020) и Японии и X в Японии (Kumagai A. et al., 2021).

Исследования генетического разнообразия выявили строгую географическую корреляцию между вирусными вариантами и появлением новых генетических вариантов (Bertolotti L. et al., 2018).

В доступной литературе отсутствуют сведения об изучении генетического разнообразия BRSV в России.

Особенностью BRSV является его способность инфицировать организм даже при наличии вируснейтрализующих антител и вызывать повторные заражения на протяжении всей жизни животного (Valentova V. et al., 2003b). Выявление и характеристика генетически различных подгрупп BRSV, циркулирующих в стадах, и дальнейшие исследования их антигенных свойств имеют решающее значение для принятия эффективных мер борьбы и профилактики инфекции.

1.4.4 Генетическое разнообразие BCoV

Все идентифицированные к настоящему времени изоляты BCoV принадлежат к одному серотипу/генотипу на основании анализа перекрестной нейтрализации вируса и генотипирования независимо от клинического происхождения (Suzuki T. et al., 2020; Vlasova A.N., Saif L.J., 2021). В гене S между респираторными и кишечными изолятами были обнаружены точечные мутации, при этом исследования *in vivo* выявили высокий уровень перекрестной защиты телят между такими изолятами (Saif L.J., Jung K., 2020). Генотипирование выявило отдельные сублинии и кластеры в зависимости от года и места изоляции, но не от клинической картины (Alekseev K.P. et al., 2008; Bok M. et al., 2015; Gunn L. et al., 2015; Vlasova A.N., Saif L.J., 2021).

На основе филогенетического анализа гена S все изоляты BCoV подразделяются на две группы – G I (европейская) и G II (американо-азиатская)

(Salem E. et al., 2020). Исследования определили США как единственный источник проникновения ВСоV в другие страны (Franzo G. et al., 2020). Дальнейший анализ показал, что ранние классические штаммы из разных стран сгруппировались в подгруппу G Ia, включая некоторые штаммы из Азии, Америки и Европы, а также исходные штаммы Mebus. Штаммы ВСоV из Европы сгруппировались в подгруппу G Ib. Среди штаммов группы G II большинство штаммов ВСоV из США, Китая, Японии и Вьетнама относятся к подгруппе G IIb, в то время как ВСоV в Корее отличается от других азиатских стран и принадлежит к подгруппе G IIa (Zhu Q. et al., 2022). Q. Zhu et al. (2022) показали, что американские штаммы ВСоV распространены во всех подгруппах. Следовательно, эволюция американских штаммов ВСоV может представлять собой эволюцию глобальных штаммов. Азиатские штаммы тесно связаны с американскими и демонстрируют географическую агрегацию генетической изменчивости, что может быть связано с торговлей между США и этими странами Азии (Suzuki T. et al., 2020).

В нашей стране молекулярная эпизоотология ВСоV мало изучена. В.А. Кудрявцевым (2004) определена первичная структура вариабельных фрагментов HE и S генов изолятов коронавируса КРС, выявленных на территории РФ. Проведен сравнительный филогенетический анализ первичной структуры фрагментов генома штаммов и полевых изолятов ВсоV.

1.4.5 Генетическое разнообразие ВоHV-4

В настоящее время в разных странах выделено более 100 штаммов ВоHV-4. Все известные изолированные вирусы классифицируются на три генетические группы на основе геномного и филогенетического анализов. Вирусы генотипа 1, называемые вирусами, подобными Movar 33/63, в основном выделены в Европе. Вирусы генотипа 2, называемые вирусами, подобными DN599, в основном выделены в Северной Америке. Вирусы генотипа 3 являются штаммами африканских буйволов (Dewals B. et al., 2006).

На сегодняшний день секвенированы семь полных геномов штаммов ВоНВ-4 генотипа 1, включая 66-p-347, SD16-38 и SD16-49 из США (Bauermann F.V. et al., 2022); V.test из Бельгии (Palmeira L. et al., 2011); FMV09 из Канады (Gagnon C.A. et al., 2017); НВ-ZJK из Китая (Guo W. et al., 2023) и SG20 из Японии (Kumagai A. et al., 2024).

Исследования штаммов разных групп выявили важные различия в девяти ORF, а также вариации в длине сегментов прDNA (Palmeira L. et al., 2011). Кроме того, наблюдалась изменчивость среди изолятов из разных регионов и появление новых штаммов (Romeo F. et al., 2024). Биологическая значимость геномных различий, наблюдаемых в двух генотипах ВоНВ-4, остается неизвестной (Bauermann F.V. et al., 2022).

Для более полного понимания патогенеза ВоНВ-4 и установления его роли в возникновении болезней животных необходимо продолжать эпизоотологические и молекулярно-диагностические исследования.

В настоящее время недостаточно сведений о распространении ВоНВ-4 у КРС на территории нашей страны, а изучение генотипов вируса проводилось только в Московской и Тверской областях А.В. Пчельниковым (2024), в результате чего установлена циркуляция среди КРС 1 европейского генотипа ВоНВ-4.

1.4.6 Генетическое разнообразие ВРІV-3

Генетическое секвенирование матричного белка позволило дифференцировать изоляты ВРІV-3 на 3 генотипа (А, В и С) (Horwood P.F. et al., 2008; Zhu Y.M. et al., 2011). Для ВРІV-3 процент идентичности для полного геномного секвенирования обычно колеблется от 91% до 99% внутри генотипов и от 81% до 84% между генотипами (Neill J.D., et al., 2015). Вирулентность изолята и вызываемые клинические симптомы не имеют взаимосвязи с генотипом вируса (Ellis J.A., 2010). Генотип А (ВРІV-3А) был выявлен в популяциях КРС по всему миру, тогда как генотип В (ВРІV-3В) обнаружен в основном в Австралии (Horwood P.F. et al., 2008), а генотип С (ВРІV-3С) обнаружен в Китае, Аргентине,

Турции, Кореи (Zhu Y.M. et al., 2011; Maidana S.S. et al., 2012; Oem J.K. et al., 2013; Konishi M. et al., 2014; Albayrak H. et al., 2019). В настоящее время в Китае было обнаружено три генотипа BPIV-3 (Ren Y. et al., 2014).

В нашей стране А. Гериш (2021) впервые провел филогенетический анализ вакцинного штамма ПТК-45/86 и изолята ЛД-9 вируса ПГ-3 КРС, выделенного от КРС на территории Республики Татарстан. По данным исследователя, изолят относился к генотипу А, а нуклеотидная последовательность участка М гена изолята ЛД-9 показала высокую степень гомологии с последовательностями американского и уругвайского штаммов.

1.5 Заключение по обзору литературы

На основании анализа литературных источников можно сделать вывод, что респираторные болезни КРС широко распространены во многих странах мира, в том числе в РФ. Основными патогенами, вызывающими комплекс респираторных болезней КРС, являются вирус герпеса крупного рогатого скота 1 типа (BoHV-1; *Varicellovirus bovinealpha1*), вирус вирусной диареи крупного рогатого скота (BVDV-1,-2,-3; *Pestivirus bovis*, *Pestivirus tauri*, *Pestivirus brazilense*), респираторно-синцитиальный вирус крупного рогатого скота (BRSV; *Orthopneumovirus bovis*), коронавирус крупного рогатого скота (BCoV; *Betacoronavirus gravedinis*), вирус парагриппа-3 крупного рогатого скота (BPIV-3; *Respirovirus bovis*), вирус герпеса 4 типа крупного рогатого скота (BoHV-4; *Rhadinovirus bovinegamma4*).

Этиология респираторных болезней сложна и часто включает в себя множество агентов, что приводит к сложным взаимодействиям между иммунной системой хозяина и патогенами. Учитывая свою многофакторную природу, болезни респираторного комплекса требуют комплексного подхода для эффективной диагностики и лечения. Точная диагностика необходима для эффективной борьбы с заболеваниями. Тем не менее, правильная идентификация вирусных патогенов остается сложной задачей для ветеринарных специалистов.

В течение последних десятилетий изучение вирусов было расширено за счет разработки ряда молекулярно-генетических методов. В настоящее время доступно множество протоколов для очистки вирусных частиц, амплификации, секвенирования и филогенетического анализа вирусных геномов. В многочисленных возможных комбинациях эти методы предоставляют возможность обнаруживать новые вирусы в клинических образцах, исследовать вирусное разнообразие, оценивать стабильность их геномов (включая обнаружение рекомбинантных и реассортированных геномов) и сложность их популяций, раскрывать закономерности внутри- и межхозяйственной эволюции вирусов, выявлять мутации, обеспечивать безопасность вакцин. Молекулярные методы используются для обнаружения вирусов – контаминантов (таких как BVDV) биологических препаратов.

Изучение генетического разнообразия циркулирующих изолятов вирусов важно для понимания эпидемиологии вируса и разработки успешных мер борьбы с возбудителем, в частности, создания эффективных вакцин и надежных диагностических тестов. Только при наличии знаний классической и молекулярной эпидемиологии вирусов в регионе и/или стране возможно реализовать и оценить эффективность иммунопрофилактических программ против вирусных респираторных инфекций в стадах КРС по всему миру (Leme R.A. et al., 2020).

Перечисленные в литературном обзоре проблемы послужили основанием для обоснования актуальности исследуемой темы, а также формирования целей и задач настоящего исследования.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в 2014-2025 гг. в лаборатории биотехнологии-диагностический центр Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук и в хозяйствах Новосибирской, Томской, Кемеровской, Омской, Тюменской и Иркутской областей, Алтайского и Красноярского краев и Республики Казахстан.

2.1 Материалы и методы исследований

2.1.1 Материалы

Образцы биологического материала

В работе использовали 6964 пробы биологического материала (легкие, слизистые оболочки носа и трахеи, легочные лимфатические узлы, кровь, носовые выделения, бронхиальный и трахеальный экссудат) от больных, павших и вынужденно убитых животных разных возрастных групп с признаками респираторной патологии, 166 проб биологического материала от абортированных плодов и мертворожденных телят (ткани и внутренние органы); 442 пробы - от телят с диареей (внутренние органы, кровь), 4850 парных проб сыворотки крови от КРС разных возрастных групп из 131 животноводческого хозяйства. Также исследовали 13426 проб спермы, полученной в 1985 - 2021 годах от 274 быков-производителей; 30 образцов эмбриональной сыворотки разных серий и производителей.

Оборудование

При проведении научных исследований использовали следующие приборы и оборудование: амплификаторы «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Россия), «БИС-110» (ООО "БИС-Н", Россия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США); генетические анализаторы (секвенаторы) ABI Prism 3130xl DNA analyzer, GeneAmp PCR-system 6700 (Applied Biosystems, США); камера для горизонтального элек-

трофореза «SE-2» (ООО «Хеликон», Россия); источник питания для электрофореза постоянного тока «Эльф-4» (ООО «ДНК-Технология», Россия); трансиллюминатор TSP-20 LM (Viber Lourmat Франция); система геледокументирования «Биотест-1» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия); бокс для ПЦР-диагностики - LS БАВ-ПЦР – «Ламинар-С» («Ламинарные системы», Россия); бокс микробиологической безопасности БМБ –II «Ламинар-С»-1,2 («Ламинарные системы»); ламинарный шкаф Delta II класса биозащиты с УФ-лампой; микроскоп «Аксиоверт 200»; микроцентрифуга-вортекс «Микроспин» FV-2400 (BioSan, Латвия); центрифуга MiniSpin для микропробирок (Eppendorf, Германия); система фотодокументирования «Биотест-Колор» (Россия); Установка для получения очищенной воды «Аквалаб» (Россия); флуориметр «Qubit 2.0» (Invitrogen, США), флуориметр Quantus (Promega, США); аспиратор с сосудом ловушкой FTA-1 с блоком питания для удаления надосадочной жидкости (BioSan, Латвия); холодильники бытовые с холодильной (температурный диапазон от +2 до +8°C) и морозильной (температура не выше - 18°C) камерами; морозильник сверхнизкой температуры до -86°C (Midea, Китай); термостат твердотельный с таймером ТТ-2 «Термит» (Россия); флаконы культуральные с обработанной поверхностью, 25 см², 96-луночные планшеты для клеточных культур (TPP, Швейцария), набор автоматических пипеточных дозаторов с варьируемыми объемами доз («Thermo Labsystems», Eppendorf); одноразовые наконечники Ахуген (США) с аэрозольным барьером для пипеточных механических дозаторов; полипропиленовые пробирки объемом 0,2, 0,5 и 1,5 мл, Ахуген (США); фарфоровые ступки и пестики.

Химические реактивы и наборы реагентов

Химические реактивы производства ООО «Лаборатория Медиген» (Россия): SmartTaq ДНК-полимераза, 5 mM раствор dNTP, 10×буфер для Taq-полимеразы без Mg²⁺, 100 mM раствор MgCl₂, ДНК-маркер 100bp (10 фрагментов: 100-1000 bp).

Химические реактивы производства BIORON GmbH (Германия): SuperHotTaq ДНК-полимераза 5 е.а./мкл, 10×буфер для Taq-полимеразы, 100 mM раствор MgCl₂.

Химические реактивы производства Евроген (Россия): HS Taq ДНК-полимераза 5 е.а./мкл, 10×буфер для Taq-полимеразы, 100 mM раствор $MgCl_2$, dNTP с концентрацией каждого нуклеотида 10 mM.

Химические реактивы производства Sigma-Aldrich (США): агароза, бромистый этидий, трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), Трис-НСl, динатриевая соль этилендиамин-тетрауксусной кислоты (Na_2EDTA), ацетат натрия, диметилсульфоксид, изопропанол, фенол.

Комплекты реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп», «ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора);

Комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК «Реверта-Л» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора);

Для проведения мультиплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени с флуоресцентными зондами одношаговым методом использовали набор реагентов БиоМастер ОТ-ПЦР-РВ (2×) (ООО «Биолабмикс», Россия), содержащий 2× буфер для ОТ-ПЦР-РВ (100 mM Трис-НСl, pH 8.3 (при 25 °C), 150 mM КСl, 0,6 mM каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 8 mM $MgCl_2$, 8 mM ДТТ, стабилизаторы и усилители ферментов) и 25× БиоМастер-микс (50 mM Трис-НСl, pH 8.0 (при 25°C), 100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 5 mM дитиотреитол, 50% (v/v) глицерин и 0.1% (v/v) NP-40, ингибитор РНКаз, M-MuLV –РН ревертаза и HS-Taq ДНК-полимераза).

Набор реагентов Wizard PCR Preps DNA Purification Systems для выделения продуктов амплификации из агарозного геля, производства Promega (США).

Наборы реагентов для проведения секвенирования ДНК, производства Applied Biosystems (США): набор реагентов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits, денатурирующий полимер для секвенирования POP-6, 10×буфер с ЭДТА для проведения капиллярного электрофореза, Hi-Di формамид для растворения образцов перед их нанесением для электрокинетической инъекции.

Олигонуклеотидные праймеры и зонды были синтезированы в ЗАО «Евроген» (Москва) и ИХБФМ СО РАН (Новосибирск).

Культуры клеток

В работе использовали перевиваемые культуры клеток MDBK, КСТ, 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 и изоляты вирусов

- Вирус ИРТ КРС (BoHV-1) - штамм Оренбург;
- Вирус ВД-БС КРС 1 вида (BVDV-1) - штамм Oregon C24V;
- Вирус ВД-БС КРС 2 вида (BVDV-2) – штамм Blagodatsky;
- Вирус РСИ КРС (BRSV) - штамм РСВ №3;
- Вирус КВИ КРС (BCoV) - штамм КМИЭВ-1;
- Вирус герпеса 4 КРС (BoHV-4) - штамм «Movar 33/63»;
- Вирус ПГ-3 КРС (BPIV-3) - штамм SF-4;
- Вирус КЧС (CSFV) – штамм ЛК;
- Аденовирус КРС 1 типа (BAdV-1) – штамм BV-10;
- Риновирус КРС (BRV) – штамм SD-1;
- Вирус болезни Ауески (SuHV-1) – штамм Арский.

Вакцина "Бови-шилд Голд FP5 L5" (Zoetis Inc, США) – первый компонент, содержащий вирусы BoHV-1, BVDV-1, BVDV-2, BRSV и BPIV-3.

Вакцина Кэтлмастер Голд FP5 L5 - первый компонент, содержащий вирусы BoHV-1, BRSV, BPIV-3, и второй компонент, содержащий - штаммы лептоспир и вирусы BVDV-1 и BVDV-2.

Питательные среды для вирусологических исследований

Питательная среда Игла MEM жидкая, с L-глутамином, стерильная (ООО «Биолот», Россия);

Раствор Версена 0,02%, стерильный (ООО «Биолот», Россия);

Сыворотка эмбриональная бычья жидкая, стерильная, Premium, BioWest (Франция);

Химопсин, лиофилизированный, стерильный, для культур клеток.

Питательные среды для микробиологических исследований

Для выделения и культивирования бактерий использовали ГРМ-агар, кровяной мясопептонный агар (КМПА), шоколадный агар, триптон-соевый бульон, агар Мак-Конки-ГРМ, бульон Хоттингера, агар Эндо-ГРМ, Висмут-сульфит-ГРМ агар, Агар Плоскирева-ГРМ ФБУН ГНЦ ПМБ (г. Оболенск).

2.1.2 Методы

Отбор проб биологического материала и подготовка для исследования

Пробы внутренних органов и тканей размером 2 см³ от животных отбирали не позднее 2 часов после их гибели или вынужденного убоя. От больных животных с помощью ватных тампонов отбирали пробы носовых, глазных, вагинальных и маточных выделений. Пробы биоматериала сразу помещали в стерильные пенициллиновые флаконы или специальные стерильные контейнеры. Материал для исследований транспортировали в лабораторию в замороженном или охлажденном виде в герметично закрытых термоконтейнерах или термосах с хладоагентами. Пробы спермы от быков-производителей помещали в сосуд Дьюара с жидким азотом и транспортировали в лабораторию. Отобранный материал не подвергали повторному размораживанию/замораживанию.

Пробы органов и тканей гомогенизировали с помощью ступок и пестиков и готовили 10%-ную суспензию на стерильном физиологическом растворе, центрифугировали при 5000 об/мин и использовали по 100 мкл осветленного супернатанта для выделения нуклеиновых кислот. Пробы спермы предварительно разводили стерильным физиологическим раствором в соотношении 1:3, перемешивали на вортексе и использовали для выделения ДНК. Для экстракции РНК/ДНК кровь и сыворотку крови использовали без предварительной подготовки.

Выделение нуклеиновых кислот и обратная транскрипция

Выделение нуклеиновых кислот проводили с использованием наборов «Рибо-преп», «ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) согласно инструкциям производителя. Очищенную РНК ресуспендировали в 50 мкл РНК-буфера.

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора реагентов «Реверта-Л» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) в соответствии с инструкцией производителя.

Культивирование культур клеток

Для культивирования культур клеток использовали полистироловые культуральные флаконы и 96-луночные планшеты для клеточных культур (TPP, Швейцария). Поддерживали оптимальный температурный режим 37°C без атмосферы CO₂. Выращивание монослоя проводилось на питательной среде Игла MEM (ООО Биолот, Россия) с добавлением 5-10 % эмбриональной сыворотки крови телят (Fetal Bovine Serum, BioWest, Франция), тестированной на наличие вирусов ВД-БС и ИРТ КРС и антител к ним. При выращивании культур клеток использовали 0,01% раствор химопсина в 0,02% растворе Версена (производство ООО «БиолоТ»).

В зависимости от скорости формирования монослоя один раз в 2-3 дня осуществлялся пересев культуры клеток путем удаления ростовой питательной среды и двукратного отмывания клеточного монослоя 0,02% раствором Версена. Для окончательного снятия монослоя с субстрата во флакон вносили раствор трипсина-ЭДТА (Панэко, Россия) с последующей инкубацией в термостате при 37°C в течение 5 минут. После отделения клеток от субстрата в культуральный флакон вносили ростовую питательную среду и проводили пересев клеток в соотношении 1:3-1:4.

Выделение вирусов в культурах клеток

Для выделения вирусов BoHV-1, BVDV, BoHV-4, BRSV из исследуемых проб биоматериала (кусочки проб внутренних органов) готовили 10% суспензию на стерильном фосфатно-буферном растворе, pH 7,4-7,6. После добавления антибиотиков (100 ед./мл канамицина и 500 ед./мл гентамицина) суспензию выдерживали при 4°C в течение 2-3 часов. Центрифугировали 30 минут при 3000 об/мин, отбирали надосадочную жидкость для вирусыведения. Флаконы со сформированным монослоем культуры клеток отмывали поддерживающей средой Игла MEM и вносили по 0,2-0,3 мл надосадочной жидкости, выдерживали их в термо-

стате при 37°C в течение 60 минут, затем из них удаляли испытуемый материал и добавляли поддерживающую питательную среду. Зараженные и контрольные флаконы с культурой клеток инкубировали при 37°C до 7 суток, ежедневно просматривая их под инвертированным микроскопом с целью выявления ЦПД.

Идентификацию выделенных агентов проводили в реакции нейтрализации при помощи моноспецифических сывороток к референтным штаммам Оренбург, Oregon C24V, Movar 33/63 и РСВ №3. Индекс нейтрализации, равный 2 lg ТЦД_{50/мл} и выше свидетельствовал о принадлежности изолятов к вирусам ВоНV-1, ВVDV, ВоНV-4 или BRSV, соответственно.

Определение инфекционной активности (титра) вируса

Инфекционную активность вируса определяли титрованием по методу Рида и Менча. Культуру клеток MDBK засеивали в 96-луночные культуральные планшеты (ТТР, Швейцария) и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение суток. Суточный монослой отмывали от ростовой среды и готовили последовательные десятикратные разведения вирусосодержащего материала, прошедшего три цикла замораживания-оттаивания, в поддерживающей питательной среде Игла MEM от 10⁻¹ до 10⁻⁷. Все пробы исследовали в 4 повторях. Отрицательный контроль – лунки со средой Игла MEM.

Планшеты после заражения инкубировали в условиях термостата при 37°C в атмосфере 5% CO₂. На 3-5 сутки после заражения проводили учет ЦПД вируса визуально под малым увеличением инвертированного микроскопа. Положительным результатом считали поражение монослоя от 30% общей площади лунки до полного отслоения клеток от субстрата. По результатам оценки состояния монослоя в зараженных и контрольных лунках составляли кумулятивную таблицу.

Окончательный расчет проводили по формуле Рида и Менча:

$$\lg \text{ТЦД}_{50/\text{мл}} = \lg B - (b - 50 / b - a) \times \lg d, \text{ где:}$$

B – доза, дающая эффект более 50%;

A – доза, дающая эффект менее 50%;

b, a – эффект дозы соответственно B и A, %;

d – интервал между двумя соседними дозами.

Подбор праймеров и зондов для ПЦР

Поиск последовательностей олигонуклеотидных праймеров и зондов осуществляли на основе анализа полных геномов вирусов ВоНV-1, ВVDV-1 ВVDV-2, ВVDV-3, BRSV, ВоНV-4, ВCoV, ВPIV-3, представленных в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/GenBankSearch.html>), при помощи пакета программного обеспечения «Lasergen». Полученные последовательности нескольких пар праймеров дополнительно тестировали на специфичность с помощью моделирования ПЦР в программе “Vector NTI Suite” с последовательностями геномов представителей семейств вирусов и из базы данных GenBank.

Окончательный выбор праймеров и зондов основывался на следующих критериях: высокий индекс сходства фрагмента и ДНК различных штаммов вирусов, высокая температура отжига (GC- метод), большая длина консенсусов, отсутствие гетеродуплексов. Химический синтез праймеров осуществляли амидофосфитным методом на автоматическом синтезаторе ASM-102U. Концентрацию в маточном растворе определяли спектрометрическим методом.

Постановка ПЦР

Полимеразную цепную реакцию проводили в 25 или 30 мкл реакционной смеси, содержащей 10-кратный ПЦР буфер для ДНК-полимеразы (в соответствии с рекомендацией производителя), 1,5-3,3 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTP, 0,1-0,15 мМ каждого праймера, 1,5-2,5 е.а. SuperHotTaq ДНК-полимеразы. В смесь добавляли 5 мкл выделенной ДНК или кДНК.

При постановке реакции амплификации с детекцией продуктов в режиме реального времени в смесь добавляли 0,1-0,15 мМ зондов.

Подробные методики исследований приведены по мере изложения материалов собственных исследований в соответствующих подразделах.

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

В каждой реакции использовали контрольные образцы: отрицательный контроль выделения РНК или ДНК, отрицательные и положительные контроли ПЦР.

Для оценки эффективности экстракции нуклеиновых кислот из образцов материала использовали внутренние контрольные образцы (ВКО).

Электрофоретический анализ продуктов ПЦР

Аmplицированные ДНК-фрагменты разделяли в 2% агарозном геле в присутствии бромистого этидия в стандартном трис-боратном буфере при напряжении 10 В/см. Результаты электрофореза учитывали, просматривая гель в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на трансиллюминаторе ТСП-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). После амплификации реакционную смесь очищали от невключившихся флуоресцентно меченных нуклеотидов очисткой на сефадексе G-50 superfine. Сравнивали установленные нуклеотидные последовательности с представленными в базе данных GenBank с использованием поисковой системы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

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. (Kumar S. et al., 2016). Топологию ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (1000 шагов репликации) (Felsenstein J., 1985). Для построения деревьев использовали модель General Time Reversible (GTR), гамма-распределение вариации частот между сайтами (G + I).

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 соответствующих детектируемых участков геномов каждого возбудителя, и использовали их для контроля амплификации отдельно для каждого анализа. Для подтверждения специфичности полученных фрагментов определяли их нуклеотидную последовательность, для чего использовали набор реагентов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, США). Продукты секвенирующей реакции анализировали методом капиллярного электрофореза в автоматическом секвенаторе ABI PRISM® 3130xl (Applied Biosystems/Hitachi, Япония). Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями базы данных NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Все фрагменты ДНК, необходимые для получения ПКО, являлись целевыми и соответствовали участкам геномов анализируемых возбудителей. Концентрацию плазмидной ДНК определяли с использованием набора реагентов Quant-iT dsDNA, HS (Invitrogen, США) и флуориметра QUBIT (Invitrogen, США).

Положительные контрольные образцы были получены в результате клонирования синтезированных ДНК-фрагментов, несущих вирусоспецифическую вставку, в плазмиду pCR2.1 (Invitrogen, США) с использованием для трансформации клеток *Escherichia coli* линии TOP 10 (Invitrogen).

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 генома BVDV-3 методом ПЦР с электрофоретической детекцией

BVDV-3 первоначально был идентифицирован как контаминант эмбриональной сыворотки КРС бразильского происхождения (Schirrmeier H. et al., 2004) и впоследствии был связан с различными клиническими проявлениями у КРС в Южной Америке и других странах (Cortez A. et al., 2006). Существующие на момент исследования тест-системы на основе ПЦР выявляли только геномы вирусов ВД-БС КРС 1 и 2 видов. Поэтому нашей задачей было разработать тест-систему ПЦР для выявления генома BVDV-3 и изучить его возможную циркуляцию в молочных хозяйствах Сибири.

Для выбора праймеров с использованием программы ClustalW были проанализированы нуклеотидные последовательности BVDV трех видов, опубликованных в GenBank: штаммы BVDV-1 — NADL (AJ133738.1), Singer (DQ088995.1), Osloss (M96687.1), PT-810 (AY078406.1), BVDV-2 — US890 (Z79772.1), Giessen-6 (AY379547.1), BVDV-3 — D32/00_'HoBi' (AY489116.1), Th/04_KhonKaen (NC_012812), SVA/cont-08 (FJ232692.1) и IZSPLV_To (HM151361.1). Для BVDV-3 были найдены несколько видоспецифичных районов, внутри каждого из них с помощью программы Oligo v.6.31 были подобраны три пары олигонуклеотидных праймеров, обеспечивающие специфическую амплификацию РНК вируса, с позициями по гену NS5A 182-199 и 534-553, 535-554 и 791-810 и 9202-9218 и 9501-9521.

Окончательный выбор праймеров основывался на следующих критериях: высокий индекс сходства фрагмента и РНК различных штаммов BVDV-3, высокая температура отжига (GC- метод), большая длина консенсусов, отсутствие гетеродуплексов. Химический синтез праймеров осуществляли амидофосфитным методом на автоматическом синтезаторе ASM-102U («Biosset», Россия). Их концентрацию в маточном растворе определяли спектрометрически.

В результате предварительных испытаний из трех пар праймеров наилучшие результаты показали праймеры, комплементарные позициям 9202-9218 и 9501-9521 гена NS5A прототипного штамма D32/00_ 'HoBi' (AB871953.1), поэтому их использовали в дальнейшей работе (таблица 1).

Таблица 1 – Олигонуклеотидные праймеры для амплификации генома BVDV-3

Название	Олигонуклеотиды	Размер ампликона
SEQ ID NO:1	5'-TTTGCAGCCGAGCGTAG-3'	320 п.н.
SEQ ID NO:2	5'-CCTCCTGCATACTGTACACCTT-3'	

Условия проведения амплификации оптимизировали по следующим параметрам: концентрация ионов магния в реакционной смеси; концентрация праймеров в реакционной смеси; температура отжига праймеров.

Оптимизированный состав реакционной смеси включал следующие компоненты: 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 представлен в таблице 2.

Ввиду отсутствия штаммов и изолятов BVDV-3 в коллекции лаборатории, положительные контрольные образцы (ПКО) были получены методом молекулярной трансформации бактерии *Escherichia coli* плазмидой pDrive, содержащей специфические ДНК-вставки. Концентрация плазмидной ДНК, определенная при помощи набора реагентов Quant-iTdsDNA, HS («Invitrogen», США) на флуори-

метре QUBIT («Invitrogen», США), составила 0,333 мкг/мкл, что соответствует $7,4 \times 10^{10}$ копий/мкл.

Таблица 2 – Программа для амплификации фрагмента генома BVDV-3

Температура	Время	Количество циклов
95 ⁰ С	5 мин	1
95 ⁰ С	45 сек	40
60 ⁰ С	45 сек	
72 ⁰ С	1 мин	
72 ⁰ С	5 мин	1

Для определения специфичности набора олигонуклеотидов для идентификации генома BVDV-3 проводили ПЦР с генетическим материалом близкородственных вирусов BVDV1 (штамм Oregon C24V), BVDV2 (штамм Blagodatsky), а также классической чумы свиней (штамм ЛК), BRSV (штамм РСВ №3), ВоHV-1 (штамм Оренбург), аденовируса КРС 1 типа (штамм BV-10), риновируса КРС 1 типа (штамм SD-1) из коллекции СФНЦА РАН и культуры клеток КСТ (таблица 3).

Таблица 3 – Определение специфичности ПЦР для выявления генома BVDV-3

№ п/п	Наименование образца	Штамм/изолят	Результат реакции
1	ПКО BVDV-3		+
2	BVDV-1	Oregon C24V	-
3	BVDV-2	Blagodatsky	-
4	CSFV	ЛК	-
5	BRSV	РСВ № 3	-
6	ВоHV-1	Оренбург	-
7	BAdV-1	BV-10	-
8	BRV	SD-1	-
9	Культура клеток КСТ		-

Примечание: «+» - положительный результат;
«-» - отрицательный результат.

В результате определения специфичности установили, что ПЦР выявляла только кДНК положительного контроля BVDV-3, геномы других вирусов не были выявлены. Анализ проводили в нескольких повторах, неспецифические реакции не были выявлены ни в одном случае.

Для оценки чувствительности реакции готовили последовательные десятикратные разведения образца ПКО, которые исследовали в ПЦР. За аналитическую чувствительность принимали последнее разведение ПКО, с которым результат ПЦР-анализа интерпретировался как положительный. Опыт проводили в трех повторях с ПКО в концентрациях от $7,4 \times 10^{10}$ до $7,4 \times 10^{-1}$. Чувствительность ПЦР составила $7,4 \times 10^1$ копий/мкл.

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

Геном BVDV-3 был выявлен в 7 сериях эмбриональной сыворотки от двух производителей из Южной Америки (рисунок 1). В пробах биоматериала (внутренние органы и сыворотки крови) от животных BVDV-3 не был выявлен.

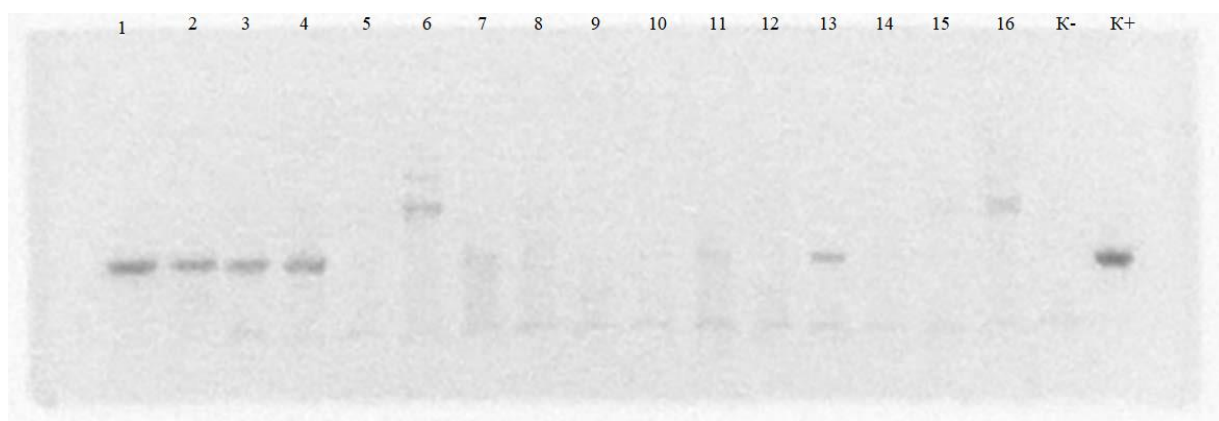


Рисунок 1 – Результаты электрофореза продуктов амплификации BVDV-3: К- - отрицательный контроль ПЦР, К+ - положительный контроль ПЦР, №№1 – 16 – исследуемые пробы эмбриональной сыворотки

Для подтверждения специфичности полученных фрагментов провели их секвенирование. Расшифровку первичных данных хроматограмм проводили с помощью программы Sequencher v. 4.0.5 (Gene Codes Corporation, США). Анализ нуклеотидных последовательностей синтезируемых фрагментов проводили мето-

дами выравнивания с опубликованными последовательностями других штаммов BVDV-3 (в частности, BVDV3_D32/00 и BVDV3_Th/04_Khonkaen) с помощью программы ClustalW (Thompson J.D. et al., 1994).

По результатам филогенетического анализа, все изученные положительные образцы эмбриональной сыворотки группировались со штаммом D32/00_'HoBi' (бразильская группа) (рисунок 2).

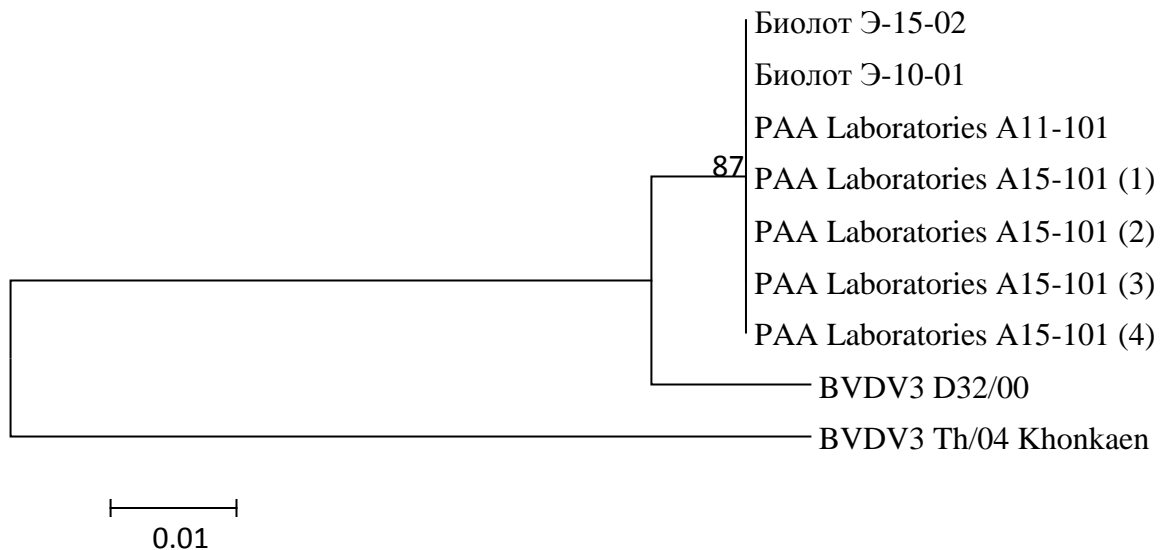


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево, построенное без укоренения методом Neighbor Joining с использованием модели Кимуры в программе MEGA v.4. В узлах ветви показан коэффициент поддержки бутстрэп-теста. Пробы PAA Laboratories A15-101 (1-4) взяты из разных партий эмбриональной сыворотки

В результате проведенных исследований разработана тест-система на основе ПЦР с электрофоретической детекцией результата, позволяющая выявлять ген BVDV-3 в биологическом материале и биологических препаратах.

Получен патент Российской Федерации на изобретение от 28.12.2022 № RU 2607025 C1 (приложение А).

2.2.1.2 Тест-система для выявления и дифференциации пестивирусов крупного рогатого скота (BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3) методом ПЦР в режиме реального времени

В нашей стране установлено широкое распространение BVDV-1, BVDV-2, а также нами выявлены факты контаминации эмбриональных сывороток КРС BVDV-3, и не исключена циркуляция этого вида пестивируса среди КРС. В связи с этим возникла необходимость в разработке мультиплексной ПЦР в режиме реального времени для быстрого одновременного выявления и дифференциации пестивирусов КРС трех видов. В качестве мишени была выбрана нетранслируемая область 5'-UTR, поскольку она обладает высокой консервативностью внутри каждого вида BVDV.

Для выбора праймеров провели анализ нуклеотидных последовательностей 5'-UTR области геномов всех видов рода Pestivirus из базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и определили наиболее консервативные участки, специфичные для всех видов, а также специфичные для каждого вида в отдельности. Анализ свойств олигонуклеотидных праймеров проводили с использованием программы Vector NTI 9.0.0 (InforMax). Характеристика выбранных праймеров представлена в таблице 4.

Отработку температуры отжига праймеров и условий проведения амплификации проводили экспериментальным путем.

Состав реакционной смеси включал следующие компоненты: 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 0,2 мкг каждого праймера, по 0,1 мкг каждого зонда, 1.25 U Taq-ДНК - полимеразы, 5 мкл кДНК.

ПЦР проводили в два раунда. В первом раунде выявляли все три вида BVDV, во втором – проводили дифференциацию видов пестивирусов. Температурный режим ПЦР приведен в таблице 5.

Таблица 4 – Олигонуклеотидные праймеры и зонды для выявления и дифференциации пестивирусов крупного рогатого скота

Мишень	Название праймера	Последовательность	Размер ампликона, п.н.
Олигонуклеотиды для I реакции			
BVDV	PV _{spp} F	5-CCATRCCCTTAGTAGGACKAGC-3	286–289
	PV _{spp} R	5- TCAACTCCATGTGCCATGTAC-3	
	PV _{spp} Z	5-(FAM) CTCGAGATGCCAYGTGGACGAGG(BHQ1)-3	
Олигонуклеотиды для II реакции			
BVDV-1	PVA F	5-GGTAGCAACAGTGGTGAGTT-3	105
	PVA R	5-CGTCCACGTGGCATCTC-3	
	PVA Z	5-(FAM) TAGTCGTCAGTGGTTCGACGCCT (BHQ1)-3	
BVDV-2	PVB F	5-CTAGCGATGCCCTTAGTAG-3	106-108
	PVB R	5-CGTCGAAGCATTGACGACT-3	
	PVB Z	5-(FAM) TAGCGGTAGCAGTGAGTTCATTGGATGGCC (BHQ1)-3	
BVDV-3	PV _{sp} F	5-CCATRCCCTTAGTAGGACKAGC-3	110
	PVH R	5-TCCTTGATGCGTCGAACCA-3	
	PVH Z	5-(FAM) TAGTGGTAGCAGTGAGCTCCTTGGAT (BHQ1)-3	

Таблица 5 – Температурный режим ПЦР для выявления и дифференциации пестивирусов КРС

Температура	Время	Количество циклов
1 раунд		
95°C	5 мин	1
95°C	10 сек	45
57°C	15 сек	
72°C	30 сек	
2 раунд		
95°C	5 мин	1
95°C	10 сек	45
55°C	15 сек	
72°C	30 сек	

Измерение флуоресценции осуществляли при температуре 55°C (для первого раунда) или 57°C (для второго раунда) на канале FAM. Положительными считали образцы со значением Ct <40.

Положительные контрольные образцы (ПКО) получали методом молекулярной трансформации компетентных бактериальных клеток *Escherichia coli* плазмидой pDrive, содержащей специфические ДНК-вставки, и использовали их для контроля амплификации отдельно для каждого анализа. Концентрацию плазмидной ДНК определяли с использованием набора реагентов Quant-iT dsDNA, HS (Invitrogen, США) и флуориметра QUBIT (Invitrogen, США).

Для определения аналитической чувствительности готовили десятикратные разведения положительных контролей. Исследования проводили в трех повторах.

Результаты определения аналитической чувствительности реакции с ПКО трех видов пестивирусов представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Определение аналитической чувствительности ПЦР в реальном времени для выявления и дифференциации пестивирусов крупного рогатого скота при исследовании положительных контрольных образцов

Положительные контрольные образцы	Аналитическая чувствительность, копий/мкл	Значение Ct в последнем разведении, детектируемом положительно (среднее значение Ct \pm SD)	Коэффициент вариации, %
BVDV	32	37,83 \pm 0,12	1,48
BVDV-1	15	38,29 \pm 0,55	1,91
BVDV-2	18	35,38 \pm 0,32	1,63
BVDV-3	3 \times 10 ²	35,55 \pm 0,46	1,31

Таким образом, аналитическая чувствительность ОТ-ПЦР в режиме реального времени для BVDV spp. составила 32 копии/мкл, BVDV-1 - 15 копий/мкл, BVDV-2 - 18 копий/мкл, BVDV-3 - 3 \times 10² копий/мкл. Стандартные отклонения значений пороговых циклов варьировали от 0,12 до 0,55. Средние коэффициенты вариаций значений пороговых циклов при повторных исследованиях не превышали 1,91%, что свидетельствует о высокой повторяемости результатов определения аналитической чувствительности ОТ-ПЦР.

Для определения диагностической чувствительности реакции исследовали в ПЦР десятикратные разведения референтных штаммов BVDV-1 и BVDV-2 с титрами инфекционной активности $6,2 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и $5,6 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно. Все исследования проводили в трех повторах. Диагностическую чувствительность реакции со штаммами BVDV-3 не определяли по причине их отсутствия в нашей коллекции. Данные по определению диагностической чувствительности приведены в таблице 7 и на рисунке 3.

Таблица 7 – Определение диагностической чувствительности ПЦР в реальном времени для выявления и дифференциации пестивирусов крупного рогатого скота при исследовании штаммов BVDV-1 и BVDV-2

Выявление BVDV-1		
Штамм Oregon C24V, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$	Значение порогового цикла при различных концентрациях вируса (среднее Ct \pm SD)	
	BVDV	BVDV-1
6,2	20,92 \pm 0,30	19,47 \pm 0,46
5,2	23,82 \pm 0,20	22,26 \pm 0,58
4,2	27,70 \pm 0,12	26,45 \pm 0,46
3,2	30,99 \pm 0,86	29,44 \pm 0,37
2,2	33,84 \pm 0,66	32,71 \pm 0,32
1,2	37,84 \pm 0,66	35,76 \pm 0,31
0,2	Отрицательно	Отрицательно
Выявление BVDV-2		
Штамм Blagodatsky, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$	Значение порогового цикла при различных концентрациях вируса (среднее Ct \pm SD)	
	BVDV	BVDV-2
5,6	22,20 \pm 0,20	18,12 \pm 0,46
4,6	26,07 \pm 0,13	22,36 \pm 0,86
3,6	29,12 \pm 0,62	24,39 \pm 0,44
2,6	32,11 \pm 0,85	28,94 \pm 0,69
1,6	35,53 \pm 0,32	33,79 \pm 0,55
0,6	39,53 \pm 0,32	38,76 \pm 0,87
0,06	Отрицательно	Отрицательно

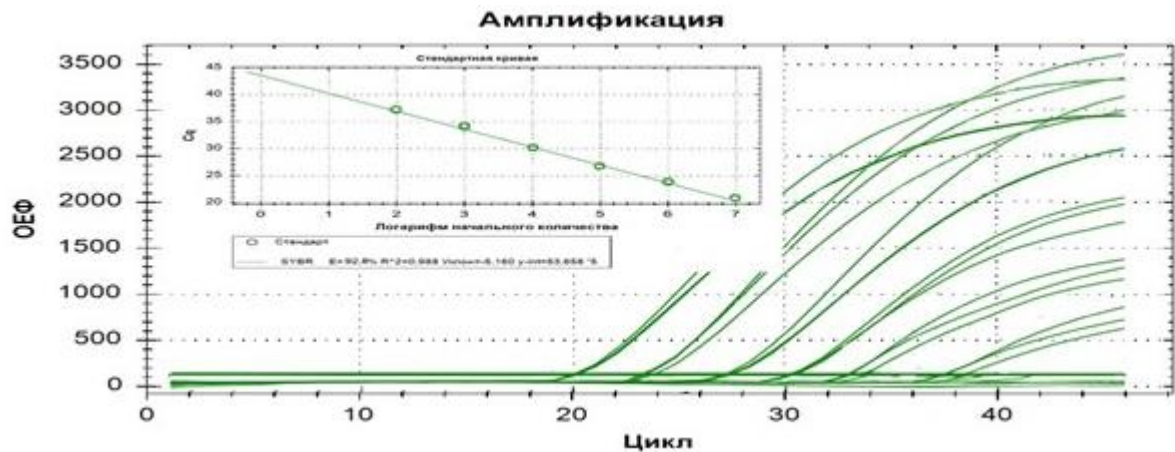


Рисунок 3 – Результаты исследования десятикратных разведений штамма Oregon C24V с общими праймерами и зондом *Pestivirus spp.*

Результаты показали, что минимальный титр штамма Oregon C24V (BVDV-1), выявляемый в реакции, равен $1,2 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, а штамма Blagodatsky (BVDV-2) – $0,6 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Для определения специфичности разработанной реакции проводили ПЦР с генетическим материалом гомологичных и гетерологичных вирусов, культурой клеток КСТ, эмбриональной сывороткой КРС и сывороткой крови свиней.

По результатам исследования разработанная ПЦР выявляла только геномы пестивирусов крупного рогатого скота трех видов, а генетический материал других вирусов - нет (таблица 8). Таким образом, ПЦР в реальном времени для выявления и дифференциации пестивирусов КРС обладает высокой чувствительностью и специфичностью.

С помощью разработанной ПЦР в реальном времени и ПЦР с электрофоретической детекцией результата параллельно исследовано 18 образцов коммерческой эмбриональной сыворотки КРС, 870 проб сыворотки крови, 389 проб внутренних органов от телят с респираторными болезнями, 23 пробы от абортированных плодов, 74 пробы от коров с гинекологическими патологиями (таблица 9). Для идентификации генома BVDV-1 и BVDV-2 использовали праймеры S. Vilcek et al. (1994), а BVDV-3 – описанные в предыдущей главе.

Таблица 8 – Определение специфичности ПЦР в реальном времени для выявления и дифференциации пестивирусов крупного рогатого скота

Наименование образца	Штамм/изолят	Результат			
		BVDV	BVDV-1	BVDV-2	BVDV-3
ПКО BVDV		+	+	+	+
ПКО BVDV-1		+	+	-	-
ПКО BVDV-2		+	-	+	-
ПКО BVDV-3		+	-	-	+
BVDV-1	Oregon C24V	+	+	-	-
BVDV-2	Blagodatsky	+	-	+	-
CSFV	ЛК	-	-	-	-
BoHV-1	Оренбург	-	-	-	-
BRSV	РСВ № 3	-	-	-	-
BAdV-1	BV-10	-	-	-	-
BRV	SD-1	-	-	-	-
BoHV-4	Movar 33/63	-	-	-	-
BPIV-3	SF-4	-	-	-	-
Культура клеток КСТ		-	-	-	-
Эмбриональная сыворотка КРС		-	-	-	-
Сыворотка крови свиней		-	-	-	-

Таблица 9 – Результаты сравнительного исследования биоматериала с помощью ПЦР в реальном времени для выявления и дифференциации пестивирусов крупного рогатого скота и ПЦР с электрофоретической детекцией

Вид биоматериала	Всего исследовано проб	Результат исследования, количество положительных проб				
		ПЦР с электрофоретической детекцией	ПЦР-РВ			
			Pestivirus spp.	BVDV-1	BVDV-2	BVDV-3
Эмбриональная сыворотка КРС	18	7	7	-	-	7
Сыворотка крови телят	870	4	4	4	-	-
Пробы органов от телят с респираторными патологиями	389	47	47	47	-	-
Пробы органов от коров с гинекологическими патологиями	74	18	18	16	2	-
Абортированные плоды	23	7	7	6	1	-
Итого	1374	83	83	73	3	7

Согласно данным таблицы 9, при исследовании проб биоматериала ПЦР в реальном времени и ПЦР с электрофоретической детекцией выявлено одинаковое количество проб, содержащих геном вируса вирусной диареи КРС. BVDV-1 присутствовал в 73 пробах, BVDV-2 – в 3, BVDV-3 – в 7 образцах коммерческой эмбриональной сыворотки.

Таким образом, разработанная ПЦР в реальном времени обладает высокой чувствительностью, специфичностью и позволяет выявлять и идентифицировать три вида пестивирусов КРС в пробах биологического материала.

Получен патент Российской Федерации на изобретение от 08.09.2020 № RU 2731716 С1 (приложение А).

2.2.1.3 Тест-система для выявления и количественного определения вируса респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота методом ПЦР в режиме реального времени

Респираторно-синцитиальный вирус (*Orthopneumovirus bovis*, BRSV) является одним из основных респираторных патогенов у КРС во всем мире. Респираторно-синцитиальная инфекция (РСИ) наиболее тяжело протекает у телят в возрасте до 6 месяцев и у неиммунных и ослабленных животных.

Выделение вируса в культуре клеток – классический метод диагностики РСИ КРС, провести его возможно только на ранней стадии инфекции. Трудности метода связаны с высокой степенью лабильности вируса, длительностью его проведения до одного и более месяцев и трудоемкостью. ОТ-ПЦР – быстрый, специфичный и чувствительный метод диагностики РСИ КРС (Voxus M. et al., 2005), широко применяемый в настоящее время. Мишенями для амплификации являются участки генов, кодирующих протеины F, G или N вируса. С помощью количественной ПЦР возможно определить концентрацию возбудителей, с трудом размножающихся в культурах клеток или легко разрушающихся.

Ранее нами была разработана ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией результата для выявления генома BRSV (Патент № 2405039). Недостатком данного способа является невозможность количественной оценки вируса.

Целью данного раздела была разработка ОТ-ПЦР с использованием гибридационно-флуоресцентной детекции в режиме реального времени, позволяющей выявлять геном BRSV и определять его концентрацию в образцах проб биологического материала от больных животных.

В качестве мишени использовали один из наиболее консервативных генов – ген оболочечного гликопротеина N вируса, а в качестве гена сравнения и контроля ПЦР – мРНК гена GAPDH.

Подбор олигонуклеотидных праймеров и зондов проводили на основе нуклеотидных последовательностей штаммов вируса BRSV, представленных в базе данных GenBank ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/GenBankSearch.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/GenBankSearch.html)), при помощи пакета программного обеспечения «Lasergen».

В качестве внутреннего контроля использовали праймеры и зонды к мРНК гена GAPDH KPC, разработанные H. Zhao et al. (2016).

Характеристики выбранных праймеров и зондов представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Олигонуклеотидные праймеры и зонды для выявления BRSV и гена GAPDH KPC

Мишень	Название праймеров	Последовательность	Размер, п.н.
Выявление BRSV			
gN	SEQ ID NO:1	5-ATGCTGCAGGACTAGGTATAATGG-3	120
	SEQ ID NO:2	5-ACACTGTAATTGATGACCCCATTTCTC-3	
	SEQ ID NO:3	5-(FAM) ATGCTGCCAAAGCATATGCGGAACACA- 3(BHQ1)	
Выявление гена GAPDH KPC			
GAPDH	SEQ ID NO:4	5-GATGGTGAAGGTTCGGAGTGAAC-3	100
	SEQ ID NO:5	5-GTCATTGATGGCGACGATGT-3	
	SEQ ID NO:6	5-(ROX)-CTGGTCACCAGGGCTGCTT- 3(BHQ2)	

Оптимизированный состав реакционной смеси включал следующие компоненты: 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 0,2 мкг каждого праймера, по 0,1 мкг каждого зонда, 1.25 U Taq-ДНК-полимеразы, 5 мкл кДНК.

Температурный режим проведения ПЦР приведен в таблице 11.

Таблица 11 – Программа для амплификации фрагментов генов BRSV и GAPDH КРС

Температура	Время	Количество циклов
95°C	5 мин	1
95°C	15 сек	45
60°C	1 мин	

Измерение флуоресценции осуществляли при температуре 60°C на каналах FAM (для BRSV) и Texas Red (для гена GAPDH КРС). Положительными считали образцы с пороговым значением Ct < 37.

Для оценки специфичности реакции исследовали РНК вирусов BVDV-1, BVDV-2, BoHV-1, BoHV-4, BoCV, риновирус (BRV), аденовирус (BAdV) и вирус парагриппа-3 (BPIV-3).

Из данных таблицы 12 видно, что положительный результат был получен только с РНК штамма и изолятов BRSV и отсутствовал с РНК других вирусов, что подтверждает высокую специфичность реакции.

Положительные контрольные образцы были получены в результате клонирования синтезированных ДНК-фрагментов, несущих вирусоспецифическую вставку, в плазмиду pCR2.1 (Invitrogen, США) с использованием для трансформации клеток *Escherichia coli* линии TOP 10 (Invitrogen).

Таблица 12 – Оценка специфичности ОТ-ПЦР для выявления BRSV

Штамм вируса	Результат ПЦР
BRSV (PCB №3)	+
BRSV (изолят «К-18»)	+
BRSV (изолят «Ишим»)	+
BVDV-1 (Oregon C24V)	-
BVDV-2 (Blagodatsky)	-
BoHV-1 (Оренбург)	-
BoHV-4 (Movar-33/63)	-
BCoV (КМИЭВ-1)	-
BRV (SD-1)	-
BAdV-1 (BV-10)	-
BPIV-3 (SF-4)	-

Примечание: «+»- положительный результат; «-» - отрицательный результат

Для определения аналитической чувствительности реакции готовили последовательные десятикратные разведения ПКО. Исследование проводили в трех повторях (рисунок 4, таблица 13).

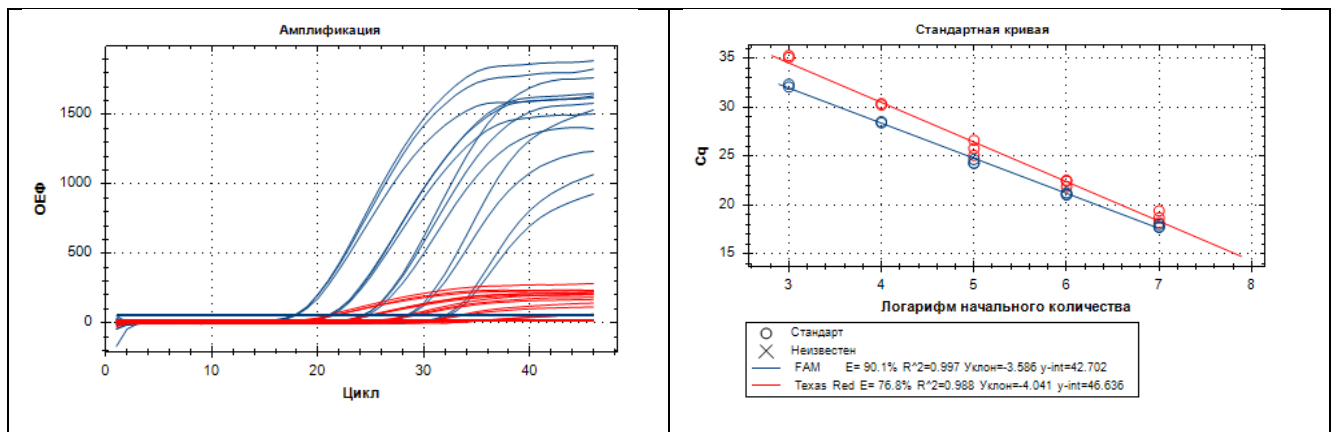


Рисунок 4 – Графики определения аналитической чувствительности и эффективности ПЦР-РВ для выявления BRSV (линии синего цвета; концентрации от $2,5 \times 10^4$ до $2,5 \times 10^0$ копий/мкл) и гена GAPDH КРС (линии красного цвета; концентрации от $1,2 \times 10^4$ до $1,2 \times 10^0$ копий/мкл)

Таблица 13 – Определение аналитической чувствительности и эффективности ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления BRSV и GAPDH

ПКО	Показатель	Концентрации ПКО BRSV, копий/мкл				
		$2,5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^3$	$2,5 \times 10^2$	$2,5 \times 10^1$	$2,5 \times 10^0$
BRSV	Среднее Ct \pm SD	18,92 \pm 0,30	22,82 \pm 0,20	24,70 \pm 0,12	28,99 \pm 0,86	33,84 \pm 0,66
	Коэффициент вариаций, %	1,60	0,86	0,49	0,32	0,65
ПКО	Показатель	Концентрации ПКО GAPDH, копий/мкл				
		$1,2 \times 10^4$	$1,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$	$1,2 \times 10^1$	$1,2 \times 10^0$
GAPDH	Среднее Ct \pm SD	22,26 \pm 0,58	26,45 \pm 0,46	29,44 \pm 0,32	32,71 \pm 0,37	35,76 \pm 0,31
	Коэффициент вариаций, %	2,61	1,75	1,07	1,13	0,87

Чувствительность реакции 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 «РСВ №3» с заранее определенной концентрацией, равной $3,5 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$, была оценена эффективность реакции для количественной оценки концентрации вирусной РНК. Для этого приготовили 7 последовательных 10-кратных разведений вируса, из которых выделили РНК и исследовали в ПЦР, а ее результаты сопоставили с данными кривой разведений ПКО. Предел чувствительности реакции составил $10^{0,5} \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$, что соответствовало $3 \lg \text{ПКО}/\text{см}^3$.

С использованием разработанной ПЦР исследовали 273 пробы биоматериала от животных (таблица 14). Для сравнения диагностической эффективности параллельно проводили исследование этих проб с использованием тест-системы с электрофоретической детекцией амплифицированного фрагмента на ген гликопротеина F BRSV, разработанной нами ранее (Патент № 2405039).

Таблица 14 – Результаты выявления и определения концентрации BRSV методом ПЦР в пробах биоматериала различного происхождения

n=273

Вид биологического материала	Количество положительных проб / %	Концентрация вируса в пробе, lg копий РНК BRSV/GAPDH
Носовые выделения	6 / 2,2	1,5±0,75 / 2,1±0,25
Экссудат из трахеи, бронхов, носовых синусов	11 / 4,0	0,3±0,21 / 2,8±0,15
Слизистая оболочка трахеи и бронхов	2 / 0,7	0,3±0,21 / 1,3±0,21
Бронхи	3 / 1,1	0,5±0,03 / 1,2±0,29
Легкие	29 / 10,6	1,3±0,5 / 4,8±0,47
Легочные лимфатические узлы	2 / 0,7	0,1±0,03 / 0,3±0,03
Всего	53 / 19,4	0,6±0,28 / 2,08±0,23

Результаты исследования показали, что вирус присутствовал в 19,4% проб. В таблице 3 представлено распределение вируса по органам: чаще BRSV выявляли в легких (10,6% положительных проб). Далее следовали трахеальный и бронхиальный экссудаты (4,0%), носовые выделения (2,2%) и бронхи (1,1%). Реже всего (по 0,7%) вирус обнаруживался в слизистых оболочках трахеи, бронхов и в легочных лимфатических узлах. Полученные результаты полностью совпали с данными, полученными при исследовании этих же образцов биоматериала с помощью ранее разработанной тест-системы с электрофоретической детекцией продуктов амплификации.

Для определения концентрации вируса в пробах биоматериала сопоставляли значения пороговых циклов разведений ПКО и GAPDH с известной концентрацией со значениями C_t исследуемых проб и выражали в lg BRSV/GAPDH. Уровень вирусной нагрузки варьировался в зависимости от типа биоматериала, что может указывать на различную степень развития инфекции у животных на момент отбора проб. Самые высокие концентрации вируса отмечались в легочной ткани

($1,3 \pm 0,5$ - $4,8 \pm 0,47$ lg копий РНК BRSV/GAPDH), носовых секретах ($1,5 \pm 0,75$ - $2,1 \pm 0,25$ lg копий РНК BRSV/GAPDH) и жидкостях из воздухоносных путей (трахея, бронхи, носовые пазухи) ($0,3 \pm 0,21$ - $2,8 \pm 0,15$ lg копий РНК BRSV/GAPDH).

Таким образом, разработанная ПЦР показала высокую чувствительность, специфичность и эффективность при исследовании проб биоматериала от животных и количественного определения вируса. Данная разработка может использоваться в диагностике РСИ КРС, изучении патогенеза вируса, определении эффективности вакцин и противовирусных препаратов.

Получен патент Российской Федерации на изобретение от 24.03.2022 № RU 2768753 С2 (приложение А).

2.2.1.4 Тест-система для выявления герпесвируса крупного рогатого скота 4-го типа методом ПЦР в режиме реального времени

Герпесвирус 4 типа (*Rhadinovirus bovinegamma4*; ВоHV-4) широко распространен в популяциях КРС во многих странах мира.

Инфекции, вызванные герпесвирусом КРС 4 типа, характеризуются многообразием клинических форм: респираторные и гинекологические патологии, аборт, дерматиты, диареи, маститы. Вирус был также обнаружен в сперме. ВоHV-4 способен устанавливать латентную инфекцию в клетках моноцитов/макрофагов и тройничных ганглиях.

С целью изучения распространения ВоHV-4 среди КРС в нашей стране и определения его роли в инфекционной патологии нами была разработана ПЦР в режиме реального времени для выявления ДНК данного вируса.

В качестве мишени для амплификации был выбран консервативный ген гликопротеина L (gL) вируса. Провели анализ нуклеотидных последовательностей гликопротеина L различных штаммов ВоHV-4 (JN133502.1, Z79634.1, M90787.1, KC999113.1, AF318573.1), опубликованные в международной базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Анализ свойств олигонуклеотидных праймеров и зондов проводили с использованием программы Vector NTI 9.0.0

(InforMax). Последовательности выбранных праймеров и зонда приведены в таблице 15.

Таблица 15 – Олигонуклеотидные праймеры и зонды для выявления генома ВоHV-4

Название праймера и зонда	Последовательность	Размер ампликона, п.н.
SEQ ID NO:1	5- АСАТСАТАТТАААСССАТТGGC -3	156
SEQ ID NO:2	5- АТССТТСТGTGTTТААСССТАТСАG -3	
SEQ ID NO:3	5(FAM)- СААТТGGААТGTGСТGTGGT -3(BHQ1)	

В качестве положительного контрольного образца (ПКО) в ПЦР использовали рекомбинантную плазмидную ДНК рCR2.1, содержащую нуклеотидную последовательность фрагмента гена gL. Амплификацию проводили в 30 мкл реакционной смеси, включавшей набор реагентов БиоМастер UDG HS-qPCR (ООО «Биолабмикс», Россия), 10 рМ каждого праймера и зонда, а также 5 мкл ДНК.

Температурные условия проведения реакции представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Программа для амплификации фрагмента генома ВоHV-4

Температура	Время	Количество циклов
95 °С	5 мин	1
95 °С	15 сек	10
60 °С	20 сек	
72 °С	20 сек	
95 °С	15 сек	35
57 °С	1 мин	

Измерение флуоресценции проводили на канале FAM при температуре 57°С. Результат считали положительным при Ct <35.

Результаты определения специфичности представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Определение специфичности ПЦР в реальном времени для выявления генома ВоHV-4

Образец	Штамм, изолят	Результат ПЦР
ПКО ВоHV-4		+
ВоHV-4	Movar 33/63	+
ВоHV-1	Оренбург	-
ВоHV-2	М	-
SuHV-1	Арский	-
BAdV-1	BV-10	-
BRV	SD-1	-
BVDV-1	Oregon C24V	-
BVDV-2	Blagodatsky	-
BRSV	PCB №3	-
Культура клеток MDBK		-

По результатам анализа ПЦР выявляла только ДНК ВоHV-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. Исследование проводили в трех повторах. Воспроизводимость определяли, проводя исследование в разные дни. Аналитическая чувствительность реакции составила 5,3 копий/мкл, эффективность амплификации – 94,6%. Линейная зависимость средних значений Ct при десятикратных разведениях (наклон $-0,3460$; коэффициент детерминации $R^2=0,996$) подтверждает высокую воспроизводимость и стабильность полученных результатов (рисунок 5).

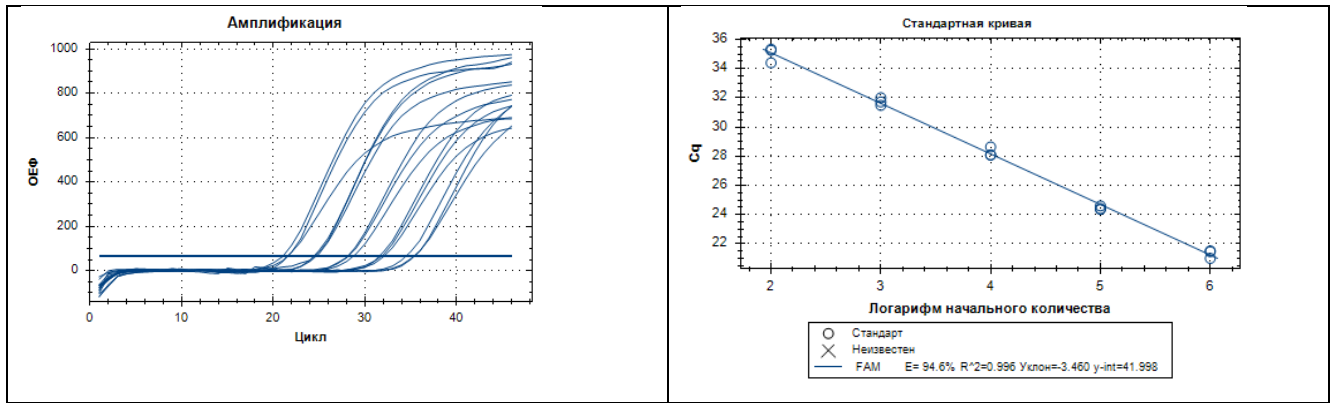


Рисунок 5 – Графики определения аналитической чувствительности и эффективности ПЦР-РВ для выявления ДНК VoHV-4

Данные таблицы 18 демонстрируют высокую точность анализа: коэффициент вариации составил не более 1,78% для внутрисерийной и 2,21% для межсерийной воспроизводимости.

Таблица 18 – Определение эффективности ПЦР для выявления VoHV-4

Концентрация, копий/мкл	Внутрисерийная воспроизводимость		Межсерийная воспроизводимость	
	Среднее значение $Ct \pm SD$	Коэффициент вариации CV, %	Среднее значение $Ct \pm SD$	Коэффициент вариации CV, %
$5,3 \times 10^4$	$20,87 \pm 0,37$	1,78	$20,88 \pm 0,46$	2,21
$5,3 \times 10^3$	$24,01 \pm 0,1$	1,43	$24,05 \pm 0,16$	0,65
$5,3 \times 10^2$	$27,71 \pm 0,37$	1,32	$27,81 \pm 0,47$	1,68
$5,3 \times 10^1$	$31,23 \pm 0,21$	0,66	$31,29 \pm 0,25$	0,81
$5,3 \times 10^0$	$34,5 \pm 0,49$	1,42	$34,47 \pm 0,6$	1,76

Для определения эффективности разработанной ПЦР провели исследование 350 проб биоматериала от животных с признаками респираторных, желудочно-кишечных и гинекологических патологий (таблица 19).

Результаты исследования показали, что геном VoHV-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%).

Таблица 19 – Исследование проб биоматериала от животных на ВоНВ-4 с помощью ПЦР в реальном времени

Вид биоматериала	Количество исследованных проб	Количество Положительных проб/%
Носовые выделения	35	21/60
Слизистая трахеи	30	8/26,7
Легкие	50	20/40
Бронхиальные лимфатические узлы	50	15/30
Брыжеечные лимфатические узлы	43	0
Селезенка	50	0
Кровь	45	3/6,7
Абортплод	25	4/16
Вагинальные выделения	42	5/11,9
Молоко	30	6/20,0
Итого	400	82/20,7

Таким образом, разработанная ПЦР в реальном времени для выявления генома ВоНВ-4 обладает высокой чувствительностью и специфичностью и может использоваться при исследовании проб биоматериала от больных животных.

Получен патент Российской Федерации на изобретение от 19.09.2019 № RU 2700750 С1 (приложение А).

2.2.1.5 Тест-система для одновременного выявления восьми вирусов респираторного комплекса крупного рогатого скота методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени

В настоящее время особую актуальность приобретает разработка мультиплексных ПЦР для одновременного выявления нескольких патогенов. Отсутствие на отечественном рынке зарегистрированных мультиплексных тест-систем на основе ОТ-ПЦР-РВ для комплексного выявления и количественного определения геномов основных вирусов КРС обусловило необходимость данной разработки.

Для идентификации возбудителей методом мультиплексной ПЦР были использованы синтетические олигонуклеотидные праймеры и зонды (патент Российской Федерации на изобретение № 2798286 С1 от 21.06.2023).

Для исключения перекрестных реакций специфичность всех праймеров и зондов была проверена с помощью программного обеспечения Vector NTI 9.0.0 (InforMax). Характеристики выбранных праймеров и зондов представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Олигонуклеотидные праймеры и зонды для выявления восьми вирусов методом мультиплексной ПЦР в реальном времени

Патоген	Мишень	Название праймера/ зонда	Последовательность (5'-3')	Размер ампликона, п.н.
Первая реакция				
BoHV-1	gB	BoHV-1_F1	GCACCTACGACATCCTCAAC	97
		BoHV-1_R1	AACCTGTCGTCGCTAACTGG	
		BoHV-1_Z1	Cy5-TATACACCAGCTTGCCGACCAACG-BHQ2	
BoHV-4	gL	BoHV-4_F1	ACATCACATTAACCCATTGGC	156
		BoHV-4_R1	ACTCCTTCTGTGTTAACCTATCAG	
		BoHV-4_Z1	ROX-CAATTGGAATGTGCTGTGGT-BHQ1	
BPIV-3	gN	BPIV-3_F1	CGGACATCAATAGGCTCAAGG	143
		BPIV-3_R1	CTACACCCATCGCATAACTCC	
		BPIV-3_Z	FAM—CACCAGGCAACTATCCCGCTCTC-BHQ1	
BRSV	gN	BRSV_F1	ATGCTGCAGGACTAGGTATAATGG	120
		BRSV_R1	ACACTGTAATTGATGACCCCATCTC	
		BRSV_Z1	HEX-CTAGTGCAGGACCAACAGCTGCTC-BHQ1	
Bos taurus	GAPDH	GAPDH_F1	GATCGTGAAGGTCGGAGTCAAC	105
		GAPDH_R1	GTGATTGATGGCGACCATGT	
		GAPDH_Z1	Cy5.5- CTGGTCACCAGGGCTGCTT-BHQ2	
		GAPDH_R1	CATAGATGGCCTCATTGTCTACC	
		GAPDH_Z1	Cy5.5- CAACTCCATCCTCAC-CACCCACAC-BHQ3	

Продолжение таблицы 20

Патоген	Мишень	Название праймера/ зонда	Последовательность (5'-3')	Размер ампликона, п.н.
Вторая реакция				
BCoV	gN	BCoV_F1	GGTACAGACACAACAGACGTTC	125
		BCoV_R1	GTCAATGTCGGTGCCATACT	
		BCoV_Z1	FAM-TGGAACAGGACCGCATGCTAAAGA-BHQ1	
		BCoV_Z2	FAM-TGGAACAGGACCGCATGCCAAAGA-BHQ1	
BVDV-1	5'UTR	BVDV1_F1	GGTAGCAACAGTGGTGAGTT	105
		BVDV1_R1	CGTCCACGTGGCATCTC	
		BVDV1_Z1	HEX-TAGTCGTCAGTGGTTCGACGCCT-BHQ1	
BVDV-2	5'UTR	BVDV2_F1	CTAGCGATGCCCTTAGTAG	106-108
		BVDV2_R1	CGTCGAAGCATTGACGACT	
		BVDV2_Z1	Cy5-TAGCGGTAGCAGTGAGTTCATTGGATGGCC-BHQ2	
BVDV-3	5'UTR	BVDV3_F1	CCATACCTTCAGTAGGACGAGC	110
		BVDV3_R1	TCCTTGATGCGTCGAACCA	
		BVDV3_Z1	ROX-TAGTGGTAGCAGTGAGCTCCTTGGAT-BHQ2	
Bos taurus	GAPDH	GAPDH_F1	AAGCTGGAGTTCTCCATTACC	105

Для подбора параметров реакции и контроля амплификации были сконструированы положительные контрольные образцы путем клонирования специфических целевых фрагментов геномов возбудителей в плазмидный вектор pCR2.1 с последующей трансформацией компетентных клеток *Escherichia coli*.

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

Постановку ПЦР проводили с использованием набора БиоМастер ОТ-ПЦР-РВ (2х) (Биолабмикс, Россия).

Для оптимизации эффективности и специфичности амплификации экспериментально провели подбор концентрации праймеров и зондов. В ПЦР тестировали концентрации праймеров и зондов 50 нМ, 100нМ, 150 нМ, 200 нМ. На основе значений C_t и интенсивности сигнала была выбрана наиболее оптимальная концентрация праймеров и зондов для каждого патогена – 100 нМ.

Для определения оптимальных условий работы амплификации варьировали температуру отжига в диапазоне от 56°C до 65°C. В результате подобрали наилучший температурный режим проведения ПЦР (таблица 21).

Таблица 21 – Программа для амплификации фрагментов геномов восьми вирусов

Температура	Время	Количество циклов
50°C	30 мин	1
95°C	5 мин	1
95°C	15 сек	45
60°C	60 сек	

Таким образом, измерение флуоресценции проводили при 60⁰С в первой реакции на канале FAM – для ВоHV-1, HEX - ВоHV-4, Texas Red - ВPIV-3, Cy5 - BRSV, Quasar 750 – GAPDH КРС; во второй реакции на канале FAM – для ВCoV, HEX – ВVDV-1, Texas Red - ВVDV-2, Cy5 – ВVDV-3, Quasar 750 – GAPDH КРС. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения амплификатора. Положительными считали образцы со значением порогового цикла $C_t < 37$ (таблица 22).

Таблица 22 – Учет результата мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ

Вирус КРС	Результат исследования				
	FAM	HEX	Texas Red	Cy5	Quasar 750
Первая реакция					
BoHV-1	+	-	-		-
BoHV-4	-	+		-	-
BPIV-3		-	+	-	-
BRSV	-		-	+	-
GAPDH КРС	-	-	-	-	+
Вторая реакция					
BCoV	+	-	-	-	-
BVDV-1	-	+	-	-	-
BVDV-2	-	-	+		-
BVDV-3	-	-		+	-
GAPDH КРС	-	-	-	-	+

Оценку специфичности разработанных праймеров проводили путем постановки ПЦР как в моно-, так и в мультиплексном форматах для каждого целевого патогена, специфичности олигонуклеотидов к гену GAPDH – используя образцы клеточных культур и сыворотки крови различных видов животных и человека (таблица 23).

Разработанные и апробированные системы праймеров и зондов продемонстрировали высокую специфичность. В условиях мультиплексного анализа отсутствовали перекрестные реакции между целевыми последовательностями. Ген GAPDH КРС стабильно детектировался во всех клеточных линиях и штаммах вирусов, при культивировании которых использовали эмбриональную сыворотку крупного рогатого скота.

Таблица 23 – Определение специфичности мультиплексной ПЦР для выявления геномов восьми вирусов

Образец	Штамм (изолят)	Результат ПЦР	
		1 реакция	2 реакция
BoHV-1	Оренбург	+ FAM + Quasar 750	+ Quasar 750
BoHV-4	Movar 33/63	+ HEX + Quasar 750	+ Quasar 750
BPIV-3	SF-4	+ Texas Red + Quasar 750	+ Quasar 750
BRSV	PCB № 3	+ Cy5 + Quasar 750	+ Quasar 750
BCoV	КМИЭВ-1	+Quasar 750	+ FAM + Quasar 750
BVDV-1	Oregon C24V	+Quasar 750	+ HEX + Quasar 750
BVDV-2	Blagodatsky	+Quasar 750	+ Texas Red + Quasar 750
BVDV-3	UT	+Quasar 750	+ Cy5 + Quasar 750
BRV	SD-1	+Quasar 750	+ Quasar 750
BAdV-1	BV-10	+Quasar 750	+ Quasar 750
<i>Mannheimia haemolytica</i>	16	-	-
<i>Pasteurella multocida</i>	T80	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	1891	-	-
<i>Escherichia coli</i>	F-50	-	-
Культура клеток КСТ		+ Quasar 750	+ Quasar 750
Культура клеток MDBK		+ Quasar 750	+ Quasar 750
Сыворотка крови крупного рогатого скота		+ Quasar 750	+ Quasar 750
Сыворотка крови овцы		-	-
Сыворотка крови свиньи		-	-
Сыворотка крови человека		-	-

Аналитическую чувствительность мультиплексной ПЦР оценивали путем определения предела обнаружения для каждой мишени с использованием серии десятикратных разведений ПКО, содержащих целевые последовательности генов вирусов, с концентрацией от 10^6 до 10^1 копий/мкл. Предел обнаружения определяли как самую низкую концентрацию, при которой 95% повторов давали положительный сигнал амплификации. Амплификация каждого разведения проводилась в трех повторах. Экспериментальная серия выполнялась в разные дни, разными сотрудниками и на разных приборах, при этом эффективность ПЦР рассчитывалась автоматически при помощи программного обеспечения амплификатора CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) (рисунки 6, 7).

Предел обнаружения для ВоHV-1, ВоHV-4, ВPIV-3, BRSV, ВCoV, ВVDV-3 составил 10 копий/мкл, ВVDV-1 и ВVDV-2 – 10^2 копий/мкл, а эффективность амплификации – от 87,9 до 118,9% (таблица 24 и рисунки 6, 7).

Таблица 24 – Определение аналитической чувствительности и эффективности мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ для обнаружения респираторных вирусов КРС

Вирус	Уклон	Линейность R2	Эффективность, %	Чувствительность, копий/мкл
ВоHV-1	-3,203	0,995	105,2	10
ВоHV-4	-3,278	0,993	101,9	10
ВPIV-3	-3,649	0,998	87,9	10
BRSV	-3,543	0,998	91,5	10
ВCoV	-3,426	0,997	95,8	10
ВVDV-1	-3,289	0,992	101,4	10^2
ВVDV-2	-3,381	0,997	97,6	10^2
ВVDV-3	-3,394	0,998	97,1	10
GAPDH КРС	-2,939	0,962	118,9	10^1

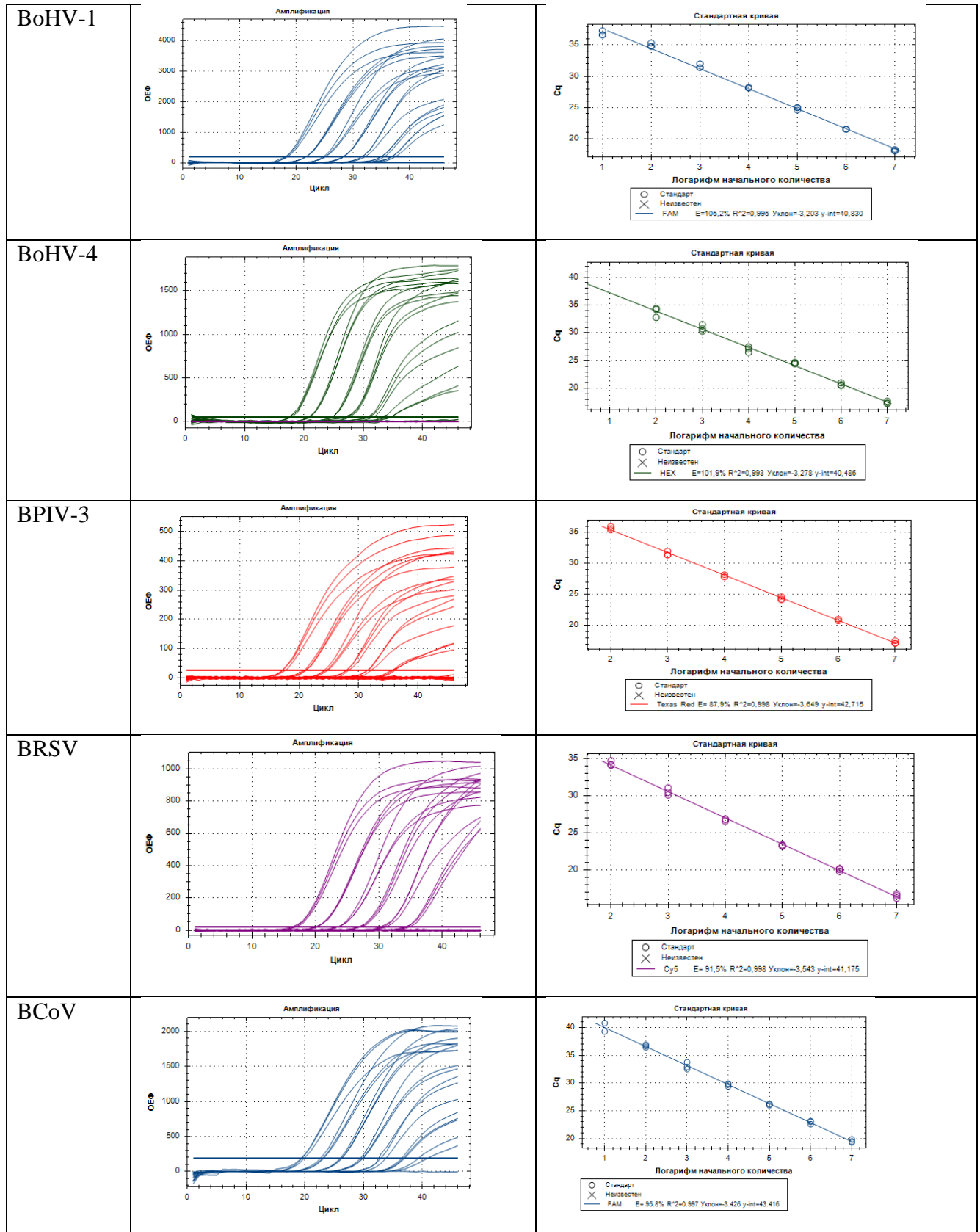


Рисунок 6 – Графики определения аналитической чувствительности и эффективности праймеров и зондов, используемых для выявления вирусов КРС в мультиплексном формате

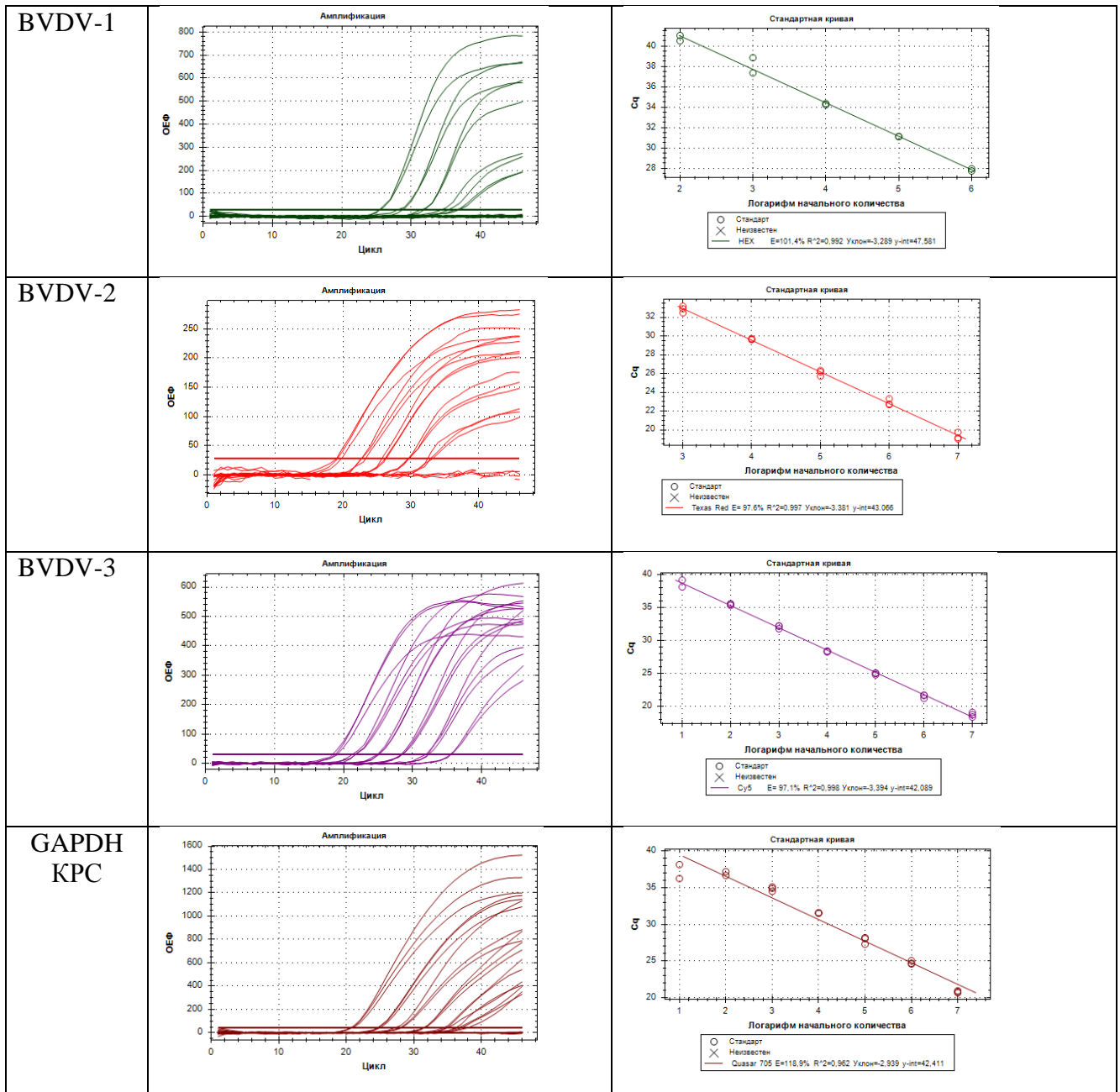


Рисунок 7 – Графики определения аналитической чувствительности и эффективности праймеров и зондов, используемых для выявления вирусов КРС в мультиплексном формате

Для определения внутрисерийной и межсерийной воспроизводимости мультиплексной ПЦР использовали ПКО с концентрациями 10^5 , 10^4 и 10^3 копий/мкл. Внутрисерийную воспроизводимую оценивали по трем повторам на каждый запуск, а межсерийную – по трем независимым запускам, проведенным в разные дни.

При оценке внутрисерийной воспроизводимости коэффициент вариации не превышал 2,04%, а межсерийной – 2,67, что подтверждает высокую точность, повторяемость и воспроизводимость анализа (таблица 25).

Таблица 25 – Оценка повторяемости и воспроизводимости реакции

ПКО	Концентрация, копий/мкл	Внутрисерийная воспроизводимость		Межсерийная воспроизводимость	
		Среднее значение $St \pm SD$	Коэффициент вариации CV, %	Среднее значение $St \pm SD$	Коэффициент вариации CV, %
BoHV-1	10^5	21,56±0,11	0,49	21,61±0,15	0,7
	10^4	25,49±0,25	0,99	25,54±0,34	1,35
	10^3	28,99±0,3	1,04	29,08±0,78	2,67
BoHV-4	10^5	21,13±0,2	0,94	21,18±0,36	1,7
	10^4	25,26±0,26	1,04	25,22±0,37	1,45
	10^3	28,1±0,53	1,88	28,12±0,55	1,96
BPIV-3	10^5	21,18±0,2	0,94	21,2±0,28	1,31
	10^4	25,54±0,312	1,24	25,56±0,43	1,68
	10^3	28,44±0,2	0,71	28,48±0,33	1,17
BRSV	10^5	20,27±0,17	0,82	20,3±0,24	1,18
	10^4	24,56±0,42	1,71	24,47±0,47	1,92
	10^3	27,83±0,54	1,94	27,79±0,58	2,08
BCoV	10^5	23,15±0,31	1,32	23,11±0,35	1,5
	10^4	26,59±0,47	1,75	26,79±0,59	2,21
	10^3	29,93±0,61	2,04	29,94±0,68	2,27
BVDV-1	10^5	29,14±0,29	0,99	29,14±0,34	1,17
	10^4	32,13±0,39	1,21	32,17±0,41	1,26
	10^3	34,7±0,48	1,39	34,74±0,54	1,56
BVDV-2	10^5	22,4±0,2	0,89	22,45±0,27	1,21
	10^4	26,26±0,38	1,45	26,3±0,55	2,09
	10^3	30,13±0,56	1,87	30,16±0,67	2,21
BVDV-3	10^5	22,1±0,25	1,11	22,09±0,3	1,36
	10^4	25,11±0,33	1,31	25,15±0,45	1,78
	10^3	28,62±0,46	1,6	28,53±0,49	1,72
GAPDH KPC	10^5	25,11±0,32	1,28	25,14±0,4	1,16
	10^4	28,6±0,43	1,49	28,65±0,68	2,36
	10^3	32,19±0,57	1,78	32,26±0,8	2,47

Для определения диагностической эффективности разработанной мультиплексной ПЦР провели исследование 255 проб биологического материала, отобранного от телят с признаками респираторных болезней. Для сравнения эффективности выявления геномов возбудителей использовали ПЦР в моно-формате.

Анализ полученных результатов показал, разработанная нами мультиплексная ОТ-ПЦР-РВ обладает высокой точностью и эффективностью, результаты исследования полностью совпали с методом ПЦР в моно-формате, при этом эффективность выявления BPIV-3 с помощью мультиплексной ПЦР была выше (таблица 26).

Таблица 26 – Результаты исследования проб биоматериала от больных телят при помощи ПЦР в моно-формате и мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ

Патоген	Количество положительных проб	
	ПЦР в моно-формате	Мультиплексная ОТ-ПЦР-РВ
BoHV-1	32	32
BoHV-4	24	24
BPIV-3	3	6
BRSV	16	16
BCoV	37	37
BVDV-1	34	34
BVDV-2	5	5
BVDV-3	3	3

Ключевым преимуществом разработанной мультиплексной тест-системы на основе ОТ-ПЦР-РВ является существенная оптимизация процесса детекции. Сокращение времени исследования одной пробы до 1,5 часов обеспечивает четырехкратное ускорение диагностического цикла по сравнению с последовательным проведением моноспецифических реакций. Одновременная детекция нескольких мишеней в едином объеме реакционной смеси позволяет минимизировать риск ошибок оператора и существенно уменьшить материальные затраты за счет сни-

жения объема используемых расходных материалов и реактивов, что делает метод экономически предпочтительным для массовых скрининговых исследований.

Получен патент Российской Федерации на изобретение № 2798286 С1 от 21.06.2023 (приложение А).

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

В развитии респираторных болезней крупного рогатого скота участвуют многочисленные агенты вирусной и бактериальной природы, при этом ключевую роль играют вирусы. Вирусная инфекция вызывает повышенную восприимчивость к бактериальным инфекциям либо за счет иммуносупрессии, либо за счет повреждения эпителия верхних дыхательных путей и легочной паренхимы, что способствует миграции и колонизации нижних дыхательных путей бактериальными патогенами. В случае смешанных вирусных и бактериальных инфекций отмечается более высокая заболеваемость и смертность.

Вирусы респираторного комплекса КРС, кроме поражения органов дыхательной системы, способны вызывать различные клинические формы болезней, такие как репродуктивные нарушения, болезни пищеварительной системы, болезнь слизистых и острые формы инфекции с иммуносупрессией.

Поскольку респираторные болезни крупного рогатого скота имеют полиэтиологическую структуру, необходимо проведение комплексной лабораторной диагностики вирусных и бактериальных инфекций для установления этиологической роли инфекционных агентов и планирования противоэпизоотических мероприятий.

Целью данного раздела стало изучение этиологической структуры массовых респираторных болезней КРС за период 2015-2024 гг. и определение эпизоотологически значимых возбудителей респираторного комплекса в хозяйствах Сибири.

В 2015-2024 гг. для изучения этиологической структуры респираторных болезней КРС в хозяйствах по производству молока Сибири при вспышках инфек-

ции от больных, павших и вынужденно убитых животных отбирали пробы биоматериала и исследовали методом ПЦР. Всего исследовали методом ПЦР 6964 пробы биоматериала от животных разных возрастных групп из 131 животноводческого хозяйства Новосибирской, Тюменской, Томской, Кемеровской, Омской областей, Алтайского и Красноярского краев, Республики Казахстан. Спектр диагностируемых инфекций включал вирусы ВоHV-1, BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3, BRSV, ВоCV, ВоHV-4 и ВPIV-3). Все исследования методом ПЦР проводили с использованием тест-систем, разработанных нами и описанными в главе 2.2.1. Бактериальные патогены выделяли общепринятыми бактериологическими методами, а *Mannheimia haemolytica* и *Pasteurella multocida* выявляли с использованием разработанной А.В. Нефедченко и соавт. (2016) тест-системой на основе ПЦР.

Согласно таблице 27, в этиологической структуре массовых респираторных болезней в 2015-2024 гг. в хозяйствах молочного направления лидирующую позицию занимает 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.

Впервые в России BVDV-3 был выявлен при вспышке респираторного заболевания среди телят после вакцинации стада живой вакциной, содержащей данный вирус в качестве контаминанта.

Вторую позицию по частоте диагностики занимает ИРТ КРС, ВоHV-1 выявили в 14,9% проб. ВоHV-4 содержали 12,6% проб биоматериала. ВCoV обнаружили в 9,4% исследованных проб. Реже диагностировали РСИ КРС (6,1%) и парагрипп-3 КРС (6,3%).

Из бактериальных агентов в пробах чаще присутствовали *Pasteurella multocida* (28,0%) и *Mannheimia haemolytica* (25,5%). Выделение других бактериальных возбудителей составило от 1,5 до 9,0%.

Всего вирусные агенты респираторного комплекса были выявлены в 69,1% исследованных проб биоматериала, а бактериальные агенты выделены в 77,8% проб.

Таблица 27 – Инфекционные агенты, выявленные при вспышках массовых респираторных болезней крупного рогатого скота в молочных хозяйствах Сибири в 2015-2024 гг.

n=6964

Инфекционный агент	Количество положительных проб	Количество положительных проб, %
Вирусы		
BoHV-1	1041	14,9
BVDV-1	1114	16,0
BVDV-2	213	3,1
BVDV-3	84	1,2
BRSV	425	6,1
BoHV-4	875	12,6
BCoV	625	9,4
BPIV-3	436	6,3
Итого вирусы	4813	69,1
Бактерии		
<i>Pasteurella multocida</i>	1953	28,0
<i>Mannheimia haemolytica</i>	1774	25,5
<i>Histophilus somni</i>	625	9,0
<i>Trueperella pyogenes</i>	478	6,9
<i>Salmonella spp.</i>	318	4,6
<i>Escherichia coli</i>	163	2,3
<i>Streptococcus pneumonia</i>	106	1,5
Итого бактерии	5417	77,8

Эпизоотическая ситуация по респираторным болезням неодинакова в хозяйствах с различной концентрацией животных, молочной продуктивностью, комплектованием поголовья высокопродуктивным импортным скотом. Поэтому изучение особенностей эпизоотической ситуации по респираторным болезням в зависимости от концентрации животных, наличия или отсутствия ввода новых животных, циркулирующих вирусных и бактериальных агентов имеет важное значение при планировании профилактических мероприятий.

В данном исследовании мы разделили все молочные хозяйства на три группы. Первая группа включала 15 крупных молочных комплексов из Тюменской, Томской, Новосибирской областей, Алтайского и Красноярского краев, в которых происходил завоз импортного скота из разных стран. Поголовье составляло 1000 и более дойных коров, а среднегодовая молочная продуктивность более 7000 л молока.

Ко второй группе отнесли 57 крупных хозяйства из Новосибирской, Тюменской, Томской, Омской, Кемеровской областей, Красноярского и Алтайского краев, 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 из всех вышеперечисленных областей и краев с поголовьем до 300 дойных коров и продуктивностью 3000 – 4000 л молока, в которых последние несколько лет не происходило ввода новых животных.

2.2.2.1 Этиологическая структура респираторных болезней крупного рогатого скота на молочных комплексах с завозом импортного поголовья

Молочное животноводство занимает ведущее место в российском агропромышленном комплексе и является одной из важнейших отраслей для обеспечения продовольственной безопасности страны.

В последние годы в Россию активно осуществляют поставки крупного рогатого скота из стран Европы и Америки с целью увеличения генетического потенциала стада и комплектования поголовья высокопродуктивными животными.

Эффективность работы с импортным скотом снижают дефицит знаний и опыта, неадаптированные проекты молочных комплексов, несоответствие кормовой базы потребностям организма животных и технологии кормления. Проявлению этого способствует повышенная чувствительность к действию неблагоприятных факторов, что обусловлено особенностями обмена веществ у животных с высоким генетическим потенциалом. Интегральным результатом отмеченного является высокая в сравнении с отечественным поголовьем заболеваемость импортного скота, что приводит к его выбытию, снижению продуктивного потенциала и племенной ценности (Амерханов Х.А. и соавт., 2018). Помимо этого, импорт скота с неизвестным инфекционным статусом способствует заносу новых вирусов или новых генетических вариантов вирусов на молочные комплексы.

По данным В.Г. Рядчикова (2010), в хозяйствах Российской Федерации в первый год использования купленного за рубежом скота выбраковывается от 8 до 35% голов. Падеж и выбраковка импортного скота по различным заболеваниям фактически составляет 30-50%.

Согласно исследованиям А.В. Пчельникова (2024), за период 2012-2021 гг. 87% импортированных животных поступили из стационарно неблагополучных по инфекционному ринотрахеиту крупного рогатого скота стран. По другим инфекциям статистические данные в доступной литературе отсутствуют, но, учитывая широкое распространение вирусов в различных странах мира, можно заключить, что риск заноса новых эпизоотических штаммов различных возбудителей на территорию нашей страны при завозе импортного скота очень высок.

На молочных комплексах, учитывая высокую концентрацию животных, болезни имеют тенденцию к быстрому массовому распространению.

Исследовали пробы биологического материала от павших и больных животных с признаками респираторных болезней разных половозрастных групп из 15 крупных молочных комплексов Новосибирской, Тюменской, Томской областей, Красноярского и Алтайского краев и Республики Казахстан, в которых происходил завоз импортного скота из разных стран. поголовье составляло более 1000 дойных коров, а среднегодовая молочная продуктивность более 7000 л молока.

Всего исследовали 2280 проб биоматериала от телят (в возрасте до 10 дней – 605 проб, 11-30 дней – 640 проб, 1-3 мес. – 517 проб, 4-6 мес. – 350 проб, старше 6 мес. – 168 проб), от коров и нетелей – 575 проб.

Согласно результатам наших исследований, в этиологической структуре болезни респираторного комплекса КРС на молочных комплексах с завозом импортного скота в 2015–2024 гг. ведущими патогенами являлись возбудители ИРТ КРС (19,5%) и ВД-БС КРС (25,3%). При этом геном BVDV-1 был обнаружен в 20,3%, BVDV-2 – в 5,0% проб биоматериала, а BVDV-3 не регистрировался. Геном BRSV выявили в 7,3% проб, BoHV-4 – в 14,9%, BCoV – в 10,6%, а BPIV-3 – в

7,4% проб (рисунок 8). Итого, генетический материал вирусов респираторного комплекса выявили в 84,8 % проб биоматериала КРС.

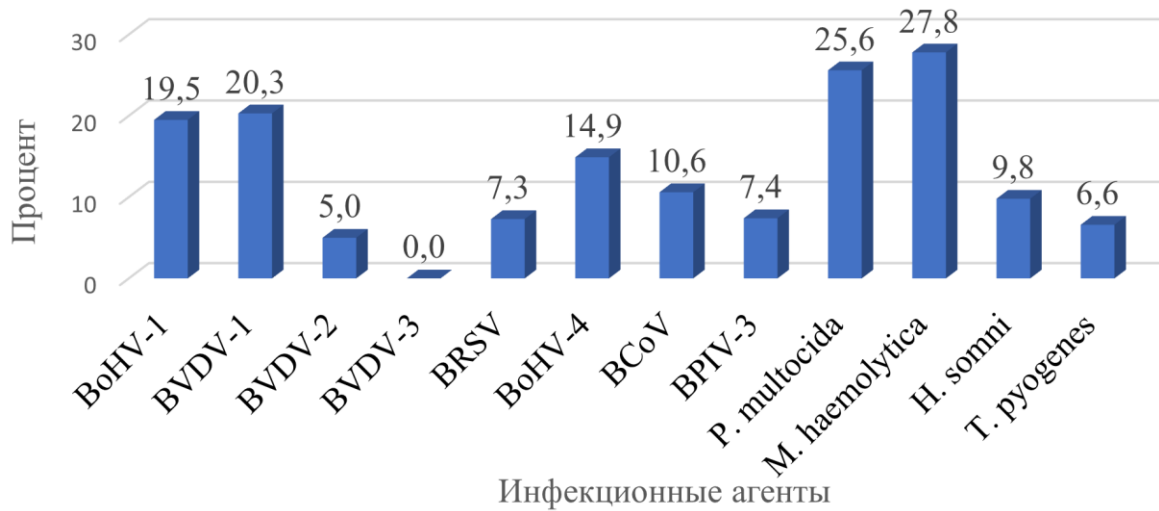


Рисунок 8 – Частота выявления инфекционных агентов при вспышках респираторных болезней КРС на крупных молочных комплексах с завозом импортного скота (в % от числа исследованных проб)

С использованием бактериологического и молекулярно-генетического метода выявили следующие бактерии, участвующие в респираторной патологии КРС на молочных комплексах с завозом импортного скота: *Pasteurella multocida* – в 25,6%, *Mannheimia haemolytica* – в 27,8%, *Histophilus somni* – в 9,8%, *Trueperella pyogenes* – в 6,6% исследованных проб биоматериала. Бактерии респираторного комплекса выделены из 69,7% исследованных проб биоматериала.

Проанализированы особенности этиологической структуры респираторных болезней среди животных разных возрастных категорий: телят в возрасте с рождения до 10 дней, 11-30 дней, 1-3 месяцев, 4-6 месяцев, старше 6 месяцев, а также коров и нетелей.

Частота выявления патогенов при вспышках респираторных болезней в различных возрастных категориях животных представлена в таблице 28.

Таблица 28 – Частота выявления инфекционных агентов при вспышках респираторных болезней КРС в пробах биоматериала от животных разных возрастных категорий на крупных молочных комплексах с завозом импортного скота в 2015-2024 гг.

Инфекционный агент	Возрастная группа животных, количество проб биоматериала / % положительных						
	Телята					Всего телята n=2280	Коровы, нетели n=575
	До 10 дней n=605	11-30 дней n=640	1-3 мес. n=517	4-6 мес. n=350	Старше 6 мес. n=168		
Вирусы							
BoHV-1	135/22,3	118/18,4	81/15,7	52/14,9	26/15,5	412/18,1	144/25,0
BVDV-1	92/15,2	150/23,4	91/18	90/17,4	30/17,9	453/19,9	126/21,9
BVDV-2	32/5,3	37/5,8	37/7,2	14/4,0	7/4,2	127/5,6	15/2,6
BVDV-3	0	0	0	0	0	0	0
BRSV	18/3,0	52/8,1	49/9,5	34/9,7	14/8,3	167/7,3	40/7,0
BoHV-4	73/12,1	96/15,0	88/17,0	53/15,1	27/16,1	337/14,8	88/15,3
BCoV	5/0,8	77/12,0	94/18,2	50/14,3	20/11,9	246/10,8	56/9,7
BPIV-3	24/4,0	54/8,4	52/10,1	42/12,0	10/6,0	182/8,0	28/4,9
Итого вирусы	379/62,6	584/91,3	492/95,2	335/95,7	134/80,0	1924/84,4	497/86,4
Бактерии							
<i>Pasteurella multocida</i>	171/28,3	186/29,1	118/22,8	81/23,1	32/19,0	588/25,8	142/24,7
<i>Mannheimia haemolytica</i>	95/15,7	197/30,8	172/33,3	121/34,6	58/34,5	643/28,2	150/26,1
<i>Histophilus somni</i>	32/5,2	57/8,9	71/13,7	45/12,9	20/11,9	225/9,9	54/9,4
<i>Trueperella pyogenes</i>	21/3,5	46/7,2	38/7,4	22/6,3	18/10,7	145/6,4	43/7,8
Итого бактерии	319/52,7	486/75,9	399/77,2	269/76,9	128/76,2	1601/70,2	409/71,1

Из представленных в таблице данных следует, что при вспышках массовых респираторных болезней на крупных молочных комплексах, в которые производился завоз КРС из других стран, вирусы респираторного комплекса были выявлены в 84,4% проб биологического материала от телят и 86,4% проб от коров. Бактерии, участвующие в патологии респираторного комплекса, выделены в 70,2% проб от телят и 71,1% проб от коров.

Анализ возрастной восприимчивости и клинического проявления свидетельствует о том, что телята заболевают вирусными и ассоциативными вирусно-бактериальными инфекциями в возрасте от 10 до 30 дней. Отсутствие или низкий

уровень колостральных антител в этом возрасте обуславливает их повышенную уязвимость к полевым штаммам вирусов.

Особое место в структуре респираторных болезней занимают ИРТ и ВД-БС КРС. В среднем частота выявления ВоНВ-1 составила среди телят и коров 18,1% и 25,0% соответственно. У телят в возрасте до 10 дней геном выявляли чаще (22,3%), чем среди телят других возрастов.

РНК BVDV-1 обнаружили в 19,9% и 21,9% проб биоматериала от телят и коров соответственно. Чаще вирус обнаруживали у телят в возрасте 11-30 дней (23,4%). BVDV-2 присутствовал в 5,6% и 2,6% проб биоматериала от телят и коров, при этом чаще выявлялся у телят 1-3 мес. BVDV-3 не был идентифицирован. Итого, возбудители ВД-БС КРС (BVDV-1 и BVDV-2) в совокупности обнаружены в 25,4% и 24,5% проб от телят и коров.

Возбудитель РСИ КРС выявили в 7,3% и 7,0% проб от телят и коров соответственно, при этом наименьший процент обнаружен у телят до 10 дней (3%), а наиболее часто встречался у телят 1-6 мес.

ВСоV присутствовал в 10,8% исследованных проб от телят и 9,7% проб от коров, при этом реже всего его детектировали у телят до 10 дней (0,8%), а чаще у телят 1-3 мес. (18,2%).

ВоНВ-4 выявили в 14,8% и 15,3% проб от телят и коров соответственно, частота выявления была примерно на одном уровне у всех возрастов (12,1-17,0% среди телят).

Вирус парагриппа-3 КРС обнаружили в 8,0% и 4,9% проб от телят и коров. У телят до 10 дней зафиксировали наименьший процент выявления вируса – 4,0%, телят 11-30 дней, 1-3 мес., 4-6 мес. – 8,4, 10,1 и 12,0% соответственно.

Наибольшая частота встречаемости бактерий наблюдалась у *Mannheimia haemolytica* и составила 28,2% и 26,1% у телят и коров. У телят в возрасте от 11 дней до 6 мес. бактерию выявляли в 30,8-34,6% проб. Минимальный процент выявления зафиксировали у телят до 10 дней (15,7%).

Бактерию *Pasteurella multocida* обнаруживали примерно на одном уровне у коров и телят (25,8% и 24,7%). Наиболее часто ее выделяли в пробах от телят до

1 мес. *Histophilus somni* обнаруживали в 9,9% и 9,4% проб от телят и коров соответственно, при этом чаще у телят от 1 до 6 мес. (13,7 – 11,9%). *Trueperella pyogenes* выделили из 6,4% проб от телят и 7,8% проб от коров. Наиболее часто бактерию выделяли из проб телят от 11 дней до 6 мес. (6,3-10,7%).

Таким образом, согласно результатам наших исследований, на крупных молочных комплексах с импортом скота из других стран циркулирует широкий спектр вирусных (84,8%) и бактериальных (69,7%) агентов.

2.2.2.1.1 Ассоциации респираторных патогенов у крупного рогатого скота на молочных комплексах с завозом импортного поголовья

Согласно результатам наших исследований, на крупных молочных комплексах с завозом импортного скота в моноварианте вирусы присутствовали в 25,2% проб биоматериала. Как единственный патоген BoHV-1 обнаружен в 28,6%, BVDV-1 – в 27,0%, BVDV-2 – в 8,3%, BRSV – в 24,6%, BoHV-4 – в 4,4%, BCoV – в 7,1% проб, содержащих вирусы в моноварианте (рисунок 9). Вирус парагриппа-3 КРС был выявлен только в различных ассоциациях с другими возбудителями.

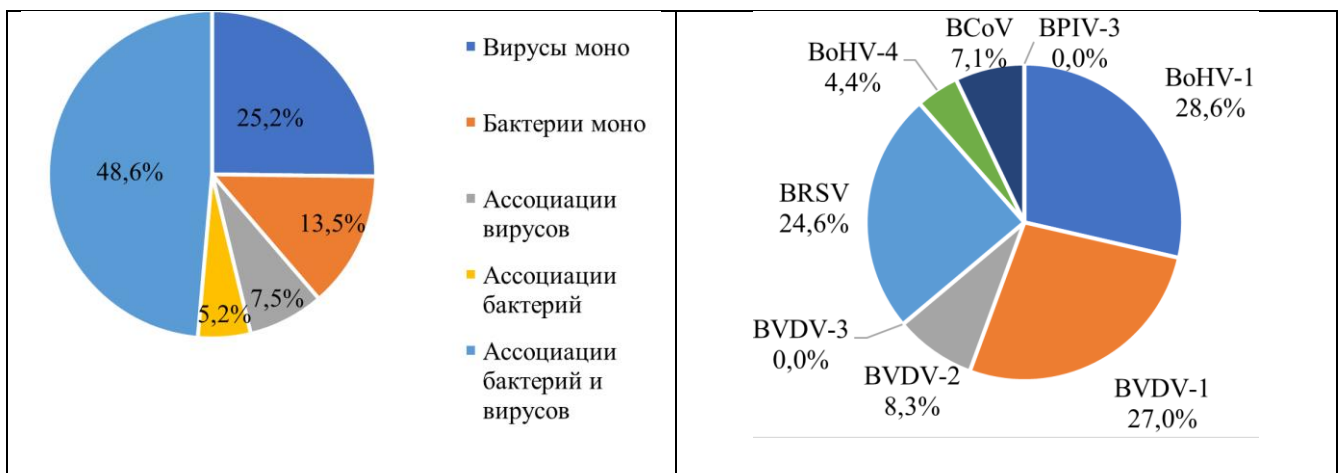


Рисунок 9 – Частота встречаемости моно- и микст-инфекций и видовой состав вирусных агентов при моноинфекции на комплексах с завозом импортного скота

Таким образом, на крупных молочных комплексах с завозом скота из других стран наиболее часто происходила циркуляция вирусно-бактериальных ассоциаций (48,6%), а циркуляция вирусов в моноварианте, согласно нашим исследованиям, составила 25,2%. BoHV-1, BVDV, BRSV чаще выявлялись при респираторных болезнях как единственные этиологические агенты, а BCoV, BoHV-4 и BPIV-3 – в различных ассоциациях с бактериальными и, реже, вирусными возбудителями (рисунок 10).

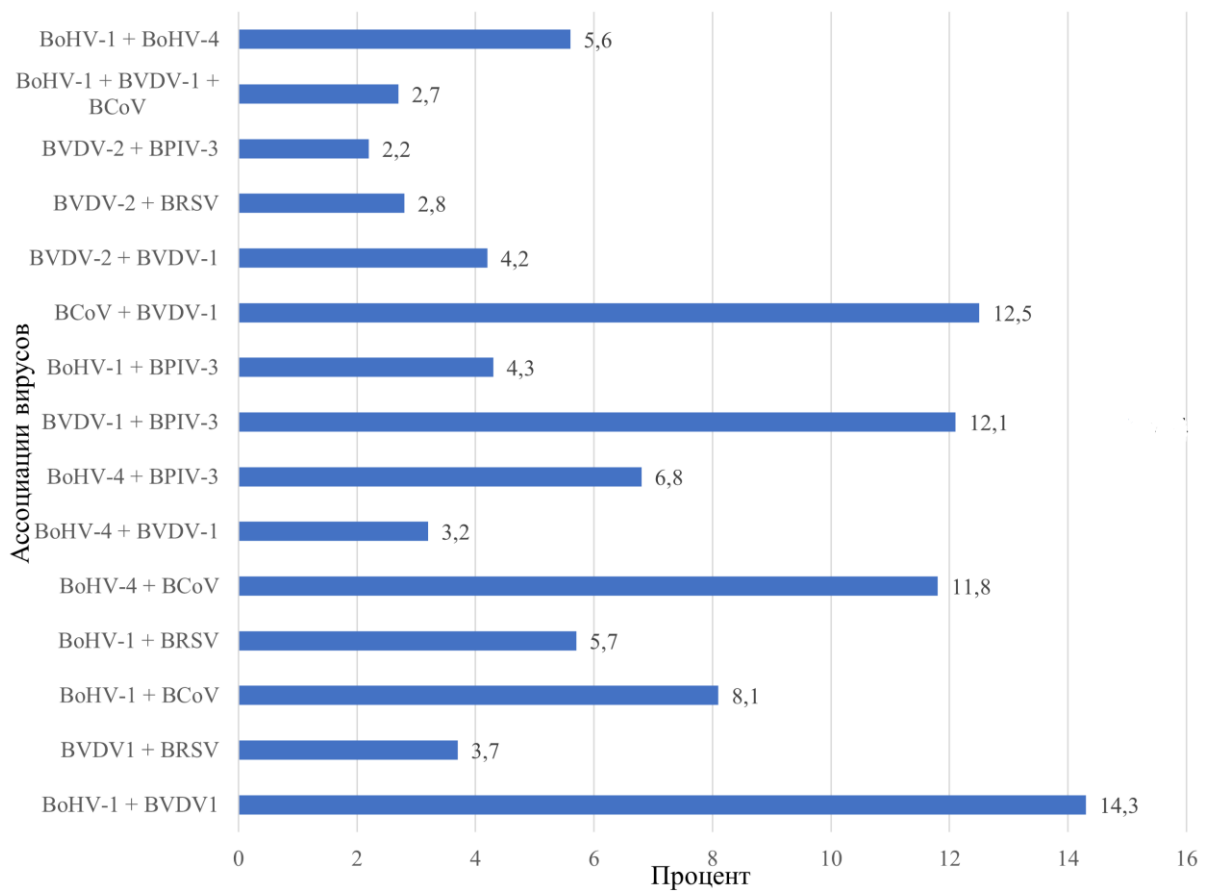


Рисунок 10 – Частота выявления ассоциаций вирусов при вспышках респираторных болезней на крупных молочных комплексах с завозом импортного скота (в % от всех вирусных ассоциаций)

Наиболее часто встречались ассоциации BoHV-1 и BVDV-1 (14,3%), BCoV и BVDV-1 (12,5%), BVDV-1 и BPIV-3 (12,1%), BoHV-4 и BCoV (11,8%).

2.2.2.1.2 Этиологическая структура респираторных болезней у импортного скота в период адаптации на крупных молочных комплексах

Адаптация импортированных животных к условиям хозяйств России подразделяется на 4 периода. Первый период составляет 7-14 дней. Транспортный стресс способствует возникновению патологий, развивающихся по принципу адаптационных болезней. Во второй период (2-3 мес.) происходят метаболическая адаптация и формирование иммунитета, соответствующего требованиям местности, существует наиболее высокая вероятность развития вторичного иммунодефицита, что может стать причиной ослабления резистентности и снижения эффективности вакцинопрофилактики. В течение третьего периода (8-10 месяцев) происходят отелы животных. В это время выбывает 55-60% от общего количества потерь за весь период адаптации. Основными причинами выбытия являются патологические роды, гепатоз, ацидоз рубца, болезни конечностей (пододерматит, некробактериоз и др.). Четвертый этап завершается к началу третьей лактации. Основными причинами выбытия коров в течение второй и третьей лактаций являются болезни органов воспроизводства, дыхания, конечностей и печени. (Амерханов Х.А., 2018).

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 месяцев 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-месячного возраста, снижение молочной продуктивности.

Было установлено, что такие факторы, как продолжительность и вид транспортировки животных, проведение или отсутствие вакцинации в стране-экспортере, а также введение антибиотиков, не оказывали влияния на уровень заболеваемости и летальности в обследованных нами хозяйствах.

От больных, павших животных, абортированных плодов и мертворожденных телят с использованием разработанных нами тест-систем на основе ПЦР исследовали 1400 проб биоматериала и выявили спектр инфекционных агентов, представленных на рисунке 11.

Результаты исследований свидетельствуют о полиэтиологической природе выявленных патологий с доминированием вирусных агентов. Обнаружен широкий спектр патогенов, включающий возбудителей вирусной (BVDV, BoHV-1, BRSV, BoHV-4 и BPIV-3) и бактериальной (*P. multocida*, *M. haemolytica*, *H. somni*) природы.

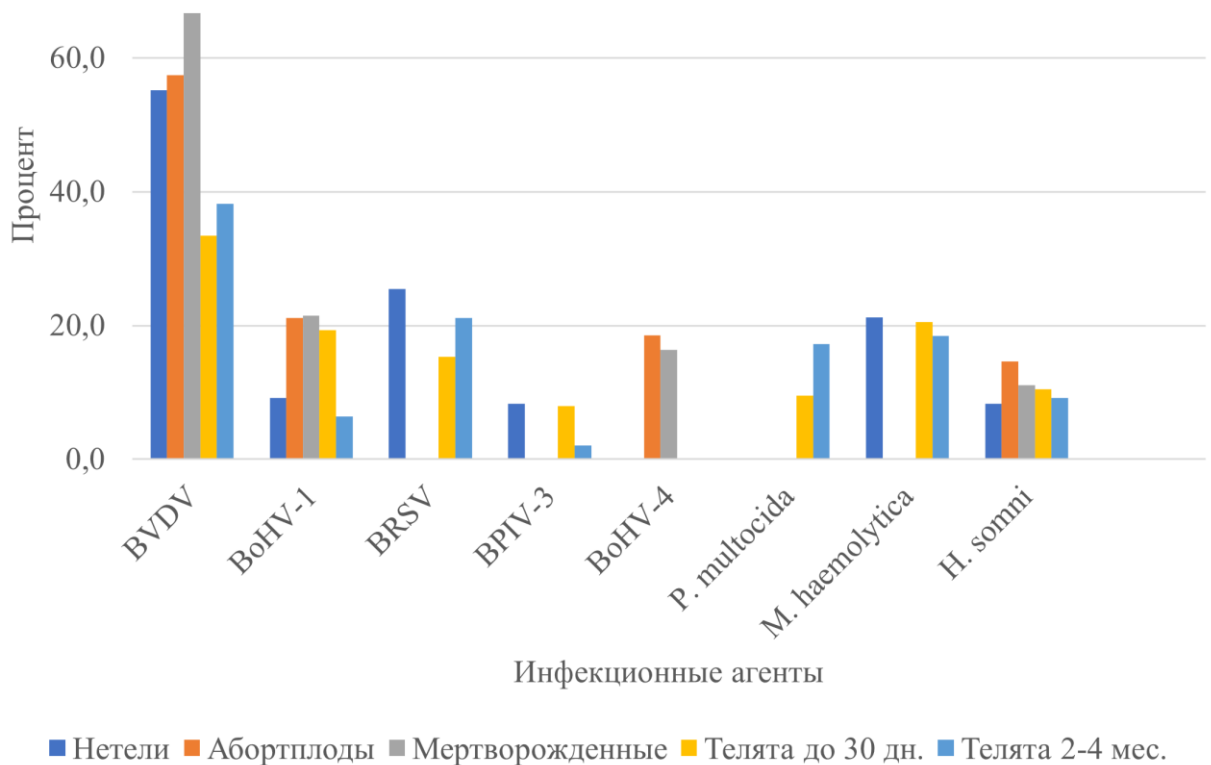


Рисунок 11 – Спектр инфекционных агентов у различных возрастных групп КРС в первые 2-3 года после комплектования импортным поголовьем, %

BVDV являлся основным этиологическим фактором репродуктивных нарушений. В частности, уровень детекции BVDV достигал 68,0% у мертворожденных телят и 57,4% у абортированных плодов. Геном BoHV-1 был идентифицирован 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. Наибольшая частота выявления BRSV отмечалась у нетелей (25,5%) и телят в возрасте 2-4-х месяцев (21,1%).

Для оценки уровня распространения персистентной формы инфекции (ПИ) BVDV на комплексах было проведено исследование модельных групп по 100-200 голов. Методом ПЦР исследовано 4850 парных проб сыворотки крови, отобранных с интервалом 4-6 недель от КРС разных возрастных групп (нетели, первотелки, коровы 2-3 лактации, а также рожденные от них телята). Для исключения острой формы ВД-БС КРС пробы сыворотки крови, содержащие геном вируса в первом исследовании, тестировали повторно через 4-6 недель. 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%, что определялось условиями содержания животных, плотностью размещения, длительности комплектования помещений, количества поступающих животных и источников поступления, частоты ввода новых животных, совместного содержания стельных животных с молодняком, отсутствия специфической профилактики болезни.

Таким образом, в условиях адаптации к новому региону у импортированного племенного скота, а также у полученного от него потомства наблюдается вы-

сокая 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*.

2.2.2.2 Этиологическая структура респираторных болезней крупного рогатого скота на молочных комплексах без импортного поголовья

В условиях интенсификации молочного животноводства возрастает значение вирусных инфекций КРС. На крупных молочных комплексах часто возникают вспышки массовых респираторных болезней молодняка, протекающие по типу энзоотической бронхопневмонии. Это связано с высокой плотностью животных, стрессом, связанным со смешиванием животных из разных групп, транспортировкой и перегруппировкой, высокой концентрацией возбудителей, что приводит к быстрому распространению инфекций и усугублению симптомов, требуя комплексных мер профилактики и лечения.

Для изучения спектра патогенов, вызывающих респираторные патологии на молочных комплексах, на которых комплектование поголовья не осуществлялось импортированными из других стран животными, исследовали 2480 проб биологического материала от животных разных возрастных групп.

Согласно нашим результатам исследования, вирусные инфекционные агенты были выявлены в 68,7% проб биоматериала от больных и павших животных с симптомами респираторных болезней. Среди респираторных вирусов доминировали BoHV-1 и BVDV. Возбудитель ВД-БС КРС, все три вида, были выявлены в 20,6% проб. Наиболее часто выявляли BVDV-1 (16,3%), реже BVDV-2 (1,5%) и BVDV-3 (2,8%). BVDV-3 был впервые выявлен в пробах биоматериала от КРС при вспышках заболевания в нескольких хозяйствах после вакцинации животных контаминированной вакциной, подробнее этот вопрос будет рассмотрен в разделе 2.2.3.2.

ВоНВ-1 был обнаружен в 14,1% проб биоматериала, ВоНВ-4 – в 11,9% проб. ВСоV выявили в 10,0% проб, BRSV и ВPIV-3 – в 6,1 и 6,0% проб соответственно.

Бактерии респираторного комплекса выделены из 79,9% проб. Так, наиболее часто выделяли *Pasteurella multocida* - в 34,3%, *Mannheimia haemolytica* – в 27,4%, реже *Histophilus somni* – в 9,8%, а *Trueperella pyogenes* – в 8,4% проб биоматериала (рисунок 12).

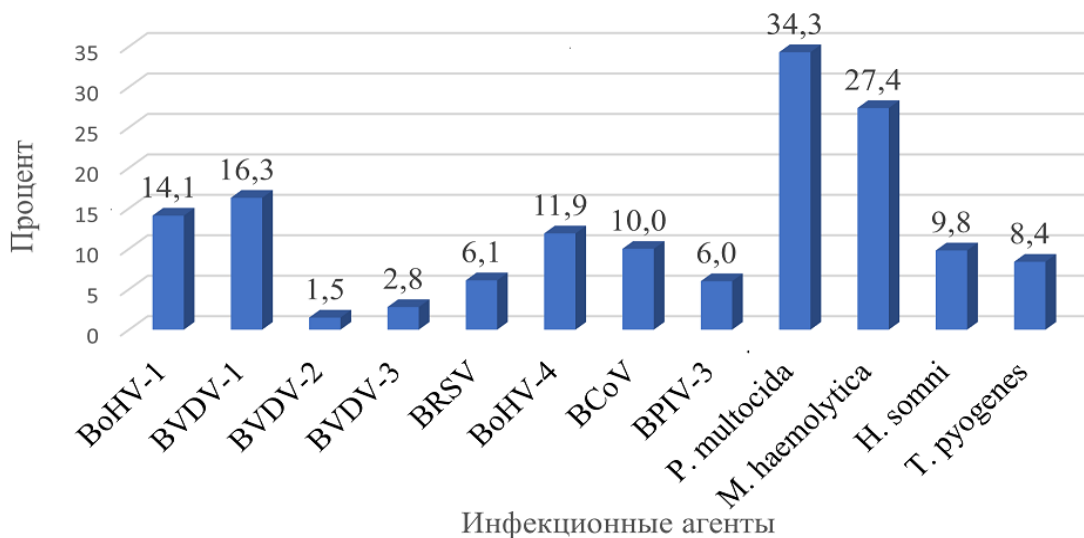


Рисунок 12 – Частота выявления инфекционных агентов при вспышках респираторных болезней КРС на крупных молочных комплексах без импорта (в % от числа исследованных проб)

Сравнение этиологической структуры респираторных инфекций у животных разных возрастных групп представлено в таблице 29.

При оценке возрастных особенностей этиологической структуры респираторных болезней выявлено, что ВоНВ-1 обнаруживали чаще у телят до 10 дней (18,0%), тогда как у телят других возрастов процент выявления составил 12,2 – 13,9%, а у коров – 15,1%.

Возбудитель ВД-БС КРС в пробах от телят до 10 дней представлен только одним видом - ВVDV-1 (12,3%). Среди телят частота выявления ВVDV-1 составила 15,9%, а коров – 18,0%.

Таблица 29 – Частота выявления инфекционных агентов при вспышках респираторных болезней КРС в пробах биоматериала на крупных молочных комплексах без импорта

Возбудитель	Возрастная группа животных, количество проб биоматериала / % положительных						
	Телята n=1990					Телята всего n=1990	Коровы, нетели n=490
	До 10 дней n=400	11-30 дней n=554	1-3 мес. n=563	4-6 мес. n=286	Старше 6 мес. n=187		
Вирусы							
BoHV-1	72/18,0	72/13,0	71/12,6	35/12,2	26/13,9	276/13,9	74/15,1
BVDV-1	49/12,3	105/19,0	92/16,3	43/15,0	28/15,0	317/15,9	88/18,0
BVDV-2	0	0	12/2,1	7/2,4	2/1,1	21/1,1	15/3,1
BVDV-3	0	12/2,2	17/3,0	9/3,1	6/3,2	44/2,2	25/5,1
BRSV	12/3,0	33/6,0	52/9,2	23/8,0	8/4,3	128/6,4	24/4,9
BoHV-4	40/10	67/12,1	68/12,1	31/10,8	30/16,0	236/11,9	60/12,2
BCoV	5/1,3	59/10,6	87/15,5	38/13,3	20/10,7	209/10,5	38/7,8
BPIV-3	11/2,8	41/7,4	47/8,3	18/6,3	9/4,8	126/6,3	23/4,7
Итого вирусы	189/47,3	389/70,2	446/79,2	204/71,3	129/69,0	1357/68,2	347/70,8
Бактерии							
<i>Pasteurella multocida</i>	112/28,0	182/32,9	211/37,5	108/37,8	72/38,5	685/34,4	165/33,7
<i>Mannheimia haemolytica</i>	61/15,3	144/26,6	175/31,1	95/33,2	50/26,7	525/26,4	154/31,4
<i>Histophilus somni</i>	23/5,8	49/8,8	60/10,7	33/11,5	24/12,8	189/9,5	55/11,2
<i>Trueperella pyogenes</i>	18/4,5	51/9,2	49/8,7	27/9,4	14/7,5	159/8,0	50/10,2
Итого бактерий	214/53,5	426/76,9	495/87,9	263/92,0	160/85,6	1558/78,3	424/86,5

BVDV-2 выявляли в группах телят 1-3 мес., 4-6 мес. и старше 6 мес. в 2,1, 2,4 и 1,1% соответственно, а коров – в 3,1% проб.

BVDV-3 у телят в среднем зарегистрирован в 2,2% проб, а частота выявления в разных возрастных категориях колебалась от 0% (у телят до 10 дней) до 3,2% (у телят старше 6 мес.), а у коров регистрировался в 5,1% проб.

BRSV редко выявлялся в пробах от телят до 10 дней (3,0%). У телят 11-30 дней, 1-3 мес, 4-6 мес. и старше 6 мес. частота его выявления составила 6,0, 9,2, 8,0 и 4,3% соответственно, а у коров геном BRSV выявлялся в 4,9% проб.

Частота верификации генома ВоНV-4 у телят и коров была примерно на одном уровне – 11,9% и 12,2%. Вирус выявляли чаще в возрастной группе телят старше 6 мес., среди телят от 11 дней до 3 мес. частота выявления составила 12,1%, 4-6 мес. и до 10 дней – 10,8 и 10,0% от общего количества исследованных проб биоматериала.

Геном ВСоV обнаруживали у телят и коров в 10,5 и 7,8% проб соответственно. При этом реже выявляли РНК коронавируса в пробах от телят до 10 дней (1,3%), а чаще всего у телят 1-3 мес. (15,5%). В возрастных группах 11-30 дней, 4-6 мес., старше 6 мес. ВСоV выявляли в 10,6, 13,3, 10,7% проб.

ВРIV-3 зарегистрирован 6,3% проб от телят и 4,7% проб от коров. Наиболее часто вирус обнаруживали в пробах телят 1-3 мес. (8,3%) и 11-30 дней (7,4%), реже в возрастных группах 4-6 мес. (6,3%) и старше 6 мес. (4,8%), а реже всего у телят до 10 дней (2,8%).

Бактериальные агенты респираторного комплекса выделены у телят и коров в 78,3 и 86,5% проб биоматериала.

Наиболее часто при респираторных инфекциях выделяли бактерию *Pasteurella multocida*. У телят до 10 дней бактерия была выделена из 28,0% проб, более старших возрастных групп – от 32,9 до 38,5% проб. В среднем *Pasteurella multocida* регистрировали у телят и коров в 34,4 и 33,7% проб.

Частоты выделения *Mannheimia haemolytica* у телят до 10 дней составила 15,3% и повышалась с возрастом животных: 11-30 дней – 26,6%, 1-3 мес. – 31,1%, 4-6 мес. – 33,2 %, старше 6 мес. – 26,7%, а у коров – 31,4%.

Histophilus somni выделяли от телят и коров в среднем из 9,5% и 11,2% проб. Реже бактерию регистрировали у телят в возрасте до 10 дней (5,8%), с возрастом частота выявления возрастала и к 6 мес. приближалась к 12,8%.

Бактерию *Trueperella pyogenes* выделяли у телят (в среднем 8%) и коров (10,2%), при этом также наблюдалось увеличение частоты выявления в зависимости от возраста: от 4,5% в возрасте до 10 дней до 9,4% к 4-6 мес.

Резюмируя вышеизложенное, на крупных молочных комплексах с местным скотом широко распространены как вирусные (68,7%), так и бактериальные

(79,9%) агенты, вызывающие комплекс респираторных болезней крупного рогатого скота.

2.2.2.2.1 Ассоциации респираторных патогенов у крупного рогатого скота на молочных комплексах без импортного поголовья

Оценили распространенность смешанных и моноинфекций при респираторных болезнях среди крупного рогатого скота на крупных молочных комплексах без импорта животных.

Результаты исследования показали, что на крупных молочных комплексах без импорта скота одновременно вирусные и бактериальные агенты респираторного комплекса выявили в 46,5% проб. Эти ассоциации включали различные комбинации 1-2 вирусов и бактерии.

Доля проб биоматериала, содержащих вирусы в моноварианте, составила 18,1%. При этом BoHV-1 в моноварианте выявлен в 23,5%, BVDV-1 – в 18,8%, BRSV - в 18,6%, BVDV-2 – в 2,7%, BVDV-3 – в 11,3%, BoHV-4 – в 7,8%, BCoV - в 2,1%, BPIV-3 – в 5,8% проб от общего количества проб, содержащих вирусы в моноварианте (рисунок 13).

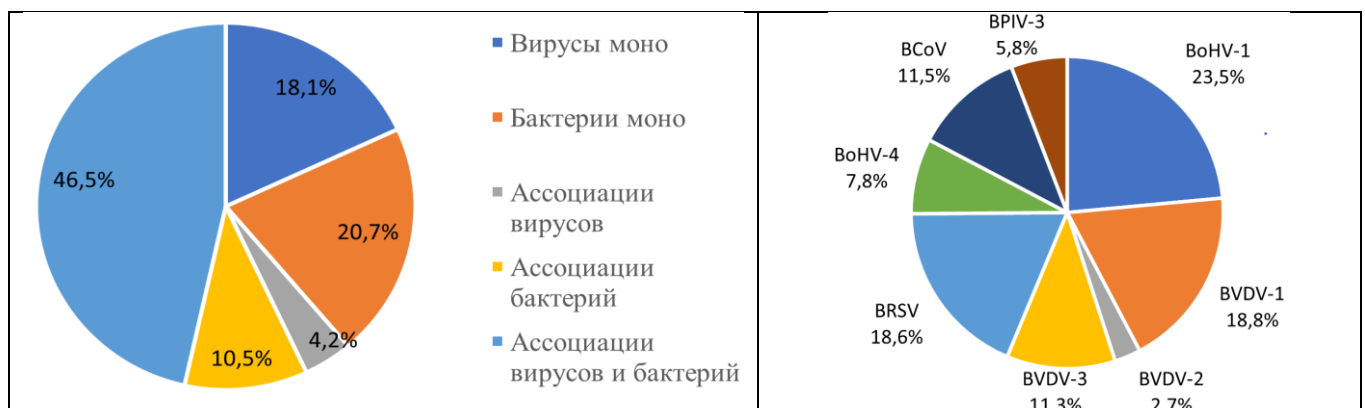


Рисунок 13 – Частота встречаемости моно- и микст-инфекций и видовой состав вирусных агентов при моноинфекции на комплексах без импортного скота

Бактерии в моноварианте выявили в 20,7% проб. Чаще выделяли *Pasteurella multocida* (43,1%), *Mannheimia haemolytica* (38,8%), реже *Histophilus somni* (11,8%) и *Trueperella pyogenes* (6,3%) проб. Ассоциации бактерий присутствовали в 10,5% проб.

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%) (рисунок 14).

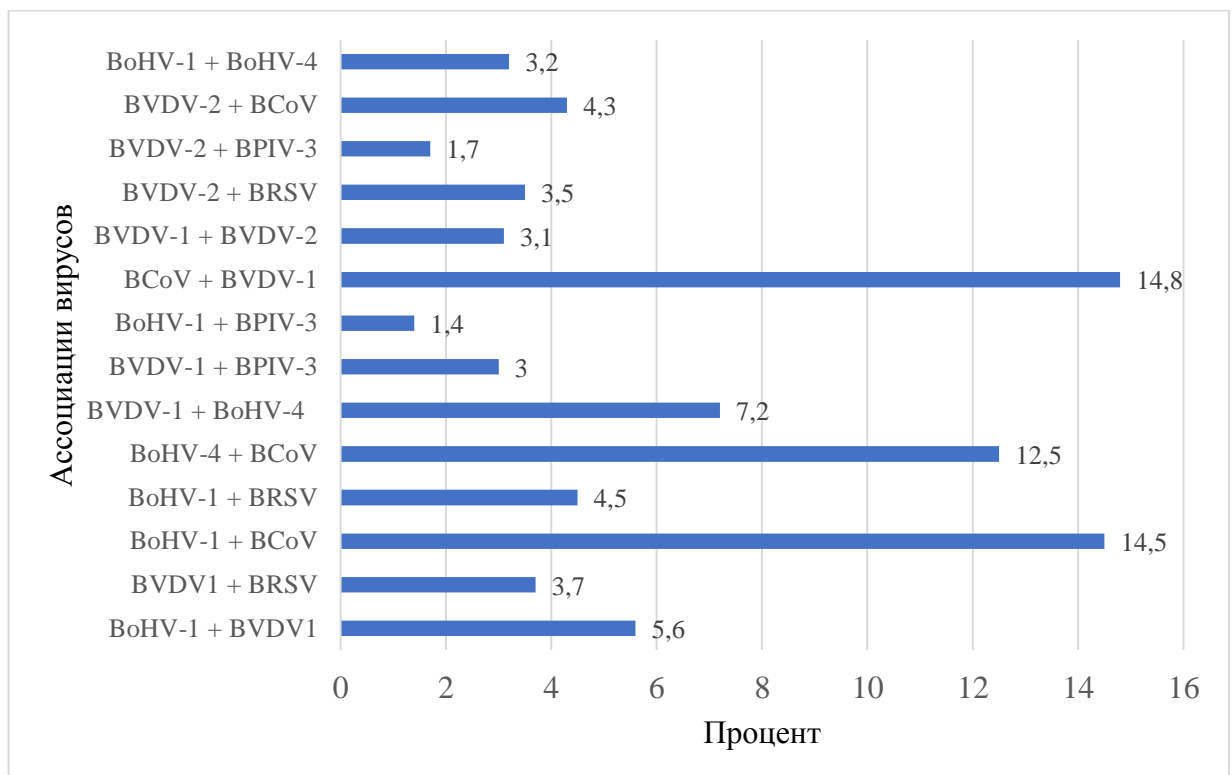


Рисунок 14 – Частота выявления вирусных ассоциаций при вспышках респираторных болезней на крупных молочных комплексах без импортного скота (в % от всех вирусных ассоциаций)

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что на крупных молочных комплексах без импорта наиболее часто встречаются вирусно-бактериальные ассоциации (46,5%), бактерии в моноварианте присутствуют в большем количестве проб, чем вирусы (20,7% против 18,1%).

2.2.2.3 Этиологическая структура респираторных болезней крупного рогатого скота на мелких товарных фермах

На мелких фермах за счет меньшего поголовья животных и более тщательного контроля есть возможность своевременного выявления и изоляции больных животных, а также поддержки более благоприятных условий содержания, что снижает риск распространения вирусных инфекций. В отличие от крупных комплексов, где болезни имеют тенденцию к быстрому массовому распространению, на мелких фермах они распространяются медленнее и в меньших масштабах.

Пробы биоматериала отбирали от больных и павших животных с признаками респираторных болезней из 59 мелких молочных товарных ферм с поголовьем до 300 дойных коров и продуктивностью 3000-4000 л молока, в которых последнее несколько лет не происходило ввода новых животных, из всех вышеперечисленных областей и краев. Всего исследовали 1629 проб биоматериала от животных разных возрастных групп.

В результате проведенных исследований установили присутствие широкого спектра вирусов респираторного комплекса в 47,1% проб биоматериала, а бактерий – в 88,7%.

Возбудители ВД-БС КРС были обнаружены в 232 пробах (14,2%) и были представлены BVDV-1 (11,2%), BVDV-2 (2,1%), BVDV-3 (0,9%). На втором месте по частоте выявления находился BoHV-4 (9,5%). BoHV-1 детектировали в 8,3% проб, BCoV – в 6,3%, BPIV-3 и BRSV – 4,7 и 4,1% соответственно.

Среди бактериальных агентов наиболее часто выделяли *Pasteurella multocida* (22,9%), *Salmonella spp.* (19,5%) и *Mannheimia haemolytica* (18,5%). *Escherichia coli* обнаружена в 10,0% исследованных проб, *Streptococcus pneumoniae* – в 6,5%, *Histophilus somni* – в 6,3%, а *Trueperella pyogenes* – в 5,0% (рисунок 15).



Рисунок 15 – Частота выявления инфекционных агентов при вспышках респираторных болезней КРС на мелких товарных фермах (в % от числа исследованных проб)

Для изучения особенностей этиологической структуры респираторных болезней проанализировали частоту выявления инфекционных агентов у животных разных возрастных групп: телят до 10 дней ($n=250$), 11-30 дней ($n=370$), 1-3 мес. ($n=382$), 4-6 мес. ($n=220$), старше 6 мес. ($n=112$) и коров и нетелей ($n=295$) (таблица 30).

При оценке возрастных особенностей этиологической структуры респираторных болезней установили, что среди телят чаще регистрировали ВД-БС КРС (10,5%), при этом наиболее распространенный возбудитель BVDV-1 (7,6%). Среди коров также часто диагностировали ВД-БС КРС (13,5%), частота выявления BVDV-1 составила 9,5%. BVDV-1 реже выявляли у телят до 10 дней (6,0%), у более старших телят вирус регистрировали в 7,3-8,6% проб.

BVDV-2 в пробах от телят и коров регистрировали примерно на одинаковом уровне - 2,2 и 2,0% соответственно. В зависимости от возраста частота выявления менялась незначительно (2,0-2,1% у телят с рождения до 3 мес., 1,8% у телят 4-6 мес. и 3,6% у телят старше 6 мес.

Таблица 30 – Частота выявления инфекционных агентов при вспышках респираторных болезней КРС в пробах биоматериала на мелких товарных фермах в 2015-2024 гг.

Возбудитель	Возрастная группа животных, количество проб биоматериала / % положительных						
	Телята n=1334					Телята всего n=1334	Коровы, нетели n=295
	До 10 дней n=250	11-30 дней n=370	1-3 мес. n=382	4-6 мес. n=220	Старше 6 мес. n=112		
Вирусы							
BoHV-1	26/10,4	31/8,4	30/7,9	18/8,2	8/7,1	113/8,5	22/7,5
BVDV-1	15/6,0	27/7,3	33/8,6	18/8,2	9/8,0	102/7,6	28/9,5
BVDV-2	5/2,0	8/2,2	8/2,1	4/1,8	4/3,6	29/2,2	6/2,0
BVDV-3	0	0	4/1,1	3/1,4	2/1,8	9/0,7	6/2,0
BRSV	0	12/3,2	23/6,0	15/5,9	5/4,5	55/4,1	11/3,7
BoHV-4	22/8,8	32/8,7	39/10,2	22/10,0	9/8,0	124/9,3	30/10,2
BCoV	5/2,0	30/8,1	38/9,9	15/6,8	5/4,5	93/7,0	10/3,4
BPIV-3	5/2,0	15/4,1	24/6,3	14/6,4	5/4,5	63/4,7	14/4,8
Итого вирусы	78/31,2	155/41,9	199/52,1	109/49,5	47/42,0	588/44,1	127/43,1
Бактерии							
<i>Pasteurella multocida</i>	33/13,2	87/23,5	92/24,1	52/23,6	28/25,0	292/21,9	81/27,5
<i>Mannheimia haemolytica</i>	20/8,0	63/17,0	70/18,3	43/19,5	21/18,8	217/16,3	85/28,8
<i>Histophilus somni</i>	8/3,2	19/5,1	28/7,3	14/6,4	11/9,8	80/6,0	32/10,8
<i>Trueperella pyogenes</i>	7/2,8	13/3,5	18/4,7	10/4,5	9/8,0	57/4,3	24/8,1
<i>Salmonella spp.</i>	62/24,8	102/27,6	94/24,6	35/15,9	8/7,1	301/21,8	17/5,8
<i>Escherichia coli</i>	60/24,0	66/17,8	37/9,7	0	0	163/12,2	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	48/19,2	35/9,5	19/5,0	4/1,8	0	106/7,9	0
Итого бактерии	238/95,2	385/104,1	358/93,7	158/71,8	77/68,8	1216/91,2	229/77,6

Инфицирование животных BVDV-3 в мелких хозяйствах было также, как и на крупных комплексах без завоза импорта, связано с заносом возбудителя в стадо через вакцинацию контаминированной вакциной. Вирус выявляли у телят старше 1 мес. в 1,1-1,8% проб, среднее значение 0,7%, а у коров – в 2,0% проб. Вирус РСИ КРС выявляли в пробах от телят 11-30 дней (3,2%), 1-3 мес. (6,0%), 4-6 мес. (5,9%), старше 6 мес. (4,5%), итого в среднем среди телят в 4,1%, а коров –

3,7%. Частота выявления ВоНV-4 среди телят и коров составило 9,3 и 10,2%, при этом среди разных возрастных групп телят наблюдался почти одинаковый уровень – от 8,0% до 10,2%. ВСоV наиболее часто выявляли в пробах от телят 1-3 мес. и 11-30 дней (9,9 и 8,1%), реже всего – у телят до 10 дней (2,0%) и коров (3,4%). Вирус парагриппа-3 КРС обнаруживали чаще в пробах от телят 1-3 мес. (6,3%) и 4-6 мес. (6,4%), реже – от телят до 10 дней (2,0%), а в среднем у телят в 4,7% проб. 4,8% проб от коров содержали ВPIV-3.

Частота выявления вирусов респираторного комплекса составила среди телят 44,1%, а коров – 43,1%.

Бактерия *Pasteurella multocida* была выявлена у телят в возрастной группе до 10 дней в 13,2% проб, далее частота выявления возрастала и составляла 23,5-25,0%, а у коров – 27,5%. Частота выделения *Mannheimia haemolytica* у телят до 10 дней составляла 8,0%, а в среднем среди телят – 16,3%, а у коров – 28,8%. *Histophilus somni* был выделен из проб от телят в среднем в 6,0% с наименьшей частотой в возрасте до 10 дней 3,2% и наибольшей – у телят старше 6 мес. (9,8%), а у коров – в 10,8% проб. *Trueperella pyogenes* обнаруживали чаще в пробах от коров – 8,1%, частота выявления данного патогена увеличивалась с возрастом – от 2,8% в возрасте до 10 дней до 8,0% у телят старше 6 мес. *Salmonella spp.* – один из наиболее встречающихся патогенов среди телят в мелких хозяйствах. Наиболее часто бактерию выделяли из проб от телят до 10 дней (24,8%), 11-30 дней (27,6%), 1-3 мес. (24,6%), реже у телят 4-6 мес. (15,9%) и старше 6 мес. (7,1%). У коров *Salmonella spp.* выделили из 5,8% проб. *Escherichia coli* выделили из 12,2% проб от телят: до 10 дней – 24,0%, 11-30 дней – 17,8%, 1-3 мес. – 9,7%. *Streptococcus pneumoniae* чаще всего выявляли у телят до 10 дней (19,2%), а в среднем среди телят до 6 мес. в 7,9% проб.

Ограниченная численность поголовья и минимизация заноса экзогенных вирусных патогенов на малые предприятия способствуют снижению интенсивности циркуляции вирусных инфекций. Вместе с тем, дефицит строгого контроля за соблюдением ветеринарно-санитарных регламентов и зоогигиенических стандар-

тов обуславливает превалирование патологий бактериальной этиологии в структуре заболеваемости.

2.2.2.3.1 Ассоциации респираторных патогенов у крупного рогатого скота на мелких товарных фермах

На мелких товарных фермах при респираторных инфекциях в 37,9% проб биоматериала от животных установили присутствие ассоциаций вирусов и бактерий в различных комбинациях, чаще включающих один вирус и 1-2 бактерии. Бактерии в моноварианте выявлены в 32,7% проб, а вирусы – в 4,9%. Бактериальные ассоциации детектировали в 23,4% проб биоматериала, а вирусные ассоциации – только в 1,1% проб (рисунок 16).

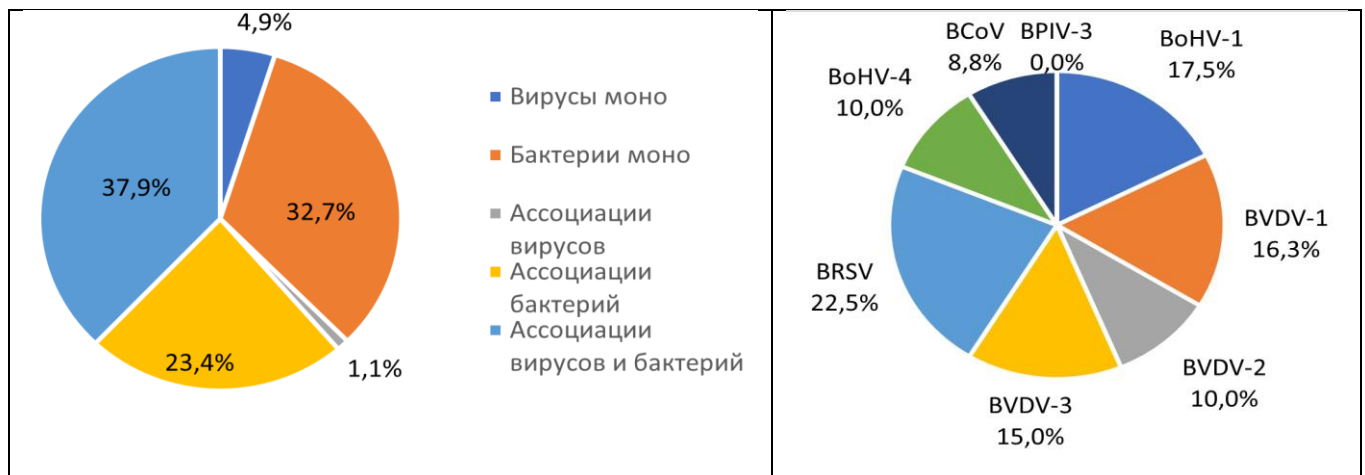


Рисунок 16 – Частота встречаемости моно- и микст-инфекций и видовой состав вирусных агентов при моноинфекции на мелких товарных фермах

Из рисунка 16 видно, что 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 вирус парагриппа-3 обнаруживали только совместно с бактериями.

Как единственный инфекционный агент бактерии в пробах биоматериала из данной категории хозяйств были обнаружены в 32,7% проб. В структуре бактериальных моноинфекций на первом месте находилась бактерия *Salmonella spp.* (37,7%), реже выделяли *Escherichia coli* (18,6%), *Pasteurella multocida* (15,4%), *Streptococcus pneumoniae* (13,5%), *Mannheimia haemolytica* (12,0%), *Histophilus somni* (3,8%). Бактерию *Trueperella pyogenes* выделяли только в ассоциациях с другими вирусами или бактериями.

Сочетания двух вирусов обнаружили в 1,1 % проб, чаще это были комбинации коронавируса КРС с другими вирусами: BVDV-3 и BCoV, BVDV-2 и BCoV, BVDV-1 и BCoV, BoHV-1 и BCoV, BoHV-4 и BCoV, а также BoHV-1 и BPIV-3, BVDV-3 и BoHV-4 (рисунок 17).

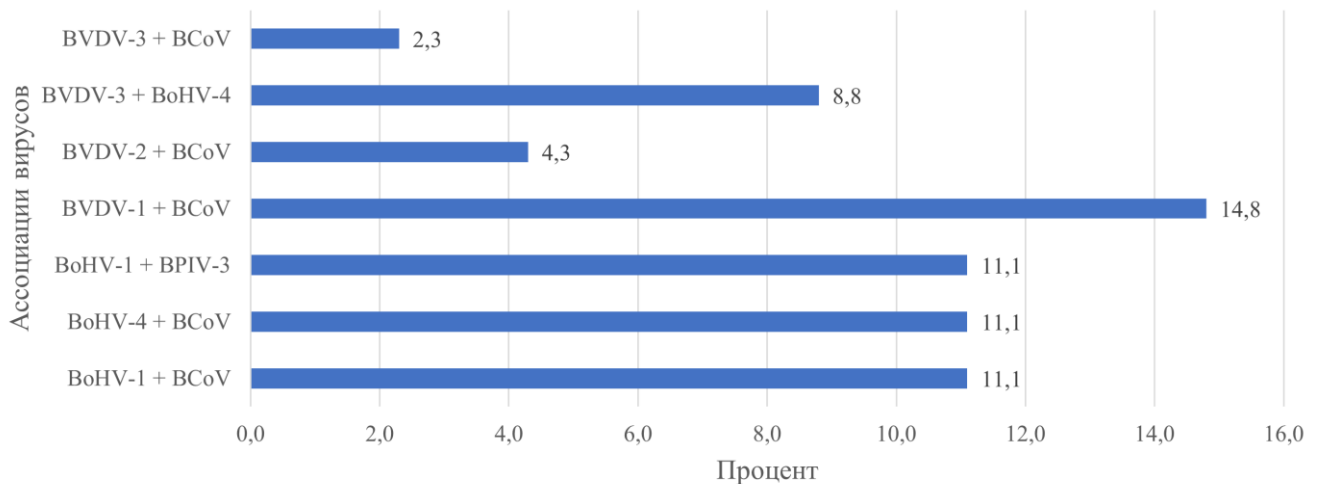


Рисунок 17 – Частота выявления вирусных ассоциаций при вспышках респираторных болезней на мелких товарных фермах (в % от всех вирусных ассоциаций)

Таким образом, установлено, что на мелких фермах в возникновении респираторных болезней чаще участвуют вирусно-бактериальные ассоциации (37,9%) и бактерии в моноварианте (32,7%), реже – вирусы в моноварианте (4,9%) и ассоциациях (1,1%).

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

BVDV у стельных животных вызывает репродуктивные патологии и рождение иммунотолерантных, персистентно инфицированных телят, которые выделяют вирус на протяжении всей жизни и являются основным источником передачи и поддержания вируса в популяции крупного рогатого скота. Кроме того, клинические проявления ВД-БС КРС включают диарею, лихорадку, респираторные патологии, болезнь слизистых оболочек.

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

ВД-БС КРС широко распространена среди крупного рогатого скота в России. Известно, что BVDV-2 вызывает более тяжелые случаи клинического течения заболевания (Ridpath J.F., 2010). Инфицирование крупного рогатого скота одновременно двумя видами вируса ВД-БС КРС (BVDV-1 и BVDV-2) было описано в экспериментальных исследованиях (Arenhart S. et al., 2010; Makoschey V., Janssen M.G.J., 2011; Larska M. et al., 2012) и в естественных условиях зарубежными исследователями (Fulton R.W. et al., 2000; Evermann J.F., Ridpath J.F., 2002; Ahn B.C. et al., 2005). В доступной отечественной литературе отсутствует информация о выявлении смешанной инфекции разных видов BVDV.

На молочном комплексе в одной из областей Сибири после завоза 138 нетелей из США зарегистрировали вспышку вирусной диареи. Клинические признаки включали аборт, рождение слабого нежизнеспособного молодняка, эрозии носового зеркальца и десен, диарею и респираторные болезни среди завезенных нетелей, а через несколько месяцев – и среди местного поголовья. У павших телят в возрасте до 10 дней на вскрытии регистрировали геморрагическое воспаление и полосчатые эрозии в кишечнике, кровоизлияния в эпикарде и миокарде. У телят в возрасте 3-6 мес., рожденных от местных коров, выявляли признаки острых ре-

спираторных заболеваний. Заболеваемость составила 60-80%, а смертность – 50%. В течение года 250 телят, в том числе от импортного и местного скота, пало от острой бронхопневмонии, а также 50% импортированных и 20% местных нетелей.

С помощью разработанной тест-системы для выявления и дифференциации пестивирусов КРС исследовали 114 проб биоматериала от абортированных плодов и павших телят в возрасте до 10 дней и 3-6 мес. Результаты выявления геномов пестивирусов представлены на рисунке 18.

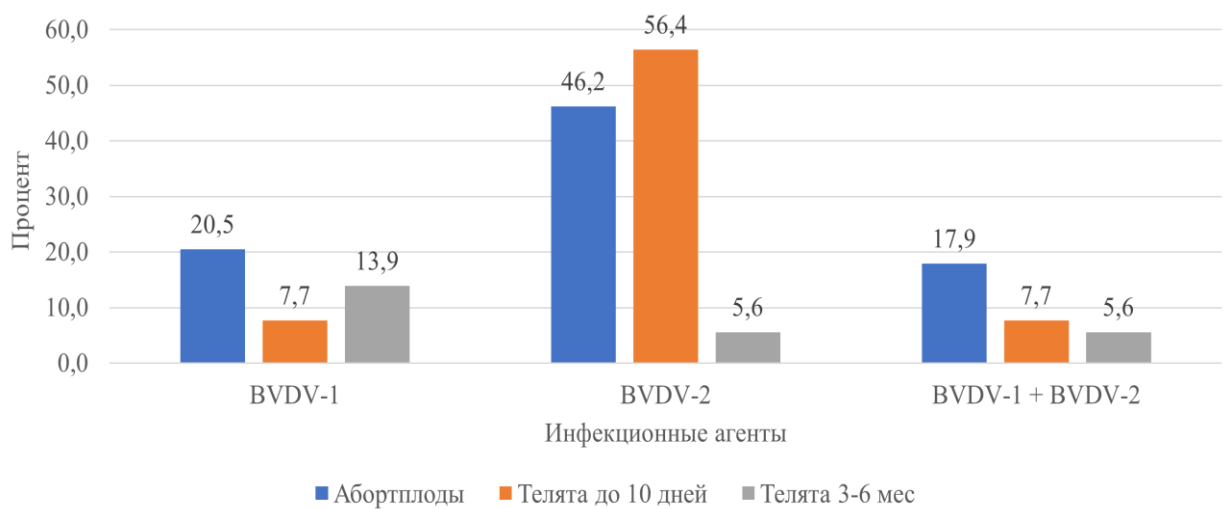


Рисунок 18 – Частота выявления геномов пестивирусов в органах абортплодов и телят методом ОТ-ПЦР, в %

Наши исследования показали, что геномы вирусов ВД-БС КРС двух видов 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%. Наличие двух вирусных агентов в организме создает условия для их синергетического взаимодействия.

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.

Филогенетическая дендрограмма изолятов BVDV, обнаруженных во время вспышки, представлена на рисунке 19. Изолят T41/17 идентифицировали как BVDV-1b, а T15/17 – BVDV-2a.

Таким образом, нами доказана возможность возникновения смешанных инфекций BVDV-1 и BVDV-2 в естественных условиях после импорта животных из-за рубежа. При этом у телят в возрасте 3-6 мес. чаще выявляли BVDV-1, а BVDV-2 – у абортированных плодов и телят до 10 дней с признаками системной инфекции и диареи, что может быть связано с более широким тропизмом к органам плодов и новорожденных телят, включая ткани лимфоидной системы и головного мозга, незрелостью иммунной системы, а также внутриутробным инфицированием нецитопатогенным биотипом вируса.

Сочетанная циркуляция вирусов BVDV1 и BVDV2 в популяции животных приводит к утяжелению клинической картины заболевания, росту уровня заболеваемости и смертности. Кроме того, данное явление способствует ускользанию патогенов от защитных механизмов иммунной системы и, как следствие, снижению протективного действия применяемых вакцин. Это обуславливает необходимость обязательного учета возможности смешанных инфекций, как при проведении диагностических процедур, так и при разработке стратегий противоэпизоотических мероприятий и выборе вакцинных препаратов.

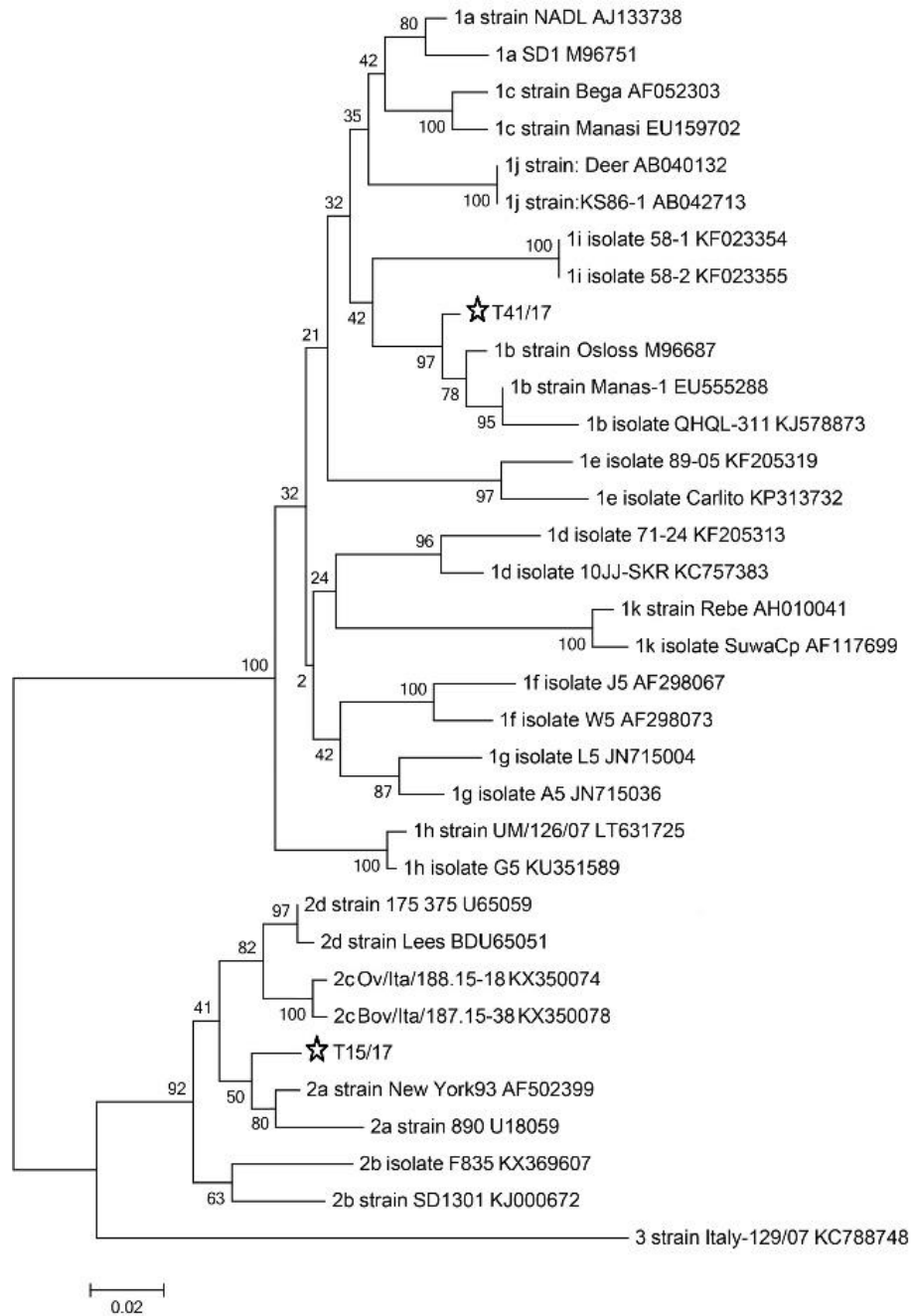


Рисунок 19 – Филогенетическое дерево, построенное в программе MEGA 6 на основе данных о нуклеотидной последовательности области 5' UTR генома BVDV. Топология дерева восстановлена методом ближайших соседей. Матрица генетических расстояний рассчитана методом минимальной эволюции. Указаны индексы статистической поддержки узлов, бутстрэп тест рассчитан для 1000 реплик

2.2.3.2 Характеристика BVDV-3 инфекции в молочных хозяйствах

Роль пестивирусов BVDV-1 и BVDV-2 в патологии КРС хорошо изучена многими исследователями, в том числе в России. Для выявления этих вирусов разработаны и широко используются диагностические тест-системы, для профилактики применяют вакцины.

BVDV-3 в нашей стране не регистрировался. Ранее нами этот вирус был выявлен в образцах эмбриональной сыворотки (раздел 2.2.1.1).

В 2019-2021 гг. впервые 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 животных в данных хозяйствах живой вакциной против нодулярного дерматита. От павших и вынужденно убитых животных с различными клиническими синдромами отобрали пробы биологического материала и исследовали на наличие геномов вирусов с помощью разработанных тест-систем.

Результаты исследования показали (таблица 31), что у животных во всех трех хозяйствах выявлен геном BVDV-3. Так, в хозяйстве № 1 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 ВоHV-4. Вирус нодулярного дерматита в исследованных пробах биологического материала не был обнаружен. В хозяйстве №2 зарегистрировали смешанную инфекцию BVDV-3 и нодулярного дерматита в содержимом подкожных пузырьков. В хозяйстве №3 в пробах биоматериала от абортированных плодов выявили геном BVDV-3 в моноварианте.

Таблица 31 – Результаты исследования биологического материала от животных во время вспышек BVDV-3 инфекции

Хозяйство	Возрастная группа заболевших животных	Клинические признаки и патолого-анатомические изменения	Результаты исследования
№1	коровы	Аборты на разных сроках, снижение показателя оплодотворяемости	BVDV-3 в мозге, легких, селезенке, лимфатических узлах, почках, кишечнике, желудке абортплодов
	Телята 1,5 и 3-4 мес.	Анорексия, поражение слизистых ротовой полости и носа, пенистые выделения из ротовой полости, конъюнктивит, диарея, респираторные болезни. Воспалительные и эрозивные поражения слизистых оболочек пищевода, сычуга и кишечника	BVDV-3 в селезенке, легких, лимфатических узлах, кишечнике BoHV-4 в легких, селезенке, лимфатических узлах, почках, печени
	Телки 1 год	Анорексия, конъюнктивиты, диарея, истощение. Эрозии и геморрагическое воспаление тонкого отдела кишечника, кровоизлияния в селезенке и геморрагическое воспаление почек, увеличение и воспаление регионарных лимфатических узлов	
№2	Телята 1-4 мес.	Узелки в области головы и крестца. Отек гортани и носовой полости, большое количество узелков на слизистой оболочке ротовой полости, гортани и пищевода	BVDV-3 в содержимом подкожных пузырьков Вирус нодулярного дерматита в крови и содержимом подкожных пузырьков
№3	коровы	аборты	BVDV-3 в мозге, легких, селезенке, лимфатических узлах, почках, кишечнике, желудке абортплодов

В трех сериях живой вакцины против нодулярного дерматита крупного рогатого скота, которые применяли в описываемых хозяйствах, методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени выявили наличие генома BVDV-3. Низкая детекция вируса нодулярного дерматита при одновременном выявлении BVDV-3 в исследованных пробах свидетельствует о доминирующем течении вирусной диареи в обследованных животноводческих хозяйствах.

Таким образом, нами впервые в РФ была зафиксирована и описана вспышка инфекции, вызванная BVDV-3, в естественных условиях в трех крупных молочных хозяйствах. Установлено, что причиной заноса вируса в хозяйства, которые ранее считались благополучными, стала контаминированная живая вакцина. Клинические признаки, зарегистрированные у животных в возрасте от нескольких дней до нескольких лет, проявлялись системной инфекцией, энтеритами, болезнью слизистых оболочек, респираторным синдромом, абортами, снижением оплодотворяемости, увеличением сервис-периода, активизацией условно-патогенной микрофлоры.

Данные исследования обосновывают необходимость оптимизации методов лабораторной диагностики пестивирусных инфекций крупного рогатого скота и усиления контроля качества биопрепаратов для исключения их контаминации вирусами диареи.

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

Коронавирусы крупного рогатого скота (BCoV) вызывают диарею новорожденных телят, зимнюю дизентерию коров и респираторные инфекции животных разных возрастов. Все изоляты BCoV выделяются с фекалиями и носовыми выделениями и принадлежат к одному серотипу/генотипу на основании анализа перекрестной нейтрализации вируса и генотипирования независимо от клинического происхождения (Vlasova A.N., Saif L.J., 2021).

Исследования проводили в 2018-2022 гг. в молочных хозяйствах из нескольких областей СФО в период вспышек массовых респираторных и желудочно-кишечных болезней. Отобрали 1508 проб биоматериала от 116 телят в возрасте до 6 месяцев и исследовали с помощью разработанных тест-систем на основе ПЦР для выявления вирусов респираторного комплекса.

Геном BCoV выявили в 11,8% исследованных проб биологического материала от телят с респираторным и диарейным синдромом.

Как видно из рисунка 21, BCoV детектировали чаще у телят с желудочно-кишечными заболеваниями (16,3%), чем у телят с респираторной патологией (9,9%), что может указывать на предпочтительный тропизм возбудителя к органам желудочно-кишечного тракта. При гастроэнтеритах вирус чаще присутствовал у телят в возрасте до 10 дней (9,5%), а при респираторном синдроме – 30-60 дней (6,1%).

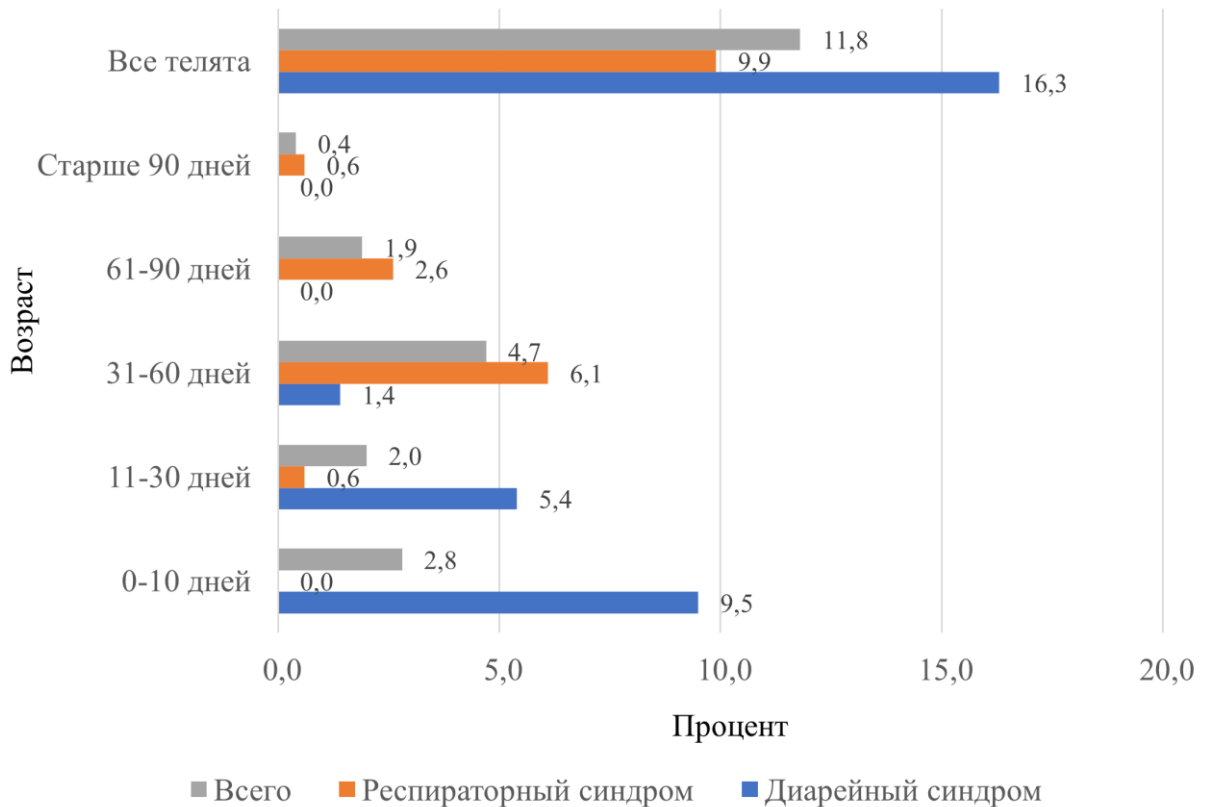


Рисунок 21 – Частота выявления BCoV методом ОТ-ПЦР-РВ в пробах биоматериала от телят разных возрастных групп, в %

Данные исследования демонстрируют дифференцированное распространение генома BCoV: при диарее он выявляется во всех отделах ЖКТ, брыжеечных лимфатических узлах, крови, реже в паренхиматозных органах, при этом в респираторном тракте не обнаруживается (рисунок 22). При респираторном синдроме доминирует выявление вируса в легких, трахеобронхиальном экссудате, легочных лимфоузлах, крови (рисунок 23). Обнаружение 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.



Рисунок 22 – Выявление ВCoV в органах телят при диарейном синдроме, в %



Рисунок 23 – Выявление ВCoV в органах телят при респираторном синдроме, в %

При диарейном синдроме в пробах биоматериала, содержащих BCoV, было выявлено 7 инфекционных агентов. Результаты исследования показали статистически значимую корреляцию между наличием коронавируса и присутствием ротавируса КРС, *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 этом вирусы ВД-БС КРС, ВГ-4 КРС, а также *Streptococcus pneumoniae* и клостридии, как правило, чаще встречались в пробах, не содержащих коронавирус. Тем не менее, эта тенденция не достигла уровня статистической достоверности ($p > 0,05$).

Исследование выявило 8 возбудителей респираторного синдрома. Наиболее частыми ко-патогенами, ассоциированными с коронавирусом, были *P. multocida* (61,1% случаев) и *M. haemolytica* (44,4%). Также были обнаружены вирусы ИРТ (33,2%) и ВД-БС (28,3%) КРС, и *Streptococcus pneumoniae* (33,5%). Расчет коэффициента Пирсона показал достоверную положительную корреляцию между коронавирусом, *P. multocida* и *M. haemolytica* (0,388-0,361 при $p < 0,05$). Эти результаты подтверждают синергизм между данными агентами и повышение способности бактерий к колонизации респираторного тракта в присутствии вируса. В отличие от этого, статистически значимая взаимосвязь между одновременным выявлением коронавируса и другими исследованными возбудителями (BoHV-1, BVDV, BRSV, BoHV-4, бактерии *S. dublin* и *Streptococcus pneumoniae*) не была установлена ($p > 0,05$). Это позволяет сделать вывод, что коронавирус, вероятно, не играет основной роли в качестве этиологического агента респираторного комплекса КРС.

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 ВоHV-1 и BVDV

BVDV и ВоHV-1 – вирусные инфекционные агенты, которые могут передаваться через сперму крупного рогатого скота во время естественного спаривания и при искусственном осеменении (El-Mohamady R.S. et al., 2020).

Вирусы свободно присутствуют в плазме семенной жидкости или прикрепляются к головке сперматозоида, сохраняясь в течение многих лет в замороженных эякулятах.

BVDV реплицируется в семенных пузырьках, предстательной железе и яичках быка, что приводит к персистирующей инфекции, при этом сперма становится потенциальным источником инфекции (Newcomer B.W. et al., 2014). У коров, оплодотворенных спермой быка с персистентной инфекцией (ПИ), наблюдался более низкий процент зачатия – 38% по сравнению с 66% у коров, оплодотворенных спермой быка без вируса ВД КРС (Kirkland P.D. et al., 1994).

У быков вирус ИРТ КРС реплицируется в слизистой оболочке препуция, пениса и уретры. При ИРТ КРС источником возбудителя инфекции являются быки-производители, у которых заболевание протекает в латентной форме без проявления клинических признаков. Такие быки могут выделять инфекционный вирус в течение всей жизни периодически во время реактивации латентного вируса (Глотов А.Г. и соавт., 2006).

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

В 2003-2004 гг. исследовали пробы спермы от выбракованных в 1985-2002 годах в связи с окончанием срока эксплуатации 116 быков (1356 серий) только на ИРТ КРС. В 469 (34,6%) сериях от 33 (28,4%) быков выявили вирус ВоНV-1. Степень контаминации банка спермы вирусом в разные годы составила 16,7-67,6%.

В 2004-2005 гг. изучали образцы спермы от 27 живых быков-производителей, находящихся в эксплуатации, на контаминацию ВоНV-1 и BVDV. В результате исследования 324 серии спермы, полученных в течение двух лет с интервалами в 6 мес., оба вируса обнаружили у 10 быков, причем ВоНV-1 присутствовал в 56 (17,3%) сериях, а BVDV – в 80 (24,7%). По результатам проведенных лабораторных исследований быки-производители не подлежали выбраковке, однако серии спермопродукции, давшие положительный результат на наличие вирусных патогенов, были утилизированы. Серии спермы, свободные от возбудителей, допускали к использованию для искусственного осеменения маточного поголовья в хозяйствах.

В 2006-2021 гг. исследовали 11746 серий спермы от 131 быка на два вируса. ВоНV-1 выявили в 2014 г. у двух (1,5%) завезенных быков в четырех (0,03%) эякулятах, а BVDV – в 2019 г. у одного (0,8%) быка в 10 (0,09%) пробах. По результатам исследований быка-производителя, в сперме которого выявили BVDV, выбраковали.

Итого, анализ 13426 образцов спермы от 274 быков показал присутствие ВоНV-1 у 16,4% быков (3,98% серий), а BVDV – у 4,01% быков (0,41% серий), подтверждая наличие данных патогенов в популяции быков-производителей.

В молочных хозяйствах среди коров и нетелей, которых осеменяли контаминированными вирусами ИРТ и ВД-БС КРС сериями спермы, регистрировали вспышки гинекологических болезней, проявляющиеся вульвовагинитами, аборт-

тами, эндометритами, рождением нежизнеспособных телят. При исследовании проб вагинальных выделений от 100 коров и 50 нетелей методом ПЦР ВоHV-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. Для установления роли инфицированной спермы в распространении указанных вирусов провели анализ генетических вариантов, выявленных у изолятов вирусов из спермы и выделений от коров.

Результаты ПЦР-ПДРФ анализа показали идентичность рестрикционных профилей ампликонов изолятов ВоHV-1, выделенных из спермы и выделений от коров. Установлено, что данные изоляты принадлежат к «респираторному» субтипу 1.1, который ассоциируется с высокой частотой абортос 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 образцов спермы, свидетельствует об их филогенетическом родстве (рисунок 24).

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

Анализируя результаты данного раздела, можно сделать заключение, что на неблагополучных по вирусам племпредприятиях возможно комплектовать банки спермы от инфицированных быков, исследуя на вирусы ИРТ и ВД-БС КРС все серии спермы с интервалом в 6 месяцев и выбраковывая инфицированные серии, используя для осеменения коров в хозяйствах не содержащие вирусов серии спермы.

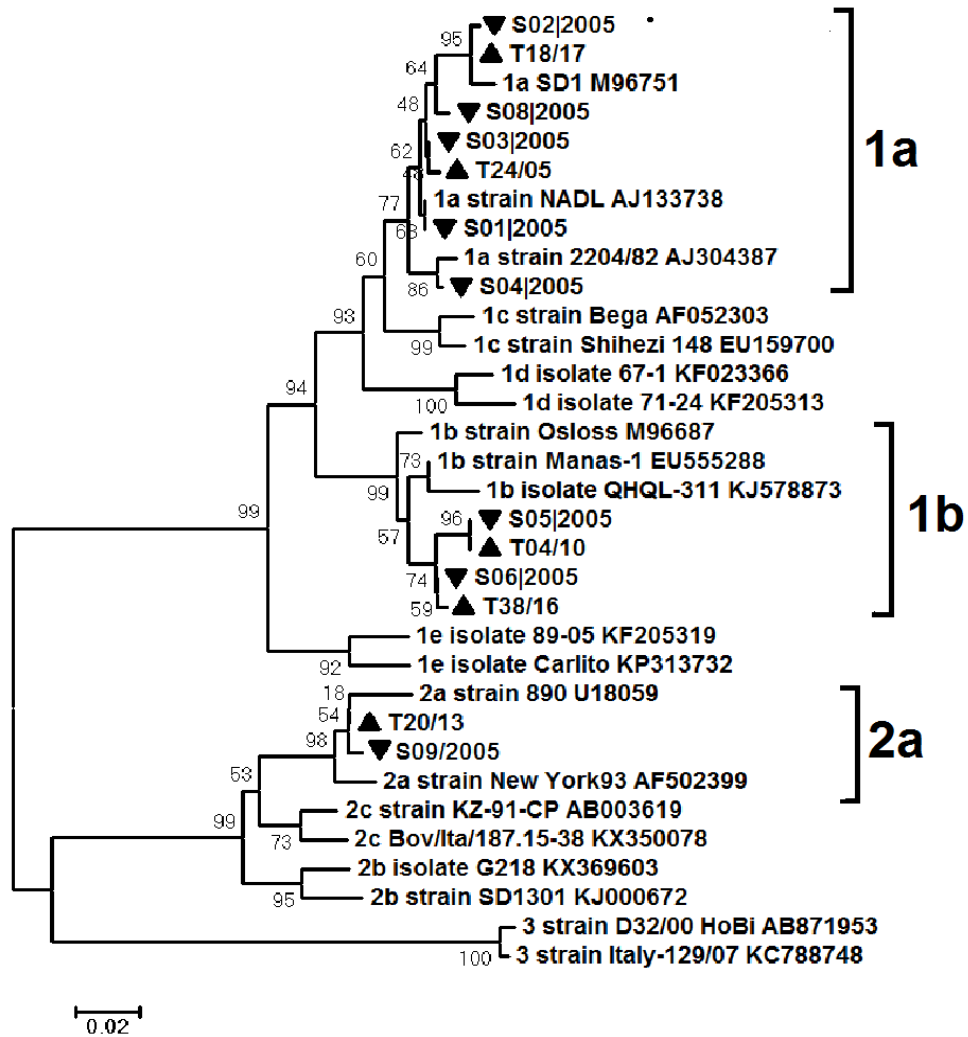


Рисунок 24 – Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей участка генома 5'UTR вируса ВД-БС КРС

Знаком ▼ показаны изоляты, выделенные из спермы, а ▲ - изоляты от коров и телок

2.2.5.2 Контаминация эмбриональных сывороток и клеточных культур пестивирусами крупного рогатого скота

Присутствие посторонних вирусов в клеточных культурах является одной из основных проблем при производстве биологических продуктов для человека и животных.

BVDV являются распространенными контаминантами эмбриональных сывороток, вакцин, перевиваемых культур клеток и др. Контаминация биопрепаратов НЦП штаммами пестивирусов происходит при их производстве, когда вирусы заносятся в культуры клеток из непроверенной эмбриональной сыворотки, ис-

пользуемой для размножения вакцинных штаммов (Makoschey V. et al., 2003; Pastoret P.P., 2010).

Существенную роль в распространении возбудителей в популяциях КРС играют контаминированные вакцины.

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

ОТ-ПЦР для выявления геномов BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3 выполняли с использованием разработанной нами и описанной в главе 2.2.1.2 тест-системы.

Результаты исследования показали, что 80% исследованных перевиваемых линий 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}, Ems, E1, E2. Результаты филогенетического анализа клеточных линий представлены в таблице 32. Изоляты BVDV из культур клеток N/MDBK/06, N/КСТ/06, N/CRFK/07, N/RK13/00, N/ТЕВ/10, N/L929/05, N/MF/06, N/ВНК21/08, 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}, Ems, E1, E2.

Результаты филогенетического анализа эмбриональных сывороток КРС представлены в таблице 33. Семь изолятов BVDV из эмбриональных сывороток отнеслись к субтипу BVDV-3a (рисунок 24), 4 – к BVDV-1a по генам 5'UTR, N^{pro}, Ems, E1, E2, а 2 изолята (R/FBS/96 и SA/FBS/08) – по гену 5'UTR – к BVDV-1a, а N^{pro}, Ems, E1, E2 - BVDV-1j.

Вероятно, контаминация клеточных культур субтипом BVDV-1a НЦП биотипа вируса имеет единый источник происхождения. Предположительно, контаминация клеточных культур могла произойти при использовании для культивиро-

вания клеток эмбриональной сыворотки, содержащей НЦП биотип вирусных агентов BVDV.

Таблица 32 – Результаты филогенетического анализа генов 5'UTR, N^{pro}, Erns, E1, E BVDV в образцах перевиваемых линий культур клеток

№ п/п	Наименование культуры клеток	Изолят	Происхождение	Вирус, субтип	
				По гену 5'UTR	По генам N ^{pro} , Erns, E1, E2
1	MDBK	N/MDBK/06	Почка теленка	BVDV- 1a	BVDV- 1a
2		N/MDBK/08		BVDV- 1a	BVDV-1j
3	KCT	N/KCT/06	Коронарные сосуды теленка	BVDV-1a	BVDV- 1a
4	CRFK	N/CRFK/07	Почка кошки	BVDV-1a	BVDV- 1a
5	RK13	N/RK13/00	Почка кролика	BVDV-1a	BVDV- 1a
6	TEB	N/TEB/10	Тестикулы эмбриона коров	BVDV-1a	BVDV- 1a
7	L929	N/L929/05	Фибробласты мыши	BVDV-1a	BVDV- 1a
8	MF	N/MF/06	Фибробласты мыши	BVDV-1a	BVDV- 1a
9	BHK21	N/BHK21/08	Почка сирийского хомячка	BVDV-1a	BVDV- 1a
10	Vero	N/Vero/10	Почка африканской зеленой мартышки	BVDV-1a	BVDV- 1a
11	FS	N/FS/12	Селезенка кошки	BVDV-1a	BVDV- 1a

Таблица 33 – Результаты филогенетического анализа генов 5'UTR, N^{pro}, Erns, E1, E BVDV в образцах эмбриональных сывороток крупного рогатого скота

№ п/п	Наименование изолята в дендрограмме	Вирус, субтип	
		По гену 5'UTR	По генам N ^{pro} , Erns, E1, E2
1	R/FBS/99	BVDV-1a	BVDV-1a
2	SA/FBS/05	BVDV-1a	BVDV-1a
3	R/FBS/03	BVDV-1a	BVDV-1a
4	SA/FBS/11	BVDV-1a	BVDV-1a
5	R/FBS/96	BVDV-1a	BVDV-1j
6	SA/FBS/08	BVDV-1a	BVDV-1j
7	A15-101 1551	BVDV-3a	BVDV-3a
8	A15-101	BVDV-3a	BVDV-3a
9	A11-101	BVDV-3a	BVDV-3a
10	A15-102	BVDV-3a	BVDV-3a
11	A15-101 0130	BVDV-3a	BVDV-3a
12	E 15-02	BVDV-3a	BVDV-3a
13	E 10-01	BVDV-3a	BVDV-3a

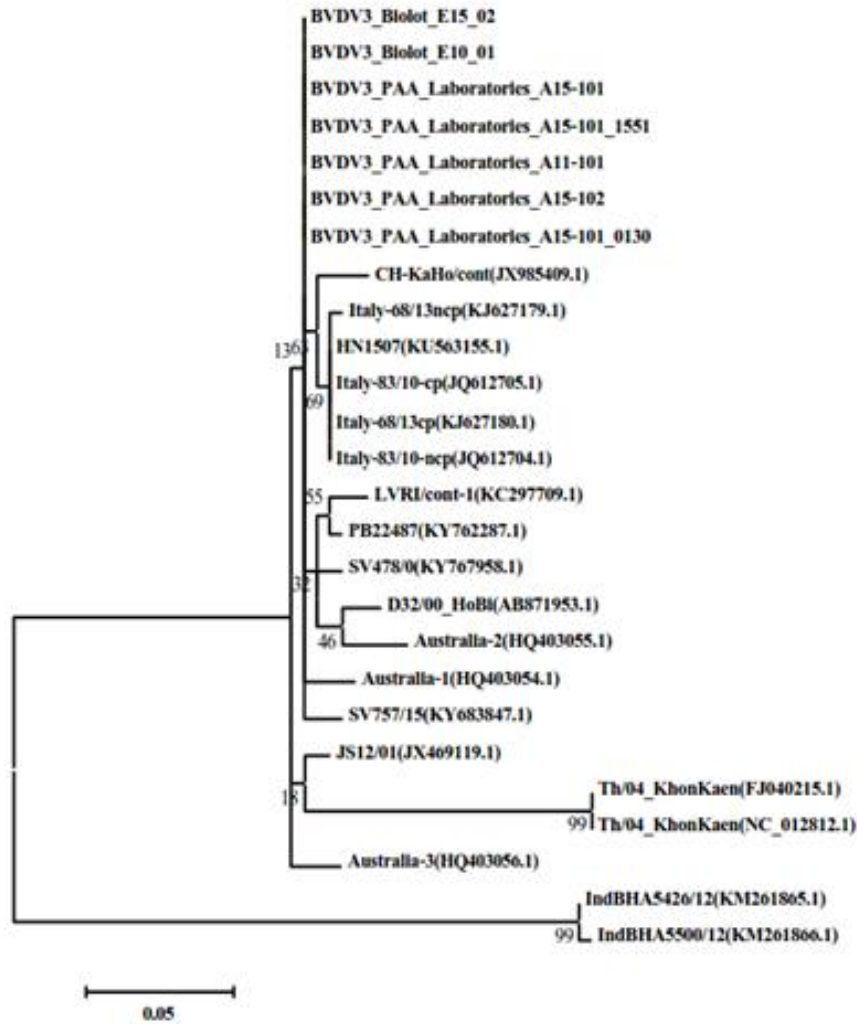


Рисунок 24 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе участка гена BVDV-3 5'UTR

В разделе 2.2.1.1 данной работы мы представили обнаружение генома BVDV-3 в семи образцах эмбриональной сыворотки, а в разделе 2.2.3.2 описали вспышку ВД-БС КРС, вызванную применением вакцины, содержащей в качестве контаминанта высоковирулентный BVDV-3, циркуляции которого ранее на территории РФ не было зарегистрировано.

Таким образом, нами установлен факт присутствия BVDV в биологических продуктах, в том числе в ветеринарных вакцинах, клеточных линиях и эмбриональных сыворотках.

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

2.2.6.2 Филогенетический анализ области 5'-UTR изолятов BVDV

В настоящее время описано 24 субтипа BVDV-1 (1a–1x) (Rivas J. et al., 2022), 5 субтипов BVDV-2 (2a–2e) (De Oliveira P.S.B. et al., 2022) и 5 субтипов BVDV-3 (3a–3e) (Kalaiyarasu S. et al., 2022). Высокая изменчивость пестивирусов, обусловленная особенностями строения их генома, приводит к возникновению новых штаммов. Полиморфизм вирусов осложняет диагностику и может снизить эффективность существующих программ вакцинации и профилактики. Недостаточность исследований генетического разнообразия BVDV в России, а также отсутствие официальных программ контроля на государственном уровне подчеркивают актуальность изучения этого вопроса для разработки оптимальной стратегии борьбы с заболеванием.

Целью данного исследования было изучение генетического полиморфизма штаммов BVDV, циркулирующих среди персистентно и транзитно инфицированного высокопродуктивного молочного скота на молочных комплексах Сибири.

Для филогенетического анализа вируса широко используется высококонсервативная область 5'-UTR. Нами проведено нуклеотидное секвенирование амплифицированных фрагментов 5'-UTR области генома вируса с последующим филогенетическим анализом проб биоматериала, содержащих геном BVDV, полученных от клинически здоровых персистентно инфицированных и транзитно инфицированных животных с респираторным синдромом, репродуктивными нарушениями и от абортированных плодов, а также эмбриональных сывороток, контаминированных культур клеток и вакцины. Результаты изучения генетиче-

ского полиморфизма вирусов ВД-БС КРС представлены в таблице 34 и рисунках 25, 26. Филогенетическая дендрограмма области генома 5'UTR BVDV-3 была представлена в разделе 2.2.5.2.

Таблица 34 – Генетический полиморфизм изолятов BVDV, циркулирующих среди крупного рогатого скота на молочных комплексах Сибири

№ п/п	Наименование изолята	Субенотип BVDV	Регион	Источник выделения вируса	Страна происхождения животных
1	T18/08	1a	Тюменская область	внутренние органы абортплода	Австрия
2	T24/05	1a	Тюменская область	сыворотка крови теленка	Голландия
3	T18/17	1a	Тюменская область	внутренние органы абортплода	Австрия
4	T23/08	1b	Тюменская область	сыворотка крови пи теленка	США
5	T29/08	1b	Тюменская область	внутренние органы теленка	Словения
6	T21/08	1b	Тюменская область	легкие теленка	Германия
7	T30/08	1b	Тюменская область	селезенка теленка	Германия
8	T07/09	1b	Тюменская область	сыворотка крови ПИ теленка	Дания
9	K14/08	1b	Красноярский край	сыворотка крови коровы	Россия
10	N09/16	1b	Новосибирская область	сыворотка крови коровы	Россия
11	K14/16	1b	Красноярский край	сыворотка крови коровы	Россия
12	N08/17	1b	Новосибирская область	сыворотка крови нетели	Германия
13	T38/16	1b	Тюменская область	сыворотка крови ПИ теленка	США
14	T30/16	1b	Тюменская область	мезентериальные лимфоузлы теленка	Голландия
15	T41/17	1b	Тюменская область	внутренние органы ПИ нетели	Дания

Продолжение таблицы 34.

№ п/п	Наименование изолята	Субенотип BVDV	Регион	Источник выделения вируса	Страна происхождения животных
16	T13/15	1b	Тюменская область	сыворотка крови теленка	Голландия
17	T05/12	1b	Тюменская область	лимфоидные органы теленка	США
18	N01/11	1b	Новосибирская область	сыворотка крови коровы	Россия
19	N02/11	1b	Новосибирская область	сыворотка крови нетели	Германия
20	T03/07	1b	Тюменская область	легкие теленка	США
21	T04/10	1b	Тюменская область	селезенка теленка	Германия
22	T01/16	1b	Тюменская область	сыворотка крови теленка	Словения
23	T11/17	1c	Тюменская область	сыворотка крови теленка	Голландия
24	N38/11	1d	Новосибирская область	сыворотка крови теленка с респираторной патологией	Россия
25	T42/06	1d	Тюменская область	легкие теленка	Франция
26	T24/16	1d	Тюменская область	лимфоидные органы теленка	Франция
27	N11/17	1d	Новосибирская область	сыворотка крови теленка	Россия
28	Kz08/14	1f	Казахстан	сыворотка крови теленка с респир. патологией	Германия
29	Kz05/15	1f	Казахстан	сыворотка крови теленка	Германия
30	T11/15	1f	Тюменская область	сыворотка крови ПИ теленка	Австрия
31	K12/15	1f	Красноярский край	внутренние органы теленка с пневмонией	Россия
32	O10/15	1f	Омская область	сыворотка крови ПИ теленка	Россия
33	Ir03/17	1f	Иркутская область	сыворотка крови коровы	Россия
34	T13/17	1f	Тюменская область	сыворотка крови нетели	неизвестна

Продолжение таблицы 34.

№ п/п	Наименование изолята	Субенотип BVDV	Регион	Источник выделения вируса	Страна происхождения животных
35	K04/16	1f	Красноярский край	сыворотка крови коровы	Россия
36	N09/15	1i	Новосибирская область	сыворотка крови теленка с респираторной патологией	Россия
37	T11/16	1p	Тюменская область	кровь теленка	Германия
38	T06/09	1r	Тюменская область	кровь теленка с респираторной патологией	Австрия
39	N09/10	1r	Новосибирская область	селезенка теленка с респираторными заболеваниями	Россия
40	N33/10	2a	Новосибирская область	внутренние органы абортплода	Россия
41	N43/06	2a	Новосибирская область	внутренние органы абортплода	Россия
42	T20/13	2a	Тюменская область	внутренние органы мертворожденного теленка	США
43	N12/16	2b	Новосибирская область	внутренние органы абортплода	США
44	N19/17	2b	Новосибирская область	внутренние органы мертворожденного теленка	Россия
45	T15/17	2c	Тюменская область	внутренние органы абортплода	США
46	V23/01	3a	Новосибирская область	легкие теленка	Россия
47	V23/02	3a	Алтайский край	содержимое подкожных пузырьков	Россия
48	V23/03	3a	Алтайский край	внутренние органы абортплода	Россия

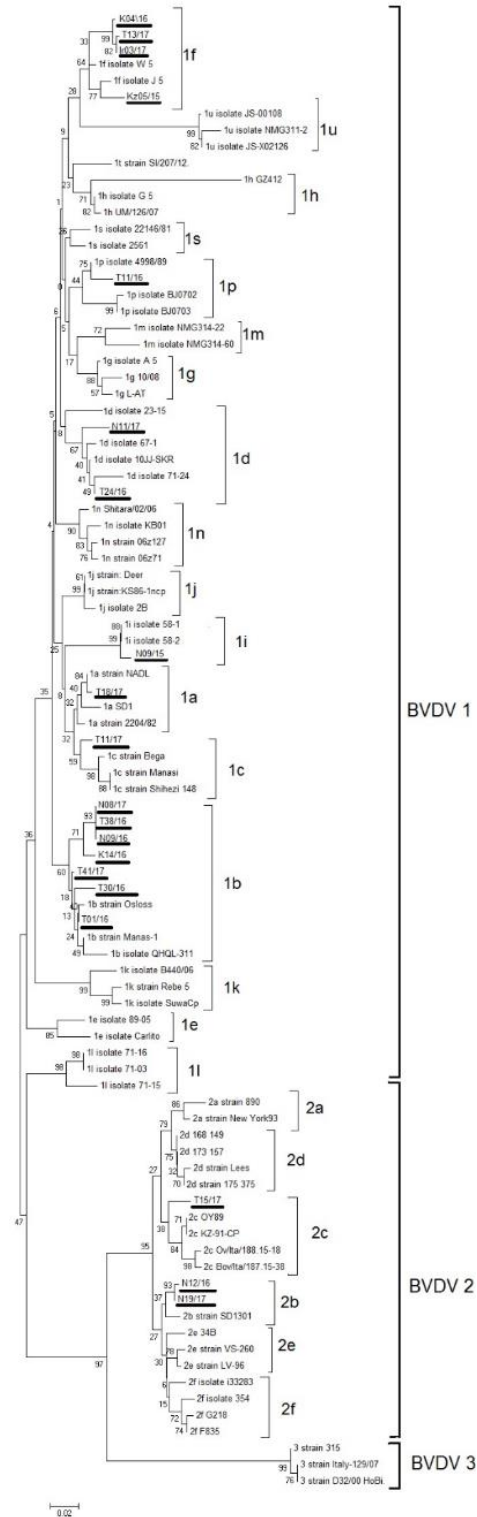


Рисунок 25 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе участка 5'UTR генома BVDV-1 и BVDV-2. Выравнивание последовательностей провели с использованием ClustalW метода. В качестве внешней группы использовали последовательности BVDV-3. Бутстреп поддержка указана около каждого узла дендрограммы. Для референтных штаммов указано название и номер в базе данных GenBank

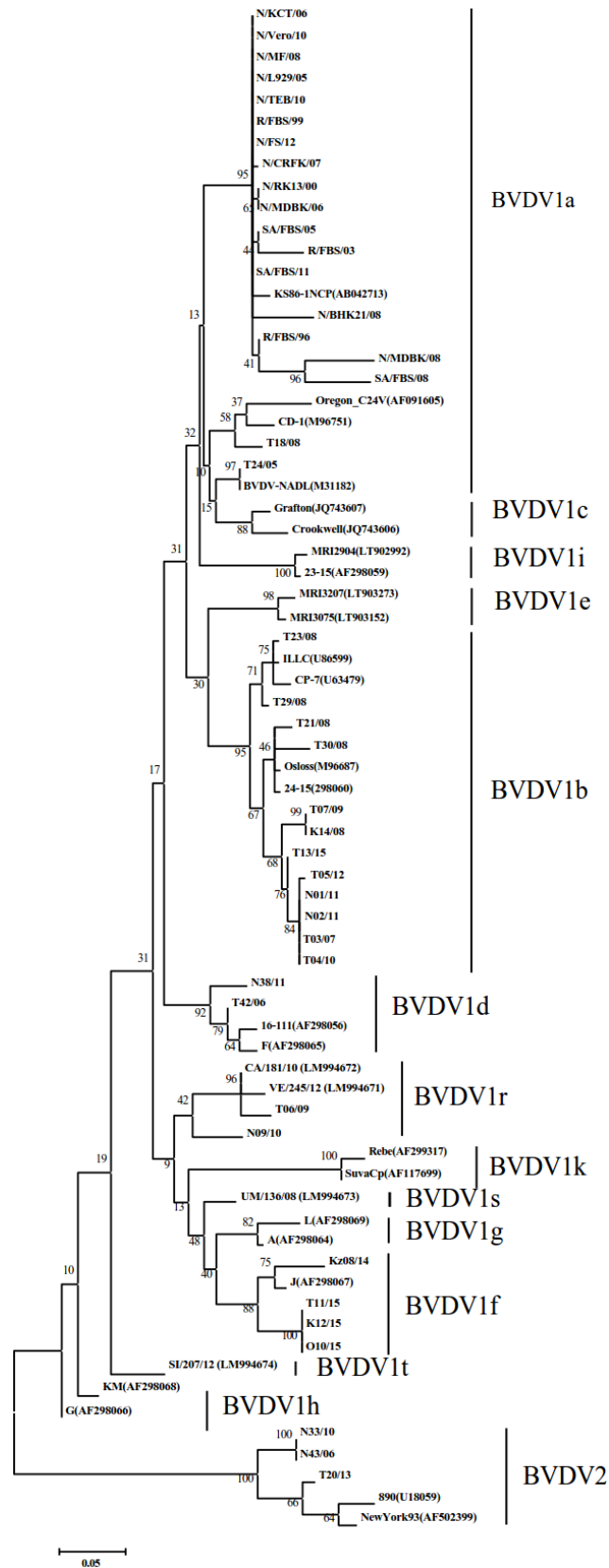


Рисунок 26 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе участка 5'UTR генома BVDV. Бутстрэп поддержка указана около каждого узла дендрограммы. Для референсных штаммов указано название и номер в базе данных GenBank

В результате проведенных исследований с использованием филогенетического анализа области 5'-UTR изолятов нами 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) у крупного рогатого скота 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 27).

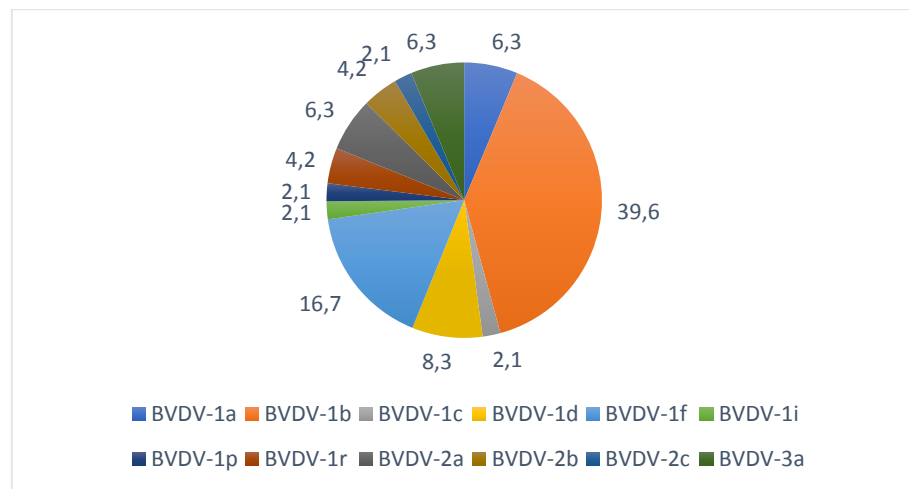


Рисунок 27 – Генетический полиморфизм штаммов BVDV, циркулирующих среди крупного рогатого скота на территории Сибири (в % от общего количества выявленных субтипов)

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%).

В Новосибирской области выявлено распространение субтипов 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 (рисунок 28).

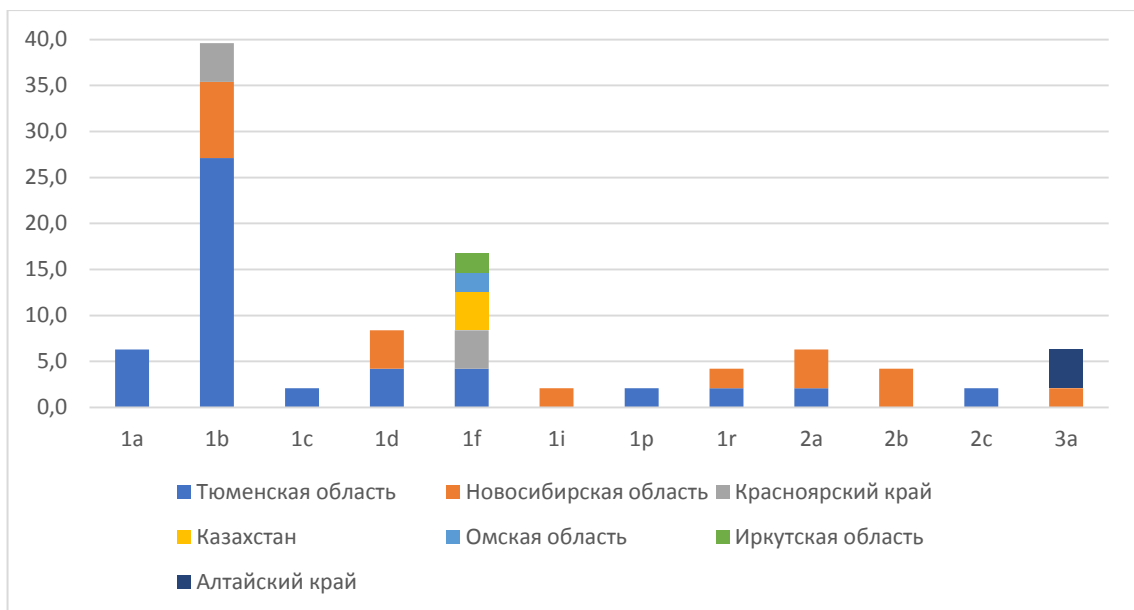


Рисунок 28 – Анализ встречаемости субтипов вируса диареи крупного рогатого скота в регионах Сибири

Изучена взаимосвязь выявленного субтипа вируса с вызываемым клиническим синдромом заболевания ВД-БС КРС.

Субтип BVDV-1a был обнаружен исключительно на территории Тюменской области во внутренних органах абортированного плодов от нетелей, импортированных из Австрии, и сыворотки крови ПИ теленка от нетели из Голландии.

BVDV-1b в Тюменской области был выявлен в пробах внутренних органов и сыворотки крови ПИ телят, рожденных от нетелей, завезенных из США, Словении, Германии, Дании, Голландии. С учетом доминирующего импортного происхождения животных в большинстве обследованных хозяйств Тюменской области, вероятно, что данный субтип является специфичным для их поголовья. В Новосибирской области BVDV-1b был зафиксирован в сыворотки крови коровы и нетели местных пород и сыворотки крови нетели из Германии, а в Красноярском крае – в сыворотке крови коровы местного происхождения.

В сыворотке крови теленка с респираторной патологией в Тюменской области был обнаружен субтип BVDV-1c. Теленок был рожден нетелью, импортированной из Голландии.

Субтип BVDV-1d детектировали в Тюменской области в хозяйстве, куда завезли скот из Франции, а также в Новосибирской области у телят местной породы с респираторной патологией.

BVDV-1f выявили в сыворотке крови ПИ теленка от нетели, завезенной из Австрии и в сыворотке крови нетель неизвестного происхождения. В Республике Казахстан данный субтип обнаружили в сыворотке крови телят с респираторной патологией, рожденных нетелями, завезенными из Германии, в Красноярском крае – во внутренних органах теленка с респираторным заболеванием и сыворотке крови коровы, в Омской области – в сыворотке крови ПИ теленка, в Иркутской области – в сыворотке крови коровы, при этом все животные данных областей были местного происхождения.

В сыворотке крови теленка местной породы в Новосибирской области, из хозяйства, где фиксировались респираторные заболевания, был обнаружен субтип BVDV-1i.

BVDV-1p и BVDV-1r детектировали в Тюменской области в крови телят с респираторной патологией, полученных от нетелей, завезенных из Германии и Австрии. Также субтип BVDV-1r выявили во внутренних органах теленка местного происхождения с респираторным заболеванием.

Субтип BVDV-2а обнаружили в Новосибирской области во внутренних органах абортированных плодов от коров местного происхождения и во внутренних органах мертворожденного теленка от нетели, завезенной из США в Тюменскую область.

BVDV-2b зарегистрировали в Новосибирской области во внутренних органах абортированного плода от нетели, завезенной из США, и во внутренних органах мертворожденного теленка от коровы из хозяйства без поступления импортного скота.

BVDV-2с выявили в Тюменской области во внутренних органах абортированного плода от нетели, завезенной из США.

Таким образом, интенсивное развитие животноводства и активная торговля скотом при недостаточном контроле создают идеальные условия для распространения и генетического разнообразия вирусов BVDV в России. Наши исследования показали циркуляцию среди персистентно и транзитно инфицированного крупного рогатого скота на молочных комплексах Сибири трех видов вирусной диареи-болезни слизистых КРС. BVDV-1 включал 8 субтипов (1a, 1b, 1c, 1d, 1f, 1i, 1p, 1r), BVDV-2 – 3 субтипа (2a, 2b, 2c), а BVDV-3 был выделен впервые в России при вспышках болезней с различными клиническими признаками и включал субтип 3a.

В результате проведенных исследований установлено, что различные субтипы вирусов имеют тенденцию вызывать определенные специфические клинические синдромы заболевания. Так, субтип BVDV-1a ассоциировался с репродуктивной патологией, BVDV-1b выявлялся чаще у персистентно инфицированных 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 – респираторную, репродуктивную патологию и системную инфекцию.

Приведенные данные могут быть использованы при изучении молекулярной эпизоотологии вирусов (механизмов распространения вирусов, отслеживания пу-

тей их циркуляции и выявления факторов, влияющих на динамику инфекционного процесса на молекулярном уровне), разработке более точных диагностических тестов с учетом широкого генетического полиморфизма BVDV, а также разработке вакцин, включающих циркулирующие в данном регионе субтипы вируса.

2.2.6.1.2 Филогенетический анализ генов N^{pro}, Erns, E1 и E2 изолятов BVDV

Использование для филогенетического анализа данных только одного гена может быть недостаточно информативным, поэтому комплексный подход, основанный на анализе вариабельности нескольких генетических локусов, позволяет повысить разрешение типирования и более точно классифицировать изоляты до уровня субтипов. Таким образом, вместо анализа одного гена применяется подход, при котором генетические профили изолятов сравниваются по нескольким маркерам, что обеспечивает более надежную и точную идентификацию.

В нашей работе для сравнительного филогенетического анализа выбраны гены N^{pro}, Erns, E1 и E2 из-за их ключевой роли в репликации вируса и механизмах уклонения от иммунного ответа животного, а также влияния на изменчивость.

Для амплификации и последующего секвенирования соответствующих участков генов N^{pro}, Erns, E1, E2 применяли праймеры, указанные в таблице 35.

Таблица 35 – Последовательности праймеров для секвенирования изолятов BVDV по генам N^{pro}, Erns, E1, E2

Ген	Праймеры	Размер ампликона, п.н.	Источник
N ^{pro}	TCTCTGCTGTACATGGCACATG CCATCTATRCACACTAAATGTGGT	428	Vilcek S. et al., 2001
Erns	GAGAACATAACACAATGGAATTTG TGCATGAGCCCCGAACC	681	Vijayaraghavan B. et al., 2012
E1	ACAAACATGGTTGGTGCAACTGGT CTTACACAGACATATTTGCCTAGGTTCCA	826	Sullivan D.G., Akkina R.K., 1995
E2	GACSTCAGTTGTAAGCCTGAG CCCCSTAGCTCCTTGTTCAGT	1119	Liu L. et al., 2009 b

Помимо изолятов, выделенных от животных и представленных в разделе, по генам N^{pro}, Erns, E1, E2 секвенировали также изоляты BVDV, выделенные из инфицированных перевиваемых культур клеток, эмбриональных сывороток и вакцины против нодулярного дерматита КРС.

Филогенетические дендрограммы приведены на рисунках 29-32.

Согласно результатам наших исследований, большинство исследованных изолятов BVDV-1 имеют высокое генетическое сходство друг с другом по изученным генам (N^{pro}, Erns, E1, E2) и группируются в общие клады (генетические группы). Однако три изолята, изначально классифицированных как BVDV-1a (R/FBS/96, N/MDBK/08 и SA/FBS/08), выделенные в лабораторных условиях из инфицированных культур клеток, оказались генетически отличными от других изолятов BVDV-1a. Эти три изолята сгруппировались в ту же кладу, что и референтные последовательности субтипа BVDV-1j, что указывает на их принадлежность именно к этому подтипу, а не к BVDV-1a, как предполагалось ранее. Таким образом, эти изоляты представляют собой пример генетической изменчивости или, возможно, неверной первоначальной классификации, и их генетический профиль ближе к субтипу BVDV-1j.

Результаты анализа четырех генов (N^{pro}, Erns, E1 и E2) подтвердили, что изоляты в рамках одних и тех же субтипов - BVDV-1a (N/KCT/06 и N/Vero/10), BVDV-1j (R/FBS/96, N/MDBK/08 и SA/FBS/08), BVDV-1b (T07/09 и K14/08), BVDV-1f (T11/15, K12/15 и O10/15) - имеют 100% - ную идентичность последовательностей по всем этим генам, что свидетельствует об их полной гомологии. Другие изоляты, которые ранее считались идентичными только на основании анализа 5'UTR, показали очень высокую степень сходства (от 96% до 99%) по остальным четырем генам, что указывает на их близкое родство.

Анализ сходства последовательностей по четырем генам показал в 100% случаев идентичность изолятов соответствующих субтипов: BVDV-1a (N/KCT/06 и N/Vero/10), BVDV-1j (R/FBS/96, N/MDBK/08 и SA/FBS/08), BVDV-1b (T07/09 и K14/08), BVDV-1f (T11/15, K12/15 и O10/15), что указывает на высокую степень гомологии. Остальные изоляты, ранее показавшие 100%-ую идентичность

Npro

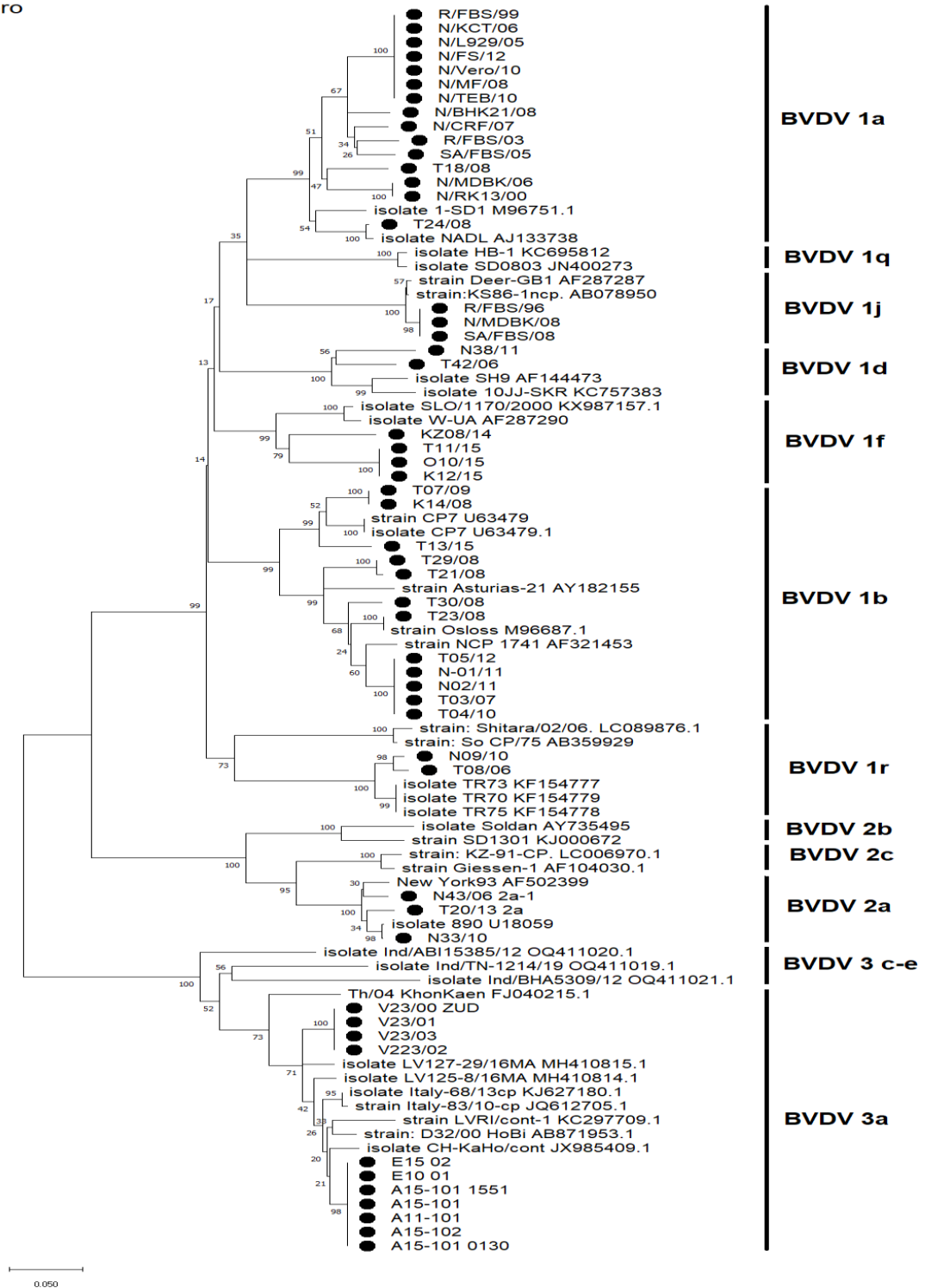


Рисунок 29 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе нуклеотидной последовательности области генома N^{pro} пестивирусов крупного рогатого скота; матрица генетических расстояний рассчитана методом максимальной эволюции; указаны индексы статистической поддержки узлов, бутстреп-тест рассчитан для 1000 реплик

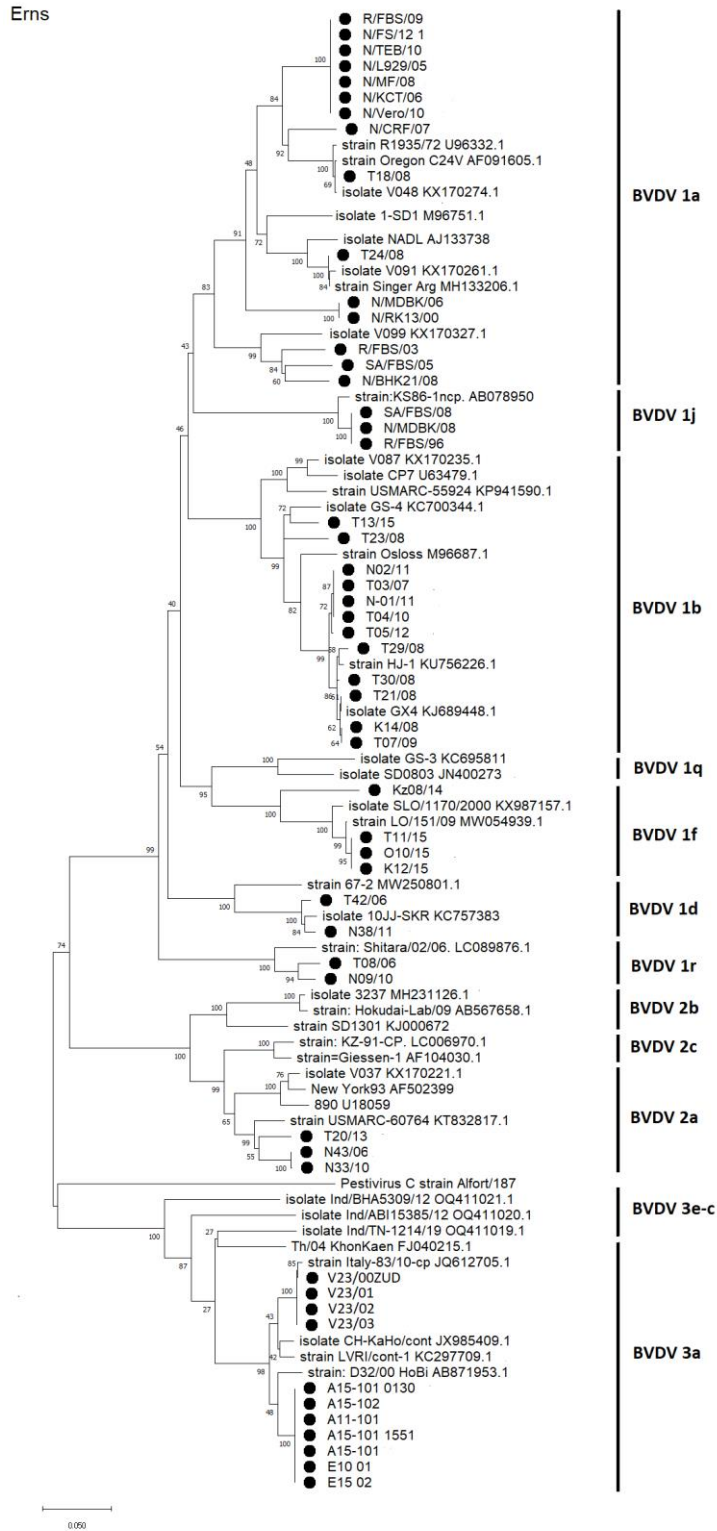


Рисунок 30 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе нуклеотидной последовательности области генома Erns пестивирусов крупного рогатого скота; матрица генетических расстояний рассчитана методом максимальной эволюции; указаны индексы статистической поддержки узлов, бутстреп-тест рассчитан для 1000 реплик

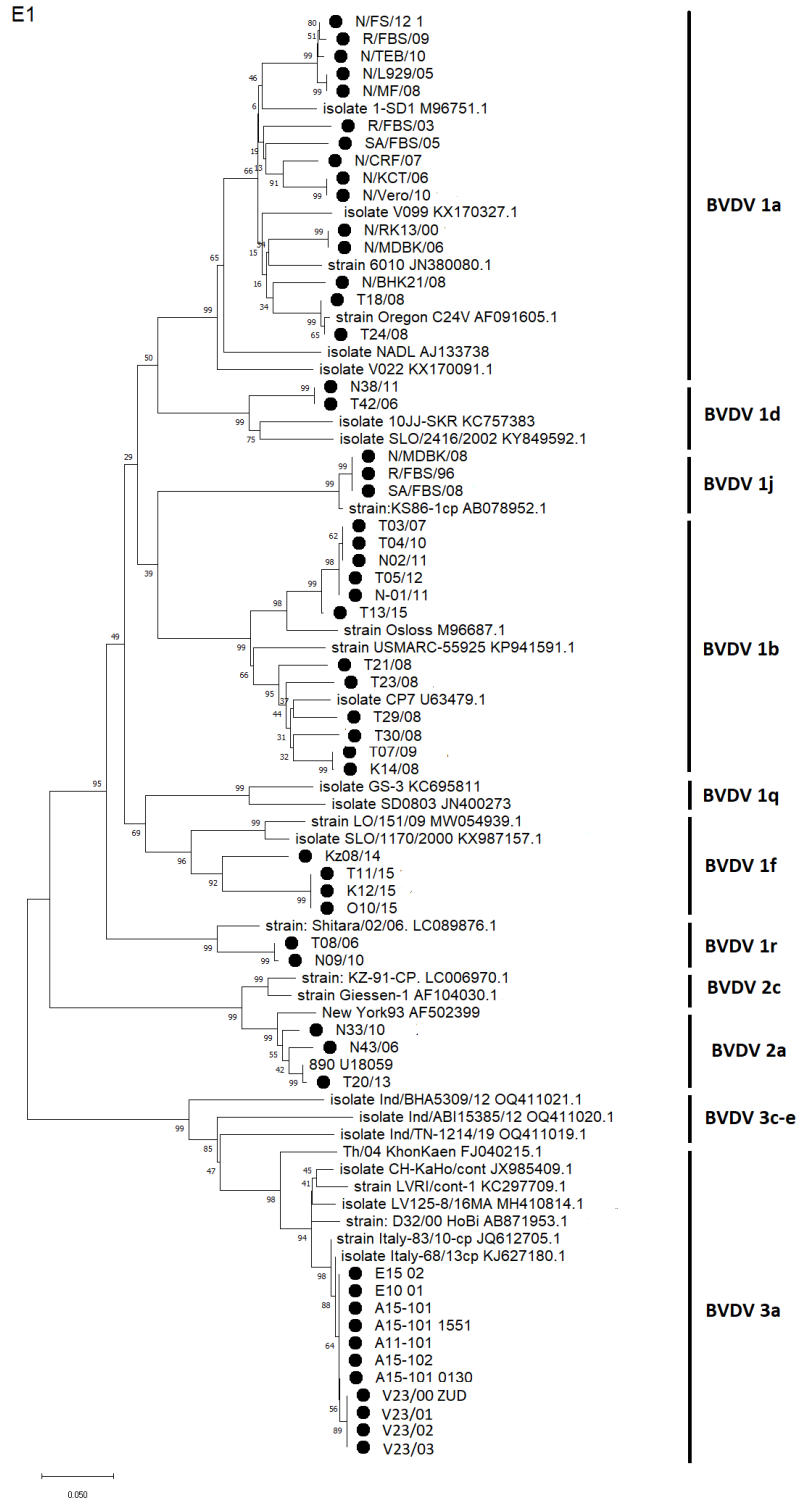


Рисунок 31 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе нуклеотидной последовательности области генома E1 пестивирусов крупного рогатого скота; матрица генетических расстояний рассчитана методом максимальной эволюции; указаны индексы статистической поддержки узлов, бутстреп-тест рассчитан для 1000 реплик

E2

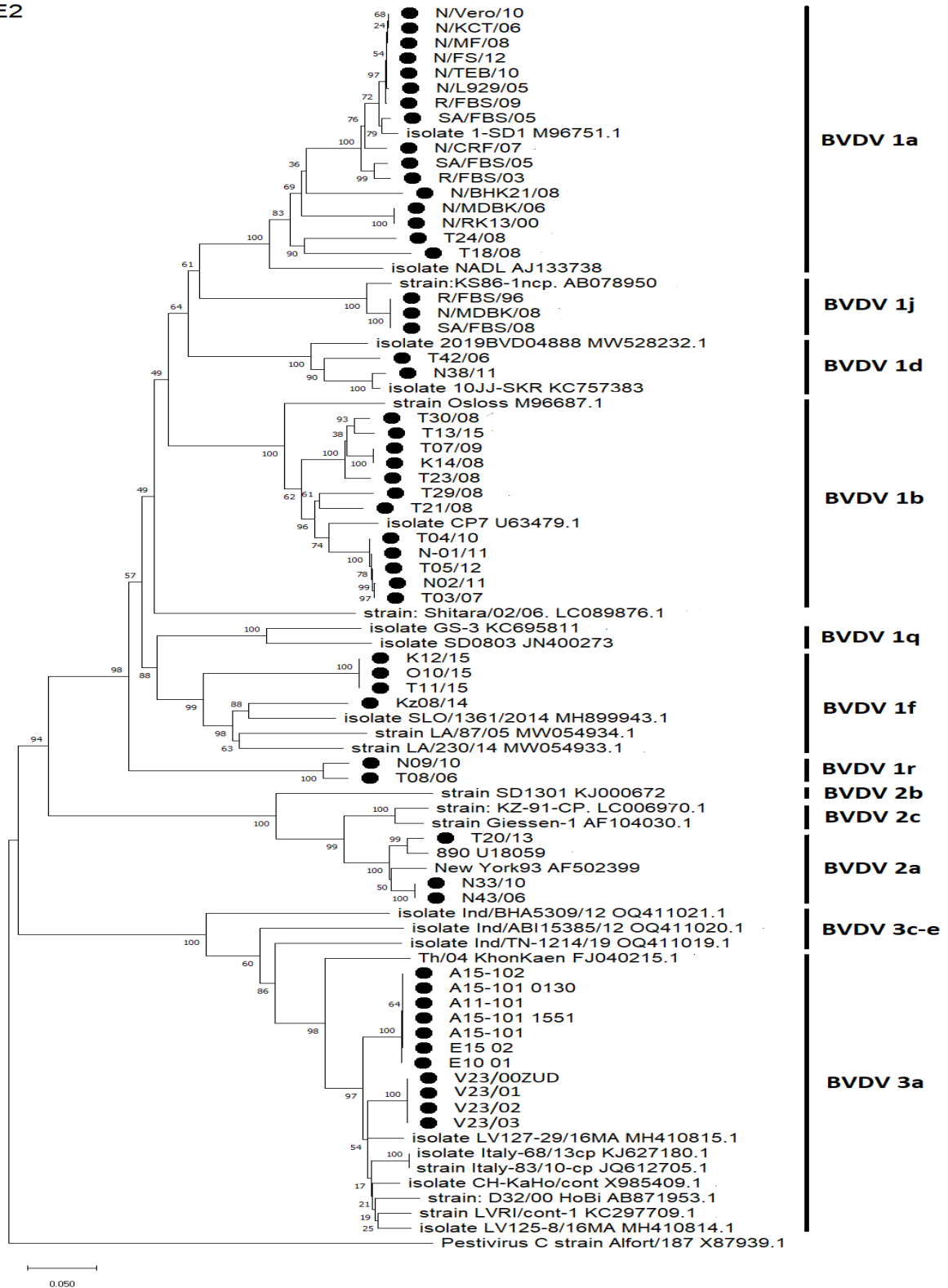


Рисунок 32 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе нуклеотидной последовательности области генома E2 пестивирусов крупного рогатого скота; матрица генетических расстояний рассчитана методом максимальной эволюции; указаны индексы статистической поддержки узлов, бутстреп-тест рассчитан для 1000 реплик

последовательностей 5'UTR, имели сходство нуклеотидных последовательностей генов N^{pro}, Erns, E1 и E2 от 96 до 99%, что также подразумевает их близкое родство.

Результаты секвенирования изолятов BVDV-2 по четырем генам показали идентичность последовательностей геномов, установленных ранее.

Согласно нашим данным, изоляты BVDV-3а разделились на две отдельные подгруппы на основе анализа гена E2. Обе подгруппы принадлежат к итало-бразильской группе BVDV-3а. Первая подгруппа включала изоляты, полученные из эмбриональных сывороток (E15-02, E10-01, A15-101, A15-101-1551, A11-101, A15-102, A15-101-0130). Вторая подгруппа состояла из изолятов, выделенных из вакцин и образцов органов животных, взятых во время вспышек заболеваний в хозяйствах (V23/00ZUD, V23/01, V23/02, V23/03). В пределах каждой из этих подгрупп наблюдалась 100%-я генетическая идентичность по всем четырем исследованным генам. При этом генетические различия между двумя подгруппами составляли около 3% (уровень идентичности 97%). Таким образом, источник вируса (эмбриональные сыворотки/культуры клеток или вакцины/органы животных) коррелировал с его генетическими особенностями, формируя две различные, хотя и очень близкие, линии в рамках одного субтипа BVDV-3а.

Результаты дополнительного филогенетического анализа по генам N^{pro}, Erns, E1 и E2 подтвердили изначальные данные генотипирования изолятов вирусов ВД-БС КРС, проведенного по гену 5'UTR, за исключением трех изолятов BVDV-1, выделенных из эмбриональных сывороток и культуры клеток (R/FBS/96, N/MDBK/08 и SA/FBS/08), генетический профиль которых по результатам сравнительного филогенетического анализа соответствовал субтипу BVDV-1j.

Таким образом, нашими исследованиями на территории Сибири установлена циркуляция трех видов вируса вирусной диареи крупного рогатого скота (BVDV-1, BVDV-2 и BVDV-3). При этом BVDV-1 является наиболее разнообразным, насчитывая 9 различных субтипов, а BVDV-2 и BVDV-3 представлены соответственно 3 и 1 субтипами.

Значительное генетическое разнообразие BVDV подчеркивает сложность эпизоотологической ситуации и может затруднять диагностику болезней, снижать эффективность вакцинации и проводимых контрольных программ.

Результаты работы опубликованы в открытых источниках (Глотов А.Г. и соавт., 2024).

2.2.6.2 Генетический полиморфизм штаммов BRSV

Респираторно-синцитиальный вирус крупного рогатого скота (Bovine respiratory syncytial virus, BRSV, *Orthopneumovirus bovis*), относящийся к семейству *Pneumoviridae*, роду *Orthopneumovirus*, в настоящее время классифицируется на десять генетических подгрупп I – X (Kumagai A. et al., 2021).

Несмотря на широкое распространение РСИ КРС в России (особенно среди импортного высокопродуктивного поголовья на молочных комплексах), научные исследования по изучению генетического разнообразия и происхождения российских штаммов вируса не проводились.

Целью данного исследования была идентификация генотипов штаммов BRSV, циркулирующих в стадах крупного рогатого скота на молочных комплексах Сибири, на основе определения полной нуклеотидной последовательности гена гликопротеина G. Для секвенирования отобрали пробы биоматериала от больных животных, в которых методом ПЦР с использованием выявили геномы BRSV.

Ограниченное число изолятов, использованных в исследовании, обусловлено спецификой вируса: его короткое пребывание в дыхательных путях животных, низкая концентрация в тканях и сложность культивирования в клеточных культурах.

Изоляты NSO1 и NSO2 были выявлены в 2018 г. в органах респираторного тракта телят с признаками острого респираторного заболевания в двух хозяйствах Новосибирской области, изоляты Alt3 и Alt4 – в 2020 и 2021 гг. в органах дыхания теленка и носовых выделениях коровы в двух хозяйствах Алтайского края. Высо-

ковирулентный изолят K18 был выделен в 2008 г. в Республике Казахстан от больных нетелей, завезенных из Канады, при вспышке массового респираторного заболевания с высокой заболеваемостью и летальностью после смешивания их с местным скотом. Все изоляты были выделены от животных с признаками острой формы инфекции: угнетение, отказ от корма, повышение температуры тела, учащенное дыхание брюшного типа с открытым ртом и высунутым языком, опущенные вниз шея и голова, выделение обильной слюны из ротовой полости. При патологоанатомическом вскрытии у них регистрировали интерстициальную, легочную эмфизему, а в некоторых случаях разрушение паренхимы легкого. Характеристика изучаемых изолятов приведена в таблице 36.

Таблица 36 – Характеристика изолятов BRSV, использованных для филогенетического анализа

№ п/п	Наименование изолята/ номер в GenBank	Источник выделения вируса	Регион
1	NSO1 / OR426499	Легкие, бронхи теленка	Новосибирская область
2	NSO2 / OR426500	Слизистая носа, легкие теленка	Новосибирская область
3	Alt3 / OR426501	Легкие, трахея теленка	Алтайский край
4	Alt4 / OR426502	Носовые выделения коровы	Алтайский край
5	K18 / OR426503)	Легкие нетели. Изолят выделен в первично-трипсинизированной культуре клеток тестикул бычков	Республика Казахстан
6	FP5L5HB / OR426504	Аттенуированный штамм 375, выделен от теленка, входит в состав вакцины Бови-Шилд Голд FP5L5 HB	США
7	FP5L5 / OR426505	Аттенуированный штамм 375, выделен от теленка, входит в состав вакцины Кэтлмастер Голд FP5L5	США

В качестве мишени для филогенетического анализа выбрали ген гликопротеина G, поскольку он имеет самую высокую зарегистрированную частоту мутаций среди штаммов BRSV. Для амплификации и последующего секвенирования полной нуклеотидной последовательности гена гликопротеина G разработали две перекрывающиеся пары праймеров: F1 (gttacatacagatgttggggc) и R1 (gtttgggagttgttggtc); F2 (gggaaatgctaagccaagcc) и R2 (ccatccttatttggccccag).

Состав реакционной смеси включал следующие компоненты: ПЦР-буфер (Bioron), 0,6 мкл 50× dNTP, по 0,5 мкг каждого праймера в концентрации 100 мкМ, 1 мкл 100 мМ MgCl₂, 1,5 еа Taq-ДНК-полимеразы (Bioron), 5 мкл ДНК. Общий объем – 30 мкл. Температурный режим для ПЦР: 95 °С – 5 мин, 1 цикл; 95°С – 30 с, 57°С – 60 с, 72°С – 60 с, 45 циклов; 72°С – 5 мин, 1 цикл. Выделение ампликонов из 1% агарозного геля проводили по методике производителя коммерческого набора для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей «Евроген», Россия.

В результате проведенных исследований были получены полные нуклеотидные последовательности гена гликопротеина G. У изолятов NSO1, NSO2, K18, FP5L5NB, FP5L5 последовательности гена имели размер 771 п.н., а у изолятов Alt3 Alt4 их размер составил 789 п.н. Нуклеотидное сходство 7 исследуемых изолятов варьировало от 87–100%. Данные последовательности были зарегистрированы в базе GenBank под номерами OR426499–OR426505. Для построения филогенетического дерева были использованы как полученные нами последовательности, так и последовательности из базы данных GenBank (рисунок 33).

Согласно данным филогенетического анализа, 7 полученных последовательностей распределились между двумя разными подгруппами — II и III.

Филогенетический анализ показал, что изоляты NSO1 и NSO2 образуют одну кладу с европейскими изолятами из Хорватии – B2532014/14/CRO (KY660261), Италии – 48036/MA/2018 (OM860285), Швеции – HPIG-SLU-620-Lovsta 2016 (MG947594), относящимися к подгруппе II. Нуклеотидное сходство изолятов NSO1 и NSO2 с хорватским штаммом составило 99,09%, со шведским – 98,44%, а с итальянским – 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 присутствует замена 66 (Asn→Lys) (рисунок 34).

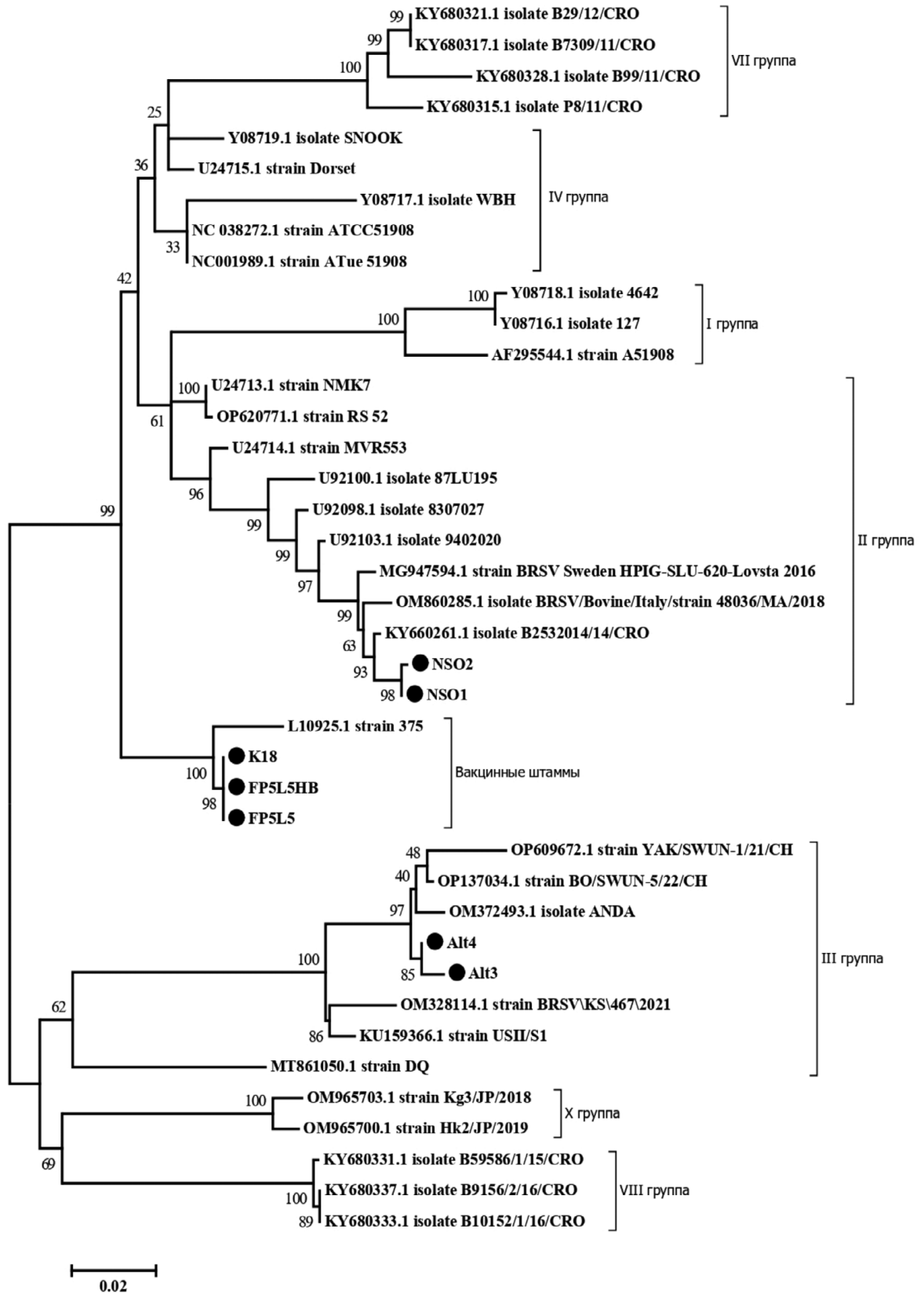


Рисунок 33 – Филогенетическое дерево, построенное на основе полной нуклеотидной последовательности гена *G* BRSV. Последовательности, полученные в данном исследовании, отмечены ●.

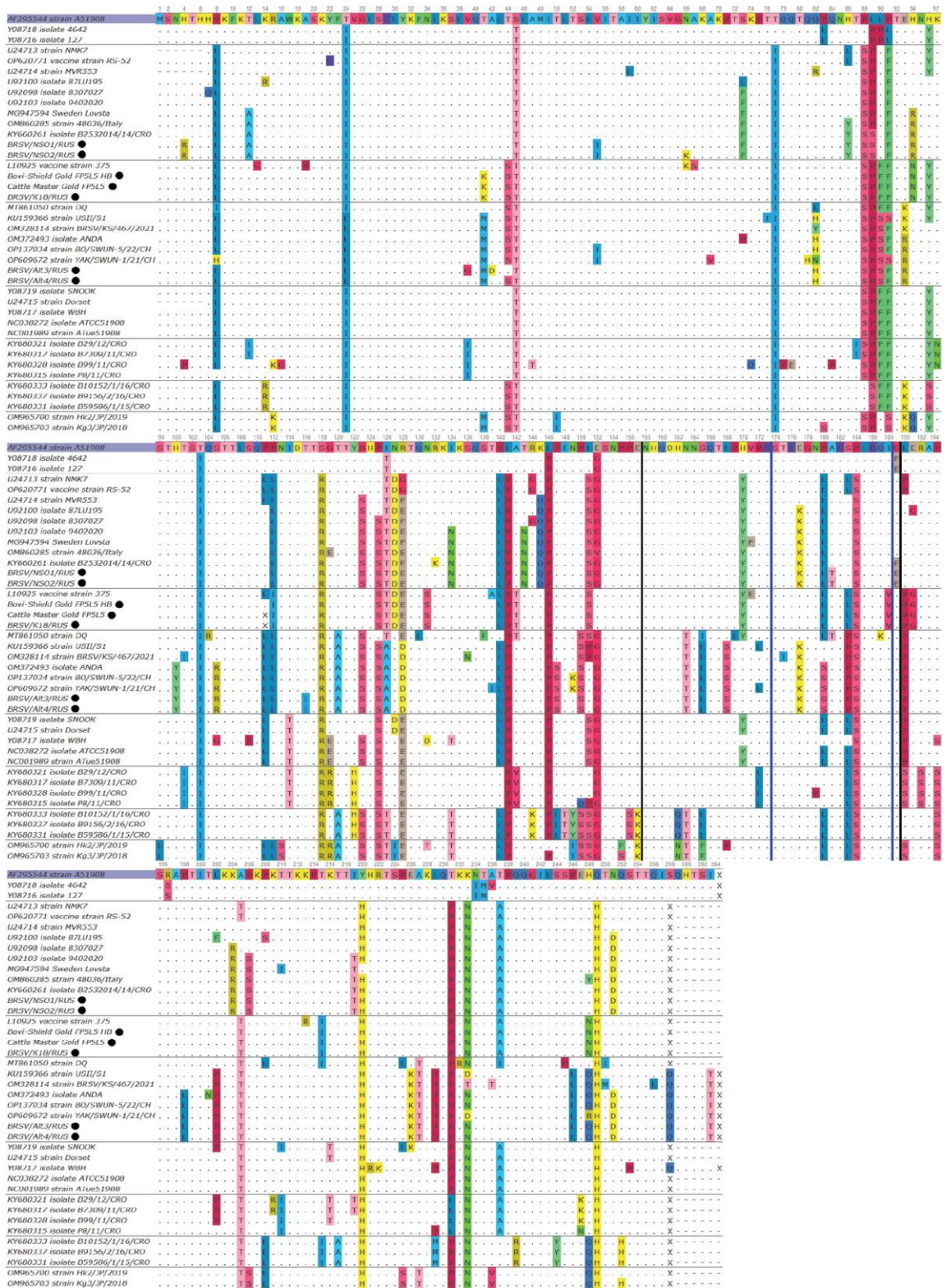


Рисунок 34 – Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей G-белка между изолятами NSO1, NSO2, Alt3, Alt4, K18, FP5L5NB, FP5L5 и эталонными штаммами BRSV, опубликованными в GenBank

Отдельную кладу образовали изолят K18, выделенный от животных, завезенных из Канады, а также образцы вакцин FP5L5NB (вакцина Бови-Шилд Голд) и FP5L5 (вакцина Кэтлмастер Голд) и штамм 375 (L10925), входящий в состав разных вакцин. Нуклеотидное сходство между изолятами K18, FP5L5NB 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). Данные представлены на рисунке 34.

Изоляты Alt3 и Alt4, выделенные на территории Алтайского края, были классифицированы как принадлежащие к подгруппе III. Наиболее близкими к алтайским изолятам оказались китайские штаммы BO/SWUN-5/22/CH (OP137034), YAK/ SWUN-1/21/CH (OP609672) и американский изолят ANDA (OM372493), нуклеотидное сходство которых составило 98,73–97,34%. Кроме того, отдельными соседними ветками в этой кладе выделяются американский штамм USII/S1 (KU159366) и китайский штамм DQ (MT861050). В последовательностях изолята Alt3 были 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). Данные представлены на рисунке 34.

Таким образом, нами впервые в России было проведено исследование по определению полной нуклеотидной последовательности гена G респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота, в результате которого у молочного скота Сибири установлена циркуляция штаммов BRSV, относящихся к II и III подгруппам и независимой кладе.

Выявление и характеристика генетически различных подгрупп вируса, циркулирующих среди поголовья крупного рогатого скота, имеют решающее значение для выбора эффективных контрольных мероприятий и профилактики РСИ КРС.

Результаты работы опубликованы в открытых источниках (Глотов А.Г. и соавт., 2024).

2.2.6.3 Генетический полиморфизм штаммов BCoV

Все штаммы коронавируса крупного рогатого скота (BCoV) на основании анализа перекрестной нейтрализации вируса и генотипирования относятся к одному серотипу/генотипу независимо от клинического происхождения (Suzuki T. et al., 2020; Vlasova A.N., Saif L.J., 2021). Генотипические различия (сублинии и кластеры) коррелируют с годом и географическим местом изоляции, но не ассоциированы с клинической картиной заболевания. Филогенетический анализ гена S показал, что все изоляты BCoV делятся на два кластера: европейский (I) и американо-азиатский (II).

В нашей стране исследованию молекулярной эпизоотологии BCoV посвящена работа В.А. Кудрявцева (2004). Автором проведен филогенетический анализ фрагментов S и HE генов изолятов BCoV и депонированы в GenBank последовательности вариабельной области HE гена 13 изолятов, выявленных на территории РФ. На территории Сибири исследования по филогенетическому анализу циркулирующих штаммов BCoV не проводились.

Цель данного исследования - изучение генетического полиморфизма изолятов BCoV, циркулирующих среди высокопродуктивного молочного скота в Сибири.

Пробы биоматериала отбирали в период массовых вспышек респираторных и желудочно-кишечных инфекций животных.

Для выявления РНК BCoV использовали праймеры и зонд 5 ctagtaaccaggctgatgtcaatacc-3, 5-ggcggaacctagtcggaata-3, 5-(FAM)cggctgacattctcgatc-(BHQ1)-3 (Decaro N. et al., 2008 b). Для контроля эффективности полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали праймеры и зонд на ген GAPDH крупного рогатого скота 5-gatggtgaaggctcggagtgaac-3, 5-gtcattgatggcgacgatgt-3, 5-(ROX)-ctggtcaccagggtgctt - 3 (BHQ2) (Zhao H. et al., 2016).

ПЦР проводили в 30 мкл смеси, содержащей 5 мкл кДНК, 10 пмоль каждого праймера и зонда, готовую смесь реактивов «Био-Мастер ОТ-ПЦР-РВ» («Биолаб-

микс», Россия). Программа амплификации: 5 мин 95°C, затем 45 циклов 95°C 15 с и 60°C 1 мин.

Для нуклеотидного секвенирования отобрали 18 изолятов, содержащих геном ВСоV.

Фрагменты генов S и N амплифицировали в образцах ВСоV-положительных проб. Для амплификации фрагмента гипервариабельного участка гена S размером 622 пары нуклеотидов (п.н.) использовали праймеры S1 (cttataagtgcscscsaaactaaat) и S2 (cctactgtgagatcacatgtttg) (Decaro N. et al., 2008 b).

Для амплификации фрагмента гена N размером 454 п.н. использовали праймеры ВСоV1 (cgatgaggctattccgac и ВСоV2 (tgtgggtgagtgctctgc) (Takiuchi E. et al., 2006). ПЦР проводили по программе для выявления ВСоV. Продукты амплификации разделяли в агарозном геле и очищали с помощью набора Omega Biotek Gel Extraction Kit (Omega Bio-tek, Inc., США) в соответствии с инструкцией производителя.

У всех 18 изолятов были проанализированы последовательности участка гена S, а у 12 из них еще и последовательности участка гена N.

Нуклеотидная идентичность полученных последовательностей составила 96,1-100% по гену N и 91,9-100% по гену S. Секвенированные последовательности были депонированы в базу данных GenBank под номерами OR651999–OR652028. В результате анализа полученных последовательностей с использованием метода максимального правдоподобия были построены филогенетические дендрограммы с низкой статистической поддержкой клад. Принадлежность исследованных изолятов к генетическим группам представлена в таблице 37.

На основе филогенетического анализа участка последовательности гена гликопротеина S исследуемые изоляты и референтные штаммы разделились на две клады с двумя подкладами в каждой. В первую подкладу первой клады (1.1) входили 11 исследуемых изолятов (S16, S22, S24, S25, S26, S27, S29, S34, S35, S36 и S49), а также референтные штаммы из Европы и Израиля (европейская линия). Во вторую подкладу (1.2) входили классические штаммы вируса Квебек и Мебус, а также штаммы из Европы, США и Южной Кореи. Исследованные изоляты к ней

не относились. В первой подкладе второй клады (2.1) оказались 6 исследуемых 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 исследуемый изолят (S46) и штаммы из Южной Кореи, Европы, США (смешанная линия). Данные представлены на рисунке 35.

Таблица 37 – Результаты секвенирования изолятов ВСоV

Наименование изолята, секвенированного по гену S	Результат секвенирования (генетическая группа)	Клиническая форма болезни	Наименование изолята, секвенированного по гену N	Результат секвенирования (генетическая группа)	Регион выделения изолята
S34	1.1	Респираторная	N34	1.2	Тюменская область
S22	1.1	Респираторно-кишечная	N22	2	
S35	1.1	Респираторная			
S20	2.1	Респираторная	N20	1.1	Омская область
S16	1.1	Респираторно-кишечная			
S49	1.1	Респираторная	N49		Томская область
S8	2.1	Респираторная	N36	2	Новосибирская область
S36	1.1	Респираторно-кишечная			
S3	2.1	Кишечная	N3	1.1	Алтайский край
S5	2.1	Кишечная	N5	1.1	
S25	1.1	Респираторно-кишечная	N25	2	
S24	1.1	Респираторная и кишечная	N24	2	
S29	1.1	Кишечная	N29	2	
S13	2.1	Кишечная			
S7	2.1	Кишечная			
S27	1.1	Респираторно-кишечная			
S46	2.2	Респираторная	N46	2	Красноярский край
S26	1.1	Респираторно-кишечная	N26	2	Иркутская область

На основе филогенетического анализа участка последовательности гена нуклеокапсида N исследуемые изоляты и референтные штаммы разделились на две клады, одна из них включала две подклады. В первую подкладу (1.1) входили

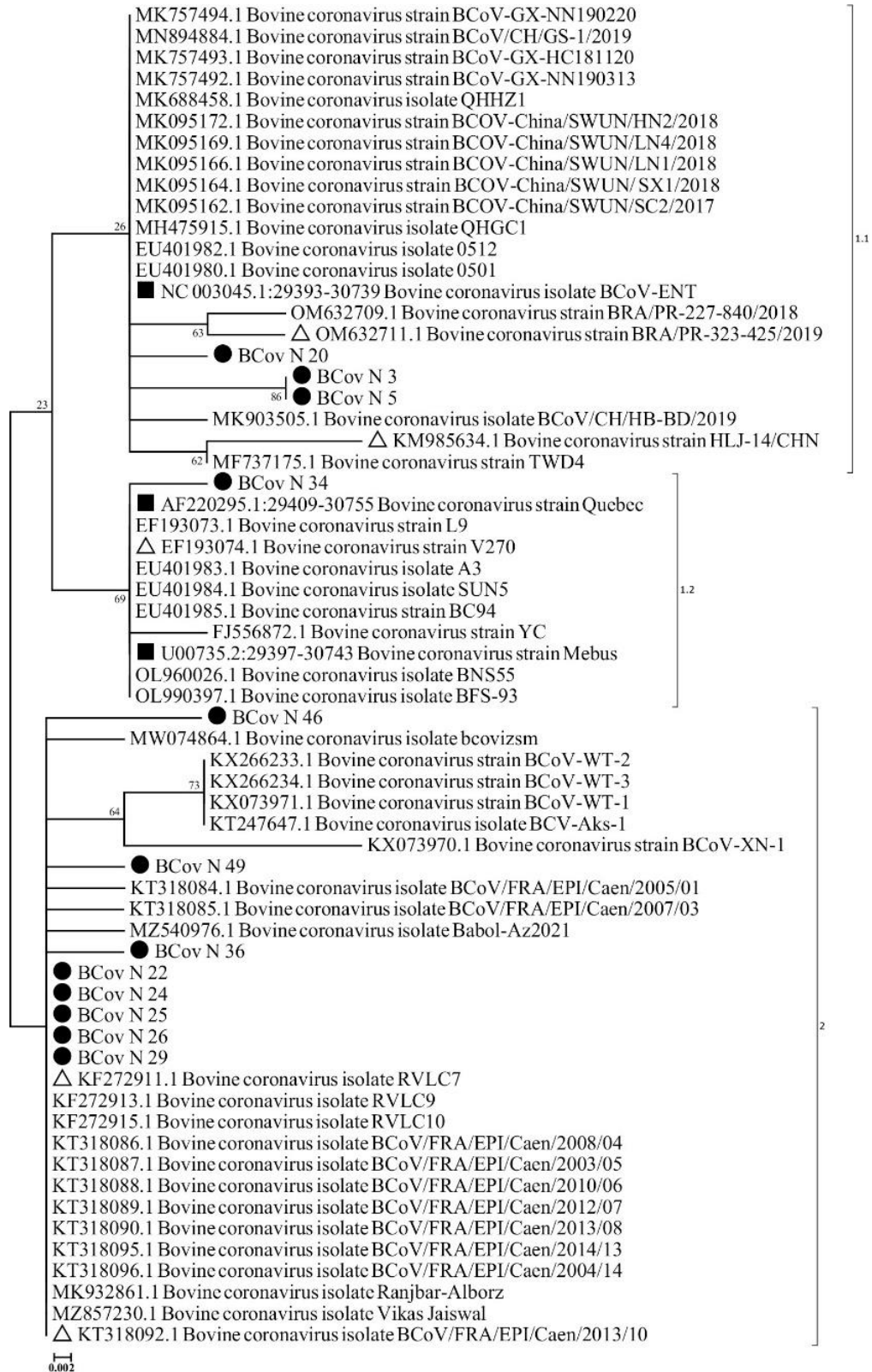


Рисунок 36 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе участка последовательности гена нуклеокапсид N BCoV. Бутстрэп-поддержка указана около каждого узла дендрограммы.

Штаммы, полученные в данной работе, отмечены черным кругом (●).
 Референтные штаммы отмечены черным квадратом (■)

3 исследуемых штамма (N3, N5 и N20), а также штаммы из Китая, Южной Кореи, Таиланда, США и Бразилии (американо-азиатская линия). Во вторую подкладу (1.2) входил один исследуемый изолят (N34), классические штаммы Квебек и Мембус, а также штаммы из Германии, Южной Кореи, Китая и Индии (смешанная линия). Во второй кладе (2) оказались 8 исследуемых штаммов (N22, N 24, N25, N26, N29, N36, N46 и N49), а также штаммы из Китая, Европы, Ирана и Индии (смешанная линия). Данные представлены на рисунке 36.

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

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

Таким образом, в ходе проведенных исследований нами установлено широкое распространение и значительное молекулярно-генетическое разнообразие коронавируса крупного рогатого скота на молочных комплексах Сибири. Популяция сибирских изолятов вируса демонстрирует сложное генетическое строение и включает две клады с двумя подкладами в каждой по гену S, а также две клады по гену N.

Информация о молекулярно-генетических особенностях циркулирующих штаммов ВCoV в конкретном регионе будет способствовать оптимизации региональных программ борьбы с инфекцией и принятию обоснованных решений о целесообразности и эффективности вакцинации, а также разработке новых диагностикомов и вакцин. Это особенно актуально в контексте программ иммунизации животных, когда существует риск несовпадения генетических типов вакцинных штаммов с типами вируса, фактически циркулирующими на данной территории.

Результаты работы опубликованы в открытых источниках (Глотов А.Г. и соавт., 2022).

2.2.6.4 Генетический полиморфизм штаммов ВоНV-4

Изоляты вируса ВоНV-4 классифицируются на три генетические группы по результатам филогенетического анализа: генотип 1, или Европейская группа (Movar 33/63 – подобные), генотип 2, или Американская группа (DN599 – подобные), и генотип 3, выделенный от африканских буйволов. В нашей стране изучение циркуляции генетических групп вируса среди крупного рогатого скота Московской и Тверской областей проводилось А.В. Пчельниковым (2024), в Сибири такие исследования отсутствуют. В связи с этим целью данной работы было определение генетического полиморфизма штаммов ВоНV-4, распространенных на территории Сибири.

Пробы биоматериала отбирали от телят с респираторными и желудочно-кишечными болезнями, а также от коров с гинекологической патологией в период вспышек массовых заболеваний животных.

Выявление ДНК ВоНV-4 проводили с использованием праймеров 5-acatcacattaaaccattggc-3 и 5-actccttctgtgtttaacctatcag-3 и зонда 5(FAM)-caattggaatgtgctgtggt-3(BHQ1) гена гликопротеина L, разработанных нами ранее. У 5 изолятов ВоНV-4 определили первичные нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов гена гликопротеина L вируса и провели их филогенетический анализ.

Филогенетический анализ участка гена гликопротеина L ВоНV-4 показал, что в России встречаются штаммы как Европейской (Movar-like, генотип 1), так и Американской (DN 599-like, генотип 2) ветвей данного вируса. Из 5 исследованных образцов 4 изолята были отнесены к Американской ветви и один к Европейской (таблица 38 и рисунок 37).

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

Таблица 38 – Результаты секвенирования изолятов ВоHV-4

№ п/п	Наименование изолята	Источник выделения вируса	Клиническая форма болезни	Регион	Результат секвенирования
1	Kz19/18	Вагинальные выделения, корова	гинекологическая	Республика Казахстан	Генотип 2, Американский
2	T24/18	Брыжеечные лимфатические узлы, теленок	кишечная	Тюменская область	
3	N29/18	Кровь, теленок	кишечная	Новосибирская область	
4	N26/18	Носовые выделения, теленок	Респираторная	Новосибирская область	
5	N31/18	Легкие, теленок	респираторная	Новосибирская область	Генотип 1, Европейский

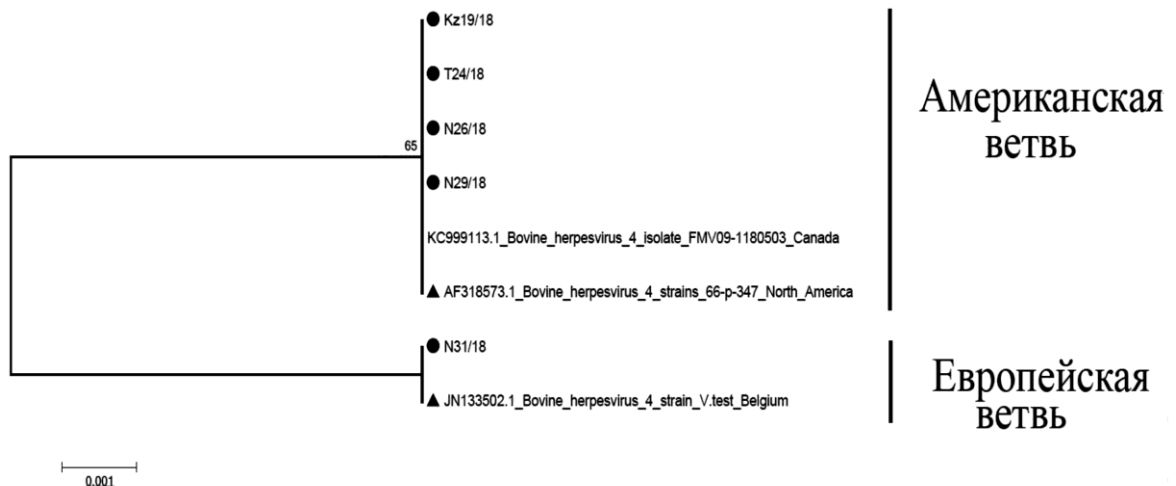


Рисунок 37 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе участка гена гликопротеина L герпесвируса крупного рогатого скота 4-го типа. Выравнивание последовательностей проведено с использованием ClustalW метода. Бутстреп-поддержка указана около каждого узла дендрограммы

Таким образом, на основании филогенетического анализа на молочных комплексах Сибири была установлена циркуляция двух генотипов ВоНV-4: Американского и Европейского. Изоляты, отнесенные к Европейскому генотипу, выделены от животных с гинекологической, желудочно-кишечной и респираторной патологией в Новосибирской, Тюменской областях и Республике Казахстан, а к Американскому – от телят с респираторной патологией в Новосибирской области.

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.

2.3 Обсуждение результатов

По причине многофакторной природы и разнообразных проявлений заболевания диагностика респираторных болезней является сложной задачей.

Диагностика вирусных заболеваний традиционно основывалась на выделении вирусных патогенов в культурах клеток. Лабораторная диагностика вирусных инфекций, основанная на выделении вирусов в культурах клеток, является трудоемкой и затратной процедурой (повышенные требования к качеству биоматериала, возможность выделения вируса только на ранней стадии инфекции, длительный инкубационный период до образования видимого цитопатического действия, неспособность некоторых вирусов размножаться в клеточных культурах, расходы, связанные с приобретением и поддержанием клеточных культур и др.). Исходя из актуальности проблемы, разработка эффективных методов обнаружения патогенов респираторных инфекций у животных имеет первостепенное значение.

С начала 2000-х годов обнаружение вирусов в клинических образцах с помощью молекулярных методов стало более доступным. В настоящее время полимеразная цепная реакция (ПЦР) является широко распространенным и эффективным методом диагностики вирусных инфекций крупного рогатого скота.

Вирус диареи крупного рогатого скота (BVDV) ассоциируется с разнообразной клинической картиной у животных: он может приводить к иммуносупрессии, развитию персистентной инфекции, болезни слизистых оболочек, респираторным заболеваниям и нарушениям репродуктивной функции (Глотов А.Г., Глотова Т.И., 2008).

Помимо патогенного действия на животных, вирусы этого рода также могут выступать в качестве контаминантов различных биологических препаратов. BVDV-1 — доминирующий вид пестивирусов, циркулирующий среди крупного рогатого скота во всем мире. На его долю приходится подавляющее большинство (88 %) всех обнаруженных штаммов этих вирусов (Yeşilbag K. et al., 2017). BVDV-2 считается более вирулентным и распространен в США и Канаде, где его доля составляет около 50% от всех выделенных штаммов (Ridpath J.F., 2010). Метод ОТ-ПЦР для выявления BVDV без дифференциации на виды был впервые предложен С. Hertig et al. в 1991 г., разработка опиралась на использование генов р80 и рр53, отвечающих за кодирование белков NS3 и E2. BVDV-3 был впервые выделен в 2004 г. как контаминант эмбриональной сыворотки, и существующие методы диагностики ВД-БС КРС не обнаруживали его. Для амплификации фрагментов геномов вирусов ВД-БС КРС многие исследователи выбирают регион (5'-UTR), являющийся высококонсервативной областью.

В своих исследованиях для выбора праймеров мы также использовали этот регион. Разработанная нами в 2016 г. ОТ-ПЦР для выявления генома BVDV-3 обладала высокой чувствительностью, составившей $7,4 \cdot 10^{-1}$ копий/мкл, и специфичностью. С использованием разработанной ПЦР мы исследовали 18 серий эмбриональных сывороток различных производителей, использовавшиеся в разные годы (до 2016) в исследовательских лабораториях для культивирования клеток. В семи образцах эмбриональных сывороток двух производителей был детектирован ге-

ном вируса. Филогенетический анализ подтвердил выявление данного вида вируса и по его результатам образцы были классифицированы как принадлежащие к бразильской группе, представленной штаммом D32/00_'HoBi'. В то же время в пробах биоматериала от животных этот вид вируса обнаружен не был.

Широкое распространение пестивирусов КРС в нашей стране с учетом потенциальной опасности появления и распространения нового вида BVDV-3 повлекло за собой потребность в разработке быстрой и комплексной диагностики всех трех возбудителей ВД-БС КРС.

Liu L. et al. (2008) разработали ПЦР на основе технологии TaqMan, который, как утверждалось, был специфичен для BVDV-3, но этот анализ не мог одновременно различать BVDV-1 и BVDV-2 и показал частичную перекрестную реакцию с образцами BVDV-2 с высоким титром (Decaro N. et al., 2012b).

N. Decaro et al. (2012b) разработали вложенную ПЦР для типирования пестивирусов. Перекрестных реакций между видами не наблюдалось, но методика была трудоемкая и присутствовала высокая вероятность перекрестной контаминации образцов. M. Losurdo et al. (2015) была разработана ОТ-ПЦР-РВ, основанная на технологии TaqMan, для дифференциации BVDV-1, BVDV-2 и BVDV-3. Анализ был линейным и воспроизводимым, позволяя обнаружить всего 10 копий вирусной РНК.

V. Mari et al. (2016) разработали ОТ-ПЦР-РВ на основе TaqMan, который позволил эффективно дифференцировать вирусы BVDV-1, BVDV-2 и HoBi-подобные пестивирусы. Чувствительность ПЦР составила 10^0 – 10^1 копий РНК. Анализ продемонстрировал воспроизводимость и линейный характер результатов в диапазоне не менее 9 порядков, от $10^0/10^1$ до 10^9 копий РНК.

Нами разработана двухэтапная ОТ-ПЦР-РВ, позволяющая одновременно детектировать и типировать вирусы ВД-БС трех видов. Для первой реакции использовали праймеры, которые выявляли все три вида пестивирусов, а для типирования – праймеры и зонды собственного дизайна, что обеспечило высокую эффективность реакции. Мы не зафиксировали перекрестных реакций между пестивирусами, как и положительных результатов при тестировании вирусов других

групп. Минимальное количество обнаруживаемых копий ПКО составило $7,2 \times 10$ ГЭ на реакцию. Аналитическая чувствительность ОТ-ПЦР в реальном времени варьировала для разных видов, а именно: $1,6 \cdot 10^2$ для BVDV, $7,2 \cdot 10$ для BVDV-1, $9,0 \cdot 10$ для BVDV-2 и $1,5 \cdot 10^3$ ГЭ для BVDV-3. Результаты определения диагностической чувствительности показали, что минимальный титр штамма Oregon C24V (BVDV-1), выявляемый в реакции, равен $1,2 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$, а штамма Vlagodatsky (BVDV-2) – $0,6 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$. Диапазон стандартных отклонений значений пороговых циклов составил от 0,12 до 0,60. Для сравнения эффективности провели исследования 1374 проб биоматериала (внутренние органы от телят, коров и абортированных плодов, пробы сыворотки крови, эмбриональные сыворотки КРС) с помощью разработанной ОТ-ПЦР-РВ для выявления и дифференциации пестивирусов крупного рогатого скота и ПЦР с электрофоретической детекцией с праймерами Ridpath. Оба метода ПЦР выявили одинаковое число положительных проб, содержащих вирусный геном. Таким образом, разработанная нами тест-система для выявления и дифференциации трех видов пестивирусов крупного рогатого скота не уступает зарубежным образцам.

Традиционный метод диагностики РСИ КРС – выделение вируса в культуре клеток – может быть применен только в начальной стадии заболевания. Ключевые трудности метода заключаются в неустойчивости вируса, длительности (свыше 1 месяца) и трудоемкости анализа. В литературе имеется ряд публикаций по разработке методов на основе ПЦР для выявления генома BRSV. Мишенями для амплификации чаще являются участки генов, кодирующих протеины F или G вируса. В нашей стране разработке ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией посвящена работа К.В. Войтовой. L.E. Larsen et al. (1999) разработали ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией результатов с праймерами на гены гликопротеинов F и G соответственно, J.F. Valarcher et al. (1999) и V. Valentova et al. (2003b) – вложенную ОТ-ПЦР с праймерами на гены N и F соответственно для обнаружения BRSV у естественно и экспериментально инфицированных телят. Ключевой недостаток этих разработок - отсутствие возможности количественной оценки вируса.

Разработанная нами ОТ-ПЦР-РВ позволяет выявлять геном BRSV и определять его концентрацию в образцах проб биологического материала от больных животных. Праймеры подобраны на ген гликопротеина N вируса. Для внутреннего контроля использовались праймеры и зонды к мРНК гена GAPDH крупного рогатого скота, созданные по методике, описанной в работе Zhao H. и соавт. (2016). Чувствительность метода для определения гена нуклеопротеина N вируса BRSV достигла $2,5 \times 10^3$ ГЭ/см³, а для гена GAPDH — $1,2 \times 10^3$ ГЭ/см³. Отмечена высокая степень линейной зависимости результатов: коэффициент детерминации (R^2) составил 0,9873 для гена N и 0,9976 для гена GAPDH. Коэффициент воспроизводимости для различных концентраций варьировался в диапазоне 0,32-3,57%, что подтверждает высокую эффективность и точность анализа. Чувствительность реакции составил $10^{0,5}$ ТЦЦ_{50/см³}, или $5 \log^{10}$ ПКО/см³. Результаты исследования образцов биоматериала от животных полностью совпали с данными, полученными при исследовании этих же проб при помощи разработанной нами ранее тест-системы с электрофоретической детекцией. Наибольшая концентрация BRSV регистрировалась в легких ($1,3 \pm 0,5$ — $4,8 \pm 0,47$ lg копий РНК BRSV/GAPDH), носовых секретах ($1,5 \pm 0,75$ — $2,1 \pm 0,25$ lg копий РНК BRSV/GAPDH) и экссудате из трахеи, бронхов и носовых синусов ($0,3 \pm 0,21$ - $2,8 \pm 0,15$ lg копий РНК BRSV/GAPDH).

В рамках исследования распространения ВоHV-4 среди крупного рогатого скота в России и определения его роли в инфекционной патологии нами была разработана и апробирована ПЦР в реальном времени для детекции вирусной ДНК. Консервативный ген gL вируса был выбран в качестве мишени для амплификации. Аналитическая чувствительность реакции составила 53 геномных эквивалента. Результаты испытания подтвердили высокую чувствительность и специфичность разработанной ПЦР в реальном времени для определения генома ВоHV-4, показав выявление вируса в 20,7% проб биоматериала, при этом наиболее высокая частота обнаружения зафиксирована в носовых выделениях (60%), легких (40%), бронхиальных лимфоузлах (30%) и слизистой трахеи (26,7%). Эти данные подтверждают, что разработанный метод ПЦР в реальном времени обладает вы-

сокой чувствительностью и специфичностью, что делает его эффективным инструментом для диагностики BoHV-4 у животных. M. Goltz et al. (2004) разработали ПЦР для выявления gB BoHV-4 с электрофоретическим режимом регистрации результата, что значительно увеличивает время проведения анализа, а стадия электрофореза может привести к контаминации исследуемых проб продуктами амплификации. D.A. Herlekar et al. (2013) разработали ПЦР в реальном времени для выявления сразу трех герпесвирусов крупного рогатого скота – BoHV-1, BoHV-2 и BoHV-4 и с помощью этого метода исследовали молоко коров.

Ранее нами была разработана ПЦР с электрофоретической детекцией результата для выявления вируса ИРТ КРС (Котенева С.В., 2006).

Для эффективной борьбы с респираторными заболеваниями крупного рогатого скота необходима быстрая и точная идентификация конкретного возбудителя, что позволяет разработать стратегию контроля эпизоотии. Мультиплексная ПЦР-диагностика, которая может одновременно выявлять и количественно определять несколько возбудителей в пробе, стала ключевым методом для решения этой задачи, особенно при диагностике вирусных инфекций. В России отсутствуют коммерческие мультиплексные тест-системы для выявления вирусов респираторного комплекса КРС.

Нами разработана мультиплексная ОТ-ПЦР в реальном времени, позволяющая одновременно, быстро и эффективно выявлять восемь вирусов крупного рогатого скота (BoHV-1, BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3, BRSV, BCoV, BoHV-4, BPIV-3). Использование данной разработки сокращает расходы на реактивы, экономит время исследования и повышает диагностическую эффективность по сравнению с отдельным проведением ПЦР для каждого вируса. Исследование проводили в двух параллельных реакциях – в первой выявляли BoHV-1, BoHV-4, BPIV-3, BRSV, во второй - BCoV, BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3, в качестве положительного контроля в обеих реакциях использовали ген GAPDH КРС. Аналитическая чувствительность для BoHV-1, BoHV-4, BPIV-3, BRSV, BCoV, BVDV-3 составила 10 копий/мкл, BVDV-1 и BVDV-2 – 10^2 копий/мкл, а эффективность амплификации – от 87,9 до 118,9%.

Анализ полученных результатов показал, разработанная нами мультиплексная ОТ-ПЦР-РВ обладает высокой точностью и эффективностью, результаты исследования полностью совпали с методом ПЦР в моно-формате, при этом эффективность выявления ВРIV-3 с помощью мультиплексной ПЦР была выше.

Основным преимуществом разработанной мультиплексной тест-системы на основе ОТ-ПЦР-РВ является существенная оптимизация процесса детекции. Сокращение времени исследования одной пробы до 1,5 часов обеспечивает четырехкратное ускорение диагностического цикла по сравнению с последовательным проведением моноспецифических реакций. Одновременная детекция нескольких мишеней в едином объеме реакционной смеси позволяет минимизировать риск ошибок оператора и существенно уменьшить материальные затраты за счет снижения объема используемых расходных материалов и реактивов, что делает метод экономически предпочтительным для массовых скрининговых исследований.

В публикациях, посвященных ветеринарной диагностике, представлены разработки мультиплексных систем для одновременной детекции нескольких респираторных вирусов у крупного рогатого скота. Такие системы позволяют эффективно диагностировать инфекции, сочетая в себе высокую точность и скорость анализа.

Так, L. Thonur et al. (2012) разработали одношаговый мультиплексный анализ ОТ-ПЦР в реальном времени для обнаружения BRSV, BoHV-1 и ВРIV3. Анализ был быстрым, высокопроизводительным, специфичным и имел чувствительность 97% при обнаружении 10^2 копий BRSV, BoHV-1 и ВРIV3.

M. Fergusson et al. (2024) провели валидацию мультиплексной ОТ-ПЦР в реальном времени, разработанную компанией AusDiagnostics Pty. Ltd для обнаружения семи распространенных патогенов, связанных с комплексом респираторных болезней (BRSV, BoHV-1, ВРIV-3, *M. haemolytica*, *P. multocida*, *M. bovis* и *H. somni*), в качестве внутреннего контроля использовали β -актин млекопитающих. Специфичность теста составила 100%, а чувствительность была в диапазоне от 93,5% до 100% для семи патогенов. С помощью данной ПЦР исследовали 323 образца краниоventральных долей легких с пневмонией от КРС. Исследова-

тели предлагают использовать единый пороговый уровень для всех патогенов, что упрощает интерпретацию результата. На основании настоящего исследования положительная граница $Ct \leq 30,06$ представляется оптимальной для использования в случаях комплекса респираторных болезней в Великобритании.

J. Zhang et al. (2022) разработали одношаговую мультиплексную ПЦР-РВ для одновременного выявления пяти вирусных агентов - BVDV, BoHV-1, BPIV-3, BRSV, а также недавно появившегося вируса гриппа D (IDV). Предел обнаружения составил ~10 копий/реакцию для одиночной ПЦР в реальном времени и 100 копий/реакцию для мультиплексной ПЦР в реальном времени. Было исследовано в общей сложности 213 образцов носовых выделений крупного рогатого скота с признаками заболевания дыхательных путей для оценки эффективности разработанной реакции, что доказало, что метод обладает хорошей специфичностью и чувствительностью. Данные наблюдения показали, что инфекции BVDV и BoHV-1 являются доминирующей причиной комплекса респираторных болезней в стаде, тогда как уровень обнаружения IDV, BPIV-3 и BRSV относительно ниже. Примечательно, что в этом разработанном анализе набор праймеров/зондов BVDV показал самую низкую амплификацию. Одним из возможных объяснений является то, что флуоресценция Cy5 была самой слабой и очень восприимчивой к помехам от других флуорофоров из-за его собственных физических свойств. BoHV-1 продемонстрировал самую высокую эффективность амплификации, вероятно, из-за его двухцепочечной структуры ДНК, которая обеспечивает более эффективную амплификацию.

M. Kishimoto et al. (2017) разработали мультиплексную ПЦР-РВ на 16 возбудителей комплекса болезней КРС: BVDV, BCoV, BPIV-3, BRSV, IDV, вирус ринита А крупного рогатого скота, вирус ринита В крупного рогатого скота, BoHV-1, аденовирус крупного рогатого скота 3, аденовирус крупного рогатого скота 7, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Trueperella pyogenes*, *Mycoplasma bovis* и *Ureaplasma diversum*. С помощью разработанной ПЦР исследовали 40 образцов мазков из носа. Эффективность ПЦР находилась в диапазоне 84,2–101,8%. Чувствительность реакции для вирусов

составила ≤ 10 TCID₅₀ /реакция. Для бактериальных нуклеиновых кислот чувствительность составила ≤ 1 КОЕ /реакция.

L. Li et al. (2025) разработали мультиплексную количественную ОТ-ПЦР в реальном времени для одновременного выявления gN BRSV, gM BPIV-3, 5'-UTR BVDV, Hexon BAV-3, *oppF Mycoplasma bovis* и gB BoHV-1. Этот метод продемонстрировал высокую специфичность и чувствительность. Минимальные пределы обнаружения для стандартов плазмидной ДНК вирусов BRSV, BPIV-3, BVDV, BAV-3, *Mycoplasma bovis* и BoHV-1 составили 70,1, 40,4, 15,1, 74,4, 69,6 и 4,99 копий/мкл соответственно. Диапазон коэффициентов вариации (CV) для BRSV, BPIV3, BVDV, BAV3, Mb и IBRV составил 0,38-2,44, 0,15-3,87, 1,22-3,08, 0,05-2,25, 0,33-2,13 и 0,67-3,24% соответственно. В целом, коэффициенты вариации, определенные в ходе данного исследования, составили <4%, а эффективность амплификации – 93,84-111,60%, что свидетельствует о надежности и стабильности метода. Авторы оптимизировали реакцию систему и условия амплификации, сгруппировав три РНК-вируса в реакцию систему 1 для амплификации, а два ДНК-вируса и *Mycoplasma bovis* в реакцию систему 2 для амплификации. Разделение шести патогенов на две группы упростило систему реакций и минимизировало конкуренцию между праймерами. Большинство приборов qPCR поддерживают ограниченные каналы флуоресценции, двойная система может быть совместима с более традиционными приборами, снижая порог требований к аппаратам. При исследовании образцов биоматериала от животных *Mycoplasma bovis* и BAV-3 показали более высокую частоту обнаружения среди всех исследованных патогенов. Результаты исследования установили 56 случаев смешанных инфекций среди положительных образцов, что подчеркивает различную распространенность каждого патогена.

Таким образом, разработанная нами мультиплексная ОТ-ПЦР-РВ для выявления восьми вирусов не уступает зарубежным аналогам.

С использованием разработанных нами тест-систем мы изучили этиологическую структуру вспышек респираторных болезней в хозяйствах Сибири, а также генетическое разнообразие вирусов, циркулирующих среди КРС на террито-

рии Сибири. Всего исследовали 6964 пробы биоматериала от животных разных возрастных групп из 131 животноводческого хозяйства Новосибирской, Тюменской, Томской, Кемеровской, Омской областей, Алтайского и Красноярского краев и Республики Казахстан.

Результаты исследований показали, что ведущей причиной массовых респираторных заболеваний у молочного скота в период с 2015 по 2024 гг. являются вирусы ВД-БС КРС, они были обнаружены в 20,3% исследованных образцов биоматериала. По видам вирусы ВД-БС КРС распределились следующим образом: BVDV-1 – 16,0, BVDV-2 – 3,1, BVDV-3 – 1,2% проб биоматериала. При этом циркуляция BVDV-3 установлена в молочных хозяйствах России впервые, проникновение вируса в стадо связано в использованием контаминированной вакцины. Вирус ИРТ КРС выявили в 14,9% проб биоматериала, вирус герпеса 4 типа КРС – в 12,6%, вирус КВИ КРС – в 9,4% проб. Реже были выявлены респираторно-синцитиальная инфекция (6,1%) и парагрипп-3 (6,3%). Наибольшая встречаемость среди бактерий в исследованных пробах была зафиксирована у *Pasteurella multocida* (28,0%) и *Mannheimia haemolytica* (25,5%). Реже выделяли *Histophilus somni* (9,0%), *Trueperella pyogenes* (6,9%), *Salmonella spp.* (4,6%), *Escherichia coli* (2,3%), *Streptococcus pneumonia* (1,5%). Всего вирусные агенты респираторного комплекса были выявлены в 69,1% исследованных проб биоматериала, а бактериальные агенты выделены в 77,8% проб.

Известно, что структура возбудителей будет неоднородна в хозяйствах с разной концентрацией поголовья, молочной продуктивностью и наличием или отсутствием ввода новых животных, особенно завезенных из-за рубежа. Поэтому мы выделили три категории хозяйств и изучили в них частоту выявления инфекционных агентов.

В первую категорию включили 15 крупных молочных комплексов из Тюменской, Томской, Новосибирской областей, Алтайского и Красноярского краев, в которые импортировали скот из других стран.

В 2015-2024 годах на молочных фермах с импортным скотом в 84,8% случаев болезней респираторного комплекса были обнаружены вирусы, при этом

возбудители инфекционного ринотрахеита (ИРТ КРС) и вирусной диареи-болезни слизистых (ВД-БС КРС) были самыми распространенными, с частотой 19,5% и 25,3% соответственно. Также в пробах были выявлены геномы респираторно-синцитиального вируса (7,3%), вируса герпеса 4 типа (14,9%), коронавируса (10,6%) и вируса парагриппа-3 (7,4%) крупного рогатого скота. При этом среди штаммов вируса ВД-БС КРС доминировал BVDV-1 (20,3% от общего числа проб), в то время как BVDV-2 встречался значительно реже (5,0%), а BVDV-3 не был обнаружен вовсе.

Для идентификации микроорганизмов применялись бактериологический и молекулярно-генетический методы. Бактерии респираторного комплекса были обнаружены в 69,7% исследованных проб. Среди выделенных патогенов наиболее распространенными оказались: *Mannheimia haemolytica* – 27,8%, *Pasteurella multocida* – 25,6%, *Histophilus somni* – 9,8%, *Trueperella pyogenes* – 6,6% проб биоматериала. Таким образом, результаты исследования показали значительное распространение (69,7%) указанных бактерий среди поголовья импортного скота.

Анализ возрастной восприимчивости и клинического проявления свидетельствует о том, что телята заболевают вирусными и ассоциативными вирусно-бактериальными инфекциями в возрасте от 10 до 30 дней. Отсутствие или низкий уровень колостральных антител в этом возрасте обуславливает их повышенную уязвимость к полевым штаммам вирусов.

Геном ВоНВ-1 наиболее часто обнаруживался у телят младше 10 дней (22,3%). Вирус диареи крупного рогатого скота 1-го типа (BVDV-1) чаще всего выявляли у телят 11-30 дней (23,4%), в то время как BVDV-2 чаще был обнаружен у телят в возрасте 1-3 месяцев. BVDV-3 не был обнаружен ни в одной пробе.

Результаты исследований показали различия в частоте выявления геномов различных вирусов у телят и коров в зависимости от их возраста: ВоНВ-1 наиболее часто (22,3%) выявлялся у телят в возрасте до 10 дней, BVDV-1 - чаще у телят возраста 11–30 дней (23,4%), BVDV-2 чаще выявляли у телят в возрасте от 1 до 3 месяцев (7,2%). Вирус РСИ КРС наиболее часто встречался у телят в возрасте 1–6 месяцев (8,1-9,7%). Вирус КВИ КРС присутствовал примерно в

10% исследованных проб как от телят, так и от коров, чаще всего вирус выявляли у телят в возрасте 1–3 месяцев (18,2%). ВоHV-4 выявлялся во всех возрастных группах, процент выявления у телят 1-3 мес. был выше (17,0%). Частота обнаружения парагриппа-3 повышалась с возрастом телят: от 4,0% у новорожденных телят 8,4% до 12,0% у телят 4–6 месяцев.

Mannheimia haemolytica чаще всего выделяли у телят в возрасте от 11 дней до 6 месяцев (30,8-34,6% проб), *Pasteurella multocida* - в пробах от телят в возрасте до 1 месяца (29,1%), *Histophilus somni* - у телят от 1 до 6 месяцев (13,7-11,9%), а *Trueperella pyogenes* также наиболее часто встречалась у телят в возрасте 6 мес. (10,7%).

Анализ этиологических ассоциаций при респираторных болезнях КРС на молочных комплексах с завозом животных из-за рубежа показал, что на крупных молочных комплексах, куда завозился скот из-за рубежа, преобладала циркуляция вирусно-бактериальных ассоциаций (48,6%). При этом циркуляция вирусов в моноварианте наблюдалась в 25,2% случаев, а бактерий в моноварианте значительно реже – в 13,5%.

ВоHV-1, BVDV и BRSV чаще обнаруживались в качестве единственной причины респираторных заболеваний, тогда как BCoV, ВоHV-4 и BPIV-3, как правило, выявлялись в сочетании с бактериальными и, реже, вирусными возбудителями.

На крупных молочных комплексах без импорта животных из других стран вирусы респираторного комплекса присутствовали в 68,7% проб от больных и павших животных. Вирус ВД-БС КРС был выявлен у 20,6% животных, причем чаще всего встречался BVDV-1 (16,3%), реже — BVDV-2 (1,5%) и BVDV-3 (2,8%). ВоHV-1 присутствовал в 14,1, ВоHV- в 11,9, BCoV - в 10,0%, BRSV и BPIV-3 – в 6,1 и 6,0% проб биоматериала соответственно. Бактерии, входящие в респираторный комплекс, были обнаружены в 79,9% исследованных проб биоматериала. Среди них доминировали *Pasteurella multocida* (34,3%) и *Mannheimia haemolytica* (27,4%). Значительно реже встречались *Histophilus somni* и *Trueperella pyogenes*, их выявляли в 9,8% и 8,4% случаев соответственно.

При анализе возрастных особенностей респираторных заболеваний у крупного рогатого скота из данной категории хозяйств установлено, что ВоHV-1 также, как и в хозяйствах с завозом импортного скота, чаще всего выявляется у телят до 10 дней (18,0%). Возбудитель BVDV более распространен среди коров, которые инфицированы как BVDV-1 (18,0%), так и BVDV-2 (3,1%), а также BVDV-3 (5,1%). В целом, возбудители BVDV-1, -2 и -3 обнаруживались в разных возрастных группах, причем BVDV-1 чаще встречается у телят старшего возраста, а BVDV-2 и BVDV-3 преобладали у коров. Пик обнаружения BRSV приходился на возраст 1-3 месяца (9,2%), далее частота снижалась с возрастом. Частота выявления ВоHV-4 была стабильно высокой как у телят (11,9%), так и у коров (12,2%), с наибольшей концентрацией у телят старше 6 месяцев (16,0%). Самый низкий процент выявления BCoV отмечен у телят до 10 дней (1,3%), самый высокий – у телят 1-3 месяцев (15,5%). BPIV-3 наиболее часто регистрировался в пробах от телят 1-3 мес. (8,3%). Бактериологическое исследование выявило преобладание в пробах биоматериала *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica*, а также общую тенденцию увеличения частоты выделения бактерий с возрастом животных.

Вирусно-бактериальные ассоциации присутствовали в 46,5% проб, примерно, как и в хозяйствах с импортным скотом. Вирусы в моноварианте выявили в меньшем количестве проб (18,1%), а бактерий в моноварианте – в большем (21,7%). Наиболее распространенными были следующие ассоциации вирусов: BCoV и BVDV-1, ВоHV-1 и BCoV, ВоHV-4 и BCoV. Таким образом, вирус BCoV часто присутствовал в составе смешанных инфекций.

На небольших фермах риск распространения вирусных инфекций ниже благодаря меньшему количеству животных и более тщательному уходу. В отличие от крупных хозяйств, где инфекции могут быстро распространяться, на мелких фермах они распространяются медленнее и в меньших масштабах.

На мелких товарных фермах вирусные агенты были выявлены в 47,1% проб биоматериала от животных. Возбудители вирусной диареи - болезни слизистых крупного рогатого скота были выявлены в 14,2% от общего числа исследованных образцов. Среди них доминировал вирус BVDV-1 (11,2%), в то время как BVDV-2

и BVDV-3 встречались реже (2,1% и 0,9% соответственно). На втором месте по распространенности (9,5%) находился герпесвирус крупного рогатого скота 4-го типа. Вирус ИРТ КРС – выявили в 8,3% проб, КВИ КРС – в 6,3% проб, а BPIV-3 и BRSV – в 4,7% и 4,1% проб соответственно.

Таким образом, наиболее часто встречающимся возбудителем ВД-БС оказался BVDV-1, за которым следовали ВоHV-4 и другие вирусы. Спектр бактериальных агентов у животных данной категории хозяйств включал *Pasteurella multocida* (22,9%), *Salmonella spp.* (19,5%) и *Mannheimia haemolytica* (18,5%), а также *Escherichia coli* (10,0%), *Streptococcus pneumoniae* (6,5%), *Histophilus somni* (6,3%) и *Trueperella pyogenes* (5,0%). Итого бактерии были выделены из 88,7% проб биоматериала.

Изучение возрастных особенностей этиологической структуры респираторных болезней в данной категории хозяйств показало, что BVDV-1 чаще выявляли у коров (9,5%). Частота выявления BVDV-2 не зависела от возраста, а BVDV-3 обнаруживали у телят от 1 мес., наибольший процент выявления был у коров (2,0% проб).

Частота выявления вируса РСИ КРС варьировалась в зависимости от возраста телят. Самый низкий показатель (3,2%) зафиксирован у телят 11-30 дней, достигая пика в возрасте 1-3 месяца (6,0%), среди коров выявление составило 3,7%. Примечательно, что уровень инфицирования ВоHV-4 среди различных возрастных групп телят был почти одинаковым, колеблясь в узком диапазоне от 8,0% до 10,2%. Чаще, чем в других возрастных группах, VCoV обнаруживали в пробах от телят в возрасте 1-3 месяцев и 11-30 дней (9,9% и 8,1%). BPIV-3 чаще встречался у телят в возрасте 1-3 месяцев (6,3%) и 4-6 месяцев (6,4%).

В нашем исследовании выявлена разная частота обнаружения патогенных бактерий у телят и коров: у коров чаще всего встречались *Pasteurella multocida* (27,5%), *Mannheimia haemolytica* (28,8%) и *Trueperella pyogenes* (8,1%), тогда как у телят, особенно у новорожденных, наиболее частыми были *Salmonella spp.* (24,8%), *Escherichia coli* (24,0%) и *Streptococcus pneumoniae* (19,2%). Частота вы-

явления *Pasteurella multocida* у телят возрастала с возрастом, а *Trueperella pyogenes* обнаруживалась чаще у телят старших возрастов и коров.

Смешанные вирусно-бактериальные инфекции выявили в 37,9% проанализированных образцов биоматериала от животных с респираторными заболеваниями.

Бактерии были обнаружены в 32,7% проб как единственный возбудитель, а вирусы — в 4,9%. Ассоциации бактерий были выявлены в 23,4% проб биоматериала, в то время как ассоциации вирусов (обнаружение нескольких видов вирусов) встречались значительно реже — всего в 1,1% проб. Вирусные ассоциации чаще всего были представлены такими комбинациями: BVDV-3 и BCoV, BVDV-2 и BCoV, BVDV-1 и BCoV, BoHV-1 и BCoV, BoHV-4 и BCoV, BoHV-1 и BPIV-3.

Описание вспышек заболеваний, возникающих после ввоза животных в Россию, недостаточно освещено в доступной научной литературе. А.А. Спиваковым и соавт. (2015) проведен мониторинг состояния крупного рогатого скота, ввезенного в Воронежскую область из стран-экспортеров за период 2005-2015 гг. Из числа завезенного крупного рогатого скота заболело 29,5%. Количество выбывших животных составило 21% от общего количества завезенных животных. Основными причинами падежа и вынужденного убоя в 43,35% случаев были травмы (в том числе при транспортировке), нарушения обмена веществ и поражения печени — 24,86%, заболевания органов дыхания (бронхопневмония, отек легких) — 24,52%, патологические роды и болезни молочной железы — 3,41%, сердечная недостаточность — 2,85%.

S.J. Moore et al. (2014) изучали причины гибели КРС во время транспортировки из Австралии на Ближний Восток, в Россию и Китай. Наиболее часто диагностируемой причиной гибели были респираторные болезни (59,4%), также регистрировали хромоту (12,2%), кетоз (6,7%), септицемию (6,1%) и желудочно-кишечные инфекции (5,6%). С помощью ПЦР-диагностики исследователи выявили наличие целого ряда патогенов: BCoV, BoHV-1, BVDV, BRSV, BPIV-3, *Histophilus somni*, *Mycoplasma bovis*, *Mannheimia haemolytica* и *Pasteurella multocida*. Бактериальная природа пневмонии выявлена у 72% больных респираторными бо-

лезнями животных, вирусная – у 3%, а ассоциативные вирусно-бактериальные инфекции – у 22%. Коронавирусную инфекцию КРС выявили у 13% экспортируемых животных. Авторы предполагают, что ключевыми факторами, провоцирующими респираторные заболевания, являются тепловой стресс при транспортировке, высокая плотность животных на судне, а также температура, влажность и плохая вентиляция.

Результаты изучения нами проявления респираторных заболеваний у импортного крупного рогатого скота в период акклиматизации на сибирских молочных комплексах показали, что спектр возбудителей в обследованных хозяйствах был схожим. В него вошли вирусы BVDV, BoHV-1, BoHV-4, BPIV-3, а также бактериальные патогены: *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni* и *Salmonella dublin*. Вполне вероятно, что в рассматриваемом нами в главе 2.2.2.1.2 случае завезенный из Северной Америки скот длительное время подвергался влиянию этих факторов, что на фоне вакцинации могло привести к реактивации латентных вирусов и обострению инфекций. Однако в случае с животными из Европы, где транспортировка автотранспортом заняла всего 7-9 дней, подобные выводы пока сделать трудно, и исследования в этом направлении требуют продолжения. Введение вакцин и антибиотиков перед транспортировкой, согласно нашим данным, не профилактирует респираторные болезни.

Представляет интерес изучение смешанных инфекций, в которых участвуют разные виды BVDV. Естественные случаи коинфекций двумя видами BVDV встречаются редко. Зарубежными исследователями опубликованы работы по изучению одновременного инфицирования КРС BVDV-1 и BVDV-2, BVDV-1 и BVDV-3 в экспериментальных и естественных условиях (Brock K.V., Chase C.C.L., 2000; Fulton R.W. et al., 2000; Evermann J.F., Ridpath J.F., 2002; Ahn B.C. et al., 2005; Arenhart S. et al., 2010; Makoschey B., Janssen M.G.J, 2011; Larska M. et al., 2012).

Н. Cui et al. (2024) в Китае во время вспышки респираторного заболевания на двух фермах выделили изоляты BVDV-1 и BVDV-3 от павших телят с поражением дыхательной и пищеварительной систем и интраназально заразили морских

свинок и телят отдельно каждым изолятом и одновременно обоими. Было установлено, что коинфицированный крупный рогатый скот демонстрировал более тяжелые клинические признаки, включая геморрагическую диарею, лихорадку, вирус выделялся с носовыми выделениями с 7 по 21 дня после заражения. В клетках тканей морских свинок и КРС BVDV-3 индуцировал апоптоз, тогда как BVDV-1 не вызывал гибели клеток. У животных, зараженных одним видом вируса, наблюдалась легкая форма инфекции. Коинфекция двумя видами BVDV приводила к более тяжелым исходам заболевания по сравнению с моноинфекцией.

Аргентинские исследователи M.J. Spetter et al. (2018) описали смешанную инфекцию, вызванную BVDV-1b и BVDV-2c, у мертворожденного теленка. Было установлено более широкое распределение в тканях BVDV-2, чем BVDV-1, который был выявлен только в легких и селезенке. Некоторые исследователи высказывали предположения, что BVDV-2 имеет большую способность проникать через плаценту и заражать плод по сравнению с BVDV-1 (Bielefeldt-Ohmann H. et al., 2008; Passler T. et al., 2014).

В российской научной литературе сведений о подобных случаях на данный момент не обнаружено.

Нами была диагностирована смешанная инфекция BVDV-1 и BVDV-2 на молочном комплексе, занесенная после импорта животных, что привело к абортam, рождению слабого нежизнеспособного молодняка, диарее и респираторным болезням молодняка. Оба вида вируса одновременно выявили в тканях абортплодов и телят в возрасте до 10 дней и 3-6 мес. У абортплодов BVDV-1 выявили в тимусе, селезенке и лимфатических узлах, печени, мозжечке, легких, почках и крови, а BVDV-2 обнаружили также в головном мозге, слизистой оболочке сычуга, тонком и толстом отделах кишечника, что свидетельствует о его более широком тканевом тропизме. В 17,9% исследованных проб было зафиксировано одновременное присутствие двух вирусов. У телят до 10 дней с диареей и системной инфекцией BVDV-2 регистрировали в более широком диапазоне органов и тканей, подтверждая системное распространение, при этом одновременно два вида BVDV присутствовали в 7,7% проб. У телят 3 мес. процент выявления вирусов

был ниже, чем у абортплодов и новорожденных телят, а одновременно BVDV-1 и BVDV-2 детектировали в 5,6% проб. Таким образом, наши выводы о более широком тканевом тропизме BVDV-2 согласуются с данными зарубежных исследователей M.J. Spetter et al. (2018).

Факт выявления коинфекции BVDV-1 и BVDV-2 является доказательством того, что смешанные инфекции этими вирусами могут возникать в естественной среде, и это необходимо учитывать при диагностике и разработке стратегии вакцинации.

BVDV-3 был впервые выявлен нами в 2016 году в 7 сериях эмбриональной сыворотки КРС двух производителей. В 2020 году вирус выявили при вспышках заболеваний на трех молочных комплексах в Новосибирской области и Алтайском крае. В одном хозяйстве инфекция протекала наиболее тяжело, с вовлечением животных всех возрастных групп и проявлялась абортами на разных сроках стельности, поражением пищеварительной и дыхательной системы у части телят были проявления болезни слизистых; заболеваемость достигала 90%, а летальность 100%, ущерб составил 12,5 млн руб. Во втором хозяйстве инфекция характеризовалась абортами, рождением слабого молодняка, диареей у телят. В третьем абортировали часть коров и нетелей. Установили, что данные патологии развились после вакцинации поголовья в этих хозяйствах вакциной против нодулярного дерматита, содержащей в качестве контаминанта BVDV-3. Филогенетический анализ подтвердил идентичность последовательностей вируса в пробах биоматериала от животных из трех хозяйств и в используемой вакцине и установил их принадлежность к итало-бразильской группе (BVDV-3a).

К.П. Юровым и соавт. (2016) BVDV-3 был обнаружен в составе коммерческой вакцины против чумы мелких жвачных животных на территории Республики Таджикистан. Вспышки инфекции, вызванные BVDV-3, ранее в России не были описаны. Нами в течение четырех лет (2016-2020) проводилось исследование на BVDV-1, -2, -3 поступающего биоматериала от КРС во время вспышек инфекций из разных областей и краев Сибири, а также проб, хранящихся в условиях глубо-

кой заморозки с 2008 года (ретроспективный анализ), и вирус BVDV-3 ранее не был обнаружен.

В настоящее время естественные инфекции BVDV-3 в Европе были выявлены в Италии Luzzago C., Decaro N. (2021). Проведенное нами исследование согласуется с данными авторов, согласно которым BVDV-3 распространяется в основном через биологические продукты, такие как контаминированные вакцины и эмбриональные сыворотки, а не через инфицированных животных, поскольку в Италии BVDV-3 выявляется редко, а в других европейских странах циркуляция его не регистрировалась.

M. Giammaroli et al. (2015) протестировали 26 партий эмбриональной сыворотки из разных стран на наличие геномов пестивирусов крупного рогатого скота. Все 26 партий дали положительный результат по результатам ОТ-ПЦР на наличие как минимум одного вида пестивирусов крупного рогатого скота. BVDV-3 были обнаружены в 15 партиях.

Таким образом, учитывая потенциальную угрозу передачи BVDV-3 с контаминированными биопрепаратами и уже возникшие вспышки инфекций, необходимо использовать для диагностики методом ПЦР тест-системы с дифференциацией трех видов вирусов ВД-БС КРС.

Известно, что коронавирусы крупного рогатого скота, выявляемые при желудочно-кишечных и респираторных инфекциях, являются представителями одного и того же квазивида, несмотря на генотипические и антигенные различия между отдельными изолятами (Vlasova A.N., Saif L.J., 2021).

Нами при помощи ОТ-ПЦР-РВ изучена распространенность коронавируса крупного рогатого скота (BCoV) в органах телят с различными клиническими проявлениями и частота смешанных инфекций с другими инфекционными агентами. BCoV выявляли у телят с диарейным (16,3%) и респираторным синдромами (9,9%). Установлена достоверная взаимосвязь между присутствием BCoV и наличием ротавируса, *E. coli* и сальмонелл в органах и тканях больных телят, что подтверждает роль BCoV в этиологии смешанных инфекций желудочно-кишечного тракта. Статистически значимой взаимосвязи между коронавирусом КРС и боль-

шинством других распространенных возбудителей респираторных заболеваний телят (BoHV-1, BVDV, BRSV, BPIV-3, BoHV-4 и стрептококки) не было обнаружено. Однако была установлена достоверная корреляция ($p < 0,05$) между коронавирусом и бактериями *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica*. На основании этих данных можно сделать вывод, что коронавирус может как самостоятельно вызывать респираторные заболевания у телят (моноинфекция), так и действовать совместно с указанными бактериальными патогенами, выступая в роли сопутствующего возбудителя. N. Decaro et al. (2008 b) выявляли BCoV как моноагент при респираторных болезнях телят в Италии. Согласно исследованиям L.J. Saif, K.J. Jung (2020), респираторные заболевания и патологии могут варьироваться в зависимости от штамма BCoV, возраста животного, коинфекции с другими патогенами и дополнительных стрессовых факторов окружающей среды.

Одним из основных путей передачи возбудителей многих вирусных заболеваний является семя быков-производителей. Сперма быков, инфицированных вирусами ВД-БС и ИРТ КРС, является потенциальным источником заражения. У инфицированных быков наблюдается низкое качество спермы, что способствует снижению ее оплодотворяющей способности и показателей оплодотворяемости и фертильности у коров. Сперма инфицированных быков является источником инфекции для восприимчивых коров. Использование контаминированной спермы в животноводческих хозяйствах влечет за собой значительный экономический ущерб, обусловленный нарушением репродукции и заболеваемостью молодняка (Graham D.A., 2013, Oguejiofor C.F., 2019). По данным С.П. Яцентюк (2024), при исследовании спермы из племенных хозяйств Московской и Воронежской областей и из иностранных племенных центров было выявлено до 1,3% образцов спермопродукции, содержащей генетический материал вируса ВHV-1, и 0,5% образцов с BVDV.

Для изучения контаминации спермы быков-производителей вирусами нами за 18 лет было исследовано 13426 серий спермы, полученной в 1985-2021 гг. от 274 быков методом ПЦР. Контаминация спермы вирусом ИРТ КРС была выше, чем вирусом ВД-БС КРС. BoHV-1 выявили в 3,95% серий от 16,4% быков, а

BVDV – в 0,4% серий от 4,1% быков. Более высокая степень инфицированности банка спермы вирусом ИРТ КРС, вероятно, связана с установлением у инфицированных животных пожизненной латентной инфекции и периодическим выделением вируса со спермой. Быки, остро инфицированные BVDV, выделяют вирус со спермой кратковременно. По данным A.J. Read et al. (2020), особую опасность на племпредприятии представляют персистентно инфицированные быки-производители, выделяющие BVDV со спермой на протяжении всей жизни. Нами был выявлен бык-производитель, персистентно инфицированный BVDV и выделявший вирус постоянно в течение 10 месяцев. ПЦР-ПДРФ анализ изолятов BoHV-1 и филогенетический анализ изолятов BVDV, выделенных от больных коров в хозяйствах после осеменения контаминированной спермой, показал их генетическое сходство, и это подтверждает, что инфицированная сперма является одним из главных источников распространения вирусов.

Для решения проблемы возможной контаминации спермы быков-производителей нами предложено, ввиду высокой стоимости быков и отсутствия государственных программ контроля, инфицированных животных не выбраковывать, а проводить мониторинг всех серий спермы на наличие геномов BoHV-1 и BVDV с интервалом 6 месяцев с выбраковкой инфицированных серий и реализации свободных от вирусов.

Пестивирусы КРС являются очень распространенными контаминантами биологических препаратов. Учитывая, что 90% штаммов BVDV являются нецитопатогенными, при случайном загрязнении клеточных линий обнаружить BVDV под оптическим микроскопом невозможно. Контаминация эмбриональных сывороток, и, как следствие, культур клеток млекопитающих пестивирусами КРС несет серьезную опасность. Это может повлечь за собой получение ошибочных результатов диагностики, инфицирование биологических препаратов и последующее заражение животных. В результате проведенных нами исследований 30 серий эмбриональной сыворотки КРС разных производителей методом ОТ-ПЦР с последующим секвенированием в 7 сериях выявили геном BVDV-3a, в 4 – BVDV-1a, в 2 – BVDV-1j.

В зарубежной литературе имеются сообщения о выявлении генома пестивирусов в эмбриональной сыворотке. BVDV-3 впервые выделили в 2004 году в Германии из партии эмбриональной сыворотки, произведенной в Бразилии и расфасованной в Европе (Schirrmeier H., 2004). H. Xia et al. (2011), исследуя 13 партий коммерческой эмбриональной сыворотки южноамериканского происхождения, впервые обнаружили в качестве контаминанта BVDV-3, а также BVDV-1 и BVDV-2. По данным F.V. Bauermann et al. (2014), исследовавших 90 серий коммерческой сыворотки, произведенной в США, но расфасованной в Европе, BVDV-3 обнаружен не был, но в 19 из них присутствовал BVDV-1, а в одной – BVDV-2. Аргентинские исследователи A. Recora et al. (2019) при изучении 124 образцов местной эмбриональной сыворотки выявили в 4 образцах BVDV-3, в 45 – BVDV-1b (82,2%), BVDV-1a (13,3%) и BVDV-2 (4,5%).

По нашим данным, 10 перевиваемых клеточных культур различного происхождения были контаминированы BVDV-1a: MDBK, KCT, CRFK, RK13, TEB, L929, MF, BHK21, Vero, FS. Заражение культур клеток нецитопатогенным биотипом BVDV-1a, по-видимому, имеет общий источник. Возможно, это произошло из-за использования эмбриональной сыворотки для культивирования, которая содержала этот вирусный агент. Дополнительный филогенетический анализ по генам Npro, Erns, E1 и E2 выявил субтип BVDV-1j в образце культуры клеток MDBK/08.

N. Gómez-Romero et al. (2021) методом ОТ-ПЦР обнаружили BVDV в качестве контаминанта различных биологических продуктов, используемых в Мексике для производства ветеринарных вакцин. Для этой цели были протестированы шесть партий моновалентных вакцин, восемь партий клеточных линий, используемых для производства вакцин, и 10 партий эмбриональной сыворотки разных поставщиков. Вирусная РНК была обнаружена в 62,5% проанализированных образцов. Филогенетический анализ выявил присутствие субтипов BVDV-1a, 1b и BVDV-2a в протестированных образцах.

В России Л.В. Урываев и соавт. (2012) впервые выявили контаминацию культур клеток пестивирусами, проанализировав 131 клеточную линию методом

ПЦР. Клетки человеческого происхождения были контаминированы BVDV в 40% случаев, обезьян – более чем в 60%, домашних животных – в 27% случаев. Всего BVDV был выявлен в 33% образцов клеток. Авторы обращают внимание на высокую рецепторную пластичность вируса и его способность реплицироваться в клетках животных разных биологических видов. При анализе 37 образцов разных партий образцов коммерческой эмбриональной сыворотки разных производителей РНК вируса выявили более чем в 60% случаев.

С.В. Алексеенкова и соавт. (2013) установили, что культуры клеток бычьего и свиного происхождения подвержены контаминации BVDV в наибольшей степени. Филогенетический анализ показал общность происхождения штаммов вирусов - контаминантов между собой и с эпизоотическим штаммом 190NCP нецистопатогенного биотипа, выделенного в Японии в 1987 г. во время вспышки геморрагического гастроэнтерита. Источником вируса, вероятно, послужила сыворотка КРС, используемая в составе среды для роста клеток.

На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что контаминация культур клеток млекопитающих пестивирусами крупного рогатого скота представляет серьезную угрозу заражения вирусами биологических препаратов и, следовательно, животных, а также может привести к ложным результатам диагностических исследований. В контексте производства вакцин и других биологических препаратов первостепенное значение приобретает совершенствование системы контроля, направленной на профилактику контаминации вирусами.

Генетический полиморфизм пестивирусов, обусловленный строением их генома, приводит к постоянному росту генетического разнообразия штаммов, что создает трудности в диагностике заболеваний и может негативно сказываться на эффективности профилактических мероприятий.

В нашей стране наблюдается недостаток систематизированных исследований в области филогенетического анализа вирусных изолятов пестивирусов КРС. Так, Г.К. Юров и соавт. (2013) установили циркуляцию BVDV-1a и BVDV-1m в популяциях домашнего скота и лесных бизонов. В ходе исследования, проведенного А.Г. Южаковым (2009), были идентифицированы субтипы BVDV-1b,

BVDV1-d и BVDV-2 в хозяйствах Сибири. А.В. Нефедченко (2018) выявил циркуляцию семи субтипов BVDV-1 (1a, 1b, 1c, 1d, 1i, 1f, 1p) и трех BVDV-2 (2a, 2b и 2c) среди телят с респираторной патологией в хозяйствах Сибири.

В своей работе мы оценили генетическое разнообразие вирусов вирусной диареи крупного рогатого скота при различных патологиях в шести областях и краях СФО и Республике Казахстан с помощью филогенетического анализа высококонсервативной области 5'-UTR и генов N^{pro}, Erns, E1 и E2, которые играют роль в репликации вируса, уклонении от иммунного ответа и изменчивости.

Проведенное нами исследование выявило циркуляцию трех видов вирусной диареи крупного рогатого скота среди персистентно и транзитно инфицированных животных на молочных комплексах Сибири: BVDV-1, BVDV-2 и впервые выделенный в России BVDV-3. BVDV-1 включал 8 различных субтипов (1a, 1b, 1c, 1d, 1f, 1i, 1p, 1r), BVDV-2 - 3 субтипа (2a, 2b, 2c) и BVDV-3a. Результаты исследований продемонстрировали взаимосвязь между конкретными субтипами вируса диареи крупного рогатого скота (BVDV) и вызываемыми ими клиническими проявлениями.

Наибольшее количество циркулирующих штаммов вируса (39,6%), выявленных у животных с персистентной инфекцией и респираторной патологией в Тюменской, Новосибирской областях и Красноярском крае, согласно филогенетическому анализу области 5'-UTR, отнеслись к субтипу BVDV-1b. Этот субтип – самый распространенный во всем мире и превалирует в странах Европы. Согласно исследованиям K. Yeşilbag K. et al. (2017), 31,6% всех изолятов имеют субтип BVDV-1b. Наибольшее его распространение отмечено в Италии, Польше, Словении, а также Японии и Корее. В США этот субтип по встречаемости находится на втором месте после 1a, а в Германии – после 1d (Fulton R. 2009a; Wernike K. et al., 2024). В нашей работе BVDV-1b выявили в хозяйствах с завозом скота из США, Словении, Германии, Дании и Голландии, а также у местного скота.

На втором месте по встречаемости находился BVDV-1f (16,7%). Он ассоциировался как с персистентной инфекцией, так и с респираторной патологией и выявлялся в пяти регионах Сибири: Тюменская, Омская, Иркутская области,

Красноярский край и Республика Казахстан. Примечательно, что в Тюменской области и Казахстане этот субтип выявили у животных, рожденных от нетелей, завезенных из Германии и Австрии, а в трех других областях его выявили в хозяйствах, куда импорт не осуществлялся.

Субтип BVDV-1f у персистентно инфицированных животных часто встречается в Словении и Австрии, согласно литературным данным (Toplak I. et al., 2016). Реже этот субтип был обнаружен в Италии (Luzzago C., Decaro N., 2021) и Турции (Yeşilbag K. et al., 2017), но клинические проявления болезни в этих случаях не были описаны.

Субтип BVDV-1d (8,3%) присутствовал на территории Тюменской и Новосибирской областей и являлся причиной респираторных болезней телят местного происхождения, а также рожденных от завезенных из Франции нетелей. Этот субтип наиболее распространен в странах Европы, особенно в Италии, Франции, Германии (Luzzago C., Decaro N., 2021, Rivas J. et al., 2022, Wernike K. et al., 2024).

Циркуляцию субтипа BVDV-1a (6,3%) установили в Тюменской области у нетелей и коров с репродуктивной патологией, завезенных из Австрии и Германии. Этот субтип находится на втором месте по распространенности в мире и включает, по данным К. Yeşilbag et al. (2017), 20,8% классифицированных изолятов. BVDV-1a наиболее распространен в США, Японии, Корее и европейских странах, наиболее часто в Великобритании и Германии (Fulton R., 2009 a, Oem J.K. et al., 2010, Abe Y. et al., 2016, Booth R.E.B et al., 2013, Wernike K. et al., 2024).

Субтип BVDV-1r (4,2%) выявили при респираторной патологии у теленка Тюменской области, рожденного от нетели, завезенной из Австрии, и теленка местной породы Новосибирской области. Данный субтип спорадически выявляется во Франции и Италии, но вызываемые им патологии не описаны (Luzzago C., Decaro N., 2021; Rivas J. et al., 2022).

BVDV-1c (2,1%) был выявлен в Тюменской области у теленка с респираторной патологией, рожденного нетелью, завезенной из Голландии. Почти все (95,9%) полевых изолятов из Австралии были классифицированы как BVDV-1c (Yeşilbag K. et al., 2017). Субтип циркулирует в странах Европы, Чили и Перу

(Pizarro-Lucero J. et al., 2006; Ståhl K. et al., 2009), Турции (Yeşilbag K. et al., 2017), часто в Китае (Deng M. et al., 2020).

BVDV-1p (2,1%) детектирован в Тюменской области от теленка, рожденного нетелью из Германии, с респираторной патологией. По данным литературы, этот субтип циркулирует в странах Азии, в частности, в Китае (Xiao Y. et al., 2025), при этом вызывая респираторные болезни, и не регистрировался в странах Европы.

BVDV-1i (2,1%) был зарегистрирован в Новосибирской области у животных местного происхождения с респираторной патологией, отмечается его циркуляция в странах Европы, в частности, в Великобритании (Booth R.E.B et al. 2013).

Штаммы субтипа BVDV-2a (6,3%) вызывали репродуктивные болезни у коров и нетелей местного происхождения и завезенных из США в хозяйствах Новосибирской и Тюменской областей. Этот субтип является самым часто встречающимся среди всех вирусов BVDV-2 и широко распространен в США, странах Южной Америки, Турции (Fulton R. 2009 a; De Oliveira P.S.B. et al., 2022; Yeşilbag K. et al., 2017).

Мы выявляли BVDV-2b (4,2%) во внутренних органах абортированного плода и мертворожденного теленка местной породы в Новосибирской области и у мертворожденного теленка от нетели, завезенной из США.

BVDV-2c (2,1%) встречается редко в популяции КРС. По сообщениям M. Jenckel et al., (2014) и J. Gethmann et al. (2015), в Германии и Голландии он вызывал тяжелые вспышки респираторного заболевания, внезапную гибель коров и телят, геморрагический энтерит. Согласно исследованиям N. Decaro et al. (2017), BVDV-2c в 2016 г. был обнаружен при вспышке болезни у мелких жвачных животных в Южной Италии, а ранее был зарегистрирован у КРС во время тяжелой вспышки инфекции. В Тюменской области этот субтип был выявлен в органах абортированного плода от нетели, импортированной из США. В данном случае инфекция проявилась в виде репродуктивных патологий и системного заболевания.

Субтип BVDV-3a (6,3%), впервые выявленный в России в трех хозяйствах Новосибирской области и Алтайского края после использования контаминированной вакцины, вызывал комплекс патологий, включающий респираторные, репродуктивные и системные проявления у животных разных возрастов. BVDV-3 распространен в Бразилии (Baumbach L.F. et al., 2023), Индии (Kalaiyarasu S. et al., 2022), Турции (Timurkan M.Ö., Aydın H., 2019). В странах Европы субтип регистрировался только на юге Италии, где вызывал патологию воспроизводства, проявляющуюся массовыми абортами, и был выделен от ПИ теленка. Отсутствие циркуляции BVDV-3 в большинстве стран Европы и его спорадическое выявление только в Италии свидетельствуют в пользу версии, что источником заражения крупного рогатого скота на юге страны стали контаминированные биологические продукты, а не животные-вирусоносители (Luzzago C., Decaro N., 2021). Наши данные полностью согласуются с подобным утверждением.

Таким образом, нами установлено широкое генетическое разнообразие циркулирующих штаммов пестивирусов крупного рогатого скота в хозяйствах Сибири, что объясняется заносом новых субтипов с импортируемым скотом при отсутствии мер контроля и использованием контаминированных биологических препаратов. В состав вакцин против ВД-БС КРС, применяющихся в нашей стране, входят субтипы BVDV-1a и, реже, BVDV-2a. В этом исследовании мы показали преимущественную циркуляцию на территории Сибири BVDV-1b, BVDV-1f, BVDV-1d, и остается неясным, могут ли вакцины полностью защищать от циркулирующих субтипов. E. Sozzi et al. (2019) установили, что четыре коммерческие вакцины, широко применяемые во всем мире, не способны обеспечить стойкий перекрестный иммунитет против субтипа BVDV, не содержащегося в вакцине. Исследования в этом направлении необходимо продолжить.

В настоящее время установлена во всем мире циркуляция десяти генетических подгрупп респираторно-синцитиального вируса КРС (Kumagai A. et al., 2021, Aydın O. et al., 2024).

В нашей стране генетическое разнообразие циркулирующих штаммов вируса BRSV ранее не оценивалось. Нами впервые проведено секвенирование полной

нуклеотидной последовательности гена gG пяти изолятов BRSV, выделенных от КРС на территории Сибири, данные последовательности были зарегистрированы в базе GenBank под номерами OR426499–OR426505. В результате проведенных исследований мы установили циркуляцию двух генетических подгрупп вируса – II и III.

К подгруппе II были отнесены изоляты NSO1 и NSO2, выделенные из органов дыхания телят с симптомами острого респираторного заболевания в двух хозяйствах Новосибирской области. Штаммы этой подгруппы циркулируют на территории Бельгии (Demil A. et al., 2025), Швеции, Дании (Aydin O. et al., 2024), Италии (Bertolotti L. et al., 2018), а респираторные болезни, вызываемые ими, характеризовались тяжелым течением и высокой летальностью. Экстренная иммунизация животных живой вакциной, вводимой интраназально, к успеху не привела (Giammarioli M. et al., 2020). Наши изоляты также были выявлены у животных, которые не подвергались иммунизации против данной BRSV-инфекции.

В подгруппу III вошли изоляты Alt3 и Alt4, выделенные нами в Алтайском крае. Штаммы этой подгруппы доминируют на территории Китая (Chang Y. et al., 2022), США (Kirolos A. et al., 2019), Бразилии (Headley S.A. et al., 2017), Турции (Aydin O. et al., 2024). По сообщению Kirolos A. et al. (2019), американский штамм USII/S1 связывают со вспышками респираторных заболеваний в 2015 г., которые принесли огромные экономические потери животноводству. Y. Chang et al. (2022) в Китае при вспышке острого респираторного заболевания среди телят в образцах легочной ткани детектировали штамм, относящийся к подгруппе III. Последовательности, кодирующие белок G изолятов Alt3 и Alt4 длиной 789 п.н., кодировали 263 аминокислоты, что характерно для всех представителей подгруппы III. Замена аминокислот относительно эталонного американского штамма USII/S1 (KU159366) были идентичны мутациям, обнаруженным у китайских изолятов (OM372493, OP137034, OP609672).

Изолят K18, выделенный при вспышке высококонтагиозного респираторного заболевания в Республике Казахстан от нетелей, завезенных из Канады, был отнесен нами к отдельной кладе.

Хотя ряд исследователей – J. Valarcher et al., 2000; R. Leme et al., 2020 – относят штамм 375 (L10925) и его варианты 375.1, 375.2, входящие в состав вакцин, к подгруппе III, результаты наших исследований опровергают эти выводы. Вакцинные штаммы FP5L5NB и FP5L5, а также изолят K18 были сгруппированы в отдельную кладу, демонстрируя значительное расхождение со штаммами обеих подгрупп (II и III). Возможная причина заключается в нуклеотидных заменах, которые привели к изменениям в аминокислотной последовательности 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).

Уникальная аминокислотная замена у изолятов NSO1 и NSO2 в иммунодоминантной области 181 (Ala→Thr) отмечена только у высоковирулентного штамма DQ (MT861050), однако они относятся к разным подгруппам. По данным J.P. Langedijk et al. (1997), Ala181 является важной аминокислотой для связывания антител, поэтому влияние этой аминокислотной мутации на антигенность белка G нуждается в дальнейшем изучении.

Таким образом, в связи с генетической изменчивостью BRSV, проведение молекулярно-генетических исследований является необходимым для оценки практической значимости этого разнообразия в отношении патогенных свойств штаммов и подходов к иммунопрофилактике инфекции.

Изучение генетического полиморфизма циркулирующих штаммов BCoV среди крупного рогатого скота на территории Сибири ранее не проводилось.

Наше исследование изолятов BCoV, выделенных от животных с респираторной и желудочно-кишечной патологией из семи регионов Сибири, выявило циркуляцию европейской и американо-азиатской линий. Анализ изолятов выявил дивергенцию в классификации по генам S и N.

Группа изолятов, включающая S22, S24, S25, S26, S27, S29, S36 и S49, классифицировалась как подклада 1.1 по гену S и клада 2 по гену N. Группа изолятов S3, S5 и S20 была отнесена к подкладе 2.1 по гену S и подкладе 1.1 по гену N, а изолят S34 - к подкладе 1.1 по гену S и 1.2 по гену N. Примечательно, что изолят S22 (подклада 1.1 по гену S и клада 2 по гену N, европейские штаммы) был выде-

лен от животных, импортированных из Германии и Канады. Изоляты S46 и S49, принадлежащие к подкладе 2.2 по гену S (европейские штаммы) и кладе 2 по гену N (смешанные штаммы), выделены от телят, завезенных из европейских стран. Мы пришли к выводу, что популяция изолятов коронавируса КРС, циркулирующих на территории Сибири, носит гетерогенный характер, так как одни и те же изоляты были отнесены к различным кладам и подкладам.

Нами не было установлено различий между кишечными и респираторными изолятами, происходящими из хозяйств с разным типом ведения скотоводства. Также не выявлено зависимости от локации региона и страны происхождения животных, так как большее количество изолятов было получено от скота местного происхождения.

Согласно исследованиям S. Lotfollahzadeh et al. (2020), в Иране филогенетический анализ BCoV по гену S выявлял 4 географически обусловленных кластера, а по гену N для тех же штаммов не выявил никакой четкой структуры или географической зависимости. Полученные нами данные коррелируют с результатами, представленными иранскими исследователями.

В нашей работе мы также наблюдали, что референтные штаммы вирусов распределяются по-разному в зависимости от гена. Например, штаммы RVLC7 (Ирландия) и BRA/PR323-425 (Бразилия) находятся в одной подкладе 2.2 при филогенетическом анализе по гену S, но расходятся по гену N, относясь к кладе 2 и подкладе 1.1 соответственно. Это расхождение можно объяснить тем, что бетакоронавирусы мутируют с разной скоростью, а также рекомбинациями между штаммами. M. Amicone et al. (2022) установили разную скорость мутаций у близкородственного SARS-CoV-2: его ген S мутирует в пять раз быстрее других кодирующих областей генома, вероятно, из-за давления иммунной системы хозяина, в то время как ген N демонстрирует большую стабильность.

Q. Zhu et al. (2022) определили, что в Китае характер проявления коронавирусной инфекции был связан с типом ведения животноводства, возрастом животных и плотностью размещения скота. Китайские штаммы были отнесены к американо-азиатской группе, в которой выделились три клады. Один штамм был отне-

сен к европейской группе. В то же время была зафиксирована рекомбинация между двумя разными штаммами, что привело к образованию рекомбинантного штамма BCV-AKS-01.

Мы не обнаружили географической специфичности в распространении изолятов, так как изоляты из одной клады были выявлены в географически разобщенных областях и краях Сибири. Наблюдалась зависимость между типом изолята и категорией хозяйства: респираторные изоляты чаще находили на крупных молочных комплексах, независимо от завоза животных, тогда как кишечные изоляты преобладали в мелких и средних хозяйствах с местными животными.

Генетический полиморфизм циркулирующих штаммов BoHV-4 в нашей стране изучен мало. Так, А.В. Пчельников (2024) на территории Московской и Тверской областей установил циркуляцию среди крупного рогатого скота европейского генотипа BoHV-4.

Нами на территории Сибири выявлена циркуляция двух генотипов вируса: американского (DN 599-like) - Kz19/18, T24/18, N26/18, N29/18, и европейского (Movar-like) - N31/18. Изоляты, относящиеся к американскому генотипу, были выделены от животных на территории Новосибирской и Тюменской областей и Республики Казахстан, а к европейскому – в Новосибирской области. Изоляты выделены от животных с гинекологической, респираторной и желудочно-кишечной патологией.

Изоляты вируса были получены от животных разного происхождения: N31/18 — от импортированного из Германии крупного рогатого скота, Kz19/18 и T24/18 — от животных из США (завезенных в 2008-2012 гг.). Изоляты N26/18 и N29/18 были обнаружены в хозяйствах, которые не ввозили животных из-за рубежа. На основании этих данных можно сделать предположение, что в Сибири преобладает американская генетическая линия изолятов. Возможно, вирус был завезен в регион в 1970–1980-х годах вместе с импортированным скотом из США, или же он уже давно циркулировал среди местного поголовья крупного рогатого скота.

С.А. Gagnon et al. (2017) провели полногеномное секвенирование штамма BoHV-4, выделенного от теленка с респираторным заболеванием в Канаде, и определили его принадлежность к группе европейских штаммов. Исследователи предполагают, что выделенный штамм мог быть завезен в Северную Америку из Европы путем импорта животных или принадлежность к европейской группе может быть связана с событиями рекомбинации. J. Lin et al. (2021) выявили в Китае циркуляцию европейской группы штаммов вируса герпеса 4 типа КРС. А японские исследователи А. Kumagai et al. (2024) установили принадлежность штамма SG20, выделенного от теленка с респираторной патологией, также к европейскому генотипу BoHV-4, и его тесную связь с китайским штаммом HB-JBZ. В США D. Areda et al. (2018) выявили циркуляцию европейского и американского генотипов BoHV-4 при исследовании биоматериала от коров с патологией воспроизводства. Таким образом, результаты нашего исследования выявили необходимость более детального и широкомасштабного изучения эпизоотологии, в том числе молекулярной, инфекции, вызываемой вирусом герпеса 4 типа крупного рогатого скота.

Широкий спектр респираторных заболеваний крупного рогатого скота приводит к серьезным экономическим потерям в молочном животноводстве. Вирусы, входящие в группу патогенов, вызывающих комплекс респираторных болезней крупного рогатого скота, способны поражать и другие органы и системы животных. Вызываемые патологии характеризуются большим разнообразием течения и клинических проявлений. В связи с этим установление роли конкретного этиологического агента в практических условиях имеет большое значение при изучении особенностей эпизоотической ситуации и разработке мероприятий по контролю инфекции. Необходимо постоянно обновлять и совершенствовать методы диагностики с учетом циркуляции генетических групп вирусов в регионе. В результате проведенных исследований нами разработаны ОТ-ПЦР-РВ тест-системы для выявления восьми вирусов крупного рогатого скота: BoHV-1, BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3, BRSV, BCoV, BoHV-4, BPIV-3, изучена этиологическая структура респираторных инфекций на территории Сибири в хозяйствах разных категорий,

циркуляция различных генетических групп вирусов среди крупного рогатого скота. Большое генетическое разнообразие вирусов и постоянное появление новых генотипов в результате мутаций необходимо учитывать при применении и разработке вакцин с перекрестной защитой против гетерологичных штаммов, присутствующих на данной территории.

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*. Импортированный 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 абортными, 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 ин-

фекцию, 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 ВоHV-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 импортированным 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 (приложение Б):

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», утвержденного Ученым советом ИЭВСиДВ СФНЦА РАН (протокол №1 от 20.10.2016) (приложение В);

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

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 variability 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 эф-

фективности 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- BAdV-1 - Bovine Adenovirus Type 1, аденовирус 1 типа крупного рогатого скота
- BCoV - Bovine Coronavirus, коронавирусы крупного рогатого скота
- BHK21 - перевиваемая линия культуры клеток почки сирийского хомячка
- BoHV-1 - Bovine Herpesvirus 1, герпесвирус 1 типа крупного рогатого скота
- BoHV-4 - Bovine Herpesvirus 4, герпесвирус 4 типа крупного рогатого скота
- BoHV-5 - Bovine Herpesvirus 5, герпесвирус 5 типа крупного рогатого скота
- BPIV-3 - Bovine Parainfluenza Virus 3, вирус парагриппа-3 крупного рогатого скота
- BRSV - Bovine Respiratory Syncytial Virus, респираторно-синцитиальный вирус крупного рогатого скота
- BRV - Bovine Rhinovirus, риновирус крупного рогатого скота
- BVDV - Bovine Viral Diarrhea Virus, вирус вирусной диареи – болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота
- CRFK – перевиваемая линия культуры клеток почки кошки
- CSFV - Classical swine fever virus, вирус классической чумы свиней
- Ct – значение порогового цикла амплификации
- CV – коэффициент вариации
- FS - перевиваемая линия культуры клеток селезенки кошки
- IDV – Influenza D virus, вирус гриппа D
- L929 - перевиваемая линия культуры клеток фибробластов мыши
- MDBK – культура клеток почки теленка
- MF - перевиваемая линия культуры клеток фибробластов мыши
- RK13 – перевиваемая линия культуры клеток культуры клеток почки кролика
- SD – стандартное отклонение
- SuHV-1 – Suid herpesvirus 1, вирус болезни Ауески
- TEB - перевиваемая линия культуры клеток тестикул эмбриона коров
- ВГ-4 – вирус герпеса 4 типа
- ВД-БС – вирусная диарея-болезнь слизистых

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИПВ – инфекционный пустулезный вульвовагинит

ИРТ – инфекционный ринотрахеит

ИФА – иммуноферментный анализ

КВИ – коронавирусная инфекция

кДНК – комплементарная ДНК

КРС – крупный рогатый скот

КСТ – культура клеток коронарных сосудов телят

НЦП - нецитопатогенный

ОТ – обратная транскрипция

ПГ-3 – парагрипп-3

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

ПИ – персистентно инфицированный

ПКО – положительный контрольный образец

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

РНК – рибонуклеиновая кислота

РСИ – респираторно-синцитиальная инфекция

РФ – Российская Федерация

СФО – Сибирский федеральный округ

ЦП - цитопатогенный

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев, А.Д. Усовершенствование системы профилактики респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота и обоснование иммунокоррекции: дис. ... канд. вет. наук: 06.02.02 / А.Д. Алексеев. - Екатеринбург, 2016. – 22 с.
2. Алексеенкова, С.В. Проверка клеточных культур на контаминацию вирусом диареи крупного рогатого скота — необходимое условие производства биологических препаратов / С.В. Алексеенкова, Г.К. Юров, Т.В. Гальнбек [и др.] // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2013. - №11. – С. 15-18.
3. Амерханов, Х.А. Методические рекомендации по адаптации импортного высокопродуктивного молочного скота в Российской Федерации / Х.А. Амерханов, А.Я. Самуйленко, С.В. Шабунин [и др.] // М.: ФГНБУ «Росинформагротех», 2018. – 76 с.
4. Басова, Н.Ю. Респираторные болезни молодняка крупного рогатого скота инфекционной этиологии в условиях Северного Кавказа: автореф. дис. ... д-ра ветеринар. наук: 16.00.03 / Н.Ю. Басова. – Краснодар, 2002. – 42 с.
5. Батомункуев, А. Рота- и коронавирусные инфекции крупного рогатого скота в Иркутской области / А. Батомункуев, П. Евдокимов, И. Мельцов // Ветеринария сельскохозяйственных животных. - 2020. – № 5. – С. 9-13.
6. Бучнев, К.Н. Вирусное заболевание крупного рогатого скота с поражением слизистых оболочек / К.Н. Бучнев // Вестник сельскохозяйственной науки Казахстана. - 1967. - № 7. - С. 11-15.
7. Васильев, А.В. РНГА в диагностике респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота / А.В. Васильев, Н.Г. Осидзе, В.Н. Сюрин [и др.] // Ветеринария. – 1988. - № 10. – С. 33-34.
8. Верховская, А.Е. Парагрипп крупного рогатого скота /А.Е. Верховская, О.А. Верховский, В.И. Кис, Т.И. Алипер // В кн. Актуальные инфекционные

- болезни крупного рогатого скота. Руководство. Под ред. Алипер Т.И. - 2021. – С. 396-401. doi: 10.31016/viev-2020-6.
9. Верховская, А.Е. Особенности диагностики и профилактики вирусной диареи крупного рогатого скота / А.Е. Верховская, В.А. Сергеев, Т.И. Алипер, Е.В. Иванов // Ветеринария. – 2009. - №8. - С. 3-7.
 10. Войтова, К.В. Диагностика респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции: автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук: 06.02.02 / К.В. Войтова. - Новосибирск, 2011. - 20 с.
 11. Гаджиев, Б.М. Ускоренная индикация вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в культуре клеток: автореф. дис. ...канд. ветеринар. наук: 06.02.02 / Б.М. Гаджиев. - Москва, 1991. - 24 с.
 12. Гериш, А. Генотипизация вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота, выделенного в Республике Татарстан: дис. ... канд. ветеринар. наук: 06.02.02 / А. Гериш. – Казань, 2021. - 125 с.
 13. Глотов, А.Г. Диагностика инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота методом молекулярной гибридизации и особенности эпизоотического процесса заболевания в современных условиях: автореф. дис. ... д-ра ветеринар. наук: 16.00.03 / А.Г. Глотов. - Новосибирск, 1999. - 39 с.
 14. Глотов, А.Г. Коронавирусы жвачных животных / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2020. № 3. – С. 49-61. doi: 10.26898/0370-8799-2020-3-5.
 15. Глотов, А.Г. Эпизоотическая ситуация по респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота в хозяйствах по производству молока / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, С.В. Котенева [и др.] // Ветеринария. – 2010. - № 7. - С. 21-25.
 16. Глотов, А.Г. Этиологическая структура массовых респираторных болезней молодняка крупного рогатого скота в хозяйствах, занимающихся производством молока / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, А.В. Нефедченко [и др.] // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2008. – № 3. – С. 72–78.

17. Глотов, А.Г. Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, О.Г. Петрова [и др.] // Ветеринария. – 2002. - № 3. – С. 17-21.
18. Глотов, А.Г. Респираторные болезни телят вирусно-бактериальной этиологии: монография / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова. – Новосибирск: РАСХН, Сиб. Отделение, ГНУ ИЭВСиДВ, 2008. - 256 с.
19. Глотов, А.Г. Проявление инфекционного ринотрахеита у телят раннего возраста / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, О.В. Семенова // Ветеринария. – 2013. - № 12. – С. 11-14.
20. Глотов, А.Г. Выявление респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота при помощи ОТ-ПЦР / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, И.Я. Строганова // Вопросы вирусологии. – 2011. – Т. 56(5). - С. 34-37.
21. Глотов, А.Г. Пестивирусы жвачных животных / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, А.Ф. Шуляк // Вопросы вирусологии. – 2016. Т. 61(2). С. 59-62. doi: 10.18821/0507-4088-2016-61-2- 59-62.
22. Глотов, А.Г. Респираторно-синцитиальная инфекция крупного рогатого скота / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, А.Г. Южаков // В кн. Актуальные инфекционные болезни крупного рогатого скота. Руководство. Под ред. Алипер Т.И. - 2021. – С. 373-395. doi: 10.31016/viev-2020-6.
23. 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. doi: 10.26898/0370-8799-2024-6-9.
24. 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 [и др.] // Вопросы вирусологии. - 2022. - Т. 67. - № 6. - С. 465-474. doi: 10.36233/0507-4088-141.

25. Глотов, А.Г. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота: монография / А.Г. Глотов, А.Ф. Шуляк, Т.И. Глотова, А.Н. Сергеев. – Новосибирск: РАСХН, Сиб. Отделение, ГНУ ИЭВСиДВ, 2006. – 196 с.
26. 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 [и др.] // Вопросы вирусологии. - 2024. - Т. 69. - № 1. - С. 76-87. doi: 10.36233/0507-4088-216.
27. Глотова Т.И. Выделение и типирование респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота при помощи ОТ-ПЦР / Т.И. Глотова, О.В. Кунгурцева, А.Г. Глотов [и др.] // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2010. - №10. - С. 59-64.
28. Глотова, Т.И. Инфекционный ринотрахеит и вирусная диарея крупного рогатого скота (диагностика, молекулярно-биологические свойства возбудителей, эффективность противовирусных препаратов): автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 16.00.04 / Т.И. Глотова. - Новосибирск, 2006. - 39 с.
29. Гунашев, Ш.А. Особенности распространения, профилактики и лечения парагриппа-3 крупного рогатого скота в Республике Дагестан: автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук: 06.02.02 / Ш.А. Гунашев. – Ставрополь, 2011. - 23 с.
30. Гуненков, В.В. Респираторно-синцитиальная вирусная инфекция. / В.В. Гуненков, Г.А. Халенев, В.Н. Сюрин // Животноводство и ветеринария. – 1975. - № 8. - С. 70-76.
31. Донник, И.М. Острые респираторные заболевания крупного рогатого скота и проблемы профилактики в современных условиях промышленного производства / И.М. Донник, О.Г. Петрова, С.А. Марковская // Аграрный вестник Урала. – 2013. – № 10 (116). – С. 25-27.

32. Думова, В.В. Особенности зимней дизентерии крупного рогатого скота / В.В. Думова, А.В. Кононов, С.В. Левченко [и др.] // Ветеринарная патология. - 2006. - № 4 (19). - С. 84-88.
33. Журавлева, Е.А. Нозоареал респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота / Е.А. Журавлева // Ветеринария. – 2018. - №12. - С. 3-8.
34. Зудилина, З.Ф. Выделение и идентификация вируса параинфлюэнцы-3 от крупного рогатого скота / З.Ф. Зудилина, Н.Н. Крюков // Материалы 2-ой научной конференции ВИЭВ, М., 1970. – С. 58-60.
35. Кашко, Л.С. Серологический мониторинг крупного рогатого скота в отношении вирусов-возбудителей пневмоэнтеритов телят / Л.С. Кашко, П.П. Красочко // Достижения науки и техники АПК. - 2014. - Т.28, № 11. - С. 66-68.
36. Кирпиченко, В.В. Иммунобиологические свойства возбудителя респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота, выделенного на территории Российской Федерации: автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук: 06.02.02 / В.В. Кирпиченко. - Владимир, 2021. – 24 с.
37. Коромыслов, Г.Ф. Роль ассоциации рота-, корона и пестивирусов в этиологии энтеритов телят, перспектива диагностики и иммунопрофилактики / Г.Ф. Коромыслов // Вирусные болезни с.-х. жив-х.: тезисы докладов Всероссийской науч.-практ. конф. – Владимир, 1995. - С. 219.
38. Котенева, С.В. Разработка и эффективность полимеразной цепной реакции при диагностике инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук: 16.00.03 / С.В. Котенева. – Новосибирск, 2006. – 19 с.
39. Кочиш, Т.Ю. Разработка набора реагентов для определения уровня антител к респираторно-синцитиальному вирусу крупного рогатого скота в иммуноферментном анализе: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Т.Ю. Кочиш. – Шелково, 2004. – 156 с.
40. Красочко, П.П. Серопозитивность крупного рогатого скота к вирусу инфекционного ринотрахеита / П.П. Красочко, Я.П. Яромчик, В.П. Красочко

- [и др.] // Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. - 2021. - Т.10. - № 1. - С. 39-42.
41. Кривицкая, В.З. Респираторно-синцитиальная инфекция, особенности патогенеза, стратегия профилактики и лечения / В.З. Кривицкая // Вопросы современной педиатрии. – 2013. - №2 (12). - С. 35-43.
42. Крюков, Н.Н. Герпесвирусы и их роль в инфекционной патологии / Н.Н. Крюков // Бюллетень ВИЭВ. - 1971. - №11. - С. 7-10.
43. Крюков, Н.Н. Инфекционный ринотрахеит (пустулезный вульвовагинит) крупного рогатого скота / Н.Н. Крюков // Бюллетень ВИЭВ. – 1972. – № 37. – С. 146-149.
44. Крюков, Н.Н. Микробный пейзаж и иммунологическая реактивность у телят, выращиваемых в условиях промышленной технологии / Н.Н. Крюков, А.Т. Семенюта, Э.А. Шегидевич // Труды ВИЭВ. - М., 1984. - Т. 60. - С. 15-23.
45. Кудрявцев, В.А. Использование ПЦР и секвенирования для выявления и анализа генома коронавируса крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.06 / В.А. Кудрявцев. – Владимир, 2004. – 26 с.
46. Кунгурцева, О.В. Особенности распространения вирусной диареи - болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота, молекулярно-биологические свойства изолятов вируса: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 06.02.02 / О.В. Кунгурцева. - Новосибирск, 2010. - 22 с.
47. Кушнир Н.И. Влияние инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота на репродуктивную функцию у коров / Н.И.Кушнир [и др.] // Современные проблемы диагностики, лечения и профилактики инфекционных болезней животных и птиц. Урал. науч.-исслед. ветеринар. ин-т. - Екатеринбург, 2008. - Вып. 2. - С. 281-285 .
48. Макаревич, В.Г. Чувствительность культур клеток к вирусу диареи крупного рогатого скота / В.Г. Макаревич, В.П. Назаров // Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии, изд. МВА. - 1967. - Ч. 2. - С. 45-49.

49. Макаров, В.В. Метагеномный анализ – новая методология и направление в инфекционной диагностике / В.В. Макаров // Ветеринария сегодня. - 2014. - №2 (9). – С. 15-17.
50. Метревели, Г.Д. Биологические свойства вируса и серологическая диагностика РС-инфекции крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Г.Д. Метревели. - Москва, 1989. — 19 с.
51. Мищенко, А.В. Персистентная форма вирусной диареи крупного рогатого скота / А.В. Мищенко, В.А. Мищенко, М.И. Гулюкин [и др.] // Вопросы вирусологии. - 2023. – Т. 68. - №6. – С. 465-478.
52. Мищенко, В.А. Изучение распространения вируса респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота у жвачных животных / В.А. Мищенко, В.В. Думова, М.Ю. Киселев [и др.] // Ветеринарная медицина. – 2011. – Вып. 95. – С. 169-170.
53. Мищенко, В.А. Коронавирусная инфекция взрослого крупного рогатого скота / В.А. Мищенко, В.В. Думова, О.И. Гетманский [и др.] // Ветеринарная патология. - 2005. - № 3 (14). - С. 31-34.
54. Мищенко, В.А. Роль коронавируса в респираторной патологии молодняка крупного рогатого скота / В.А. Мищенко, В.В. Думова, М.Ю. Киселев [и др.] // Ветеринария. - 2009. - № 5. - С.17-20.
55. Мищенко, В.А. Распространение коронавируса крупного рогатого скота у жвачных животных / В.А. Мищенко, В.В. Думова, О.Ю. Черных [и др.] // Ветеринария. – 2010. - №9. – С. 18–21.
56. Мищенко, В.А. Экологические особенности герпесвируса крупного рогатого скота 4 типа / В.А. Мищенко, А.В. Мищенко, В.В. Думова [и др.]. // Ветеринария Кубани. – 2013. – № 2. – С. 11-13.
57. Мищенко, В.А. Распространение парагриппа-3 крупного рогатого скота у жвачных животных / В.А. Мищенко, А.В. Мищенко, М.Ю. Киселев [и др.] // Ветеринария Кубани. - 2012. - №6. - С. 10-12.

58. Мищенко, В.А. Анализ заболеваемости молодняка крупного рогатого скота молочных пород респираторными инфекциями / В.А. Мищенко, Д.К. Павлов, В.В. Думова и [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2008. - №6. – С. 2-4.
59. Морозов, И.А. Разработка гибридизационного зонда для идентификации вируса инфекционного ринотрахеита / И.А. Морозов, С.К. Артюшин, А.Ф. Шуляк // Биохимия сельскохозяйственных животных и продовольственная программа: тез. докл. науч. конф. - Киев, 1989. - С. 56-57.
60. Нефедченко, А.В. Комплексный подход к определению этиологической структуры респираторных болезней крупного рогатого скота в молочных хозяйствах / А.В. Нефедченко, Т.И. Глотова, А.Г. Глотов // Вестник КрасГАУ. – 2017. - №1. – С. 65-71.
61. Нефедченко, А.В. Комплексная система диагностики и генетического типирования ведущих возбудителей респираторных болезней крупного рогатого скота на основе методов молекулярной биологии в современных условиях ведения молочного животноводства: дис. ... д-ра ветеринар. наук: 06.02.02 / А.В. Нефедченко. – Краснодар, 2018. – 434 с.
62. Нефедченко, А.В. Разработка метода идентификации и генотипирования бактерий *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica* на основе полимеразной цепной реакции и филогенетический анализ культур бактерий, выделенных от крупного рогатого скота. / А.В. Нефедченко, А.Н. Шиков, А.Г. Глотов [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 2016. - Т. 34, № 2. - С. 62-66. doi: 10.18821/0208-0613-2016-34-2-62-66.
63. Орлянкин, Б.Г. Коронавирусные инфекции животных: эпизоотология и патогенез / Б.Г. Орлянкин, А.Н. Власова, А.Н. Мухин, Т.И. Алипер // Ветеринария. – 2022. - № 3. С. 3–13. doi: 10.30896/0042 4846.2022.25.3.03-13.
64. Пат. 2405039 С1 Российская Федерация, МПК С12N 15/10, С12N 7/00. Синтетические олигонуклеотидные праймеры и способ выявления РНК вируса респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота с помощью синтетических олигонуклеотидных праймеров в полимеразной цепной реакции (ПЦР) / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, С.В. Котенева, А.В. Нефедченко; за-

- явитель и патентообладатель ГНУ ИЭВСиДВ СО Россельхозакадемии) (RU). - № 2009129805/10; заявл. 03.08.2009; опубл. 27.11.2010, Бюл. №33.
65. Петрова, О.Г. Комплексная система оздоровительных мероприятий при острых респираторных заболеваниях крупного рогатого скота с учетом экологических особенностей территории Урала / О.Г.Петрова, А.Т. Татарчук, И.А. Рубинский [и др.] // Диагностика, профилактика и лечение болезней животных: сборник научных трудов. Ин-т эксперим. ветеринарии Сибири и Дальнего Востока. - Новосибирск, 2008. - С. 71-75.
66. Петрова, О.Г. Особенности распространения инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в племенных хозяйствах Среднего Урала и оптимизация противоэпизоотических мероприятий / О.Г. Петрова, Н.И. Кушнир, Е.Ю. Сорокина [и др.] // Ветеринарный врач. - 2005. - № 2. - С. 50-53.
67. Петрова, О.Г. Распространение болезней легких инфекционной этиологии крупного рогатого скота и наносимый ими ущерб / О.Г. Петрова, С.А. Марковская, Н.А. Кольберг, И.М. Мильштейн // Агропродовольственная политика России. - 2012. - №4. – С. 58-61.
68. Петрова, О.Г. Острые респираторные болезни крупного рогатого скота / О.Г.Петрова, И.А. Рубинский // Екатеринбург: Литрес, 2015 - 370 с.
69. Прохватилова, Л.Б. Использование полимеразной цепной реакции для выявления герпесвируса КРС 4 типа в патологическом материале / Л.Б. Прохватилова, А.А. Гусев // В кн.: Болезни сельскохозяйственных животных вирусной и других этиологий и меры борьбы с ними: материалы научно-практической конференции. - Новосибирск, 2001. - С. 25-26.
70. Пчельников, А.В. Совершенствование и разработка методов диагностики и профилактики герпесвирусных болезней крупного рогатого скота: дис. ... д-ра ветеринар. наук: 4.2.3 / А.В. Пчельников. – Москва, 2024. – 225 с.
71. Рядчиков, В.Г. Почему болеют высокопродуктивные коровы / В.Г. Рядчиков // Животноводство России. – 2010. – № 11. – С. 43–45.

72. Соколова, Н.Л. Коронавирус – возбудитель диареи новорожденных телят / Н.Л. Соколова, И.Т. Сатторов, Л.А. Мникова // Ветеринария. – 1982. - № 11. – С. 26-27.
73. Спиваков, А.А. Мониторинг состояния крупного рогатого скота, импортированного на территорию Воронежской области / А.А. Спиваков, О.А. Ратных, И.А. Никулин // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. – 2015. - №3(46). – С. 52-57.
74. Строганова, И.Я. Диагностика респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота и особенности проявления болезни в современных условиях ведения животноводства: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 06.02.02 / И.Я. Строганова. - Новосибирск, 2011а. – 20 с.
75. Строганова, И.Я. Особенности эпизоотической ситуации по вирусным респираторным болезням крупного рогатого скота в Восточной Сибири / И.Я. Строганова // Вестник КрасГАУ. – 2011б. - №1 (52). - С. 125-128.
76. Строганова, И.Я. Распространение парагриппа-3 крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах Восточной Сибири / И.Я. Строганова // Вестник КрасГАУ. – 2011с. - № 6 (57). - С. 115-117.
77. Сюрин, В.Н. Вирусные болезни животных: монография / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. – Москва: ВНИТИБП, 1998. – 928 с.
78. Урываев, Л.В. Анализ контаминации клеточных культур пестивирусом BVDV и микоплазмами. / Л.В. Урываев, К.С. Ионова, А.В. Дедова [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2012. - №5 (57). - С. 15-21.
79. Халенев, Г.А. Разработка методов производства диагностикумов и усовершенствование лабораторной диагностики вирусной диареи и респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота: дис. ... канд. ветеринар. наук: 16.00.03 / Г.А. Халенев. – Москва, 1976. – 270 с.
80. Черных, О.Ю. Проблемы вирусной диареи крупного рогатого скота / О.Ю. Черных, А.А. Шевченко, Г.А. Джаилиди [и др.] // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2016. – Т. 58. – С. 194-198.

81. Шилова, Е.Н. Вирусная диарея – болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота в Уральском регионе / Е.Н. Шилова, М.В. Ряпосова, И.А. Шкуратова, Е.В. Вялых // Ветеринария. – 2014. - № 5. - С. 19-21.
82. Шульпин, М.И. Индикация вируса диареи крупного рогатого скота, генотипирование и филогенетический анализ изолятов, выявленных на территории Российской Федерации / М.И. Шульпин, П.К. Аялот, В.А. Мищенко // Вопросы вирусологии. – 2003. – Т. 48, № 5. - С. 41-47.
83. Южаков, А.Г. Молекулярно-генетический анализ вакцинных и вирулентных штаммов пестивирусов: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.06 / А.Г. Южаков. – Москва, 2009. – 42 с.
84. Юров, Г.К. Антигенные свойства нецитопатогенных штаммов вируса диареи – болезни слизистых крупного рогатого скота / Г.К. Юров, С.В. Алексеенкова, К.А. Диас Хименес [и др.] // Российский ветеринарный журнал. – 2013. - № 2. - С. 24–26.
85. Юров, К.П. Новый пестивирус – Хоби вирус – контаминант вакцины против чумы мелких жвачных животных / К.П. Юров, А.М. Аноятбекова, С.В. Алексеенкова // Ветеринария. – 2016. - №10. – С. 8-10.
86. Юров, К.П. Распространение инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи-болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота в различных регионах России / К.П. Юров, А.Ф. Шуляк, О.Г. Петрова, О.В. Майджи // Труды ВИЭВ. - М., 2003. - Т. 73. - С. 15-22.
87. Юров, К.П. Этиология, диагностика и профилактика массовых респираторных болезней телят / К.П. Юров, А.Ф. Шуляк, С.В. Алексеенкова // Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных: Всерос. науч.-исслед. ин-т эксперим. ветеринарии. – М., 2006. - С. 128-132.
88. Яцентюк, С.П. Биобезопасность спермопродукции быков-производителей: современное состояние и совершенствование методов контроля: дис. ... д-ра биол. наук: 4.2.2. и 4.2.3 / С.П. Яцентюк. – Москва, 2024. – 311 с.

89. Abe, Y. Genetic and antigenic characterization of bovine viral diarrhea viruses isolated from cattle in Hokkaido, Japan. / Y. Abe, T. Tamura, S. Torii [et al.] // *J. Vet. Med. Sci.* – 2016. - Vol. 78. - P. 61–70. doi: 10.1292/jvms.15-0186.
90. Abuelo, A. A winter dysentery (coronavirus infection) outbreak in a dairy herd in Galicia (northwestern Spain). / A. Abuelo, M. Perez-Santos // *Veterinary Record Case Reports.* - 2016. - Vol. 4 (1). - P. 1-5. doi: 10.1136/vetreccr-2016-000328.
91. Achenbach, J.E. Detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus using real-time quantitative RT-PCR and quantitative competitive RT-PCR assays / J.E. Achenbach, C.L. Topliff, V.B. Vassilev [et al.] // *J. Virol. Methods.* - 2004. - Vol. 121 (1) - P. 1-6. doi: 10.1016/j.jviromet.2004.05.004.
92. Agnes, J.T. Bovine respiratory syncytial virus and *Histophilus somni* interaction at the alveolar barrier. / J.T. Agnes, B. Zekarias, M. Shao // *Infect. Immun.* - 2013. - Vol. 81. - P. 2592-2597. doi: 10.1128/IAI.00108-13.
93. Ahn, B.C. Biotype, genotype, and clinical presentation associated with bovine viral diarrhea virus (BVDV) isolates from cattle / B.C. Ahn, P.H. Walz, G.A. Kennedy [et al.] // *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.* – 2005. - Vol. 3. - P. 319-325.
94. Akgül, G. Isolation of First Local Coronavirus from Cattle with Winter Dysentery in Turkey / G. Akgül, Z. Mecitoğlu, A. Ertürk [et al.] // *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* – 2013. - Vol. 32 (2). - P. 63-70. doi:10.30782/uluvfd.163488.
95. Albayrak, H. Characterisation of the First Bovine Parainfluenza Virus 3 Isolate Detected in Cattle in Turkey / H. Albayrak, Z. Yazici, E. Ozan [et al.] // *Vet. Sci.* – 2019. - Vol. 6 (2). - P. 56. doi: 10.3390/vetsci6020056.
96. Alegre, M. Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of bovine herpesvirus - 1 and - 5 / M. Alegre, M. Nanni, N. Fondevila // *J. Vet. Med.* - 2001. - Vol. 48 (8). - P. 613-621. doi: 10.1046/j.1439-0450.2001.00489.x.
97. Alekseev, K.P. Bovine-like coronaviruses isolated from four species of captive wild ruminants are homologous to bovine coronaviruses, based on complete ge-

- omic sequences / K.P. Alekseev, A.N. Vlasova, K. Jung [et al.] // *J. Virol.* – 2008. - Vol. 82. - P. 12422–12431. doi: 10.1128/JVI.01586-08.
98. Ali, H. Bovine herpesvirus-4, a potential cause of mastitis in Canadian dairy cows / H. Ali, G.P. Keefe, A. Cepica // *Br. J. Dairy Sci.* – 2011. - Vol. 2(3). - P. 31-34.
99. Amer, H.M. Development of a SYBR Green I based real-time RT-PCR assay for detection and quantification of bovine coronavirus / H.M. Amer, F.N. Almajhdi // *Mol. Cell. Probes.* – 2011. - Vol. 25 (2). - P. 101–107. doi: 10.1016/j.mcp.2011.03.001.
100. Amicone, M. Mutation rate of SARS-CoV-2 and emergence of mutators during experimental evolution / M. Amicone, V. Borges, M.J. Alves [et al.] // *Evol. Med. Public Health.* – 2022. - Vol. 10(1). - P. 142-155. <https://doi.org/10.1093/emph/eoac010>.
101. Antonis, A.F.G. Age-dependent differences in the pathogenesis of bovine respiratory syncytial virus infections related to the development of natural immunocompetence / A.F.G. Antonis, M.C. de Jong, W.H.M. van der Poel [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2010. - Vol. 91 (10). - P. 2497-2506. doi: 10.1099/vir.0.020842-0.
102. Areda, D. Bovine herpes virus type-4 infection among postpartum dairy cows in California: risk factors and phylogenetic analysis. / D. Areda, M. Chigerwe, B. Crossley // *Epidemiol. Infect.* – 2018. - Vol. 146 (7). - P. 904-912. doi: <https://doi.org/10.1017/S0950268818000791>.
103. Arenhart, S. Evidence of mixed persistent infections in calves born to cows challenged with a pool of bovine viral diarrhea virus isolates / S. Arenhart, F.V. Bauermann, F.S.F. Vogel Pesq [et al.] // *Vet. Bras.* – 2010. - Vol. 30. - P. 1053–1070.
104. Asano, K.M. Rapid detection of bovine coronavirus by a semi-nested RT-PCR / K.M. Asano, S.P. Souza, S.O.S. Silva [et al.] // *Pesqui. Vet. Bras.* – 2009. - Vol. 29 (11). - P. 869–873. doi.org/10.1590/S0100-736X2009001100001.
105. Avadhanula, V. Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner /

- V. Avadhanula, C. A. Rodriguez, J. P. Devincenzo [et al.] // *J. Virol.* – 2006. - Vol. 80 (4). - P. 1629–1636. doi: 10.1128/JVI.80.4.1629-1636.2006.
106. Aydin, O. Molecular Characterisation and Antibody Response to Bovine Respiratory Syncytial Virus in Vaccinated and Infected Cattle in Turkey / O. Aydin, A. Yilmaz, N. Turan [et al.] // *Pathogens.* – 2024. - Vol. 13 (4). - P. 304. doi: 10.3390/pathogens13040304.
107. Baker, J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *Veterinary Clinics of North America* / J.C. Baker // *Food Animal Practice.* – 1995. - Vol. 11. - P. 425-445. doi: 10.1016/s0749-0720(15)30460-6.
108. Barber, K.A. Protein composition of the bovine herpesvirus 1.1 virion / K.A. Barber, H.C. Daugherty, S.E. Ander // *Vet Sci.* – 2017. - Vol. 4 (1). - P. 11. doi:10.3390/vetsci4010011.
109. Bartha, A. Isolation of a bovine herpes virus from calves with respiratory disease and keratoconjunctivitis. A preliminary report / A. Bartha, M. Juhasz, H. Liebermann // *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* - 1966. - Vol. 16. - P. 357-358.
110. Battles, M.B. Respiratory syncytial virus entry and how to block it / M.B. Battles, J.S. McLellan // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2019. - Vol. 17. - P. 233–245. doi:10.1038/s41579-019-0149-x.
111. Bauermann, F.V. Genome sequence and experimental infection of calves with bovine gammaherpesvirus 4 (BoHV-4) / F.V. Bauermann, S.M. Falkenberg, M. Martins [et al.] // *Arch Virol.* - 2022. - Vol. 167. - P. 1659-1668. doi:10.1007/s00705-022-05486-8.
112. Bauermann, F.V. Lack of evidence for the presence of emerging HoBi-like viruses in North American fetal bovine serum lots / F.V. Bauermann, E.F. Flores, S.M. Falkenberg [et al.] // *J. Vet. Diagn. Invest.* - 2014. - Vol. 26 (1). - P. 10-17. doi: 10.1177/1040638713518208.
113. Bauermann, F.V. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses / F.V. Bauermann, J.F. Ridpath, R. Weiblen, E.F. Flores // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2013. - Vol. 25 (1). - P. 6-15. doi: 10.1177/1040638712473103.

114. Baumbach, L.F. HoBi-like Pestivirus Is Highly Prevalent in Cattle Herds in the Amazon Region (Northern Brazil) / L.F. Baumbach, A.C.S. Mósena, R.S. Alves [et al.] // *Viruses*. – 2023. - Vol. 15 (2). - P. 453. doi: 10.3390/v15020453.
115. Baxi, M. A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhoea viruses / M. Baxi, D. McRae, S. Baxi [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2006. - Vol. 116. - P. 37–44. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.03.026.
116. Becher, P. Bovine viral diarrhoea, border disease, and classical swine fever viruses / P. Becher, V. Moennig, N. Tautz // *Reference Module in Life Sciences*. - 2020. - Vol. – P. 153-164. doi: 10.1016/b978-0-12-809633-8.21233-8.
117. Belak, S. Bovine Herpesvirus 1: Rapid diagnosis of infection by direct filter hybridization / S. Belak, T. Linné, G. Magyar [et al.] // *Mol. Cell Probes*. - 1988.- Vol. 2 (2). - P. - 147-156. doi: 10.1016/0890-8508(88)90036-9.
118. Bertolotti, L. Genetic characterization of bovine respiratory syncytial virus strains isolated in Italy: Evidence for the circulation of new divergent clades / L. Bertolotti, M. Giammarioli, S. Rosati // *J. Vet. Diagn. Investig.* – 2018. - Vol. 30 (2). - P. 300–304. doi: 10.1177/1040638717746202.
119. Bianchi, E. Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000–2010) [Genotypic and antigenic profile of bovine viral diarrhoea virus isolates from Rio Grande do Sul, Brazil (2000–2010)]. / E. Bianchi, M. Martins, R. Weiblen [et al.] // *Pes. Vet. Bras.* – 2011. - Vol. 31. - P. 649–655.
120. Bianchi, M.V. Pathological and virological features of skin lesions caused by BVDV in cattle / M.V. Bianchi, S. Silveira, A.C.S. Mósena [et al.] // *Braz. J. Microbiol.* – 2018. - Vol. 50 (1). - P. 271–277. doi: 10.1007/s42770-018-0019-0.
121. Bielefeldt-Ohmann, H. Transplacental infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus types 1b and 2: viral spread and molecular neuropathology / H. Bielefeldt-Ohmann, A.E. Tolnay, C.E. Reisenhauer [et al.] // *J. Comp. Pathol.* - 2008. - Vol. 138 (2-3). - P. 72-85. doi: 10.1016/j.jcpa.2007.10.006.
122. Biswas, S. Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) - a re-emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis / S. Biswas,

- S. Bandyopadhyay, U. Dimri [et al.] // *Vet. Q.* – 2013. - Vol. 33 (2). - P. 68-81. doi: 10.1080/01652176.2013.799301. PMID: 23802762.
123. Blodörn, K. A bovine respiratory syncytial virus model with high clinical expression in calves with specific passive immunity / K. Blodörn, S. Hägglund, D. Gavier-Widen [et al.] // *BMC Vet. Res.* – 2015. - Vol. 11. - P. 76. doi: 10.1186/s12917-015-0389-6.
124. Boileau, M.J. Bovine coronavirus associated syndromes / M.J. Boileau, S. Kappil // *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* - 2010. – Vol. 26 (1). - P. 123–146. doi: 10.1016/j.cvfa.2009.10.003.
125. Bok, M. Molecular and antigenic characterization of bovine coronavirus circulating in Argentinean cattle during 1994-2010 / M. Bok, S. Mino, D. Rodriguez [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2015. - Vol. 181. - P. 221–229. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.10.017.
126. Bolin, S.R. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea viruses in calves / S.R. Bolin, J.F. Ridpath // *Am. J. Vet. Res.* – 1992. - Vol. 53. - P. 2157-2163.
127. Bolin, S.R. Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity / S.R. Bolin, D.L. Grooms // *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* – 2005. - Vol. 20 (1). - P. 51-68. doi: 10.1016/j.cvfa.2003.11.009.
128. Booth, R.E. A phylogenetic analysis of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) isolates from six different regions of the UK and links to animal movement data / R.E. Booth, C.J. Thomas, L.M.R. El-Attar // *Vet. Res.* – 2013. - Vol. 44 (1). - P. 43. doi: 10.1186/1297-9716-44-43.
129. Boxus, M. Real Time RT-PCR for the detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus/ M. Boxus, C. Letellier, P. Kerkhofs // *J. Virol. Methods.* – 2005. - Vol. 125(2). - P. 125-30. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.01.008.
130. Brock, K.V. Development of a fetal challenge method for the evaluation of bovine viral diarrhea virus vaccines / K.V. Brock, C.C.L. Chase // *Vet. Microbiol.* – 2000. - Vol. 77. - P. 209–214. doi: 10.1016/s0378-1135(00)00277-7.

131. Brogden, K.A. Polymicrobial Diseases / K.A. Brogden, J.M. Guthmiller// ASM Press. – 2002. - 328 p.
132. Brusckke, C.J. Detection of bovine virus diarrhea virus in a live bovine herpes virus 1 marker vaccine / C.J. Brusckke, H.A. Paal, K. Weerdmeester // Tijdschr Diergeneeskd. – 2001. - Vol. 126 (6). - P. 189-190.
133. Bryant, N.A. Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins / N.A. Bryant, N. Davis-Poynter, A. Vanderplassen [et al.] // EMBO J. – 2003. - Vol. 22. - P. 833–846. doi: 10.1093/emboj/cdg092.
134. Byrne, K.M. Glycoprotein B of bovine herpesvirus-1 binds heparin / K.M. Byrne, D.W. Horohov, KG. Kousoulas // Virology. – 1995. - Vol. 22. 209 (1). - P. 230-235. doi: 10.1006/viro.1995.1248.
135. Campos, F.S. Detection of bovine herpesvirus 2 and bovine herpesvirus 4 DNA in trigeminal ganglia of naturally infected cattle by polymerase chain reaction / F.S. Campos, A.C. Franco, M.T. Oliveira [et al.] // Vet. Microbiol. - 2014. - Vol. 171 (1-2). - P. 182 - 188. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.03.012.
136. Campos, F.S. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil / F.S. Campos, A.C. Franco, S.O. Hubner [et al.] // Vet. Microbiol. – 2009. - Vol. 139. - P. 67–73. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.05.015.
137. Carman, S. Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993–1995 / S. Carman, T. Van Dreumel, J. Ridpath [et al.] // J. Vet. Diagn. Invest. -1998. - Vol. 10 (1). - P. 27–35. doi: 10.1177/104063879801000010.
138. Carvajal, J.J. Host Components Contributing to Respiratory Syncytial Virus Pathogenesis / J.J. Carvajal, A.M. Avellaneda, C. Salazar-Ardiles [et al.] // Front. Immunol. – 2019. - Vol. 10. - P. 2152. doi: 10.3389/fi mmu.2019.02152.
139. Castells, M. Bovine coronavirus in Uruguay: genetic diversity, risk factors and transboundary introductions from neighboring countries / M. Castells, F. Giannitti, R.D. Caffarena [et al.] // Arch. Virol. - 2019. - Vol. 164. - P. 2715–2724. doi: 10.1007/s00705-019-04384-w.

140. Chang, Y. Prevalence and Molecular Characteristics of Bovine Respiratory Syncytial Virus in Beef Cattle in China / Y. Chang, H. Yue, C. Tang // *Animals*. – 2022. - Vol. 12 (24). - P. 3511. doi: 10.3390/ani12243511.
141. Chastant-Maillard, S. Impact of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) on reproduction / S. Chastant-Maillard // *Transbound Emerg. Dis.* – 2015. - Vol. 62 (3). - P. 245–51. doi:10.1111/tbed.12155.
142. Chen, X. Meta-analysis of prevalence of bovine herpes virus 1 in cattle in Mainland China / X. Chen, X. Wang, Y. Qi [et al.] // *Acta Tropica*. – 2018. - Vol. 187. - P. 37-43. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.07.024.
143. Chi, S. Non-structural proteins of bovine viral diarrhea virus / S. Chi, S. Chen, W. Jia [et al.] // *Virus Genes*. - 2022. - Vol. 58. - P. 491–500. doi: 10.1007/s11262-022-01914-8.
144. Chothe, S.K. Whole-genome sequence analysis reveals unique SNP profiles to distinguish vaccine and wild-type strains of bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) / S.K. Chothe, A. Sebastian, A. Thomas [et al.] // *Virology*. – 2018. - Vol. 22. - P. 27–36. doi: 10.1016/j.virol.2018.06.015.
145. Chung, J.-Y. Detection and characterization of bovine-like coronaviruses from four species of zoo ruminants / J.-Y. Chung, H.-R. Kim, Y.-C. Bae [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2011. - Vol. 148. - P. 396–401. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.08.035.
146. Claus, M.P. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR / M.P. Claus, A.F. Alfieri, A.V. Folgueras-Flatschart [et al.] // *J. Virol. Methods*. – 2005. – Vol. 128. – P. 183-188. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.05.001.
147. Collins, P.L. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease / P.L. Collins, R. Fearn, B.S. Graham // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2013. - Vol. 372. - P. 3–38. doi: 10.1007/978-3-642-38919-1_1.
148. Confer, A.W. Update on bacterial pathogenesis in BRD / A.W. Confer // *Anim. Health Res. Rev.* – 2009. - Vol. 10 (02). - P. 145. doi: 10.1017/S1466252309990193.

149. Cortez, A. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. / A. Cortez, M.B. Heinemann, A.M.M.G. De Castro [et al.] // *Pesq. Vet. Bras.* – 2006. - Vol. 26. - P. 211–216.
150. Cui, H. Enhanced pathogenicity and synergistic effects of co-infection with bovine viral diarrhea virus 1 and HoBi-like virus in cattle and guinea pigs / H. Cui, B. Ren, L. Wang [et al.] // *Front. Vet. Sci.* – 2024. - Vol. 11. - P. 1464745. doi: 10.3389/fvets.2024.1464745.
151. D'Offay, J. Isolation of a naturally occurring vaccine/wild-type recombinant bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) from an aborted bovine fetus / J. D'Offay, W. Fulton, M. Fishbein [et al.] // *Vaccine.* – 2019. - Vol. 37. - P. 4518–4524. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.06.059.
152. Da Silva Barcelos, L. Interactions Between Bovine Respiratory Syncytial Virus and Cattle: Aspects of Pathogenesis and Immunity / L. Da Silva Barcelos, A.K. Ford, M.I. Frühauf [et al.] // *Viruses.* – 2024. - Vol. 16 (11). - P. 1753. doi: 10.3390/v16111753.
153. Da Silva Silveira, C. Diseases associated with bovine viral diarrhea virus subtypes 1a and 2b in beef and dairy cattle in Uruguay / C. Da Silva Silveira, L. Maya, M.L. Casaux [et al.] // *Brazil. J. Microbiol.* – 2020. - Vol. 51. - P. 357–368. doi: 10.1007/s42770-019-00170-7.
154. Dağalp, S.B. Genetic variability of bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4) field strains from Turkish cattle herds / S.B. Dağalp, F. Dogan, A.R. Babaoglu [et al.] // *Vet. Ital.* – 2021. - Vol. 57 (1). - P. 49-59. doi: 10.12834/VetIt.2095.11150.1.
155. Dagalp, S.B. Molecular and antigenic characterization of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) strains from cattle with diverse clinical cases in Turkey / S.B. Dagalp, F.T. Farzani, F. Dogan [et al.] // *Trop. Anim. Health Prod.* – 2020. - Vol. 52. - P. 555–564. doi: 10.1007/s11250-019-02042-6.
156. Dağalp, S.B. An assessment of bovine herpes virus 4 as a causative agent in abortions and neonatal death / S.B. Dağalp, A.R. Babaoglu, F. Doğan [et al.] //

- Onderstepoort J. Vet. Res. – 2020. - Vol. 87 (1). - P. 1761. doi: 10.4102/ojvr.v87i1.1761.
157. Darweesh, M.F. Characterization of the cytopathic BVDV strains isolated from 13 mucosal disease cases arising in a cattle herd / M.F. Darweesh, M.K. Rajput, L.J. Braun [et al.] // Virus Res. – 2015. – Vol. 195. - P. 141-147. doi: 10.1016/j.virusres.2014.09.015.
158. De Brun, L. Detection of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) in dairy herds in Uruguay / L. De Brun, V. da Silva, C. Castro [et al.] // Veterinaria (Montev.). - 2020. - Vol. 56 (213). doi: 10.29155/vet.56.213.3.
159. De Oliveira, P.S.B. A New (Old) Bovine Viral Diarrhea Virus 2 Subtype: BVDV-2e / P.S.B. De Oliveira, J.V.J. Silva Júnior, R. Weiblen [et al.] // Arch. Virol. – 2022. - Vol. 167. - P. 2545–2553. doi: 10.1007/s00705-022-05565-w.
160. Decaro, N. Respiratory disease associated with bovine coronavirus infection in cattle herds in Southern Italy / N. Decaro, M. Campolo, C. Desario [et al.] // J. Vet. Diagn. Invest. - 2008a. – Vol. 20. - P. 28–32. doi: 10.1177/104063870802000105.
161. Decaro, N. Detection of bovine coronavirus using a TaqMan-based real-time RT-PCR assay / N. Decaro, G. Elia, M. Campolo [et al.] // J. Virol. Methods. - 2008b. - Vol. 151 (2). - P. 167–171. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.05.016.
162. Decaro, N. Evidence for circulation of bovine viral diarrhoea virus type 2c in ruminants in Southern Italy / N. Decaro, M.S. Lucente, G. Lanave [et al.] // Transbound Emerg. Dis. – 2017. - Vol. 64. - P. 1935–1944. doi: 10.1111/tbed.12592.
163. Decaro, N. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe / N. Decaro, M.S. Lucente, V. Mari [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2011. - Vol. 17. - P. 1549–1552. doi: 10.3201/eid1708.101447.
164. Decaro, N. Hobi-like pestivirus in aborted bovine fetuses / N. Decaro, M.S. Lucente, V. Mari [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2012a. - Vol. 50. - P. 509–512. doi: 10.1128/JCM.05887-11.
165. Decaro, N. Detection of a Hobi-like virus in archival samples suggests circulation of this emerging pestivirus species in Europe prior to 2007 / N. Decaro,

- V. Mari, M.S. Lucente [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2013. – Vol. – 167. - P. 307–13. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.09.006.
166. Decaro, N. A nested PCR approach for unambiguous typing of pestiviruses infecting cattle / N. Decaro, R. Sciarretta, M.S. Lucente [et al.] // *Mol. Cell. Probes.* - 2012b. - Vol. 26. - P. 42–46. doi: 10.1016/j.mcp.2011.11.003.
167. Dehkordi, S.F. Prevalence study of Bovine viral diarrhea virus by evaluation of antigen capture ELISA and RT-PCR assay in Bovine, Ovine, Caprine, Buffalo and Camel aborted fetuses in Iran / S.F. Dehkordi // *AMB Express.* – 2011. - Vol. 1 (1). - P. 32. doi: 10.1186/2191-0855-1-32.
168. Deim, Z. Detection of bovine herpesvirus 4 in aborted bovine placentas / Z. Deim, L. Szeredi, V. Tompo [et al.] // *Microb. Pathol.* – 2006. – Vol. 41. (4-5). – P. 144-148. doi: 10.1016/j.micpath.2006.03.006.
169. Delooz, L. Laboratory findings suggesting an association between BoHV-4 and Bovine abortions in Southern Belgium / L. Delooz, G. Czaplicki, J.Y. Houtain [et al.] // *Transbound Emerg Dis.* - 2017. – Vol. 64. - P. 1100–1109. doi:10.1111/tbed.12469.
170. Demil, A. Phylogenetic Analysis of Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) Subgroups in Wallonia Region of Belgium in Relation to Current Vaccination Strategies / A. Demil, M. Dourcy, M.M. Garigliany [et al.] // *Vaccines (Basel).* - 2025. - Vol. 13 (3). - P. 298. doi: 10.3390/vaccines13030298.
171. Deng, M. Prevalence and Genetic Diversity of Bovine Viral Diarrhea Virus in Dairy Herds of China / M. Deng, N. Chen, C. Guidarini [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2020. - Vol. 242. - P. 108565. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.108565.
172. Deng, Y. High prevalence of bovine viral diarrhea virus 1 in Chinese swine herds / Y. Deng, C.Q. Sun, S.J. Cao [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2012. - Vol. 159. - P. 490- 493. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.04.023.
173. Deng, Y. Genetic diversity of Bovine viral diarrhea virus infection in goats in southwestern China / Y. Deng, S. Wang, R. Liu [et al.] // *J. Vet. Med.* - 2018. - Vol. 2018: 8274397. doi: 10.1155/2018/8274397.

174. Dewals, B. Evolution of Bovine herpesvirus 4: Recombination and transmission between African buffalo and cattle / B. Dewals, M. Thirion, N. Markine-Goriaynoff [et al.] // *J. Gen. Virol.* - 2006. - Vol. 87. - P. 1509–1519. doi: 10.1099/vir.0.81757-0.
175. Diallo, I.S. Detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 using a multiplex real-time polymerase chain reaction / I.S. Diallo, B.G. Corney, B.J. Rodwell // *J. Virol. Methods.* – 2011. - Vol. 175 (1). - P. 46-52. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.04.013.
176. Dias, J.A. Seroprevalence and risk factors of bovine herpesvirus 1 infection in cattle herds in the state of Paraná, Brazil / J.A. Dias, A.A. Alfieri, J.S. Ferreira-Neto [et al.] // *Transbound and Emer. Dis.* – 2013. – Vol. 60 (1). - P. 39-47. doi: 10.1111/j.1865-1682.2012.01316.x.
177. Díaz, J.M. Monitoring of the shedding and serological dynamics of Bovine gammaherpesvirus type 4 in a dairy cattle herd / J.M. Díaz, A. Prieto, G. López-Lorenzo [et al.] // *Vet. Microbiol.* - 2019. - Vol. 239. - P. 108495. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.108495.
178. Dubuisson, J. Experimental infection of bulls with a genital isolate of bovine herpesvirus-4 and reactivation of latent virus with dexamethasone / J. Dubuisson, E. Thiry, M. Bublot [et al.] // *Vet. Microbiol.* - 1989. - Vol. 21 (2). - P. 97-114. doi: 10.1016/0378-1135(89)90022-9.
179. Dunowska, M. Bovine viral diarrhoea viruses from New Zealand belong predominantly to the BVDV-1a genotype / M. Dunowska, R. Lal, S.D. Dissanayake [et al.] // *N. Z. Vet. J.* – 2024. - Vol. 72 (2). - P. 66-78. doi: 10.1080/00480169.2023.2291039.
180. Egyed, L.A. Studies of in vivo distribution of bovine herpesvirus type 4 in the natural host / L.A. Egyed, A.S. Bartha // *J. Clin. Microbiol.* - 1996. - Vol. 34. - P. 1091-1095.
181. El Omari, K. Structure of a pestivirus envelope glycoprotein E2 clarifies its role in cell entry / K. El Omari, O. Iourin, K. Harlos [et al.] // *Cell Rep.* – 2013. - Vol. 3. - P. 30–35. doi: 10.1016/j.celrep.2012.12.001.

182. Ellis, J. What is the evidence that bovine coronavirus is a biologically significant respiratory pathogen in cattle? / J. Ellis // *Canadian Vet. J.* – 2019. - Vol. 60 (2). - P. 147–152.
183. Ellis, J.A. Bovine Parainfluenza-3 Virus / J.A. Ellis // *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.* - 2010. - Vol. 26. - P. 575-593. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.08.002
184. Ellis, J.A. Update on viral pathogenesis in BRD / J.A. Ellis // *Anim. Heal. Res. Rev.* - 2009. - Vol. 10. - P. 149-153. doi: 10.1017/S146625230999020X.
185. El-Mayet, F. Stress Can Induce Bovine Alpha-Herpesvirus 1 (BoHV-1) Reactivation from Latency. / F. El-Mayet, C. Jones // *Viruses.* - 2024. - Vol. 16. - P. 1675. doi: 10.3390/v16111675.
186. El-Mohamady R.S. Concurrent detection of bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 in bulls' semen and their effect on semen quality / R.S. El-Mohamady, T.S. Behour, Z.M. Rawash // *International Journal of Veterinary Science and Medicine.* – 2020. - Vol. 8 (1). - P. 106–114. doi: 10.1080/23144599.2020.1850197.
187. Escutenaire, S. SYBR Green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the generic detection of coronaviruses / S. Escutenaire, N. Mohamed, M. Isaksson [et al.] // *Arch. Virol.* – 2007. - Vol. 152 (1). - P. 41–58. doi: 10.1007/s00705-006-0840-x.
188. Evermann, J.F. Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhoea virus in the northwestern United States / J.F. Evermann, J.F. Ridpath // *Vet. Microbiol.* – 2002. - Vol. 89. - P. 129–139. doi: 10.1016/s0378-1135(02)00178-5.
189. Fabian, K. An investigation of the aetiological role of bovine herpesvirus 4 in bovine endometritis / K. Fabian, L. Makrai, K. Sachse [et al.] // *Vet. J.* – 2008. - Vol. 177 (2). - P. 289-292. doi:10.1016/j.tvjl.2007.04.010.
190. Fakhrajang, W. Bovine respiratory coronavirus enhances bacterial adherence by upregulating expression of cellular receptors on bovine respiratory epithelial cells / W. Fakhrajang, P.E. Sudaryatma, H. Mekata [et al.] // *Vet. Microbiol.* - 2021. - Vol. 255. - P. 109017. doi: 10.1016/j.vetmic.2021.109017.

191. Felsenstein, J. Phylogenies and the Comparative Method / J. Felsenstein // *Am. Nat.* – 1985. - Vol. 125(1). - P. 1-15.
192. Fergusson, M. Validation of a multiplex-tandem RT-PCR for the detection of bovine respiratory disease complex using Scottish bovine lung samples / M. Fergusson, M. Maley, T. Geraghty [et al.] // *Vet. J.* - 2024. – Vol. 303. - P. 106058. doi: 10.1016/j.tvjl.2023.106058.
193. Ferreira, R.C. Molecular epidemiology of viral infections / R.C. Ferreira, C. Chato, L.M. Baena [et al.] // *Molecular Medical Microbiology (Third Edition)*. – 2024. - P. 2625-2639. doi: 10.1016/B978-0-12-818619-0.00137-4.
194. Folkerts, G. Parainfluenza-3 induced hyperreactivity of the guinea pig trachea coincides with an increased number of bronchoalveolar cells / G. Folkerts, M. Janssen, F.P. Nijkamp // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 1990. - Vol. 30. - P. 159S–161S. doi: 10.1111/j.1365-2125.1990.tb05493.x.
195. Franzo, G. Bovine Coronavirus: Variability, Evolution, and Dispersal Patterns of a No Longer Neglected Betacoronavirus / G. Franzo, M. Drigo, M. Legnardi [et al.] // *Viruses.* – 2020. - Vol. 12 (11). - P. 1285. doi: 10.3390/v12111285.
196. Fulton, R. Prevalence of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States / R. Fulton, E.M. Whitley, B.J. Johnson [et al.] // *Can. J. Vet. Res.* – 2009 a. - Vol. 73:283. doi: 10.1111/j.1751-0813.2009.00486.x.
197. Fulton, R.W. Evaluation of diagnostic tests used for detection of bovine viral diarrhea virus and prevalence of subtypes 1a, 1b, and 2a in persistently infected cattle entering a feedlot / R.W. Fulton, B. Hessman, B.J. Johnson [et al.] // *J. Am. Vet. Med. Assoc.* - 2006. - Vol. 228 (4). - P. 578 – 584. doi: 10.2460/javma.228.4.578.
198. Fulton, R.W. Bovine viral diarrhea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle / R.W. Fulton, J.T Saliki, A.W. Confer [et al.] // *J. Vet. Diagn. Invest.* - 2000. - Vol. 12. - P. 33–38. doi: 10.1177/104063870001200106.

199. Fulton, R.W. Viral Diseases of the Bovine Respiratory Tract / R.W. Fulton // Food Animal Practice. – 2009 b. – P. 171–191. - doi: 10.1016/B978-141603591-6.10042-9.
200. Fulton, R.W. Bovine herpesvirus-1: Comparison and differentiation of vaccine and field strains based on genomic sequence variation / R.W. Fulton, J.M. D’Offay, R. Eberle // Vaccine. – 2013. - Vol. 31. - P. 1471–1479. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.01.013.
201. Gagnon, C.A. Whole Genome Sequencing of a Canadian Bovine Gammaherpesvirus 4 Strain and the Possible Link between the Viral Infection and Respiratory and Reproductive Clinical Manifestations in Dairy Cattle / C.A. Gagnon, C.K. Traesel, N. Music [et al.] // Front. Vet. Sci. - 2017. - Vol. 4. - P. 92. doi: 10.3389/fvets.2017.00092.
202. Gaudino, M. Understanding the mechanisms of viral and bacterial coinfections in bovine respiratory disease: a comprehensive literature review of experimental evidence / M. Gaudino, B. Nagamine, M.F. Ducatez, G. Meyer // Vet. Res. – 2022. - Vol. 53 (1). - P. 70. doi: 10.1186/s13567-022-01086-1.
203. Gay, E. A nationwide epidemiological study of acute bovine respiratory disease in France / E. Gay, J. Barnouin // Prevent. Vet. Med. – 2009. - Vol. 89. - P. 265–271. doi: 10.1016/j.prevetmed.2009.02.013.
204. Gethmann, J. BVD-2 outbreak leads to high losses in cattle farms in Western Germany / J. Gethmann, T. Homeier, M. Holsteg [et al.] // Heliyon. – 2015. - Vol. 1 (1). - P. e00019. doi: 10.1016/j.heliyon.2015.e00019.
205. Giammarioli, M. Highly pathogenic Bovine Respiratory Syncytial virus variant in a dairy herd in Italy / M. Giammarioli, P. Mangili, A. Nanni [et al.] // Vet. Med. Sci. – 2020. - Vol. 6 (4). - P. 740–745. doi: 10.1002/vms3.312.
206. Giammarioli, M. Genetic Detection and Characterization of Emerging HoBi-like Viruses in Archival Foetal Bovine Serum Batches / M. Giammarioli, J.F. Ridpath, E. Rossi [et al.] // Biologicals. – 2015. - Vol. 43. - P. 220–224. doi: 10.1016/j.biologicals.2015.05.009.

207. Giangaspero, M. Pestivirus species potential adventitious contaminants of biological products / M. Giangaspero // *Trop. Med. Surg.* – 2013. – Vol. 1 (6). doi: 10.4172/2329-9088.1000153.
208. Gillet, L. Investigation of the Susceptibility of Human Cell Lines to Bovine Herpesvirus 4 Infection: Demonstration that Human Cells Can Support a Non-permissive Persistent Infection Which Protects Them against Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Apoptosis / L. Gillet, F. Minner, B. Detry [et al.] // *J. Virol.* – 2004. - Vol. 78 (5). - P. 2336–2347. doi: 10.1128/JVI.78.5.2336-2347.2004.
209. Givens, M.D. Detection of bovine viral diarrhea virus in semen obtained after inoculation of seronegative postpubertal bulls / M.D. Givens, A.M. Heath, K.V. Brock [et al.] // *Am. J. Vet. Res.* – 2003. - Vol. 64 (4). - P. 428-34. doi: 10.2460/ajvr.2003.64.428.
210. Goltz, M. Glycoprotein B of bovine herpesvirus type 4: its phylogenetic relationship to gB equivalents of the herpesviruses / M. Goltz, H. Broll, A. Mankertz [et al.] // *Virus Genes.* – 1994. - Vol. 9 (1). - P. 53-59. doi: 10.1007/BF01703435.
211. Gomez, D.E. Viral enteritis in calves / D.E. Gomez, J.S. Weese // *Can. Vet. J.* – 2017. - Vol. 58 (12). - P. 1267–1274.
212. Gómez-Romero, N. Detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus found contaminating commercial veterinary vaccines, cell lines, and fetal bovine serum lots originating in Mexico / N. Gómez-Romero, L. Velazquez-Salinas, J.F. Ridpath [et al.] // *Arch. Virol.* – 2021. - Vol. 166(7). - P. 1999-2003. doi: 10.1007/s00705-021-05089-9.
213. Graham, D.A. Bovine herpes virus-1 (BoHV-1) in cattle – a review with emphasis on reproductive impacts and the emergence of infection in Ireland and the United Kingdom / D.A. Graham // *Ir. Vet. J.* – 2013. - Vol. 66. – P. 15. doi:10.1186/2046-0481-66-15.
214. Griffin, D. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex / D. Griffin, M.M. Chengappa, J. Kuszak, D.S. McVey // *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* – 2010. - Vol. 26 (2). - P. 381-394. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.04.004.

215. Grissett, G.P. Structurd literature review of responses of cattle to viral and bacterial pathogens causing bovine respiratory disease complex / G.P. Grissett, B.J. White, R.L. Larson // *J. Vet. Intern. Med.* – 2015. - Vol. 29 (3). - P. 770-780. doi: 10.1111/jvim.12597.
216. Grom, J. Molecular detection of BHV- 1 in artificially inoculated semen and in the semen of a latently infected bull treated with dexamethasone / J. Grom, P. Hostnik, I. Toplak [et al.] // *Vet. J.* - 2006. – Vol. 171 (3). – P. 539-544. doi: 10.1016/j.tvjl.2004.11.004.
217. Gunn, L. Phylogenetic investigation of enteric bovine coronavirus in Ireland reveals partitioning between European and global strains / L. Gunn, P.J. Collins, M.J. O'connell [et al.] // *Ir. Vet. J.* – 2015. - Vol. 68. - P. 31. doi: 10.1186/s13620-015-0060-3.
218. Guo, W. Characterization and phylogenetic analysis of bovine gammaherpesvirus 4 isolated in China, 2022 / W. Guo, T. Sun, Y. Liu [et al.] // *Virus Genes.* - 2023. - Vol. 59. - P. 417–426. doi: 10.1007/s11262-023-01981-5.
219. Guo, W. The full-genome characterization and phylogenetic analysis of bovine herpesvirus type 1.2 isolated in China / W. Guo, J. Xie, J. Liu [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2022. - Vol. 13: 1033008. doi: 10.3389/fmicb.2022.1033008.
220. Gür, S. The possible role of bovine herpesvirus type-4 infection in cow infertility / S. Gür, N. Doğan // *Anim. Sci. J.* - 2010. - Vol. 81 (3). - P. 304-308. doi: 10.1111/j.1740-0929.2010.00743.x.
221. Hakhverdyan, M. Evaluation of a single-tube fluorogenic RT-PCR assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples / M. Hakhverdyan, S. Hagglund, L.E. Larsen [et al.] // *J. Virol. Methods.* - 2005. - Vol. 123 (2). - P. 195 - 202. doi: 10.1016/j.jviromet.2004.09.016.
222. Han, M.G. Cross-protection in gnotobiotic calves between a human enteric coronavirus and a virulent bovine enteric coronavirus / M.G. Han, D.-S. Cheon, X. Zhang [et al.] // *J. Virol.* – 2006. - Vol. 80 (24). - P. 12350–12356. doi: 10.1128/JVI.00402-06.

223. Harms, N.J. Health status of reintroduced wood bison (*bison bison athabascae*): Assessing the conservation value of an isolated population in Northwestern Canada / N.J. Harms, T.S. Jung, C.L. Andrew [et al.] // *J. Wildl. Dis.* – 2019. - Vol. 55. - P. 44–53. doi: 10.7589/2017-09-235.
224. Hasoksuz, M. Biologic, antigenic, and full-length genomic characterization of a Bovine-Like Coronavirus isolated from a giraffe / M. Hasoksuz, K. Alekseev, A. Vlasova [et al.] // *J. Virol.* – 2007. - Vol. 81. - P. 4981–4990. doi: 10.1128/JVI.02361-06.
225. Headley, S.A. Bovine respiratory disease associated with *Histophilus somni* and bovine respiratory syncytial virus in a beef cattle feedlot from Southeastern Brazil / S.A. Headley, L.C. Balbo, A.F. Alfieri [et al.] // *Semin. Cienc. Agrar.* – 2017. - Vol. 38. - P. 283–294. doi: 10.5433/1679-0359.2017v38n1p283.
226. Hedayat, N. Isolation and identification of bubaline herpesvirus 1 (BuHV-1) from latently infected water buffalo (*Bubalus bubalis*) from Iran / N. Hedayat, M.R. Haji Hajikolaei, M.R. Seyfi Abad Shapouri // *Trop. Anim. Health Prod.* – 2020. - Vol. 52 (1). - P. 217–26. doi: 10.1007/s11250-019-02007-9.
227. Hendaus, M.A. Virus-induced secondary bacterial infection: a concise review / M.A. Hendaus, F.A. Jomha, A.H. Alhammadi // *Ther Clin Risk Manag.* – 2015. - Vol. 11. - P. 1265–1271. doi: 10.2147/TCRM.S87789.
228. Herlekar, D.A. Presence of viral and bacterial organisms in milk and their association with somatic cell counts / D.A. Herlekar, C.S. Shashikant, A.A. Gurjar [et al.] // *J. Dairy Sci.* - 2013. - Vol. 96 (10). - P. 6336-6346. doi: 10.3168/jds.2013-6631.
229. Hertig, C. Detection of bovine viral diarrhoea (BVD) virus using the polymerase chain reaction / C. Hertig, U. Pauli, R. Zanoni [et al.] // *Veterinary Microbiology.* – 1991. - Vol. 26. – P. 65–76. doi: 10.1016/0378-1135(91)90042-E.
230. Hill, F.I. Evaluation of two commercial enzyme – linked immuno-sorbent assays for detection of bovine viral diarrhoea virus in serum and skin biopsies of cattle / F.I. Hill, M.P. Reichel, R.J. McCoy [et al.] // *New Zealand Vet. J.* – 2007. - Vol. 55. - P. 45–48. doi: 10.1080/00480169.2007.36734.

231. Hodgins, D.C. Respiratory Viruses and Bacteria in Cattle / D.C. Hodgins, J.A. Conlon, P.E. Shewen // In: Brogden K.A, Guthmiller J.M., editors. Polymicrobial Diseases. Washington (DC): ASM Press. - 2002. Chapter 12.
232. Hodnik, J.J. Coronaviruses in cattle / J.J. Hodnik, J. Ježek, J. Starič // Trop. Anim. Health Prod. - 2020. - Vol. 52. - P. 2809–2816. doi: 10.1007/s11250-020-02354-y.
233. Hoerlein, A.B. Studies of shipping fever in cattle. 1. Parainfluenza 3 virus antibodies in breeder calves / A.B. Hoerlein, M.E. Mansfield, F.R. Abinati [et al.] // J. Am. Vet. Med. Assoc. - 1959. - Vol. 135 (3). - P. 153-160.
234. Hong, T. Pestiviruses infection: Interferon-virus mutual regulation / T. Hong, Y. Yang, P. Wang [et al.] // Front. Cell. Infection Microbiol. – 2023. - Vol. 13: 1146394. doi: 10.3389/fcimb.2023.1146394.
235. Horwood, P.F. Identification of two distinct bovine parainfluenza virus type 3 genotypes / P.F. Horwood, J.L. Gravel, T.J. Mahony // J. Gen. Virol. – 2008. - Vol. 89. - P. 1643–1648. doi: 10.1099/vir.0.2008/000026-0.
236. Hostnik, P. Review of infections with bovine herpesvirus 1 in Slovenia / P. Hostnik, D. Cerne, J. Mrkun [et al.] // Front in Vet Sci. – 2021. - Vol. 8: 676549. doi: 10.3389/fvets.2021.676549.
237. Hou, Z. A Systematic Study of Bovine Viral Diarrhoea Virus Co-Infection with Other Pathogens / Z. Hou, J. Wang, B. Tan [et al.] // Viruses. – 2025. - Vol. 17 (5): 700. doi: 10.3390/v17050700.
238. Houe, H. Serological analysis of a small herd sample to predict presence or absence of animals persistently infected with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in dairy herds / H. Houe // Res. Vet. Sci. - 1992. - Vol. 53. - P. 320-323.
239. Houe, H. Test Strategies in Bovine Viral Diarrhea Virus Control and Eradication Campaigns in Europe / H. Houe, A. Lindberg, V. Moennig // J. Vet. Diagn. Investig. – 2006. - Vol. 18. - P. 427–436. doi: 10.1177/104063870601800501.
240. Huang, Y. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19 / Y. Huang, C. Yang,

- X.F. Xu [et al.] // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2020. - Vol. 41 (9). - P. 1141–1149. doi: 10.1038/s41401-020-0485-4.
241. Hurst, K.R. An interaction between the nucleocapsid protein and a component of the replicase-transcriptase complex is crucial for the infectivity of coronavirus genomic RNA / K.R. Hurst, R. Ye, S.J. Goebel [et al.] // *J. Virol.* – 2010. Vol. 84 (19). - P. 10276–10288. doi: 10.1128/JVI.01287-10.
242. Izumi, Y. Characterization of Bovine herpesvirus type 4 isolated from cattle with mastitis and subclinical infection by the virus among cattle / Y. Izumi, S. Tsuduku, K. Murakami [et al.] // *J. Vet. Med.* - 2006. - Vol. 68. - P. 189–193. doi: 10.1292/jvms.68.189.
243. Jackova, A. The extended genetic diversity of BVDV-1: typing of BVDV isolates from France / A. Jackova, M. Novackova, C. Pelletier [et al.] // *Vet Res Commun.* – 2008. - Vol. 32 (1). - P. 7-11. doi: 10.1007/s11259-007-9012-z.
244. Jenckel, M. Mixed triple: allied viruses in unique recent isolates of highly virulent type 2 bovine viral diarrhea virus detected by deep sequencing / M. Jenckel, D. Höper, H. Schirrmeier [et al.] // *J. Virol.* - 2014. - Vol. 88 (12). - P. 6983–6992. doi: 10.1128/JVI.00620-14.
245. Jones, C. Bovine Herpesvirus 1 Counteracts Immune Responses and Immune-Surveillance to Enhance Pathogenesis and Virus Transmission / C. Jones // *Front Immunol.* - 2019. - Vol. 10: 1008. doi: 10.3389/fimmu.2019.01008.
246. Kalaiyarasu, S. Molecular Characterization of Recent HoBi-like Pestivirus Isolates from Cattle Showing Mucosal Disease-like Signs in India Reveals Emergence of a Novel Genetic Lineage / S. Kalaiyarasu, N. Mishra, K. Jayalakshmi [et al.] // *Transbound Emerg. Dis.* – 2022. - Vol. 69. - P. 308–326. doi: 10.1111/tbed.13981.
247. Kaler, J. Respiratory Syncytial Virus: A Comprehensive Review of Transmission, Pathophysiology, and Manifestation / J. Kaler, A. Hussain, K. Patel [et al.] // *Cureus.* - 2023. - Vol. 15 (3): 36342. doi: 10.7759/cureus.36342.

248. Kalkanov, I. Etiological and pathomorphological investigations in calves with coronaviral pneumoenteritis / I. Kalkanov, I. Dinev, I. Zarkov // *Macedonian Veterinary Review*. – 2019. - Vol. 42 (1). - P. 43–49. doi: 10.2478/macvetrev-2018-0028.
249. Kampa, J. Epidemiology of Bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus type 1 Infections in dairy cattle herds: Evidence of self-clearance and detection of infection with a new atypical pestivirus. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences. – Uppsala. – 2006. - P. 1-43.
250. Kanno, T. A long-term animal experiment indicating persistent infection of bovine coronavirus in cattle / T. Kanno, R. Ishihara, S. Hatama [et al.] // *J. Vet. Med. Sci.* – 2018. - Vol. 80 (7). - P. 1134–1137. doi: 10.1292/jvms.18-0050.
251. Kendrick, J.W. Infectious pustular vulvovaginitis of cattle / J.W. Kendrick // *Cornell.Vet.* – 1958. -Vol. 48 (3). - P. 458-495.
252. Khaneabad, A. BoHV-1 affects abortion and progesterone in dairy cows Bovine alphaherpesvirus 1 (BoHV-1) seropositivity, progesterone levels and embryo loss of 30-day-old pregnant dairy cows in Zagros Industrial Dairy Farm in Shahrekord: Examination and analysis / A. Khaneabad, T. Taktaz, S. Goodarzi // *Vet. Med. Sci.* – 2023. - Vol. 9 (4). - P. 1934-1939. doi: 10.1002/vms3.1187.
253. Khodakaram-Tafti, A. Persistent bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in cattle herds / A. Khodakaram-Tafti, G.H. Farjanikish // *Iran J. Vet. Res.* – 2017. - Vol. 18(3). - P. 154–163.
254. Kibenge, F.S. Amplification of strains of bovine herpesvirus 1 by use of polymerase chain reaction with primers in the thymidine kinase region / F.S. Kibenge, L.M. Harris, P.K. McKenna [et al.] // *Am. J. Vet. Res.* - 1994. - Vol. 55 (9). - P. 1206-1212.
255. King, J. Cattle connection: molecular epidemiology of BVDV outbreaks via rapid nanopore whole-genome sequencing of clinical samples / J. King, A. Pohlmann, K. Dziadek [et al.] // *BMC Veterinary Res.* – 2021. - Vol. 17 (1). - P. 1–10. doi: 10.1186/s12917-021-02945-3.

256. Kirkland, P.D. The outcome of widespread use of semen from a bull persistently infected with pestivirus / P.D. Kirkland, S.G. Mackintosh, A. Moyle // *Vet. Rec.* – 1994. - Vol. 135. - P. 527–529. doi: 10.1136/vr.135.22.527.
257. Kirolos, A. A landscape review of the published research output relating to respiratory syncytial virus (RSV) in North & Central America and Europe between 2011–2015 / A. Kirolos, A. Christides, S. Xian [et al.] // *J. Glob. Health.* – 2019. - Vol. 9 (1): 010425. doi: 10.7189/jogh.09.010425.
258. Kishimoto, M. Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with bovine respiratory disease complex / M. Kishimoto, S. Tsuchiaka, S.S. Rahpaya [et al.] // *J. Vet. Med. Sci.* – 2017. - Vol. 79. - P. 517–523. doi: 10.1292/jvms.16-0489.
259. Klamming, S. Uterine infection with bovine herpesvirus type 4 in dairy cows / S. Klamming, I. Prunner, M. J. Giuliadori [et al.] // *Reprod. Domest. Anim.* - 2017. - Vol. 52 (1). - P. 115-121. doi: 10.1111/rda.12865.
260. Konishi, M. Complete Genome Sequence of the First Isolate of Genotype C Bovine Parainfluenza Virus Type 3 in Japan / M. Konishi, T. Ohkura, M. Shimizu [et al.] // *Genome Announc.* – 2014. - Vol. 2. - P. 01215-14. doi: 10.1128/genomeA.01215-14.
261. Kostanic, V. Comparative Insights into Acute Gastroenteritis in Cattle Caused by Bovine Rotavirus A and Bovine Coronavirus / V. Kostanic, V. Kunic, M. Prišlin Šimac [et al.] // *Vet. Sci.* – 2024. - Vol. 11. – P. 671. doi: 10.3390/vetsci11120671.
262. Kozasa, T. Analysis of a pair of END⁺ and END⁻ viruses derived from the same bovine viral diarrhea virus stock reveals the amino acid determinants in N^{pro} responsible for inhibition of type I interferon production / T. Kozasa, Y. Abe, K. Mitsuhashi [et al.] // *J. Vet. Med. Sci.* – 2015. - Vol. 77. - P. 511–518. doi: 10.1292/jvms.14-0420.
263. Krešić, N. Genetic analysis of bovine respiratory syncytial virus in Croatia / N. Krešić, T. Bedeković, D. Brnić [et al.] // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* – 2018. - Vol. 58. - P. 52–57. doi: 10.1016/j.cimid.2018.09.004.

264. Kruger, E.R. Bovine Herpesvirus 4 in Parana State, Brazil: case report, viral isolation, and molecular identification / E.R. Kruger, T.R. Penha, D.R.E. Stoffelo [et al.] // *Braz. J. Microbiol.* – 2015. - Vol. 46 (1). - P. 279-283. doi: 10.1590/S1517-838246120130949.
265. Kumagai, A. Isolation and complete genomic characterization of a Movar 33/63-like Japanese bovine herpesvirus 4 from a calf with respiratory disease / A. Kumagai, V. Soga, K. Kimura [et al.] // *J. Vet. Med. Sci.* - 2024. - Vol. 86 (6). - P. 645–652. doi: 10.1292/jvms.24-0028.
266. Kumagai, A. Sequence and unique phylogeny of G genes of bovine respiratory syncytial viruses circulating in Japan / A. Kumagai, K. Kawauchi, K. Andoh [et al.] // *J. Vet. Diagn. Investig.* – 2021. - Vol. 33. - P. 162–166. doi: 10.1177/1040638720975364.
267. Kumar, N. Isolation and characterization of bovine herpes virus 5 (BoHV5) from cattle in India / N. Kumar, Y. Chander, T. Riyesh [et al.] // *PLoS One.* - 2020. - Vol. 15(4): e0232093. doi: 10.1371/journal.pone.0232093.
268. Kumar, P. Bovine Respiratory Disease Complex – A Review / P. Kumar, A. Yadav, Lokesh [et al.] // *Int. J. Curr. Microbiol.* - 2018. - Vol. 7(12). – P. 352-358. - doi: 10.20546/ijcmas.2018.712.043.
269. Kumar, S. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets / S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura // *Mol. Biol. Evol.* – 2016. - Vol. 7 (33). - P. 1870–74. doi: 10.1093/molbev/msw0544.
270. La Rocca, S.A. A short target real-time RT-PCR assay for detection of pestiviruses infecting cattle / S.A. La Rocca, T.A. Sandvik // *J. Virol. Methods.* – 2009. - Vol. 161. - P. 122–127. doi: 10.1016/j.jviromet.2009.06.005.
271. Lamb, R.A., Parks, G.D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: D. M. Knipe, P. M. Howley (eds). *Fields Virology*. 5.1. Wolters Kluwer: Lippincott Williams and Wilkins. 2007. - P. 1449–1496.
272. Langedijk, J.P. Antigenic structure of the central conserved region of protein G of bovine respiratory syncytial virus / J.P. Langedijk, R.H. Melen, G. Taylor [et

- al.] // *J. Virol.* – 1997. - Vol. 71 (5). - P. 4055–61. doi: 10.1128/jvi.71.5.4055-4061.1997.
273. Lanyon, S.R. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis / S.R. Lanyon, F.I. Hill, M.P. Reichel // *Vet. J.* – 2014. - Vol. 199. - P. 201–209. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.07.024.
274. Larsen, L.E. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): A review / L.E. Larsen // *Acta Veterinaria Scandinavica.* – 2000a. - Vol. 41 (1). - P. 1-24. doi: 10.1186/BF03549652.
275. Larsen, L.E. Extensive sequence divergence among bovine respiratory syncytial viruses isolated during recurrent outbreaks in closed herds / L.E. Larsen, K. Tjørnehoj, B. Viuff // *J. Clin. Microbiol.* – 2000b. – Vol. 38. - P. 4222–4227. doi: 10.1128/JCM.38.11.4222-4227.2000.
276. Larsen, L.E. Uttenthal diagnosis of enzootic pneumonia in Danish cattle: reverse transcription-polymerase chain reaction assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in naturally and experimentally infected cattle / L.E. Larsen, K. Tjørnehoj, B. Viuff [et al.] // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 1999. - Vol. 11. - P. 416-422. doi: 10.1177/104063879901100505.
277. Larska, M. Kinetics of single and dual infection of calves with an Asian atypical bovine pestivirus and a highly virulent strain of bovine viral diarrhoea virus 1 / M. Larska, M.P. Polak, V. Riitho [et al.] // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* - 2012. - Vol. 35. - P. 381–390. doi: 10.1016/j.cimid.2012.03.003.
278. LeBlanc, N. A novel combination of TaqMan RT-PCR and a suspension microarray assay for the detection and species identification of pestiviruses / N. LeBlanc, M. Leijon, M. Jobs [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2010. - Vol. 142. - P. 81–86. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.09.046.
279. Leme, R.A. Molecular characterization of Brazilian wild-type strains of bovine respiratory syncytial virus reveals genetic diversity and a putative new subgroup of the virus / R.A. Leme, A.M.D. Agnol, L.C.A. Balbo [et al.] // *Vet. Q.* – 2020. - Vol. 40 (1). P. 83–96. doi: 10.1080/01652176.2020.1733704.

280. Lemon, J.L. A Review of UK-Registered and Candidate Vaccines for Bovine Respiratory Disease / J.L. Lemon, M.J. McMenamy // *Vaccines*. – 2021. - Vol. 9. - P. 1403. doi: 10.3390/vaccines9121403.
281. Lété, C. Proteomic characterization of bovine herpesvirus 4 extracellular virions / C. Lété, L. Palmeira, B. Leroy [et al.] // *J. Virol.* – 2012. - Vol. 86. - P. 11567–11580. doi: 10.1128/JVI.00456-12.
282. Letellier, C. Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus / C. Letellier, P. Kerkhofs // *J. Virol. Methods*. – 2003. - Vol. 114(1). - P. 21-27. doi: 10.1016/j.jviromet.2003.08.004.
283. Li, L. Establishment of a multiplex qPCR assay for the detection of pathogens associated with bovine respiratory disease complex / L. Li, Q. Jiang, S. Li [et al.] // *Front. Vet. Sci.* – 2025. - Vol. 12: 1594488. doi: 10.3389/fvets.2025.1594488.
284. Li, L. Quantitative proteomic analysis shows involvement of the p38 MAPK pathway in bovine parainfluenza virus type 3 replication / L. Li, P. Li, A. Chen [et al.] // *Virol. J.* – 2022. - Vol. 19 (1): 116. doi: 10.1186/s12985-022-01834-x.
285. Li, S. First isolation of bovine coronavirus with a three-amino-acid deletion in the N gene causing severe respiratory and digestive disease in calve / S. Li, X. Yuan, L. Mao [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2024. - Vol. 15: 1466096. doi: 10.3389/fmicb.2024.1466096.
286. Lin, J. Isolation and molecular characterization of bovine herpesvirus 4 from cattle in mainland China / J. Lin, R.-H. Chen, M.-J. Yang, et al. // *Arch. Virol.* - 2021. - Vol. 166. - P. 619–626. doi: 10.1007/s00705-020-04896-w.
287. Lindberg, A.L.E. Bovine Viral Diarrhoea Virus Infections and its Control A review / A.L.E. Lindberg // *Veterinary Quarterly*. – 2003. - Vol. 25 (1). - P. 1-16. doi: 10.1080/01652176.2003.9695140.
288. Liu, C. RNA-Seq based transcriptome analysis during bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection / C. Liu, Y. Liu, L. Liang [et al.] // *BMC Genomics*. – 2019. - Vol. 20: 774. doi: 10.1186/s12864-019-6120-4.

289. Liu, L. Virus recovery and full-length sequence analysis of atypical bovine pestivirus Th/04_KhonKaen / Liu L., Kampa J., Belák S. [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2009 a. - Vol. 138. - P. 62-68. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.006.
290. Liu, L. A TaqMan real-time RT-PCR assay for selective detection of atypical bovine pestiviruses in clinical samples and biological products / L. Liu, H. Xia, S. Belák [et al.] // *J. Virol. Methods.* – 2008. - Vol. 154. - P. 82–85. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.09.001.
291. Liu, L. Phylogeny, classification and evolutionary insights into Pestiviruses / L. Liu, H. Xia, N. Wahlberg [et al.] // *Virology.* – 2009 b. - Vol. 385 (2). - P. 351–357. doi: 10.1016/j.virol.2008.12.004.
292. Loneragan, G.H. Trends in mortality ratios among cattle in US feedlots / G.H. Loneragan, D.A. Dargatz, P.S. Morley [et al.] // *J. of the American Veterinary Medical Association.* – 2001. - Vol. 219. - P. 1122–1127. doi: 10.2460/javma.2001.219.1122.
293. Losurdo, M. Development of a TaqMan assay for sensitive detection of all pestiviruses infecting cattle, including the emerging HoBi-like strains / M. Losurdo, V. Mari, M.S. Lucente [et al.] // *J. Virol. Methods.* – 2015. - Vol. 224. - P. 77–82. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.08.013.
294. Lotfollahzadeh, S. Bovine coronavirus in neonatal calf diarrhoea in Iran / S. Lotfollahzadeh, O. Madadgar, M. Reza Mohebbi [et al.] // *Vet. Med. Sci.* – 2020. - Vol. 6 (4). - P. 686–94. doi: 10.1002/vms3.277.
295. Lovato, L. Infection of cattle with a bovine herpesvirus 1 strain that contains a mutation in the latency-related gene leads to increased apoptosis in trigeminal ganglia during the transition from acute infection to latency / L. Lovato, M. Inman, G. Henderson [et al.] // *J. Virol.* – 2003. - Vol. 77. - P. 4848–4857. doi: 10.1128/jvi.77.8.4848-4857.2003.
296. Lukacs, N.W. Respiratory virus-induced TLR7 activation controls IL-17-associated increased mucus via IL-23 regulation / N.W. Lukacs, J.J. Smit, S. Mukherjee [et al.] // *J. Immunol.* 2010. - Vol. 185 (4). - P. 2231–2239. doi: 10.4049/jimmunol.1000733.

297. Luzzago, C. Epidemiology of bovine pestiviruses circulating in Italy / C. Luzzago, N. Decaro // *Front. Vet. Sci.* - 2021. - Vol. 8: 669942. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.669942>.
298. Madin, S.H. Isolation of IBR virus / S.H. Madin, C.J. York, D.G. McKercher // *Science.* - 1956. - Vol. 126, № 6. - P. 721-722. doi: 10.1126/science.124.3225.721.
299. Maidana, S.S. Isolation and characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Argentina / S.S. Maidana, P.M. Lomonaco, G. Combessies [et al.] // *BMC Vet. Res.* - 2012. - Vol.8: 83. doi: 10.1186/1746-6148-8-83.
300. Makoschey, B. Investigation of a dual fetal infection model with bovine viral diarrhoea viruses (BVDV)-1 and BVDV-2 / B. Makoschey, M.G.J. Janssen // *Arch. Virol.* - 2011. - Vol. 156. - P. 1831-1833. doi: 10.1007/s00705-011-1023-y.
301. Makoschey, B. Bovine viral diarrhoea virus antigen in foetal calf serum batches and consequences of such contamination for vaccine production / B. Makoschey, P.T.J.A. van Gelder, V. Keijsers [et al.] // *Biologicals.* - 2003. - Vol. 31(3). - P. 203-208. doi: 10.1016/s1045-1056(03)00058-7. 27.
302. Mao, L. Primary surveys on molecular epidemiology of bovine viral diarrhoea virus 1 infecting goats in Jiangsu province, China / L. Mao, W. Li, L. Yang [et al.] // *BMC Vet Res.* - 2016. - Vol. 12:181. doi: 10.1186/s12917-016-0820-7.
303. Mari, V. Multiplex real-time RT-PCR assay for bovine viral diarrhoea virus type 1, type 2 and HoBi-like pestivirus / V. Mari, M. Losurdo, M.S. Lucente [et al.] // *J. Virol. Methods.* - 2016. - Vol. 229. - P. 1-7. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.12.003.
304. Marshall, D.J. Distribution of virus and viral antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus / D.J. Marshall, R.A. Moxley, C.L. Kelling // *Vet. Pathol.* - 1996. - Vol. 33. - P. 311-318. doi: 10.1177/030098589603300308.

305. Masri, S.A. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay / S.A. Masri, W. Olson, P.T. Nguyen [et al.] // *Can. J. Vet. Res.* -1996. - Vol. 60 (2). - P. 100-107.
306. Maurer, K. CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus / K. Maurer, T. Krey, V. Moennig [et al.] // *J. Virol.* – 2004. - Vol. 78. - P. 1792–1799. doi: 10.1128/jvi.78.4.1792-1799.2004.
307. McGill, J.L. Bovine gamma delta T cells contribute to exacerbated IL-17 production in response to coinfection with bovine RSV and *Mannheimia haemolytica* / J.L. McGill, R.A. Rusk, M. Guerra-Maupome [et al.] // *PLoS One.* 2016. - Vol. 11: 0151083. doi: 10.1371/journal.pone.0151083.
308. McNulty, M.S. Coronavirus infection of the bovine respiratory tract / M.S. McNulty, D.G. Bryson, G.M. Allan [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 1984. - Vol. 9 (5). - P. 425–34. doi: 10.1016/0378-1135(84)90063-4.
309. Mebus, C.A. Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a coronavirus-like agent / C.A. Mebus, E.L. Stair, M.B. Rhodes [et al.] // *Vet. Pathol.* – 1973. - Vol. 10 (1). - P. 45–64. doi: 10.1177/030098587301000105.
310. Milićević, V. Bovine Parainfluenza Virus 3 and Bovine Respiratory Syncytial Virus: Dominant Viral Players in Bovine Respiratory Disease Complex among Serbian Cattle / V. Milićević, S. Šolaja, D. Glišić [et al.] // *Animals.* – 2024. - Vol. 14 (10): 1458. doi: 10.3390/ani14101458.
311. Millet, J.K. Molecular diversity of coronavirus host cell entry receptors / J.K. Millet, J.A. Jaimes, G.R. Whittaker // *FEMS Microbiol. Rev.* - 2021. - Vol. 45 (3): fuaa057. doi: 10.1093/femsre/fuua057.
312. Mirosław, P. Increased genetic variation of bovine viral diarrhea virus in dairy cattle in Poland / P. Mirosław, M. Polak // *BMC Vet. Res.* – 2019. - Vol. 15 (1): 278. doi: 10.1186/s12917-019-2029-z.
313. Miyano, H. Mammary lesions associated with bovine herpesvirus type 4 in a cow with clinical mastitis / H. Miyano, M. Haritani, H. Sentsui [et al.] // *J. Vet. Med. Sci.* - 2004. - Vol. 66 (4). - P. 457–460. doi: 10.1292/jvms.66.457.

314. Mohanty, S.B. A new bovine herpes virus and its effects on experimentally infected calves / S.B. Mohanty, R.C. Hammond, M.G. Lillie // Arch. Gesamte Virusforsch. - 1971. - Vol. 34. - P. 394-395. doi:10.1007/BF01254696.
315. Monge, A. Bovine herpesvirus 4-associated postpartum metritis in a Spanish dairy herd / A. Monge, L. Elvira, J.V. Gonzalez [et al.] // Res. Vet. Sci. - 2006. - Vol. 80. - P. 120–125. doi: 10.1016/j.rvsc.2005.04.001.
316. Moore, S.J. Mortality of live export cattle on long-haul voyages: pathologic changes and pathogens / S.J. Moore, M.A. O’Dea, N. Perkins [et al.] // J. Vet. Diagn. Invest. - 2014. - Vol. 26 (2). - P. 252 – 265. doi: 10.1177/1040638714522465.
317. Morán P.E. Herpesvirus bovino 4 (BoHV-4): aspectos generales de su biología y situación en la República Argentina / P.E. Morán, S.E. Pérez, A.C. Odeón [et al.] // Rev. Argent. Microbiol. - 2015. - Vol. 47 (2). - P. 155-166. doi: 10.1016/j.ram.2015.02.007.
318. Muylkens, B. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis / B. Muylkens, J. Thiry, P. Kirten [et al.] // Vet Res. - 2007. - Vol. 38 (2). - P. 181–209. doi: 10.1051/vetres:2006059.
319. Nandi, S. Bovine herpes virus infections in cattle / S. Nandi, M. Kumar, M. Manohar [et al.] // Anim. Health Res. Rev. - 2009. - Vol. 10. - P. 85-98. doi: 10.1017/S1466252309990028.
320. Natsuaki, S. Fatal Winter Dysentery with Severe Anemia in An Adult Cow / S. Natsuaki, K. Goto, K. Nakamura // J. Vet. Med. Sci. - 2007. - Vol. 69 (9). - P. 957-60. doi: 10.1292/jvms.69.957.
321. Neill, J.D. Identification and genome characterization of genotype B and genotype C bovine parainfluenza type 3 viruses isolated in the United States / J.D. Neill, J.F. Ridpath, B.T. Valayudhan // BMC Vet. Res. - 2015. - Vol. 11: 112. doi: 10.1186/s12917-015-0431-8.
322. Newcomer, B.W. Serologic survey for antibodies against three genotypes of bovine parainfluenza 3 virus in unvaccinated ungulates in Alabama /

- B.W. Newcomer, J.D. Neill, P.K. Galik [et al.] // *AJVR*. – 2017. – Vol. 78 (2). - P. 239-243. doi: 10.2460/ajvr.78.2.239.
323. Newcomer, B.W. Laboratory diagnosis and transmissibility of bovine viral diarrhoea virus from a bull with a persistent testicular infection / B.W. Newcomer, K. Toohey-Kurth, Y. Zhang [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2014. - Vol. 170. - P. 246–257. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.02.028.
324. Nikolin, V. Presence of Bovine herpesvirus type 4 (BHV-4) infection in bulls for artificial insemination in Serbia / V. Nikolin, V. Milićević, V. Radosavljevic // *Acta Veterinaria Beograd.* – 2008. - Vol. 58. - P. 267-273. doi:10.2298/AVB0803267N.
325. Nikolin, V.M. First Serbian isolates of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) from a herd with a history of postpartum metritis / V.M. Nikolin, G. Donofrio, B. Milosevic [et al.] // *New Microbiol.* - 2007. - Vol. 30. - P. 53–57.
326. Niskanen, R. Lack of virus transmission from bovine viral diarrhoea virus infected calves to susceptible peers. / R. Niskanen, A. Lindberg, B. Larsson [et al.] // *Acta Veterinaria Scandinavica.* – 2000. - Vol. 41. - P. 93-99. doi: 10.1186/BF03549659.
327. O’Donoghue, S. A Comprehensive Review: Bovine Respiratory Disease, Current Insights into Epidemiology, Diagnostic Challenges, and Vaccination. / S. O’Donoghue, S.M. Waters, D.W. Morris [et al.] // *Veterinary Sciences.* - 2025. - Vol. 12 (8). - P. 778. doi: 10.3390/vetsci12080778.
328. O’Neill, R. Patterns of detection of respiratory viruses in nasal swabs from calves in Ireland: A retrospective study / R. O’Neill, J. Mooney, E. Connaghan [et al.] // *Vet. Rec.* – 2014. - Vol. 175(14) :351. doi: 10.1136/vr.102574.
329. Oberto, F. A Qualitative PCR Assay for the Discrimination of Bubaline Herpesvirus 1, Bovine Herpesvirus 1 and Bovine Herpesvirus 5 / F. Oberto, E. Carella, C. Caruso [et al.] // *Microorganisms.* – 2023. - Vol. 11 (3): 577. doi: 10.3390/microorganisms11030577.
330. Ochirkhuu, N. Molecular detection and characterization of bovine viral diarrhoea virus in Mongolian cattle and yaks / N. Ochirkhuu, S. Konnai, R. Odbileg [et

- al.] // Arch. Virol. – 2016. - Vol. 161 (8). - P. 2279–83. doi: 10.1007/s00705-016-2890-z.
331. Oem, J.K. Phylogenetic analysis and characterization of Korean bovine viral diarrhea viruses / J.K. Oem, B.H. Hyun, S.H. Cha [et al.] // Vet. Microbiol. – 2009. - Vol. 139 (3-4). - P. 356–360. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.06.017.
332. Oem, J.K. Molecular characterization of a Korean bovine parainfluenza virus type 3 isolate / J.K. Oem J.K., E.Y. Lee, K.K. Lee [et al.] // Vet Microbiol. – 2013. - Vol. 162. - P. 224–227. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.10.013.
333. Oguejiofor, C.F. Mechanisms linking bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection with infertility in cattle / C.F. Oguejiofor, C. Thomas, Z. Cheng [et al.] // Anim. Health. Res. Rev. – 2019. - Vol. 20 (1). - P. 72 – 85. doi:10.1017/S1466252319000057.
334. Ogunbiyi, P.O. Parainfluenza-3 virus-induced enhancement of histamine release from calf lung mast cells—effect of levamisole / P.O. Ogunbiyi, W.D. Black, P. Eyre // J. Vet. Pharmacol. Ther. – 1988. - Vol. 11. - P. 338–344. doi: 10.1111/j.1365-2885.1988.tb00193.x.
335. Oma, V.S. Bovine coronavirus in naturally and experimentally exposed calves; viral shedding and the potential for transmission / V.S. Oma, M.Tråvén, S. Alenius // Virol. J. – 2016. - Vol. 13: 100. doi.org/10.1186/s12985-016-0555-x.
336. Oma, V.S. Temporary carriage of bovine coronavirus and bovine respiratory syncytial virus by fomites and human nasal mucosa after exposure to infected calves / V.S. Oma, T. Klem, M. Traven // BMC Veterinary Research. - 2018. - Vol. 14 (1): 22. doi: 10.1186/s12917-018-1335-1.
337. Osorio, F.A. Experimental inoculation of cattle with bovine herpesvirus-4: evidence for a lymphoid-associated persistent infection / F.A. Osorio, D.E. Reed // Am. J. Vet. Res. - 1983. - Vol. 44. - P. 975–980.
338. Ostler, J.B. The Bovine Herpesvirus 1 Latency-Reactivation Cycle, a Chronic Problem in the Cattle Industry / J.B. Ostler, C. Jones // Viruses. – 2023. - Vol. 15 (2): 552. doi: 10.3390/v15020552.

339. Paller, T. The prevalence of ten pathogens detected by a real-time PCR method in nasal swab samples collected from live cattle with respiratory disease / T. Paller, P. Hostnik, M. Pogačnik [et al.] // *Slovenia veterinary research*. – 2017. - Vol. 54 (3). - P. 101–107. doi: 10.26873/SVR-24743-2017.
340. Palmeira, L. Sequencing of bovine herpesvirus 4 v.test strain reveals important genome features / L. Palmeira, B. Machiels, C. Lété [et al.] // *Virology*. - 2011. - Vol. 8: 406. doi: 10.1186/1743-422X-8-406.
341. Pang, F. Immune evasion strategies of bovine viral diarrhoea virus / F. Pang, Q. Long, M. Wei // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2023. - Vol. 13: 1282526. doi: 10.3389/fcimb.2023.1282526.
342. Pansri, P. Evaluation of novel multiplex qPCR assays for diagnosis of pathogens associated with the bovine respiratory disease complex / P. Pansri, J. Katholm, K.M. Krogh [et al.] // *Vet. J.* – 2020. - Vol. 256: 105425. doi: 10.1016/j.tvjl.2020.105425.
343. Pardon, B. Pathogen-specific risk factors in acute outbreaks of respiratory disease in calves / B. Pardon, J. Callens, J. Maris [et al.] // *J. Dairy Sci.* 2020. - Vol. 103 (3). - P. 2556-2566. doi: 10.3168/jds.2019-17486.
344. Park, S.J. Dual enteric and respiratory tropisms of winter dysentery bovine coronavirus in calves / S.J. Park, G.Y. Kim, H.E. Choy // *Arch. Virol.* – 2007. - Vol. 152 (10). - P. 1885–1900. doi: 10.1007/s00705-007-1005-2.
345. Parreira, R. Laboratory Methods in Molecular Epidemiology: Viral Infections / R. Parreira // *ASM Journals*. – 2018. - Vol. 6 (6): 10. doi: 10.1128/microbiolspec.AME-0003-2018.
346. Partida, L.E. Detection of bovine viral diarrhoea virus 2 as the cause of abortion outbreaks on commercial sheep flocks / L.E. Partida, M. Fernandez, J. Gutierrez [et al.] // *Transbound Emerg. Dis.* – 2017. - Vol. 64. - P. 19-26. doi: 10.1111/tbed.12599.
347. Passler, T. Infectious agents: Bovine Viral Diarrhoea Virus. In: Hopper R., editor. *Bovine Reproduction*. John Wiley and Sons. - 2014. - P. 545–61.

348. Pastoret, P.P. Human and animal vaccine contaminations / P.P. Pastoret // *Biologicals*. – 2010. - Vol. 38 (3). - P. 332-334. doi: 10.1016/j.biologicals.2010.02.015.
349. Patrono, L.V. Human coronavirus OC43 outbreak in wild chimpanzees, Côte d'Ivoire, 2016. / L.V. Patrono, L. Samuni, V.M. Corman [et al.] // *Emerg. Microbes Infect.* – 2018. - Vol. 7. - P. 118. doi: 10.1038/s41426-018-0121-2.
350. Pecora, A. Molecular characterization of pestiviruses in fetal bovine sera originating from Argentina: evidence of circulation of HoBi-Like viruses / A. Pecora, M.S. Perez Aguirreburualde, J.F. Ridpath [et al.] // *Front. Vet. Sci.* – 2019. - Vol. 6: 359. doi: 10.3389/fvets.2019.00359.
351. Pedrera, M. Characterization of apoptosis pathways (intrinsic and extrinsic) in lymphoid tissues of calves inoculated with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus genotype-1 / M. Pedrera, J.C. Gomez-Villamandos, M.A. Risalde [et al.] // *J. Comp. Pathol.* 2012. - Vol. 146. - P. 30–39. doi: 10.1016/j.jcpa.2011.03.015.
352. Pérez, S. Genetic characterization of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) isolates from Argentine cattle suggests a complex evolutionary scenario / S. Pérez, J. Manrique, P. Morán [et al.] // *Mol. Biol. Rep.* – 2020. - Vol. 47. - P. 4905–4909. doi: 10.1007/s11033-020-05449-9.
353. Perrin, B. Selection of European Union standard reference sera for use in the serological diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis / B. Perrin, T. Calud, P. Cordioli [et al.] // *Rev Sci Tech.* - 1994. - Vol. 13. - P. 947–960. doi: 10.20506/rst.13.3.810.
354. Petrini, S. Genomic Characterization of a Wild-Type *Bovine alphaherpesvirus 1* (BoAHV-1) Strain Isolated in an Outbreak in Central Italy / S. Petrini, V. Curini, C. Righi [et al.] // *Viruses*. – 2024. - Vol. 16 (1): 150. doi: 10.3390/v16010150.
355. Pizarro-Lucero, J. Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile / J. Pizarro-Lucero, M.O. Celedón, M. Aguilera [et al.] // *Vet. Microbiol.* - 2006. - Vol. 115. - P. 208-217. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.02.009.

356. Potgieter, L.N.D. Immunology of bovine viral diarrhoea virus / L.N.D. Potgieter // *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* – 1995. - Vol. 11. - P. 501–520. doi: 10.1016/s0749-0720(15)30464-3.
357. Rahe, M.C. Bovine coronavirus in the lower respiratory tract of cattle with respiratory disease / M.C. Rahe, D.R. Magstadt, J. Groeltz-Thrush [et al.] // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2022. - Vol. 34. - P. 482–488. doi: 10.1177/1040638722107858.
358. Rana, S.K. Use of real-time polymerase chain reaction to detect bovine herpesvirus 1 in frozen cattle and buffalo semen in India / S.K. Rana, S.N. Kota, P.N. Samayam [et al.] // *Vet. Ital.* – 2011. – Vol. 47 (3). – P. 313-322.
359. Rashmi, L. Bovine Alphaherpesvirus-1 (BoHV-1) Infection in cattle: an overview of epidemiology, role of envelope proteins in disease and control / L. Rashmi, R. Sharada, D. Ratnamma [et al.] // *Indian J. Anim. Res.* - 2024. - Vol. 5136. – P. 1-12. doi: 10.18805/IJAR.B-5136.
360. Read, A.J. Prolonged detection of bovine viral diarrhoea virus infection in the semen of bulls / A.J. Read, S. Gestier, K. Parrish [et al.] // *Viruses.* – 2020. - Vol. 12 (6): 674 doi: 10.3390/v12060674.
361. Ren, Y. Prevalence and Molecular Characterization of Bovine Parainfluenza Virus Type 3 in Cattle Herds in China / Y. Ren, C. Tang, H. Yue // *Animals.* – 2023. - Vol. 13 (5): 793. doi: 10.3390/ani13050793.
362. Ridpath, J.F. Sequential exposure to bovine viral diarrhoea virus and bovine coronavirus results in increased respiratory disease lesions: Clinical, immunologic, pathologic, and immunohistochemical findings / J.F. Ridpath, R.W. Fulton, F.V. Bauermann [et al.] // *J. Vet. Diagn. Investig.* – 2020. - Vol. 32 (4). - P. 513–526. doi: 10.1177/1040638720918561.
363. Ridpath, J.F. Bovine Viral Diarrhoea Virus: Global Status / J.F. Ridpath // *Vet. Clin. North Am. Food Animal Pract.* - 2010. - Vol. 26. - P. 105 – 121. doi: 10.1016/j.cvfa.2009.10.007.
364. Righi, C. The cell-mediated immune response against bovine alphaherpesvirus 1 (BoHV-1) infection and vaccination / C. Righi, G. Franzoni, F. Feliziani [et al.]

- // Vaccines. – 2023. - Vol. 11 (4): 785. <https://doi.org/10.3390/vaccines11040785>.
365. Rijsewijk, F.A. Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains / F.A. Rijsewijk, M.J. Kaashoek, J.P. Langeveld [et al.] // *J. Gen Virol.* – 1999. - Vol. 80. - P. 1477–1483. doi: 10.1099/0022-1317-80-6-1477.
366. Risalde, M.A. Pathogenic mechanisms implicated in the intravascular coagulation in the lungs of BVDV-infected calves challenged with BHV-1 / M.A. Risalde, V. Molina, P.J. Sánchez-Cordón [et al.] // *Vet. Res.* – 2013. - Vol. 44: 20. doi:10.1186/1297-9716-44-20.
367. Rivas, J. Genetic Diversity of Bovine Viral Diarrhea Virus in Cattle in France between 2018 and 2020 / J. Rivas, A. Hasanaj, C. Deblon [et al.] // *Front. Vet. Sci.* – 2022. - Vol. 9: 1028866. doi: 10.3389/fvets.2022.1028866.
368. Roels, S. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow / S. Roels, G. Charlier, C. Letellier [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2000. – Vol. 146 (20). - P. 586 – 588. doi: 10.1136/vr.146.20.586.
369. Roizman B., Knipe D.M., Whitley R.J. Herpes Simplex Virus. In: David M, Knipe DM, Howley PM, editors. - *Fields virology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, PA, USA: 2007. - P. 2501–2602.
370. Rola, J. Seroprevalence of bovine herpesvirus 1 related alphaherpesvirus infections in free-living and captive cervids in Poland / J. Rola, M. Larska, W. Socha [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2017. – Vol. 204. – P. 77-83. – doi: 10.1016/j.vetmic.2017.04.006.
371. Romeo, F. Whole Genome Sequence-Based Analysis of Bovine Gammaherpesvirus 4 Isolated from Bovine Abortions / F. Romeo, M.J. Spetter, S.B. Pereyra [et al.] // *Viruses.* – 2024. - Vol. 16 (5): 739. doi: 10.3390/v16050739.
372. Roshanzamir, A. The Impact of Cytopathogenic and Non-cytopathogenic Biotypes of Bovine Viral Diarrhea Virus on Total Antioxidant Capacity of Bovine Oocytes In-vitro / A. Roshanzamir, M. Talebkhan Garoussi, J. Mehrzad // *Iranian*

- Journal of Veterinary Medicine. – 2025. - Vol. 19 (3). - P. 563-570. doi: 10.32598/ijvm.19.3.1005577.
373. Russo, L. Characterization of BoHV-4 ORF45 / L. Russo, E. Capra, V. Franceschi [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2023. - Vol. 14: 1171770. doi: 10.3389/fmicb.2023.1171770.
374. Sacco, R.E. Respiratory syncytial virus infection in cattle / R.E. Sacco, J.L. McGill, A.E. Pillatzki [et al.] // *Vet. Pathol.* – 2014. - Vol. 51 (2). - P. 427-36. doi: 10.1177/0300985813501341.
375. Saif, L.J. Bovine respiratory coronavirus / L.J. Saif // *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* – 2010. - Vol. 26. - P. 349–64. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.04.005.
376. Saif, L.J. Comparative pathogenesis of bovine and porcine respiratory coronaviruses in the animal host species and SARS-CoV-2 in humans / L.J. Saif, K.J. Jung // *Clin. Microbiol.* - 2020. - Vol. 58: 10.1128/jcm.01355-20. doi: 10.1128/jcm.01355-20.
377. Salem, E. Global Transmission, Spatial Segregation, and Recombination Determine the Long-Term Evolution and Epidemiology of Bovine Coronaviruses / E. Salem, V. Dhanasekaran, H. Cassard [et al.] // *Viruses.* - 2020. - Vol. 12 (5): 534. doi: 10.3390/v12050534.
378. Saliki, J.T. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections / J.T. Saliki, E.J. Dubovi // *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* - 2004. - Vol. 20. – P. 69-83. doi: 10.1016/j.cvfa.2003.11.005.
379. Sarmiento-Silva, R.E. Epidemiology, molecular epidemiology and evolution of bovine respiratory syncytial virus / R.E. Sarmiento-Silva, Y. Nakamura-Lopez, G. Vaughan [et al.] // *Viruses.* – 2012. - Vol. 4 (12). - P. 3452-3467. doi: 10.3390/v4123452.
380. Satarker, S. Structural proteins in severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 / S. Satarker, M. Nampoothiri // *Arch. Med. Res.* – 2020. - Vol. 51 (6). - P. 482–91. doi: 10.1016/j.arcmed.2020.05.012.

381. Savard, C. First Report and Genomic Characterization of a Bovine-like Coronavirus Causing Enteric Infection in an Odd-Toed Non-Ruminant Species (Indonesian Tapir, *Acrocodia Indica*) during an Outbreak of Winter Dysentery in a Zoo / C. Savard, C. Provost, O. Ariel [et al.] // *Transbound. Emerg. Dis.* – 2022. - Vol. 69. - P. 3056–3065. doi: 10.1111/tbed.14300.
382. Schirrmeier, H. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species / H. Schirrmeier, G. Strebelow, K. Depner [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2004. - Vol. 85. - P. 3647–3652. doi: 10.1099/vir.0.80238-0.
383. Schroeder, R.J. An acute respiratory infection of dairy cattle / R.J. Schroeder, D.M. Mous // *Am. J. Vet. Med. Assoc.* – 1959. – Vol. 125 (3). – P. 471-472.
384. Sen, S. Understanding structural malleability of the SARS-CoV-2 proteins and relation to the comorbidities / S. Sen, A. Dey, S. Bandhyopadhyay [et al.] // *Brief. Bioinform.* – 2021. - Vol. 22 (6): bbab232. doi: 10.1093/bib/bbab232.
385. Shang, Z. Respiratory syncytial virus: from pathogenesis to potential therapeutic strategies / Z. Shang, S. Tan, D. Ma // *Int. J. Biol. Sci.* – 2021. – 17 (14). - P. 4073–4091. doi: 10.7150/ijbs.64762.
386. Silflow, R.M. Bronchoalveolar immune defense in cattle exposed to primary and secondary challenge with bovine viral diarrhoea virus / R.M. Silflow, P.M. Degel, A.G. Harmsen // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2005. - Vol. 103 (1-2). - P. 129-39. doi: 10.1016/j.vetimm.2004.09.008.
387. Silveira, C.S. Diseases associated with bovine viral diarrhoea virus subtypes 1a and 2b in beef and dairy cattle in Uruguay / C.S. Silveira, L. Maya, M.L. Casaux [et al.] // *Braz. J. Microbiol.* - 2020. - Vol. 51 (1). - P. 357-368. doi: 10.1007/s42770-019-00170-7.
388. Silveira, S. Genetic Diversity of Brazilian Bovine Pestiviruses Detected Between 1995 and 2014 / S. Silveira, M.N. Weber, A.C. Mósena [et al.] // *Transbound. Emerg. Dis.* – 2017. - Vol. 64 (2). - P. 613–23. doi: 10.1111/tbed.12427.

389. Smith, F.L. Diarrhea outbreak associated with coronavirus infection in adult dairy goats / F.L. Smith, M.C. Heller, B.M. Crossley [et al.] // *J. Vet. Intern. Med.* – 2022. - Vol. 36. - P. 805–811. doi: 10.1111/jvim.16354.
390. Sobhy, N.M. Surveillance, isolation and complete genome sequence of bovine parainfluenza virus type 3 in Egyptian cattle / N.M. Sobhy, S.K. Mor, I.M. Bastawecy [et al.] // *Int. J. Vet. Sci. Med.* – 2017. - Vol. 5 (1). - P. 8-13. doi: 10.1016/j.ijvsm.2017.02.004.
391. Socha, W. Occurrence of bovine coronavirus and other major respiratory viruses in cattle in Poland / W. Socha, M. Larska, J. Rola [et al.] // *J. Vet. Res.* 2022. - Vol. 66. - P. 479–486. doi: 10.2478/jvetres-2022-005.
392. Soules, K.R. Bovine Coronavirus Infects the Respiratory Tract of Cattle Challenged Intranasally / K.R. Soules, M.C. Rahe, L. Purtle [et al.] // *Front. Vet. Sci.* - 2022. - Vol. 9: 878240. doi: 10.3389/fvets.2022.878240.
393. Sozzi, E. Cross-Reactivity Antibody Response after Vaccination with Modified Live and Killed Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVD) Vaccines / E. Sozzi, C. Righi, M. Boldini [et al.] // *Vaccines (Basel)*. - 2020. - Vol. 8 (3): 374. doi: 10.3390/vaccines8030374.
394. Spetter, M.J. Dual natural infection with bovine viral diarrhoea virus -1 and -2 in a stillborn calf: tissue distribution and molecular characterization / M.J. Spetter, E.L.L. Uriarte, E.A.G. Altamiranda [et al.] // *Open Vet. J.* – 2018. - Vol. 8 (4). – P. 493-497. doi: 10.4314/ovj.v8i4.23.
395. Ståhl, K. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from Peru and Chile / K. Ståhl, A. Benito, R. Felmer [et al.] // *Pesq. Vet. Bras.* – 2009. - Vol. 29. - P. 41–44. doi: 10.1590/S0100-736X2009000100006.
396. Ståhl, K. Natural infection of cattle with an atypical “HoBi”-like pestivirus—implications for BVD control and for the safety of biological products / K. Ståhl, J. Kampa, S. Alenius [et al.] // *Vet. Res.* – 2007. - Vol. 38. - P. 517–523. doi: 10.1051/vetres:2007012.

397. Stalder, H.P. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland / H.P. Stalder, P. Meier, G. Pfaffen [et al.] // *Prev. Vet. Med.* - 2005. - Vol. 72. - P. 37–41. doi: 10.1016/j.prevetmed.2005.01.020.
398. Su, A. Infection of polarized bovine respiratory epithelial cells by bovine viral diarrhea virus (BVDV) / A. Su, Y. Fu, J. Meens [et al.] // *Virulence.* – 2021. - Vol. 12 (1). - P. 177–187. doi: 10.1080/21505594.2020.1854539.
399. Sudaryatma, P.E. Bovine respiratory syncytial virus enhances the adherence of *Pasteurella multocida* to bovine lower respiratory tract epithelial cells by up-regulating the platelet-activating factor receptor / P.E. Sudaryatma, A. Saito, H. Mekata [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2020. - Vol. 11: 1676. - doi: 10.3389/fmicb.2020.01676.
400. Sudaryatma, P.E. Co-infection of epithelial cells established from the upper and lower bovine respiratory tract with bovine respiratory syncytial virus and bacteria / P.E. Sudaryatma, H. Mekata, M. Kubo [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2019. - Vol. 235. - P. 80-85. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.06.010.
401. Sullivan, D.G. A nested polymerase chain reaction assay to differentiate Pestiviruses / D.G. Sullivan, R.K. Akkina // *Virus Res.* - 1995. - Vol. 38. - P. 231–239. doi: 10.1016/0168-1702(95)00065-x.
402. Suminda, G.G.D. High-throughput sequencing technologies in the detection of livestock pathogens, diagnosis, and zoonotic surveillance / G.G.D. Suminda, S. Bhandari, Y. Won [et al.] // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* – 2022 (20). - P. 5378-5392. doi: 10.1016/j.csbj.2022.09.028.
403. Suzuki, T. Genomic characterization and phylogenetic classification of bovine coronaviruses through whole genome sequence analysis / T. Suzuki, Y. Otake, S. Uchimoto [et al.] // *Viruses.* – 2020. - Vol. 12 (2): 183. <https://www.mdpi.com/1999-4915/12/2/183>.
404. Szenci, O. Co-infection with bovine herpesvirus 4 and *Histophilus somni* significantly extends the service period in dairy cattle with purulent vaginal discharge / O. Szenci, G. Sassi, L. Fodor [et al.] // *Reproduction in Domestic Animals.* - 2016. - Vol. 51 (1). - P. 143–149. doi: 10.1111/rda.12658.

405. Tajima, M. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany / M. Tajima, H.R. Frey, O. Yamato [et al.] // *Virus Res.* – 2001. - Vol. 76 (1). - P. 31–42. doi: 10.1016/s0168-1702(01)00244-1.
406. Takiuchi, E. Improved detection of bovine coronavirus N gene in faeces of calves infected naturally by a semi-nested PCR assay and an internal control / E. Takiuchi, D.T. Stipp, A.F. Alfieri [et al.] // *J. Virol. Methods* 2006. - Vol. 131 (2). - P. 148–154. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.08.005.
407. Taylor, J.D. The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors? / J.D. Taylor // *Can. Vet. J.* – 2010. - Vol. 51(10). - P. 1095-1102.
408. Thompson, J.D. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice / J.D. Thompson, G.D. Higgins, T.J. Gibson // *Nucleic Acids Res.* - 1994. - Vol. 22 (22). - P. 4673-4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673.
409. Thonur, L. One-step multiplex real time RT-PCR for the detection of bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1 and bovine parainfluenza virus 3 / L. Thonur, M. Maley, J. Gilray [et al.] // *BMC Vet. Res.* - 2012. - Vol. 8. - P. 1746–6148. doi: 10.1186/1746-6148-8-37.
410. Timsit, E. Evaluation of a commercial real-time reverse transcription polymerase chain reaction kit for the diagnosis of Bovine respiratory syncytialvirus infection / E. Timsit, C. Maingourd, E. Le Dréan [et al.] // *J. Vet. Diagn. Invest.* - 2010. - Vol. 22 (2). - P. 238-241. doi: 10.1177/104063871002200211.
411. Timurkan, M.O. Increased genetic diversity of BVDV strains circulating in Eastern Anatolia, Turkey: first detection of BVDV-3 in Turkey / M.O. Timurkan, H. Aydın // *Trop. Anim. Health Prod.* – 2019. - Vol. 51 (7). - P. 1953-1961. doi: 10.1007/s11250-019-01901-6.
412. Toftaker, I. A cohort study of the effect of winter dysentery on herd-level milk production / I. Toftaker, I. Holmøy, A. Nødtvedt [et al.] // *J. Dairy Sci.* – 2017. – Vol. 100. - P. 6483–6493. doi: 10.3168/jds.2017-12605.

413. Toplak, I. Complete genome sequence of a bovine viral diarrhea virus sub-genotype 1e strain, SLO/2407/2006, isolated in Slovenia / I. Toplak, U. Kuhar, D. Kušar [et al.] // *Genome Announc.* - 2016. - Vol. 4 (6): e01310-16. doi: /10.1128/genomea.01310-16.
414. Genetic link to cattle diseases uncovered. *Science Daily / USDA/Agriculture Research Service.* 2011. <https://www.sciencedaily.com/releases/2011/09/110908104001.htm>
415. Valarcher, J.F. Evaluation of a nested reverse transcription- PCR assay based on the nucleoprotein gene for diagnosis of spontaneous and experimental bovine respiratory syncytial virus infections / J.F. Valarcher, H. Bourhy, J. Gelfi [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* - 1999. - Vol. 37. - P. 1858-1862. doi: 10.1128/JCM.37.6.1858-1862.1999.
416. Valarcher, J.F. *Viral Respiratory Infections in Cattle* / J.F. Valarcher, S. Hogghund // *World Buiatrics Congress.* - 2006, Nice, 15-19 October 2006.
417. Valarcher, J.F. Evolution of bovine respiratory syncytial virus / J.F. Valarcher, F. Schelcher, H. Bourhy // *J. Virol.* - 2000. - Vol. 74. - P. 10714–10728. doi: 10.1128/jvi.74.22.10714-10728.2000.
418. Valarcher, J.F. Bovine respiratory syncytial virus infection / J.F. Valarcher, G. Taylor // *Vet. Res.* - 2007. - Vol. 38. - P. 153–180. doi:10.1051/vetres:2006053.
419. Valentova, V. The antigenic and genetic variability of bovine respiratory syncytial virus with emphasis on the G protein / V. Valentova // *Vet. Med.* - 2003a. - Vol. 48 (9). - P. 254–266. doi: 10.17221/5778-VETMED.
420. Valentova, V. Detection of bovine respiratory syncytial virus in cell cultures by nested RT-PCR and use of the method for virus identification in clinical samples / V. Valentova, K. Kovarcik, I. Psikal // *Acta Vet. Brno.* - 2003b. - Vol. 72. - P. 115-122. doi: 10.2754/avb200372010115.
421. Vaucher, R.A. RT-PCR for detection of bovine parainfluenza virus type 3 (bPIV-3) / R.A. Vaucher, A.B. Simonetti, P.M. Roehe // *Acta Sci. Veterinarie.* - 2008. - Vol. 36 (3). - P. 215-220. doi: 10.22456/1679-9216.17288.

422. Verna, A.E. Genomic analysis of bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4) from Argentina: high genetic variability and novel phylogenetic groups / A.E. Verna, J.M. Manrique, S.E. Perez [et al.] // *Vet. Microbiol.* - 2012. - Vol. 160. – P. 1-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.04.039.
423. Vijayaraghavan, B. Evaluation of envelope glycoprotein E(rns) of an atypical bovine pestivirus as antigen in a microsphere immunoassay for the detection of antibodies against bovine viral diarrhoea virus 1 and atypical bovine Pestivirus / B. Vijayaraghavan, H. Xia, R. Harimoorthy [et al.] // *J. Virol. Methods.* - 2012. - Vol. 185 (2). - P. 193–198. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.06.017.
424. Vijgen, L. Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: Molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event / L. Vijgen, E. Keyaerts, E. Moes [et al.] // *J. Virol.* – 2005. - Vol. 79 (3). - P. 1595–1604. doi: 10.1128/JVI.79.3.1595-1604.2005.
425. Vilcek, S. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups / S. Vilcek, D.J. Paton, B. Durkovic [et al.] // *Arch. Virol.* - 2001. - Vol. 146 (1). - P. 99–115. doi: 10.1007/s007050170194.
426. Vilcek, S. Detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) genome by PCR / S. Vilcek // *J. Virol. Methods.* - 1993. – Vol. 41. – P. 245–247. doi: 10.1016/0166-0934(93)90132-b.
427. Vilcek, S. Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples / S. Vilcek, M. Elvander, A. Bllagi-Pordany [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* - 1994. - Vol. 32. - P. 2225-2231. doi: 10.1128/jcm.32.9.2225-2231.1994.
428. Vilcek, S. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis / S. Vilcek, A.J. Herring, J.A. Herring [et al.] // *Arch. Virol.* – 1994. – Vol. 136 (3-4). P. 309-23. doi: 10.1007/BF01321060.
429. Vlasova, A.N. Bovine coronavirus and the associated diseases / A.N. Vlasova, L.J. Saif // *Front. Vet. Sci.* – 2021. - Vol. 8: 643220. doi: 10.3389/fvets.2021.643220.

430. Vogel, F.S. Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2 (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation / F.S. Vogel, E.F. Flores, R. Weiblen [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2004. – Vol. 98. - P. 185-196. doi: 10.1016/j.vetmic.2003.09.020.
431. Waldeck, H.W.F. Risk Factors for Introduction of Bovine Herpesvirus 1 (BoHV-1) Into Cattle Herds: A Systematic European Literature Review / H.W.F. Waldeck H.W.F., L. van Duijn, K. van den Heuvel-van den Broek [et al.] // *Front. Vet. Sci.* 2021. - Vol. 8: 688935. doi: 10.3389/fvets.2021.688935.
432. Walker, P.J. ICTV: Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2022) / P.J. Walker, S.G. Siddell, E.J. Lefkowitz [et al.] // *Arch. Virol.* – 2022. - Vol. 11. - P. 2429–2440. doi: 10.1007/s00705-022-05516-5.
433. Walz, P.H. Bovine viral diarrhea virus: An updated American College of Veterinary Internal Medicine consensus statement with focus on virus biology, hosts, immunosuppression, and vaccination / P.H. Walz, M.F. Chamorro, S.M. Falkenberg [et al.] // *J. Vet. Intern. Med.* – 2020. - Vol. 34 (5). - P. 1690–1706. doi: 10.1111/jvim.15816.
434. Wang, F.-I. Structures and functions of Pestivirus glycoproteins: not simply surface matters / F.-I. Wang, M.-C. Deng, Y.-L. Huang [et al.] // *Viruses*. – 2015. - Vol. 7. - P. 3506-3529. doi: 10.3390/v7072783.
435. Weiskircher, E. Bovine viral diarrhea virus NS4B protein is an integral membrane protein associated with Golgi markers and rearranged host membranes / E. Weiskircher, J. Aligo, G. Ning [et al.] // *Virol. J.* – 2009. - Vol. 6: 185. doi: 10.1186/1743-422X-6-185.
436. Werid, G.M. An overview of the detection of bovine respiratory disease complex pathogens using immunohistochemistry: emerging trends and opportunities / G.M. Werid, D. Miller, F. Hemmatzadeh [et al.] // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2024. - 36 (1). – P 12-23. doi: 10.1177/10406387231210489.

437. Werid, G.M. Detection of Bovine Respiratory Syncytial Virus in Cattle: A Systematic Review and Meta-Analysis / G.M. Werid, A.K. Wubshet, T.T. Araya [et al.] // *Ruminants*. – 2024. - Vol. 4 (4). - P. 491-514. doi: 10.3390/ruminants4040035.
438. Wernike, K. “Fading out” - genomic epidemiology of the last persistently infected BVDV cattle in Germany / K. Wernike, F. Pfaff, M. Beer // *Front. Vet. Sci.* – 2024. - Vol. 10: 1339248. doi: 10.3389/fvets.2023.1339248.
439. Wernike, K. Development and validation of a triplex real-time PCR assay for the rapid detection and differentiation of wild-type and glycoprotein E-deleted vaccine strains of Bovine herpesvirus type 1 / K. Wernike, B. Hoffmann, D. Kalthoff [et al.] // *J. Virol. Methods*. – 2011. - Vol. 174 (1-2). - P. 77-84. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.03.028.
440. Woo, P.C.Y. ICTV Virus Taxonomy Profile: Coronaviridae 2023 / P.C.Y. Woo, R.J. De Groot, B. Haagmans [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2023. - Vol. 104: 001843. doi: 10.1099/jgv.0.001843.
441. Xia, H. Detection and identification of the atypical bovine pestiviruses in commercial foetal bovine serum batches / H. Xia, B. Vijayaraghavan, S. Belák [et al.] // *PLoS ONE*. – 2011. - Vol. 6 (12): e28553. doi: 10.1371/journal.pone.0028553.
442. Xia, J.Q. Detection of bovine herpesvirus 1 the semen of experimentally infected bulls by dot-blot hybridisation, polymrease chain reaction and virus isolation / J.Q. Xia, R.M. Lofstedt, C.V. Yason [et al.] // *Res. Vet. Sci.* - 1995a. - Vol. 59 (2). – P. 183-185. doi: 10.1016/0034-5288(95)90058-6.
443. Xia, J.Q. Comparison of dot blot hybridization, polymerase chain reaction, and virus isolation for detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in artificially infected bovine semen / J.Q. Xia, C.V. Yason, F.S. Kibenge // *Can. J. Vet. Res.* – 1995b. – Vol. 59. – P.102-109.
444. Xiao, Y. Prevalence and genetic characterization of bovine viral diarrhea virus in dairy cattle in northern China / Y. Xiao, Y. Liu, T. Chi, et al. // *BMC Vet. Res.* – 2025. - Vol. 21 (1): 250. doi: 10.1186/s12917-025-04491-8.

445. Xu, L. Identification of bovine coronavirus in a Daurian ground squirrel expands the host range of Betacoronavirus 1 / L. Xu, W. Liu, M. Bie [et al.] // *Virol. Sin.* – 2023. - Vol. 38 (2): 321-323. doi: 10.1016/j.virs.2023.02.002.
446. Yamamoto, S. Bovine respiratory syncytial virus enhances the attachment of *Trueperella pyogenes* to cells / S. Yamamoto, S. Okumura, R. Kobayashi [et al.] // 2024. – *J. Vet. Med. Sci.* - Vol. 86 (10). - P. 1068–1075. doi: 10.1292/jvms.24-0068.
447. Yamamoto, T. Genomic analyses of bovine viral diarrhea viruses isolated from cattle imported into Japan between 1991 and 2005 / T. Yamamoto, T. Kozasa, H. Aoki [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2008. - Vol. 127 (3-4). - P. 386–91. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.08.020.
448. Yamamoto, Y. Characterization of a bovine herpesvirus type 4 isolated from the spinal cord of a cow with astasia / Y. Yamamoto, K. Murakami, Y. Inoshima [et al.] // *Arch. Virol.* – 2000. - Vol. 145. - P. 2363–2370. doi: 10.1007/s007050070026.
449. Yan, L. Combination of reverse transcription real-time polymerase chain reaction and antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of animals persistently infected with Bovine viral diarrhea virus / L. Yan, S. Zhang, L. Pace [et al.] // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2011. - Vol. 23. - P. 16–25. doi: 10.1177/104063871102300103.
450. Yang, B. Primary replication and invasion of the bovine gammaherpesvirus BoHV-4 in the genital mucosae / B. Yang, Y. Li, O. Bogado Pascottini [et al.] // *Vet. Res.* - 2017. - Vol. 48: 83. doi: 10.1186/s13567-017-0489-3 32.
451. Yang, B. Gammaherpesvirus BoHV-4 infects bovine respiratory epithelial cells mainly at the basolateral side / B. Yang, J. Xie, J. Van Cleemput [et al.] // *Vet. Res.* - 2019. - Vol. 50: 11. doi: 10.1186/s13567-019-0629-z.
452. Yesibag, K. Seroprevalence of Bovine Respiratory Viruses in North-Western Turkey / K. Yesibag, B. Gungor // *Tropical Animal Health and Production.* - 2008. - Vol. 40. - P. 55-60. doi:10.1007/s11250-007-9053-x.

453. Yeşilbag, K. Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus / K. Yeşilbag, G. Alpay, P. Becher // *Viruses*. – 2017. - Vol. 9: 128. doi: 10.3390/v9060128.
454. Yilmaz, S.G. Brain invasion of bovine coronavirus: molecular analysis of bovine coronavirus infection in calves with severe pneumonia and neurological signs / S.G. Yilmaz, O. Aydin, H.E. Tali [et al.] // *J. Vet. Sci.* – 2024. - Vol. 25 (4): e45. doi: 10.4142/jvs.23261.
455. Young, N.J. Real-time RT-PCR detection of Bovine Viral Diarrhoea virus in whole blood using an external RNA reference / N.J. Young, C.J. Thomas, M.E. Collins [et al.] // *J. Virol. Methods*. – 2006. - Vol. 138. - P. 218–222. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.08.008.
456. Zhang, J. Development of a one-step multiplex real-time PCR assay for the detection of viral pathogens associated with the bovine respiratory disease complex / J. Zhang, W. Wang, M. Yang [et al.] // *Front. Vet. Sci.* – 2022. - Vol. 9: 825257. doi: 10.3389/fvets.2022.825257.
457. Zhang, K. Prevalence characteristic of BVDV in some largescale dairy farms in Western China / K. Zhang, J. Zhang, Z. Qiu [et al.] // *Front. Vet. Sci.* – 2022. - Vol. 9: 961337. doi: 10.3389/fvets.2022.961337.
458. Zhang, M.D. The nasal viromes of cattle on arrival at western Canadian feedlots and their relationship to development of bovine respiratory disease / M.D. Zhang, J.E. Hill, T.W. Alexander [et al.] // *Transbound. Emerg. Dis.* – 2021. - Vol. 68 (4). - P. 2209-2218. doi: 10.1111/tbed.13873.
459. Zhang, S. Molecular Diagnosis of Viral Respiratory Infections / S. Zhang, W. Zhang, Y.-W. Tang // *Curr. Infect. Dis. Rep.* – 2011. - Vol. 13 (2). - P. 149–158. doi: 10.1007/s11908-011-0168-x.
460. Zhang, S.Q. Comparison of conventional RT-PCR, reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification, and SYBR green I-based real-time RT-PCR in the rapid detection of bovine viral diarrhoea virus nucleotide in contaminated commercial bovine sera batches / S.Q. Zhang, B. Tan, P. Li [et al.] // *J. Virol. Methods*. – 2014. - Vol. 207. - P. 204–209. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.05.020.

461. Zhang, X.M. Biological and genetic characterization of a hemagglutinating coronavirus isolated from a diarrhoeic child / X.M. Zhang, W. Herbst, K.G. Kousoulas [et al.] // *J. Med. Virol.* – 1994. - Vol. 44 (2). - P. 152–161. doi: 10.1002/jmv.1890440207.
462. Zhang, F. Genetic characterization of bovine coronavirus strain isolated in Inner Mongolia of China / F. Zhang, C. Chai, R. Niu [et al.] // *BMC Vet. Res.* - 2024. - Vol. 20: 209. doi: 10.1186/s12917-024-04046-3.
463. Zhao, H. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR in Bovine PBMCs transformed and non-transformed by *Theileria annulata* / H. Zhao, J. Liu, Y. Li [et al.] // *Korean J. Parasitol.* – 2016. - Vol. 54 (1). - P. 39–46. doi: 10.3347/kjp.2016.54.1.39.
464. Zhou, Y. Phylogenetic analysis and characterization of bovine herpesvirus-1 in cattle of China, 2016–2019 / Y. Zhou, X. Li, Y. Ren [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution.* - 2020. – Vol. 85: 104416. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104416.
465. Zhu, Q. Epidemiological survey and genetic diversity of bovine coronavirus in Northeast China / Q. Zhu, M. Su, Z. Li [et al.] // *Virus Res.* – 2022. - Vol. 308: 198632. doi: 10.1016/j.virusres.2021.198632.
466. Zhu, Y.M. Isolation and genetic characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from cattle in China / Y.M. Zhu, H.F. Shi, Y.R. Gao [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2011. - Vol. 149 (3-4). - P. 446–451. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.11.011.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Патенты РФ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2798286

Способ выявления возбудителей респираторных инфекций крупного рогатого скота: BPIV, BRSV, BHV-4, BCoV, BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3, на основе мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН) (RU)*

Авторы: *Глотов Александр Гаврилович (RU), Нефедченко Алексей Васильевич (RU), Глотова Татьяна Ивановна (RU), Котенева Светлана Владимировна (RU)*

Заявка № **2022114969**

Приоритет изобретения **01 июня 2022 г.**

Дата государственной регистрации в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **21 июня 2023 г.**

Срок действия исключительного права на изобретение истекает **01 июня 2042 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2768753

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

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский федеральный научный центр агrobiотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН) (RU)*

Авторы: *Нефедченко Алексей Васильевич (RU), Глотов Александр Гаврилович (RU), Глотова Татьяна Ивановна (RU), Котенева Светлана Владимировна (RU)*

Заявка № 2020125439

Приоритет изобретения 22 июля 2020 г.

Дата государственной регистрации

в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 24 марта 2022 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 22 июля 2040 г.

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат 68b80077e14e4010a94edbd24145d5c7
Владелец **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 20.03.2022 по 26.05.2023

Ю.С. Зубов



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2731716

**Набор для дифференциации пестивирусов крупного
рогатого скота и способ дифференциации пестивирусов
крупного рогатого скота**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Сибирский федеральный научный центр
агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН)*
(RU)

Авторы: *Нефедченко Алексей Васильевич (RU), Глотов
Александр Гаврилович (RU), Глотова Татьяна Ивановна
(RU), Котенева Светлана Владимировна (RU)*

Заявка № 2019134978

Приоритет изобретения 30 октября 2019 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 08 сентября 2020 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 30 октября 2039 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ильев



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2700750

Набор олигонуклеотидных праймеров и зонда для выявления вируса герпеса крупного рогатого скота 4-го типа (BHV-4) в пробах биоматериала

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН) (RU)*

Авторы: *Нефедченко Алексей Васильевич (RU), Глотова Татьяна Ивановна (RU), Глов Александр Гаврилович (RU), Котенева Светлана Владимировна (RU)*

Заявка № 2018137753

Приоритет изобретения 25 октября 2018 г.

Дата государственной регистрации в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 19 сентября 2019 г.

Срок действия исключительного права на изобретение истекает 25 октября 2038 г.

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2607025

**Синтетические олигонуклеотидные праймеры и способ
выявления РНК атипичного пестивируса крупного рогатого
скота**

Патентообладатели: *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН) (RU), Федеральное бюджетное учреждение науки "Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" (ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор") (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2016120164

Приоритет изобретения 24 мая 2016 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 10 января 2017 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 24 мая 2036 г.

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Г.П. Ивлиев



Приложение Б

ТУ и инструкции на тест-системы

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

УТВЕРЖДАЮ:
Директор СФНЦА РАН
К.С. Голохваст

« 14 » сентября 2023 г.

**ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
РЕСПИРАТОРНОГО КОМПЛЕКСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ
РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**


ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ
ТУ 9388-004-05095834-2023

Срок введения с _____ 200 г.

2023

Продолжение титульного листа ТУ


Зав. лабораторией биотехнологии-
диагностический центр СФНЦА РАН

 А.Г. ГЛОТОВ
«14» сентября 2023 г.


Главный научный сотрудник лаборатории
биотехнологии-диагностический центр
СФНЦА РАН

 Т.И. ГЛОТОВА
«14» сентября 2023 г.

Старший научный сотрудник лаборатории
биотехнологии-диагностический центр
СФНЦА РАН

 С.В. КОТЕНЕВА
«14» сентября 2023 г.

Старший научный сотрудник лаборатории
биотехнологии-диагностический центр
СФНЦА РАН

 А.В. НЕФЕДЧЕНКО
«14» сентября 2023 г.

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
 НАУКИ СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
 АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

«УТВЕРЖДАЮ»
 директор СФНЦА РАН
 К.С. Голохваст
 "14"  2023 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению тест-системы для выявления возбудителей респираторного комплекса крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
 (организация-производитель СФНЦА РАН,
 п. Краснообск, Новосибирская обл.)

I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Тест система предназначена для выявления вирусов вирусной диареи – болезни слизистых оболочек КРС 1-3 генотипов (*Bovine viral diarrhea virus*, BVDV1, BVDV2, BVDV3), вируса респираторно-синцитиальной инфекции КРС (*Bovine respiratory syncytial virus*, BRSV), вируса инфекционного ринотрахеита КРС (*Bovine herpesvirus-1*, BHV-1), коронавируса КРС (*Bovine coronavirus*, BCoV), вируса парагриппа-3 КРС (*Bovine parainfluenza virus 3*, BPIV), вируса герпеса 4-го типа КРС (*Bovine herpesvirus-4*, BHV-4). В состав тест-системы рассчитанной на проведение 50 анализов, включая контрольные пробы, входят:

- Комплект для выделения РНК;
- Комплект для получения кДНК;
- Комплект для проведения ПЦР-амплификации участка кДНК;
- Комплект контрольных образцов.

Комплект для выделения РНК состоит из следующих компонентов:

лизирующий раствор	1 флакон, 15,0 см ³
раствор для преципитации	1 флакон, 20,0 см ³
раствор для отмывки 3	1 флакон, 25,0 см ³
раствор для отмывки 4	1 флакон, 10,0 см ³
РНК-буфер	4 пробирки по 1,2 см ³

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

УТВЕРЖДАЮ:
Директор СФНЦА РАН
 К.С. Голохваст
«14»  2023 г.

**ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА РЕСПИРАТОРНО
СИНЦИТИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ
РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**


ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ
ТУ 9388-004-05095833-2023

Срок введения с _____ 200 г.

2023

Продолжение титульного листа ТУ

Зав. лабораторией биотехнологии-
диагностический центр СФНЦА РАН



А.Г. ГЛОТОВ
«14» сентября 2023 г.

Главный научный сотрудник лаборатории
биотехнологии-диагностический центр


СФНЦА РАН

Т.И. ГЛОТОВА
«14» сентября 2023 г.

Старший научный сотрудник лаборатории
биотехнологии-диагностический центр

СФНЦА РАН

С.В. КОТЕНЕВА
«14» сентября 2023 г.

Старший научный сотрудник лаборатории
биотехнологии-диагностический центр

СФНЦА РАН

А.В. НЕФЕДЧЕНКО
«14» сентября 2023 г.

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
 НАУКИ СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
 АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

«УТВЕРЖДАЮ»
 директор СФНЦА РАН
 К.С. Голохваст
 "14" сентября 2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению тест-системы для выявления вируса респираторно синцитиальной
 инфекции крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции
 в режиме реального времени
 (организация-производитель СФНЦА РАН,
 п. Краснообск, Новосибирская обл.)

I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. В состав тест-системы для выявления вируса респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции, рассчитанного на проведение 50 анализов, включая контрольные пробы, входят:

- Комплект для выделения РНК;
- Комплект для получения кДНК;
- Комплект для проведения ПЦР-амплификации участка кДНК;
- Комплект контрольных образцов.

Комплект для выделения РНК состоит из следующих компонентов:

лизирующий раствор	1 флакон, 15,0 см ³
раствор для преципитации	1 флакон, 20,0 см ³
раствор для отмывки 3	1 флакон, 25,0 см ³
раствор для отмывки 4	1 флакон, 10,0 см ³
РНК-буфер	4 пробирки по 1,2 см ³

Комплект для получения кДНК состоит из следующих компонентов:

Буфер для обратной транскрипции	1 пробирка, 0,475 см ³
Праймеры для обратной транскрипции	1 пробирка, 0,025 см ³
Ревертаза (M-MLV – обратная транскриптаза)	1 пробирка, 0,025 см ³
ДНК-буфер	1 пробирка, 1,0 см ³

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

УТВЕРЖДАЮ:
Директор СФНЦА РАН
 К.С. Голохваст
«14» 2023 г.

**ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ
ПЕСТИВИРУСОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО
ВРЕМЕНИ**

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ
ТУ 9388-004-05095835-2023

Срок введения с _____ 200 г.

2023

Продолжение титульного листа ТУ


Зав. лабораторией биотехнологии-
диагностический центр СФНЦА РАН

 А.Г. ГЛОТОВ
«14» сентября 2023 г.


Главный научный сотрудник лаборатории
биотехнологии-диагностический центр

СФНЦА РАН
 Т.И. ГЛЮТОВА
«14» сентября 2023 г.

Старший научный сотрудник лаборатории
биотехнологии-диагностический центр

СФНЦА РАН
 С.В. КОТЕНЕВА
«14» сентября 2023 г.

Старший научный сотрудник лаборатории
биотехнологии-диагностический центр

СФНЦА РАН
 А.В. НЕФЕДЧЕНКО
«14» сентября 2023 г.

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
 НАУКИ СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
 АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК



ИНСТРУКЦИЯ
 по применению тест-системы для выявления и дифференциации пестивирусов
 крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции
 в режиме реального времени
 (организация-производитель СФНЦА РАН,
 п. Краснообск, Новосибирская обл.)

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. В состав тест-системы для выявления и дифференциации пестивирусов крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции, рассчитанного на проведение 50 анализов, включая контрольные пробы, входят:

- Комплект для выделения РНК;
- Комплект для получения кДНК;
- Комплект для проведения ПЦР-амплификации участка кДНК;
- Комплект контрольных образцов.

Комплект для выделения РНК состоит из следующих компонентов:

лизирующий раствор	1 флакон, 15,0 см ³
раствор для преципитации	1 флакон, 20,0 см ³
раствор для отмывки 3	1 флакон, 25,0 см ³
раствор для отмывки 4	1 флакон, 10,0 см ³
РНК-буфер	4 пробирки по 1,2 см ³

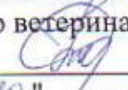
Комплект для получения кДНК состоит из следующих компонентов:

Буфер для обратной транскрипции	1 пробирка, 0,475 см ³
Праймеры для обратной транскрипции	1 пробирка, 0,025 см ³
Ревертаза (M-MLV – обратная транскриптаза)	1 пробирка, 0,025 см ³
ДНК-буфер	1 пробирка, 1,0 см ³

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(СФНЦА РАН)

УТВЕРЖДАЮ
Временно исполняющий
обязанности директора
СФНЦА РАН, академик

Н.А. Кашечиков
"20" ноября 2017 г.

СОГЛАСОВАНО
Руководитель ИЭВСиДВ,
д-р ветеринар. наук

Н.А. Донченко
"20" ноября 2017 г.

СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ

**на изготовление и контроль тест-системы для выявления
атипичного пестивируса крупного рогатого скота методом
полимеразной цепной реакции**



«УТВЕРЖДАЮ»
 ВРИО директора СФНЦА РАН
 Н.И. Кашеваров
 20 ноября 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению тест-системы для выявления атипичного пестивируса крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции
 (организация-производитель СФНЦА РАН,
 п. Краснообск, Новосибирская обл.)

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. В состав тест-системы для выявления атипичного пестивируса крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции, рассчитанного на проведение 50 анализов, включая контрольные пробы, входят:

- Комплект для выделения РНК;
- Комплект для получения кДНК;
- Комплект для проведения ПЦР-амплификации участка кДНК;
- Комплект для электрофоретического анализа продуктов ПЦР;
- Комплект контрольных образцов.

Комплект для выделения РНК состоит из следующих компонентов:

лизирующий раствор	1 флакон, 15,0 см ³
раствор для преципитации	1 флакон, 20,0 см ³
раствор для отмывки 3	1 флакон, 25,0 см ³
раствор для отмывки 4	1 флакон, 10,0 см ³
РНК-буфер	4 пробирки по 1,2 см ³

Комплект для получения кДНК состоит из следующих компонентов:

Буфер для обратной транскрипции	1 пробирка, 0,475 см ³
Праймеры для обратной транскрипции	1 пробирка, 0,025 см ³
Ревертаза (M-MLV – обратная транскриптаза)	1 пробирка, 0,025 см ³
ДНК-буфер	1 пробирка, 1,0 см ³

Комплект для проведения ПЦР-амплификации участка кДНК состоит из следующих компонентов:

ПЦР-буфер	1 пробирка, 0,150 см ³
MgCl ₂	1 пробирка, 0,05 см ³
dNTP-mix	1 пробирка, 0,125 см ³
Праймер Н1	1 пробирка, 0,05 см ³

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

УТВЕРЖДАЮ:
Директор СФНЦА РАН
К.С. Голохваст
« 14 »  2023 г.

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕРПЕСВИРУСА КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА 4-ГО ТИПА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ


ТУ 9388-004-05095832-2023

Срок введения с _____ 20 г.

2023

Продолжение титульного листа ТУ

Зав. лабораторией биотехнологии-
диагностический центр СФНЦА РАН



А.Г. ГЛОТОВ
«14» сентября 2023 г.

Главный научный сотрудник лаборатории
биотехнологии-диагностический центр


СФНЦА РАН

Т.И. ГЛОТОВА
«14» сентября 2023 г.

Старший научный сотрудник лаборатории
биотехнологии-диагностический центр

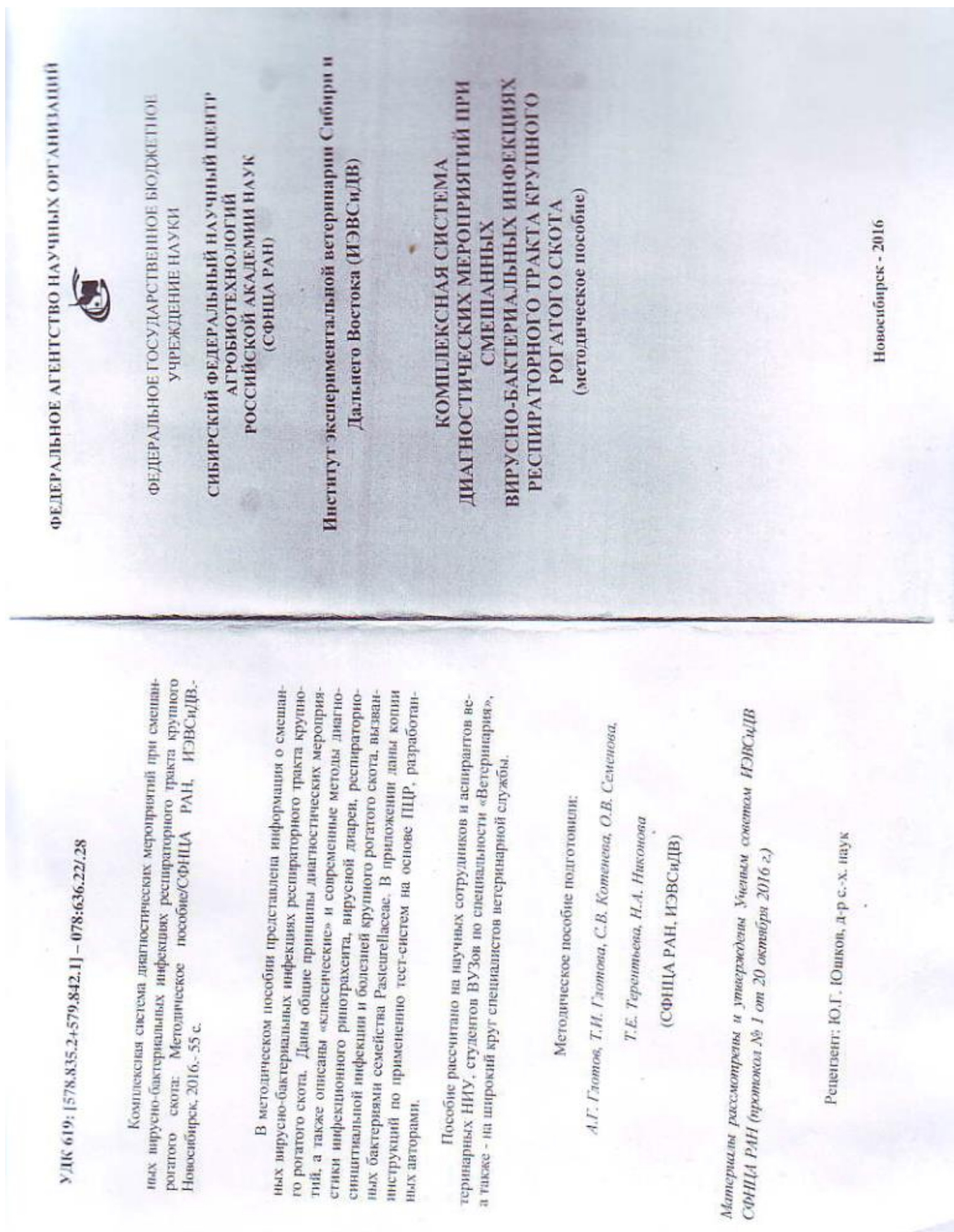
СФНЦА РАН

С.В. КОТЕНЕВА
«14» сентября 2023 г.

Старший научный сотрудник лаборатории
биотехнологии-диагностический центр

СФНЦА РАН

А.В. НЕФЕДЧЕНКО
«14» сентября 2023 г.

Приложение В

Методические рекомендации



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(СФНЦА РАН)

Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и
Дальнего Востока (ИЭВСиДВ)

КОМПЛЕКСНАЯ СИСТЕМА
ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ ПРИ
СМЕШАННЫХ
ВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЯХ
РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА
(методическое пособие)

Новосибирск - 2016

УДК 619: [578.835.2+579.842.1] – 078:636.22/28

Комплексная система диагностических мероприятий при смешанных вирусно-бактериальных инфекциях респираторного тракта крупного рогатого скота: Методическое пособие/СФНЦА РАН, ИЭВСиДВ. Новосибирск, 2016. - 55 с.

В методическом пособии представлены информация о смешанных вирусно-бактериальных инфекциях респираторного тракта крупного рогатого скота. Даны общие принципы диагностических мероприятий, а также описаны «классические» и современные методы диагностики инфекционного ринотрахеита, вирусной диарей, респираторно-синцитиальной инфекции и болезни крупного рогатого скота, вызванных бактериями семейства Pasteurellaceae. В приложении даны копии инструкций по применению тест-систем на основе ПЦР, разработанных авторами.

Пособие рассчитано на научных сотрудников и аспирантов ветеринарных НИУ, студентов ВУЗов по специальности «Ветеринария», а также - на широкий круг специалистов ветеринарной службы.

Методическое пособие подготовили:

А.Г. Глатов, Т.И. Глотова, С.В. Котенова, О.В. Семанова,

Т.Е. Терентьева, Н.А. Никонова

(СФНЦА РАН, ИЭВСиДВ)

*Материалы рассмотрены и утверждены Ученым советом ИЭВСиДВ
СФНЦА РАН (протокол № 1 от 20 октября 2016 г.)*

Рецензент: Ю.Г. Юшков, д-р с.-х. наук

УДК 619:578.835.2+579.842.1
ББК 48.731.311-6
С 40

С 40 Система диагностических мероприятий при основных экономически значимых вирусно-бактериальных инфекциях крупного рогатого скота: методическое пособие / А.Г. Глозов, Т.И. Глотова, А.В. Нефедченко, С.В. Котенева; СФНЦА РАН. – Новосибирск: СФНЦА РАН, 2020. – 64 с.

Рецензенты:

член-корреспондент РАН *К.А. Лайшев*,
доктор сельскохозяйственных наук *Ю.Г. Юшков*

Рассмотрено и рекомендовано к печати
экспертной комиссией СФНЦА РАН
(протокол № 5 от 25.11.2020)

ISBN 978-5-6044505-4-3

В методическом пособии представлена информация об основных, имеющих экономическое значение для современного животноводства, вирусных и бактериальных инфекциях крупного рогатого скота. Даны общие принципы их диагностики. Описаны классические и современные методы диагностики инфекционного ринотрахеита, вирусной диarei, респираторно-синцитиальной инфекции и пастереллеза крупного рогатого скота. В приложении даны копии титульных листов инструкций и технических условий по применению тест-систем на основе ПЦР, разработанных авторами.

Пособие рассчитано на научных сотрудников и аспирантов ветеринарных НИУ, студентов вузов по специальности «Ветеринария», а также на широкий круг специалистов ветеринарной службы.

УДК619:578.835.2+579.842.1
ББК 48.731.311-6

ISBN 978-5-6044505-4-3

©СФНЦА РАН

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

**СИСТЕМА
ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ
ПРИ ОСНОВНЫХ ЭКОНОМИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ
ВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНЫХ
ИНФЕКЦИЯХ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

Методическое пособие

Новосибирск 2020