

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР
КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ»
(ФГБУ «ВГНКИ»)

На правах рукописи

ЯЦЕНТЮК СВЕТЛАНА ПЕТРОВНА

**БИОБЕЗОПАСНОСТЬ СПЕРМОПРОДУКЦИИ БЫКОВ-
ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И
СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ**

4.2.2 – санитария, гигиена, экология, ветеринарно-санитарная экспертиза и
биобезопасность

4.2.3 – инфекционные болезни и иммунология животных

Диссертация

на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научный консультант:
Доктор биологических наук
Капустин Андрей Владимирович

Москва–2024

Оглавление

1	ВВЕДЕНИЕ.....	5
2	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
2.1	Общие сведения об использовании искусственного осеменения в современном животноводстве	17
2.2	Современное состояние рынка спермопродукции	19
2.3	Риски использования технологии искусственного осеменения	20
2.4	Инфекционные агенты, выявляемые в племенном материале КРС	21
2.4.1	Общие сведения	21
2.4.2	Герпесвирусы КРС	23
2.4.3	Вирус диареи КРС	35
2.4.4	Вирус Шмалленберг	41
2.4.5	Вирус Блютанга	45
2.4.6	Микоплазмы и уреоплазмы КРС	48
2.4.7	Кампилобактерии	57
2.4.8	Бруцеллы	61
2.4.9	Хламидии	64
2.4.10	Лептоспиры	68
2.4.11	Коксии	71
2.4.12	Гистофилы <i>Histophilus somni</i>	75
2.5	Использование молекулярно-генетических методик и ПЦР-тест-систем при выявлении инфекционных агентов в сперме	81
2.6	Требования к спермопродукции в разных странах	90
2.7	Заключение к обзору литературы	91
3	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	94
3.1	Биологический материал, использованный в работе	94
3.2	Реактивы, препараты, среды и наборы реагентов	94
3.3	Оборудование для молекулярно-генетических исследований	100
3.4	Микробиологические исследования	101
3.5	Вирусологические исследования	102
3.6	Экстракция нуклеиновых кислот и обратная транскрипция	103
3.7	Подбор праймеров и зондов для ПЦР	103
3.8	Проведение ПЦР	104
3.9	Определение нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК методом капиллярного электрофореза (по Сенгеру)	105

3.10	Получение положительных контрольных образцов.....	106
3.11	Проведение секвенирования «нового поколения»	106
3.12	Математические расчеты	108
4	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	110
4.1	Анализ современного состояния контроля биобезопасности племенного материала.....	110
4.2	Оценка возможности использования ПЦР-тест-систем, предназначенных для диагностики болезней КРС, для тестирования спермопродукции	114
4.3	Скрининговое исследование спермы быков для выявления вирусных инфекционных агентов	122
4.4	Вирусологическое исследование образцов спермы КРС.....	123
4.5	Поиск новых вирусных контаминантов спермы быков	125
4.6	Разработка способа выявления ДНК BHV-6 в сперме быков методом ПЦР в режиме «реального времени».....	128
4.7	Скрининговое исследование спермы быков для выявления бактериальных инфекционных агентов	131
4.7.1	Результаты выявления <i>Campylobacter spp.</i>	132
4.7.2	Выявление <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Proteus spp.</i>	132
4.7.3	Выявление <i>Coxiella burnetii</i>	133
4.7.4	Выявление <i>Histophilus somni</i>	134
4.8	Разработка методики выявления ДНК <i>H. somni</i> на основе ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».....	135
4.9	Изучение свойств культур <i>H. somni</i> , выделенных из различного биологического материала	140
4.10	Выявление генов устойчивости к антибиотикам изолятов <i>H. somni</i> ..	142
4.11	Сравнительный анализ полных геномов изолятов <i>H. somni</i>	148
4.12	Выявление микроорганизмов рода <i>Mycoplasma</i>	156
4.13	Разработка методик выявления ДНК <i>Mycoplasma bovis</i> , <i>M. californicum</i> , <i>M. bovis genitalium</i> и <i>Ureaplasma diversum</i> на основе ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».....	158
4.14	Определение жизнеспособности микоплазм	167
4.15	Изучение метагенома образцов спермы быков	168

5 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	178
6 ЗАКЛЮЧЕНИЕ	192
7 РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	198
8 ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	201
9 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	204
10 ПРИЛОЖЕНИЯ	280

1 ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Целями Стратегии развития агропромышленного комплекса Российской Федерации на период до 2030 года, утвержденной распоряжением Правительства Российской Федерации от 8 сентября 2022 г. № 2567-р, является обеспечение долгосрочного и перспективного развития, импортозамещения критически важной продукции и усиление продовольственной безопасности [67]. Разработчиками документа подчеркивается, что в современных условиях достижение целей Стратегии сопряжено с рисками и угрозами, немаловажную роль среди которых играют ветеринарные риски, связанные с возникновением и распространением ранее не регистрировавшихся на территории Российской Федерации заразных болезней животных, и биологические угрозы, возникающие вследствие нарушения обязательных требований к обеспечению безопасности и качества продукции на всех стадиях ее оборота на потребительском рынке.

Среди сельскохозяйственной продукции особое место занимает племенная продукция – семя быков-производителей, используемое для воспроизводства поголовья крупного рогатого скота. Кριοконсервированная сперма быков производится внутри страны на племенных предприятиях, а также весьма активно импортируется на территорию России [2, 9]. При этом даже в условиях санкционного давления объемы поставок спермопродукции не снижаются: так, в 2020 году ввезено 4 492 тыс. доз, а в первом квартале 2023 года – более 1 235 тыс. доз.

Основным недостатком использования технологии искусственного осеменения является потенциальное распространение инфекционных и генетических заболеваний. В отношении оценки качества и безопасности спермы быков в Российской Федерации действуют межгосударственные стандарты ГОСТ 26030-2015 (в отношении замороженной спермы быков) и ГОСТ 33955-2016 (в отношении замороженной спермы быков, разделенной по полу) [31-32] Однако, данные стандарты не лишены недостатков. Так, они не позволяют выявлять загрязнение спермы вирусами и микоплазмами, кроме того, стандарты не являются

обязательными, в связи с чем качество импортируемой и производимой спермы контролируется на добровольной основе.

Для спермы быков-производителей, ввозимой на территорию Российской Федерации, действуют требования Решения Комиссии Таможенного союза от 18 июня 2010 года № 317 «О применении ветеринарно-санитарных мер в Евразийском Экономическом Союзе». Согласно данному документу к ввозу на таможенную территорию Евразийского экономического союза и (или) перемещению между государствами-членами допускается сперма быков-производителей, собранная, обработанная и транспортируемая в соответствии с рекомендациями Кодекса здоровья наземных животных Всемирной организации здоровья животных [50, 87]. При этом контроль соблюдения требований качества и безопасности непосредственно самой спермопродукции не предусмотрен, а положение об отсутствии в ввозимой сперме патогенных и токсикогенных микроорганизмов, присутствовавшее в ранних версиях документа, было исключено.

Риски, связанные с инфекционными агентами в криоконсервированной сперме, изучаются исследователями в разных странах, и случаи заноса со спермой патогенов были неоднократно зафиксированы [256, 606; 376, 551]. Авторы публикаций отмечают, что даже при соблюдении рекомендаций Кодекса здоровья наземных животных Всемирной организации здоровья животных особенности инфекционных агентов, частота и способ отбора проб, качество лабораторных испытаний и используемые методы анализа оказывают значительное влияние на получаемый результат исследования [68, 433, 501, 606].

Изменяющиеся свойства циркулирующих штаммов инфекционных агентов, состояние здоровья животных в условиях интенсивного животноводства наряду с изменением действенности используемых мер борьбы с болезнями и коррективами на рынке спермопродукции для искусственного осеменения делает актуальным пересмотр и совершенствование средств и методов контроля биологической безопасности племенного материала.

Степень разработанности темы. Вопросам контроля племенного материала посвящены работы как отечественных, так и зарубежных авторов [1, 3,

12, 15, 38, 68, 78, 79, 93,95, 322, 551и др]. Отечественные специалисты при оценке качества и безопасности спермы быков-производителей основное внимание уделяли морфофункциональным особенностям половых клеток [9, 2, 4, 40, 41; 48]. В последние годы происходит внедрение молекулярно-генетических технологий во все сферы племенного животноводства. Так, выросло число работ, посвященных выявлению генетических аномалий крупного рогатого скота и подтверждению происхождения племенных животных, где в качестве исследуемого материала используется, в том числе, спермопродукция [9, 44, 101]. При этом проблеме выявления в спермопродукции возбудителей инфекционных болезней крупного рогатого скота уделяется все еще недостаточно внимания. Традиционно при тестировании спермопродукции используются культуральные методы [9-10, 38], в последнее время все больше исследователей используют методы амплификации нуклеиновых кислот для детекции генетического материала бактерий и вирусов [1, 62]. Опубликованные работы посвящены выявлению в сперме быков отдельных инфекционных патогенов и не носят системный характер, что не позволяет комплексно оценить состояние биологической безопасности спермопродукции.

Целью данной работы является совершенствование средств и методов контроля биологической безопасности племенного материала, используемого для искусственного осеменения, для снижения риска распространения инфекционных заболеваний среди крупного рогатого скота.

Для достижения указанной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Проанализировать современное состояние мер, используемых для поддержания биобезопасности продукции, используемой для искусственного осеменения.
2. Охарактеризовать встречаемость инфекционных агентов в спермопродукции отечественных и иностранных племенных центров с использованием молекулярно-генетических методов.
3. Разработать и определить аналитические характеристики методик на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального

времени» для выявления герпеса купного рогатого скота 6 типа, детекции патогенных микоплазм *Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. californicum*, а также *Ureaplasma diversum* и *Histophilus somni* в спермопродукции и биологическом материале.

4. Оценить сохранение жизнеспособности выявляемых в сперме быков вирусов герпеса КРС, микоплазм и *H. somni*, изучить молекулярно-генетические характеристики выделенных из спермы изолятов *H. somni* и риски, связанные с передачей *H. somni* через сперму быков.
5. Определить состав микробиома спермы быков отечественных и иностранных племенных центров и возможности использования метагеномных данных для оценки качества спермопродукции.
6. Сформулировать на основании полученных результатов предложения по совершенствованию системы обеспечения биобезопасности спермопродукции.

Научная новизна работы состоит в том, что:

При выполнении данной работы предложены оригинальные методики на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» для тестирования спермопродукции и биологического материала КРС на наличие *H. somni*, *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. californicum*, *U. diversum*, вируса герпеса КРС 6 типа.

С использованием ПЦР-тест-систем и разработанных методик впервые изучена встречаемость 25 инфекционных агентов в образцах спермопродукции КРС отечественного и зарубежного происхождения.

Впервые показаны случаи одновременной детекции генетического материала нескольких микоплазм в сперме быков, изучена частота выявления в спермопродукции видов *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. californicum* и *U. diversum* и их сочетаний.

Впервые определены и охарактеризованы полные последовательности геномов изолятов *H. somni*, выделенных на территории Российской Федерации, в том числе из образцов импортированной спермопродукции.

Впервые в России проведено изучение антибиотикорезистентности изолятов *H. somni* с использованием фенотипических и генотипических методов, разработаны и валидированы методики детекции генов *strA*, *strB* и *sul2*, детерминирующих устойчивость *H. somni* к аминогликозидам и сульфаниламидам.

Впервые в России проведены метагеномные исследования образцов спермы быков из отечественных и иностранных племенных, оценены индексы видового разнообразия, представленность типов, классов, отдельных родов и видов бактерий.

Теоретическая и практическая значимость проведённых исследований.

Аналитический материал и предложения, разработанные по результатам диссертационной работы, были использованы при подготовке Решения о Комплексе совместных действий государств-участников СНГ по обеспечению биологической безопасности генетического материала при воспроизводстве сельскохозяйственных животных на период до 2026 года, утвержденного Советом глав правительств Содружества Независимых Государств 20.05.2022 (Приложение Б).

На основании результатов диссертационной работы подготовлены предложения в проект документа «Правила и нормы в области племенного животноводства. Регламент и технология работы организаций по искусственному осеменению и региональных предприятий по хранению и реализации семени быков-производителей».

Рассмотрены и утверждены на заседании секции Зоотехния и ветеринария Отделения сельскохозяйственных наук РАН Методические рекомендации «Методика выявления и дифференциации *Mycoplasma bovis* и *Mycoplasma californicum* на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации» (08.08.2017) (Приложение И).

Подготовлены, рассмотрены и утверждены на секции Зоотехния и ветеринария Отделения сельскохозяйственных наук РАН «Методические рекомендации по оздоровлению отечественных скотоводческих хозяйств, неблагополучных по инфекционным заболеваниям, вызванным антибиотикорезистентными штаммами бактерий (молекулярно-генетический метод выявления гистофилеза крупного рогатого скота и способ его лечения)» (15.10.2021) (Приложение К).

Результаты проведенных исследований были использованы при подготовке ГОСТ Р 70150-2022 «Тест-системы для диагностики болезней животных методом полимеразной цепной реакции Общие требования и методы испытаний» (Приложение В) и редакции ГОСТ 32198-2013 «Средства воспроизводства. Сперма. Методы микробиологического анализа».

На основании проведенных исследований утверждены, включены в область аккредитации Испытательного центра ФГБУ «ВГНКИ» (Приложение Н) и используются при проведении лабораторных исследований биологического материала и спермопродукции:

- Методика по выявлению и дифференциации *Mycoplasma bovis* и *Mycoplasma californicum* на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации» (16.02.2018) (Приложение П);

- Методика выявления ДНК *Ureaplasma diversum* на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации (09.06.2018) (Приложение Р);

- Методика выявления ДНК *Mycoplasma bovis* на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации (09.06.2018) (Приложение С);

- Методика выявления генома вируса болезни Шмалленберг на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации (28.11.2018) (Приложение Т);

- Методика идентификации и типирования изолятов возбудителя гемофилеза крупного рогатого скота *Histophilus somni* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации (25.11.2019) (Приложение У).

Методика переведена в формат тест-системы. Разработан и рассмотрен на заседании научно-технического совета Россельхознадзора (15.12.2019) комплект нормативной документации (СТО и инструкция по применению) на Тест-систему для идентификации и типирования изолятов возбудителя гемофилеза крупного рогатого скота *Histophilus somni* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» (Приложения Л, М).

Получены патенты РФ:

- № 2657609 (14.06.2018) на способ определения индекса фрагментации ДНК сперматозоидов у животных-производителей (Приложение Г);

-№ 2752893 (11.08.2021) на набор олигонуклеотидов и способ идентификации и детекции ДНК бактерии *Histophilus somni* методом ПЦР в режиме реального времени (ПриложениеД);

-№2770204 (14.04.2022) на способ идентификации ДНК бактерии *Ureaplasma diversum* в сперме крупного рогатого скота методом ПЦР в режиме реального времени (Приложение Е);

- № 2787048 (28.12.2022) на способ детекции ДНК вируса герпеса КРС 6 типа в биологическом материале крупного рогатого скота методом ПЦР в режиме реального времени (Приложение Ж).

Материалы диссертационной работы использованы при подготовке программ обучения студентов кафедры «Биологическая безопасность объектов ветеринарного надзора и обращения лекарственных средств в ветеринарии» ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И.Скрябина» (Приложение Ф).

Материалы диссертационной работы использованы при обучении ветеринарных специалистов по программе повышения квалификации «ПЦР-диагностика инфекционных болезней животных», реализуемой отделом «Научно-методический базовый центр» ФГБУ «ВГНКИ».

Материалы работы использованы при разработке программы подготовки научных и научно-педагогических кадров в аспирантуре ФГБУ «ВГНКИ» «Современные методы лабораторной диагностики бактериальных болезней животных» (группа научных специальностей 4.2 «Зоотехния и ветеринария») (22.12.2022) (Приложение X).

Методология и методы исследований. Теоретические исследования, проведенные в работе, основываются на современных представлениях о возбудителях инфекционных болезней, их передаче при искусственном осеменении, биологических особенностях и способах детекции в различных типах материала животных. Методологический подход включал анализ накопленных литературных данных, систематизацию и обобщение полученных результатов исследования. Объектом исследования являлась биобезопасность спермопродукции, предметом – инфекционные агенты, загрязняющие спермопродукцию, и методы контроля качества и безопасности племенного материала. В экспериментальной части работы использованы молекулярно-генетические (выделение нуклеиновых кислот, ПЦР и ОТ-ПЦР с различными форматами детекции продуктов амплификации, секвенирование по Сенгеру и «нового поколения»), микробиологические (выделение микоплазм и изучение свойств *Histophilus somni*), вирусологические (культивирование вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота) и биоинформатические методы анализа со статистической обработкой полученных данных.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Результаты анализа нормативно-правовой базы, регулирующей обращение племенной продукции в Российской Федерации.

2. Обоснование требований к ПЦР-тест-системам, используемым для тестирования спермопродукции.

3. Результаты тестирования образцов криоконсервированной спермы быков-производителей наличие генетического материала 11 вирусных и 14 бактериальных патогенов.

4. Результаты разработки и применения в экспериментальных и производственных условиях методик на основе ПЦР в реальном времени для детекции в спермопродукции ДНК вируса герпеса КРС 6 типа, *Mycoplasma bovis genitalium*, *M. californicum*, *U. diversum* и *M. bovis*, выявления генетического материала *Histophilus somni*.

5. Результаты изучения последовательностей полного генома изолятов *H. somni*, выделенных на территории Российской Федерации.

6. Алгоритм контроля и принятия решений при тестировании микоплазменного загрязнения спермопродукции с применением ПЦР и культуральных методов.

7. Предложения по совершенствованию системы обеспечения биобезопасности спермопродукции.

Степень достоверности. Материалы диссертационной работы опубликованы в ведущих российских и международных изданиях. Валидацию разработанных методик и верификацию диагностических тест-систем для тестирования спермы проводили с учетом рекомендаций Всемирной организации здоровья животных. Экспериментальная часть работы проведена на поверенном и аттестованном оборудовании с использованием разных амплификаторов одного типа, реактивов и наборов реагентов разных серий. Статистическая обработка экспериментальных данных, проведенная с использованием программ Microsoft Excel 2016 и Statistica 13.3 и встроенного программного обеспечения используемого оборудования, включала в себя расчеты средних арифметических значений, коэффициента вариации и достоверности различия выборок с использованием t-критерия Стьюдента.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на заседаниях ученого совета ФГБУ «ВГНКИ» (Москва, 2017–2023 гг.), Секции ветеринарного надзора Научно-технического совета Россельхознадзора (Москва, 2017–2021 гг.), секции Зоотехния и ветеринария Отделения сельскохозяйственных наук РАН (Москва, 2018, 2021), а также на следующих научных мероприятиях: Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика», (Москва, 2017 г., 2018 г.); Международная научно-практическая конференция «Перспективы и актуальные проблемы развития высокопродуктивного молочного и мясного скотоводства» (Республика Беларусь, Витебск, 2017 г.); Международная научно-практическая конференция «Генетический материал - стратегический запас страны. Требования к проведению контроля качества генетического материала» (Московская обл., Быково, 2017 г.); 5-й конгресс Европейской ассоциации ветеринарной лабораторной диагностики (Бельгия, Брюссель, 2018 г.); Всероссийская (национальная) конференция «Научное обеспечение агропромышленного комплекса» (Краснодар, 2019 г.); V Международная конференция «Достижения молодых ученых - в ветеринарную практику», (Владимир, 2019 г.); X Международная научно-практическая конференция АгроЕвразия 2021 «Климат, экология, сельское хозяйство Евразии», (Иркутская область, п. Молодежный, 2021 г.); X юбилейная международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика» (Москва, 2021 г.); Виртуальная встреча Европейской ассоциации ветеринарной лабораторной диагностики (2021 г.); Международная научно-практическая конференция «Инновационные решения актуальных вопросов биобезопасности» (Казань, 2022 г.); Научно-практическая конференция «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии, биотехнологии и экспертизы сырья и продуктов животного происхождения» (Москва, 2022 г.); 6-й конгресс Европейской ассоциации ветеринарной лабораторной диагностики (Испания, Севилья, 2022); Международная конференция «Устойчивое развитие: ветеринария, сельское хозяйство, аграрная техника и экология» (VMAEE2022) (Москва, 2022); Научно-практическая конференция «Экономически и социально значимые инфекции

сельскохозяйственных животных: меры профилактики и борьбы» (Москва, 2022); II Всероссийская школа-конференция «Сохранение и преумножение генетических ресурсов микроорганизмов» (Санкт-Петербург, 2023), Научно-практический агрофорум «Обеспечение продовольственной безопасности: стратегия и решения» (Екатеринбург, 2023 г.).

Личный вклад соискателя. Все этапы представленной работы, включая: планирование исследования, сбор и предварительная подготовка образцов, подбор методов испытаний, осуществление всех молекулярно-генетических, микробиологических, вирусологических исследований, анализ и статистическая обработка полученных результатов выполнены при непосредственном участии автора диссертационной работы. Выбор научной проблемы, целей, задач исследования, обсуждение, обоснование и формулирование выводов, подготовка к публикациям результатов исследований и апробация их на научно-практических конференциях были проведены автором лично или при его определяющем участии.

В выполнении отдельных фрагментов работы принимали участие сотрудники ФГБУ «ВГНКИ» д.б.н. Борунова С.М., к.б.н. Козлова А.Д., к.б.н. Брюсова М.Б., к.б.н. Красникова М.С., к.в.н. Рудняев Д.А., к.в.н. Агринская Е.П., к.х.н. Поболелова Ю.И., Лазарева Е.А., Горбачева Н.С., Тимофеева И.А. и Гордеева В.Д.

Подготовка аналитических материалов по микоплазмам крупного рогатого скота проводилась совместно с сотрудниками Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный центр охраны здоровья животных» д.б.н. Спрыгиным А.В., к.б.н. Бьядовской О.П., к.в.н. Кирпиченко В.В., д.в.н. Кононовым А.В.

Лабораторное выделение и идентификацию микоплазм микробиологическими методами осуществляли при участии сотрудников Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» д.в.н., профессора Сидорчука А.А. и к.б.н. Орловой С.Т., вирусологические исследования – совместно

с к.в.н. Пчельниковым А.В. В выполнении культуральных работ также принимал участие сотрудник ФГБНУ «Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» к.б.н. Лаишевцев А.И. Участие всех коллег отражено в совместных публикациях. Всем коллегам, оказавшим техническую, консультативную и методическую помощь при выполнении работы и подготовке совместных публикаций, автор выражает глубокую признательность.

Публикации. Автором по теме диссертации опубликовано 40 научных работ, 5 из которых – в изданиях, входящих в базы данных Scopus, 17 статей – в журналах, включенных ВАК Минобрнауки в перечень рецензируемых научных журналов для опубликования основных научных результатов диссертации, получены 4 патента Российской Федерации.

Объем и структура диссертации. Материалы диссертационной работы изложены на 311 страницах компьютерного текста и содержат введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, рекомендации по использованию полученных результатов, список сокращений и условных обозначений, список литературы, приложения. Диссертация иллюстрирована 25 таблицами и 31 рисунком. Список литературы содержит 624 источника, в том числе 108 отечественных и 516 иностранных. В приложении представлены копии документов, подтверждающих апробацию работы, достоверность результатов и практическую значимость.

2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 Общие сведения об использовании искусственного осеменения в современном животноводстве

Сегодня искусственное осеменение является одной из наиболее широко используемых репродуктивных технологий у крупного рогатого скота (далее – КРС). Возможность получения из одного эякулята быка-производителя до нескольких десятков спермодоз обуславливает преимущества, которые стали причиной широкого применения искусственного осеменения – распространение полезных качеств в поголовье и увеличение его генетической ценности, экономия средств, четкое управление репродуктивной деятельностью и сохранение редких пород.

В обзорных работах, посвященных теме искусственного осеменения, иностранными специалистами [304], признается историческая роль российских ветеринаров во внедрении искусственного осеменения в практику животноводства. Новаторские работы велись в России с 1899 года И.И. Ивановым, работавшим в институте экспериментальной медицины. Русскими учеными были предложены первые разбавители спермы, разработаны технологии и принципы организации и проведения искусственного осеменения [60]. Успехи технологии стимулировали исследования за пределами России: в Японии [462], Дании, Италии, Швеции, Великобритании и США [304].

Активное применение искусственного осеменения было связано с разработкой способов хранения спермы. Было предложено несколько способов хранения, из которых наиболее перспективным был признан метод длительного хранения спермы в глубокозамороженном состоянии [26]. Также стимулом для широкомасштабного применения технологии искусственного осеменения молочного скота явились разработки вариантов разбавителей спермы, увеличивающих сроки хранения племенного материала и обеспечивающих защиту сперматозоидов от холодового шока при криоконсервировании. В связи с тем, что важнейшей из задач разбавителей спермы является предупреждение развития

микроорганизмов, в среду стали добавлять антимикробные средства (пенициллин, стрептомицин, гентамицин, тилозин, линкомицин, спектиномицин и др) [66]. Еще одним новаторством, способствовавшим развитию искусственного осеменения, являлось изобретение датскими ветеринарами упаковки спермы [304]. Во Франции впоследствии технология замораживания и хранения спермы быков была усовершенствована, сперму быков стали расфасовывать в малых дозах, в тонкостенные полимерные трубки – пайетты или соломинки [26]. Отечественные специалисты также работали в данном направлении, предложив свой способ быстрого замораживания спермы быков в форме гранул, используя нанесение спермы на фторопластовую пластину с ячейками с последующим ее замораживанием в жидком азоте [103].

В настоящее время в племенных центрах для криоконсервации спермы быков используют несколько технологий: замораживание и хранение в герметичных полимерных емкостях - в облицованных гранулах (отечественная технология), в пайеттах-соломинках (европейская технология) и замораживание в открытых гранулах [26.]

Для разбавления спермы быков применяют специальные комплексные синтетические среды, а также биологические среды, в состав которых может входить молоко и яичный желток. Для улучшения выживаемости сперматозоидов в процессе криоконсервации и сохранения их фертильности продолжают проводиться исследования, направленные на совершенствование синтетических разбавителей, предназначенных для глубокого замораживания спермы быков [304].

Качество спермы от начальных этапов развития искусственного осеменения до настоящего времени оценивают, в первую очередь, путем определения доли нормальных, прямо-поступательно движущихся сперматозоидов с использованием светового микроскопа [540]. В последние годы для количественной оценки и изучения движения сперматозоидов стали активно использовать дифференциальное окрашивание и интерференционное контрастирование, множественное окрашивание, проточную цитометрию и компьютерный анализ [265; 301; 303]. При использовании замороженной спермы важной стала процедура

оценки жизнеспособности сперматозоидов после оттаивания и проверка их акросомного статуса [9, 26, 537].

2.2 Современное состояние рынка спермопродукции

Согласно оценке сообщений из разных стран об использовании репродуктивных технологий, проведенной Продовольственной и сельскохозяйственной организацией Объединённых Наций (ФАО) в 2007 году, в большинстве стран мира эти технологии используются, в первую очередь, при разведении КРС. Наиболее часто репродуктивные технологии применяют в странах Северной Америки, Среднего и Ближнего Востока и странах Европы [580], причем именно технологии искусственного осеменения являются наиболее востребованными.

В связи с этим закономерным является то, что племенная продукция (сперма быков) является в настоящее время предметом активной международной торговли. Развитие технологии в биотехнике репродукции животных позволяет приобретать семя быков различных пород, в том числе, разделённое по полу, а также спермопродукцию от быков-клонов. Цена за одну спермодозу на мировом рынке варьирует от нескольких долларов, до одной-двух тысяч долларов за дозу в зависимости от используемых технологий, ценности быка-донора и качества генетического материала. В 2019 году объем продаж спермы быков в мире составил 449 млн долларов. В 2021 году сперма КРС занимала 2753-е место в мире по объемам продаж с общим объемом торговли 561 миллион долларов. В период с 2020 по 2021 год экспорт спермы КРС в мире, по данным агрегатора данных ОЕС [188], вырос на 9,38%, с 513 млн долларов до 561 млн долларов и составил 0,000027% от общего объема мировой торговли.

В 2021 году крупнейшими экспортерами спермы КРС были США (294 млн долларов), Канада (90,7 млн долларов), Нидерланды (35,8 млн долларов), Германия (27,7 млн долларов) и Великобритания (27,4 млн долларов), а крупнейшими импортерами – Китай (85,5 млн долларов), Бразилия (40,1 млн долларов),

Великобритания (35,2 млн долларов), США (27,8 млн долларов) и Россия (26,2 млн долларов).

2.3 Риски использования технологии искусственного осеменения

При всех достоинствах искусственного осеменения эта технология, однако, не лишена определенных недостатков и связанных с ними рисков.

Среди недостатков обсуждаются следующие:

- затраты на искусственное осеменение для отдельных хозяйств оказываются выше по сравнению с содержанием стада племенных быков;
- нерациональное применение технологии может привести к потере генетического разнообразия, вплоть до исчезновения отдельных пород;
- использование искусственного осеменения связывают со снижением фертильности молочного скота;
- проблемным аспектом является определение фертильного периода в половом цикле коров [143, 453, 480, 580];
- существенным недостатком технологии искусственного осеменения является потенциальное распространение генетических и инфекционных заболеваний.

Кроме упомянутых выше недостатков и рисков использования искусственного осеменения, в настоящее время растет беспокойство по поводу распространения устойчивости микроорганизмов к противомикробным препаратам [571], что вызывает вопросы о том, насколько оправдано включение антибиотиков в разбавители спермы, поскольку оно имеет профилактическую, а не терапевтическую цель. В своей работе Музыка и соавторы [63], подчеркивают, что санация спермы антибактериальными препаратами не всегда приводит к желаемому результату как из-за снижения собственно эффективности препаратов, так и из-за их токсичности для спермиев, при этом длительное применение бактерицидных препаратов в средах для разбавления спермы может способствовать развитию резистентных штаммов микроорганизмов [63]. Отдельными научными группами высказываются предложения о перспективности

использовании альтернативного удаления контаминирующих бактерий во время обработки спермы, как более предпочтительного варианта повышения безопасности спермопродукции [443].

В случае присутствия в спермодозах патогенных микроорганизмов риски распространения инфекционных заболеваний многократно возрастают. Замороженная сперма является идеальной системой для сохранения жизнеспособности микроорганизмов, и широкое использование искусственного осеменения с использованием криоконсервированных спермодоз делает данную продукцию потенциальным фактором передачи инфекционных агентов половым путем. Учитывая, что в настоящее время продажа спермодоз племенных быков активно ведется как на национальном, так и на международном уровне, возникают риски передачи и дальнейшего распространения возбудителей в благополучные районы, а также заноса на территорию Российской Федерации ранее не регистрируемых заболеваний. Широкое использование антимикробных средств в составе разбавителей спермы также ставит вопрос о потенциальном распространении устойчивых к антибиотикам микроорганизмов.

2.4 Инфекционные агенты, выявляемые в племенном материале КРС

2.4.1 Общие сведения

В настоящее время установлена возможность передачи через сперму КРС инфекционных агентов вирусной и бактериальной природы, а также простейших и микоплазм.

При проведении оценки степени рисков, связанных с передачей инфекционных агентов через спермопродукцию, предназначенную для искусственного осеменения коров, зарубежными исследователями в 1997 году было выделено 3 категории заболеваний (рисунок 1) [77, 256]:

1 категория – инфекционные заболевания, для которых доказанной является степень риска передачи через сперму от умеренной до высокой.

2 категория – заболевания, для которых существуют свидетельства о низкой степени риска передачи через сперму.

3 категория - заболевания, для которых недостаточно накоплено подтвержденной информации о передаче через сперму, включающая как инфекции, для которых передача посредством искусственного осеменения вероятна, и инфекции, для которых передача возбудителя через спермопродукцию маловероятна.

Инфекции со степенью риска передачи через сперму от умеренной до высокой	Инфекции с низкой степенью риска передачи через сперму	Инфекции, для которых информации о передаче через сперму недостаточно
<ul style="list-style-type: none"> •Ящур •Везикулярный стоматит •Чума КРС •Инфекционный ринотрахеит КРС •Вирусная диарея КРС •Туберкулез •Кампилобактериоз КРС •Бруцеллез •Трихомоноз КРС •Микоплазмоз •Гистофилез (вызываемый <i>Histophilus somni</i>) •Инфекции, вызываемые убиквитарными микроорганизмами (<i>P. aeruginosa</i>, <i>E. coli</i>, <i>Staphylococcus spp.</i>, <i>Streptococcus spp.</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> •Блутанг •Лейкоз КРС •Эфемерная лихорадка КРС •Болезнь Акабане •Лептоспироз 	<ul style="list-style-type: none"> •Вирусный иммунодефицит КРС •Паратуберкулез •Нодулярный дерматит •Лихорадка долины Рифт •Пастереллез •Злокачественная катаральная лихорадка •Листериоз •Анаплазмоз •Бабезиоз •Хламидиоз •Инфекции, вызванные грибной микрофлорой

Рисунок 1 – Риски передачи инфекционных болезней КРС при использовании технологий искусственного осеменения [256].

В последние годы список микроорганизмов, выявляемых в сперме крупного рогатого скота, был дополнен *Ureaplasma diversum*, *Acholeplasma spp.*, *Trueperella pyogenes* и *Neospora caninum*. В семени быков выявляли пестивирус Нови-like (вирус диареи КРС 3 типа, BVDV-3) [156, 336], вирус нодулярного дерматита [366], герпесвирус 4 типа BHV-4 [549, 438] и вирус Шмаленберг [285, 352]. При проведении оценки рисков, связанных с передачей возбудителей инфекций КРС со спермой в отдельных работах рассматриваются также вирус респираторно-синцитиальной инфекции КРС, вирус парагриппа-3 КРС, коронавирус КРС, а также микроорганизмы рода *Salmonella* [567].

В настоящее время установлена возможность передачи через сперму различных инфекционных агентов, часть из которых являются возбудителями заболеваний, нотифицируемых во Всемирную организацию здоровья животных (ВОЗЖ) (ранее – Международное эпизоотическое бюро). ВОЗЖ разрабатывает нормативные документы, касающиеся правил, которые страны – члены организации могут использовать для защиты от заноса заболеваний и патогенных микроорганизмов, без установления необоснованных санитарных барьеров. Однако, кроме патогенов, упомянутых в Кодексе здоровья наземных животных и в Руководстве по Диагностическим Тестам и Вакцинам для Наземных Животных ВОЗЖ, некоторые инфекционные агенты также могут быть выявлены в спермопродукции, и их роль в развитии патологии у животных продолжает быть объектом исследований. Среди большого количества инфекционных агентов, встречающихся в спермопродукции КРС, наибольшее влияние на качество и безопасность спермопродукции, с учетом наличия методов профилактики, контроля и эпизоотической ситуации, по данным научной литературы, оказывают несколько групп микроорганизмов вирусной и бактериальной природы [256].

2.4.2 Герпесвирусы КРС

Герпесвирусы жвачных животных, представленные альфа- и гамма-герпесвирусами, вызывают широкий спектр поражений, включая неврологические, респираторные, а также заболевания органов репродукции. Неоднократно сообщалось о выявлении вирусов герпеса из спермы быков [360,594, 620].

В настоящее время описано 7 альфа-герпесвирусов (таблица 1) и 2 гамма-герпесвируса жвачных животных, среди которых герпесвирус КРС 1 типа (BHV-1) является наиболее важным и лучше всего изученным.

Таблица 1 – Альфа-герпесвирусы жвачных [535].

Вирус	Естественный хозяин	Проявление	Географическое распространения
Bovine herpesvirus 1	КРС	Инфекционный ринотрахеит КРС Инфекционный пустулезный вульвовагинит	Европа, Америка, Азия, Австралия
Bovine herpesvirus 5	КРС	Энцефалит крупного рогатого скота	Европа, Америка, Австралия
Bubaline herpesvirus 1	Водяной буйвол	Субклиническая генитальная инфекция	Европа, Австралия
Caprine herpesvirus 1	Коза	Вульвовагинит, аборт, неонатальная системная инфекция	Европа, Америка, Австралия
Cervid herpesvirus 1	Благородный олень	Поражения глаз	Европа
Cervid herpesvirus 2	Северный олень	Субклиническая генитальная инфекция	Европа
Elk herpesvirus 1	Лось	Субклиническая генитальная инфекция	Северная Америка

Герпесвирус КРС 1 типа

Характеристика возбудителя и его роль в развитии заболеваний репродуктивного тракта КРС

Герпесвирус КРС 1 типа (Bovine herpesvirus-1; BHV-1) относится к роду *Varicellovirus* в подсемействе *Alphaherpesvirinae*, принадлежащему семейству *Herpesviridae*, отряду *Herpesvirales*. Вирус представляет собой полую полигональную структуру с липидной оболочкой, а нуклеокапсид содержит геном, представленный двухцепочечной ДНК, которая кодирует около 70 белков, из которых 33 – структурных и около 15 – неструктурных [176]. Вирусные гликопротеины расположены в оболочке на поверхности вириона и играют важную

роль в патогенезе и иммунитете. Нуклеокапсид состоит из 162 полых капсомеров: 150 гексамеров и 12 пентамеров. ДНК обернута вокруг волокнистой ложкообразной сердцевины, волокна которой прикреплены к внутренней стороне окружающего капсида [597]. Вирион плеоморфный, его диаметр колеблется от 120 до 200 нм. Размер генома BHV-1 составляет примерно 140 т.п.н., в нем определено 73 открытых рамки считывания [323], при этом только 33 гена важны для репликации вируса *in vitro*, а роль 2 генов до сих пор не выяснена [569]. Большая часть генов обладает высокой степенью идентичности с генами других представителей семейства *Herpesviridae* [65].

BHV-1 связан с развитием респираторных заболеваний, инфекционным пустулезным вульвовагинитом и инфекционным пустулезным баланопоститом КРС. Вирус также вызывает аборт, бесплодие, конъюнктивиты и энцефалиты. [117]. Вызываемые BHV-1 болезни включены в список ВОЗЖ, включающий болезни животных, которые имеют важное экономическое значение и играют важную роль в международной торговле.

На основе рестрикционных паттернов BHV-1 ранее разделяли на подтипы 1.1, 1.2a, 1.2b и 1.3 [176], а ранее выделяемые подтипы 1.3a 1.3b, в настоящее время выделены в отдельный вид (BHV-5) [118, 175, 298, 574].

Считается, что подтип 1.1 ассоциирован с респираторным течением, а подтипы 1.2a и 1.2b связаны с поражением органов репродукции. Все подтипы способны вызывать заболевания, но штаммы подтипов 1.2a и 1.2b считаются менее вирулентными [65, 258]. В Алжире подтип 1.2a вируса обнаруживали у коров с респираторной и репродуктивной патологией [120]. При исследовании, проведенном в США, штаммы подтипа 1.1 выявляли преимущественно у телят с респираторными поражениями, а подтипа 1.2b у животных с заболеваниями органов репродукции [310]. Сходные данные об обнаружении изолятов BHV 1.2b в сперме быков и влагалищных смывах коров поступали из Австралии и Новой Зеландии, однако данный подтип также выявлялся и у телят с респираторной патологией [555; 604].

Источниками инфекции являются как выделения из носа и глотки при кашле, так и выделения из половых органов, жидкости и ткани плода, а также сперма. Надо отметить, что выживаемость ВHV-1 достаточно высока при низкой температуре и высокой относительной влажности. Показано, однако, что животные, выделяющие вирус из влагалища или крайней плоти, передают вирус менее эффективно по сравнению с воздушно-капельным способом передачи [258, 320].

При этом передача вируса половым путем при естественном размножении, а также при использовании зараженной спермы или инструментов во время искусственного оплодотворения, считается одним из механизмов распространения ВHV-1. Жизнеспособный вирус может быть выделен из спермы инфицированных, но клинически здоровых быков, и это следует учитывать, если быки участвуют в процессе разведения, либо используются в качестве доноров спермы.

При поражении репродуктивного тракта быков (инфекционный баланопостит) вирус реплицируется в слизистой оболочке препуция, пениса и мочеиспускательного канала и выделяется со спермой [594, 600, 620]. После экспериментального интраназального и генитального заражения быков возрастом не менее 18 месяцев, вирус выделяли из смывов препуциальных тканей в течение 2-10 дней. При этом вирус только единожды был выделен из дистальной части уретры, не выявлялся при исследовании проксимального отдела уретры, придаточных желез, придатков яичка или яичек. Интраназальное введение вируса телятам не вызывало признаков баланопостита, но также приводило к выделению ВHV-1 из крайней плоти [600].

В исследованиях, проведенных в конце прошлого века, было показано, что после первичного внутрипрепуциального инфицирования быки могут начать выделять ВHV-1 из крайней плоти между 2 и 7 днями после заражения, и этот период может длиться несколько недель [485, 600]. У конкретного быка длительность выделения вируса может меняться: некоторые быки выделяют вирус в течение нескольких дней или недель [166, 226 563], тогда как у других быков выделение вируса практически не обнаруживается [600]. Было отмечено, что у отдельных животных может наблюдаться периодическое спонтанное выделение

вируса, которое может продолжаться в течение 361 дня [557]. Такие периоды спонтанного или искусственно вызванного (например, при лечении кортикостероидами) прерывистого распространения вируса часто остаются клинически незамеченными и быки могут распространять вирус через нерегулярные промежутки времени в течение многих лет [600].

Герпесвирусная инфекция распространена по всему миру, однако заболевание, по данным ВОЗЖ, считается ликвидированным в ряде стран Европы (Австрия, Дания, Финляндия, Швеция, Швейцария, Норвегия и некоторых районах Италии и Германии).

Характерным свойством герпесвирусов является их способность вызывать скрытые инфекции. В большинстве случаев инфицирование КРС BHV-1 протекает субклинически. После заражения и сероконверсии, BHV-1 может пожизненно сохраняться у инфицированных животных в скрытом состоянии в сенсорных нейронах, в частности, в тройничном или крестцовом ганглиях [617]. После внутрирепродуктивных инфекций BHV-1 может повторно выводиться из крайней плоти намного дольше, чем в первичной фазе инфекции [166, 227].

Как естественный, так и искусственный стресс (введение кортикостероидов) может вызвать реактивацию латентного BHV-1 и последующее выделение, которое обычно происходит в местах первичной инфекции. Реактивация часто может быть незамеченной клинически. Вирус может быть реактивирован, в том числе под действием неблагоприятных факторов, что приводит к повторному выделению вируса в окружающую среду без проявления клинических признаков заболевания. [600].

Вирус герпеса КРС 5 типа (BHV-5), близкий родственник BHV-1, сходство с которым по последовательности генома достигает более 85%, является возбудителем герпесвирусного энцефалита КРС. Ввиду высокой перекрестной реактивности антител BHV-5 с антителами, индуцированными BHV-1, распространение BHV-5 изучено значительно меньше. Тем не менее инфекции BHV-5 выявляются с возрастающей частотой, особенно в Южной Америке [295]. Заболевание, вызываемое этим вирусом, характеризуется часто фатальным

менингоэнцефалитом, хотя, как и при других герпесвирусах, число инфекций без каких-либо клинических признаков, вероятно, велико. Однако поскольку вирус влияет на центральную нервную систему, инфицирование ВНВ-5 (как и ВНВ-1) необходимо учитывать при дифференциальной диагностике аборт и энцефалопатии КРС [182]. Длительное время ВНВ-5 не ассоциировали с поражениями органов репродукции, однако развитие методов диагностики и дифференциации вирусов привело к появлению большого числа сообщений, описывающих обнаружение ВНВ-5 в сперме быков и риски, которые стоит учитывать в связи с недостаточной изученностью этого вируса [140,179, 182, 231, 261, 354, 367, 174]. Отдельные исследователи полагают, что многие аспекты связи ВНВ-5 с заболеваниями органов репродукции остаются еще не выясненными, и существует вероятность, что патогенез аналогичен таковому при ВНВ-1 [295].

Контроль и профилактика заболеваний, вызванных герпесвирусом КРС 1 типа

Заболевания, вызванные ВНВ-1, контролируют путем удаления из стад животных-носителей, при этом идентификацию чаще всего проводят серологически. Дополнительно для выявления носителей проводят введение кортикостероидов для провоцирования реактивации и последующего выделения вируса [564].

Против заболеваний, вызванных вирусом герпеса КРС 1 типа, широко используются вакцины, выпускаемые как в моноварианте, так и в комбинации с другими вирусами КРС. Доступны инактивированные и живые аттенуированные вакцины, созданы рекомбинантные «маркерные» ДНК-вакцины, в которых удалены ген тимидинкиназы и некоторые гены гликопротеина [61, 206, 564].

«Маркерные» вакцины обычно не содержат гликопротеина Е (gE), против которого вырабатывается антительный ответ на естественную инфекцию. Поскольку вакцинированные животные не реагируют на этот конкретный антиген, возможно дифференцирование инфицированных животных от вакцинированных (DIVA-стратегия). Хотя вакцины часто не предотвращают заражение, они

значительно снижают инцидентность и тяжесть заболевания [370]. Живые и убитые гликопротеиновые «маркерные» вакцины с удаленным гликопротеином Е в настоящее время широко используются в Европе в сочетании с соответствующими диагностическими тестами для мониторинга заболеваний крупного рогатого скота. Важно отметить, что вакцинация живыми вакцинами может вызвать развитие скрытой инфекции, а вакцинный вирус способен долгое время сохраняться в организме животного [373].

Изучение влияния на фертильность КРС

Негативное влияние инфекции BHV-1 на фертильность изучалось в течение многих лет. В одном из самых ранних отчетов, опубликованных в 1967 году, описывалось экспериментальное исследование влияния присутствия BHV-1 на искусственное осеменение [382]. Телки, осемененные спермой, содержащей американский штамм K22 BHV-1, демонстрировали клинические признаки инфекционного вульвовагинита, зачала и в итоге произвела живого теленка в срок только одна из четырех телок. В последующем исследовании 6 из 8 серонегативных телок, осемененных таким же образом, имели короткие циклы эструса (11–15 дней). Проведенное исследование эндометрия у телок показало развитие хронического некротизирующего эндометрита, который все еще проявлялся через 31–47 дней после осеменения. В вульве, влагалище и яйцеводах некоторых животных также наблюдались гистопатологические изменения, и 5 из 8 обследованных животных имели кистозные желтые тела [324].

В еще одном исследовании сравнивали влияние BHV-1 на фертильность при искусственном и естественном осеменении. Серонегативные телки и коровы были либо осеменены спермой, содержащей австралийский штамм BHV-1 (сперма вводилась непосредственно в матку), либо были естественным образом скрещены с быками, которые были предварительно инокулированы тем же вирусом за 2 дня до осеменения. После искусственного осеменения только 2 из 10 животных были зачаты после первого осеменения, а еще 2 животных были зачаты после второго осеменения спермой без BHV-1. Кроме того, у 4 из 6 животных наблюдалось сокращение эструса [481].

Независимо от способа осеменения у всех коров, осемененных спермой, инфицированной ВНВ-1, в течение 48 часов развивался инфекционный вульвовагинит, который продолжался в течение 9–11 дней. В группе искусственного осеменения вирус постоянно выделяли из вагинальных мазков всех животных на протяжении 8–9 дней, а периодически вирус выделялся в течение 40 дней у некоторых животных после осеменения. Гистопатологическое исследование 6 небеременных животных в группе искусственного осеменения показало наличие эндометрита от легкой до тяжелой степени. Также были зарегистрированы поражения яйцевода, влагалища и бартолиновых желез. Авторы пришли к выводу, что путь заражения имеет решающее значение для развития эндометрита и бесплодия [481]. Хотя введение ВНВ-1 естественным путем, по-видимому, не оказывает значительного влияния на фертильность, введение ВНВ-1 в матку может вызвать бесплодие из-за эндометрита, а также увеличить частоту укороченных циклов эструса [324].

Вопрос о влиянии вируса на такие параметры качества спермы, как подвижность и количество сперматозоидов с аномальной морфологией, до конца все еще не решен. В одних исследованиях отмечено, что инфекционный баланопостит быков, вызванный ВНВ-1, приводит к уменьшению подвижности сперматозоидов и общему ухудшению качества спермы [226], а авторы других исследований не обнаружили влияния загрязнения ВНВ-1 на качество спермы [609]. Более поздние исследования показали, что ВНВ-1 может не влиять как на подвижность сперматозоидов, так и на их акросомальный статус [355], однако описано влияние данного возбудителя на качество спермы, обусловленное генерализованным течением заболевания [360, 600].

Согласно требованиям ВОЗЖ, чтобы предотвратить производство спермопродукции, контаминированной ВНВ-1, быки во время сбора спермы должны содержаться в изоляции или в стаде, свободном от ВНВ-1, и кровь должна быть проверена на наличие антител к ВНВ-1 как минимум 21 день после последнего сбора спермы, которая будет использоваться для осеменения.

Если бык является серопозитивным или имеет неизвестный серологический статус, ВОЗЖ рекомендует исследование одной аликвоты спермы из каждого забора на присутствие ВHV-1 с отрицательным результатом с использованием анализа, валидированного для образцов спермы [50].

Герпесвирус КРС 4 типа

Характеристика возбудителя и его роль в развитии заболеваний КРС

Герпесвирус КРС 4 типа (Bovine herpesvirus-4; ВHV-4) является представителем семейства *Herpesviridae*, подсемейства *Gammaherpesvirinae* и относится к роду *Rhadinovirus*.

Вирион ВHV-4 содержит двухцепочечную ДНК размером 144 ± 6 т.п.н. Структура генома ВHV-4 типична для герпесвирусов этой группы. Одна геномная единица включает уникальную центральную часть, называемую L-ДНК, фланкированную с обоих концов концевыми тандемными повторами, называемыми Н-ДНК [437].

Штаммы ВHV-4 традиционно делят на две основные группы, представляющие 1 и 2 генотипы. Выделяемые североамериканские и европейские ветви штаммов вируса, по-видимому, имеют близкое родство. В некоторых исследованиях сообщалось о выделении третьего генотипа ВHV-4 [130, 318,].

В последние годы появилось много сообщений о детекции герпесвируса КРС 4 типа как у домашних, так и у диких парнокопытных животных в разных странах мира [100].

ВHV-4 впервые был впервые выделен в 1963 г. А. Vartha в Венгрии от телят с проявлениями респираторной инфекции и кератоконъюнктивитами [154]. Значительно позже – в 1971 году S.B. Mohanty с коллегами изолировал вирус и провел экспериментальное заражение животных на территории США [436].

Вопросу изучения локализации ВHV-4 *in vivo* было посвящено несколько работ. В 1996 году при исследованиях экспериментально инфицированных животных было показано, что наибольшее количество ДНК вируса (от 50 до 500

копий на 1 мг клеточной ДНК) обнаруживается в селезенке, легких, трахее и носовом эпителии [565]. Также было выявлено, что ВНВ-4 естественным образом инфицирует мононуклеарные клетки крови, такие как макрофаги и моноциты, и проявляет специфический тропизм к эндотелию сосудов, тканям молочной железы, эндометрию и тканям плода [130, 253].

Проведенные исследования показали, что заражение восприимчивых животных полевыми изолятами ВНВ-4 редко приводит к развитию типичных клинических проявлений. Вирус выделяли как у животных без клинических проявлений заболевания, так и у животных с послеродовым метритом [178], в случаях маститов [208, 416], при пневмонии, кератоконъюнктивитах, энцефалитах как при естественном, так и при экспериментальном заражении [130]. Отечественные ученые изолировали генетический материал ВНВ-4 от КРС с респираторной патологией как при ассоциированной вирусной инфекции, так и в моноварианте [22]. Имеются экспериментальные данные о периодическом выделении вируса из молока, слюны и спермы [232].

Работа Drolet с соавторами (1986) является примером изучения клинических проявлений, связанных с вирусом ВНВ-4. В проведенном в течение более 2-х лет исследовании 33% изолятов ВНВ-4 были ассоциированы с абортom, 25% - с пневмонией, 17% - с диареей и 25% - с другими симптомами. При этом 75% изолятов ВНВ-4 были получены от животных с сопутствующими бактериальными, грибковыми или другими вирусными инфекциями и только 3 изолята ВНВ-4 были выделены от животных в качестве единственного патогена [254].

Большинство изолятов ВНВ-4 не вызывают тяжелого течения заболевания или являются полностью апатогенными для КРС, а роль этого вируса как самостоятельного патогена остается до сих пор не доказанной [184, 292, 410, 460]. Отдельные исследователи утверждают, что антитела к ВНВ-4 значительно чаще выявляются у животных с репродуктивными поражениями, чем у КРС без клинических проявлений [130]. Достаточно часто ВНВ-4 изолируют при абортах на разных стадиях стельности [318, 438, 460, 565].

Как и в случае с другими вирусами герпеса, у животных, экспериментально инфицированных ВНВ-4, может развиваться латентная инфекция, которая способна привести к реактивации вируса и его повторной экскреции на фоне лечения дексаметазоном и/или под влиянием стрессовых факторов [292].

Изучение влияния на фертильность КРС

Ранние исследования демонстрировали, что штамм ВНВ-4, выделенный у быка с признаками орхита и азооспермии, вызывал непоследовательные поражения здоровых животных после интратестикулярной инокуляции, при этом инфильтрация интерстициальной ткани мононуклеарными клетками чаще наблюдалась в придатке яичка, чем в яичке [330, 460]. Все эти факты объясняют интерес ученых к вопросу возможности передачи вируса со спермой быков, используемой для искусственного осеменения [460, 549, 552, 568]. Аргентинские ученые показали, что у 4,3% быков из станций искусственного осеменения в сперме обнаруживалась ДНК вируса [549]. Схожее исследование, проведенное в Венгрии, показало, что доля ВНВ-4-положительных образцов спермы, используемой для искусственного осеменения, составляет 19,3% [568]. Изучение быков из сербских станций искусственного осеменения, показало, что 18 из 50 животных содержали антитела к ВНВ-4, а в сперме одного из быков была выявлена ДНК вируса, что позволило авторам сделать вывод о том, что искусственное оплодотворение является потенциальным путем передачи ВНВ-4 [460], а изучение роли вируса в развитии болезней органов репродукции КРС необходимо продолжить.

Вирус герпеса КРС 6 типа

Характеристика возбудителя и его роль в развитии заболеваний КРС

Вирус герпеса КРС 6 типа (Bovine herpes virus-6, ВНВ-6), также известный как лимфотропный вирус герпеса КРС, является еще одним представителем подсемейства *Gammaherpesvirinae*, однако относится к роду *Macavirus* [80, 81, 463].

Вирус был впервые выделен в США в 1972 году из лейкоцитов коровы с признаками лимфосаркомы [593]. В последующие годы вирус был также обнаружен у коров и буйволов на территории США [230], Европы [185-186], Канады [509], Южной Америки [180], Новой Зеландии [233].

Филогенетический анализ показал, что BHV-6 входит в группу макавирусов, отличающуюся от других гаммагерпесвирусов. Геном BHV-6 включает единственную уникальную кодирующую область с низким содержанием G + C (L-ДНК) размером 141 т.п.н. и область с высоким содержанием G + C (H-ДНК), содержащую повторы 1022 п.н. Сравнительный анализ геномов макавирусов продемонстрировал организационную консервативность этой группы, так, например, L-ДНК BHV-6 содержит 77 генов, ортологичных другим родственным представителям рода *Mascavirius*. При этом для BHV-6 показаны уникальные гены и продемонстрированы различия в последовательностях внутри кодирующих областей [463].

В разные годы разными коллективами исследователей ДНК BHV-6 была обнаружена в 50–80% случаев в тканях клинически здоровых взрослых животных и в 30% случаев у здоровых телят [230, 396, 415]. На основании полученных результатов авторами сделан вывод о повсеместной распространенности BHV-6 у здорового КРС. Авторы работ предполагают, что телята рождаются свободными от данного вируса и инфицируются им в первые месяцы жизни, при этом механизм заражения остается неизвестным.

В других работах генетический материал BHV-6 был выявлен в биологическом материале коров, больных лейкозом, маститами, эндометритами, но этиологическая связь наличия данного возбудителя с описанными болезнями доказана так и не была [185, 230, 509].

Даже несмотря на то, что в научной литературе были сообщения о присутствии BHV-6 в опухолевых клетках и в образцах, взятых от молочных коров с послеродовым метритом, связь BHV-6 с развитием каких-либо заболеваний все еще остается неопределенной, вирус остается одним из самых малоизученных

вирусов герпеса КРС, а информация о случаях распространения этого инфекционного агента через сперму отсутствует.

2.4.3 Вирус диареи КРС

Характеристика возбудителя и его роль в развитии заболеваний КРС

Вирус диареи КРС (Bovine viral diarrhea virus (BVDV)) - один из наиболее важных вирусов, поражающих КРС во всем мире и способный вызывать как острое, так и длительное, персистирующее течение заболевания [112, 306, 440, 497]. BVDV впервые был выделен в 40-е годы двадцатого века в США от коров с гастроэнтеритом с высокой летальностью [472].

Вирус принадлежит роду *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*. Вирусная частица с диаметром приблизительно 50 нм (диапазон размеров частиц от 40 до 65 нм) состоит из билипидной оболочки, окружающей электронно-плотное ядро, что выявлено с помощью криоэлектронной микроскопии и электронной микроскопии с отрицательным окрашиванием [207, 442]. Род *Pestivirus* содержит несколько видов, включая BVDV и тесно связанные вирусы классической чумы свиней и пограничной болезни овец. Ранее у BVDV выделяли 2 генотипа – BVDV-1 и BVDV-2, каждый из которых может быть представлен штаммами, характеризующимися нецитопатическим или цитопатическим воздействием на культивируемые клетки [65; 524]. Недавно был идентифицирован третий генотип вируса, BVDV-3, к которому были отнесены НоВи-подобные вирусы, выделенные из фетальной сыворотки КРС, импортированной из Бразилии [156].

Геном BVDV представлен одноцепочечной (+) РНК и имеет размер около 12,3 т.п.н. Он состоит из одной открытой рамки считывания (ORF), фланкированной короткими 5'- и 3'-нетранслируемыми областями (UTR). ORF кодирует один большой полипротеин, который посттрансляционно процессируется в четыре структурных (С, Е_{гns}, Е1, Е2) и неструктурных (N_{pro}, NS2-3, NS4A NS4B, NS5A, NS5B) белка [524]. Из всех вирусных белков неструктурный белок NS3 и гликопротеины Е_{гns} и Е2 являются иммунодоминантными белками вируса, которые индуцируют значительные и определяемые титры антител у

инфицированных животных [590]. На основе частичного или полного секвенирования генома было выделено как минимум 22 подтипа BVDV-1 (от BVDV-1a до BVDV-1v) (24), в то время как BVDV-2 и НоВи-подобный вирус разделены на 4 подтипа (от a до d) [435].

Крупный рогатый скот является естественным хозяином для BVDV [220].

Распространенность инфекции, вызванной BVDV, оцененная на основании серологических исследований в различных географических регионах, колеблется от 40 до 90% у отдельных особей и достигает 28-66% в стадах КРС, в то время как 0,5-2,5% животных являются носителями вируса [112, 220, 329].

Наиболее распространенный путь передачи BVDV – прямой контакт между животными [403]. Инфицированные особи выделяют вирус с жидкостями и выделениями организма, включая истечения из носа, слюну, сперму, мочу, фекалии, слезы, молоко [190]. Было показано, что BVDV может передаваться при ректальном обследовании [584]. Носительство вируса или персистирующая инфекция, играет большую роль в инфицировании восприимчивого КРС и поддержании циркуляции BVDV в популяциях [408]. Персистирующая инфекция возникает, когда плод подвергается воздействию нецитопатического штамма вируса примерно в период от 18 до 125 дней стельности [326]. В результате такие инфицированные (*persistently infected (PI)*) животные постоянно являются источниками вируса, выделяя его продолжительное время. Американскими учеными получены доказательства того, что после очевидного выздоровления вирус диареи КРС может длительно находиться в тканях яичников, семенников, а также в иммунопривилегированных участках центральной нервной системы. В этом случае животные могут оставаться заразными в течение нескольких месяцев [353].

Тяжесть заболевания, вызванная BVDV, различается при заражении разными штаммами вируса. Вирус диареи КРС может вызывать подавление иммунитета, что делает инфицированных животных более восприимчивыми к заражению другими вирусами и бактериями [220].

Поскольку вирус может передаваться через сперму быков, передача вируса при естественном разведении или искусственном осеменении коров спермой инфицированных быков является предметом изучения и контроля [266, 585].

Профилактика заболеваний, вызванных вирусом диареи КРС

Для профилактики заболевания активно используют вакцинацию, целью которой в современных условиях является обеспечение перекрестной защиты как от разных подтипов BVDV-1, так и от штаммов BVDV-2, которые, с момента заноса с контаминированной маркированной вакциной от инфекционного ринотрахеита КРС вирулентного вируса этого типа в Нидерланды в 2001 году также стали представлять угрозу для скота [377, 479].

Для борьбы с вирусной диареей КРС наиболее широко применяются живые и инактивированные вакцины на основе штаммов генотипов BVDV-1a и BVDV-1b [125, 281, 575]. Живые вакцины содержат аттенуированные штаммы BVDV и обычно вызывают более широкий и продолжительный иммунный ответ, чем инактивированные вакцины, что связано, видимо, с работой Т-клеток. Продолжительность иммунитета, индуцированного инактивированными вакцинами против BVDV, обычно короче, и иммунный ответ против различных штаммов или изолятов может быть недостаточным для защиты по сравнению с живыми вакцинами [171].

BVDV часто включают в состав поливалентных вакцин для КРС, а в последние годы идет активная разработка и изучение эффективности субъединичных и рекомбинантных вакцин против вирусной диареи КРС [113, 346].

Влияние BVDV на воспроизводство КРС

Потери при репродукции, связанные с вирусом диареи КРС, были впервые описаны еще в 1946 году [472]. Хотя BVDV признан основным компонентом респираторных заболеваний, особенно у телят, именно проникновение вируса в ткани органов репродукции КРС имеет выраженные отсроченные эффекты [196]. BVDV может использовать репродуктивную систему для сохранения и циркуляции в популяциях КРС [326].

В нескольких работах было показано, что BVDV может приводить к снижению плодовитости пораженного скота [306, 356, 401, 424, 470, 570]. Инфекция BVDV была связана с частотой гибели эмбриона и плода, потерями телят и задержкой плаценты в послеродовом периоде [402]. Другие наблюдения связывают инфицирование вирусом со снижением показателей зачатия и наступления стельности [340, 425, 570, 599], увеличением интервала между отелами [264], увеличенным временем до первого отела [592] и повышенным риском позднего возвращения к работе [401, 470].

Авторами одного исследования было высказано предположение, что влияние BVDV на фертильность молочных телок зависит от времени заражения и стадии репродуктивного развития [446]. Было показано, что инфицирование BVDV в течение первых 45 дней стельности не оказывало влияния на скорость возврата к течке, но было связано с увеличением частоты аборт в середине стельности (7%) у дойных коров [572]. Сообщалось также о снижении скорости отела и оплодотворяемости у латентно инфицированных BVDV коров [573]. Более того, фертильность снижалась у внешне здоровых животных, у которых обнаруживались антитела к BVDV, антиген BVDV или и то, и другое [189]. Присутствие антигена вируса в крови коров ощутимо влияло на эффективность зачатия, снижая показатель зачатия с 71 до 28% [262].

Предыдущие исследования раскрыли наличие нескольких различных механизмов, посредством которых вирус диареи КРС может влиять на фертильность (рисунок 2). К ним относятся вирусные воздействия на репродуктивные органы, гаметы, эмбрион и плод. Многие из основных механизмов, особенно связанных с ранним невынашиванием беременности, еще требуют изучения. Считается также, что инфицирование BVDV повышает восприимчивость скота к другим патогенам [470].



Рисунок 2 – Механизмы, связывающие развитие бесплодия КРС, с инфицированием вирусом диареи КРС [470], с изменениями.

Известно, что BVDV поражает большинство органов репродуктивного тракта инфицированных животных. Вирус обнаруживали образцах тканей яичек [235], яйцеводах [172], в макрофагоподобных клетках в строме эндометрия [251], во влагалищной слизи [195], а также в эпителиальных и неэпителиальных клетках эндометрия, миометрия и плаценты [307]. Вирус также выявляли в клетках яичника и в фолликулярной жидкости [251, 259, 307, 470]. Более того, вирусные антигены были обнаружены в яйцеклетках инфицированных коров [196, 305], в эмбрионах [195, 259] и у плодов [470].

Существуют различные мнения о последствиях вирусной инфекции для функции яичек и фертильности быков. Вирус реплицируется в семенных пузырьках и предстательной железе и может выделяться в сперме быков как при острой, так при хронической инфекции [389, 393, 585]. BVDV также может локализоваться в семенниках быков, вызывая стойкое инфицирование яичек и делая сперму потенциальным источником инфекции [131, 266, 601].

О влиянии вируса на качество спермы нет однозначных данных: в исследованиях, проведенных в 1991–1994 годах, сообщалось, что ни у быков с острой инфекцией, ни у быков с персистирующей инфекцией не было выявлено каких-либо явных отклонений в качестве спермы [389]. Напротив, в других исследованиях сообщалось о таких нарушениях при инфицировании вирусом диареи, как недостаточный объем спермы, снижение концентрации и подвижности сперматозоидов, а также увеличение числа сперматозоидов с аномалиями [393, 531].

Сперма инфицированных быков, помимо отрицательного воздействия на уровень оплодотворения и фертильность, также может быть потенциальным источником инфекции для восприимчивых коров. Показано, что концентрация BVDV сперме инфицированных быков может колебаться от 5 to 75 TCID₅₀/ml [389]. Вирус может быть выделен из спермы некоторых быков при острой инфекции, при этом в период, когда в сыворотке обнаруживаются антитела, выделение вируса из спермы прекращается [389]. В одной из работ показано, что вирусом, появившимся в сперме через 12 дней после искусственного заражения быка, оказались заражены 5% осемененных телок, при этом антитела к BVDV в сыворотке быка не обнаруживали [356]. Впоследствии горизонтальная передача вируса от инфицированных телок к стельному скоту привела к появлению плодов с персистирующей формой инфекции [356].

Согласно рекомендациям Кодекса здоровья наземных животных ВОЗЖ, для уменьшения рисков распространения вируса через сперму быки на станциях искусственного осеменения должны проходить несколько стадий тестирования [50]. Такие меры необходимы не только для установления иммунного статуса быков, но и для подтверждения отсутствия персистирующей или острой инфекции. Руководство по диагностическим тестам ВОЗЖ рекомендует первоначально тестировать образцы цельной крови или сыворотки, а для подтверждения инфицирования яичек у быков отбирать образцы спермы не менее трех раз с интервалами не менее 7 дней с тестированием молекулярно-генетическими методами.

2.4.4 Вирус Шмалленберг

Характеристика возбудителя и особенности болезни Шмалленберга

Вирус Шмалленберг (SBV) относится к вирусам серогруппы Simbu из рода *Orthobunyavirus* (семейство *Peribunyaviridae*, отряд *Bunyavirales*). В роду *Orthobunyavirus* насчитывается более 170 представителей, включая вирусы, вызывающие заболевания у жвачных животных и людей. Вирусы серогруппы Simbu распространены в Африке, Океании и на Ближнем Востоке, где представлены не менее, чем 25 вирусами, и до 2011 года не встречались в Европе. Передача вирусов этой группы происходит, в основном, через укусы кровососущих насекомых, в первую очередь, мокрецов (рода *Culicoides*) и комаров (семейства *Culicidae*) [6, 18; 20].

Когда SBV был впервые выделен от больных коров в Германии, в местечке Шмалленберг, метагеномный анализ показал, что вирус имеет схожесть с геномными последовательностями трех других известных ортобуньявирусов, которые также инфицируют КРС: вирусом Шамонда, Айно и Акабане [18].

Подобно другим членам семейства *Peribunyaviridae*, SBV представляет собой оболочечный вирус с геномом, состоящим из трех сегментов одноцепочечной (-) РНК, названных в соответствии с их размером: малый (S), средний (M) и большой (L) [267]. Предполагается, что эти сегменты обладают сходством с другими родственными ортобуньявирусами [602]. L-сегмент, кодирует РНК-полимеразу (транскриптазу) вируса; основными белками, кодируемыми S-сегментом, являются нуклеокапсидный белок (N) и неструктурный протеин (N Sm). M-сегментом кодируются поверхностные гликопротеины (Gt и Gz). Поверхностные белки участвуют в прикреплении, слиянии клеток и гемагглютинации, и, соответственно, влияют на вирулентность вируса [6].

Было показано, что последовательности SBV имеют 69% идентичности с последовательностями L-сегмента вируса Акабане, 71% - с M-сегментом вируса Айно и 97% идентичности с S-сегментом вируса Шамонда [465].

Учитывая, что SBV является арбовирусом, антигенный дрейф в его геноме считается ограниченным, поскольку вирус зависит от вектора-переносчика, а те

мутации, которые могут быть полезны для репликации в конечном хозяине, могут быть невыгодными в векторе [341, 595]. Это предположение подтверждается сообщениями о высокой генетической стабильности SBV, выделенного из векторов-переносчиков и конечного хозяина в Польше [217].

У коров заболевание, вызванное SBV, может проявляться угнетенным состоянием, отказом от корма, диареей, гипертермией (температура тела 40 °C и выше), абортами, мертворождением, а также снижением молочной продуктивности более чем на 50%. Клинические признаки у взрослого крупного рогатого скота обычно длятся до 6 дней и тесно связаны с кратковременной вирусемией SBV [465, 473].

Наиболее заметными клиническими признаками, связанными с инфекцией SBV, являются те, которые наблюдаются у потомства животных, инфицированных на критической стадии стельности (4-8-я неделя для КРС) [248, 465]. Как и другие ортобуньявирусы КРС, SBV может вызывать аборт, преждевременные роды или мертворождения, появление мумифицированных плодов и рождение телят с синдромом артрогрипоза-гидранэнцефалии. Заражение SBV на ранних сроках стельности также связывают с эмбриональной смертностью и возвращением к эструсу [519, 545, 561]. Это подтверждается сообщениями о снижении фертильности в стадах, пораженных SBV, в Швейцарии, где было показано увеличение числа осеменений на одну корову для успешного зачатия при искусственном осеменении [148], в Германии и Нидерландах в 2011 г. где также отмечали увеличение числа осеменений на корову, повторный эструс и увеличение числа абортов [545]. У жвачных животных первичным сигналом распознавания беременности является интерферон (IFN-tau), ряд исследований показал, что белок NSs SBV играет главную роль в ингибировании продукции IFN и вносит вклад в патогенез SBV [276, 466, 547].

Поскольку SBV является относительно новым вирусом, патогенез и особенности передачи болезни Шмалленберг изучены все еще недостаточно. Хотя трансмиссивный путь передачи вируса считается основным, а вирус успешно реплицируется внутри насекомых-векторов, рассматриваются и другие возможные

пути передачи. Так, было показано, что экспериментальное внутривенное и подкожное заражение телят в возрасте 9 месяцев ПЦР-положительной кровью приводило к заражению животных, которые заболели и давали положительный результат ПЦР на 2-6-е сутки после инокуляции, при этом оральная или назальная инокуляция вируса не приводила к виремии [6; 248, 465]. Вертикальная передача SBV у КРС продемонстрирована обнаружением вируса в тканях мертворожденных и абортплодов и новорожденных телят с врожденными пороками [539, 546].

Болезнь Шмалленберга не входит в перечень notiфицируемых в ВОЗЖ болезней животных. Представители мирового сообщества придерживаются позиции, что болезнь не наносит значительного экономического ущерба и не представляет риска для животноводства. На основании этого страны ЕС не проводят открытые и широкие мониторинговые исследования, а в случае выявления инфекции страна ограничивается признанием своей территории эндемичной [20].

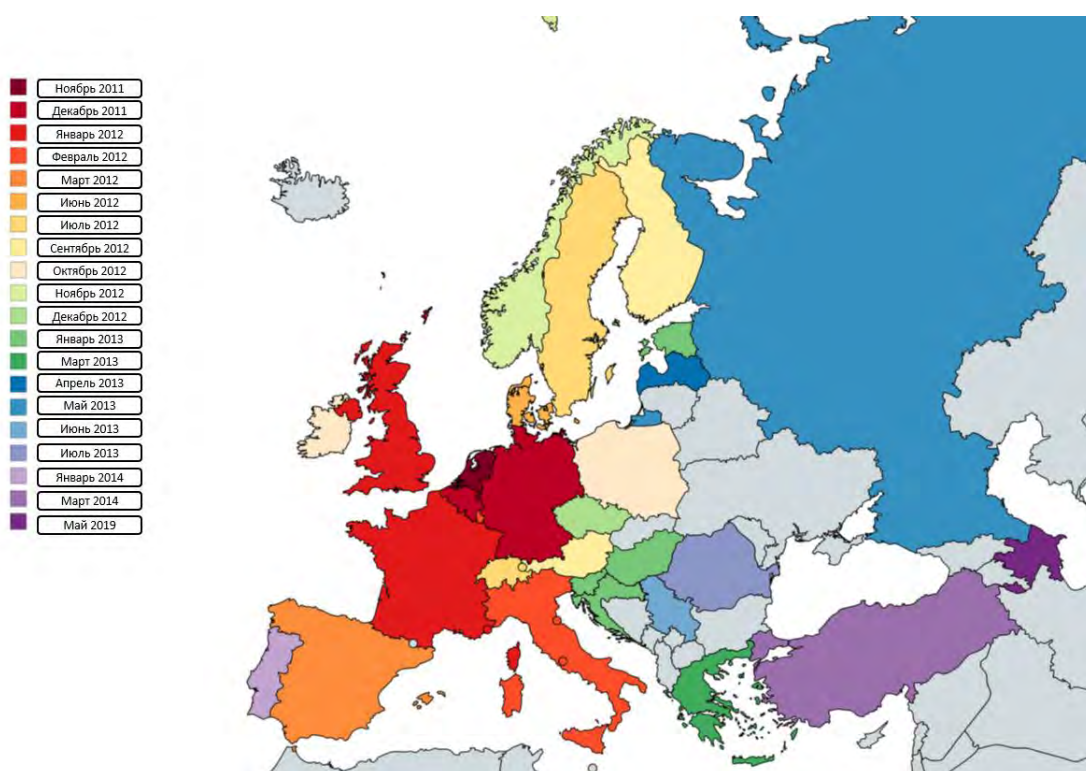


Рисунок 3 – Распространение вируса Шмалленберг в странах Европы с 2011 по 2019 гг (по информации на основании серомониторинга или результатов выявления РНК SBV) [546].

Результаты исследований европейских ученых свидетельствуют о том, что вирус Шмалленберг за 10 лет прочно закрепился на территории Европы [286, 546] (рисунок 3). Серологические исследования, проведенные в ряде регионов России, показали, что у аборигенного скота наблюдается сероконверсия к вирусу Шмалленберг, РНК вируса выявляли в крови как у местного, так и у завезенного скота, что показывает, что этот возбудитель уже циркулирует на территории РФ и может представлять собой серьезную проблему при дальнейшем распространении [18,20, 23, 98]

Передача вируса через сперму КРС

Возможность передачи вируса SBV через сперму быков была предметом активного изучения в нескольких работах [285, 352, 465, 544]. Проведенные сотрудниками Института Фридриха Лёффлера исследования спермы 94 быков с известным статусом антител к SBV на наличие генома SBV выявили 26 положительных партий спермы от 11 быков [285]. В другой работе сообщалось о выявлении антигена вируса в 29 из 766 партий спермы от 11 из 95 SBV-инфицированных быков. В исследовании была отмечена прерывистая экскреция вируса у 2 быков, также у 4 быков отмечена возможность появления вируса в сперме в период появления ранних антител. У быков с сероконверсией и продолжительным выделением вируса в сперме РНК SBV преимущественно обнаруживали во фракции семенных клеток, тогда как у быков с единичными положительными результатами РНК вируса выявляли исключительно в семенной плазме [465].

В другой работе европейских ученых также было показано наличие вируса в сперме быков: у трех из семи инфицированных SBV быков было выявлено 29 положительных партий спермы из исследованных 136 [285]. Методом биопробы было показано, что вирус в сперме быков жизнеспособен и может спровоцировать острую инфекцию у мышей с дефицитом рецептора интерферона α / β (IFNAR - / -) [285, 279, 465]. Интересно, что время обнаружения вирусной РНК в сперме разных быков варьировало от 2-х недель до почти 3-х месяцев после появления антител в

крови у животного, что указывает на то, что вирус может присутствовать в сперме быка до 3 месяцев после заражения [285].

По проблеме предотвращения распространения болезни Шмалленберга, а также по вопросам возможной передачи вируса через сперму, используемую для искусственного осеменения Европейским Союзом и ВОЗЖ были разработаны предложения по тестированию животных и правилам, которым должны следовать центры по сбору спермы КРС [141]. Согласно этим правилам, животные, находящиеся в центрах, должны проходить систематический серологический скрининг каждые 28 дней. В случае выявления сероконверсии у ранее серонегативного донора, все дозы спермы от этого быка, полученные после предыдущего отрицательного серологического теста, проходят ПЦР-тест для обнаружения вирусной РНК, и любые эякуляты, дающие положительный результат, уничтожаются. Быки, возобновляющие производство после периода простоя, систематически должны проходить серологический скрининг перед сбором спермы для определения их статуса.

2.4.5 Вирус Блютанга

Блютанг — это инфекционное трансмиссивное заболевание, поражающее домашних и диких жвачных. В основном это болезнь овец и оленей, но КРС и дикие жвачные животные являются важными резервуарами для вируса.

Блютанг встречается в основном в странах между 40° с.ш. и 35° ю. ш. и является эндемичным для западных штатов США [510]. В настоящее время болезнь зарегистрирована на всех континентах, наблюдается тенденция ее распространения в более северные регионы. С 1999 г. в Европе отмечаются первые вспышки болезни. Первоначально они были зафиксированы в странах южной Европы (Греция, Италия, Корсика и Балканы), но с 2007 года отмечались уже в Германии, Франции и Великобритании. В Канаде и Новой Зеландии блютанг не зафиксирован, а Австралии есть свидетельства его присутствия, но нет клинических свидетельств болезни [388].

КРС играет особенно важную роль в распространении болезни из-за продолжительной виремии при отсутствии клинических проявлений.

Вирус Блютанга (BTV) принадлежит к роду *Orbivirus*, семейству *Reoviridae*. Вирусный геном сегментирован двухцепочечной РНК длиной 19000 п.н., состоящей из 10 сегментов длиной от 800 до 3000 п.н. [51], которые кодируют 4 неструктурных белка (NS1, NS2, NS3 и NS3A) и 7 структурных (VP1–VP7). В настоящее время существует по крайней мере 27 серотипов блютанга [343], которые детерминируются белком VP2, при этом каждый серотип обладает рядом особенностей и не все способны вызывать ярко выраженную болезнь блютанга [510, 603]. Разные серотипы имеют разное географическое распространение.

Для передачи вируса необходимы насекомые-переносчики, и обычно он не передается от животного к животному. Вспышки блютанга чаще случаются летом и очень зависят от количества переносчиков в окружающей среде. Комары *Culicoides* являются основными переносчиками в США, где основным возбудителем является *Culicoides sonorensis*. В Африке и на юге Европы основным видом является *C. imicola*. Недавнее распространение *C. imicola* в районы центральной и северной Европы, которые выходят за пределы северной границы распространения *C. imicola*, свидетельствует о вовлечении новых насекомых-переносчиков и связано с потеплением климата [480].

Влияние на репродукцию КРС показано для отдельных серотипов BTV [510]. Было идентифицировано несколько серотипов вируса, способных вызвать инфицирование плода [170], и во время европейской эпизоотической вспышки с 2007 по 2008 год было признано, что серотип 8 вируса (BTV-8) может проникать через плаценту и приводить к потере плода или рождению инфицированного потомства. Этот серотип, в отличие от ранее изученных, выявляемых в Европе до 2006 года, вызывает ярко выраженные клинические признаки у КРС и приводит к значительному увеличению аборт [350, 583] независимо от стадии стельности.

Возможность передачи вируса блютанга через сперму неоднократно изучалась в различных научных работах [110, 191-193, 411-412, 583]. Было показано, что жизнеспособный вирус может быть выделен из спермы быка с

персистирующей инфекцией в течение 300 дней после заражения [411]. Эксперимент по искусственному заражению быков через вектор-переносчик *Culicoides* показал, что вирус выявляется в сперме не менее 106 дней, при этом его присутствие в сперме не приводит к увеличению количества дефектных сперматозоидов, а у осемененных такой спермой телок обнаруживаются антитела к вирусу [193].

В работе 1994 года вирус был выделен в культуре клеток в двух образцах из 1800 исследованных образцов спермы естественно инфицированных быков [477]. Изучение влияния ВТВ-8 на качество спермопродукции, проведенное немецкими учеными, показало, что инфицирование не влияло на объем и концентрацию сперматозоидов, но приводило к снижению подвижности сперматозоидов при размораживании криоконсервированной спермы и увеличению количества дефектных сперматозоидов как в свежей, так и в размороженной сперме [260].

В 2021 году опубликованы результаты эксперимента, направленного на изучение особенностей передачи ВТВ-8 через сперму при искусственном осеменении. В общей сложности шесть групп по три телки были осеменены спермой быков, естественно инфицированных ВТВ-8, в результате чего виремия и сероконверсия были определены у 8 из 18 осемененных телок, и вирус в культуре был выделен у пяти из этих животных. Авторами исследования отмечено, что вирусная нагрузка в сперме быков оказывала значительное влияние на частоту инфицирования, время начала виремии после искусственного оплодотворения и срок, на котором произошло прерывание стельности. Кроме того, проведенный эксперимент говорит о возможной связи повторного появления блютанга во Франции в 2015 году с использованием зараженной ВТВ-8 спермы быков [583].

Для профилактики болезни применяют живые аттенуированные и инактивированные вакцины, которые неплохо обеспечивают защиту от инфекции. Имеются данные о том, что вакцинация аттенуированными вакцинами, содержащими 2 и 9 серотипы вируса, приводила к абортам, но количество таких реакций было невысоко и зависело от периода стельности на момент вакцинации.

[170]. В настоящее время разрабатываются вакцины, в которых используются очищенные вирусные белки, а не ослабленные живые штаммы.

Чтобы предотвратить производство спермопродукции, контаминированной ВТV, ВОЗЖ рекомендует собирать сперму у быков, у которых нет клинических признаков блютанга в день сбора спермы, и в течение не менее 60 дней до начала и во время сбора спермы бык-донор спермы:

- находился за пределами неблагополучной по блютангу зоны;
- был защищен от вирусных векторов или
- находился в период отсутствия переносчиков в зоне сезонно-свободной от блютанга.

Чтобы обеспечить отсутствие контаминации спермы вирусом блютанга, рекомендовано также проведение исследований быков-доноров с помощью следующих диагностических тестов:

- тест на наличие антител к вирусам блютанга, по крайней мере, каждые 60 дней в течение периода сбора спермы и между 28 и 60 днями после окончательного сбора серии, либо:
 - выделение вируса из образцов крови, собранных в начале, не реже одного раза в 7 дней в течение, и по завершении сбора спермы для этой партии, или
 - ПЦР-анализ образцов крови, собранных в начале, по крайней мере каждые 28 дней во время и в конце сбора спермы.

2.4.6 Микоплазмы и уреаплазмы КРС

Общая характеристика

Микоплазмы и уреаплазмы — представители семейства *Mycoplasmataceae*, относящиеся к порядку *Mycoplasmatales*, классу *Mollicutes*. Согласно классической микробиологической классификации, одобренной Таксономическим комитетом при Международной организации микоплазмологов, в классе *Mollicutes* в настоящее время выделяют 9 родов: *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*, *Haloplasma* (таблица 2) [11, 71].

Таблица 2 – Таксономия микоплазм [71] с изм. автора.

Класс	Порядок	Семейство	Род	Количество видов
Mollicutes	<i>Mycoplasmatales</i>	<i>Mycoplasmataceae</i>	<i>Mycoplasma</i>	233
			<i>Ureaplasma</i>	10
	<i>Acholeplasmatales</i>	<i>Acholeplasmataceae</i>	<i>Acholeplasma</i>	21
	<i>Entomoplasmatales</i>	<i>Entomoplasmataceae</i>	<i>Entomoplasma</i>	6
			<i>Mesoplasma</i>	13
		<i>Spiroplasmataceae</i>	<i>Spiroplasma</i>	39
	<i>Haloplasmatales</i>	<i>Haloplasmataceae</i>	<i>Haloplasma</i>	1
	<i>Anaeroplasmatales</i>	<i>Anaeroplasmataceae</i>	<i>Anaeroplasma</i>	4
			<i>Asteroplasma</i>	1

Класс *Mollicutes* насчитывает более 200 видов, представители которых значительно отличаются от других *Eubacteria* (таблица 3) и считаются самыми мелкими самовоспроизводящимися микроорганизмами с геномом от 580 до 1380 тысяч пар нуклеотидных оснований. [161, 520, 522]. Не имея клеточной стенки, эти бактерии, по существу, имеют трехслойную клеточную мембрану со встроенными стеринами, рибосомами и кольцевыми двухцепочечными молекулами ДНК. Отсутствие клеточной стенки обуславливает их полиморфность и устойчивость к антибиотикам, влияющим на процесс синтеза клеточной стенки бактерий [161, 458].

Благодаря наличию нескольких систем, обеспечивающих вариабельность структуры и экспрессии поверхностных белков, микоплазмы хорошо адаптируются и наилучшим образом взаимодействуют с организмом-хозяином. Поверхностные липопротеины микоплазм, кодируемые семейством генов *vsp*, способны с высокой частотой меняться как *in vitro*, так и *in vivo*, что приводит к значительной вариабельности штаммов [74, 272, 313].

Таблица 3 – Отличия *Mollicutes* от других представителей класса *Eubacteria*

Характеристика	<i>Mollicutes</i>	Другие <i>Eubacteria</i>
Клеточная стенка	Отсутствует	Присутствует
Плазматическая мембрана	Содержит холестерин (у большинства видов)	Не содержит холестерин
Размер генома	580–2200 т.п.н.	1050 - >10000 т.п.н.
G+C состав	23–40%	25–75%
Количество рРНК оперонов в геноме	1-2	1-10
Размер 5S рРНК	104–113 п.н	>114 п.н.
Использование UGA кодона	Кодирование Триптофана	Стоп-кодон
Количество генов тРНК	Около 30	Около 80
РНК-полимераза	Рифампин-резистентная	Рифампин-чувствительная

Ряд характеристик микоплазм позволяет им образовывать колонии и биопленки, сохраняться на поверхностях слизистых оболочек, проникать в ткани и противостоять агрессивному иммунному ответу, а также быть устойчивыми к высыханию и тепловому стрессу [164; 187]. В отличие от других бактерий, экспрессия у микоплазм осуществляется из чрезвычайно ограниченного набора генов. Адгезия микоплазм, необходимая для дальнейшего примембранного существования или последующей инвазии, является важным механизмом вирулентности этих микроорганизмов, что подтверждается изучением авирулентных штаммов, неспособных к прикреплению [74, 521]. Способность к примембранному существованию, внутриклеточная инвазия и высокая выживаемость микоплазм в различных условиях способствует сохранению этих патогенов и их распространению в организме хозяина [428]. Одним из продуктов метаболизма у таких видов микоплазм, как *Mycoplasma bovis* и *M. agalactiae* является пероксид водорода, который может быть одним из факторов патогенности при микоплазмозах [385, 448].

Из-за редуцированного генома микоплазмы не могут синтезировать ряд аминокислот и, в зависимости от вида, полностью или частично не способны синтезировать жирные кислоты. Эти вещества микоплазмы получают из клетки хозяина, а при культивировании они должны входить в состав микробиологических сред. *Mycoplasmataceae* можно культивировать в жидкой или на плотной среде, они практически не вызывают помутнения бульона, а рост бактерий можно подтвердить изменением рН среды [71]. На плотном агаре микоплазмы формируют колонии, напоминающие по виду яичницу размером от 50 до 500 мкм. Такая форма образуется в связи с тем, что центральная часть колонии, которую окружает зона поверхностного роста, врастает в агар.

Подбор сред для культивирования микоплазм является непростой задачей. Питательная среда, используемая для выращивания микоплазм, должна быть высокообогащенной инфузией бычьего сердца, содержать сыворотку, дрожжевой экстракт, пептон и другие добавки с буферизацией до конечного значения рН 7,3–7,8 [383]. Чтобы предотвратить чрезмерный рост быстрорастущих бактерий, в качестве селективных агентов добавляют антибиотики и/или ацетат таллия. Для культивирования *Ureaplasma* из-за особенностей ее метаболизма в среду добавляется мочевины, и рН среды доводится до 6,0. Идентификация колоний проводится визуально или с помощью световой микроскопии [597].

Отсутствие клеточной стенки делает микоплазмы устойчивыми к антибиотикам, основной механизм действия которых заключается в подавлении процесса синтеза клеточной стенки бактерий (бета-лактамы, пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и др.). Сообщают о низкой эффективности против микоплазм и ряда других антимикробных веществ, например, полимиксинов, сульфонамидов, триметоприма, рифампицина и налидиксовой кислоты [59, 138, 454, 588]. Активны против микоплазм могут быть линкозамиды, фторхинолоны, плевромутилины, фениколы и аминогликозиды, однако в последнее время растет число резистентных штаммов микоплазм и к этим группам препаратов [138, 315].

Роль микоплазм в патологии КРС

Микоплазмы часто играют роль секундарной микрофлоры, присоединяясь к патологическому процессу, вызванному другими микроорганизмами, но могут выступать и в качестве первичных этиологических агентов. Выделенный в 1898 году первый представитель, отнесенный к роду *Mycoplasma*, *M. mycoides subsp. mycoides*, был охарактеризован как возбудитель контагиозной плевропневмонии КРС [456, 463]. Это серьезное заболевание, распространившееся во всем мире в 19-м веке, в настоящее время успешно ликвидировано на разных континентах, за исключением Африки, где до сих пор остается серьезной проблемой [287]. Несколько других видов *Mycoplasmataceae* с разной степенью клинической значимости выявляют у КРС (таблица 4). К таким видам относят *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. californicum*, *M. bovirhinis*, *M. bovoculi*, *M. leachii* (ранее *Mycoplasma spp. bovine group 7*), *M. canis*, *M. canadense*, *M. alkalescens*, *M. arginini*, *M. wenyonii* и *Ureaplasma diversum* [458, 489, 597].

Микоплазмы крайне широко распространены по всему миру и способны вызывать многочисленные заболевания, в том числе маститы, артриты, кератоконъюнктивиты, пневмонии и репродуктивные патологии КРС. Основным источником инфекции является контакт с инфицированным животным [551]. Риски заражения возрастают при перемещении животных, введении в стадо новых животных, контактах на ярмарках и выставках [445; 447]. Другими хорошо известными рисками являются перенос эмбрионов, передача через зараженное оборудование и окружающую среду, передача воздушно-капельным путем и при искусственном оплодотворении [270, 375, 620]. Микоплазмы могут попасть в организм при вдыхании контаминированных микрокапель и частиц пыли. Заражение телят также может происходить и в результате вертикальной передачи. Источником инфекции для телят часто может являться молоко маститных коров, содержащее представителей *Mycoplasma* [397].

Таблица 4 – Представители семейства *Mycoplasmaceae*, возбудители инфекций КРС (Источник: 458 с изм. автора)

Вид	Вызываемая патология
<i>Mycoplasma alkalescens</i>	Маститы, артриты, бронхопневмонии телят
<i>Mycoplasma arginini</i>	Инфекционный кератоконъюнктивит
<i>Mycoplasma bovigenitalium</i>	Маститы, эндометриты, бесплодие, некротический вульвовагинит
<i>Mycoplasma bovis</i>	Маститы, артриты, отиты, аборт, менингиты и др., пневмония телят
<i>Mycoplasma bovirhinis</i>	Респираторные заболевания
<i>Mycoplasma bovoculi</i>	Инфекционный кератоконъюнктивит
<i>Mycoplasma californicum</i>	Маститы, артриты, пневмонии
<i>Mycoplasma canis</i>	Оппортунистические инфекции репродуктивного и респираторного тракта
<i>Mycoplasma canadense</i>	Респираторные заболевания
<i>Mycoplasma dispar</i>	
<i>Mycoplasma leachii</i>	Полиартрит
<i>Mycoplasma mycoides</i>	Контагиозная плевропневмония
<i>Mycoplasma wenyonii</i>	Гемолитическая анемия
<i>Ureaplasma diversum</i>	Вульвовагинит, эндометриты, сальпингиты, аборт, бесплодие и рождение слабого потомства

Mycoplasma bovis, второй по значимости патоген микоплазменной природы у КРС, впервые была изолирована в США еще в 1961 году от коровы с тяжелой формой мастита [74, 198]. Возбудитель за короткое время распространился во многие страны, включая Израиль (1964 г.), Испанию (1967 г.), Австралию (1970 г.), Францию (1974 г.), Великобританию (1974 г.), Чехословакию (1975 г.), Германию (1977 г.), Данию (1981 г.), Швейцарию (1983 г.), Марокко (1988 г.), Южную Корею (1989 г.), Бразилию (1989 г.), Северную Ирландию (1993 г.), Ирландскую Республику (1994 г.), Южную Африку (2005 г.) [74, 458]. Именно для этого вида показана высокая серопревалентность в стадах КРС в Европе и Америке и высокая частота выявления в легких телят при пневмониях. Значимость *M. bovis* связана с влиянием, которое этот микроорганизм оказал на животных с момента его обнаружения в странах Европы [457]. Lamt с соавторами в 2004 году показали, что *M. bovis* являлась причиной отитов у коров в США [452]. А выявление *M. bovis* из

абортированных плодов и головного мозга крупного рогатого скота с неврологическими признаками и отитом в Великобритании и Ирландии предполагают еще более широкую роль *M. bovis* в заболеваниях КРС, чем считалось ранее [369]. *M. bovis* считается одной из причин развития пневмонии телят, взрослый скот также восприимчив к этому виду микоплазм.

Заболеваемость телят, обусловленная *M. bovis*, достигает 35%, а смертность, в зависимости от штамма, может составить 10%, [458]. При развитии пневмонии *M. bovis* часто выявляется на фоне вирусных инфекций и в ассоциации с другими бактериями. Пневмония может возникать как единственное проявление инфекции или в сочетании с другими клиническими признаками, включая полиартрит у взрослых животных и средний отит у телят [202, 421, 483]. Серьезной проблемой для производителей молока являются маститы, вызываемые *M. bovis* [459, 587]. Сообщение о вспышке микоплазменного мастита, вызванного другой микоплазмой КРС, *M. bovigenitalium*, впервые было опубликовано в Англии в 1960 году [458]. При маститной патологии на втором по распространенности месте после *M. bovis* находится *M. californicum*, которая вызывает также артриты и пневмонии у молодых животных [271, 413]. Многочисленные статьи подтверждают распространенность этих микоплазм, а также *M. canadense*, *M. dispar*, *M. alkalescens*, *M. canis* у КРС в разных странах [160, 164, 229, 345, 347, 392, 458-459, 515].

Из-за растущей устойчивости выявляемых штаммов к большинству противомикробных препаратов, за исключением пока что фторхинолонов, и общих трудностей в терапии микоплазменных инфекций, в качестве перспективы для борьбы с этими инфекциями является использование вакцинации [255, 454, 459]. В настоящее время в США разработаны и применяются две инактивированные вакцины для профилактики болезней, вызванных *M. bovis* - МрВ Guard™ и Мусо-В ONE DOSE™ [255]. Эффективность двух других вакцин, коммерчески доступных в США, Мусомуне® R и Pulmo-Guard™ МрВ, проверенная в слепом систематически рандомизированном полевом испытании на 200 телятах, была оценена в 44% и менее 1% соответственно [167]. Было показано, что ни одна из

вакцин не защищает от колонизации *M. bovis* верхних дыхательных путей и от заболеваемости отитом. Кроме того, не было обнаружено значительных различий между вакцинированными и контрольными животными в оценке сывороточных антител и ответов выбранных цитокинов, однако отмечено заметное повышение концентраций цитокинов IL-1 β и TNF- α после вакцинации [167, 255]. В странах Европы и в России вакцины для профилактики микоплазменных инфекций КРС не зарегистрированы.

Микоплазмы часто выделяют из половых путей КРС, уже длительное время обсуждается роль разных видов микоплазм в развитии бесплодия, эндометрита и гранулярного вульвовагинита, сопровождающегося хроническими мутными или слизисто-гнойными выделениями и поражениями слизистой оболочки вульвы. В своей работе, описывающей микоплазменные инфекции КРС, Nicholas с соавторами называют виды *Ureaplasma diversum*, *M. bovis* и *M. bovigenitalium* основными представителями *Mycoplasmataceae*, для которых роль в развитии патологии органов репродукции видов является доказанной [325, 451, 458].

M. bovigenitalium может обнаруживаться в образцах спермы или смывах с препуция крупного рогатого скота, часто вместе с видами *Ureaplasma* и *M. bovis* [152, 291, 293, 374, 387]. Показано, что *M. bovigenitalium* часто может служить причиной некротического вульвовагинита, наносящего ущерб хозяйствам, занимающимся разведением КРС [345]. Микоплазмы и уреаплазмы также связывают со спорадическими случаями эпидидимита, орхита, уретрита и семенного везикулита, заражение быка этими микроорганизмами приводило к боли при эякуляции [458]. *M. bovigenitalium* выделяли у коров с вульвовагинитом и бесплодием, также часто в этих случаях была выявлена уреаплазма [527]. В нескольких работах говорится об обнаружении *M. bovigenitalium*, вместе с *M. bovis* и *M. californicum* в маститном молоке и выделениях вымени [157, 371]. Во время вспышки гранулематозного вульвовагинита у телок откормочной площадки *M. bovigenitalium* изолировали от пораженных животных вместе с *M. bovis*, вирусом герпеса КРС 1 типа и *Moraxella bovis*, что указывает на многофакторную этиологию заболевания [321]. Серологические доказательства причастности *M. bovigenitalium*

к заболеваниям органов репродукции были представлены в нескольких исследованиях, в которых показано, что антитела к *M. bovis genitalium* чаще обнаруживаются у КРС с репродуктивными нарушениями, чем у здоровых животных [144; 314].

Инфекционность *M. bovis* для репродуктивного тракта крупного рогатого скота была продемонстрирована в экспериментальных исследованиях. Еще в 1964 году были описаны поражения половых органов, включая эндометрит, сальпингит и сальпингоперитонит, у семи из восьми телок после экспериментальной маточной инокуляции *M. bovis* (*Mycoplasma agalactiae* var. *Bovis*) [289], в то время как еще в 1976 году ученые сообщали о плацентите, гибели плода и абортах после внутриматочной инокуляции [491]. Потенциал передачи микоплазм через замороженную сперму исследовали Hirth с соавторами [334]. В исследовании из 12 телок, осемененных спермой, содержащей *M. bovis*, микоплазма выделялась у 12, 6 и 1 животного на 8, 20 и 32 неделе исследования, соответственно. У 8 телок было показано наличие хронического гнойного сальпингита, хронического эндометрита и спаек яичников [334].

Экспериментально показано, что при естественном осеменении телок быком с большим количеством *M. bovis genitalium* в крайней плоти, у телок развивались слизисто-гнойные выделения из влагалища, а биопсия эндометрия показала некротический эндометрит. При этом *M. bovis genitalium* была изолирована в чистой культуре [405]. В другом исследовании *M. bovis genitalium*, при попадании в организм телок со спермой быка при осеменении, также вызывала развитие вульвовагинита и слизисто-гнойных выделений из влагалища. При этом жизнеспособная *M. bovis genitalium* была выделена из стенки влагалища, шейки матки, матки, яйцеводов и яичников у 8 из 12 инокулированных телок [274, 538]. Хотя в других работах указывалось, что попытки вызвать поражения в матке или яйцеводах с помощью внутриматочной, интравагинальной или интраназальной инокуляции *M. bovis genitalium* потерпели неудачу [333; 387]. Предполагается, что развитие или отсутствие поражений в репродуктивных органах может быть связано с различной патогенностью штаммов *M. bovis genitalium* [274, 387, 538].

M. bovigentialium – вид, часто выделяемый из репродуктивного тракта быков [168, 273, 299, 308, 511, 480, 586]. Общеизвестно, что крайняя плоть и отверстие уретры являются наиболее часто инфицированными областями [387].

В различных работах показано, что и другие виды *Mycoplasma* (например, *M. alkalescens*, *M. arginini*, *M. bovirhinis*, *M. californicum*, *M. canadense*) могут быть выделены из половых путей КРС и спермы, а также из абортплодов, однако их роль в развитии патологического процесса до конца еще не ясна [173, 380, 420, 480].

Ureaplasma diversum также является частым обитателем половых путей КРС и может обнаруживаться во влагалище и преддверии, реже – в матке и маточных трубах. Инфекцию коров *U. diversum* ассоциировали с гранулярным вульвовагинитом [294]. У быков уреоплазма может приводить к везикулиту, гранулярному баланопоститу и нарушению морфологии сперматозоидов [242]. Гнойные поражения, возникающие у коров при уреоплазмозе, напоминают поражения, вызываемые ВНВ-1, однако, у животных без таких явных поражений, также выделяли *U. diversum* [480]. Существует предположение, что половой путь является одним из самых важных при передаче уреоплазмы. Зараженная уреоплазмой сперма, используемая при искусственном осеменении, способствует развитию хронического эндометрита [480].

2.4.7 Кампилобактерии

Кампилобактерии, представители рода *Campylobacter* - грамотрицательные подвижные бактерии, имеющие в культуре вид тонких палочек букв S или V, спирали или штопора с одним или несколькими завитками. В род *Campylobacter*, по последним данным, включают более 33 видов, наиболее известными из которых являются *C. fetus*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. sputorum* и *C. lari*. Внутри вида *C. fetus* выделяют три подвида: *C. fetus subsp. testudinum*, *C. fetus subsp. fetus* и *C. fetus subsp. venerealis*, из которых первый подвид ассоциирован с рептилиями, а два других – выделяют от млекопитающих. Хотя клинические признаки, связанные с инфекциями, вызываемыми подвидами *C. fetus* у КРС, частично совпадают,

разделение на подвиды изначально основывалось на различиях в клинических проявлениях [300; 596] Подвидом, вызывающим бесплодие КРС, является *C. fetus subsp. venerealis*. *C. fetus subsp. fetus* обычно не считается основной причиной бесплодия КРС, хотя может вызывать спорадические аборты [414].

Другие виды *Campylobacter* (*C. coli*, *C. hyointestinalis*, *C. jejuni* и *C. sputorum*) также могут быть выявлены у КРС. Ряд сапрофитных видов *Campylobacter* присутствует в пищеварительном тракте животных или в крайней плоти быка, часто затрудняя выявление патогенных видов.

Растут кампилобактерии на специальных питательных средах при температуре 37-45° С, в анаэробных или микроаэрофильных условиях, являясь требовательными и трудными для выращивания микроорганизмами [54]. Геном кампилобактерий относительно невелик – около 1500 т.п.н., а содержание G+C варьирует от 29 до 47% [605]. Помимо хромосомной ДНК, кампилобактерии могут содержать экстрахромосомные элементы – плазмиды нескольких типов, с которыми может быть ассоциирована их вирулентность и устойчивость к антимикробным препаратам. Размер, G+C состав и количество кодируемых генов в плаزمиде может значительно варьировать [488].

Результаты полногеномного секвенирования штаммов *C. fetus subsp. venerealis* 84-112 и *C. fetus subsp. fetus* 82-40 показали, что их нуклеотидные последовательности гомологичны только на 92,9%, а каждый из штаммов обладает уникальными последовательностями: 180 т.п.н. являются уникальными для штамма 84-112 и 35 т.п.н. – для штамма 82-40 [215]. Сравнительный анализ геномов показывает, что уникальные участки ДНК расположены в разных геномных областях (называемых вариационными областями), разбросанных по синтетическому геномному ядру. Все эти области имеют особенности, указывающие на их появление в результате горизонтального переноса генов, включая сдвиг содержания G+C состава по сравнению с основным геномом, наличие генов, связанных с подвижностью (например, профагов, транспозаз) или близость к генам тРНК, предположительно маркирующих их сайты встраивания в основной геном [215]. В геномах *C. fetus* в результате анализа данных

секвенирования были определены предполагаемые островки патогенности, ответственные за адаптацию микроорганизмов к хозяевам, 12 таких островков было выявлено для *C. fetus subsp. venerealis* и 10 – для *C. fetus subsp. fetus*. Были определены также 17 семейств генов, которые могут потенциально использоваться для диагностических целей, определения патогенности или при разработке вакцин [200].

Передача возбудителя инфекции происходит, в основном, половым путем — при естественном спаривании или искусственном осеменении. При этом от 40% до 75% неиммунных телок заражаются после однократного спаривания с инфицированным быком. Первоначально организм колонизирует влагалище, иногда провоцируя легкие слизисто-гнойные выделения, в течение недели кампилобактерии проникают в матку. Инфекция остается во влагалище у 10-20% инфицированных животных [615]. *C. fetus* вызывает легкий подострый слизисто-гнойный эндометрит, при котором наблюдается значительное скопление лимфоцитов в перигландулярной области. Тяжесть эндометрита максимальна между 8-й и 13-й неделями после первичного инфицирования [278, 615]. Примерно у 25% животных наблюдается инфекция маточных труб, иногда вызывающая сальпингит [532]. Также может возникнуть воспаление шейки матки, вызывающее повышенное выделение слизи. Инфекция не влияет на процесс оплодотворения, но эндометрит приводит к низкой выживаемости эмбриона [615].

C. fetus способен изменять экспрессию своих поверхностных антигенов в ответ на присутствие антител хозяина. Это, вероятно, обеспечивает длительное сохранение (до 10 месяцев) микроорганизма внутри влагалища и является средством, с помощью которого организм ускользает от иммунной системы хозяина [199].

Хотя большинство (более 95%) коров излечивается к концу беременности (стельности), некоторые остаются инфицированными после отела, а 1–2% животных остаются постоянными носителями кампилобактерий [615].

Заражение быка не вызывает видимых повреждений половых путей и не влияет на его репродуктивное поведение или качество спермы. В отдельных

случаях возможно развитие покраснения слизистой оболочки полового члена и препуция, а также появление обильных слизистых выделений в течение первых 2-3 дней после заражения. При этом бык является активным переносчиком *C. fetus* при осеменении [480]. Известны случаи передачи возбудителя через зараженное оборудование для сбора спермы, резиновые перчатки, одежду обслуживающего персонала, подстилку и др. У быков распространение *C. fetus* ограничено покровом полового члена и его головкой, крайней плотью и дистальным отделом уретры. Поскольку микроорганизм живет в криптах покровов полового члена, вероятность длительного бактерионосительства увеличивается с возрастом быка по мере того, как крипты становятся глубже и обширнее (рисунок 4) [480].

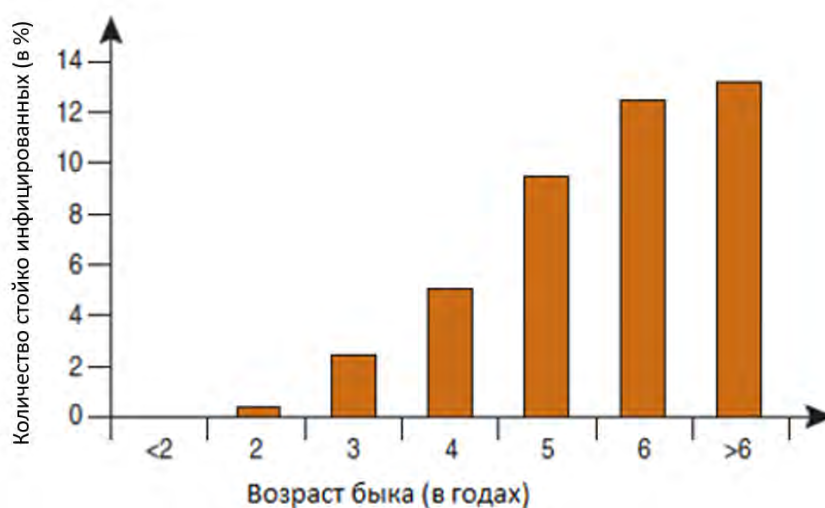


Рисунок 4 – Относительная зависимость постоянного инфицирования *Campylobacter fetus* от возраста быков [480].

Болезнь может протекать остро или хронически, проявляясь в типичной или стертой форме. Клиническими проявлениями кампилобактериоза у коров являются удлинение сервис-периода и продолжительности фазы покоя в половом цикле на 25-40 и более дней, увеличение числа многократных осеменений, а также различные воспалительные процессы репродуктивного тракта – вагинит, эндометрит, сальпингит, оофорит, аборт и задержание последа. Аборты кампилобактериозной этиологии происходят в любой стадии стельности, но чаще (более 80%) на 4-7-м месяце. Абортируют от 10–12 до 30-60% животных из числа

инфицированных. Телята, родившиеся от больных коров, ослаблены, в первые 2–4 дня жизни у них развивается диарея, смерть наступает на 3-7-й день [480].

Хотя имеются коммерческие вакцины для профилактики кампилобактериоза и в отдельных странах используют аутологичные вакцины на основе циркулирующих в хозяйствах изолированных штаммов *Campylobacter fetus*, в целом отсутствуют научные доказательства эффективности вакцинации.

Поскольку кампилобактериоз распространяется половым путем (или при контакте с зараженными объектами), необходим контроль того, чтобы инфицированные животные не попали в восприимчивое стадо. Разведение с помощью искусственного осеменения, считается одной из мер предотвращения распространения кампилобактериоза. Однако для эффективности такой меры необходимо строгое соблюдение рекомендаций по контролю безопасности спермопродукции. Рекомендации, приведенные в Кодексе здоровья наземных животных ВОЗЖ для ввоза спермы быков содержат следующие положения: «Ветеринарные органы импортирующих стран должны требовать представления международного ветеринарного сертификата, подтверждающего, что животные-доноры:

- никогда не использовались для естественного осеменения;
- или использовались только для девственных телок;
- или содержались в учреждении или центре искусственного осеменения, где не зарегистрировано случаев кампилобактериоза КРС» [50].

2.4.8 Бруцеллы

Бруцеллы, представители рода *Brucella* – мелкие коккоподобные грамотрицательные некапсулообразующие неспорообразующие неподвижные палочки [550], являются возбудителями бруцеллеза различных видов животных и человека. Эти микроорганизмы выделяют в собственное семейство *Brucellaceae* в отряде *Rhizobiales*, входящем в класс *Alphaproteobacteria*. Появление большого числа данных об особенностях генома разных бруцелл привели к научному спору об их таксономии и номенклатуре. Было предложено выделять до 34 видов

бруцелл, однако решением Подкомитета по таксономии и номенклатуре бруцелл Международного комитета по систематике прокариот (ICSP) в настоящее время принято наличие 6 видов «классических» бруцелл: *Brucella melitensis*, *Br. abortus*, *Br. suis*, *Br. ovis*, *Br. neotomae* и *Br. canis* [478].

Средний размер генома бруцелл составляет 3300 т.п.н., разделенных на две кольцевые хромосомы разного размера: 2100 т.п.н и 1200 т.п.н. [494]. Есть представители рода *Brucella* с одной мегахромосомой, появившейся, вероятно, при слиянии двух хромосом [247]. Геном бруцелл является консервативным и стабильным благодаря таким характеристикам, как значительное содержание гуанозина и цитозина в ДНК – G+C, состав у микроорганизмов этого рода составляет 57%. Кроме того, в геноме бруцелл отсутствуют свидетельства горизонтального переноса ДНК, наличия плазмид и активных лизогенных фагов [441] или недавних событий внешней рекомбинации [319, 608]. Эти свойства препятствуют приобретению экзогенного генетического материала путем классической рекомбинации или интеграции фага. Основываясь на геномных особенностях и строгой молекулярной классификации, род *Brucella* считается моноспецифическим [197].

Бруцеллез КРС обычно вызывается *Br. abortus*. *Br. melitensis*, передающаяся от овец и коз, также может вызывать заболевания крупного рогатого скота. Хотя некоторые штаммы *Br. suis* были изолированы от КРС, контактировавшего с инфицированными свиньями, этот вид, по-видимому, не вызывает заболевания крупного рогатого скота [533]. *Br. abortus* поражает и других представителей *Bovidae*, кроме *Bos taurus*, включая *Bos indicus*, яков, домашних буйволов и бизонов, а также диких *Bovidae*, *Cervidae* и *Camelidae*, в результате чего инфекция может сохраняться в популяциях диких животных.

Заболевание у молодняка может протекать бессимптомно. После заражения *Br. abortus* или *Br. melitensis* у взрослых коров развивается плацентит, обычно приводящий к аборту между пятым и девятым месяцем стельности. Даже при отсутствии аборта происходит обильное выведение организма с плацентой, фетальными жидкостями и выделениями из влагалища. Молочная железа и

связанные с ней лимфатические узлы также могут быть инфицированы, и организмы могут выделяться с молоком. Последующие стельности обычно доносятся до срока, но инфекция матки и молочной железы повторяется с уменьшением количества микроорганизмов в продуктах последа и молоке. При острых инфекциях организм присутствует в большинстве основных лимфатических узлов тела. У взрослых быков может развиваться орхит или эпидидимит. Бруцеллез может быть причиной бесплодия у обоих полов. Гигромы, обычно поражающие суставы ног, являются частым проявлением бруцеллеза в некоторых тропических странах и могут быть единственным очевидным признаком инфекции.

Бруцеллы способны колонизировать вымя и лимфатические узлы небеременных животных. У стельных коров выработка эритрозола в плаценте способствует быстрому размножению бактерий, что приводит к эндометриту, инфицированию семядолей, плацентиту. Это размножение бактерий, в итоге, приводит к выкидышу [275].

Br. abortus встречается в большинстве стран мира с развитым скотоводством. Из-за огромных потерь, которые причиняет это заболевание, во многих странах оно стало предметом программ ликвидации. В настоящее время *B. abortus* встречается во всем мире, за исключением Японии, Канады, Скандинавии, Люксембурга, Нидерландов, некоторых центральноевропейских стран, Австралии, Новой Зеландии и Израиля, где, по данным ВОЗЖ, бруцеллез был искоренен [480]. По данным, приведенным в работе 2023 года, Великобритания и большинство штатов материковой части США были свободны от этого заболевания [129]. Самый высокий уровень заболеваемости наблюдается на Ближнем Востоке, в Средиземноморском регионе, странах Африки к югу от Сахары, Китае, Индии, Перу и Мексике. В настоящее время в странах Центральной и Юго-Западной Азии наблюдается значительный рост случаев заболевания [616]. Актуальной проблемой является бруцеллез и для Российской Федерации [91].

Бруцеллез — это серьезный зооноз, включенный в список нотифицируемых болезней ВОЗЖ. Болезнь легко передается людям, вызывая как острую лихорадку, так и хроническую форму заболевания, трудно поддающегося лечению.

Большинство вспышек бруцеллеза связано с интродукцией в стадо животных-носителей. Основным источником инфекции являются абортировавшие коровы, у которых сильно контаминированы возбудителем плод, плацента, фетальные жидкости и молоко. Бруцеллы могут попасть в организм из зараженной подстилки, пищи или воды, после контакта с абортированным плодом, инфицированным последом или генитальным экссудатом от недавно абортированной коровы. Телята могут заразиться во время отела или через зараженное молоко. Заражение может происходить также через влагалище и через инфицированную сперму. Согласно опубликованным в 2013 году данным иранских исследователей, 31% исследованной спермы, и более 15% семенников, случайным образом отобранных в центрах искусственного осеменения и на скотобойнях в разных частях Ирана, были ПЦР-позитивны на бруцеллез [384].

Эталонными вакцинами для борьбы с бруцеллезом являются вакцины на основе штамма 19 *Br. abortus* и штамма Rev.1 *Br. melitensis*, с которыми сравнивают все другие вакцинные препараты. Интересно, что в работе исследователей из Бразилии в образцах спермы серонегативных быков был выявлен генетический материал вакцинного штамма 19 *Br. abortus* [332], что подтверждает необходимость дальнейшего изучения болезни, а также может говорить о существующих проблемах диагностики и о сложностях профилактики бруцеллеза.

2.4.9 Хламидии

Возбудители хламидиоза КРС относятся к отряду *Gracillicutes*, порядку *Chlamydiales*, семейству *Chlamydiaceae*.

Chlamydiaceae – граммотрицательные облигатные внутриклеточные бактерии. В 2011 году разделение хламидий на два рода, *Chlamydia* и *Chlamydophila*, ранее предложенное на основании изучения последовательностей гена 16S рРНК, было

пересмотрено и в настоящее время *Chlamydiaceae* снова объединены в род, *Chlamydia* [398].

Отличительной чертой хламидий является наличие сложного двухфазного цикла развития, при котором метаболически менее активные элементарные тельца проникают внутрь клетки организма-хозяина, где дифференцируются в вегетативные ретикулярные тельца, способные к делению [7]: внеклеточные формы хламидий (элементарные тельца) прикрепляются к клеткам-хозяевам и инициируют эндоцитоз, приводя к образованию мембраносвязанного компартмента, тельца включения. После чего элементарные тельца дифференцируются в более крупную внутриклеточную форму (ретикулярные тельца), вступая в сложные взаимодействия хозяин-патоген. В частности, эти бактерии реорганизуют везикулярный транспорт, предотвращают апоптоз, замедляют цикл клеток-хозяев и подавляют воспалительный иммунный ответ за счет подавления транскрипции ядерного фактора В [269]. Наличие таких фаз в жизненном цикле подразумевает изменения в скручивании ДНК, метаболизме и экспрессии ранних, средних и поздних генов [153, 211, 582].

Следствием облигатного внутриклеточного образа жизни хламидий является небольшой размер их генома, который составляет около 1000 т.п.н. и кодирует 850–1100 генов. Такой небольшой размер связывают с высокой степенью оптимизации, а не деградации генома [210]. Анализ геномов хламидий показал, что они имеют минимальный набор генов, необходимый для репликации, транскрипции и трансляции ДНК. Однако наличие хорошо развитых систем репарации и рекомбинации ДНК указывает на то, что хламидии обладают значительной рекомбинационной способностью [7]. Было предсказано, что не более 14 факторов транскрипции (ТФ) регулируют экспрессию генов [252], геномы хламидий имеют низкое количество псевдогенов [467], а порядок генов у разных хламидий отличается высокой степенью консервативности везде, кроме особой зоны пластичности, геномной области, в составе которой были найдены гены факторов вирулентности, например, цитотоксина, перфорины и фосфолипазы D. Наличие или

отсутствие этих факторов вирулентности может играть определенную роль в адаптации к различным хозяевам, вследствие чего сравнительная геномика хламидий часто фокусируется на этом участке генома [149, 210].

У жвачных животных заболевания вызывают, в основном, виды *Chlamydia abortus*, *C. pecorum* и *C. psittaci*, а также, в редких случаях, *C. suis*. Недавно обнаруженный организм *Waddlia chondrophila*, отнесенный к *Chlamydiales*, также может, в редких случаях, вызывать заболевания КРС [528].

Инфицирование хламидиями КРС известно с 1940 года, когда при вспышке спорадического энцефаломиелита КРС были впервые выделены эти внутриклеточные микроорганизмы [426]. После этого в ряде исследований во всем мире сообщалось о случаях абортов КРС, вызванных хламидиями.

Хламидиоз – инфекционная болезнь КРС, характеризующаяся абортами, эндометритами, вагинитами, рождением мертвых и нежизнеспособных телят, энцефаломиелитами, полиартритами, конъюнктивитами, пневмониями, энтеритами, маститами, орхитами, уретритами, баланопоститами [378, 528]. Хламидиозу присущи латентное течение, природная очаговость, широкое распространение на всех континентах, а также потенциальная опасность для человека.

Распространенность хламидий и их роль в развитии патологий системы репродукции КРС является предметом обсуждения [528]. Многие животные, по-видимому, являются носителями инфекции [508], но частота абортов, вызванных этими микроорганизмами, кажется не очень высокой и хламидии в целом не рассматриваются как серьезная угроза для животноводства. Результаты исследований одного из крупных специалистов по хламидийным инфекциям, доктора В. Kaltenboeck с соавторами позволили предположить, что инфекцию КРС хламидиями следует рассматривать скорее, как распространенную, низкоуровневую инфекцию крупного рогатого скота, чем как редкое тяжелое заболевание. Такие инфекции протекают без явных клинических признаков или с

едва заметными проявлениями заболевания, но потенциально могут иметь большое влияние на здоровье и плодовитость животных [378]. В своей работе исследователи выявили генитальные хламидийные инфекции у 61% телят и 53% взрослых телок в США. Предполагалось, что инфицирование произошло в первые недели жизни, и частота заражения увеличивалась из-за скопления животных. При этом, проведенное контрольное исследование показало, что заражение *C. abortus* приводило к снижению фертильности телок [378].

К хламидиозу восприимчив скот независимо от возраста, пола и породы. Источниками возбудителя инфекции являются больные животные с явными клиническими признаками инфекции и животные-носители. Продолжительность хламидионосительства может составлять 2–3 года. Также источником возбудителя хламидийной инфекции для КРС могут быть птицы (воробьи, голуби и др.), и млекопитающие (кошки и грызуны).

Хламидии выделяются со многими секретами и выделениями, включая влагалищные, глазные и назальные жидкости, фекалии и мочу. Микроорганизмы также присутствуют в абортированном материале, включая плод и плаценту, а также в сперме быков [132, 427, 498]. В работе 2007 года было показано, что в 9,2% образцов спермы, в 10,7% смывов с препуция и в 18% образцов фекалий быков из шести стад в Германии обнаруживались хламидии трех видов, при этом *C. abortus* была третьей по встречаемости [577]. А в исследовании ученых из Швейцарии подтверждено наличие хламидий в 6,6% образцов свежей и криоконсервированной спермы быков [498].

Заражение КРС, вероятно, происходит алиментарно, но распространение через сперму инфицированных быков, судя по полученным результатам исследований также представляется возможным [409, 498, 577]. После инфицирования коровы в эндометрии происходит колонизация и репликация хламидий, что приводит к эндометриту [427] и гибели эмбриона [622].

Инкубационный период заболевания варьируется от 5 до 125 дней при экспериментальных инфекциях [562]. Некоторые животные заражаются и abortируют в один и тот же сезон, тогда как другие после заражения могут остаться

инфицированными и аборттировать в следующем сезоне. Повторное заражение КРС тоже приводит к снижению плодовитости [480, 508].

Влияние хламидий *C. abortus* и *C. psittaci* на подвижность сперматозоидов в сперме быка изучено в 2019 году. Было показано, что жизнеспособные хламидии обоих видов снижали подвижность сперматозоидов примерно через 9 часов инкубации. Авторы, принимая во внимание скорость связывания и потерю собственной подвижности сперматозоидов сделали вывод, что влияние хламидий на снижение подвижности сперматозоидов можно считать незначительным и связанным с прикреплением хламидий к сперматозоидам. Около двух третей хламидий были связаны с передней третью сперматозоидов, акросомной областью, а включений хламидий в сперматозоиды не наблюдалось после 2-часовой совместной инкубации. Авторы работы полагают, что сперматозоиды могут служить носителем для хламидий, способствуя прохождению хламидиями шейки матки КРС. Кроме того, прикрепление хламидий к области акросомы может повлиять на оплодотворяющую способность спермы, приводя, таким образом, к снижению фертильности животных [358].

2.4.10 Лептоспиры

Род *Leptospira* является единственным представителем семейства *Leptospiraceae*, входящего в порядок *Leptospirales* и включает в себя, по последним данным, более 70 видов, 42 из которых на заседании Подкомитета по таксономии *Leptospiraceae* Международного комитета по систематике прокариот в 2019 году были признаны новыми видами [407]. Лептоспиры относятся к спирохетам, которые обладают уникальными морфологическими характеристиками в бактериальном мире. Они имеют форму спирали и внутренний двигательный орган, эндофлагеллум, что придает им большую подвижность даже в самых вязких средах. Видообразование лептоспир основано на гомологии ДНК [407]. При этом традиционно классификацию патогенных лептоспир проводят на основе их антигенной структуры, изучаемой в серологических реакциях.

Распознано более 300 различных сероваров лептоспир, которые распределены по 25 серогруппам [490]. Большинство патогенных сероваров встречаются среди видов с глобальным распространением: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* и *L. kirschneri*. На территории России выявляют до 30 сероваров, при этом лептоспиры серогрупп Pomona, Tarassovi, Icterohaemorrhagiae, Hebdomadis, Grippotyphosa, Sejroe и Canicola чаще всего вызывают болезни животных [56].

Геном *Leptospira spp.* состоит из двух кольцевых молекул ДНК, совокупная длина которых колеблется от 3900 до 4600 т.п.н., что больше, чем у других спирохет. Эта вариабельность длины генома связана с высокой адаптивностью лептоспир и способностью жить в разнообразных средах и приспосабливаться к широкому кругу хозяев [317, 611]. Более крупная хромосома содержит гены, кодирующие белки репликации (*dnaA*, *dnaN*, *gyrA*, *gyrB*) и большую часть генов домашнего хозяйства, в то время как вторая хромосома больше напоминает кольцевую плазмиду и содержит точку начала репликации, напоминающую плазмидную, а также ряд существенных генов, участвующих в синтезе аминокислот. В геноме лептоспир выявлены псевдогены и гены транспозаз, которые составляют соответственно 2% и 1% от генома патогенных лептоспир. Геном характеризуется низким G+C составом, значение которого составляет 34–41%. Последовательности генома кодируют от 3085 до 3600 предполагаемых генов. Для почти 40% генов функции еще окончательно не определены [296]. Разные виды лептоспир отличаются размером генома и набором генов, ассоциированных с патогенностью, в том числе адгезинов, гемолизинов, генов, определяющих способность к защите от иммунной системы хозяина [14, 296] (таблица 5).

Лептоспироз распространен по всему миру, большое количество крупного рогатого скота поражено лептоспирами. Заражение КРС чаще всего происходит лептоспирами серогрупп Pomona, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Hebdomadis, и Sejroe, реже – Canicola и Tarassovi [5, 102].

В зарубежных источниках упоминается возможность заражения КРС лептоспирами серовара Hardjo, штаммами, адаптированными к КРС, Hardjo bovis и Hardjo prajitno [406], а также штаммами *L. interrogans* серовара Pomona,

адаптированными к свиньям. В Великобритании в работе 1986 года на основе микробиологических исследований оценили распространенность лептоспироза примерно в 60% [499]. Для Нового Южного Уэльса в 1991 году было определено, что 27% крупного рогатого скота являлись положительными на *L. interrogans* серовар Pomona, 16% - на серовар Hardjo и 31% - на оба серовара [386].

Таблица 5 – Характеристики геномов лептоспир (Источник: 296 с изменениями автора)

Характеристика	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. interrogans</i>
Размер генома	3 931 791 п.н.	4 627 366 п.н.
G+C состав	41,1%	35,1%
Количество генов (без учета транспозаз)	2844	3379
Количество псевдогенов	368	41
Количество транспозаз	241	26
Видоспецифичные гены	265	627

Заболевание КРС лептоспирозом может протекать в острой и хронической формах. Признаками острого лептоспироза являются внезапное появление агалактии у взрослых дойных коров и овец; желтуха и гемоглобинурия, особенно у молодых животных; менингит. Хронический лептоспироз характеризуется абортами, мертворождением, рождением слабого потомства, преждевременными родами; бесплодием. Хронически инфицированные животные могут оставаться носителями в течение многих лет или пожизненно и служить резервуарами инфекции для других животных и людей. Риск заражения лептоспирами увеличивается при высокой плотности носителей и наличии восприимчивых животных. Выживание лептоспир в окружающей среде зависит от колебаний температуры и влажности. Защелачивание среды вплоть до pH 9,8 они переносят хорошо, однако в более щелочной среде бактерии необратимо утрачивают подвижность [99]. Низкая влажность и pH за пределами диапазона 6–8 вредны для их выживания в окружающей среде, тогда как теплые влажные условия

способствуют их выживанию. Лептоспиры могут длительно сохраняться во влажной почве или стоячей воде, а риск заражения *Leptospira* увеличивается в периоды сильных дождей.

Инфекция может проникнуть через ссадины на коже или через слизистые оболочки глаза, рта или носа. После инфицирования короткий латентный период (5–14 дней) сменяется бактериемией, которая, если она вызвана адаптированным к хозяину сероваром (например, *L. interrogans* сер. Hardjo), вызывает относительно легкие симптомы. При этом заражение неадаптированным штаммом (например, *L. interrogans* сер. Pomona) приводит к острому, тяжелому, иногда смертельному заболеванию. Бактериемия длится от 4 до 5 дней, после чего у животного вырабатывается иммунный ответ против лептоспир. После этого бактерии локализуются в тканях, недоступных для антител, особенно в канальцах почек [419]. Колонизация почек приводит к выделению лептоспир с мочой в течение периода времени, который длится от нескольких недель до всей жизни животного [480]. Экскреция с мочой является основным источником контаминации окружающей среды и прямого заражения как других коров, так и людей. Вопрос о передаче лептоспир через сперму быков остается открытым. В одном эксперименте у коров, искусственно осемененных спермой серопозитивного быка, с титром от 1/100 до 1/800, методом культивирования и непрямого иммунофлуоресцентного анализа не было подтверждено инфицирование лептоспирами мочи, почек и репродуктивного тракта (фаллопиевых труб, эмбрионов и матки небеременных самок) [312]. При этом показано, что лептоспиры неплохо переносят криоконсервацию спермопродукции, что говорит о возможности их передачи через спермопродукцию при искусственном осеменении [239, 499], а их присутствие во жидкостях влагалища может указывать на возможность прямой передачи половым путем [331].

2.4.11 Коксииеллы

Опасным патогеном, вызывающим заболевания как у животных, так и у человека, является *Coxiella burnetii*. Коксииелла - облигатный внутриклеточный

паразит, полиморфная грамотрицательная палочковидная бактерия, вызывающая Ку-лихорадку у человека и коксииеллез животных.

Coxiella burnetii принадлежит к группе γ -протеобактерий и является представителем единственного рода собственного семейства *Coxiellaceae*, входящего в отряд *Legionellales* [133].

В жизненном цикле коксииелл выделяют два клеточных типа. Одним из типов является малая клеточная форма, (SCV, small cell variant), характеризующаяся высокой устойчивостью к факторам внешней среды и высокой инфицирующей способностью. Вторым типом является большая клеточная форма (large cell variant, LCV) [73, 422, 423]. Форма LCV имеет больший размер ($>0,5$ мкм), метаболически активна и имеет меньшую электронную плотность. Эта форма имеет диспергированный нитевидный хроматин и обладает четко различимыми внешней и цитоплазматической мембранами с обнаженным липополисахаридом на поверхности, что имеет общие черты с грамотрицательными бактериями. Эта форма чувствительна к снижению осмотического давления. Форма SCV представляет собой небольшие стержнеобразные бактерии размером обычно от 0,2 до 0,5 мкм. Они очень компактны и обладают низкой метаболической активностью. Некоторыми структурными характеристиками SCV являются электронно-плотный и конденсированный хроматин и необычная клеточная оболочка, характеризующаяся большим количеством поперечных связей в пептидогликанах, что, по-видимому, повышает стабильность в окружающей среде [423]. SCV устойчивы к осмотическому шоку, окислительному стрессу, тепловому шоку, обработке ультразвуком и давлению, что является одной из причин того, что *C. burnetii* может противостоять суровым условиям окружающей среды [163]. При пассировании на эмбрионах или в культурах клеток у коксииелл отмечен переход из вирулентной фазы (фаза I) в авирулентную фазу (фаза II), что связывают с изменением размера полисахаридных цепей в липополисахаридах [309, 487]. При этом в природе коксииеллы существуют в фазе I, обладающей большей вирулентностью [88].

По сравнению с другими облигатными внутриклеточными бактериями изоляты *C. burnetii* имеют относительно большой кольцевой геном размером примерно 2000 т.п.н. Кроме того, в охарактеризованных изолятах были выявлены несколько типов плазмид размером от 36 до 56 т.п.н. [212, 219, 461, 581]. К настоящему времени у коксиелл идентифицировано 2134 последовательности генов. Эти гены определяют способность коксиелл к адгезии, инвазии, влияют на интенсивность внутриклеточного транспорта, модуляции хозяина и других функциях, связанных с вирулентностью [73]. Среди всех обнаруженных последовательностей генов 719 (33,7%) не имеют гомологов у других бактерий. Эти гипотетические гены могут отвечать за функции, важные в уникальном цикле развития *C. burnetii*. Анализ генома также выявил наличие многочисленных мобильных элементов и псевдогенов, которые являются дисфункциональными родственниками генов, утративших способность кодировать белок. Обнаружены также более 29 инсерционных последовательностей, что нетипично для облигатных внутриклеточных бактерий. Многочисленные псевдогены указывают на то, что редукция генома — это продолжающийся процесс, отражающий все еще продолжающуюся адаптацию к облигатному внутриклеточному образу жизни [512].

Коксиеллез характеризуется множественностью источников и факторов заражения, а также разнообразием путей заражения и чрезвычайно широким ареалом распространения. Являясь зоонозным заболеванием с длительным самостоятельным существованием внутрисадных очагов, коксиеллез фиксируется у людей в Африке, Австралии, Новой Зеландии, США, в странах Европы, Средней Азии, в ряде стран Южной Америки [88, 96, 505]. В разных странах периодически регистрируются случаи коксиеллеза, которые обусловлены заражением людей во время пребывания на неблагополучных по данной инфекции территориях или заражением от завозимых инфицированных животных или материалов животного происхождения [43].

Восприимчивыми к коксиеллезу являются все виды сельскохозяйственных животных, при этом жвачные животные, такие как КРС, овцы и козы, считаются

основной причиной возникновения вспышек заболевания у людей, что было показано при расследовании вспышки Ку-лихорадки в Нидерландах в 2007–2010 гг. и изучении причин ежегодных небольших вспышек в Германии [578]. У животных коксиеллез часто протекает бессимптомно. Инкубационный период у животных может составлять от 1 до 14 дней, хотя в некоторых источниках указано, что инкубационный период может длиться до 32 дней [55; 96]. Патоген обладает тропностью к репродуктивным органам и плоду [506], с ним могут быть ассоциированы аборт, недоношенность плода и бесплодие крупного и мелкого рогатого скота. У больных животных происходит активное выделение патогена во внешнюю среду с мочой, последом и фекалиями, а устойчивость коксиелл к факторам внешней среды и высокая инфицирующая способность приводит к распространению возбудителя, особенно активно происходящему при ухудшении условий содержания скота в животноводческих помещениях на ограниченных площадях. По данным, которые приводят в своей монографии Л.Д. Тимченко и Е.Л. Тинькова, в период наиболее интенсивного изучения коксиеллеза в хозяйствах Ставропольского края в 1991-1993 гг., был отмечен высокий уровень серопозитивных животных, что коррелировало со значительным ростом акушерско-гинекологических патологий и уровнем бесплодия КРС [96]. В неблагополучных по коксиеллезу хозяйствах уровень бесплодия в этот период в 2 раза превышал показатель для благополучных стад и мог достигать 80% от числа отелившихся коров [96]. Надо отметить, что поражение половых путей и вымени часто происходит при латентной форме коксиеллеза, а случаи болезни, таким образом, остаются незамеченными, что в целом затрудняет объективную оценку распространенности заболевания.

Несмотря на то, что способность клещей передавать коксиеллы при укусах сельскохозяйственным и диким животным доказана экспериментально, считается, что трансмиссивный путь передачи инфекции имеет ограниченное значение в эпизоотологии коксиеллеза [88]. Инфицирование часто происходит при ввозе больных животных в благополучные по коксиеллезу хозяйства, причем при стойловом содержании здоровые животные заражаются от больных в течение

нескольких недель [8]. Некоторые особенности *C. burnetii* позволяют им выживать в течение длительного времени вне хозяина, например, в фекалиях животных в течение двух лет или в засохшей крови в течение шести месяцев, соответственно [391]. В свежем мясе кокциеллы сохраняют жизнеспособность не менее 30 дней, в засоленном – даже до 80 дней и более. В зараженном молоке полная гибель кокциелл происходит только после кипячения его в течение нескольких минут, пастеризация молока не убивает кокциеллы [8, 96]. Низкие температуры (от –4 до –70 градусов) создают особо благоприятные условия для сохранения кокциелл, а сочетание таких температур с лиофильным высушиванием обеспечивает консервацию их даже на протяжении многих лет. Следовательно, загрязнение окружающей среды может длиться годами. Аэрозоли, содержащие патогены, могут распространяться ветром на расстояние до нескольких километров [507]. Вдыхание загрязненных аэрозолей, таких как вода или пыль, является одним из путей передачи как у людей, так и у животных [8, 88, 96, 423, 506]. В разных литературных источниках наряду с трансмиссивным и аэрогенным, в качестве возможных упоминаются алиментарный и половой пути инфицирования [8; 88].

Было показано, что животные также могут быть инфицированы алиментарным путем или экспериментально путем подкожной инокуляции [290]. Возможность передачи *C. burnetii* половым путем рассматривалась еще в 1948 году, когда была опубликована работа, в которой продемонстрировано, что телки, инфицированные интравагинально суспензией *C. burnetii*, через несколько дней выделяли бактерии в моче. В более поздней работе при исследовании образцов сыворотки и спермы 57 быков, жизнеспособные *C. burnetii* были обнаружены в семени 15% серопозитивных быков. Эти данные указывают на возможность передачи *C. burnetii* при искусственном осеменении КРС [395].

2.4.12 Гистофилы *Histophilus somni*

Histophilus somni, единственный представитель рода *Histophilus*, входящего в семейство *Pasteurellaceae*, класс *Gamma*proteobacteria, тип *Proteobacteria* – грамотрицательная, некапсулированная, неподвижная, плеоморфная бактерия, не

образующая спор. Первоначально описанный как «*Haemophilus*-подобный микроорганизм», *H. somni* был впервые выделен в 1956 году в США от быков с инфекционным менингоэнцефалитом [27].

В 2003 году Angen и соавт. опубликовали результаты филогенетического анализа генов *16S pPHK* и *rpoB*, на основании которых виды *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni* и *Histophilus ovis* были объединены в новую таксономическую единицу – *Histophilus somni* [503].

H. somni является привередливой бактерией, растущей только в обогащенных питательных средах в условиях CO₂ атмосферы [214, 351, 365, 418]. Идентификация *H. somni* с помощью обычных биохимических тестов затруднена из-за его плохого роста, который можно усилить за счет добавления в среду пиридоксина, флавиномононуклеотида, рибофлавина и тиаминмонофосфата [365]. *H. somni* ферментирует глюкозу, восстанавливает нитраты и является оксидазо-положительным и каталазо-отрицательным [328]. В отличие от бактерий группы *Haemophilus*, к которой ранее относили представителей этого вида, для оптимального роста *H. somni* не требуется гемин (X-фактор) или никотинамидадениндинуклеотид (NAD, V-фактор) [503].

Изучение фрагментов генома *H. somni* показало, что микроорганизмы на 60% и 44% гомологичны *Haemophilus influenzae* и *Actinobacillus lignieresii*, соответственно. На филогенетических деревьях представителей *Pasteurellaceae*, построенных на основании изучения нуклеотидных последовательностей генов *16S pPHK* и *rpoB* *H. somni* четко занимает обособленную от других родов семейства позицию [503] (рисунок 5).

Первая полная последовательность генома *H. somni* была опубликована в 2007 году, когда был впервые секвенирован непатогенный изолят 129Pt, выделенный из смыва с препуция быка [218]. Размер генома этого изолята составил более 2000 т.п.н., в нем были идентифицированы 1792 гена. Вторая полная последовательность генома *H. somni*, штамма 2336, выделенного из легких больного пневмонией теленка, была опубликована в 2011 году [338]. Сравнение этих последовательностей показало не только различия в размере геномов этих

штаммов, но и то, что большинство генов и локусов, общих для этих двух штаммов, были расположены в разных регионах хромосомы и имели противоположную ориентацию. что указывает на перестройки генома с момента их расхождения от общего предка. Кроме того, было обнаружено, что патогенный штамм 2336 имеет большее количество уникальных генов, чем штамм-комменсал 129Pt (рисунок 6).

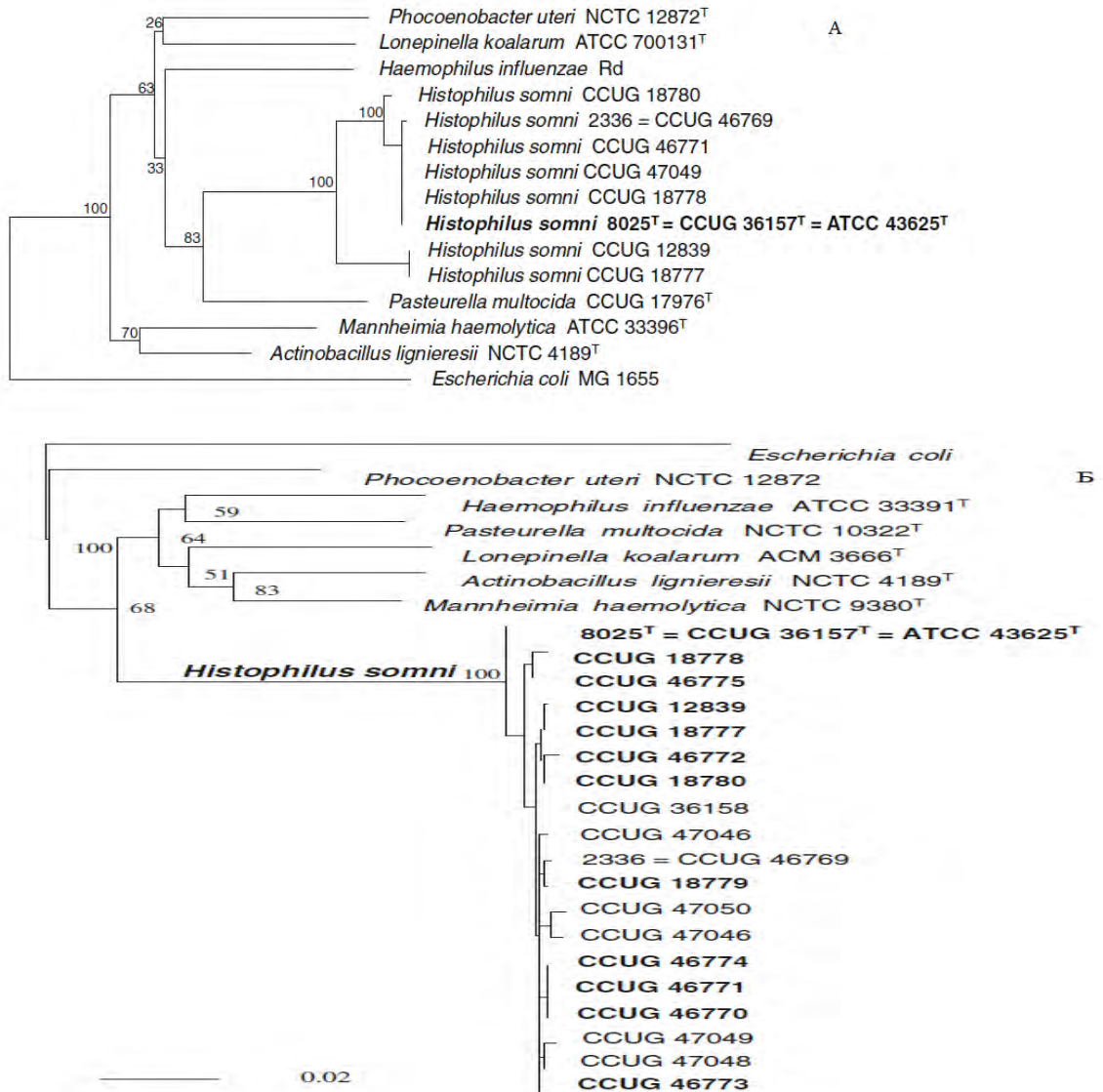


Рисунок 5 – Дендрограмма на основе последовательностей генов groV (А) и 16S рРНК (Б) представителей семейства Pasteurellaceae. Источники: 89, 503

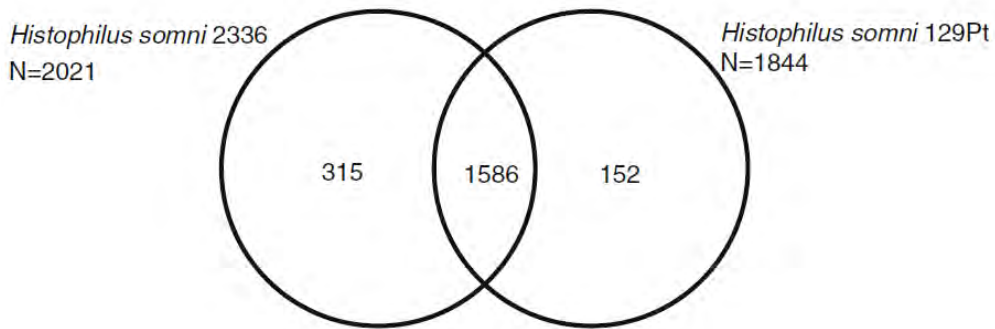


Рисунок 6 – Общие и уникальные гены двух штаммов *H. somni* – патогенного 2336 и непатогенного 129 Pt. Источник: [541].

Среди отсутствующих в штамме 129Pt генов, выявленных у патогенного штамма 2336, были гены, отвечающие за вирулентность, например, гены адгезинов, гомолога нитчатого гемагглютинина (*Fha*), системы рестрикции-модификации, а также профагоподобные последовательности и некоторые гены белков биосинтеза липоолигосахаридов с переменной фазой [541]. Однако, несмотря на секвенирование еще нескольких штаммов и изолятов *H. somni* и выявление определенных участков, связанных с вирулентностью *H. somni*, генетические детерминанты, позволяющие четко различить патогенный и непатогенный штаммы гистофил, еще не определены [486].

Заболевания, ассоциированные с *H. somni*, фиксируют в разных странах с развитым животноводством. Сообщения о связи *H. somni* с респираторными и репродуктивными заболеваниями КРС поступали из Западной и Восточной Европы, Ирана, Скандинавии, Египта и Южной Африки, Аргентины, Японии, Австралии и Новой Зеландии [27; 28, 89, 142]. В Северной Америке клинический гистофилез чаще всего встречается у животных 6–12 месяцев весом до 250 кг и молодых молочных телят [27, 28, 89, 482].

Местом обитания *H. somni* считаются слизистые оболочки здоровых жвачных животных, что позволяет считать эту бактерию условно-патогенным микроорганизмом. При этом, у КРС *H. somni* может вызывать широкий спектр заболеваний, включая менингоэнцефалит, миокардит, респираторные заболевания, отит, полиартрит, мастит, заболевания глаз и заболевания кишечного тракта.

H. somni обычно распространяется при прямом контакте [399]. У заболевших животных количество бактерий на слизистой оболочке носа значительно меньше, чем в легких и, как следствие, бактерии легче передаются при кашле, хотя носовая слизь и цельная кровь также являются потенциальным источником инфекции, поскольку бактерии жизнеспособны в этих экссудатах до 70 дней при 23,5°C. В меньшей степени влагалищная и носовая слизь также могут быть потенциально инфекционными, при этом выживаемость бактерий сохраняется в течение 5 дней [246].

В работе 2017 года А.В. Капустин с соавторами отмечают, что вызываемое *H. somni* системное заболевание, гистофилёз КРС, имеет 3 формы проявления заболевания: септическую форму, при которой могут развиваться васкулиты и тромбозы, приводящие к нейтрофильной инфильтрации и некрозу тканей в головном мозге, а также к миокардиту; респираторную форму, которая проявляется поражением верхних и нижних дыхательных путей. У животных развивается воспаление лёгких, наблюдается отказ от корма, затруднённое дыхание, кашель. Третьей формой является мочеполовая, сопровождающаяся поражением мочевыводящих путей и репродуктивных органов у коров, а также препуция у быков [27];

Известно, что *H. somni* является распространенным представителем микрофлоры половых путей КРС. Несмотря на то, что гистофилы часто выделяют из слизистой оболочки мочеполового тракта нормальных здоровых животных при отсутствии каких-либо макроскопических поражений, патогенные штаммы *H. somni* могут являться причиной маститов, эндометритов и вульвовагинитов, а также абортот [155, 399]. В своей работе Д.А. Рудняев отмечает, что «*H. somni* идентифицирован в 0,4% случаев диагностированных абортот в Новой Зеландии и от 1,7% до 3% абортот в Германии» [89].

Репродуктивная недостаточность и абортот, вызванные *H. somni*, могут являться следствием системного гематогенного распространения, либо попадания микроорганизма восходящим путем из влагалища [221]. *H. somni* может вызывать вульвовагинит, эндометрит, цервицит [209, 224, 288, 297], однако в естественных

условиях патологическое значение выделения *H. somni* из влагалищных выделений не всегда можно однозначно интерпретировать [486].

H. somni почти в три раза чаще выделяется из воспаленной матки и шейки матки, чем из нормальных органов [486]. Связь инфицированности животных *H. somni* с распространенностью выделений из влагалища коров и снижением частоты зачатия была показана в работе итальянских специалистов, опубликованной в 2011 году [525]. Предполагают, что *H. somni* пагубно влияет на развитие эмбриона, приводя к бесплодию у субклинически инфицированных коров [486]. По данным К. Грибова, при остром послеродовом эндометрите в хозяйствах Ростовской области *H. somni* выделялся у 48,7% коров, а у значительной части животных определялся как единственный инфекционный агент острого послеродового эндометрита [37].

H. somni часто выделяется из репродуктивного тракта здоровых быков. Предварительные исследования иранских специалистов показали, что урогенитальная диссеминация может быть важным средством передачи *H. somni* [142]. По данным J. Humphrey и соавторов, опубликованным в 1982 году, особенно часто (71%) микроорганизм находили в препуции молодых бычков, в 26% случаев – в мочевом пузыре, в 19% – в половых железах, в 10% – в семявыносящем протоке, но не обнаруживали в яичках и придатках яичка [496]. Показано, что некоторые штаммы *H. somni* могут вызывать гнойный постит и дистальный уретрит, а также аномалии сперматозоидов с нарушением подвижности [194]. Микроорганизм обнаруживают в нативной сперме и спермопродукции, предназначенной для искусственного осеменения. Так, *H. somni* выявляли практически в половине исследованных образцов спермы быков в Канаде [468], а обнаружение микроорганизма в сперме, собираемой центрами искусственного осеменения Ирана, вызвало обеспокоенность иранских ученых [142, 553].

Для профилактики заболеваний, вызванных микроорганизмом, в США и Канаде активно используется иммунизация инактивированными вакцинами. На рынке этих стран представлено сразу несколько коммерческих вакцинных препаратов разных производителей, их использование позволило сократить

количество случаев тромботического менингоэнцефалита, вызванного *H. somni*. Однако, особенности возбудителя, например, способность к образованию биопленок, а также изменение вирулентности у циркулирующих штаммов снижают эффективность вакцинации КРС [89].

Лечение заболеваний, вызванных *H. somni*, также, как и другими условно-патогенными микроорганизмами, проводят с использованием антибиотиков. Было показано, что антибиотикотерапия увеличивает фертильность в стадах, пораженных вульвовагинитом, вызванным этим патогеном [622]. Отечественными учеными предложены несколько схем лечения, включающие использования антимикробных средств [37, 89]. В своей работе А.В. Капустин и соавторы отмечают, что «применение антибиотиков помогает предотвратить и ликвидировать вспышки заболевания, вызванного *H. somni*, но возрастающая распространенность резистентности к антибиотикам зачастую не дает ожидаемого терапевтического результата» [46].

2.5 Использование молекулярно-генетических методик и ПЦР-тест-систем при выявлении инфекционных агентов в сперме

В 2012 году в одной из научных публикаций было высказано мнение, что скорость разработки новых лабораторных диагностических средств опережает способность врачей правильно интерпретировать результаты тестов [311] и в последнее время мы постоянно находим этому подтверждение.

В настоящее время доступен ряд диагностических методов и подходов – от культуральных и серологических, до иммунохроматографических, полимеразной цепной реакции (ПЦР), различных видов изотермической амплификации и секвенирования нового поколения (NGS). Многие компании выпускают целые линейки ветеринарных диагностикумов и тест-систем, однако по-прежнему есть сомнения относительно верной интерпретации и клинического значения результатов тестирования.

В нашей стране к этой проблеме добавляется проблема отсутствия контроля эффективности выпущенных на рынок диагностических наборов. М.С. Красникова и соавторы отмечают, что в настоящее время диагностические тест-системы не проходят обязательную государственную регистрацию и сертификацию, отсутствует перечень требований к ним, согласование текста инструкций, независимая проверка качества наборов, что приводит к появлению на рынке недостаточно качественных продуктов, проведение исследований с использованием которых может привести к неэффективной диагностике [94]. В этих условиях особенно важным является грамотный подход к тестированию с учетом особенностей биологического материала.

Молекулярно-генетические методы нашли широкое применение в диагностике инфекционных болезней животных. Научные лаборатории разрабатывают и применяют на практике свои методики, на рынке присутствуют коммерческие ПЦР-тест-системы отечественных производителей и иностранных компаний, однако не все из них предназначены и охарактеризованы для работы со спермопродукцией. Важнейшими показателями, определяющим эффективность используемого теста ПЦР, является грамотный выбор мишени и правильная подготовка исследуемого материала.

Разработка диагностических ПЦР-методик выявления вируса герпеса КРС 1 типа описана в работах отечественных ученых Глотова А. Г. [29], Котеневой С. В. [52], Глотовой Т. И. [30], Нефедченко А. В. [65], Красочко П. П. [53] и их иностранных коллег. S. Vilcek [516], F. S. Kibenge [128], C. V. Yason [277], M. Alegre [122], M. Fuchs [536] и многих других. В них чаще всего используют праймеры к генам гликопротеинов *gB*, *gC*, *gD*, *gI* и гену тимидинкиназы *tk*, как к наиболее консервативным участкам генома, позволяющих выявить большое число циркулирующих штаммов. Чтобы различать ВHV-1 и ВHV-5, в разных работах предлагалось использование гнездовой ПЦР [559], мультиплексной ПЦР [122, 243, 514], а также ПЦР с дальнейшим секвенированием по Сенгеру [183]. А использование праймеров, подобранных на ген *gE*, позволяет дифференцировать инфицирование полевым изолятом вируса от присутствия вакцинного *gE*- штамма

[243]. Хотя большинство работ направлено на использование ПЦР для выявления вируса инфекционного ринотрахеита КРС при респираторных поражениях, надо отметить, что первые публикации были посвящены именно проблеме детекции вируса в сперме быков-производителей [62, 360, 516, 621].

В течение последних 15 лет проведено значительное количество работ по исследованию спермы КРС методом ПЦР для выявления ДНК вируса BHV в сперме, исследование такого типа биологического материала предусмотрено также в некоторых отечественных тест-системах, например, описанной в работе А.В. Нефедченко [65] или в выпускаемой производителем ФБУН ЦНИИЭ под названием «Ринокор» [64].

Для выявления другого представителя герпесвирусов КРС, BHV-4, также активно используется метод ПЦР как с электрофоретической детекцией, так и с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени [22, 501]. Диагностику, как и в случае с BHV-1, проводят чаще всего с использованием праймеров, фланкирующих участки гена тимидинкиназы *tk* и генов гликопротеинов: *gB*, *gL* [65, 232, 495]. Тест-системы для выявления BHV-4 выпускаются производителями значительно реже и в основном иностранными производителями, например, в линейке наборов компании Applied Biosystems™ (LSI VetMax) такой набор присутствует и может, согласно инструкции производителя, использоваться для тестирования семенной жидкости быков.

Для детекции вируса диареи КРС ранее наиболее активно использовалась ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией, однако в последнее десятилетие эту методику практически полностью вытесняет ОТ-ПЦР с детекцией в режиме реального времени, а новые способы получения и очистки ферментов позволяют объединять стадии обратной транскрипции и ПЦР в одной пробирке, значительно упрощая процесс тестирования. Согласно опубликованным в Руководстве по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных рекомендациям ВОЗЖ, оптимальной мишенью для праймеров является высококонсервативные области генома, 5' - нетранслируемая область (5' UTR) или NS3 (ген *p80*) [119]. В связи с высокой вариабельностью вируса для идентификации штаммов актуальным

является проведение генотипирования изолятов, для чего для выбора праймеров используют более вариабельные фрагменты, чаще всего идентификацию изолятов проводят на основании изучения 3-х фрагментов: 5' UTR, гена *Npro* и поверхностного гликопротеина E [16, 65]. Исследования спермы с использованием ОТ-ПЦР активно проводятся в разных странах [68, 131, 234, 266, 513, 585]. Более того, применение ПЦР является рекомендованным ВОЗЖ способом подтверждения персистенции вируса диареи КРС в яичках у быков.

Надо отметить, что сперма из-за большого числа ингибиторов является достаточно трудным материалом для выделения нуклеиновых кислот, особенно РНК, а производители тест-систем редко включают сперму в перечень материалов для тестирования, для которых проведена оценка чувствительности и эффективности ОТ-ПЦР. Так, Thermo Scientific™ в своих инструкциях по применению наборов для выявления вируса диареи КРС предусматривает тестирование клеточных культур, органов, молока, крови, сыворотки, ушных выщипов, но не включает исследование сперму КРС. Такая же проблема возникает и при выявлении других РНК-содержащих вирусов.

Вирус Шмалленберг при тестировании биологического материала (сыворотки, суспензий органов и насекомых-переносчиков) успешно идентифицируют в ОТ-ПЦР по сегменту S генома SBV [6, 18, 475], разработаны методики тестирования с праймерами на консервативные фрагменты M и L-сегментов [244]. Разработано несколько коммерческих тест-систем для выявления РНК вируса, но также, как и в случае диареи КРС, лишь немногие производители валидируют свои разработки для тестирования спермы.

Эффективность методов экстракции и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени при выявлении SBV была оценена в двух межлабораторных испытаниях в 2015 году, в которых приняли участие 27 немецких и 17 других европейских лабораторий. Анализ полученных результатов показал, что все подходы, используемые 44 лабораториями, были достаточно надежными для обнаружения SBV во всех матрицах, кроме спермы быков. Ученые

призвали к тщательному подбору и проверке методов экстракции при тестировании спермопродукции для выявления вируса Шмалленберг [337; 279].

В 2021 году была обновлена информация о диагностике блютанга в Руководстве по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных ВОЗЖ. В Руководстве подчеркивается роль молекулярно-биологических тестов для изучения происхождения и распространения вируса, представлена база данных для филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей изолятов вируса [614].

Для молекулярно-диагностических лабораторий для подтверждения клинических случаев, выявления неинфицированных животных перед транспортировкой и контроля распространенности инфекции ВОЗЖ рекомендует использовать ОТ-ПЦР в реальном времени который позволяет обнаруживать все циркулирующие известные серотипы ВТВ с помощью амплификации с обратной транскрипцией области сегмента 10 вирусной РНК, кодирующей неструктурный белок NS3 [169]. Использование праймеров, подобранных к области сегмента 2 вируса, кодирующей капсидный белок VP2, позволяет дифференцировать серотипы вируса [47; 25; 72, 90; 51, 342, 523]. Сперма, как возможный источник вируса, продолжает привлекать внимание исследователей. Так, в работе, опубликованной в 2021 году, сделано предположение, что именно сперма, содержащая вирус ВТВ-8, стала причиной вспышки блютанга во Франции в 2015 году [583].

Еще в 2005 году южноафриканскими исследователями при использовании метода ПЦР получены доказательства длительной экскреции вируса нодулярного дерматита КРС в сперме экспериментально инфицированных быков [366]. В Руководстве по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных ВОЗЖ приведены рекомендации по использованию ПЦР-тестирования и указано, что сперма быков является одним из вариантов биологического материала для детекции вируса заразного узелкового дерматита КРС [618].

Молекулярно-генетические методы (классический ПЦР, ПЦР в «реальном времени», гнездовой вариант ПЦР) активно используют для диагностики

бруцеллеза, причем из-за высокой консервативности представителей рода *Brucella* в качестве мишени для подбора праймеров используют различные гены, например, *BruAb1_1825*, *BRA0378*, *BMEI1661*, *BruAb2_0168*, *BruAb1_0266* и *BMEI0827*, *eryC* *BCSP31*; 16S рРНК и рибосомный оперон, *omp19*, *omp2*, *IS711* [42; 57, 284, 417]. Высокая консервативность генома позволяет достаточно эффективно подбирать праймеры и для изотермической амплификации, однако при изучении бруцеллеза КРС часто возникает необходимость дополнительной видовой и штаммовой дифференциации.

Исследователями активно используется ПЦР для детекции бруцелл в сперме быков, так, в работе иранских исследователей генетический материал *Brucella* был выявлен в 31,1% исследованных спермодоз [384], в работе исследователей из Индии - в 18,81% образцов [368], из Египта – в 10% образцов [127]. Бразильскими учеными с помощью ПЦР-методик показано наличие в сперме серонегативных быков вакцинного штамма S19 [332], что поставило вопрос о возможной контаминации окружающей среды этим вакцинным штаммом [529]. При этом еще раз надо отметить, что большая часть реализуемых коммерческих тест-систем создана для идентификации микроорганизмов рода *Brucella* в бактериальных культурах и патологическом материале, а исследование спермы часто не предполагается разработчиками методик и требует дополнительной проверки эффективности.

Амплификация нуклеиновых кислот активно используется для выявления кампилобактерий, однако, как показали результаты сравнительного тестирования различных ПЦР-методик, тест, позволяющий надежно идентифицировать изоляты *C. fetus* до уровня подвидов, в настоящее время не разработан [146, 282]. Наилучшие результаты при сравнении специфичности и чувствительности методик показали тесты для выявления *C. fetus* на основе амплификации участков генов *nahE* и *cstA* [250, 282, 146]. При внутривидовой идентификации праймеры на фрагмент *ISCfe1* [250] позволили определить 97% анализируемых штаммов *C. fetus subsp. venerialis*, в то время как разные методики на основе гена *parA* выявляли только 53 и 58% штаммов этого подвида, а методики на основе гена *sapB2* – 76%

штаммов *C. fetus subsp. fetus* [282]. Работа, опубликованная в 2020 году, показала, что ограничения по использованию ПЦР-метода для дифференциации подвидов *C. fetus* могут быть связаны с наличием горизонтального переноса генов *ISCfe1* и *parA*, часто используемых для идентификации подвидов *C. fetus*, к другим видам бактерий рода *Campylobacter* [146].

В целом, для выявления кампилобактерий «золотым стандартом» остается микробиологический метод. ПЦР-методики зарубежные исследователи используют для тестирования на *C. fetus*, в первую очередь, смывов с препуция быков [146, 280; 339, 548], реже – для исследования непосредственно спермы [256].

Методы амплификации нуклеиновых кислот используются и для выявления и идентификации лептоспир [13, 58], причем применяют как классический вариант ПЦР, так и гнездовую ПЦР и ПЦР в «реальном времени». При разработке ПЦР-тестов чаще всего используют два подхода: первый предполагает обнаружение генов, которые присутствуют у всех лептоспир, например, 16S рРНК, *gryB*, *secY*, второй предполагает детекцию генов патогенных видов, например, *colA*, *lipL21*, *lipL32*, *lipL41*, *ligA* и *ligB* [13]. Несмотря на то, что методики разработаны для тестирования сыворотки, патологического материала и мочи, отдельные исследователи предлагают их использовать, после дополнительной валидации, для исследования спермы быков [228, 236, 238-239].

Для выявления хламидий и коксиелл детекция с помощью молекулярно-биологических методов играет наиболее важную роль, и связано это с возможностью определения этих слабо культивируемых микроорганизмов непосредственно в биологическом материале. Для выявления генома микроорганизмов семейства *Chlamydiaceae* наиболее часто используют ПЦР и ПЦР в реальном времени с праймерами на фрагменты 16S рРНК, 23S рРНК, межгенные спейсеры рибосомного оперона (IGS-S и IGS-L) и ген *ompA*, которые считаются наиболее подходящими для выявления хламидий разных видов [69, 379, 498, 577, 249]. Для идентификации *Coxiella*, согласно информации, представленной в Руководстве по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных

ВОЗЖ, чаще всего используют последовательность *IS111*, *IS30*, а также гены *sodB*, *com1*, *htpA*, *htpB*, *icd* и другие [619].

ПЦР в реальном времени позволяет проводить и количественную оценку содержания бактерий, что позволяет дифференцировать носительство и клинические случаи коксиеллеза [554]. Для выявления хламидиозов и коксиеллеза используют и другие молекулярно-биологические методики. Еще в 2008 году были опубликованы результаты валидационных испытаний методики детекции *Chlamydia* на основе ДНК-микрочипов ArrayTube™, показавшие высокую сопоставимость результатов с классической ПЦР, однако, уступающую ПЦР в реальном времени [249]. Тестирование спермы для выявления хламидий достаточно активно проводят как с использованием ПЦР методик, так и коммерческих ПЦР-наборов [68,126; 362, 484, 577]. Наиболее часто для этих целей применяют тест-системы без дифференциации видовой принадлежности хламидий, а компанией Thermo Scientific™ разработана тест-система для ПЦР в «реальном времени», позволяющая в мультиплексном формате выявлять и дифференцировать в образце сразу *C. burnetii* и виды рода *Chlamydia*.

Выявление микоплазм и уреаплазм также наиболее часто проводится молекулярно-биологическими методами без идентификации отдельных видов. Все еще активно используют ПЦР с электрофоретической детекцией. Так, коммерческий набор «Мик-Ком», выпускаемый компанией «АмплиСенс», является одним из наиболее востребованных диагностикумов на основе ПЦР [64]. В литературных источниках сообщали об использовании для выявления микоплазм SYBR-ПЦР, варианта ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красителем SYBR-green, который предпочтительно связывается с двухцепочечной ДНК [240] и ДНК-чипов [114]. Однако, в последнее время для выявления этих микроорганизмов как на уровне рода, так и для определения вида, наиболее часто разрабатывают и используют ПЦР в режиме «реального времени».

Информация о наиболее часто используемых генах-мишенях для ПЦР-выявления микоплазм и уреаплазм КРС приведена в таблице 6.

Таблица 6 – Гены-мишени для выявления микоплазм и уреаплазм КРС.

Инфекционный агент	Ген-мишень	Литературный источник
<i>Mycoplasma</i> spp.	16S-23S рРНК tuf	Tang et al., 2000 [116] Schnee et al., 2012 [114]
<i>M. bovis</i>	oppD uvrC Vsp polC fusA	Sachse K, et al, 2010 [589] Clothier et al., 2010 [449] Tenk et al., 2006 [241] Marenda et al., 2005 [566] Boonyayatra et al., 2012 [115]
<i>M. bovis genitalium</i>	16S-23S рРНК	Boonyayatra et al., 2012 [115]
<i>M. californicum</i>	rpoB	Boonyayatra et al., 2012 [115]
<i>M. agalactiae</i>	uvrC 16S рРНК polC	Subramaniam et al., 1998 [558] Gonzalez et al., 1995 [364] Marenda et al., 2005 [566]
<i>Ureaplasma diversum</i>	16S рРНК	Smith et al., 2012 [491]

Несмотря на то, что тест-системы и методики чаще всего используют для выявления микоплазм при респираторных заболеваниях КРС, работы по выявлению микоплазм и уреаплазм в сперме КРС проводят исследователи в разных странах [68, 216, 242, 372]. Например, в 2018 году были опубликованы результаты изучения вспышки мастита у коров в хозяйствах Финляндии, согласно которым причиной возникновения заболевания являлась сперма, по результатам, полученным с использованием ПЦР-метода, контаминированная патогенными микоплазмами [551].

Молекулярно-генетические методы используются для выявления такого сложного для культивирования микроорганизма, как *H. somni*. Для дифференциации его от других микроорганизмов чаще всего используют праймеры, подобранные на 16S рРНК [37, 134]. Иностранные компании активно продвигают на российский рынок свои диагностикумы, среди которых присутствуют наборы на основе ПЦР в режиме «реального времени» для

выявления *H. somni* как единственного патогена, или в составе наборов для скрининга респираторных или репродуктивных патогенов КРС. Иранские ученые проводили ПЦР-исследования импортируемой и производимой в стране спермы КРС, используемой для искусственного осеменения, обсуждая вопросы влияния патогена на качество спермопродукции и распространения вызываемых *H. somni* заболеваний [142, 553].

В последнее время в связи с развитием технологий полногеномного секвенирования и биоинформатического анализа появляется возможность определения полных геномов микроорганизмов и оценки микробных сообществ в различных образцах животных и человека и внешней среды. Появляются и исследования, посвященные метагеномному анализу образцов спермы, на настоящий момент проведены исследования спермы человека, однако отечественными исследователями на момент написания данной работы не было опубликовано ни одной работы по оценке микробиоты спермы животных.

2.6 Требования к спермопродукции в разных странах

Проблемой контроля качества и повышения эффективности использования генетического материала обеспокоены многие страны с развитым животноводством, а появление новых возбудителей инфекционных болезней заставляет государства регулярно анализировать риски, связанные с экспортом/импортом такой биологической продукции. В Кодексе здоровья наземных животных ВОЗЖ отдельные главы посвящены требованиям к центрам искусственного осеменения и к процедурам ветеринарного обследования быков, в этот документ включены также и рекомендации по контролю ввозимой спермы [50]. Согласно этому документу, быки-доноры должны быть исследованы на ряд инфекционных болезней (бруцеллез, туберкулез, вирусную диарею, инфекционный ринотрахеит, блютанг, кампилобактериоз, трихомоноз) в случае, если страна или зона происхождения животного не является свободной от данных болезней.

Дополнительно центрам искусственного осеменения и отбора спермы, находящимся в неблагополучной стране или зоне, ВОЗЖ рекомендует проводить тестирование отобранной спермы быков на вирус вирусной диареи КРС и на инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота (инфекционный пустулёзный вульвовагинит) по методам, указанным в Руководстве по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных.

При согласовании ветеринарных сертификатов на импортируемую продукцию страны вправе расширять список требований и контролируемых показателей. Ввоз спермопродукции в Великобританию, например, допускается только из сертифицированных племенных центров, включенных в реестр Агентства по охране здоровья животных и растений (APHA) [139]. В Австралию допускается ввоз спермопродукции только из Канады, государств-членов Европейского союза, Норвегии, Новой Зеландии, Швейцарии, Великобритании и США, при этом при импорте из Европы требуется проведение дополнительных тестов на вирус Шмалленберг [162]. Сходные требования к импортируемой спермопродукции и в Новой Зеландии, которые дополнительно предусматривают выборочную проверку до 60 спермодоз [434]. Развернутый анализ требований, включенных в ветеринарные сертификаты разных стран, дает в своей работе С.М. Борунова, особенно отмечая расширенные требования к спермопродукции в таких странах, как Турция, Норвегия, Таиланд, Германия [9].

В соответствии с действующим законодательством в области ветеринарии, проведение исследований спермы быков-производителей при ввозе в Российскую Федерацию не требуется, а свидетельством отсутствия инфекций являются результаты исследований, полученные в лабораториях страны-экспортера.

2.7 Заключение к обзору литературы

Сперма для искусственного осеменения коров является активно импортируемой продукцией на территорию Российской Федерации. Для предотвращения распространения инфекционных болезней через сперму быков в

мировом сообществе применяют стратегии криоконсервации, использования антибиотиков, добавляемых к разбавителям спермы, серологические исследования быков-доноров и карантин спермы после ее сбора. Эти стратегии, в связи с большим разнообразием микроорганизмов, которое потенциально может быть обнаружено в спермопродукции, не лишены недостатков.

Серологические исследования быков-доноров не всегда обеспечивают ясность в отношении статуса спермы, получаемой от этих быков, и не дают уверенности в том, что сперма быка не контаминирована. Наличие скрытых инфекций увеличивают риск передачи возбудителя через сперму, а периодическое или продолжительное выделение инфекционного патогена может влиять на эффективность контроля и приводить к распространению патогенных микроорганизмов. Микроорганизмы способны влиять на оплодотворяющую способность сперматозоидов, а биологические особенности позволяют ряду бактерий сохранять жизнеспособность в криоконсервированной спермопродукции.

Передача инфекционных агентов со спермой КРС при проведении искусственного осеменения в настоящее время является объектом многочисленных исследований, проводимых за рубежом, а полученная при исследованиях информация используется разными странами для оценки рисков появления и распространения новых инфекционных заболеваний и планирования противоэпизоотических мероприятий.

Обзор литературных источников позволяет сделать вывод о возможности передачи ряда инфекционных агентов как вирусной (BHV-1, BHV-4, BHV-5, BVDV, BTV, SBV и др.), так и бактериальной природы (*Brucella spp.*, *Chlamydia spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Coxiella burnettii*, *Campylobacter spp.*, *Leptospira spp.*, *H. somni*) телкам или коровам путем естественного и / или искусственного оплодотворения. При этом если для отдельных патогенов выполнение существующих рекомендаций Кодекса здоровья наземных животных ВОЗЖ позволяет считать риск передачи при импорте контролируемым (*Leptospira spp.*, *Brucella spp.*, *Campylobacter fetus*, *Coxiella burnettii*, BTV, BHV-1, BVDV), то другие

(*Chlamydia spp.*, *Mycoplasma spp.*, BHV-4, *H. somni*) контролируются явно недостаточно.

На настоящий момент накоплен большой объем информации для выявления и идентификации микроорганизмов непосредственно в образцах спермы. Это позволяет использовать эти методы при расследовании вспышек заболеваний при подозрении на передачу инфекционного агента через сперму, контролировать периодическое выделение патогена, проводить тестирование и выбраковку спермодоз, что повышает качество спермопродукции и уменьшает риски распространения патогенов через сперму, используемую для искусственного осеменения. Однако, несмотря на наличие на рынке большого числа тест-систем и ПЦР-методик выявления инфекционных агентов, отсутствует единый подход к их использованию для исследования спермы КРС. Таким образом, совершенствование методов контроля безопасности спермопродукции и оптимизация применения молекулярно-генетических методов в ветеринарной практике представляется актуальным.

3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в период с 2016 по 2023 гг. на базе ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»).

3.1 Биологический материал, использованный в работе

Исследовали племенной материал КРС (спермодозы от быков), полученный из племенных центров Российской Федерации, Нидерландов, Великобритании, США, в том числе образцы спермы, разделенной по полу. Всего исследовано 444 образца спермопродукции.

В работе для оценки специфичности разрабатываемых методик использовали штаммы микроорганизмов фонда «Всероссийская государственная коллекция штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве» ФГБУ «ВГНКИ». Перечень изолятов и штаммов бактерий и вирусов представлен в таблице А1 Приложения А.

В работе также использовали биологический материал от животных разных возрастных, половых и физиологических групп с признаками респираторных и репродуктивных поражений (респираторные и вагинальные смывы, сперма, молоко, паренхиматозные органы КРС), собранный в хозяйствах Тульской, Тверской, Московской, Калужской, Владимирской, Воронежской, Челябинской, Курской областях, Республиках Хакасия, Татарстан, Удмуртия, Мордовия.

3.2 Реактивы, препараты, среды и наборы реагентов

Готовые лекарственные препараты

Натрия хлорид раствор для инфузий изотонический 0,9% во флаконах по 200 мл («Solopharm»); раствор глюкозы для внутривенного введения 40% в пластиковых ампулах по 10 мл («Renewal»); бензилпенициллина натриевая соль (порошок для приготовления раствора для внутримышечного и подкожного введения) во флаконах по 1 млн. ЕД («Синтез АКОМП»); Амоксиклав (порошок для приготовления раствора для внутривенного введения) во флаконах 600 мг

(«Лек д.д.», Словения); Цефепим (порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения) во флаконах по 1 г («Фортун Оверсиз Компани»). В работе также использовали химические реактивы: гидроксид натрия; концентрированная соляная кислота; феноловый красный водорастворимый; L-аргинин; мочеви́на; этанол, дитиотрейтол (ДТТ), диски для определения чувствительности к антимикробным препаратам («HiMedia Laboratories Pvt Ltd»): стрептомицин (10 мкг), неомицин 30 (мкг), ампициллин (10 мкг), амоксициллин (30 мкг), цефотаксим (30 мкг), цефтазидим (30 мкг), цефтриаксон (30 мкг), тетрациклин (30 мкг), хлорамфеникол (30 мкг), энрофлоксацин (10 мкг), ципрофлоксацин (5 мг), доксициклин (30 мкг), сульфаметоксазол (100 мкг) («Bioanalyse»).

Готовые компоненты культуральных сред для микробиологических исследований

«Основа бульона для *Mycoplasma* (Основа бульона PPLO без кристаллвиолета) BBL» («Becton, Dickinson and Company (BBL)»); Среда для *Haemophilus* (основа) CM0898B («Biovitrum»), ростовая добавка для гемофилов («HiMedia Laboratories Pvt Ltd»), «Дрожжевой экстракт Vacto («Becton, Dickinson and Company»); «Агар бактериологический Vacto» («Becton, Dickinson and Company»); «Агар Мюллера-Хинтона» и «Основа для шоколадного агара» («HiMedia Laboratories Pvt Ltd»), сыворотка крови лошадиная стерильная для культивирования микоплазм («Биолот»).

Культуры клеток для вирусологических исследований

Для культивирования вируса инфекционного ринотрахеита КРС использовали перевиваемую культуру клеток почки телят (MDBK), полученную из ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Питательные среды для вирусологических исследований

В качестве ростовой питательной среды использовали среду Игла DMEM («ПанЭко») с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота («Сytiva»).

Реагенты для молекулярно-генетических исследований

При проведении ПЦР использовали наборы реагентов отечественных и иностранных производителей, представленные в таблице А2 Приложения А.

Также использовали растворы олигонуклеотидных ПЦР-праймеров и зондов (молярной концентрацией 10 мкмоль/л и чистотой специфического олигонуклеотида не менее 98%) (таблица 7). Использованные в работе олигонуклеотидные праймеры были синтезированы амидофосфитным методом на синтезаторе ASM 2000 (ООО «Биоссет» Новосибирск) согласно рекомендациям производителя с использованием стандартных амидофосфитов dT, dA(Bz), dG(iBu), dC(Ac) согласно СОП-УПП2-004 отдела молекулярной биологии ФГБУ «ВГНКИ». Отдельные олигонуклеотидные праймеры и зонды были синтезированы в ЗАО «Евроген».

Таблица 7 – Олигонуклеотиды, использованные в работе

Выявляемый патоген	Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Ген-мишень
BHV-6	BHV6-pol-F	ACAGACGGGCAGCAGATAAG	Dpol
	BHV6-pol-R	ATGGTTCGCCCCCTGTAGAGT	
	BHV6-prb	R6GCACGGACGGATACCAGGGCGCTACAGBHQ1	
M. bovis genitalium	Mbg_16S_F	GATGCCGCATGGCATTACGG	16SpPHK
	Mbg_16S_R	ATCCTGCACGCTGTGTCGCTC	
	Mbg_16S_prb	R6GAGCGTCGCTGGAGGAGCGGGGTBHQ1	
M. californicum	M_cal_F	GCACTTAGACGAAAGAGGGATT	rpoB
	M_cal_R	GGATTATCATCACCTTTGGGACT	
	M_cal_probe	ROXCGTGTTGGTTCGGAAGTGGTTCCAGBHQ3	
U. diversum	Udv_F	CATTTACTTGCATGAGTGAATG	16S pPHK
	Udv_R	AGCTACGCGTCAATGAC	
	Udv_probe	ROXTGGATGAGGGTGCGACGTATCATCCBHQ3	

LSDV	LSDV_For LSDV_Rev LSDV_probe	ACGTAAATAACATACCTGCT GGCTCATAGATTTCCTGA HEXTATATATCCCATCCATTGGTTTCABHQ1	P32
<i>Coxiella burnetii</i>	CocF CocR	GTAATATCCTTGGGCGTTGACG ATCTACGCATTTACCGCTACAC	16S pPHK
<i>H. somni</i>	H.smn_F H.smn_R H.smn_R_A H.smn_probe	GGAAGGCGATTAGTTAAGAG ACTCGAGCGTCAGTATCTTC CCTCACTTAAGTCACCACCT ROXCACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTBHQ1	16S pPHK
	strA_F strA_R strA_probe	GGCGGCTGATCTGTCTGG CAGATAGAAGGCAAGGCGTTC ROXCTCTGCTTCATCTGGCGCTGCCABHQ1	strA
	strB_F strB_R strB_probe	CGCGTTGCTCCTCTTCTCCA GGCTACATGGCGATCTGCATC HEXCGGAAAGGCACCCATAAGCGTACGBHQ2	strA
	sul2_F sul2_R sul2_probe	GCCGCAATGTGATCCATGATGTCG TGCCTTGTCGCGTGGTGTGG ROXCGATCTGCCTGCCGTCTTGCACCGABHQ1	Sul2
	AadA25F AadA25R	GGCAACGCTATGTTCTTGTCTTTG TGTACGGCTCCGCAGTGGA	AadA25
	aphA1F aphA1R	TTATGCCTCTTCCGACCATC GAGAAAATTCACCGAGGCAG	aphA1
	tetHF tetHR	CCACCATTATGATCAGTATGTCT CATCAGCCATAACAGACCATC	tetH
	blaOXA-2F blaOXA-2R	GCAGACGAACGCCAAGCGGA CCCGCACGATTGCCTCCCTC	blaOXA-2
	floR-F floR-R	TATCTCCCTGTCGTTCCAG GAAGTAGACGGAAAGCGAC	floR

Kobuvirus	Kobu-F	TCAACACCATCATCAACAACA	3D
	Kobu-R	AGGAAGGTGACGTCRTAGA	
M.bovis	M.bov_For	TGTCTTGTATGTTGGTAAAGCA	UvrC
	M.bov_Rev	CAATGCCTCTTTATTTGTTTTACAG	
	M.bov_probe	R6GAGCGCCGTCAAATACTGAAGCABHQ	
BHV-1,5	BHV1,5-1	TACCTGCGCAGCGGGCGC	gB
	BHV1,5-2	CTTCGATCACGCAGTCGCTCA	
	BHV1,5-3	ACGACGGACGATGTGTAC	
	BHV1,5-4	CTCTCGTCTCGCAGCAT	
Bacteria	16SF	AGTGGCGNACGGGTGAGTAAC	16S rRNA
	16SR	CATCTCACGACACGAGCTGACGA	

Также в работе применяли:

- Раствор натрия хлорида изотонический 0,9% («Гротекс»);
- ВКО-FL (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора);
- ВКО STI-87-rec (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора);
- Раствор 10x dNTP (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора);
- РНК-буфер (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора);
- ДНК-буфер (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора);
- ПЦР-буфер-Flu (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора);
- Полимераза TaqF (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора);
- ДНК-полимераза Tersus («Евроген»);
- смесь дНТФ (концентрация каждого нуклеотида 25мМ «Синтол»; концентрация каждого нуклеотида 10 мМ, «Евроген»);
- ПЦР-смесь-2-red (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора);
- ПЦР-смесь-2-blue (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора);
- ПКО ДНК/кДНК с концентрацией $2,5-7,5 \times 10^5$ копий/мл («Евроген»);
- RT-G-mix-D (RT-G-mix-2) (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора);

- комплект реагентов «Реверта-L» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора);
- Воск для ПЦР (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора);
- Масло вазелиновое медицинское (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора);
- Спирт изопропиловый очищенный;
- Агароза LE (Axugen);
- ТАЕ-буфер 50x («Евроген»);
- Этидия бромид («Хеликон»);
- Маркер молекулярных масс GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas);
- Реагент для очистки продуктов ПЦР «ExoSAP-IT®» (USB Products, Affymetrix);
- Реагент для секвенирования ДНК «BigDye® Terminator v1.1 Ready Reaction Mix» из набора реактивов для секвенирования «BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems);
- Формамид высокоочищенный деионизированный с электропроводностью в диапазоне (19 – 34) мкСм/см «Hi-Di™ Formamide» (Applied Biosystems);
- Полимер для капиллярного электрофореза «POP-7™ Polymer for 3130/3130xl Genetic Analyzers» (Applied Biosystems);
- Концентрат буфера для капиллярного электрофореза «310 and 31xx Running Buffer, 10X» (Applied Biosystems);
- Набор для спектральной калибровки генетического анализатора "31xx and 3500 Matrix Standards Kit, BigDye Terminator v1.1" (Applied Biosystems);
- Наборы для экстракции нуклеиновых кислот: QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), «Рибо-преп», «ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), «Проба-ГС», «Проба-НК» («ДНК-технология»), PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen);
- Набор реагентов и расходных материалов для автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG (bioMérieux);
- Набор реагентов «QuantiFluor® ONE dsDNA System» (Promega);
- Наборы реактивов «Nextera XT» (Illumina);

- Набор реагентов «MiSeq 600v3 Reagent Kit» (Illumina).

3.3 Оборудование для молекулярно-генетических исследований

В работе были использованы:

- набор автоматических дозаторов одноканальных лабораторных, с варьируемыми объемами доз (0,5-10) мкл, (2-20) мкл, (5-40) мкл, (20–200) мкл, (200-1000) мкл («Thermo Labsystems», ООО «Экохим», Eppendorf AG);
- боксы ламинарные с вертикальным потоком воздуха II класса защиты типа А, для выделения ДНК (Ламинарные системы, Thermo Electron Corp.);
- амплификатор «Терцик» программируемый четырехканальный для микропробирок вместимостью 0,6 см³ («ДНК Технология»);
- амплификаторы с оптической системой для проведения ПЦР и детекции в режиме «реального времени» RotorGene 6000 (Corbett Research), RotorGene Q (Qiagen), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.);
- амплификатор «2720 Thermal Cycler» (Applied Biosystems)
- станция для экстракции нуклеиновых кислот «NucliSENS easyMAG» (bioMérieux).
- термостат твердотельный «Термит» («ДНК-Технология»);
- отсасыватель вакуумный медицинский с колбой-ловушкой «ОМ-1» (ОАО «Утес»);
- микроцентрифуга «Pico17» (Thermo Electron);
- микроцентрифуги-встряхиватели «ELMI CM70M-07» (ELMI Ltd), «Тэта-2» (ООО «Компания Биоком»), «Microspin FV-2400» (BioSan);
- холодильник бытовой электрический по ГОСТ 26678, обеспечивающий поддержание температуры от 2 °С до 8 °С, с морозильной камерой, обеспечивающий поддержание температуры не выше минус 16 оС;
- камера для горизонтального электрофореза «SE-2» (ООО «НПФ Биоклон»);
- источник питания для электрофореза постоянного тока «Эльф-4» («ДНК-Технология»);
- трансиллюминатор ультрафиолетовый с видеосистемой гель-документирования с цифровой видеокамерой «Infinity 1500/36M Xpress» (Vilber Lourmat);

- генетический анализатор ABI PRISM 3130/3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems);
- флуориметр Quantus (Promega);
- спектрофотометр NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).
- секвенатор для секвенирования «нового поколения» MiSeq (Illumina).

3.4 Микробиологические исследования

Для определения общего количества микроорганизмов в сперме культивирование проводили на мясопептонном агаре (МПА) с добавлением 1% глюкозы. Материал высевали в чашки Петри с МПА, которые инкубировали при температуре 37° С 24 часа.

Исследования на наличие бактерий группы кишечной палочки проводили путём посева спермы на среду Булара, которое инкубировали при температуре 43-44° С в течение суток, коли-титр определяли по интенсивности газообразования.

Культивирование микроорганизмов семейства *Mycoplasmataceae* проводили на специфических средах по методу М. Ogata [469] с модификациями [475]. Каждый образец спермы культивировали на 4-х средах с добавлением глюкозы, L-аргинина, смеси глюкозы и L-аргинина, мочевины. Пробирки выдерживали в термостате при 37 °С. Для всех посевов отслеживали изменение рН по изменению цвета среды, который придавал ей индикатор. При учете положительными считали только посевы, в которых наблюдался типичный «микоплазменный» рост (помутнение среды, колонии в виде «яичницы», «кометок», «штришков» и «шариков»).

Для выявления *H. somni* в образцах спермы и другого биологического материала использовали шоколадный агар и питательную среду CM0898B с добавлением саплимента FD117. Культивирование проводили в течение 48 часов в условиях 10% CO₂ атмосферы, после чего из агаровых культур готовили суспензии *H. somni* на сердечно-мозговом бульоне. Оптическую плотность каждой суспензии оценивали по шкале МакФарланда. Посевы инкубировали с дисками антибактериальных препаратов в течение 24 часов при температуре 37° С в

атмосфере с 8-10% CO₂. Диаметр зоны ингибирования роста культур измеряли штангенциркулем и выражали в миллиметрах. Измерения проводили в трех повторностях. Чувствительность изолятов *H. somni* к антибактериальным препаратам определяли диско-диффузионным методом, сравнивая зоны задержки роста микроорганизма согласно рекомендациям Института клинических и лабораторных стандартов США (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) с некоторыми изменениями.

3.5 Вирусологические исследования

Выборочное культивирование образцов криоконсервированной спермы быков проводили в перевиваемой культуре клеток почки теленка (MDBK). Клетки культивировали в среде DMEM («ПанЭко») с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота в полистироловых культуральных матрасах с невентилируемой крышкой с площадью роста 25 см² при 37 °С. Пересев культуры проводили 2 раза в неделю по мере формирования полного монослоя в соотношении 1:3. При пересеве клеточный монослой дважды отмывали 0,25% раствором трипсина-ЭДТА («ПанЭко»). Перед заражением культуры образец криоконсервированной спермы размораживали при комнатной температуре и объединяли с 1 мл питательной среды, после чего тщательно перемешивали. Перед внесением полученной смеси на культуру клеток ростовую питательную среду сливали. Цитопатическое действие вируса проверяли ежедневно визуально под малым увеличением инвертированного микроскопа. При проявлении цитопатического действия вируса продолжали наблюдения до полного разрушения монослоя, после чего матрас с содержимым трехкратно замораживали и оттаивали, полученную суспензию использовали для дальнейших исследований методом ПЦР.

Для изучения стабильности изолированной культуры вируса проводили последовательные пассажи до получения стабильного по характеристикам и времени цитопатического действия вируса в трех последовательных пассажах.

3.6 Экстракция нуклеиновых кислот и обратная транскрипция

Экстракцию нуклеиновых кислот для проведения исследований проводили вручную с использованием наборов: «ДНК-сорб-В», «Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), «Проба-ГС» и «Проба-НК» («ДНК-технология») согласно инструкции производителей. Дополнительно тестировали наборы для выделения нуклеиновых кислот PureLink RNA Mini Kit, а также проводили автоматизированное выделение ДНК с помощью автоматической станции для экстракции NucliSENS easyMAG (bioMérieux).

Перед экстракцией нуклеиновых кислот пробы спермы разводили стерильным физиологическим раствором в соотношении 1:3, суспензию перемешивали на вортексе и 100 мкл суспензии использовали для выделения ДНК.

Подготовку проб перед выделением нуклеиновых кислот из биологического материала проводили согласно инструкциям к соответствующим тест-системам или опираясь на рекомендации МУ 1.3.25-69-09 [70].

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора реагентов «Реверта-L» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) в соответствии с инструкцией производителя [64].

3.7 Подбор праймеров и зондов для ПЦР

Подбор осуществляли на основе анализа нуклеотидных последовательностей целевых микроорганизмов, представленных в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) с использованием программ «Bioedit», «Clustal», «Vector NTI Suite» и «VectorNTI Advanced 11.0» с учетом следующих параметров: размер ожидаемого ПЦР-продукта: до 400 нп; температура плавления праймеров 52-65°C; температура плавления зонда на 5-10°C выше температуры плавления праймеров, длина праймера: 20-30 нп; G+C состав: 40-60%; минимальная вторичная структура; минимум G/C на 3' конце праймеров (не более трех из пяти последних нуклеотидов, минимум одинаковых нуклеотидов подряд (особенно G: не более 4-х подряд); отсутствие G на 5'-конце зонда. Комплиментарность гомологичным последовательностям оценивали с

использованием алгоритма BLAST на поисковом интернет-ресурсе www.ncbi.nlm.nih.gov. Оценку сходства олигонуклеотида и генома микроорганизмов определяли по максимальному значению идентичности (Identities) - %. Если выбранная нуклеотидная последовательность 100% идентична искомому участку генома, при этом гомология с другими последовательностями более низкая – считали, что праймер или олигонуклеотидный зонд подходят для выявления гена-мишени.

3.8 Проведение ПЦР

ПЦР проводили в объеме 25 мМ³. Реакционные смеси для ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» содержали 10 мкл ДНК-матрицы, по 0,12-0,6мкМ специфических праймеров и флуоресцентных зондов, раствор дНТФ, ПЦР-буфер-Flu и TaqF-полимеразу (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). Амплификацию и детекцию осуществляли на приборах RotorGene 6000, RotorGene Q. Результаты амплификации в «реальном времени» интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией.

Реакционные смеси для ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации содержали 10 мкл ДНК-матрицы, по 10мкМкаждого специфического праймера, раствор дНТФ и «ПЦР-смесь-2-blue» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). ПЦР с электрофоретической детекцией проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-Технология»). Электрофоретическую детекцию результатов амплификации проводили в 1,8% агарозном геле, содержащем бромистый этидий (0,01 мг/мл).

При использовании коммерческих наборов реагентов реакцию амплификации проводили согласно рекомендациям производителей.

В каждой серии реакций использовали контрольные образцы: отрицательный контроль ПЦР; положительный контроль ПЦР, а также отрицательный контроль экстракции ДНК или РНК.

Эффективность экстракции нуклеиновых кислот из образцов материала оценивали по прохождению реакции амплификации внутренних контролей (ВКО).

В работе использовали два типа ВКО: экзогенный контроль, добавляемый при проведении этапа выделения ДНК, и эндогенный контроль, которым служили фрагменты генома животного-хозяина, амплифицируемые в мультиплексной реакции вместе с искомой мишенью возбудителем.

3.9 Определение нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК методом капиллярного электрофореза (по Сенгеру)

Секвенирование фрагментов амплификации по Сенгеру выполняли методом “cycle sequence” с набором ABI PRISM Big Dye v.1.1 («Applied Biosystems»), согласно инструкции изготовителя с использованием капиллярного автоматического секвенатора ABI-3100 PRISM Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Перед секвенированием проводили ферментативную очистку ПЦР продуктов от невключившихся дезоксинуклеотидов и избытка праймеров. В реакцию очистки брали от 2 до 5 мкл продукта ПЦР. Переносили необходимый объем реакционной смеси в отдельную одноразовую пробирку, добавляли 2 мкл реагента «ExoSAP-IT™» и перемешивали пипетированием. Инкубировали смесь при 37°C в течение 15 минут. Встряхивали смесь на микроцентрифуге-встряхивателе, осаждали капли кратковременным центрифугированием. Инкубировали смесь при 80°C 15 минут. После чего продукт ПЦР был готов к проведению реакции секвенирования ДНК.

В качестве праймеров для секвенирования использовались те же праймеры, которые были использованы в ПЦР. Количество ДНК, добавляемой в реакционную смесь, рассчитывали, исходя из длины секвенируемого продукта ПЦР. Реакцию секвенирования проводили в объеме 5 мкл реакционной смеси в тонкостенных микропробирках объемом 0,2 мл. Реакционная смесь содержала необходимое количество ДНК, 0,8 мкл специфичного праймера концентрации 1 мкМ, и 1 мкл готовой смеси «Ready Reaction BigDye® Terminator v1.1».

Аккуратно смешивали компоненты смеси и проводили термоциклирование на амплификаторе GeneAmp 2720 по следующей программе: начальная денатурация - 1 мин при 96 °С, затем 25 циклов: денатурация 96 °С - 10сек, отжиг праймера 60°С - 5 сек, элонгация 60°С - 4 мин.

Капиллярный электрофорез проводили на генетическом анализаторе ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer после очистки образцов от избытка дидезоксинуклеотидов и солей.

Для идентификации микроорганизмов сравнивали полученные нуклеотидные последовательности фрагмента генома с известными последовательностями из баз данных. Для поиска гомологичных последовательностей в базах данных NCBI использовали алгоритм BLAST на поисковом интернет-ресурсе www.ncbi.nlm.nih.gov.

3.10 Получение положительных контрольных образцов

Положительные контрольные образцы (ПКО) получали методом молекулярной трансформации компетентных клеток *E. coli* плазмидами pAL2-T, содержащими целевые фрагменты (продукты ПЦР). Клонирование осуществляли в компании «Евроген» с использованием набора Quick-TA.

Плазмидную ДНК выделяли из ампициллин-устойчивых колоний. Наличие вставки подтверждали методом ПЦР. Концентрацию плазмидной ДНК определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

3.11 Проведение секвенирования «нового поколения»

ДНК из образцов выделяли с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN). Концентрацию выделенной ДНК измеряли на флуориметре Quantus («Promega») с использованием набора реагентов «QuantiFluor®ONE dsDNA System» («Promega»), процедуру проводили согласно инструкции производителя.

Библиотеку для секвенирования готовили по стандартному протоколу.

Библиотеку для метагеномных исследований готовили с использованием набора реактивов «Nextera XT» согласно инструкции производителя № 15044223

«16S Metagenomic Sequencing Library Preparation». Для определения полного генома микроорганизмов использовали протокол Illumina № 15031942.

Для индексирования использовали наборы олигонуклеотидов Nextera XT Index 1 Primers (N7XX) и Nextera XT Index 2 Primers (S5XX) из набора Nextera XT Index kit. Магнитные шарики «AMPure XP beads» («Beckman Coulter») использовали для очистки реакционных смесей от праймеров и невключённых индексов, отношение объема суспензии магнитных шариков к объему очищаемой реакционной смеси составляло 0,8 и 1,1, соответственно.

Парно-концевое секвенирование 2*300 п.н. проводили на платформе Illumina Miseq с использованием набора реагентов «MiSeq 600v3 Reagent Kit» в соответствии с инструкцией «Illumina Experiment Manager. User Guide» (#15031335v05). При секвенировании использовали 10 пМ библиотеку с 10% содержанием контрольной библиотеки PhiX (Illumina).

Для биоинформатического анализа при метагеномных исследованиях использовали встроенное программное обеспечение Illumina «Metagenomics 16S rRNA», версия 2.6.2.3, а также пакет программ QIIME2.

Сборку бактериального генома de novo проводили с помощью программы SPAdes_2.11.1 с исправлением ошибок и автоматическим подбором длины k-мера. Основные характеристики сборки были получены с помощью программы QUAST 4.6.3. Для сборки использовали различные наборы k-меров 21, 33, 55, 77, 99, 127. Для генотипирования использовали общий метод поиска k-mer, реализованный в программе KmerFinder на онлайн-сервисе Центра геномной эпидемиологии Датского технологического университета (CGE) (версия 2.1).

Поиск основных факторов вирулентности и генов антибиотикорезистентности проводили в режиме онлайн с использованием Базы данных факторов вирулентности (VFDB) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) и сервера RAST (<https://rast.nmpdr.org/>).

3.12 Математические расчеты

Достоверность результатов подтверждали путем статистической обработки с использованием методов параметрического и непараметрического анализа. Накопление, корректировку, систематизацию исходной информации и визуализацию полученных результатов осуществляли в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2016. Статистический анализ проводили с использованием программы STATISTICA 13.3 («StatSoft.Inc»). Номинальные данные описывали с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение номинальных данных также проводили при помощи критерия χ^2 Пирсона, позволяющего оценить значимость различий между фактическим количеством качественных характеристик выборки, попадающих в каждую категорию, и теоретическим количеством, которое можно ожидать в изучаемых группах при справедливости нулевой гипотезы.

Значение критерия χ^2 сравнивали с критическими значениями для $(r - 1) \times (c - 1)$ числа степеней свободы. В том случае, если полученное значение критерия χ^2 превышало критическое, делали вывод о наличии статистической взаимосвязи при соответствующем уровне значимости.

При сравнении средних величин в нормально распределенных совокупностях количественных данных рассчитывали t-критерий Стьюдента по следующей формуле:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$$

где: M_1 и M_2 – сравниваемые средние величины, m_1 и m_2 – стандартные ошибки средних величин, соответственно.

Полученные значения t-критерия Стьюдента оценивали путем сравнения с критическими значениями. Различия показателей считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

При оценке результатов метагеномных исследований рассчитывали индексы α -биоразнообразия.

Индекс Шеннона рассчитывали по формуле: $H = -\sum_i \left(\frac{n_i}{N} \cdot \ln \left(\frac{n_i}{N} \right) \right)$.

Индекс Симпсона рассчитывали по формуле $D = \frac{\sum_i n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$.

4 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1 Анализ современного состояния контроля биобезопасности племенного материала

Проведенный нами анализ информации, опубликованной в открытых источниках, базах данных и отчетах показал, что в нашей стране потребности животноводства в племенной продукции составляют, по приблизительным оценкам, от 7 до 10 млн. доз в год и, несмотря на принимаемые руководством страны мер по развитию отечественной племенной базы скотоводства и повышению эффективности её работы, основной объем племенной продукции в Российскую Федерацию завозится из-за рубежа. Так, если в 2008 году было ввезено 250 тыс. доз спермы быков, то в 2020 году ввезено 4 492 тыс. доз., рекордные же объемы были ввезены в 2022 году, они составили более 5 млн. доз.

Большая часть импортной племенной продукции КРС завозится в Российскую Федерацию через Республику Беларусь.

Лидером по количеству ввезенных спермодоз на территорию Российской Федерации за 2019 - 2022 годы, согласно информации, полученной нами в результате изучения данных информационно-аналитической системы «Аргус», являются США. Объёмы поставок спермы американских быков-производителей в Российскую Федерацию за последние пять лет выросли более чем в пять раз. При этом нужно отметить, что американские и канадские компании на российском рынке спермопродукции значительно потеснили европейские компании-экспортеры. Так, в 2022 году в Россию официально не было ввезено ни одной партии криоконсервированной спермы из Великобритании, Нидерландов и Чешской Республики, а ввоз семени быков из Соединенных Штатов Америки за период с начала 2021 по конец 2022 года вырос в 1,34 раза.

Информация о количестве ввезенных спермодоз быков – производителей за 2017–2022 гг. на территорию Российской Федерации представлена в таблице 8 [17].

Таблица 8 – Ввоз спермодоз быков – производителей на территорию Российской Федерации за 2017 - 2022 гг.

Страна - импортер	Объем поставки (доз)					
	2017	2018	2019	2020	2021	2022
США	957 077	632 987	1 880 965	2 905 001	2 701 043	3 626 750
Канада	1 015 235	995 179	875 366	1 182 057	1 117 499	1 260 341
Дания	6 274	4 200	25 369	41 531	46 601	20 268
Германия	62 391	47 630	76 409	135 616	70 411	28 550
Др. страны	159 017	162 060	166 127	228 133	103 318	96 744
Итого	2 193 720	1 842 056	3 024 236	4 492 338	4 038 872	5 032 653

При этом производство и реализация племенной продукции КРС из отечественных племенных центров в последние годы была ориентирована, в основном, на постсоветское пространство (Республика Казахстан, Республика Беларусь, Республика Узбекистан, Республика Азербайджан).

Несмотря на сложную геополитическую обстановку, импорт спермопродукции в Российскую Федерацию в первом квартале 2023 года сохранил значительный объем, при этом с российского рынка полностью ушли компании, предлагающие спермопродукцию племенных хозяйств Великобритании, Дании, Германии и Нидерландов. Вся официально импортируемая продукция в настоящее время завозится из стран Северной Америки. Так, по данным, представленным в «Аргус» только за период с 1 января по 30 июня 2023 года через различные пункты пропуска прошло более 2 239 900 доз, из них 69,5% продукции – из США и 30,5% – из Канады.

Для ввозимой на территорию России спермы быков-производителей действуют требования Комиссии Таможенного союза, отраженные в утвержденной форме ветеринарного сертификата. По существующим требованиям сперма должна быть получена от клинически здоровых животных из предприятий искусственного осеменения, свободных от заразных заболеваний, где быки-производители исследовались на определенный перечень заболеваний. Требования

предполагают подтверждение благополучия животных в стране экспортере, что по факту не является гарантией безопасности спермы, полученной от них. При этом требование об отсутствии ввозимой сперме патогенных и токсикогенных микроорганизмов было исключено из Единых ветеринарных (ветеринарно-санитарных) требований, предъявляемых к товарам, подлежащим ветеринарному контролю (надзору), утвержденных Решением Комиссии Таможенного союза от 18.06.2010 № 317 в конце 2011 года.

По утвержденным для ввоза спермопродукции на территорию ЕАС правилам (в соответствии с рекомендациями ВОЗЖ) быки-доноры должны быть из благополучных хозяйств по паратуберкулезу, бруцеллезу, лейкозу, трихомонозу, кампилобактериозу, инфекционному ринотрахеиту, блутангу и вирусной диарее.

Согласно утвержденным требованиям, сперма должна быть получена от быков-производителей, которые не вакцинированы против бруцеллеза. При этом нет четких требований или ограничений по вакцинации быков живыми вакцинами против вирусной диареи и инфекционного ринотрахеита, хотя известно, что вакцинация быков живыми вакцинами также может приводить к выделению вируса со спермой.

Требований к качеству и безопасности непосредственно к самой спермопродукции в законодательстве не предусмотрено.

В принятых установленных приказом Министерства сельского хозяйства РФ № 336 в 2022 году требованиях к племенным хозяйствам отсутствует положение о контроле качества выпускаемой криоконсервированной спермы [75].

Спермопродукция, поставляемая на рынок отечественными племенными хозяйствами и поступившая извне на территорию страны, в рамках добровольной сертификации может исследоваться по показателям, указанным в ГОСТ 26030-2015 и ГОСТ Р 33955-2016 [31-32]. Данные регламентирующие документы при разработке были ориентированы только для использования внутри страны и не были рассчитаны на массовый импорт такой продукции, поэтому требуют актуализации.

Согласно данным стандартам, сперма должна соответствовать нормам по таким ветеринарно-санитарным показателям, как общее число непатогенных микроорганизмов в дозе, коли-титр, количество патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. При этом определение патогенных и условно-патогенных бактерий и грибов производится микробиологическим методом (таблица 9), по требованиям, описанным ГОСТ ISO 8607 - 2015 и ГОСТ 32198-2013, а определение наличия вирусов и микоплазм в спермопродукции не проводится [33, 36].

Таблица 9 – Нормы содержания микроорганизмов (по ГОСТ 26030-2015)

Наименование показателя	Норма
Общее число непатогенных микроорганизмов в дозе, КОЕ, не более	500
Коли-титр, не более	0,1
Патогенные и условно-патогенные микроорганизмы	Не допускаются

Надо еще раз отметить, что контроль спермопродукции, согласно ГОСТ, носит добровольный, а не обязательный характер, и может не проводиться или проводиться не в полном объеме.

Ранее действовавшими Ветеринарными правилами при воспроизводстве сельскохозяйственных животных, утвержденными Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 20 июля 1971 года, был установлен ряд ветеринарных требований, согласно которым, в целях контроля за санитарным качеством спермы и условиями содержания у отечественных животных-производителей регулярно (не реже 4 раз в год) исследовали сперму и смывы из препуция, а сперму, поступающую из-за границы, направляли для исследования в Государственный научно-контрольный институт ветпрепаратов, г. Москва (ФГБУ «ВГНКИ»).

Постановлением Правительства Российской Федерации от 13.11.2010 г. № 906 «О внесении изменений в постановление Правительства Российской Федерации от 01.12.2009 № 982 «Об утверждении единого перечня продукции, подлежащей обязательной сертификации, и единого перечня продукции, подтверждение

соответствия которой осуществляется в форме принятий декларации о соответствии» сперма сельскохозяйственных животных была исключена из перечня продукции, подлежащей обязательному подтверждению соответствия. В документе, вступившем в силу в 2022 году этот вид продукции также отсутствует [76].

Методические указания по ветеринарно-санитарному качеству замороженной спермы, на основании которых проводились исследования криоконсервированной спермопродукции, были отменены приказом Минсельхоза РФ № 71 от 28.04.2005 «Об отмене методических указаний по ветеринарно-санитарному контролю качества замороженной спермы быков-производителей». Новые документы, посвященные вопросам контроля этой продукции на данный момент еще не разработаны.

Таким образом, анализ документов показывает, что существующая в настоящее время нормативно-правовая база, регулирующая сферу обращения спермопродукции, не позволяет подтвердить ее биологическую безопасность, а также не содержит необходимый спектр требований, позволяющий осуществлять контроль биобезопасности в полном объеме.

Кроме того, полномочиями по осуществлению мероприятий, направленных на обеспечение биологической безопасности племенной продукции, полученного от продуктивных и непродуктивных животных не наделен ни один федеральный орган исполнительной власти.

В сложившейся ситуации возрастают риски распространения инфекционных заболеваний при использовании спермопродукции [17].

4.2 Оценка возможности использования ПЦР-тест-систем, предназначенных для диагностики болезней КРС, для тестирования спермопродукции

Подбор условий экстракции нуклеиновых кислот из спермы

Стадия экстракции нуклеиновых кислот играет важнейшую роль при проведении ПЦР-исследований, направленных на выявление фрагментов генома

возбудителей инфекционных болезней в сперме КРС [279], поэтому исследование частоты встречаемости возбудителей инфекционных болезней КРС начали проводить с первичного тестирования различных наборов и типов выделения нуклеиновых кислот.

Для экстракции нуклеиновых кислот использовали 6 образцов спермы в гранулах из отечественных племенных центров и 6 импортных образцов спермы в пайетах-соломинах. Выделение проводили с использованием наборов «ДНК-сорб-С», «Рибо-преп» (АмплиСенс, ФБУН ЦНИИЭ), наборов «Проба-ГС» и «Проба-НК» (ООО «ДНК-технология») и автоматической станции для экстракции NucliSENS easyMAG. Каждый образец разводили раствором 0,9% натрия хлорида и выделяли в двух вариантах – в разведениях 1:1 и 1:3. Эффективность экстракции ДНК и РНК оценивали по амплификации внутреннего экзогенного контроля при использовании тест-системы «Ринокор» (АмплиСенс, ФБУН ЦНИИЭ) и внутреннего эндогенного контроля при использовании тест-системы LSI VetMAX™ IBR gB (Life Technologies Corporation) (ВКО).

При выделении нуклеиновых кислот автоматической станцией NucliSENS easyMAG была показана недостаточная эффективность экстракции ДНК из спермы КРС как при использовании разведения спермы в 2 раза, так и при использовании разведения матрицы в 4 раза [83]. Во всех образцах не было амплификации экзогенного контроля, представляющего собой плазмидную ДНК конструкцию, добавляемую при выделении ДНК, а при оценке эффективности выделения ДНК по амплификации эндогенного контроля (фрагмента гена животного) было отмечено отсутствие реакции амплификации или низкий выход ПЦР-продукта (рисунок 7).

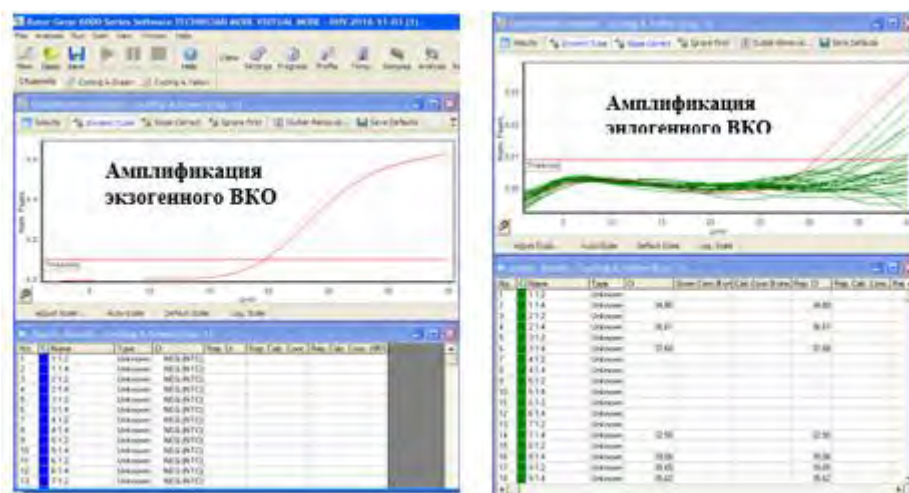


Рисунок 7 – Результаты тестирования экстракции ДНК с помощью автоматической станции NucliSENS easyMAG и наборов для выявления вируса инфекционного ринотрахеита КРС.

При экстракции ДНК из разведенной 1:3 спермы комплектом реагентов «ДНК-сорб С» (с применением протеиназы К) амплификация экзогенного ВКО наблюдалась в 41,6% образцов, что также говорит о недостаточной эффективности данного набора для выделения нуклеиновых кислот.

Выделение ДНК наборами «Проба-ГС» и «Проба-НК» (рисунок 8) показало, что оба набора позволяют достаточно эффективно выделять ДНК из такой сложной матрицы, как сперма КРС. Лучшие результаты получены при разведении образца 1:3. При сравнении этих наборов между собой было показано, что использование сорбентного метода менее эффективно, чем использование метода, включающего стадию спиртового осаждения нуклеиновых кислот. Среднее значение St амплификации экзогенного ВКО при использовании сорбентного набора «Проба-ГС» – $27,09 \pm 0,65$, а эндогенного контроля – $30,1 \pm 0,59$. При использовании набора «Проба-НК» среднее значение St амплификации экзогенного ВКО составило $22,03 \pm 1,23$, что значительно меньше, чем при использовании «Проба-ГС». St амплификации эндогенного контроля составило $23,4 \pm 0,33$, что также значительно ниже, чем при использовании сорбентного набора.

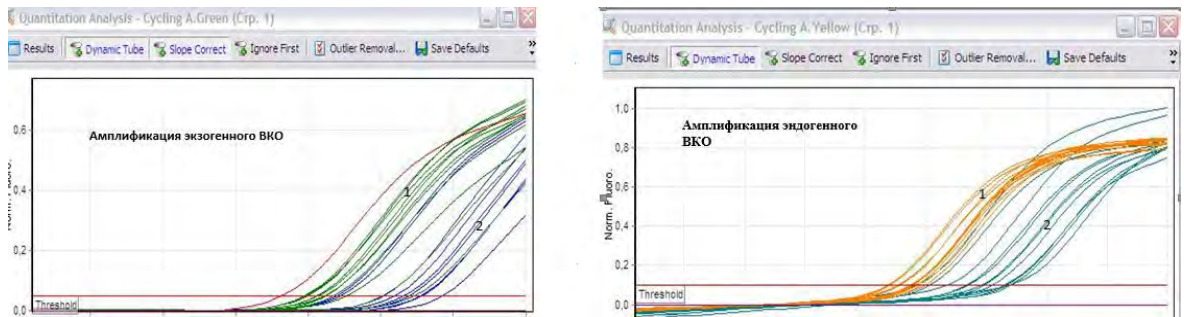


Рисунок 8 – Результаты экстракции ДНК с помощью наборов «Проба-НК» (1) и «Проба-ГС» (2).

Также был протестирован комплект реагентов «РИБО-преп», принцип действия которого (как и набора «Проба-НК») основан на лизисе клеток и денатурации клеточных белков с помощью раствора, содержащего хаотропный агент гуанидин тиоцианат с последующим осаждением нуклеиновых кислот спиртом и дальнейшей экстракцией их в раствор. Данный комплект реагентов показал хорошую эффективность выделения ДНК из образцов спермы как в случае использования экзогенного ВКО, так и в случае использования эндогенного ВКО. Среднее значение St для эндогенного контроля составило $20,85 \pm 0,27$. Различия, по сравнению с аналогичными значениями St , полученными с помощью набора «Проба-НК», согласно расчету t -критерия Стьюдента, были статистически значимыми.

Из-за полученных значений, а также с учетом большего удобства использования, связанного, в том числе, с сокращением общего времени экстракции ДНК, набор «Рибо-преп» был выбран для дальнейшей работы.

Сравнительное изучение диагностических ПЦР-наборов

Было проведено сравнение результатов работы наборов для выявления фрагментов генома вируса инфекционного ринотрахеита КРС 1 типа производства России и Франции. ДНК, выделенная из одним и тем же набором для экстракции из одних и тех же образцов спермы быков, была протестирована с использованием трех тест-систем: «РИНОКОР» (Amplisens, ФБУН ЦНИИЭ), LSI VetMAX™ IBR gV (Life Technologies Corporation), а также тест-системы производства «ВетБиоХим».

В результате анализа полученных результатов амплификации с гибридно-флуоресцентной детекцией был сделан вывод, что несмотря на различия в используемых системах амплификации внутренних контролей, тест-системы Life Technologies Corporation и ФБУН ЦНИИЭ позволяют получать аналогичные результаты: как при использовании набора отечественного производства, так и с использованием набора производства Франции в 2-х образцах отечественного семени было подтверждено наличие в образцах фрагментов генома вируса BHV 1 типа (рисунки 9, 10).

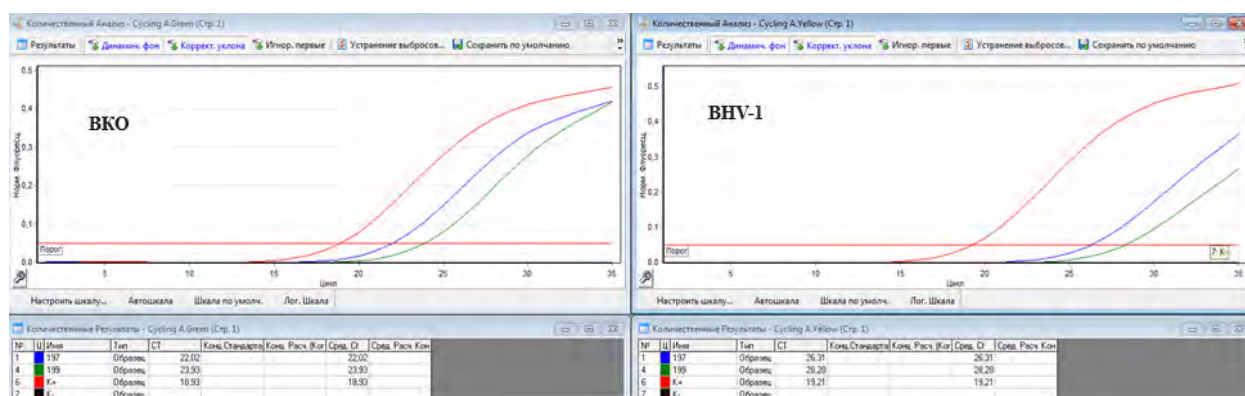


Рисунок 9 – Результаты обнаружения генома вируса BHV 1 типа в образцах спермы КРС с помощью тест-системы «Ринокор»

К+ - положительный контроль ПЦР; К- - отрицательный контроль ПЦР; 197,199 – тестируемые образцы спермы

Исследование этих же образцов с помощью тест-системы производства «ВетБиоХим» (рисунок 11) показало недостаточно высокую эффективность реакции амплификации: образцы, показавшие положительный результат при использовании наборов LSI VetMAX™ IBR gV и «Ринокор», трактовались как отрицательные при применении набора «ВетБиоХим».

Такая эффективность ПЦР-набора, наряду с отсутствием внутреннего контроля, предназначенного для контроля качества проведенного этапа выделения нуклеиновых кислот, может привести к увеличению числа ложноотрицательных результатов исследования [92].

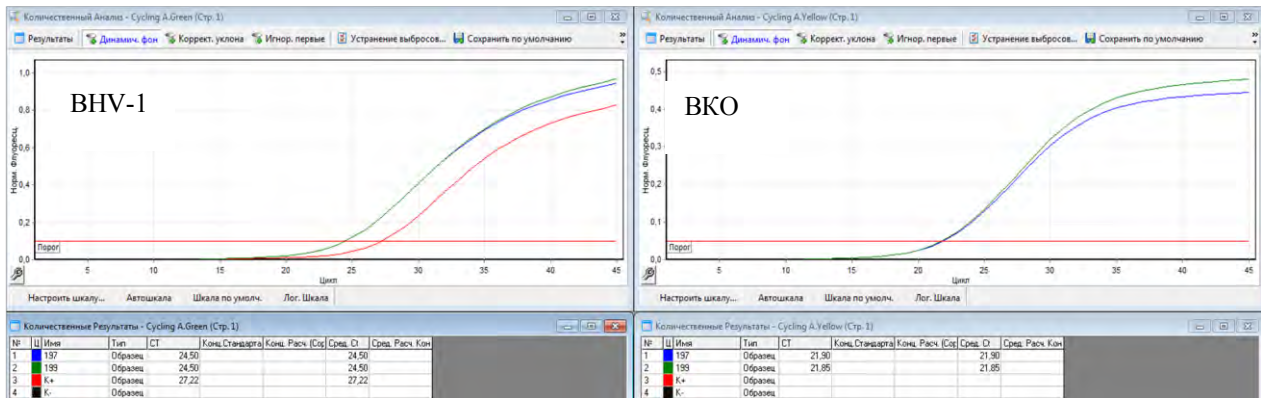


Рисунок 10 – Результаты обнаружения генома вируса BHV-1 типа в образцах спермы КРС с помощью тест-системы LSI VetMAX™ IBR gB

K+ - положительный контроль ПЦР; K- - отрицательный контроль ПЦР; 197,199 – тестируемые образцы спермы.

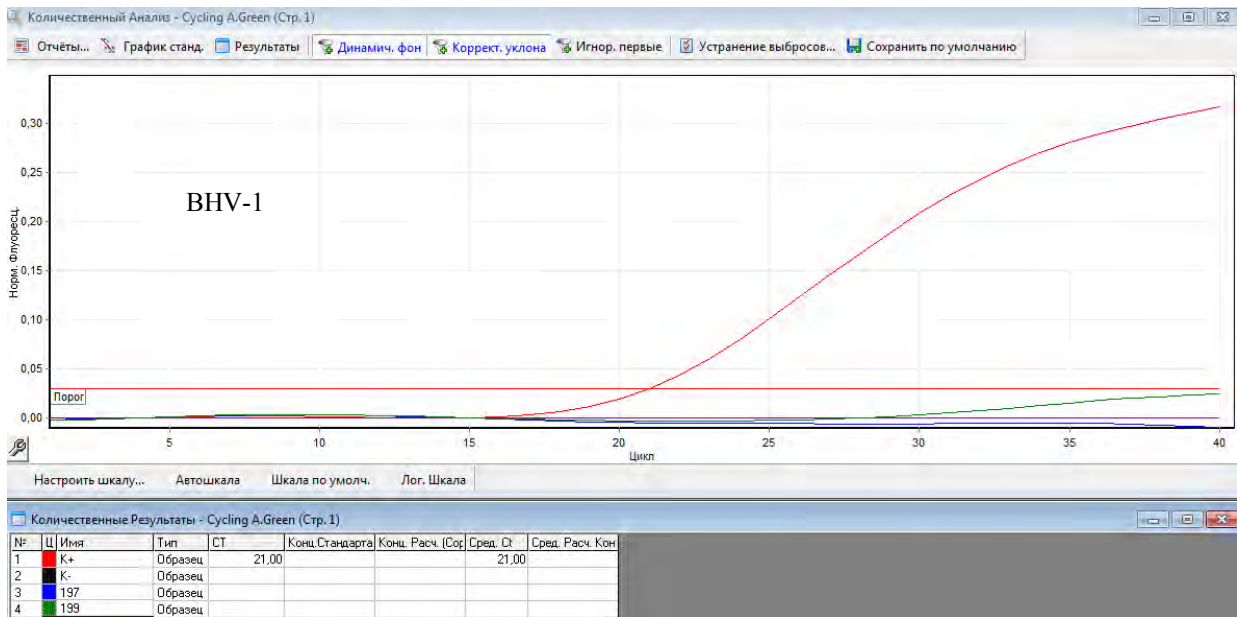


Рисунок 11 – Результаты обнаружения генома вируса BHV-1 в образцах спермы КРС с помощью тест-системы для диагностики инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени («ВетБиоХим»)

K+ - положительный контроль ПЦР; K- - отрицательный контроль ПЦР; 197,199 – тестируемые образцы спермы.

В нашей работе перед использованием диагностического набора для выявления вируса Шмалленберг, не предназначенного производителем для тестирования спермопродукции, была проведена оценка возможности его применения при исследованиях спермы быков. Для такой оценки использовали специально подготовленные образцы спермы, искусственно контаминированные генетическим материалом искомого возбудителя с известной концентрацией. На рисунке 12 представлены результаты амплификации фрагмента генома вируса Шмалленберг, в эксперименте по определению предела детекции тест-системы «SBV» при исследовании спермы.

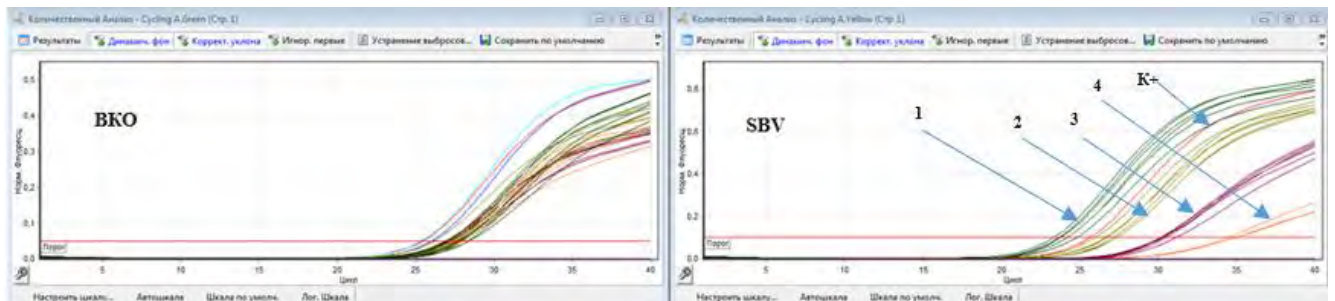


Рисунок 12 – Оценка аналитической чувствительности «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F тест-системы «SBV», используемой для амплификации фрагмента генома вируса Шмалленберг при исследовании спермы.

K+ - положительный контроль ПЦР, 1- образец, содержащий РНК вируса Шмалленберг в концентрации $8,4 \times 10^5$ копий/см³, 2 - образец, содержащий РНК вируса Шмалленберг в концентрации $8,4 \times 10^4$ копий/см³, 3 - образец, содержащий РНК вируса Шмалленберг в концентрации $8,4 \times 10^3$ копий/см³, 4 - образец, содержащий РНК вируса Шмалленберг в концентрации $8,4 \times 10^2$ копий/см³.

В таблице 10 приведены полученные значения порогового цикла для образцов спермы с разным содержанием вируса.

В проведенном эксперименте чувствительность набора составила $8,4 \times 10^3$ копий/см³ и была ниже заявленной производителем для крови, суспензии органов, сыворотки.

Изучение инструкций к диагностическим наборам показало, что производители часто не указывают информацию о чувствительности для разных видов биологического материала (смылов со слизистой, суспензия паренхиматозных органов и др.). При этом исследования показали, что чувствительность при тестировании разного материала может на порядок отличаться в зависимости от используемых наборов для экстракции нуклеиновых кислот [94, 107].

Таблица 10 – Оценка аналитической чувствительности «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F тест-системы «SBV», используемой для амплификации фрагмента генома вируса Шмалленберг при исследовании спермы.

Название образца	Значения порогового цикла при амплификации ВКО, Ct. Green			Значения порогового цикла при амплификации целевой ДНК, Ct. Yellow		
	Значения Ct	Средн. Ct±SD	Положительный результат ВКО	Значения Ct	Средн. Ct±SD	Положительный результат <i>Schmallenberg virus</i>
РНК вируса Шмалленберг, концентрация $8,4 \times 10^2$ копий/см ³	27,90 27,80 27,35 26,89 27,17 27,17	27,38±0,35	100%	34,96 34,41 34,93	34,77±0,25	50 %
РНК вируса Шмалленберг, концентрация $8,4 \times 10^3$ копий/см ³	27,19 26,99 27,28 27,68 27,78 28,00	27,49±0,35	100%	30,22 30,30 30,14 31,21 30,51 30,51	30,48±0,35	100 %
РНК вируса Шмалленберг,	27,72 26,18	27,38±0,57	100%	27,39 26,00	26,89±0,49	100%

концентрация $8,4 \times 10^4$ копий/см ³	27,99			27,39		
	27,26			26,62		
	27,51			27,16		
	27,60			26,76		
РНК вируса Шмалленберг, концентрация $8,4 \times 10^5$ копий/см ³	28,39	27,65±0,58	100%	24,79	24,00±0,46	100%
	28,37			24,17		
	27,07			23,79		
	26,96			23,34		
	27,29			23,68		
	27,84			24,21		

4.3 Скрининговое исследование спермы быков для выявления вирусных инфекционных агентов

С использованием собственных методик, а также отечественных и иностранных ПЦР-наборов с разными форматами детекции проведено исследование 444 образцов спермы быков из отечественных (N=211) и зарубежных (N=233) племенных центров на наличие генетического материала следующих мишеней (возбудителей):

- вируса инфекционного ринотрахеита КРС 1 типа (BHV-1),
- вируса инфекционного ринотрахеита КРС 4 типа (BHV-4),
- вируса лейкоза КРС (BLV),
- вируса заразного узелкового дерматита КРС (LSDV),
- вируса диареи КРС (BVDV),
- вируса Шмалленберг (SBV),
- вируса Блютанг (BTV),
- коронавируса КРС (BCOV),
- вируса парагриппа 3 КРС (BPIV-3).

Результаты представлены в таблице 11.

Генетический материал вирусов заразного узелкового дерматита, коронавируса КРС, парагриппа-3 КРС, Шмалленберг, блютанга и провирусная ДНК вируса лейкоза КРС не были выявлены ни в одном из исследованных образцов. ДНК BHV-1 и BHV-4 была выявлена как в российской, так и в

импортированной спермопродукции, в то время как генетический материал вируса диареи КРС обнаруживали только в сперме, полученной из США.

Таблица 11 – Результаты выявления вирусов в образцах спермопродукции

Вирус	Сперма быков из отечественных племенных центров		Сперма быков из зарубежных племенных центров*		Всего	
	211 образцов		233 образца		444 образца	
	Обнаружены НК	%	Обнаружены НК	%	Обнаружены НК	%
BVDV	-	0	2	0.85	2	0.45
BHV-1	2	0.94	4	1.70	6	1.35
BHV-4	1	0.47	3	1.28	4	0.90
BLV	-	0	-	0	-	0
SBV	-	0	-	0	-	0
BTV	-	0	-	0	-	0
LSDV	-	0	-	0	-	0
BCOV	-	0	-	0	-	0
BPIV	-	0	-	0	-	0

*Включая образцы сексированной спермы.

Надо отметить, что ни в одном из 20 образцов спермы, разделённой по полу, не были выявлены фрагменты генома исследованных вирусов КРС. Статистическая оценка двух выборок (образцы из отечественных племенных центров и образцы из зарубежных племенных центров) показала отсутствие между ними значимых различий.

4.4 Вирусологическое исследование образцов спермы КРС

Вирусологические исследования, представленные в данном разделе, выполнены совместно с доцентом кафедры эпизоотологии, микробиологии и

организации ветеринарного дела ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА им. К.И. Скрябина, к.в.н. Пчельниковым А.В.

Для вирусологического тестирования нами были случайным образом отобраны 8 образцов спермы быков. В 7 пробах после культивирования на MDBK цитопатический эффект не проявился на протяжении 4 слепых пассажей. После получения отрицательных результатов четвертого пассажа, работа с материалом была прекращена, а ПЦР-исследования с использованием набора реагентов «РИНОКОР» и гнездовой ПЦР с использованием праймеров, специфичных для фрагмента гена *gB* герпесвирусов 1 и 5 типа [516] подтвердили отсутствие вируса в культуре.

В 1 пробе из спермы быка, полученной из американского племенного центра, и положительной по результатам ПЦР, цитопатический эффект (ЦПД) был обнаружен на 2 день. Визуально цитопатическое действие проявлялось образованием очагов округлившихся клеток с последующим отслоением от поверхности культурального матраса с образованием своеобразных дыр округлой или продолговатой формы в монослое, по периметру которых наблюдалось скопление округлых клеток. Полное отслоение монослоя от ростового субстрата наблюдалось на четвертый день после заражения. В целом характер цитопатического действия вируса характерен для вируса инфекционного ринотрахеита КРС.

На протяжении трех последующих пассажей скорость проявления и характер ЦПД не изменились, что позволяет говорить о получении стабильной культуры вируса с признаками, характерными для вируса инфекционного ринотрахеита КРС.

Материал 1 и 4 пассажей был использован при проведении молекулярно-генетических исследований. ДНК вируса герпеса КРС была выявлена в результате ПЦР-исследования и в 1, и в 4 пассажах. В результате секвенирования полученного ПЦР-фрагмента с праймерами, общими для гена *gB* герпесвирусов 1 и 5 типа, в 1 пассаже была установлена 100% гомология нуклеотидной последовательности полученного фрагмента ДНК размером 384 п.н. с последовательностями Bovine alphaherpesvirus 1 (GenBankMK6547234; MH552112). При исследовании 4 пассажа

была установлена 100% гомология нуклеотидной последовательности полученного фрагмента ДНК размером 384 п.н. с последовательностями Bovine alphaherpesvirus 5 (KY549446; MW805274), представленными в международной базе GenBank и 99,7% гомология с последовательностями Bovine alphaherpesvirus.

Было проведено дополнительное исследование образца 4 пассажа с использованием полногеномного секвенирования. Согласно данным биоинформатического анализа было получено 917073 парных прочтений длиной 250 пн., отмечено отклонение G+C-состава от ожидаемого распределения со средним 74%, что говорит о значительной контаминации в исследуемом образце. Поиск гомологий прочтений по нуклеотидной базе NCBI выявил, что культура клеток MDBK, на которой проводили культивирование, контаминирована *Mycoplasma spp.*, а невысокое относительно наличия микоплазм и ДНК КРС содержание вируса не позволяет провести полную сборку вирусного генома высокого качества. Однако проведенный поиск прочтений, соответствующих вирусному геному, подтвердил с пересечением > 90% и идентичностью > 95% наличие в образце вируса, родственного Bovine alphaherpesvirus 5 strain P160/96.

Такой результат дает основания говорить о наличии в импортированной сперме быка из американского племенного центра жизнеспособного вируса инфекционного ринотрахеита КРС. При этом результаты секвенирования позволяют предположить наличие в образце спермы вирусов двух типов – BHV-1 и BHV-5 [108].

4.5 Поиск новых вирусных контаминантов спермы быков

В связи с появлением информации о новых вирусах, обнаруживаемых у КРС в разных странах, нами было проведено исследование спермопродукции на наличие контаминации такими вирусами, как Кобувиром КРС (Bovine kobuvirus) [49] и вирус герпеса КРС 6 типа [80, 81]. Первичное тестирование проводили с использованием ПЦР с электрофоретической детекцией амплификации. Для обоих вирусов были подобраны олигонуклеотидные праймеры для ПЦР. Подбор был проведен на основе анализа выравниваний нуклеотидных последовательностей

соответствующих вирусов, опубликованных в международных базах данных. Теоретическая специфичность праймеров была оценена с помощью программы Blast. Состав реакционной смеси и условия амплификации были оптимизированы. При оптимизации варьировали концентрацию олигонуклеотидов в смеси, меняли температуру отжига праймеров и длительность основных стадий амплификации.

Для Кобувируса ожидаемым продуктом ПЦР при использовании выбранных праймеров, подобранных на фрагмент гена РНК полимеразы, был ампликон размером 235 п.н. В реакции использовали 10 мкл кДНК, полученной в результате проведения реакции обратной транскрипции выделенной из проб спермы суммарной РНК.

Для вируса герпеса КРС 6 типа ожидаемым было получение в ПЦР ампликона размером 550 п.н. В реакции использовали 10 мкл суммарной ДНК, выделенной из образцов спермы быков.

ПЦР проводили с использованием методики "горячего старта" в программируемом четырехканальном термостате «Терцик» в 25 мкл реакционной смеси, содержащей по 10мкМ прямого и обратного праймеров, 10 мкл, ПЦР-смесь-2-blue, 0,2 мклраствора дНТФ с концентрацией каждого нуклеотида 25 ммоль/мкл («Синтол») и деионизованную воду. Температурные условия реакций представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Программы для амплификации фрагментов генома Kobuvirus и ВHV-6

Kobuvirus			ВHV-6		
Температура	Время	Циклы	Температура	Время	Циклы
94°C	пауза		94°C	пауза	
94°C	5 мин	1	94°C	5 мин	1
94°C	10 сек	42	94°C	10 сек	42
52°C	10 сек		57°C	10 сек	
72°C	20 сек		72°C	20 сек	
72°C	3 мин	1	72°C	3 мин	1
10°C	хранение		10°C	хранение	

Ожидаемый для Кобувируса продукт ПЦР при проведении электрофоретического анализа в 1,8% агарозном геле не был выявлен ни в одном случае из протестированных образцов спермы быков.

Ожидаемый для ВHV-6 фрагмент ПЦР размером около 550 п.н. (рисунок 13) был выявлен в образцах спермы быков как из отечественных, так и из зарубежных хозяйств.

Специфичность полученного продукта ПЦР была подтверждена секвенированием по Сенгеру. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей показал, что выявленный фрагмент ДНК близкородственен нуклеотидной последовательности гена ДНК-полимеразы штамма Pennsylvania 47 ВHV-6. ПЦР-фрагмент в дальнейшем использовали в качестве вставки для получения положительного контрольного образца (ПКО) – рекомбинантной плазмиды.

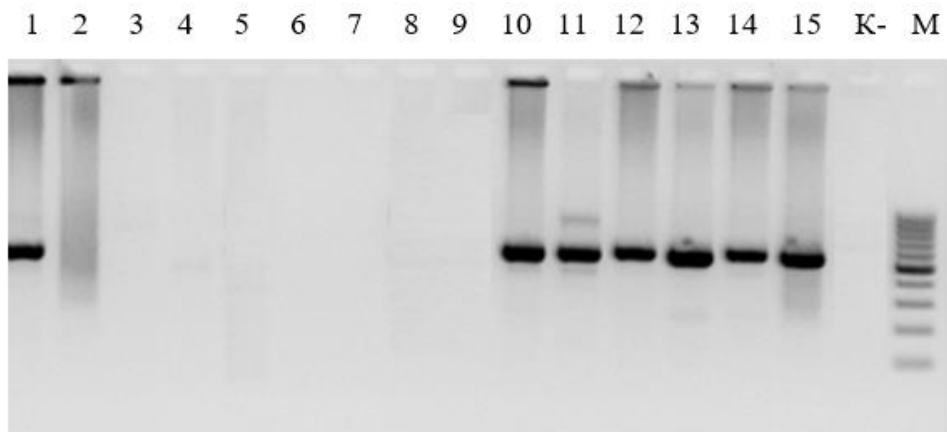


Рисунок 13 – Результаты электрофоретического анализа продуктов амплификации ДНК ВHV-6, полученных при исследовании образцов спермы.

К- отрицательный контроль ПЦР, М – маркер длин ДНК, 1-15 – тестируемые образцы.

Общее количество положительных образцов из 444 исследованных проб спермы составило 88 (19,8%). В образцах из отечественных племенных центров ДНК ВHV-6 встречалась почти в пять раз чаще, чем в спермопродукции из зарубежных племенных центров – в 34,1% и 6,86%, соответственно (таблица 13).

Таблица 13 – Результаты выявления Кобувирусов и BHV-6 в образцах спермопродукции

Вирус	Сперма быков из отечественных племенных центров		Сперма быков из зарубежных племенных центров*		Всего	
	211 образцов		233 образца		444 образца	
	Обнаружены НК	%	Обнаружены НК	%	Обнаружены НК	%
Kobuvirus	-	0	-	0	-	0
BHV-6	72	34.1	16	6.86	88	19.8

При этом было отмечено, что количество содержащих BHV-6 образцов спермопродукции различалось в разных племенных центрах: в одних, более крупных хозяйствах, BHV-6 выявляли в 10-15% образцов, в других - более, чем в 60% образцов.

4.6 Разработка способа выявления ДНК BHV-6 в сперме быков методом ПЦР в режиме «реального времени»

В связи с высокой частотой выявления в спермопродукции генетического материала BHV-6 была проведена разработка методики выявления ДНК этого вируса на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Разработку этой и других приведенных в работе методик на основе ПЦР в режиме «реального времени» проводили по схеме, представленной на рисунке 14.

После дополнительного анализа нуклеотидных последовательностей геномов вирусов рода *Macavirus* подсемейства *Gammaherpesvirinae*, представленных в базе данных GenBank, был проведен подбор мест посадки праймеров и флуоресцентного TaqMan-зонда для амплификации и детекции фрагмента гена ДНК-полимеразы (гомолога ORF9) BHV-6.



Рисунок 14 – Схема проведения разработки методик на основе ПЦР в режиме «реального времени».

При выборе рассчитывали температуру отжига, оценивали возможность формирования димеров и вторичной структуры олигонуклеотидов, кроме того, учитывали структуру праймеров, используемых для амплификации внутреннего контроля. Подобранный зонд для ПЦР в реальном времени содержал на 5'-конце флуоресцентный краситель R6G, что позволило проводить детекцию в амплификаторах RotorGene Q или CFX96 (по следующей программе термоциклирования: 15 мин при 95 °С; циклирование 1: 10 сек при 95 °С, 20 сек при 60° С, 10 сек при 72° С (5 циклов без детекции флуоресцентного сигнала); циклирование 2: 10 сек при 95 °С, 20 сек при 55° С, 10 сек при 72° С (35 циклов с детекцией флуоресцентного сигнала при 55° С на канале R6G/Yellow).

Была проведена оценка аналитической специфичности и чувствительности выбранного набора олигонуклеотидов для идентификации и детекции ДНК ВНУ-6. Специфичность оценивали с использованием панели образцов, содержащей ДНК/кДНК различных микроорганизмов и вирусов, вызывающих инфекционные заболевания КРС. В набор из 36 различных образцов бактерий и вирусов были включены родственные ВНУ-6 герпесвирусы КРС 1, 2 и 4 типов, а также геномная ДНК КРС. Анализ проводили в нескольких повторах, ни в одном случае не были

выявлены неспецифические реакции. Результаты показали, что предложенные для детекции ВНУ-6 олигонуклеотиды амплифицируют только фрагменты генома ВНУ-6 и не амплифицируют ДНК/кДНК других микроорганизмов и геномную ДНК животных из предложенной панели образцов.

Абсолютную чувствительность ПЦР-методики оценивали по результатам амплификации последовательных десятикратных разведений в РНК-буфере образца ПКО – рекомбинантной плазмиды рAL2-Т, содержащей целевую вставку с фрагментом гена DPOL(ORF9) ВНУ-6. В эксперименте использовали по 3 повтора ПКО ВНУ-6 с концентрациями от 4×10^6 копий/мл до 4×10^2 копий/мл. Воспроизводимость методики оценивали при проведении аналогичного эксперимента в разные дни, на разных приборах RotorGeneQ. За абсолютную чувствительность принимали наименьшую концентрацию ПКО, для которой получен положительный результат для всех повторов (значения $Ct < 35$). Абсолютная чувствительность системы подобранных олигонуклеотидов для детекции ДНК ВНУ-6 составила 4×10^3 коп/мл.

Также оценили предел детекции методики при тестировании спермы КРС. Для проведения исследования готовили последовательные десятикратные разведения ПКО ВНУ-6 с концентрациями от 4×10^6 копий/мл до 4×10^2 копий/мл в предварительно проверенном подготовленном отрицательном образце спермы КРС. ДНК из каждого образца спермы с разведением ПКО выделяли набором реагентов «Рибо-преп», после чего проводили реакцию амплификации. За чувствительность (предел детекции) принимали наименьшую концентрацию ПКО, для которой получен положительный результат ПЦР в трех повторах.

Предел детекции при исследовании спермы составил 4×10^3 коп/мл (рисунок 15).

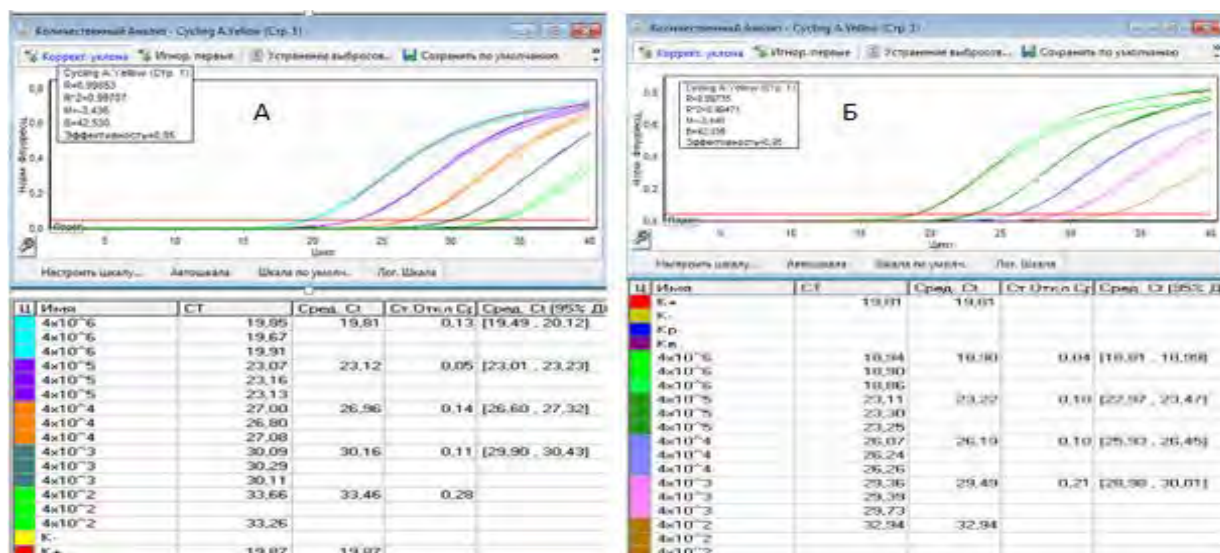


Рисунок 15 – Оценка чувствительности методики детекции ДНК BVD-6.

А- при тестировании разведений ПКО в сперме КРС

Б- при тестировании разведений ПКО в РНК-буфере.

Разработанная методика использовалась для подтверждения результатов тестирования с использованием классической ПЦР с электрофоретической детекцией. При тестировании образцов было получено 100% соответствие результатов. В дальнейшем методика была валидирована для тестирования сыворотки и цельной крови КРС и использована при проведении исследований материала от животных.

4.7 Скрининговое исследование спермы быков для выявления бактериальных инфекционных агентов

Наборы для ПЦР-диагностики были использованы для скрининговых исследований спермы для выявления следующих бактериальных агентов: *Chlamydia spp.*, *Campylobacter spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus*, *Histophilus somni*, *Leptospira spp.*, *Brucella spp.*, *Coxiella burnetti*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Также были проведены ПЦР-исследования образцов, направленные на выявление в сперме ДНК *Neospora caninum*.

По результатам молекулярно-генетических исследований ни в одном из 444 образцов спермы быков не была выявлена ДНК микроорганизмов родов *Chlamydia*, *Leptospira* и *Brucella*, а также *Neospora caninum*. Результаты исследований подробно описаны в статье, опубликованной в журнале «Ветеринария» в 2019 году [92].

4.7.1 Результаты выявления *Campylobacter spp.*

При исследовании образцов спермы с помощью тест-системы «LSIVetMAX™*Campylobacter spp.*» на присутствие ДНК микроорганизмов рода *Campylobacter* положительный результат ПЦР был получен для 168 образцов из 211 исследованных спермодоз отечественных быков и для 129 проб из 233 образцов импортной спермы.

В связи с большим числом сапрофитных видов рода *Campylobacter*, которые могут присутствовать как в пищеварительном тракте, так и в крайней плоти быков, для выявления патогенных видов дополнительно было проведено исследование положительных образцов спермы на наличие ДНК *C. fetus* и *C. jejuni* с использованием наборов «LSIVetMAX™*Campylobacter fetus*» и «КАМ-БАК». ДНК *C. jejuni* была обнаружена в 9,7% образцов, полученных из отечественных и иностранных племенных центров. Фрагменты генома *C. fetus* были выявлены в трех образцах спермы быков из отечественных хозяйств.

Наиболее вероятно, что генетический материал *C. jejuni* попал в спермодозы при взятии спермы. Факт обнаружения свидетельствует о санитарных нарушениях при таком взятии, а выявление *C. fetus* в спермодозах быков говорит о неудовлетворительной работе ветеринарной службы племенного хозяйства.

4.7.2 Выявление *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus spp.*

Выявление ДНК *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus spp.* в образцах спермы проводили с помощью наборов «Ветскрин. Аругипол», «Ветскин.Протепол», «Ветскрин.Стафипол» производства НПФ «Литех». Результаты представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Выявление ДНК *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* в образцах спермы.

Патоген	Сперма быков из отечественных племенных центров		Сперма быков из зарубежных племенных центров		Всего	
	211		233		444	
	Обнаружено	%	Обнаружено	%	Обнаружено	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	2,36	9	3,86	14	3,15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	3,79	16	6,86	24	5,4
<i>Proteus spp.</i>	3	1,42	2	0,85	5	1,12

Культуральным методом были исследованы 232 образца, включая все образцы, в которых были выявлены фрагменты генома *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Для 47 образцов было установлено превышение в 1,2-1,8 раза нормированного ГОСТ 26030-2015 значения общего числа непатогенных микроорганизмов. Рост *P. aeruginosa* был зафиксирован в 8 образцах. *Staphylococcus aureus* – в 6 образцах, *Proteus spp.* – в 2 образцах.

Различия между полученными результатами молекулярно-биологических и микробиологических исследований можно объяснить, как высокой чувствительностью метода ПЦР, так и наличием в пробе спермы нежизнеспособных бактерий. Проведенный анализ значения t-критерия Стьюдента показал, что различия для выборок – сперма из отечественных и иностранных племенных центров – статистически не значимы.

4.7.3 Выявление *Coxiella burnetii*

Тестирование образцов 444 образцов спермы на наличие контаминации *Coxiella burnetii* проводили с использованием набора реагентов LSI VetMAX™ Triplex *Coxiella burnetii* и *Chlamydomphila spp.* ДНК *C. burnetii* была обнаружена в 32 образцах спермы быков, импортированных из племенных центров США, при этом в спермопродукции отечественных племенных центров и хозяйств

Великобритании и Нидерландов генетический материал коксииелл выявлен не был. Присутствие ДНК *C. burnetii* дополнительно подтверждали амплификацией с использованием специфических праймеров *сосF* и *сосR* [327] по следующей программе термоциклирования: 1 цикл :5 мин при 95 °С; 42 цикла: 10 сек при 95 °С, 10 сек при 60° С, 10 сек при 72° С и дополнительный цикл 72° С – 3мин. Полученные продукты ПЦР анализировали после электрофореза в агарозном геле, затем секвенировали по Сенгеру. Во всех образцах в результате анализа фрагмента гена 16S рРНК было подтверждено наличие генетического материала *Coxiella burnetii*.

4.7.4 Выявление *Histophilus somni*

Выявление ДНК *Histophilus somni* в образцах спермы проводили с помощью набора реагентов LSI Vet MAX *Histophilus somni*. В 73,9% искомая мишень амплификации была обнаружена. При этом доля положительных образцов в исследованных 211 пробах отечественной спермопродукции была значительно выше, составив 89,6%, тогда как для 233 образцов импортированного семени она составила 59,6%.

Положительный результат для части проб был подтвержден с использованием альтернативной методики ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации с использованием праймеров *H.smn_F* и *H.smn_R*, предложенных в работе 1998 года [134]. Секвенирование полученных продуктов амплификации фрагмента генома *Histophilus somni* размером 411 п.н. проводили для 11 образцов спермы отечественного происхождения и 12 образцов импортной спермы. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей 16S рРНК подтвердил принадлежность анализируемого участка генома к *H. somni*. Результаты подобного исследования сперматозоидов, используемых для искусственного осеменения в Иране выявили значительно меньшую обсемененность сперматозоидов – 21,62% [553]. Есть свидетельства, что *H. somni* может присутствовать в репродуктивном тракте здоровых животных, однако также оказывает негативное влияние на репродуктивные качества семени [567].

4.8 Разработка методики выявления ДНК *H. somni* на основе ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»

В связи с высокой частотой встречаемости *H. somni* в спермопродукции КРС и отсутствием на момент исследований отечественных наборов для выявления ДНК *H. somni* была проведена разработка методики выявления генетического материала *H. somni* на основе ПЦР в режиме «реального времени».

Отдельные материалы раздела выполнены совместно с Д.А. Рудняевым и подробно описаны в диссертационной работе [89] и публикациях [21,28].

На основании изучения литературных источников [134] и множественных выравниваний нуклеотидных последовательностей микроорганизмов семейства *Pasteurellaceae*, представленных в базе данных GenBank, были выбраны области посадки прямого и обратного праймеров, фланкирующие участок длиной 153 п.н. гена 16S рРНК, и выбран TaqMan зонд для флуоресцентной детекции продукта ПЦР (рисунок 16).

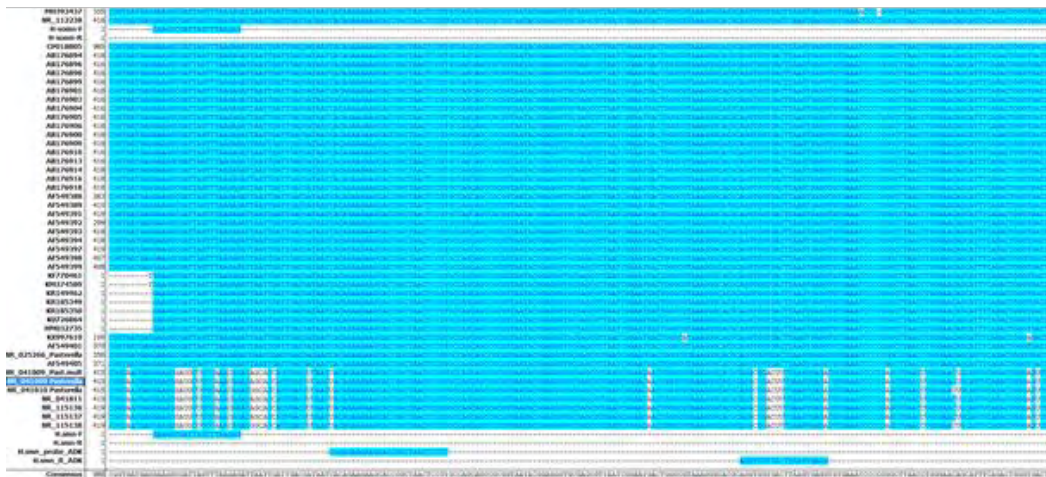


Рисунок 16 – Фрагмент выравнивания нуклеотидных последовательностей участка гена 16s рРНК микроорганизмов семейства *Pasteurellaceae*, использованного для подбора мест посадки праймеров.

С помощью интернет-сервиса Nucleotide BLAST online была показана высокая степень гомологии выбранных олигонуклеотидов с фрагментом гена 16S рРНК *H. somni* и отличие от нуклеотидных последовательностей других

представителей семейства *Pasteurellaceae*. При подборе рассчитывали температуру отжига, возможность формирования димеров и вторичную структуру олигонуклеотидов.

Для анализа качества выделения нуклеиновых кислот и полноты удаления ингибиторов ПЦР была подобрана система праймеров и зондов для амплификации экзогенного неконкурентного ВКО, представляющего собой плазмидный вектор со вставкой-мишенью, который добавляется к каждой анализируемой пробе на этапе экстракции ДНК. Таким образом, состав ПЦР-смеси позволил проводить ПЦР в мультиплексном формате, с одновременным детектированием ДНК *H. somni* и ВКО. Для этого были подобраны флуоресцентные красители для зондов, позволяющие детектировать ДНК *H. somni* на канале ROX/Orange, а ДНК неконкурентного ВКО - на канале FAM/Green приборов RotorGene 6000, RotorGene Q и CFX96.

Для оценки характеристик ПЦР-методики был создан положительный контрольный образец – ПКО на основе вектора pAL2-T, в который был искусственно встроен продукт амплификации ДНК *H. somni*.

Подбор условий амплификации проводили на RotorGene Q. Количество циклов амплификации варьировали от 35 до 45, температуру отжига - от 55°C до 65°C. Увеличение количества циклов увеличивало время проведения теста, но не повышало чувствительность. Наилучшая эффективность амплификации и разгорания зондов наблюдалась при температуре отжига 60°C. Таким образом, была подобрана следующая программа амплификации и детекции: 15 мин при 95 °C; циклирование 1: 10 сек при 95 °C, 20 сек при 63° C, 10 сек при 72° C (5 циклов без детекции флуоресцентного сигнала); циклирование 2: 10 сек при 95 °C, 20 сек при 60° C, 10 сек при 72° C (35 циклов с детекцией флуоресцентного сигнала при 55° C на каналах FAM/Green и R6G/Yellow).

Экспериментально подбирали концентрацию олигонуклеотидов в реакционной смеси. В эксперименте варьировали концентрации праймеров и зонда для выявления *H. somni* при постоянной концентрации праймеров и зонда для амплификации ВКО. Использовали 2 варианта реакционной смеси: 1 вариант -

H.smn_F/ H.smn_R_ADK –3 мкМ, H.smn_probe_ADK – 2 мкМ и 2 вариант - H.smn_F/ H.smn_R_ADK – 4 мкМ, H.smn_probe_ADK – 3 мкМ. Оценку проводили по результатам амплификации ПКО концентрацией ДНК от 1×10^2 копий/мл до 1×10^5 копий/мл. Было показано, что оптимальной концентрацией олигонуклеотидов в реакционной смеси является концентрация праймеров –3 мкМ, а зонда – 2 мкМ, увеличение концентрации не влияет на чувствительность теста.

Специфичность тест-системы проверяли на панели образцов, содержащей нуклеиновые кислоты 9 вирусных и 33 бактериальных патогенов, вызывающих заболевания КРС, а также геномную ДНК КРС. При подборе образцов особое внимание уделяли представителям семейства *Pasteurellaceae* – *Haemophilus parasuis*, *Mannheimia haemolytica*, *Biberstenia trehalosi*, *Actinobacillus spp.*, различным штаммам *Pasteurella multocida*. Показано, что выбранные олигонуклеотиды выявляют *H. somni* и не дают положительного результата амплификации с ДНК/РНК других микроорганизмов и ДНК КРС.

При валидации методики оценивали: абсолютную чувствительность системы амплификации, эффективность ПЦР, аналитическую чувствительность при тестировании разных видов биологического материала, а именно: вагинальных и препуциальных смывов КРС, молока, суспензии органов и спермы быков.

Для оценки чувствительности и эффективности проводили амплификацию последовательных десятикратных разведений в ДНК-буфере образца ПКО в концентрациях от 1×10^2 копий/мл до 1×10^6 копий/мл в шести повторах для каждой концентрации (рисунок 17). Расчет эффективности реакции проводили с помощью программного обеспечения прибора RotorGeneQ, которое позволяет на основе заданных стандартных значений концентрации образца и полученных значений C_t определять коэффициент линейной детерминации R^2 , коэффициент корреляции R наклон кривой M и эффективность ПЦР. В наших экспериментах эффективность ПЦР варьировала от 0,94 до 0,96 при проведении ПЦР на разных амплификаторах.

Абсолютная чувствительность детекции ДНК *H. somni* в мультиплексной реакции составила 1×10^4 коп/мл. При тестировании чувствительности системы

праймеров при экстракции ДНК из спермы, молока, смывов и суспензии органов удалось добиться такого же значения чувствительности - 1×10^4 коп/мл.

С помощью разработанной методики выявления ДНК *H. somni* было исследовано 745 образцов различного биологического материала крупного рогатого скота. ДНК *H. somni* была выявлена в 28,59 % исследованных проб. Высокий процент обнаружения был показан для криоконсервированной спермы КРС (71,2%), в материале из репродуктивного тракта быков и влагалищных экссудатов коров ДНК возбудителя обнаруживали в 52,75 % проб. В исследованных образцах патологического материала (фрагментов легких КРС) ДНК *H. somni* обнаруживали в 32,07% образцов (таблица 15).

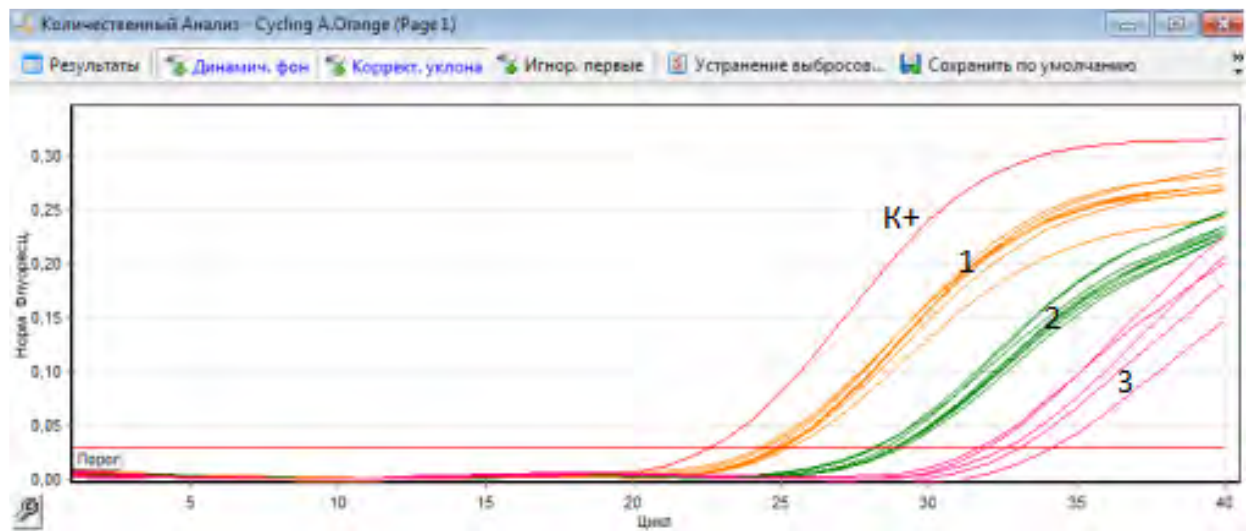


Рисунок 17 – Оценка аналитической чувствительности праймеров, используемых для амплификации ДНК *H. somni* при исследовании спермы КРС.

K+ - положительный контроль ПЦР, 1 – концентрация гена-мишени в сперме быка 1×10^6 копий/мл; 2 - концентрация 1×10^5 копий/мл; 3-концентрация 1×10^4 копий/мл.

Проведенное сравнение разработанной методики выявления ДНК *H. somni* с коммерческим набором реагентов LSI VetMAX™ Histophilus somni (Life Technologies Corporation, Франция), проведенное на 54 образцах биологического материала показало, что разработанная нами методика и набор LSI VetMAX™

демонстрируют аналогичные результаты при тестировании образцов с содержанием возбудителя выше 1×10^4 копий/мл [89].

Таблица 15 – Выявление ДНК *H. somni* методом ПЦР с помощью разработанной методики в биологическом материале от КРС

Исследованный материал	Количество исследованных образцов	Количество образцов, содержащих ДНК <i>H. somni</i>	% выявления	Регионы отбора
Сперма	118	84	71,2	Московская, Воронежская области
Влагалищные/препуциальные смывы	127	67	52,75	Московская, Калужская, Воронежская, Челябинская, Курская, Тверская области, Республики Татарстан и Хакасия
Мазки из респираторного тракта	438	87	19,86	Московская, Калужская, Воронежская, Челябинская, Курская, Тверская области, республики Татарстан и Хакасия, Удмуртия, Мордовия
Легкие	53	17	32,07	Московская, Калужская, Челябинская, Тверская области, Республики Татарстан, Удмуртия, Мордовия
Молоко	9	1	11,1	Московская, Тульская, Калужская, Воронежская, области
Всего	745	213	28,59	

В связи с высокой частотой обнаружения ДНК *H. somni* для оценки потенциальных рисков передачи этого микроорганизма через сперму быков были проведены микробиологические и молекулярно-генетические исследования культур *H. somni*, выделенных из различного биологического материала как здоровых, так и больных животных.

4.9 Изучение свойств культур *H. somni*, выделенных из различного биологического материала

Культуральные работы, описанные в данном разделе, выполнены совместно с сотрудником ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН А.И. Лаишевцевым и представлены в статье, опубликованной в 2021 году в журнале «Сельскохозяйственная биология» [24].

Из 145 образцов, включая фрагменты легких КРС с признаками пневмонии, сердечную мышцу животных с признаками миокардита, а также из смывов с препуция и семенной жидкости были выделены и идентифицированы 18 изолятов *H. somni*. В качестве контрольного штамма использовали и анализировали свойства штамма *Histophilus somni* ATCC 700025. Изоляты диско-диффузионным методом оценивали на чувствительность к антимикробным средствам четырех групп: аминогликозидам, бета-лактамам, фторхинолонам и тетрациклинам.

При определении устойчивости зону ингибирования 30 мм и выше считали показателем высокой чувствительности к антибиотику, от 29 до 15 мм — средней чувствительности. Зону ингибирования менее 15 мм считали показателем резистентности к антибиотику.

Поскольку *H. somni* — медленно растущий организм, требовательный к условиям культивирования, вырастить в достаточном количестве и оценить чувствительность к нескольким группам антибиотиков удалось лишь для 12 изолятов: 4 – из спермы быков, 2 – из вагинальных смывов, 5 – из образцов легких и 1 – из ткани сердечной мышцы. Таким образом, было подтверждено, что наличие антибиотиков в составе среды для разбавления криоконсервированной спермы

быков не исключает присутствие в спермодозах жизнеспособных *H. somni*. Результаты проявления устойчивости 12 культур *H. somni* к антимикробным средствам диско-диффузионным методом представлены в таблице 16.

Результаты оценки фенотипической устойчивости показывают, что чувствительность *H. somni* к бета-лактамам антибиотикам и тетрациклинам достаточно высока и находится в пределах 75-100%. Также высокой, на уровне 66-75 %, была чувствительность к фторхинолонам и амфениколам.

Наиболее часто исследованные изоляты *H. somni* были устойчивы к аминогликозидам. Резистентными к стрептомицину были 50% культур, а устойчивыми к неомицину - 42%.

Таблица 16 – Фенотипическая антибиотикорезистентность 12 выделенных изолятов *H. somni*

Антибиотики	Число (доля) изолятов		
	Устойчивых	С промежуточной устойчивостью	Чувствительных
Аминогликозиды			
Стрептомицин	6 (50 %)	-	6 (50 %)
Неомицин	5 (42 %)	2 (16%)	5 (42%)
Бета-лактамы			
Ампициллин	3(25 %)	-	9(75 %)
Амоксициллин	3 (25 %)	-	9 (75 %)
Цефотаксим	1 (8 %)	-	11 (92 %)
Цефтазидим	-	-	12 (100 %)
Цефтриаксон	-	-	12 (100%)
Тетрациклины			
Тетрациклин	-	-	12 (100 %)
Доксициклин	2 (17 %)	-	10 (83 %)
Фторхинолоны			
Энрофлоксацин	3 (25%)	1 (8%)	8 (66,6%)
Ципрофлоксацин	3 (25%)	-	9 (75%)
Амфениколы			
Хлорамфеникол	3 (25 %)	-	9 (75%)

Ни одна из выделенных из спермы быков культур *H. somni* не была устойчива к бета-лактамам антибиотикам и тетрациклам. При этом два изолята, выделенных из спермы, демонстрировали устойчивость к энрофлоксацину, один был резистентен к хлорамфениколу. Две культуры, полученные из спермы, были резистентны к стрептомицину, одна – к неомицину.

Выделенные 2 изолята из образцов спермы, были дополнительно исследованы на чувствительность к канамицину, гентамицину и спектиномицину. Все образцы были чувствительны к гентамицину и спектиномицину, одна из культур, выделенная из спермы быка, была устойчива к канамицину.

Шесть изолятов *H. somni*, включая 2 образца, выделенных из спермы быков, были дополнительно исследованы на чувствительность к сульфаниламиду сульфаметоксазолу. К данному препарату оказались устойчивы 2 культуры, что составило 33% исследованных образцов, включая один образец, выделенный из спермы.

Таким образом, для культур *H. somni*, выделенных из различного биологического материала, показана резистентность к некоторым группам антимикробных средств, из которых наиболее частой, по нашим данным, выявлялась устойчивость к аминогликозидам.

Наибольший интерес при анализе результатов устойчивости культур, выделенных из образцов спермопродукции, в дальнейшей работе мы уделяли развитию устойчивости к аминогликозидам и сульфаниламидам, как к группам антимикробных средств, наиболее часто используемым при разбавлении спермы.

4.10 Выявление генов устойчивости к антибиотикам изолятов *H. somni*

С использованием ПЦР с электрофоретической и гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации проведено тестирование 18 изолятов *H. somni*.

Для детекции 8 генов, наиболее часто встречающихся у *H. somni*, согласно данным литературных источников [24]: *blaOXA-2* (устойчивость к пенициллинам), *tetH* (устойчивость к тетрациклам), *aadA25*, *strA*, *strB*, *aphA1* (устойчивость к

аминогликозидам), *sul2* (устойчивость к сульфаниламидам) и *floR* (устойчивость к амфениколам), были выбраны олигонуклеотидные праймеры для методик ПЦР-тестирования. При выборе мест посадки праймеров анализировали нуклеотидные последовательности не только представителей семейства *Pasteurellaceae*, но и гены представителей семейства *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Salmonella spp*).

Изоляты *H. somni* были протестированы на наличие всех выбранных генов устойчивости к антибиотикам. Положительные образцы дополнительно подтверждали методом секвенирования по Сенгеру.

Для трех генов антибиотикорезистентности (*strA*, *strB*, *sul2*) были разработаны ПЦР-методики с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени. После предварительного скрининга и получения продуктов ПЦР выявления гена *sul2*, обуславливающего устойчивость к сульфаниламидам, и генов *strA* и *strB* которые связаны с устойчивостью к аминогликозидам, были сконструированы плазмиды, несущие фрагменты этих генов, которые далее использовались в качестве положительных контрольных образцов (ПКО) при разработке ПЦР-методик.

Экспериментально подбирали концентрацию олигонуклеотидов в реакционных смесях для одновременной детекции в одной реакции фрагментов *strA*, *strB*, а также для детекции гена устойчивости *sul2*. Была подобрана программа амплификации. Оптимальной для приборов RotorGene 6000 и RotorGene Q была признана следующая программа амплификации и детекции: 15 мин при 95 °С; циклирование 1: 10 сек при 95 °С, 20 сек при 63° С, 10 сек при 72° С (5 циклов без детекции флуоресцентного сигнала); циклирование 2: 10 сек при 95 °С, 20 сек при 60° С, 10 сек при 72° С (35 циклов с детекцией флуоресцентного сигнала при 55° С на каналах ROX/Orange и HEX/Yellow).

Чувствительность ПЦР-методик для выявления генов *strA* и *strB*, оцененная с использованием серии десятикратных разведений соответствующих ПКО (в концентрации от 1×10^5 до 1×10^2 копий/мл), варьировала от 6×10^3 копий/мл для детекции генов *strB*, до 7×10^4 копий/мл для гена *strA*. На рисунке 18 представлены

результаты определения предела детекции (чувствительности) разработанной методики выявления гена *sul2*, которая составила $6,4 \times 10^3$ копий/мл.

Для каждого из генов антибиотикорезистентности *strA*, *strB* и *sul2* проводили расчет эффективности реакции амплификации. В разработанных ПЦР-методиках детекции генов антибиотикорезистентности *H. somni* коэффициент R^2 был приближен к 0,99 для каждого из генов. Эффективность реакции амплификации генов *strA*, *strB*, *sul2* находилась в диапазоне от 0,93 (или 93%) до 1,04 (или 104%) (рисунок 19, таблица 17).

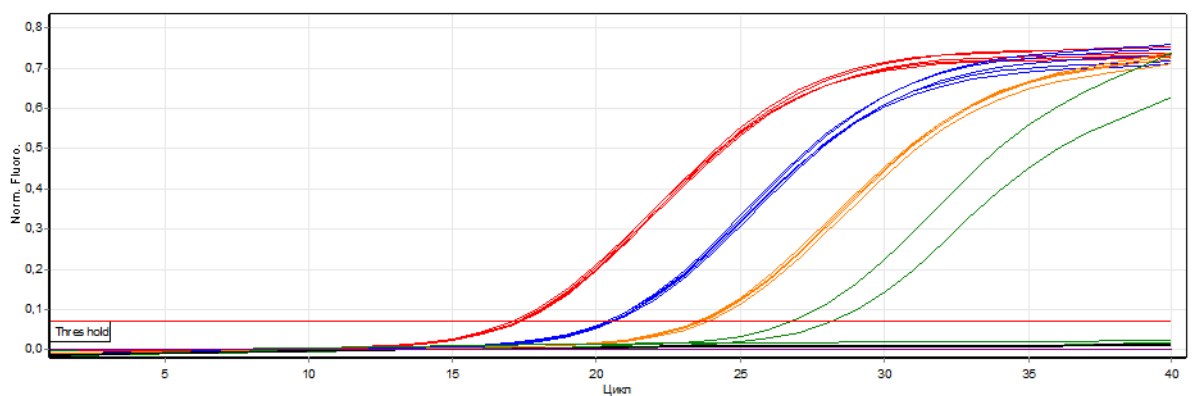


Рисунок 18 – Результаты анализа чувствительности ПЦР для выявления фрагмента гена *sul2* *H. somni* при использовании десятикратных разведений плазмиды с целевой вставкой (от $6,4 \times 10^5$ копий/мл – красный цвет кривой, до $6,4 \times 10^2$ копий/мл – зелёный цвет кривых на графике накопления флуоресцентного сигнала).

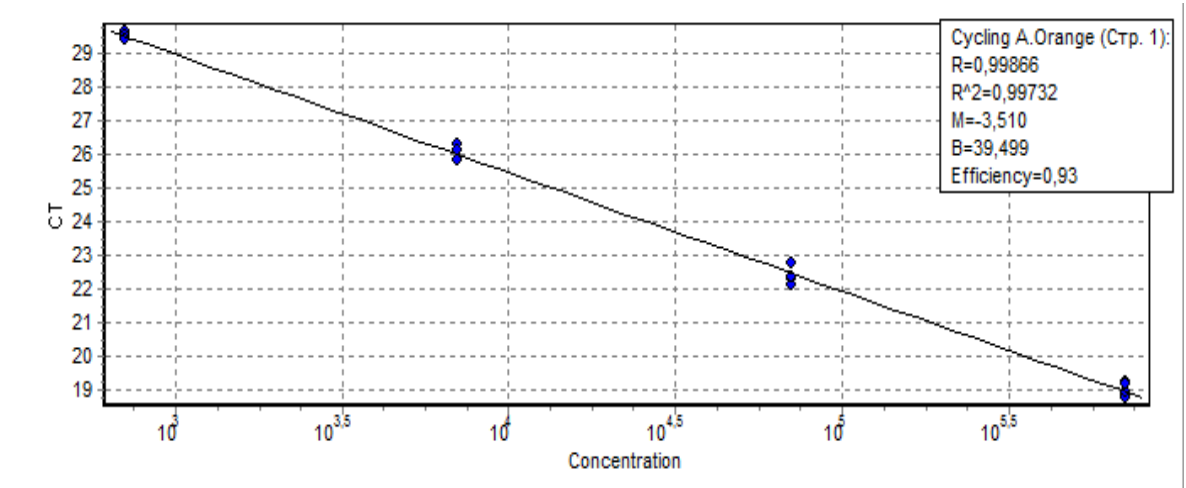


Рисунок 19 –Результаты расчета эффективности реакции амплификации фрагмента гена *strA* *H. somni* при использовании десятикратных разведений плазмиды с целевой вставкой

Таблица 17 – Значения эффективности реакции амплификации генов *H. somni strA*, *strB*, *sul2* полученные в работе.

Ген	Значение R^2	Эффективность амплификации, %
<i>strA</i>	0,997	93
<i>strB</i>	0,988	104
<i>sul2</i>	0,996	99

Причиной того, что значения эффективности превысили 1 (100 %), вероятно являлось непропорциональное расщепление зонда по отношению к наработанному количеству ампликона.

Результаты исследования 18 изолятов *H. somni* представлены в таблице 18. Гены *tetH* и *blaOXA-2* не были выявлены ни в одном из исследованных образцов. Чаще всего выявляли гены устойчивости к аминогликозидам: гены *strA* и *strB* выявили в 44% образцов, ген *aadA25* - в 39%, ген *aphA1* - в 11% образцов. Ген *sul2*, детерминирующий устойчивость к сульфаниламидам был выявлен в 3 исследованных изолятах *H. somni*, ген *floR* – в двух образцах.

В работе проводили сравнение результатов выявления резистентности *H. somni*, полученных с использованием фенотипического (диско-диффузионного) и молекулярно-генетического методов. У всех штаммов, устойчивых к стрептомицину, по данным микробиологического тестирования, выявляли фрагменты гена *aadA25*. Во всех пяти штаммах, устойчивых к неомицину, детектировано одновременное присутствие генов *strA* и *strB*, в двух штаммах с промежуточной устойчивостью к неомицину отсутствовали гены *strA* и *strB*, однако был выявлен ген *aadA25*. Ген *aphA1* выявлен у двух образцов, устойчивых к стрептомицину и неомицину одновременно. У изолятов *H. somni*, чувствительных к гентамицину и спектиномицину по данным микробиологического исследования, гены устойчивости к аминогликозидам обнаружены не были [24]. Таким образом, было продемонстрировано высокое соответствие фенотипической и генотипической устойчивости *H. somni* к аминогликозидам.

Таблица 18 – Выявление генов антибиотикорезистентности у 18 изолятов *H. somni* [24], с изменениями.

Группа антибиотиков	Ген резистентности	Фермент, кодируемый данным геном	Количество положительных образцов	
			n	%
Аминогликозиды	<i>aadA25</i>	аминогликозид-3''-аденилтрансфераза	n=7	39 %
	<i>strA</i>	аминогликозид-3''-фосфотрансфераза	n=8	44 %
	<i>strB</i>	аминогликозид-6-фосфотрансфераза	n=8	44%
	<i>aphA1</i>	аминогликозид-3'-фосфотрансфераза	n=2	11 %
Тетрациклины	<i>tetH</i>	белок эффлюкса	n=0	-
Бета-лактамы	<i>blaOXA-2</i>	бета-лактамаза	n=0	-
Сульфаниламиды	<i>sul2</i>	дигидроптероат синтаза	n=3	17 %
Амфениколы	<i>floR</i>	хлорамфеникол ацетилтрансфераза	n=2	11 %

В двух изолятах, устойчивых к сульфаниламидам, по данным микробиологического исследования, был выявлен ген *sul2*. Кроме того, этот ген был обнаружен у одного изолята *H. somni*, не исследованного диско-диффузионным методом [24].

Ген устойчивости к бета-лактамам *blaOXA-2* не был найден ни в одном из трёх образцов, устойчивых, по данным фенотипирования, к антибиотикам этой группы. Нельзя исключить, что в этих трёх образцах могут присутствовать другие гены, определяющие устойчивость к этим антибиотикам.

Сходный результат был получен и при сопоставлении фенотипической и молекулярно-генетической устойчивости к тетрациклинам: ген *tetH* не был обнаружен ни в одном из образцов несмотря на то, что два изолята демонстрировали устойчивость к доксициклину. Возможно, резистентность исследованных изолятов *H. somni* связана с другими генами.

Обобщенная информация о соответствии результатов выявления генов устойчивости и изучения фенотипических проявлений резистентности четырех изолятов *H. somni*, выделенных из криоконсервированной спермы быков, представлена в таблице 19.

Полученные результаты показали, что сперма быков может нести жизнеспособные *H. somni*, устойчивые к разным группам антимикробных средств. Метод ПЦР, при наличии информации о наиболее распространенных генетических детерминантах устойчивости к антибиотикам, может использоваться в качестве быстрого скринингового метода контроля распространения резистентности.

Таблица 19 – Сравнение фенотипической и генетической устойчивости изолятов *H. somni*, выделенных из образцов спермы

Группа антибиотиков	Изоляты <i>H. somni</i> , выделенные из спермы быков							
	Фенотипическая устойчивость				Наличие генетических детерминант устойчивости			
	551	532	533	442	551	532	533	442
Тетрациклины	S	S	S	S	tetH-	tetH-	tetH-	tetH-
Бета-лактамы	S	S	S	S	blaOXA-	blaOXA-	blaOXA-	blaOXA-
Аминогликозиды	R	S	R	S	aadA25+	aadA25-	aadA25+	aadA25-
					strA-	strA-	strA+	strA-
					strB-	strB-	strB+	strB-
					aphA1-	aphA1-	aphA1-	aphA1-
Сульфаниламиды	S	S	R	S	Sul2-	Sul2-	Sul2+	Sul2-
Амфениколы	S	S	S	R	floR-	floR-	floR-	floR+
Фторхинолоны	R	R	S	S	gyrA+*	gyrA+*	НД	НД

S – чувствительный, R – устойчивый; + - ген обнаружен, - - ген не обнаружен

*- по данным полногеномного секвенирования, НД – нет данных

4.11 Сравнительный анализ полных геномов изолятов *H. somni*

Для определения локализации выявленных генов антибиотикорезистентности в целях оценки рисков передачи устойчивости к антибиотикам между микроорганизмами, а также для изучения факторов вирулентности изолятов *H. somni* было проведено полногеномное секвенирование и сравнительный анализ полных геномов образцов *H. somni*, выделенных из криоконсервированной спермы быков. Исследование проведено совместно с сотрудниками ФГБУ «ВГНКИ» Поболеловой Ю.И., Тимофеевой И.А., Гордеевой В.Д., что отражено в совместных публикациях.

После накопления культурального материала и очистки ДНК, пригодными для проведения полногеномного секвенирования были признаны две культуры, выделенные из спермы быков канадского происхождения – *H. somni* 551 и 532. Дополнительно была проанализирована культура *H. somni* 188, выделенная из смыва с влагалища коровы с признаками эндометрита и штамм *H. somni* ATCC 700025, полученный из Американской коллекции типовых культур.

Размер генома изолятов *H. somni* варьировал от 1,9 до 2,3 $\times 10^6$ п.н, число кодирующих последовательностей - от 1795 до 2256 п.н. Среднее значение доли кодирующих последовательностей в геномах составило 90%, среднее значение G+C-состава для разных штаммов было в пределах 36,8-37,2%. Полученные последовательности полных геномов были депонированы в международную базу данных GenBank (BioProject: PRJNA736593). Информация о последовательностях полных геномов представлена в таблице 20.

Таблица 20 – Характеристика геномов изучаемых культур *H. somni*

Изолят	ATCC 700025	188	551	532
Источник выделения	Нет данных	Вагинальный смыв	Сперма	Сперма
Дата выделения		2018	2018	2018
Количество кодирующих последовательностей	2037	2256	1948	1795
Общая плотность кодирования	90,6%	90,9%	90,1%	89,9%
Размер генома (п.н.)	2 126 663	2 290 854	2 036 892	1 906 694
G+C-состав	37,2	36,9	37,1	36,8
Количество генов 5S рРНК	4	4	4	4
Количество генов 16S рРНК	1	2	2	1
Количество генов 23S рРНК	1	3	1	1
Количество генов тРНК	39	56	44	42
Количество профагов	2	1	1	1

При сравнении изученных геномов с патогенным штаммом *H. somni* 2336 было установлено, что общими для всех образцов являются 1242 гена. Геном образца *H. somni* 188 имеет наибольшее количество уникальных генов (325 из 2256, т.е. 14,40%), в то время как геномы остальных трех образцов имели сходное количество уникальных генов (АТСС 700025 - 8,3%, 551 - 7,9 %, 532 - 6,85 %).

Аналогичные результаты были получены при сравнении изучаемых штаммов с непатогенным штаммом *H. somni* 129Pt. Было показано, что 1220 генов являлись общими для четырех исследуемых образцов и 129Pt. Образец 188 также, как и при сравнении с патогенным штаммом *H. somni*, содержал самое большое количество уникальных генов (330 из 2256, т.е. 14,63%) (рисунок 20). Геномы двух анализируемых изолятов *H. somni*, выделенных из спермы быков, совпали между собой и с последовательностями патогенного штамма *H. somni* 2336 по 1268 участкам, а между собой и с последовательностями непатогенного *H. somni* 129 Pt – по 1260 фрагментам генома.

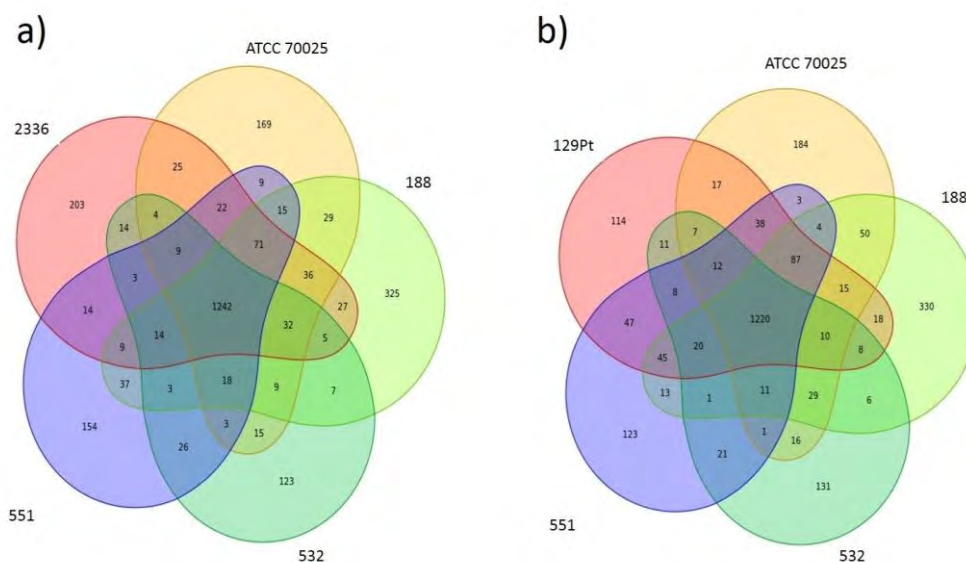


Рисунок 20 –Сравнение геномов *H. somni* АТСС 700025, 188, 551 и 532 с эталонными последовательностями а) патогенного штамма 2336 б) непатогенного 129Pt.

Выявление генетических детерминант вирулентности в геномах H. somni

Согласно литературным данным, существует ряд генов, отличающих патогенный штамм *H. somni* 2336 от непатогенного 129 Pt [541]. Часть этих генов подробно изучена и описан возможный механизм патогенного действия *H. somni* на организм животного, однако для большинства генов вклад в бактериальную вирулентность лишь предполагается. В своей работе мы провели поиск возможных факторов вирулентности исследованных изолятов *H. somni* и сравнение обнаруженных генов с таковыми у патогенного штамма 2336, выделенного от больного животного, и непатогенного 129 Pt (таблица 21).

Было показано, что образцы *H. somni* 551 и 532, выделенные из спермы быков, различаются по наличию детерминант вирулентности. В образце 551, в отличие от других проанализированных изолятов, отсутствует один из двух генов *tbp*, кодирующих трансферрин-связывающий белок, а именно ген *tbpB*, который вовлечен в механизм транспорта и утилизации железа. В данном образце, как и в других *H. somni*, включенных в анализ, был обнаружен ген *tbpA*, при этом, в отличие от последовательности этого гена в других анализируемых образцах, в образце 551 последовательность *tbpA* была усеченной.

H. somni, выделенные из спермы, отличались и по генам *ibpA* и *ibpB*, кодирующим иммуноглобулин-связывающие белки, которые играют важную роль в вирулентности *H. somni*. У образца 551, как и у непатогенного штамма 129 Pt, оба гена *ibpA* и *ibpB* найдены не были, что говорит о вероятной непатогенности этого изолята. В геноме образца 532, как и у патогенного штамма 2336, были обнаружены оба полных гена *ibpA* и *ibpB*, а сравнение последовательностей *ibpA* и *ibpB* образца 532 и патогенного штамма 2336 показало достаточно высокое значение идентичности. Кроме того, в геноме образца 532 перед геном *ibpA* были найдены прямые повторы DR1/DR2, наличие которых связывают с цитотоксичностью *H. somni* в отношении эпителиальных и фагоцитирующих клеток, что может нарушать бактерицидную активность этих клеток [335].

Таблица 21 – Гены, ассоциированные с вирулентностью *H. somni*

Ген	Белок, кодируемый геном	Изоляты <i>H. somni</i>					
		2336	129Pt	ATCC 700025	188	551	532
Гемаггютиныны							
<i>ibpA</i>	Иммуноглобулин-связывающий белок А	+	-	+	+	-	+
<i>ibpB</i>	Иммуноглобулин-связывающий белок В	+	-	+	+	-	+
Белки транспорта и утилизации железа							
<i>tbpA</i>	Трансферрин-связывающий белок А	+	+	+	+	+/-	+
<i>tbpB</i>	Трансферрин-связывающий белок В	+	+	+	+	-	+
<i>fur</i>	Белок, регулирующий поглощение железа	+	+	-	-	-	-
Липополисахариды							
<i>lob1</i>	Галактозил трансфераза	+	+	+	+	+/-	+
<i>lob2A</i>	Гликозил трансфераза	+	+	+	+	-	+
<i>lob2B</i>	N-ацетилглюкозаминтрансфераза	+	-	+	+	-	+
<i>lob2C</i>	Гликозилтрансферазоподобный белок	+	+	+	+	+	+
<i>lob2D</i>	Гликозилтрансферазоподобный белок	+/-	+	+	+	+/-	+
<i>licA</i>	Холинкиназа	+	+	+	+	+	+
<i>licB</i>	Транспортер холина	+	+	+	+	+	+
<i>licC</i>	СТР: фосфохолинцитидилилтрансфераза	+	+	+	+	+	+
<i>licD</i>	ЛОС холинфосфотрансфераза	+	+	+	+	+	+
<i>neuA</i>	Синтаза СМР-N-ацетил-5-нейраминовой кислоты	+	+/-	+	+	+/-	+
<i>siaA</i>	Сиалилтрансфераза	+	+/-	+	+	+/-	+
<i>lsgB</i>	СМР-N-ацетилнейрамин-бета-галактозамид-альфа-2,3- сиалилтрансфераза	+	-	+/-	+/-	-	-

+ ген обнаружен; - ген не обнаружен; +/- выявлена неполная последовательность гена

Сравнение генов липополисахаридов, отвечающих за защиту *H. somni* от иммунного ответа организма-хозяина (таблица 21), также выявило различия между анализируемыми образцами. Так в образце 551, как и у непатогенного 129Pt, был выявлен усеченный ген *neuA*, отвечающий за синтез N-ацетил-5-нейраминовой кислоты (Neu5Ac, или сиаловой кислоты). Аминокислотная последовательность белка, кодируемого *neuA* у образца 551, была на 41 аминокислоту меньше по сравнению с последовательностями других выделенных штаммов, включая патогенный 2336 и образец из спермы 532. Ранее было показано, что штамм 2336 продуцирует две сиалилтрансферазы, кодируемые генами *siaA* и *lsgB*, в то время как у непатогенного 129Pt отсутствует ген *lsgB*, а укороченный ген *siaA* кодирует 75 аминокислот из 297. В нашей работе было показано, что полный ген *siaA* присутствует в образцах ATCC 700025, 188 и 532, а в образце 551 обнаружена только часть гена *siaA*. Ген *lsgB* не был выявлен у образцов 551 и 532, как и у 129Pt, а в образцах ATCC 700025 и 188 присутствовали его укороченные варианты. Проведенный анализ позволяет предположить, что образцы ATCC 700025, 188, а также образец 532, выделенный из спермы, имеют потенциал для преодоления защиты хозяина.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в сперме КРС могут присутствовать не только *H. somni*, являющиеся нормальными обитателями репродуктивного тракта КРС, но и бактерии этого вида, патогенные для КРС, что, с учетом высокой частоты встречаемости *H. somni* в сперме КРС, может представлять потенциальную угрозу здоровью животных.

Выявление генетических детерминант устойчивости к антибиотикам в геномах H. somni

Проведенный в данной работе анализ генома образца *H. somni* 551 выявил наличие гена *AAC-6-Ia+APH-2''*, кодирующего бифункциональный фермент. Этот фермент обладает как ацетилтрансферазной, так и фосфотрансферазной активностью. Ранее было показано, что устойчивость к канамицину, гентамицину и тобрамицину связана с работой фосфотрансферазы, тогда как

ацетилтрансферазная активность фермента приводит к развитию устойчивости к канамицину, тобрамицину, нетилмицину, амикацину и изепамицину [530]. Анализ нуклеотидной последовательности гена *AAC-6-Ia+APH-2''* *H. somni* 551 показал, что область AAC(6)-IIa характеризуется высокой степенью консервативности для бактерий разных групп. Область APH у разных микроорганизмов более вариабельна. Сравнение этого фрагмента показало, что APH *H. somni* отличается от аналогичной области *E. coli* (эталонная последовательность NCBI: WP_063840674.1) одноточечными заменами, в то время как APH *Campylobacter* (эталонная последовательность NCBI: WP_057038954.1) имеет самые большие отличия от этой области исследуемого образца *H. somni*. При этом область APH *Enterococcus faecium* (эталонная последовательность NCBI: WP_016439437.1) совпадает с таковой *H. somni* на 100%. Ранее было показано, что *H. somni* 551 фенотипически устойчив к антибиотикам группы аминогликозидов, а наличие в геноме генов *aadA25* и *AAC-6-Ia+APH-2''* подтвердило, что устойчивость обусловлена данными генами, расположенными в хромосомной ДНК *H. somni*.

По фенотипическим данным образцы *H. somni* 551 и 532, выделенные из спермы быков, также были устойчивы к фторхинолонам поэтому целью биоинформатического анализа было выявление генетических маркеров устойчивости к фторхинолонам в последовательностях 551 и 532.

Ранее было показано, что развитие резистентности к фторхинолонам, описанное для *Pasteurella multocida*, может быть связано с мутациями в положениях 83 и 87 гена топоизомеразы II (*gyrA*) [302]. Сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей топоизомеразы II для образцов *H. somni* показал наличие в образцах 551 и 532 замены Ser – Ile в позиции 83. Однако замены в положении 87 в анализируемых последовательностях *H. somni* обнаружено не было (рисунок 21).

	83	
<i>H. somni</i> WP011609318	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	SAVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQGNFGSVDGDAPAAM
<i>H. somni</i> 188	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	SAVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQGNFGSVDGDAPAAM
<i>H. somni</i> 2336	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	SAVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQGNFGSVDGDAPAAM
<i>H. somni</i> 129 Pt	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	SAVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQGNFGSVDGDAPAAM
<i>H. somni</i> ATCC 700025	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	SAVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQGNFGSVDGDAPAAM
<i>H. somni</i> 551	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGD	IAVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQGNFGSVDGDAPAAM
<i>H. somni</i> 532	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGD	IAVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQGNFGSVDGDAPAAM
	*****	*****
	855	879
<i>H. somni</i> WP011609318	IVGRNTQGVRLIRTAETE	QVVSLERVCDTDEEENIDNNFE
<i>H. somni</i> 188	IVGRNTQGVRLIRTAETE	QVVSLERVCDTDEEENIDNNFE
<i>H. somni</i> 2336	IVGRNTQGVRLIRTAETE	QVVSLERVCDTDEEENIDNNFE
<i>H. somni</i> 129 Pt	IVGRNTQGVRLIRTAETE	QVVSLERVCDTDEEENIDNNFE
<i>H. somni</i> ATCC 700025	IVGRNTQGVRLIRTAETE	QVVSLERVCDTDEEENIDNDFE
<i>H. somni</i> 551	IVGRNTQGVRLIRTSETE	QVVSLERVCDTDEEENIDNDFE
<i>H. somni</i> 532	IVGRNTQGVRLIRTAETE	QVVSLERVCDTDEEENIDNDFE
	*****	*****

Рисунок 21 – Аминокислотные замены в белковых последовательностях топоизомеразы II *H. somni*.

В образцах 532, ATCC 700025 и 551 была выявлена мутация Asn879Asp, а в образце 551 - еще одна мутация в позиции 855, приводящая к замене аланина на серин – Ala855Ser, однако данные о значимости замен этих кодонов в доступной литературе отсутствуют.

Интересно, что устойчивые штаммы *H. somni* 551 и 532 были выделены из спермы быков, собранной и импортированной из Канады. В связи с этим в анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей *gyrA* *H. somni* были дополнительно включены последовательности полных геномов изолятов *H. somni*, выделенных в 2015 г. в Канаде и представленных в базе данных NCBI. Изучение полученного выравнивания показало, что такой замены в положении 83 *gyrA* у канадских изолятов *H. somni* ранее не наблюдалось (рисунок 22). Можно предположить, что в последние годы у штаммов *H. somni*, циркулирующих в Канаде, повысилась резистентность к фторхинолонам.

<i>H.somni</i> 551	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDI	AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSVDGDAP
<i>H.somni</i> 532	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDI	AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSVDGDAP
<i>H.somni</i> ATCC 700025	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSVDGDAP
<i>H.somni</i> 188	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSVDGDAP
<i>H.somni</i> 2336	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSVDGDAP
<i>H.somni</i> 129Pt	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSVDGDAP
<i>H.somni</i> WP011609318	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSVDGDAP
<i>H.somni</i> WP132995165	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSVDGDAP
<i>H.somni</i> QQF83114	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSVDGDAP
<i>H.somni</i> TFF01354	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSVDGDAP
<i>H.somni</i> THA92427	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSVDGDAP
<i>H.somni</i> QQJ90816	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSVDGDAP
<i>H.somni</i> QQF90277	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSVDGDAP
<i>H.somni</i> QEH16321	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSVDGDAP
<i>H.somni</i> QEH21732	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSVDGDAP
<i>H.somni</i> QEH23527	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSVDGDAP
<i>H.somni</i> QEH14531	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSVDGDAP
<i>H.somni</i> QEH10855	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSVDGDAP
<i>H.somni</i> QEH18135	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSVDGDAP
<i>H.somni</i> QEH19938	KAYVKSARVVGDVIGKYHPHGDS	AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSVDGDAP
	*****	*****

Рисунок 22 – Фрагмент выравнивания аминокислотных последовательностей топоизомеразы II из исследованных и канадских образцов *H. somni*. Показана аминокислотная замена в положении 83.

Таким образом, анализ особенностей полных геномов образцов *H. somni* показал, что сперма быков, поступающая из племенных хозяйств разных стран, потенциально может быть источником не только патогенных *H. somni*, но и микроорганизмов этого вида, устойчивых к различным антибиотикам. Было показано, что молекулярно-генетические методы могут использоваться для прогнозирования резистентности *H. somni* к антимикробным средствам, и такое использование может способствовать контролю распространения устойчивых к антибиотикам или патогенных штаммов *H. somni*.

4.12 Выявление микроорганизмов рода *Mycoplasma*

При исследовании образцов спермы на присутствие ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma* с помощью тест-системы «Мик-ком» положительный результат ПЦР был получен для 182 образцов из 211 исследованных спермодоз отечественных быков (86,3 %) и для 134 проб из 233 образцов импортной спермы (57,5%). Анализ полученных результатов ПЦР, проведенный на основе оценки интенсивности свечения ампликонов на электрофореграммах, позволил

предположить в целом несколько меньшую обсемененность микоплазмами проб семени, полученных из иностранных племенных центров (рисунок 23).

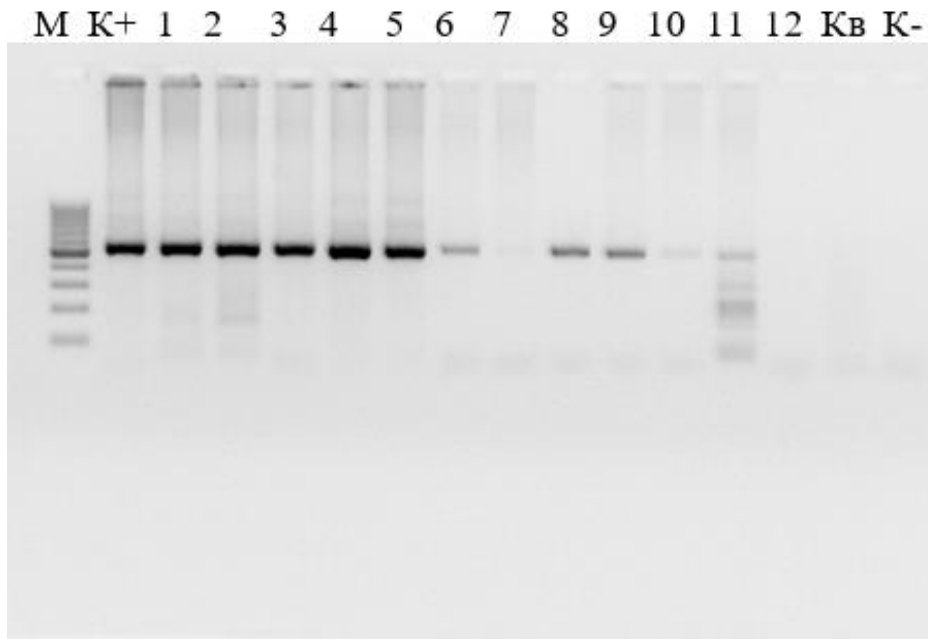


Рисунок 23 – Результаты электрофоретического анализа ПЦР-исследования образцов спермы с помощью тест-системы «Мик-ком». 1-5 образцы спермы быков из отечественных племенных центров, 6-12 – образцы из иностранных племенных хозяйств, K+ -положительный контроль ПЦР, Kв – отрицательный контроль выделения ДНК, K- отрицательный контроль ПЦР, M – маркер длин ДНК.

Таким образом, общая загрязненность микоплазмами исследуемой спермопродукции составила 71,2%

В связи с большим количеством видов, входящих в род *Mycoplasma*, а также невозможностью дифференциации видовой принадлежности обнаруживаемых микоплазм с помощью тест-системы «Мик-ком» было проведено нуклеотидное секвенирование 43 полученных продуктов ПЦР.

Сравнительный анализ полученных последовательностей с последовательностями, представленными в международной базе GenBank, показал для 10 исследованных образцов высокую идентичность с 16S рРНК *Mycoplasma*

bovigenitalium (98-99%), для 8 образцов была обнаружена максимальная идентичность с *M. californicum*. Для четырех образцов была показана 99% гомология с нуклеотидной последовательностью фрагмента 16S рРНК штамма *Ureaplasma diversum* ATCC 49782. Кроме того, для двух образцов была выявлена максимальная идентичность с последовательностями *M. canadense*. Для 19 исследованных образцов анализ результатов секвенирования показал неоднородность чтения матрицы, что свидетельствует о возможном наличии в образце нескольких видов *Mycoplasma* или недостаточной специфичности анализа.

Для исключения возможной контаминации спермодоз видом *Mycoplasma bovis* все образцы спермопродукции, показавшие положительный результат при тестировании с помощью тест-системы «Мик-ком», были дополнительно исследованы с помощью набора LSI VetMAX™. В трех образцах из иностранных племенных центров была выявлена ДНК *Mycoplasma bovis*.

Результаты наших исследований показали высокий уровень загрязненности спермопродукции КРС микроорганизмами рода *Mycoplasma*, в том числе потенциально патогенными видами *M. bovigenitalium*, *M. californicum*, а также *Ureaplasma diversum*. Надо отметить, что широко используемые в России наборы для ПЦР-диагностики микоплазмоза животных не позволяют дифференцировать патогенные и условно-патогенные виды, что делает актуальным разработку ПЦР-наборов для выявления видов *Mycoplasma bovis*, *M. bovigenitalium*, *M. californicum* и *Ureaplasma diversum*.

4.13 Разработка методик выявления ДНК *Mycoplasma bovis*, *M. californicum*, *M. bovigenitalium* и *Ureaplasma diversum* на основе ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

Разработка ПЦР-методик, описанная в этом разделе, выполнена совместно с сотрудниками отдела генодиагностики инфекционных болезней животных ФГБУ «ВГНКИ» и подробно описана в статье, опубликованной в 2019 году в журнале «Сельскохозяйственная биология» [39]. Работа была разделена на теоретическую и

экспериментальную часть. Теоретическая часть включала анализ литературных источников, в том числе мест «посадки праймеров» и протоколов ПЦР, используемых для выявления и дифференциации патогенных микоплазм. С использованием международных баз данных нуклеотидных последовательностей был проведен выбор олигонуклеотидных праймеров и зондов для амплификации выявляемых агентов и теоретический анализ специфичности выбранных праймеров и зондов. Кроме того, был составлен перечень образцов, которые необходимо было включить в панель для практической оценки аналитической специфичности методики. При составлении такой панели учитывались результаты анализа специфичности на Интернет-сервисе Nucleotide BLAST online, таксономическую принадлежность микроорганизма к классу *Mollicutes*, семейству *Mycoplasmataceae* и/или родственным группам, а также возможность обнаружения микроорганизма в биологическом материале КРС, объектах окружающей среды.

Экспериментальная часть разработки включала подбор состава реакционной смеси и условий амплификации и детекции выявляемого агента и внутреннего контрольного образца, оценку аналитической специфичности методики; оценку эффективности амплификации; оценку абсолютной чувствительности праймеров и оценку аналитической чувствительности методики при тестировании разных видов биологического материала.

В результате анализа нуклеотидных последовательностей, представленных в базе данных GenBank, были выбраны олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентные TaqMan-зонды для амплификации участков генов *UvrC* для *M. bovis*, 16S рРНК для *M. bovis genitalium* и *U. diversum* и *rpoB* для *M. californicum*. Выбранные праймеры фланкируют участки генов длиной 148 п.н. (позиции 697986-698133 последовательности GenBank CP019639.1) для *M. bovis*, 96 п.н. (позиции 504837-504932 последовательности GenBank CP007521.1) для *M. californicum*, 127 п.н. (позиции 131-257 последовательности GenBank AY974058.1) для *M. bovis genitalium*, 114 п.н. (позиции 119-232 последовательности GU227397.1) для *U. diversum* [39]. Для детекции продуктов амплификации в режиме «реального времени» были подобраны олигонуклеотидные зонды, несущие флуоресцентные

красители R6G и ROX, которые позволяют одновременно выявлять и дифференцировать *M. californicum*/*M. bovigentalium* и *M. bovis*/*U. diversum* в мультиплексном формате.

Экспериментальное тестирование предложенной панели образцов, включавшей ДНК 42 штаммов и изолятов различных микроорганизмов, а также геномную ДНК КРС, показало отсутствие неспецифических реакций и 100% специфичность методик в рамках анализируемой панели образцов.

Для подбора условий ПЦР, оценки эффективности амплификации и оценки абсолютной чувствительности праймеров были созданы 4 положительных контрольных образца на основе вектора pAL2-T, в который были искусственно встроены продукты амплификации ДНК *M. californicum*, *M. bovigentalium*, *M. bovis* и *U. diversum*, соответственно.

Условия амплификации и детекции оптимизировали на приборах RotorGene Q и CFX96. Была подобрана следующая программа амплификации и детекции *U. diversum*, *M. bovis*, *M. californicum*, *M. bovigentalium*: 15 мин при 95 °С; циклирование 1: 10 сек при 95 °С, 20 сек при 60° С, 10 сек при 72° С (10 циклов без детекции флуоресцентного сигнала); циклирование 2: 10 сек при 95 °С, 20 сек при 55° С, 10 сек при 72° С (35 циклов с детекцией флуоресцентного сигнала при 55° на каналах, соответствующих красителям ROX и R6G). Для исключения ложноотрицательных результатов анализа, в образцы на этапе выделения ДНК вносили экзогенный неконкурентный внутренний контрольный образец (ВКО), который амплифицировали одновременно со специфической мишенью. Результат амплификации детектировали на канале, соответствующем красителю FAM.

Концентрацию олигонуклеотидов в мультиплексных реакционных смесях подбирали экспериментально. В окончательном варианте реакционная смесь для амплификации содержала 10 мкл ДНК-матрицы, 10 мкл ПЦР-смеси-1 (по 6 мкМ специфических праймеров и 3 мкМ специфических зондов для каждой мишени, 3 мкМ праймеров для амплификации ВКО, 1,5 мкМ зонда ВКО, раствор дНТФ, деионизованная вода), 0,5 мкл Taq-F полимеразы, 5 мкл ПЦР-смеси-2-FRT («Амплисенс»). Амплификацию *M. bovis* проводили совместно с амплификацией

ВКО с детекцией на двух каналах, *M. californicum* и *M. bovigentalium* и ВКО – одновременно на трех каналах. ПЦР и детекцию *U. diversum* – вместе с ВКО на двух каналах.

Определение эффективности амплификации и абсолютной чувствительности праймеров проводили по результатам амплификации 10-кратных разведений ПКО с известной концентрацией плазмидной ДНК в РНК-буфере. При определении эффективности амплификации и абсолютной чувствительности фрагментов генома *M. bovigentalium* и *M. californicum* использовали серии десятикратных разведений ПКО *M. bovigentalium* с концентрацией от $7,5 \times 10^8$ копий/мл до $7,5 \times 10^1$ копий/мл и ПКО *M. californicum* с концентрацией от 6×10^8 копий/мл до 6×10^1 копий/мл. Для оценки эффективности амплификации и абсолютной чувствительности фрагментов генома *M. bovis* - ПКО *M. bovis* с концентрацией от $2,7 \times 10^5$ копий/мл до $2,7 \times 10^1$ копий/мл, для *U. diversum* – ПКО с концентрацией от $3,45 \times 10^5$ копий/мл до $3,45 \times 10^1$ копий/мл. Для каждого разведения проводили амплификацию в нескольких повторах. Эксперименты проводили в разные дни, разными исполнителями и на разных приборах. Эффективность ПЦР определяли автоматически с помощью программного обеспечения амплификаторов RotorGene Q (рисунок 24).

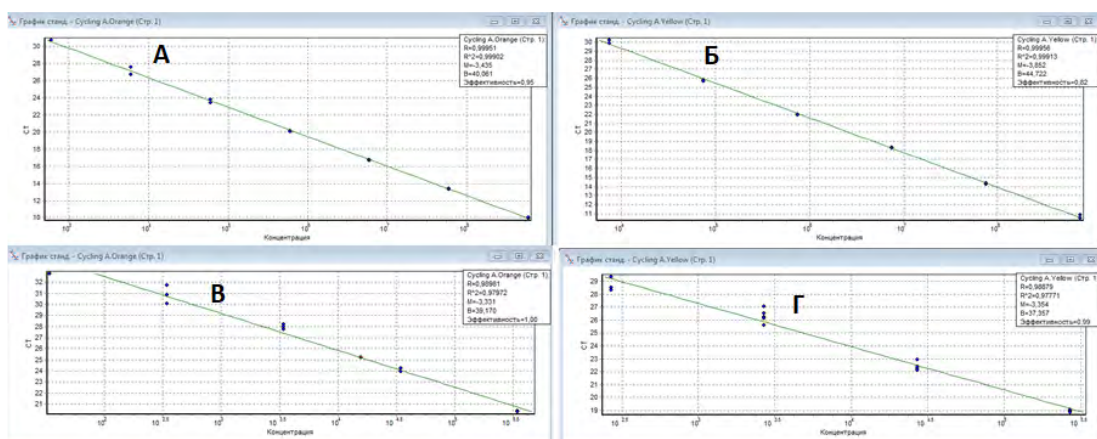


Рисунок 24 – Расчет эффективности амплификации, проведенный с помощью программного обеспечения амплификаторов RotorGene Q по результатам ПЦР 10-кратных разведений ПКО

A – *M. californicum*; Б–*M. bovigentalium*; В–*U. diversum*; Г– *M. bovis*

По результатам нескольких проведенных экспериментов средняя эффективность амплификации фрагментов генома *M. bovigenitalium* и *M. californicum* при проведении мультиплексной реакции составила 78% и 94%, соответственно. Значения абсолютной чувствительности систем праймеров и зондов - $7,5 \times 10^3$ копий/мл для *M. bovigenitalium* и 6×10^3 копий/мл для *M. californicum*. Для *M. bovis* абсолютная чувствительность составила $2,7 \times 10^3$ копий/мл, а средняя эффективность ПЦР – 99%, для *U. diversum* – чувствительность $3,45 \times 10^2$ копий/мл, а эффективность ПЦР – 98%.

Оценку аналитической чувствительности каждой из методик детекции проводили, анализируя результаты амплификации серии 10-кратных разведений соответствующих ПКО в отрицательных образцах разных видов биологического материала. В качестве тестируемого материала (матрицы) использовали образцы криоконсервированной спермы быков, а также влагалищные и носовые смывы, молоко и суспензию паренхиматозных органов КРС. Выделение ДНК и дальнейшее исследование для каждой из мишеней проводили в 6 повторах. За аналитическую чувствительность принимали наименьшую концентрацию ПКО ДНК, дающую положительный сигнал в ПЦР в 6 случаях из 6. Полученные результаты представлены в таблице 22. Результат исследования чувствительности методик при исследовании спермы представлен на рисунке 25.

Чувствительность разработанных методик для разных матриц варьировала от 2,7 до $7,5 \times 10^3$ копий/мл (таблица 22). Таким образом, было показано, что разработанные методики можно использовать как для детектирования *M. bovigenitalium*, *M. californicum*, *U. diversum* и *M. bovis* при проведении контроля спермопродукции, так и для проведения диагностических исследований при тестировании различного биологического материала КРС.

Таблица 22 – Аналитическая чувствительность (предел обнаружения) разработанных методик при выделении ДНК набором «Рибо-преп»

Выявляемый инфекционный агент	Тестируемый материал			
	Сперма быков	Молоко	Смывы слизистой со	Суспензия органов
<i>U. diversum</i>	3,45x10 ³ коп/мл	3,45x10 ³ коп/мл	3,45x10 ² коп/мл	3,45x10 ³ коп/мл
<i>M. bovigentialium</i>	7,5x10 ³ копий/мл	7,5x10 ³ копий/мл	7,5x10 ³ копий/мл	7,5x10 ³ копий/мл
<i>M. californicum</i>	6x10 ³ копий/мл	6x10 ³ копий/мл	6x10 ² копий/мл	6x10 ³ копий/мл
<i>M. bovis</i>	2,7x10 ³ копий/мл	2,7x10 ³ копий/мл	2,7x10 ³ копий/мл	2,7x10 ³ копий/мл

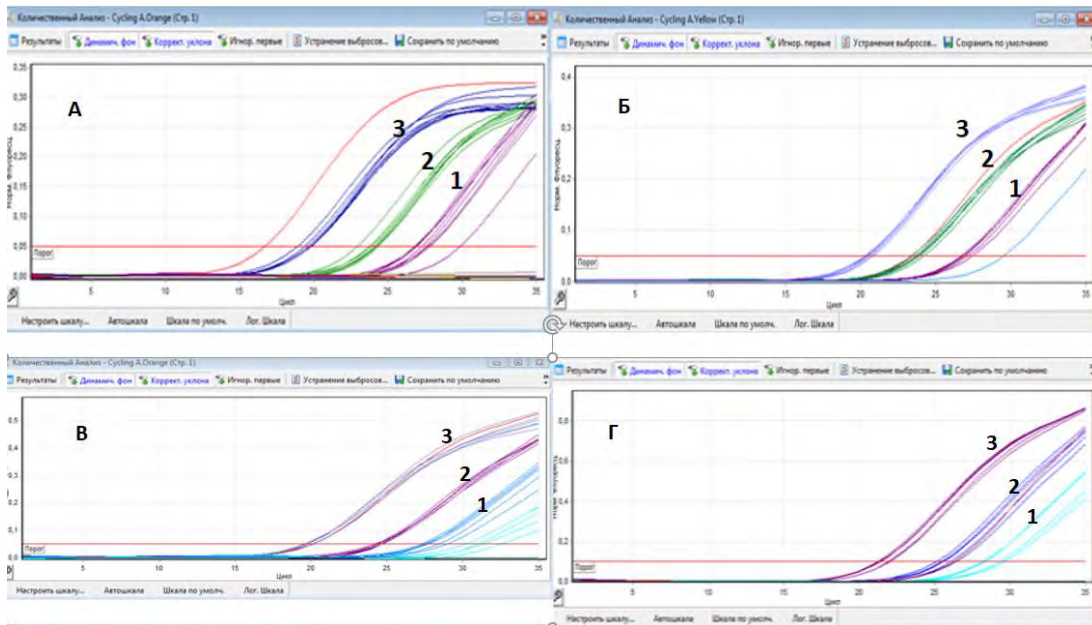


Рисунок 25 – Графики накопления флуоресцентного сигнала при амплификации целевых фрагментов ДНК, выделенной из 10-кратных разведений ПКО в отрицательных образцах спермы быков.

А — амплификация *U. diversum*; Б — амплификация *M. bovigentialium*; В — амплификация *M. bovis*; Г — амплификация *M. californicum*; 1, 2, 3 — разведения соответствующих ПКО в концентрации $N \times 10^3$, $N \times 10^4$, $N \times 10^5$ копий/мл.

Дополнительно для каждой из разработанных методик была оценена их повторяемость, воспроизводимость и устойчивость к влиянию отклонений объема используемых компонентов реакции (робастность). Определение робастности

методики проводили, оценивая влияние 20% изменения (увеличения и уменьшения) объема трех составляющих ПЦР-смеси, которые добавляются отдельно при постановке реакции: полимеразы TaqF, ПЦР-буфера, смеси, содержащей олигонуклеотиды, раствор дНТФ, и деионизованную воду. Использовали серии десятикратных разведений ПКО в РНК-буфере. Каждое разведение исследовали в трех повторах. Было показано, что 20% изменение объема реагентов не оказывает существенного влияния на результат исследования.

Результаты тестирования образцов с помощью разработанных методик

Разработанные методики выявления ДНК *M. californicum*, *M. bovis genitalium*, *M. bovis* и *U. diversum* использовали для выявления генетического материала патогенных микоплазм в образцах патологического материала КРС и диких жвачных копытных, смывов со слизистой животных, молока, смывов со спермоприемников и криоконсервированной спермы КРС [39]. Всего с применением разработанных методик было исследовано более 1200 различных образцов.

Результаты тестирования спермы быков из отечественных и иностранных племенных центров представлены в таблице 23.

Анализ полученных результатов тестирования спермы быков показал, что ДНК *M. bovis* была обнаружена только в образцах из племенных центров США и не была выявлена в спермодозах, импортированных из Нидерландов, Великобритании, а также в образцах из отечественных племенных хозяйств. Дополнительное тестирование положительных образцов с использованием тест-системы LSI VetMAX™ *Mycoplasma bovis* подтвердило полученные результаты.

Таблица 23 – Результаты выявления ДНК микоплазм в образцах спермопродукции

Инфекционный агент	Сперма быков из отечественных племенных центров		Сперма быков из зарубежных племенных центров		Всего	
	229 образцов		240 образцов		469 образцов	
	Обнаружена ДНК	%	Обнаружена ДНК	%	Обнаружена ДНК	%
<i>M. bovis genitalium</i>	132	57,6	55	22,9	187	39,8
<i>M. californicum</i>	101	44,1	50	20,8	151	32,2
<i>Ureaplasma diversum</i>	116	50,6	28	11,7	144	30,7
<i>M. bovis</i>	0	0	8	3,3	8	1,7

Надо отметить, что в нашем исследовании *M. bovis* была обнаружена только в образцах из иностранных племенных хозяйств [623], тогда как в опубликованной в 2020 году работе сообщалось о выявлении этого микроорганизма в 11,6% спермодоз из отечественных племенных хозяйств [84]. Такие различия связаны, вероятно, с разным уровнем контроля здоровья быков в различных племенных хозяйствах, поставляющих сперму для искусственного осеменения.

Анализ полученных в нашей работе результатов показал, что в сперме быков из отечественных племенных центров ДНК микоплазм встречалась почти в два раза чаще, чем в импортной спермопродукции. ДНК *M. bovis genitalium* выявляли в 57,6% отечественных и в 22,9% импортных образцов спермы, ДНК *M. californicum* была выявлена в 44,1 и 20,8% образцов, соответственно. При этом ДНК *Ureaplasma diversum* обнаружена в 50,6% образцов спермы быков из российских племенных центров и значительно реже в образцах спермы иностранного происхождения.

Для значительного числа образцов спермы нами было отмечено коинфицирование различными видами микоплазм [623]. Сочетанная инфекция наблюдалась в 128 образцах из отечественных хозяйств, что составляет 55,8% исследованных образцов спермопродукции Российских племхозов, и в 37 образцах спермы из зарубежных племенных центров, что составляет 15,4%

исследованных импортированных образцов спермы быков. Наиболее часто было выявлено коинфицирование *M. californicum*/*M. bovis* (22,1%) и *M. bovis*/*M. bovis* – в 91 образце (19,4 %). Одновременное инфицирование *M. bovis*, *M. californicum* и *U. diversum* наблюдалось в 56 образцах спермы из отечественных хозяйств (24,6 %) и в 4 пробах спермы из зарубежных племенных центров (1,7%) (рисунок 26). В одном образце спермы, полученной из США, были выявлены все четыре вида детектируемых представителей семейства *Mycoplasmataceae* - *M. californicum*, *M. bovis*, *M. bovis* и *U. diversum*. В двух образцах наблюдалось коинфицирование *M. bovis*, *M. bovis* и *M. californicum* и еще в двух образцах - *M. bovis* с *M. bovis*.

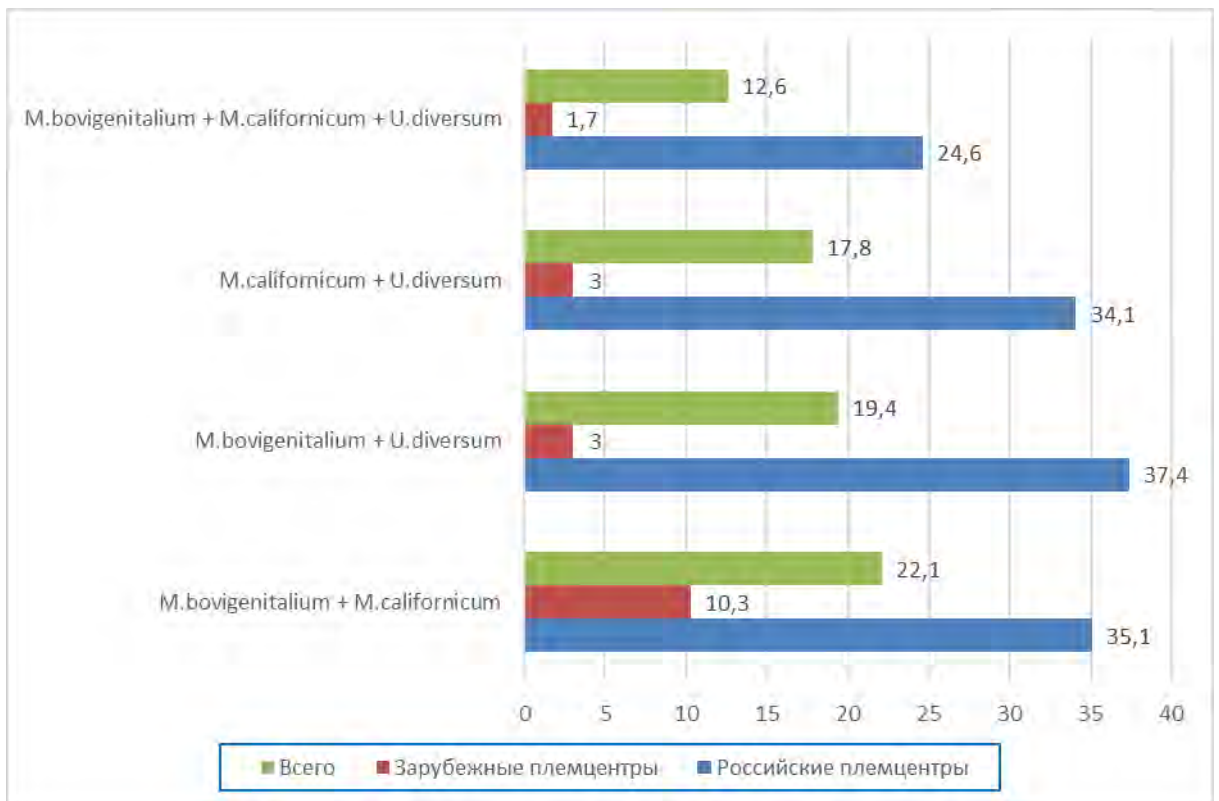


Рисунок 26 – Сочетанное инфицирование микоплазмами спермы быков из отечественных и зарубежных племенных центров. Указан процент выявления разных сочетаний патогенов.

С помощью разработанных методик было проведено тестирование образцов нативной спермы быков и смывов со спермоприемников, полученных из хозяйств Центрального федерального округа. В нашем исследовании, как и в работе [84], было показано, что *M. bovigentalium* является наиболее часто встречающимся в спермопродукции микоплазменным патогеном.

4.14 Определение жизнеспособности микоплазм

Классическим методом идентификации микоплазм считается микробиологический [216], однако для роста микоплазм необходимы специализированные среды и определенные условия. При этом рост других видов бактерий часто существенно затрудняет или делает невозможным выявление и дифференциацию микоплазм [475]. В исследовании, посвященном выявлению *M. bovis*, показано, что культивирование характеризуется чувствительностью, не превышающей 75% [518].

Несмотря на высокую чувствительность и способность метода ПЦР детектировать микоплазмы и определять их видовую принадлежность [115, 283, 449, 534, 589], метод ПЦР не позволяет судить о жизнеспособности микроорганизмов, обнаруживаемых в образце, поэтому для оценки безопасности спермы быков, используемой для искусственного осеменения было проведено определение жизнеспособности микоплазм в криоконсервированной сперме быков.

Жизнеспособность микоплазм подтверждали методом культивирования, исследуя случайным образом отобранные 65 образцов спермы быков, в которых методом ПЦР была выявлена ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma*. 43 культуры после учета результатов культивирования на четырех вариантах сред дополнительно тестировали методом ПЦР. Тестирование проводили на наличие ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma* без дифференциации видовой принадлежности для оценки правильности интерпретации полученных при культивировании результатов, а также для определения наличия видов *M. bovigentalium*, *M. californicum*, *M. bovis* и *U. diversum*.

Для 61 из 65 образцов спермы быков, положительных по результатам ПЦР (94%) был зафиксирован рост на селективных питательных средах, при этом наблюдали равномерное или неравномерное помутнение среды, изменение рН, а также отмечали колонии в виде «кометок», «штришков» и «шариков».

Соответствие результатов микробиологического выявления и результатов обнаружения ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma* без дифференциации вида микроорганизмов в полученных культурах составило 88,3%. При тестировании полученных культур методом ПЦР *M. bovis genitalium* и *M. californicum* были выявлены в 12 (27,9%) и 7 (16,2%) из 43 исследованных культур. *Ureaplasma diversum* была обнаружена в 16,2% культур. В 4 из 43 культур было подтверждено наличие нескольких видов микоплазм. В одной культуре были зафиксированы *M. californicum* и *U. diversum*, в другой - *M. bovis genitalium* и *U. diversum*, еще в двух – одновременно были выявлены *M. bovis genitalium*, *M. californicum* и *U. diversum*.

Полученные результаты подчеркивают недостаточность используемых методов контроля безопасности спермопродукции, поступающей на российский рынок и актуальность скрининговых исследований спермопродукции КРС, направленных на выявление *Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. californicum* и *Ureaplasma diversum* для подтверждения качества спермы быков и предотвращения распространения микоплазменной инфекции.

4.15 Изучение метагенома образцов спермы быков

По мере накопления информации о микробиомах различных систем организма КРС растет осведомленность о влиянии нормального микробного сообщества на здоровье животных, а также о последствиях, которые изменения в микробиоме оказывают на такие качества, как продуктивность, фертильность и устойчивость к инфекционным заболеваниям [439]. Микробиом влагалища и матки коров в последнее десятилетие изучается достаточно активно, и выявлена связь между составом микробиома и нарушениями репродуктивного здоровья [543, 359,

363, 591]. При этом информация о микробиоме урогенитального тракта и спермы быков стала появляться лишь в последние 2-3 года [344, 394, 431, 612].

Ранее в отдельных работах было показано, что бактерии в семенной жидкости могут оказывать негативное воздействие на сперматозоиды, вызывая снижение подвижности и жизнеспособности наряду с увеличением частоты агглютинации сперматозоидов [556, 576]. Недавние исследования показывают, что присутствие бактерий в сперме встречается относительно часто, в том числе у фертильных быков с нормальными параметрами спермы, и следует предположить, что сперма имеет собственную специфическую микрофлору. Вероятно, именно изменение состава микробного сообщества и является одной из причин нарушения подвижности сперматозоидов, а присутствие определенной бактериальной флоры может быть не вредным, а необходимым для нормальной функции сперматозоидов [394, 432].

Появление методов секвенирования ДНК «нового поколения» позволяет с высоким разрешением выявлять в образце наличие как культивируемых, так и некультивируемых видов бактерий, проводить сравнительную оценку представленности различных таксонов, т.е. проводить метагеномные исследования. Термином «метагеном» называют совокупность геномов и генов микроорганизмов в образце биологического материала или окружающей среды, чаще всего имея в виду совокупность бактерий [237, 359, 431]. Сбор информации о метагеноме спермы является шагом на пути к пониманию сложной системы взаимоотношений между представителями микробной флоры между собой и их влияния на активность, подвижность и качество сперматозоидов. Идентификация бактерий также может помочь в разработке новых средств борьбы с микробным загрязнением спермы и изменить подход к использованию антибиотиков в средах для разбавления спермы [344].

В настоящей работе мы проанализировали метагеном образцов криоконсервированной спермы быков. В анализ были включены случайным образом отобранные 34 образца спермопродукции: 10 образцов спермы,

расфасованной в облицованные гранулы в отечественных племенных хозяйствах и 24 образца спермы из иностранных племенных центров [105].

Выравнивание полученных фрагментов ДНК выполнялось с помощью программы VSEARCH с использованием следующих параметров: идентичность 97%, покрытие 95%. В результате было отобрано 2900 уникальных последовательности. Полученные данные полногеномного секвенирования показали, в целом, невысокую бактериальную обсемененность образцов, в сравнении с традиционно анализируемыми образцами для метагеномных исследований, таких как, например, кишечник или образцы фекалий [45]. Среднее значение индекса видового разнообразия Шеннона образцов спермы быков из отечественного племенного центра составило $1,4 \pm 0,12$, а для образцов спермы иностранных быков - $1,3 \pm 0,08$. Рассчитанные значения индекса Симпсона составили $0,3 \pm 0,04$ и $0,31 \pm 0,03$ для этих групп образцов, соответственно. Расчет t-критерия Стьюдента показал отсутствие статистически значимых различий параметров α -биоразнообразия между пробами из отечественных и иностранных племенных центров.

Филумы (типы) бактерий, определенные в образцах спермы в результате анализа полученных последовательностей с помощью программы Qiime 2, представлены на рисунке 27.

В образцах спермы от разных быков было выявлено до 19 известных типов, однако, только 6 из них – *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Tenericutes* или, согласно обновленной номенклатуре 2021 года, – *Pseudomonadota*, *Bacillota*, *Fusobacteriota*, *Bacteroidota*, *Actinomycetota*, *Mycoplasmata* [474] появляются хотя бы в одном из исследованных образцов с частотой выше 5% от общего состава микробного сообщества [103-104].

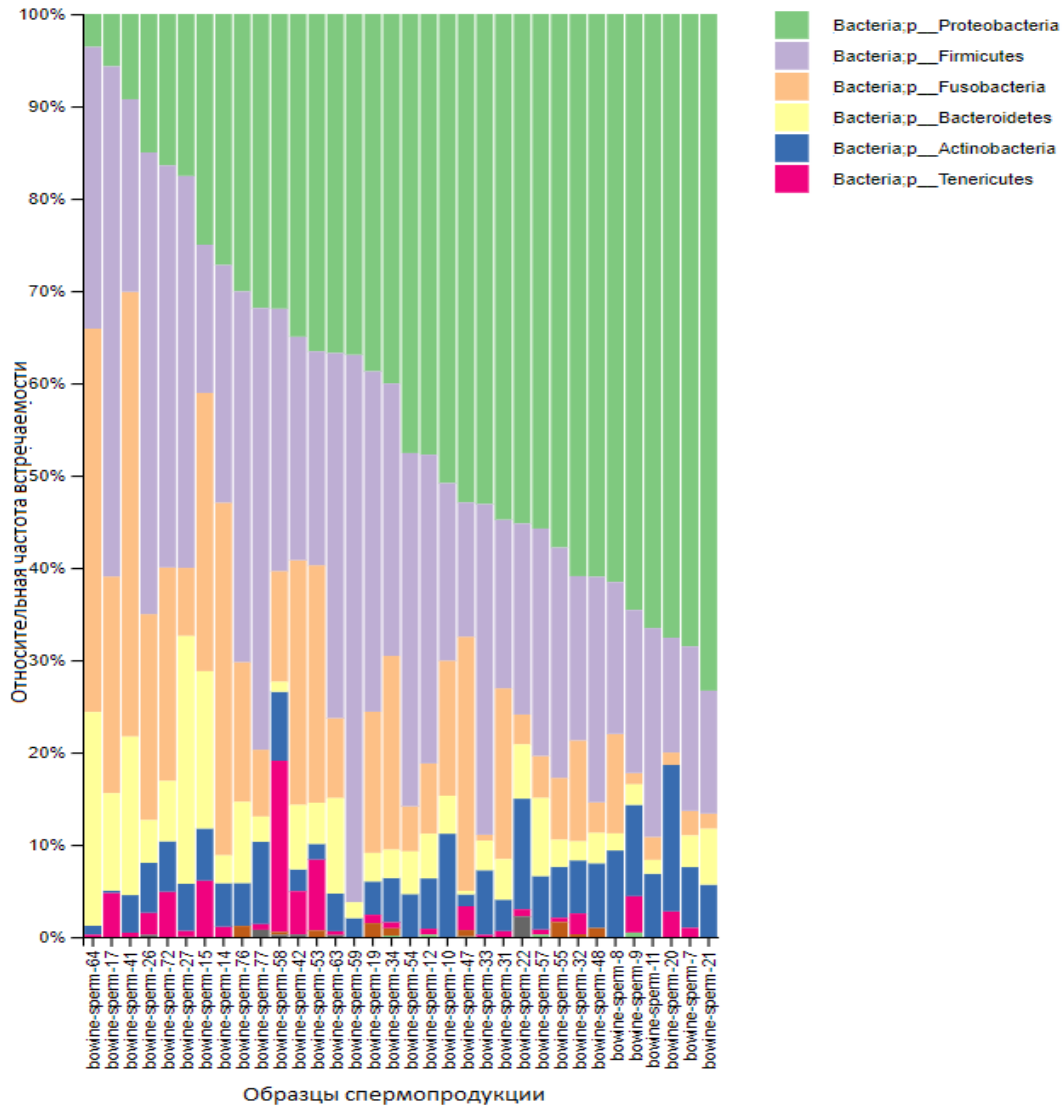


Рисунок 27 – Относительная представленность типов бактерий в анализируемых образцах криоконсервированной спермы быков.

Пять из шести выявленных в нашей работе доминирующих типов, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* и *Fusobacteria*, были ранее обнаружены в составе микробиоты семенной плазмы человека [492]. Сходные данные были получены и для спермы быков [431]. Однако, в отличие от данных, представленных в работе словацких ученых в 2021 году, анализирувавших микробиом свежеполученной спермы здоровых племенных быков голштино-фризской породы, в микробиоме анализируемых нами образцов значительно меньше представлены *Actinobacteria*. При этом в 76,5% спермодоз были выявлены

Tenericutes, не выявленные в работе словацких коллег [431], относительное содержание последовательностей которых в отдельных образцах достигало 18%.

В исследуемых в нашей работе образцах было выявлено 18 классов бактерий (рисунок 28), из них генетический материал 11 классов был обнаружен и идентифицирован хотя бы в одном из образцов с частотой, превышающей 5% всех определенных последовательностей [104,105].

Анализ двух отдельных групп образцов из отечественных и иностранных племенных хозяйств, показал различия во встречаемости основных представителей бактериальной микрофлоры. В образцах спермы российских быков преобладающими филумами (типами) были *Fusobacteria* и *Firmicutes*. На третьем месте по частоте были представлены *Proteobacteria*. В сперме иностранных быков при этом в 87,5% образцов преобладающим типом были представители *Proteobacteria* (таблица 24).

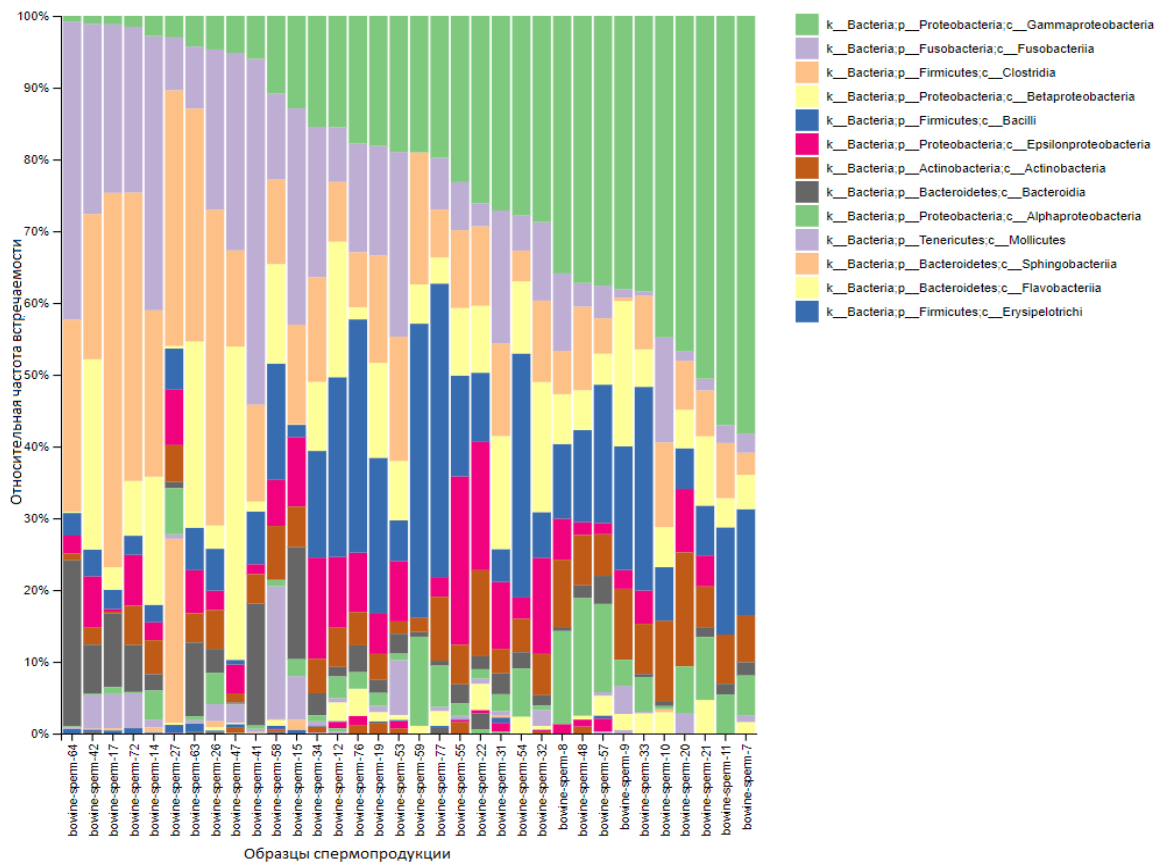


Рисунок 28 – Относительная представленность классов бактерий в анализируемых образцах криоконсервированной спермы быков.

Различалось в отечественных и иностранных образцах и разнообразие на уровне родов и видов. Так, в образцах российских быков с содержанием выше 1% было зафиксировано в среднем 13 родов бактерий. В 7 из 10 проанализированных образцов преобладающим родом был *Fusobacterium*, содержание последовательностей генома которого колебалось от 18,85 до 37,91%. Значение прочтений, определенных как *Fusobacterium*, для отечественных быков составило $21,26 \pm 10,99$, этот род встречался во всех образцах быков.

На втором месте по частоте встречаемости расположился неидентифицированный род порядка *Clostridiales* с содержанием от 1,37 до 27,55% от числа всех идентифицированных последовательностей (рисунок 29).

Таблица 24 – Количественные результаты исследования филогенетического профиля на уровне типа для спермы отечественных и иностранных быков

Тип микроорганизма	Отечественные		Иностранные		t-критерий Стьюдента*
	Значение (% прочтений)±SD	Медиана	Среднее значение (% прочтений)±SD	Медиана	
<i>Proteobacteria</i> (<i>Pseudomonadota</i>)	19,14±11.57	16,97	51,9±12.81	53,94	6,98
<i>Firmicutes</i> (<i>Bacillota</i>)	34,82±13.18	35,0	27,25±11.97	24,52	1,5
<i>Fusobacteria</i> (<i>Fusobacteriota</i>)	26,96±13.19	24,99	9,12±8.05	6,97	3,79
<i>Bacteroidetes</i> (<i>Bacteroidota</i>)	12,83±8.49	10,45	3,72±2.29	3,24	3,17
<i>Actinobacteria</i> (<i>Actinomycetota</i>)	3,84±1.98	4,40	6,52±3.42	5,77	2,76

SD - стандартное отклонение

*Выделены статистически значимые значения (95% доверительный интервал)

Третьим родом, встречающимся в образцах отечественных быков, был род *Pravimonas*. Также во всех образцах были обнаружены фрагменты генома микроорганизмов рода *Campylobacter*, содержание последовательностей которых варьировало от 0,37 до 9,68%. Анализ полученных фрагментов генома позволил идентифицировать вид *Campylobacter ureolyticus* [105].

Данный вид был определен также и в 20 из 24 образцов спермы из иностранных племенных центров. Содержание фрагментов ДНК этого микроорганизма варьировало в разных образцах от иностранных быков от 1,55 до 23,47%.

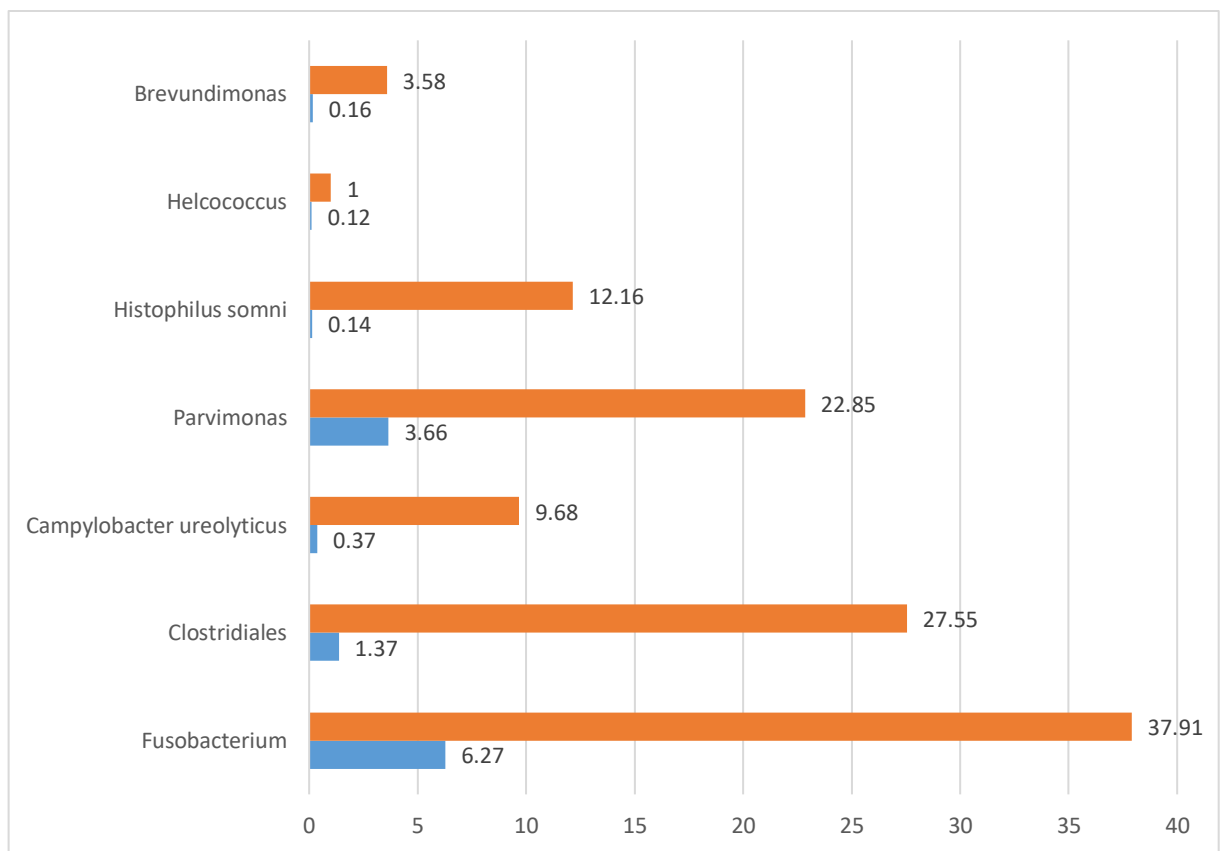


Рисунок 29 – Минимальное и максимальное содержание идентифицированных последовательностей генома микроорганизмов (в % от общего числа прочтений), детектированных во всех исследованных образцах спермопродукции российских быков.

В образцах спермы иностранных быков было определено 15 различных родов бактерий с содержанием выше 1%. При этом только в 5 из 24 образцов

преобладающим родом в микробном сообществе был род *Fusobacterium*. В 19 из 24 образцов был выявлен неидентифицированный род порядка *Clostridiales*, однако его общее содержание относительно других последовательностей в образце, в целом, было ниже, чем в образцах из российских хозяйств.

На рисунке 30 представлены роды бактерий, наиболее часто выявляемые в образцах спермопродукции (без разделения на принадлежность к отечественным или иностранным хозяйствам) с содержанием выше 1% от числа всех идентифицированных нуклеотидных последовательностей.



Рисунок 30 – Встречаемость в образцах спермы быков родов бактерий с содержанием генетического материала свыше 1 %.

Анализ полученных фрагментов генома в образцах спермы позволил идентифицировать вид *Campylobacter ureolyticus*, который встречался в обеих группах.

При проведенном анализе микробиома спермы человека ранее было отмечено, что преобладание представителей *Pseudomonas* и *Prevotella* в образцах коррелировало с аномальными параметрами качества спермы, а повышенная относительная численность микроорганизмов рода *Lactobacillus* была характерна для образцов с нормальной спермограммой [151, 432]. Согласно полученным нами результатам, генетический материал родов *Pseudomonas* и *Prevotella* был выявлен

в 79,4% образцов. При этом последовательности *Lactobacillus* были выявлены лишь в 5 из 34 образцов, а содержание нуклеотидных последовательностей этого рода не превысило 2,8%. Такие результаты позволяют предположить, что анализируемые образцы криоконсервированной спермы были недостаточно высокого качества по морфофункциональным параметрам.

В нашем исследовании микроорганизмы рода *Prevotella* с содержанием последовательностей генома выше 5% встречались исключительно в образцах спермы российских быков, при этом представители рода *Pseudomonas* в этих образцах выявлены не были. При этом в 9 из 24 проанализированных образцов импортированной спермы содержание генетического материала *Pseudomonas*, по данным метагеномного анализа, было достаточно высоко и варьировало от 16,25 до 37,06%. Биоинформатическая оценка на уровне вида показала, что в образцах присутствовали последовательности *P. stutzeri* и *P. mendocina*. Эти виды часто выделяют из почвы, навоза, сточных вод, их также описывали при анализе госпитальной микрофлоры [97, 504]. Возможно, высокая частота встречаемости этих видов в образцах связана с особенностями отбора спермы у быков и дальнейшей подготовки спермодоз.

Проведенный в работе 2022 года [394] анализ встречаемости и сочетаний микроорганизмов в сперме быков с удовлетворительными и неудовлетворительными показателями качества семени показал, что представители родов *Campylobacter* и *Fusobacterium* наиболее часто встречаются в образцах, характеризующихся аномальными показателями спермограммы. Именно образцы, в которых генетический материал *Campylobacter* и *Fusobacterium* встречался наиболее часто, преобладали среди образцов, включенных в наше исследование. В своей работе [394] авторы акцентируют внимание на синергетической связи микроорганизмов рода *Campylobacter* и *Fusobacterium* с другими членами микробного сообщества, отмечая симбиотическое взаимодействие между представителями рода *Fusobacterium* и такими бактериями, как, например, *Prevotella*, *Bacteroidetes* и *Trueperella*, выраженное в стимуляции фузобактериями

пролиферации других бактерий за счет предоставления факторов роста и ослабления защиты организма-хозяина высвобождением белков-токсинов.

Согласно полученным нами результатам, нуклеотидные последовательности *Fusobacterium* были выявлены в 94% образцов в сочетании с наибольшим количеством таксонов бактерий, что согласуется с предположением, что представители рода *Fusobacterium* являются активным членом семенного микробиома и могут оказывать влияние на качество спермы.

Проведенные метагеномные исследования позволили подтвердить полученные нами методом ПЦР данные о частой встречаемости в образцах спермы *H. somni* и представителей семейства *Mycoplasmataceae*. *H. somni* был идентифицирован в 82,3% образцов с содержанием от 0,22 до 12,6%. Дополнительно проведенные биоинформатические исследования показали, что наиболее часто выявляемыми видами микоплазм в сперме быков является *M. californicum* и *M. bovigenitalium*, за ними по частоте встречаемости следуют *M. canadense* и *M. timone*, что хорошо согласуется с полученными нами ранее данными секвенирования по Сенгеру.

Нуклеотидные последовательности микоплазм по результатам метагеномных исследований были выявлены в 47% исследованных образцов, содержание последовательностей этих микроорганизмов колебалось в разных образцах от 0,3 до 6,1% от всех идентифицированных последовательностей, при этом наибольшее содержание было выявлено в образцах спермопродукции из отечественных племенных центров. Микроорганизмы рода *Ureaplasma*, по данным анализа микробиома, были обнаружены в 14 из 34 исследованных образцов (41,1%) с содержанием последовательностей от 0,03 до 14,75%. Интересно, что максимальное содержание нуклеотидных последовательностей генома микроорганизмов рода *Ureaplasma* для пяти образцов спермы из отечественных племенных центров, в которых было подтверждено наличие последовательностей этого микроорганизма, составило 0,14%, а наибольшее содержание микроорганизмов этого рода (14,75%) было выявлено в импортированных образцах. Это говорит о большей обсемененности микроорганизмами этого вида

именно исследованных образцов спермопродукции из иностранных племенных центров.

5 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Стремительно растущая численность населения в мире требует соответственно значительного увеличения мирового производства продуктов питания и новых подходов к управлению животноводством [404]. Такие подходы должны учитывать сразу множество факторов, включая разработку и производство эффективных кормов, снижение выбросов газов и экологичную переработку отходов животноводства, создание высокопродуктивных пород, а также повышение продолжительности жизни, здоровья животных и их плодовитости [607]. Бесплодие КРС является важным экономическим фактором в животноводстве [159], а одной из многочисленных причин, приводящих к снижению воспроизводства животных, является низкое биологическое и санитарное качество спермы [19].

В обзорной статье, вышедшей в марте 2023 года в журнале «Veterinary and Animal Science» авторы подчеркивают, что патогены, выявленные у одного быка, могут иметь более существенное влияние на показатели фертильности на уровне стада, чем патогены коровы, поскольку один бык может использоваться для естественного или искусственного осеменения, являясь распространителем таких патогенов, которые могут привести к серьезным экономическим потерям [381 607]. На основании систематического обзора 38 источников литературы, опубликованных с 1996 по 2022 год и посвященных проблемам фертильности КРС, авторы обзорной статьи делают вывод о растущей озабоченности проблемой фертильности быков и их роли в качестве переносчиков патогенов [607].

Для диагностических исследований и контроля здоровья быков-производителей активно используются диагностические наборы на основе метода ПЦР. Только часть из них предназначена, согласно информации производителей, для тестирования спермы. Проведенное в работе изучение наборов и комплектов реагентов, представленных на рынке России, выявило проблему, связанную с

особенностями ПЦР-диагностики инфекционных болезней животных. Наборы для ПЦР-диагностики являются продуктом, разрабатываемым коммерческой компанией, которая отвечает за их соответствие целевому назначению, функциональные и технические характеристики. Часто при разработке оценивается только теоретическая специфичность, но не проводится изучение чувствительности и эффективности работы методики при тестировании различных типов исследуемого материала. Сравнение же наборов различных производителей обычно проводится только в рамках научных исследований или провайдером при анализе результатов раундов профессионального тестирования [94, 107]. При этом полученные в нашей работе результаты подтверждают необходимость тщательной верификации методик выявления возбудителей инфекционных болезней животных при внедрении в работу лаборатории наборов новых производителей. Проводить такую верификацию необходимо с использованием всех тестируемых матриц, а также с использованием сравнительного метода, например, по алгоритмам ГОСТ ISO 16140-2011 [35]. При выборе коммерческих наборов необходимо учитывать наличие системы амплификации внутреннего контроля и информацией производителя о чувствительности при тестировании спермы с использованием рекомендованного метода выделения нуклеиновых кислот.

В своей работе мы изучали встречаемость в спермопродукции основных патогенов, которые рассматривают в связи с бесплодием и проблемами фертильности быков. Обобщенная информация по выявленным в результате проведенного анализа патогенам приведена в таблице 25.

Необходимо подчеркнуть разную значимость полученных выявлений. Наиболее важным, на наш взгляд, является обнаружение в образцах криоконсервированной спермопродукции вирусов герпеса (BHV-1), возбудителя инфекционного ринотрахеита КРС, и вируса диареи КРС (BVDV), являющихся инфекционными агентами, вызывающими заболевания животных, случаи выявления которых в соответствии с национальным законодательством и международными соглашениями подлежит обязательному уведомлению в органы

исполнительной власти в области ветеринарии, а также во Всемирную организацию здоровья животных.

Таблица 25 – Результаты выявления исследуемых патогенов в образцах спермы

Выявляемый патоген	Сперма из российских племенных центров		Сперма из иностранных племенных центров		Общее количество образцов	
	Всего исследовано образцов 211		Всего исследовано образцов 233		Всего исследовано образцов 444	
	Количество положительных образцов	%	Количество положительных образцов	%	Количество положительных образцов	%
BHV-1	2	0,9	4	1,7	6	1,3
BHV-4	1	0,5	3	1,3	4	0,9
BHV-6	72	34,1	16	6,9	88	19,8
BVDV	0	0	2	0,9	2	0,5
<i>Mycoplasma spp.</i>	182	86,3	134	57,5	316	71,2
<i>Mycoplasma bovis</i>	128	60,7	52	22,3	180	40,5
<i>Mycoplasma californicum</i>	99	46,9	46	19,7	145	32,6
<i>Mycoplasma bovis</i>	0	0	7	3	7	1,6
<i>Ureaplasma diversum</i>	110	52,1	24	10,3	134	30,1
<i>Coxiella burnetii</i>	0	0	32	13,7	32	7,2
<i>Histophilus somni</i>	189	89,6	139	59,6	328	73,9
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	2,4	9	3,9	14	3,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	3,8	16	6,9	24	5,4
<i>Proteus spp.</i>	3	1,4	2	0,8	5	1,1
<i>Campylobacter spp.</i>	168	79,6	129	55,4	297	66,9
<i>Campylobacter jejuni</i>	34	16,1	9	3,9	43	9,7
<i>Campylobacter fetus</i>	3	1,4	0	0	3	0,7

Вирус герпеса КРС является одним из наиболее изучаемых инфекционных агентов, которых ассоциируют с бесплодием быков [607]. Для него показана передача через сперму как при естественном, так и при искусственном оплодотворении, а также в литературных источниках описано его влияние на качество спермы – присутствие вируса увеличивает число аномальных сперматозоидов, снижает их концентрацию, жизнеспособность и подвижность

[268, 322, 455, 607]. Как и в случае с BHV-1, инфицирование BVDV приводит к снижению числа и подвижности сперматозоидов, а также к увеличению количества их аномальных форм, а инфицирование коров может вызвать аборт [326]. В работе, опубликованной А.В. Нефедченко и соавторами в 2022 году, были получены данные мониторингового 18-летнего тестирования спермопродукции КРС одного из отечественных племенных предприятий. Было показано, что вирус инфекционного ринотрахеита выявлялся в период тестирования в сперме от 16,7% до 67,6% быков и присутствовал в среднем в 3,95% серий спермопродукции, а вирус диареи КРС - в 0,4% серий от 4,1% быков. Интересно, что проведенные исследования показали, что в сперме присутствовали три генетических варианта вируса диареи КРС, которые чаще всего участвуют в патологии воспроизводства КРС и субтип 1.1 BHV, который часто вызывает аборт у маточного поголовья [62]. Эти данные, также, как и результаты нашей работы, подтверждают, что спермопродукция является одним из основных источников распространения вирусов инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи крупного рогатого скота в молочных хозяйствах.

В исследованном в нашей работе материале из племенных хозяйств Московской и Воронежской областей и из иностранных племенных центров было выявлено до 1,3% образцов спермопродукции, содержащей генетический материал вируса BHV-1, и 0,5% образцов с BVDV. Несмотря на меньший процент выявления, наши данные в целом подтверждают выводы коллег о том, что существует необходимость исследований накопленных эякулятов банков спермы и выбраковки инфицированных серий. Полученные результаты подтверждают необходимость совершенствования системы контроля племенного материала, а отсутствие утвержденных требований к контролю спермопродукции на наличие вирусов, вместе с отсутствием утвержденных требований к диагностикумам и с возрастающим объемом импортируемой на территорию России спермопродукции делает проблему распространения BHV-1 и BVDV с криоконсервированной спермой весьма актуальной.

С учетом сложившейся ситуации предлагается ввести обязательный контроль серий спермопродукции на наличие генетического материала BHV-1 и BVDV. Контроль должен проводиться валидированными методиками в лабораториях, аккредитованных для проведения данных исследований.

Другие вирусы, генетический материал которых обнаружен в спермопродукции в нашей работе, изучены научным сообществом значительно хуже. Для BHV-4 ранее показана корреляция вирусной инфекции с послеродовым метритом и абортами [177], при этом отсутствует информация о точной роли BHV-4 в бесплодии быков [145, 607]. В нашей работе впервые показано наличие генетического материала BHV-6 в спермопродукции. Вирус является малоизученным, предполагают, что он вызывает бессимптомные латентные инфекции [463]. Возможно, дальнейшее изучение особенностей вируса поможет получать информацию об иммунном статусе животного.

Также, как и BHV-6, *Histophilus somni*, вероятнее всего может относиться к нормальным обитателям репродуктивного тракта быков, и именно с этим связана высокая частота обнаружений этих инфекционных агентов в сперме быков. Однако *H. somni* может приводить к развитию гнойного постита и уретрита, а также к увеличению аномалий сперматозоидов и нарушению их подвижности [21, 28, 89, 194]. Высокая частота встречаемости *H. somni* в сперме быков уже была отмечена в нескольких публикациях [142, 553] и была подтверждена в нашем исследовании. Вызывает беспокойство хорошо сохраняющаяся в криоконсервированной спермопродукции жизнеспособность *H. somni* и способность этого микроорганизма накапливать и передавать мутации, определяющие его патогенные свойства и устойчивость к антибиотикам.

Широкое использование противомикробных препаратов в животноводстве может привести к появлению и селекции устойчивых к противомикробным препаратам патогенов. Используемые при производстве спермопродукции среды с антимикробными препаратами также влияют на экспрессию у бактерий, присутствующих в сперме, генов устойчивости к антибиотикам и способны усилить появление и распространение резистентных изолятов.

Полученные в нашей работе результаты показали, что присутствие генов резистентности не всегда может говорить об уровне их экспрессии и фенотипическом проявлении. Однако для некоторых антибиотиков в нашем исследовании, как и в работе [136] показана четкая взаимосвязь между наличием генетических детерминант у изолятов и проявлением фенотипической устойчивости *H. somni*. Опубликованные в последние годы научные статьи подтверждают рост числа *H. somni*, устойчивых к антибиотикам и важность скрининга генов, определяющих устойчивость к разным группам антибиотиков [136, 158, 316, 357, 429].

Относительно роли *C. burnetii* в развитии репродуктивных проблем у быков на настоящее время накоплено недостаточно информации, лишь отдельные авторы упоминают потенциальную возможность передачи со спермой этого опасного патогена, относящегося к зоонозам [322, 395, 607]. Нами был проанализирован состав сред, используемых в разных племенных центрах для разбавления и хранения спермы, который показал, что производители криоконсервированной спермы на племенных фермах США в средах часто используют молоко для разбавления, защиты спермы и поддержания ее биологических свойств. Следует отметить, что о распространении *C. burnetii* с молоком хорошо известно [135, 222]. Показано, что *C. burnetii* была обнаружена в 1,42% образцов молока, исследованных в Турции [327], частота *C. burnetii* в образцах молока, исследованных в Иране с использованием различных ПЦР-методик, составила более 10% [579].

При исследовании молока, проведенном в 2001-2003 гг. в США, *C. burnetii* была обнаружена в более чем 94% образцов [223]. Несмотря на снижение этого показателя до 45% при исследованиях, проведенных в США в 2007 г. [147], распространенность *C. burnetii* в пробах молока в США все еще крайне высока. Возможно, высокая частота обнаружения ДНК *C. burnetii* в образцах спермы в нашем исследовании связана с использованием в средах для разбавления спермы загрязненного молока, содержащего *C. burnetii*.

Согласно информации, опубликованной в научной литературе коксииеллез – серьезная проблема в США. Ку-лихорадка – заболевание, подлежащее регистрации в Соединенных Штатах. По данным Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC) в 2019 г. было зарегистрировано более 170 случаев острой Ку-лихорадки, а также 34 случая хронической Ку-лихорадки. Более трети случаев (36%) зарегистрированы в трех штатах (Калифорния, Техас и Айова) [203], которые являются лидерами животноводства в стране. Поскольку клинически здоровый крупный рогатый скот является основным источником инфекции *C. burnetii*, нельзя исключить попадание коксииелл в сперму с загрязненным молоком, что делает возможным дальнейшее широкое распространение возбудителя. Кроме того, случаи выявления возбудителя в сперме серопозитивных быков, описанные в литературе [395], указывают на необходимость дополнительного контроля спермопродукции. Результаты нашей работы показали наличие генетического материала коксииелл в импортированной из США спермопродукции. Надо отметить, что наши исследования были ограничены методами обнаружения ДНК *C. burnetii*, и мы не можем подтвердить жизнеспособность возбудителя в криоконсервированной сперме. Однако наши результаты показывают, что существует риск передачи *C. burnetii* животным через сперму. Нужно отметить, что возбудитель коксииеллеза животных и Ку-лихорадки человека из-за высокой инфицирующей способности и устойчивости коксииелл к воздействиям внешней среды часто рассматривают в качестве потенциального агента бактериологического оружия. В сложившейся ситуации это делает тестирование поступающей по импорту криоконсервированной спермопродукции на наличие *C. burnetii* особенно актуальным.

Согласно данным, приведенным в статье [607], бактерии рода *Campylobacter* являются наиболее упоминаемыми в работах, посвященных проблемам фертильности быков. Ранее показано, что эти бактерии способны необратимо связываться со сперматозоидами, изменяя структуру и функциональность плазматической мембраны сперматозоидов, что негативно влияет на качество спермы быков [263]. Отдельные виды *Campylobacter* являются нормальными

обитателями микробиома спермы, что также было показано и в нашей работе при проведении метагеномных исследований. Выявленное в нашей работе в спермодозах присутствие *C. fetus* свидетельствует о недостаточном ветеринарно-санитарном контроле в племенном хозяйстве, а сперма, содержащая такие микроорганизмы, представляет собой источник опасного патогена. Интересно, что в нашей работе было выявлено 9,7% образцов спермы, содержащей генетический материал *C. jejuni*. Сходные результаты были опубликованы в статьях Ноуе с соавторами, в которых высказано мнение, что повсеместное распространение *C. jejuni* в фекалиях КРС может способствовать заражению этим патогеном препуциальной области [361, 500]. Можно предположить также, что наличие *C. jejuni* в сперме быков говорит о нарушениях при отборе и подготовке спермопродукции. О нарушениях санитарно-ветеринарных условий отбора спермы говорят и полученные в нашей работе результаты обнаружения ДНК *Staphylococcus spp*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Proteus spp*.

Микробиологические исследования спермы, проведенные в 2017-2018 гг и опубликованные в работе М.А. Сушковой и соавторов в 2022 году, показали, что актуальным является как выявление этих условно-патогенных микроорганизмов, так и определение их устойчивости к антимикробным препаратам [95]. В работе 2021 года было показано, что условно-патогенные бактерии, присутствующие в сперме быков, могут влиять на структурную целостность и функциональную активность сперматозоидов, а также на общий окислительный и воспалительный профиль спермы КРС [150]. Опубликованные в последнее время научные исследования показывают интерес ученых к микробным сообществам спермы КРС [430, 431, 526] и подтверждают перспективность использования метагеномных исследований для изучения влияния микроорганизмов на репродуктивные свойства. Проведенный в нашей работе метагеномный анализ показал неоднородность состава микробного сообщества в образцах спермопродукции. Вероятно, на микробиом спермы быка оказывает влияние иммунный статус быка и микробный состав других систем органов животного. Полученная в нашей работе информация о микробиоме спермы в целом согласуется с выводами, сделанными в

2019 году С.М. Боруновой о низком качестве спермопродукции, используемой на территории России [9]. Оценивая полученные результаты, необходимо учитывать, что на состав микробиома криоконсервированной спермопродукции также влияет соблюдение санитарно-гигиенических норм при отборе спермы, ее подготовке, разбавлении и фасовке.

Однако окончательно влияние состава микробиома на качество спермопродукции еще предстоит выяснить. Перспективным кажется определение наличия в микробиоме спермы маркерных таксонов, для которых будет четко показана связь между их присутствием в образце и результирующей фертильностью [104-105]. Накопление информации о составе микробного сообщества и ее связи с показателями качества спермы все еще происходит [394, 431] и может способствовать выбору перспективных быков, используемых для производства криоконсервированной спермопродукции для искусственного осеменения, а точное и эффективное прогнозирование фертильности быков, в том числе с использованием данных метагеномных исследований, несомненно повысит экономическую эффективность и устойчивость отрасли разведения КРС.

Результаты метагеномных исследований, проведенных в нашей работе, согласуются с данными ПЦР-исследований о частой встречаемости в образцах спермы *H. somni* и представителей *Mycoplasmataceae*.

Важными представляются полученные в нашей работе результаты выявления микоплазм. Ранее было показано, что передача микоплазм через сперму, предназначенную для искусственного осеменения, характеризуется высокой степенью риска [242, 256]. Особый интерес и опасность представляет *Mycoplasma bovis*, которая, попадая с инфицированной спермой, вызывает поражения репродуктивного тракта коров [551]. Поскольку выделение микоплазм со спермой часто протекает без клинических проявлений у быка-донора [444], случаи носительства *M. bovis* и других *Mollicutes*, вызывающих заболевания КРС (*M. bovigentialium*, *M. californicum* и *Ureaplasma diversum*) часто остаются незамеченными и являются одной из причин заболеваний телят и развития маститов у коров [256].

Классическим методом идентификации микоплазм считается микробиологический [216], однако для роста микоплазм необходимы специализированные среды и определенные условия культивирования. При этом рост других видов бактерий часто существенно затрудняет или делает невозможным выявление и дифференциацию микоплазм [475]. В исследовании, посвященном выявлению *M. bovis*, показано, что культивирование характеризуется чувствительностью, не превышающей 75% [518]. Для выявления микоплазм в различном биологическом материале хорошо зарекомендовал себя метод ПЦР, позволяющий с высокой чувствительностью детектировать микоплазмы и определять их видовую принадлежность [115, 449, 456, 534, 589].

В нашем исследовании *M. bovis* была обнаружена только в образцах из иностранных племенных хозяйств, тогда как в опубликованной в 2020 году работе сообщалось о выявлении этого микроорганизма в 11,6% спермодоз из отечественных племенных хозяйств [84]. Такие различия связаны, вероятно, с разным уровнем контроля здоровья быков в различных племенных хозяйствах, поставляющих сперму для искусственного осеменения. При этом, как и в работе [84], в нашем исследовании было показано, что *M. bovis genitalium* является наиболее часто встречающимся в спермопродукции микоплазменным патогеном.

В проведенных ранее работах, посвященных сравнению молекулярно-биологического и микробиологического методов выявления микоплазм, показана достаточно высокая степень согласованности результатов для обоих методов при исследовании разных видов биологического материала. При исследованиях спермы на наличие микоплазм 50% исследованных образцов были положительны как в результате ПЦР-исследования, так и по данным культивирования [216]. Такой невысокий уровень совпадения результатов может быть связан как с нарушением условий хранения и транспортировки образцов, приведшими к понижению жизнеспособности микоплазм, так и с низким содержанием микроорганизмов в сперме и трудностями идентификации микоплазм на фоне других микроорганизмов. При сравнении результатов микробиологического исследования и ПЦР необходимо также учитывать, что на результаты культуральных работ могут

оказывать влияние антимикробные препараты, входящие в состав разбавителей криоконсервированной спермы. В своей обзорной работе, опубликованной в 2020 году, S. C. Santos и A.R. Silva [542] указывают, что наиболее часто в разбавителях спермы млекопитающих используют β -лактамы (пенициллины и цефалоспорины), которые нарушают процесс синтеза клеточной стенки бактерий, вызывая лизис и гибель клеток, а также аминогликозиды (гентамицин, стрептомицин, амикацин), макролиды (тилозин, спектиномицин) и линкозамиды (линкомицин), которые являются ингибиторами синтеза бактериального белка [560].

В технологии подготовки спермы быков первыми наиболее применяемыми антибиотиками были пенициллин и стрептомицин [123] и было показано, что их комбинация дает лучшие результаты оплодотворяемости, чем использование каждого препарата по отдельности [542]. В настоящее время в Европе согласно Директиве ЕС 88/407 стандартом для разбавления спермы КРС является использование комбинации четырех антибиотиков (гентамицин, тилозин, линкомицин, спектиномицин). В нашей стране наиболее часто для санации спермы используют saniрующие препараты, в состав которых входят полимиксина сульфат и гентамицина сульфат (Полиген) или бензилпенициллина (калиевая или натриевая соль), стрептомицина сульфат и стрептоцид (Спермосан-3).

Отсутствие у микоплазм клеточной стенки делает неэффективным использование β -лактамных антибиотиков для борьбы с микоплазмами [450]. Как правило, эффективными против микоплазм являются тетрациклины, линкозамиды, макролиды, фениколы или фторхинолоны [349]. Однако, недавние исследования показали, что по всему миру в последние годы растет число штаммов микоплазм с низкой чувствительностью к разным препаратам этих групп [121, 137, 205, 348].

Результаты проведенных исследований образцов спермы с использованием ПЦР-методик и микробиологического метода подтверждают возможность передачи микоплазм, в том числе патогенных видов *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. californicum*, а также *U. diversum*, при искусственном осеменении. В нашей работе подтверждена ранее показанная [216] возможность обнаружения в биологическом материале сразу нескольких видов микоплазм.

В нашей работе культивирование проводили только для тех образцов, в которых было подтверждено наличие ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma*, и для этих образцов был продемонстрирован высокий уровень соответствия результатов микробиологического и молекулярно-генетического методов. По полученным нами данным при исследованиях спермы на наличие микоплазм 94% исследованных образцов были положительны как в результате ПЦР-исследования, так и по данным культивирования. Однако подтверждение наличия микоплазм методом ПЦР в образцах после культивирования показало лишь 88,3% соответствия результатов. Такие отличия могут быть связаны со сложностью идентификации микоплазм в культурах. В целом, полученные в нашей работе результаты подтверждают возможность обнаружения в биологическом материале сразу нескольких видов микоплазм. Использование разработанных ПЦР-методик и микробиологического метода показало возможность передачи жизнеспособных микоплазм, в том числе патогенных видов *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. californicum*, а также *U. diversum*, при использовании криоконсервированной спермы для искусственного осеменения. В исследованных образцах спермы быков выявлена высокая степень заражения микоплазмами. При использовании сочетания микробиологического метода и ПЦР-тестирования показано, что более 50% образцов спермопродукции, положительных по результатам ПЦР, содержат жизнеспособные микоплазмы.

Высокий уровень выявления в образцах жизнеспособных микоплазм, продемонстрированный в нашей работе, также свидетельствует о недостаточной эффективности используемых для разбавления спермы антибиотиков против микроорганизмов семейства *Mycoplasmataceae*.

Для уменьшения рисков передачи жизнеспособных микоплазм при использовании племенного материала высокой ценности, считаем необходимым рекомендовать использовать комбинированный подход, сочетающий молекулярно-генетический метод детекции генетического материала патогена и культуральный метод подтверждения его жизнеспособности.

На рисунке 31 представлен алгоритм лабораторных исследований для выявления контаминации спермопродукции микоплазмами с применением ПЦР и культуральных методов. При данном подходе на первом этапе проводится скрининговое тестирование, направленное на выявление ДНК микроорганизмов семейства *Mycoplasmataceae*. В случае получения положительного результата тестирования материал направляют на исследование микробиологическим методом для подтверждения жизнеспособности, а в случае получения «микоплазменного» роста проводится идентификация патогенных видов микоплазм. В случае подтверждения наличия в образце жизнеспособных видов микоплазм, продукция подлежит выбраковке. При отсутствии жизнеспособных микоплазм в документах на спермопродукцию делается отметка о выявлении генетического материала микроорганизмов семейства *Mycoplasmataceae*.

Предлагаемый подход расширяет и уточняет алгоритм, предложенный ранее [9] для выявления микоплазм в сперме быков.

Полученные нами данные подтверждают, что молекулярно-биологический и микробиологический методы при исследовании спермопродукции КРС на наличие микоплазм хорошо согласуются и дополняют друг друга. Кроме того, наши результаты подчеркивают недостаточность используемых методов контроля безопасности спермопродукции, поступающей на российский рынок и актуальность скрининговых исследований спермопродукции КРС, направленных на выявление *Mycoplasma bovis*, *M. bovigenitalium*, *M. californicum* и *Ureaplasma diversum* для подтверждения качества спермы быков и предотвращения распространения микоплазменной инфекции.



Рисунок 31 – Схематическое изображение алгоритма лабораторных исследований и принятия решения при тестировании контаминации спермопродукции микоплазмами с применением ПЦР и культуральных методов.

6 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты анализа нормативно-правовой базы, регулирующей сферу обращения спермопродукции в Российской Федерации, свидетельствуют о том, что существующая система контроля не позволяет в полном объеме подтверждать биобезопасность спермопродукции, поступающей на отечественный рынок, и требует модификации для предупреждения распространения инфекционных болезней и повышения качества племенной продукции.

В данной работе биобезопасность спермопродукции оценивали по таким критериям, как загрязненность посторонними инфекционными агентами вирусной и бактериальной природы, а также возможность распространения микроорганизмов, устойчивых к антимикробным средствам. Основной акцент в работе сделан на использовании молекулярно-генетических методик.

Были проведены ПЦР-исследования 444 образцов криоконсервированной спермы быков из отечественных и иностранных племенных хозяйств на наличие 25 патогенов. При работе с коммерческими ПЦР-наборами показано, что большинство наборов для проведения ПЦР-диагностики инфекционных заболеваний КРС, представленных на российском рынке, не предназначены для обнаружения патогенов в сперме. Для получения достоверных результатов при тестировании спермопродукции такие наборы требуют проведения дополнительных валидационных испытаний.

В целях совершенствования системы контроля биобезопасности спермопродукции были разработаны собственные методики на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»: для выявления вируса нодулярного дерматита, для детекции вируса герпеса КРС 6 типа, для выявления и дифференциации *Mycoplasma bovis genitalium* и *M. californicum*; для детекции *M. bovis*, выявления *Ureaplasma diversum*, обнаружения *Histophilus somni* и детектирования его генов устойчивости к аминогликозидам и сульфаниламидам.

Специфичность методик была оценена с использованием панели образцов, включающей широкий спектр вирусных и бактериальных патогенов. Доказано отсутствие неспецифических реакций со штаммами и изолятами гетерологичных бактерий и вирусов, а также геномной ДНК КРС. Методики валидированы для тестирования спермы быков, а также для исследований других видов биологического материала (смывов со слизистой, суспензии внутренних органов и тканей и др.).

Проведенные культуральные исследования подтвердили, что в криоконсервированной сперме быков сохраняются жизнеспособные вирусы герпеса КРС, гистофилы и микоплазмы. Сравнительный анализ фенотипической и генотипической устойчивости изолятов *H. somni*, выделенных из образцов спермопродукции, показал перспективность использования скринингового ПЦР-тестирования и анализа полных геномов для прогнозирования антибиотикорезистентности и изменений вирулентности этого возбудителя. Метагеномные исследования продемонстрировали, что сперма быков содержит широкий спектр бактерий, относящихся к разным таксономическим группам, а сравнительный анализ микробиома спермы может быть использован для оценки качества спермопродукции и быков-производителей.

При исследовании спермопродукции показана высокая обсемененность образцов микроорганизмами семейства *Mycoplasmataceae*, среди которых отмечена высокая частота встречаемости патогенных видов *M. bovis genitalium*, *M. californicum* и *U. diversum*. В рамках выполнения работы была предложена схема проведения лабораторного контроля спермопродукции на загрязненность микоплазмами, включающая первичное ПЦР-тестирование спермодоз без определения видовой принадлежности микоплазм с последующим культивированием положительных образцов на дифференциальных средах и окончательным тестированием полученных культур микроорганизмов методом ПЦР для подтверждения наличия живых представителей патогенных видов микоплазм.

Полученные результаты выявления бактериальных и вирусных патогенов подчеркивают недостаточность используемых методов контроля безопасности спермопродукции, поступающей на российский рынок. Для своевременного выявления несоответствующей продукции необходимо не только контролировать спермопродукцию традиционными методами согласно действующим нормативным документам ветеринарно-санитарной экспертизы, но и расширять перечень контролируемых показателей. Также необходимо расширять методическую базу лабораторных исследований, активно включая в нее молекулярно-генетические методы контроля.

В результате выполненных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Обосновано, что для выявления загрязнения спермопродукции используемые методики и наборы на основе ПЦР должны содержать систему амплификации внутреннего контроля и информацию о чувствительности при тестировании спермы с предложенным методом экстракции.

2. Использование ПЦР-методик позволило установить отсутствие загрязнения реализуемой на территории страны спермопродукции племенных быков вирусами блютанга, заразного узелкового дерматита, Шмалленберг, парагриппа-3, коронавируса и лейкоза КРС, а также кобувирусами, *Neospora caninum*, микроорганизмами родов *Leptospira*, *Brucella* и *Chlamydia*, что подтверждено результатами исследований 444 образцов спермы как отечественного, так и зарубежного происхождения.

3. При исследовании 444 образцов спермопродукции племенных быков выявлены фрагменты генома инфекционных агентов, вызывающих нотифицируемые болезни ВОЗЖ: вирус герпеса КРС 1 типа (1,3% образцов), вирус диареи КРС (0,9% образцов), *Campylobacter fetus* (0,7% образцов) и *Coxiella burnetii* (7,2% проб), при этом генетический материал вируса диареи КРС и *Coxiella burnetii* обнаружен только в образцах зарубежной племенной продукции, а *Campylobacter fetus* – в образцах спермы быков из отечественных племенных хозяйств.

4. Разработан и апробирован при тестировании спермопродукции способ детекции ДНК вируса герпеса КРС 6 типа, позволивший выявить генетический материал вируса в 19,8% образцов спермы быков.

5. Разработана, утверждена и внедрена в практику методика выявления генетического материала *Histophilus somni* с пределом детекции 1×10^4 коп/мл и выявления генов *H. somni*:

– определяющих устойчивость к аминогликозидам *strB* с чувствительностью методики 6×10^3 коп/мл; *strA* с чувствительностью 7×10^4 коп/мл;

– *sul2* определяющего устойчивость к сульфаниламидам с пределом детекции методики $6,4 \times 10^3$ коп/мл. Методики могут использоваться для подтверждения клинических случаев и прогнозирования резистентности *H. somni* к антимикробным средствам этих групп.

6. Показана высокая частота встречаемости *H. somni* в образцах спермы быков: 89,6% в отечественной спермопродукции и 59,6% – в образцах из иностранных племенных центров. Показано сохранение жизнеспособности *H. somni* в криоконсервированной сперме быков.

7. Определены последовательности полных геномов четырех изолятов *H. somni*, изучены их генетические особенности в сравнении с типовыми патогенным и непатогенным штаммами *H. somni*. Показано, что сперма быков, поступающая из разных племенных хозяйств, может быть источником не только патогенных *H. somni*, но и микроорганизмов этого вида, устойчивых к различным группам антибиотиков.

8. Разработаны, утверждены и внедрены в практику ПЦР-методики выявления *M. bovis genitalium*, *M. californicum*, *U. diversum* и *M. bovis*, которые позволяют проводить тестирование различных видов биологического материала, включая сперму быков, со средней чувствительностью 5×10^3 копий/мл.

9. Установлено, что 71,2 % исследованной спермопродукции загрязнено микроорганизмами семейства *Mycoplasmataceae*, при этом наиболее часто выявляется генетический материал *M. bovis genitalium* - 40,5%, *M. californicum* - 32,6%, *U. diversum* – 30,1%, *M. bovis* – 1,6% исследованных спермодоз. Для 55,8%

образцов спермопродукции отечественных племенных хозяйств и 15,4% импортированных образцов выявлено одновременное инфицирование несколькими видами микоплазм. Наиболее часто встречающимися сочетаниями микроорганизмов являются *M. californicum*/*M. bovigenitalium* (22,1%) и *M. bovigenitalium*/*U. diversum* (19,4%).

10. В результате проведенных исследований установлено, что 53,68% микоплазм, обнаруженных в спермопродукции, сохраняют свою жизнеспособность и могут представлять потенциальную угрозу биобезопасности животноводческой отрасли.

11. Разработан алгоритм лабораторных исследований для выявления контаминации спермопродукции микоплазмами с применением ПЦР и культуральных методов: выявление ДНК *Mycoplasma/Ureaplasma* в образцах спермы – исследование микробиологическим методом для подтверждения жизнеспособности микоплазм – идентификация патогенных видов микоплазм методом ПЦР в полученных культурах – принятие решения о выбраковке серии спермопродукции на основании полученных результатов.

12. Проведенный метагеномный анализ образцов спермы быков, полученных из отечественных и иностранных племенных центров, показал значительные различия состава основных представителей микробиома: в образцах спермы российских быков преобладали типы *Fusobacteria* и *Firmicutes*, в сперме иностранных быков в 87,5% образцов преобладающим типом были представители *Proteobacteria*.

13. Анализ микробного состава и определение содержания в микробиоме маркерных таксонов *Pseudomonas*, *Campylobacter*, *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium* перспективно использовать для оценки качества спермопродукции.

14. Использование разработанных методик и алгоритмов диагностических исследований спермопродукции быков по выявлению контаминации различными инфекционными агентами, в том числе вызывающих нотифицируемые болезни ВОЗЖ позволит контролировать и подтверждать биобезопасность

спермопродукции, поступающей на отечественный рынок, и обеспечивать продовольственную безопасность Российской Федерации.

7 РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Научные результаты, полученные в ходе выполнения исследований, могут быть рекомендованы в качестве современных подходов в ветеринарии для эффективного исполнения Федерального закона № 492-ФЗ "О биологической безопасности в Российской Федерации" в части обеспечения биологической безопасности в животноводстве согласно п. 3,6 и 7 статьи 4 «Деятельность по обеспечению биологической безопасности».

Рекомендовано:

1. Проведение исследований серий племенной продукции и мазков от доноров-производителей из племенных центров на вирусные и микоплазменные инфекции в рамках эпизоотического мониторинга.
2. Для исключения загрязнения спермы вирусами инфекционного ринотрахеита 1 типа и диареи крупного рогатого скота каждую серию замороженной спермопродукции исследовать методом ПЦР с использованием тест-систем, валидированных для тестирования спермы быков.
3. Импортируемую замороженную спермопродукцию исследовать методом ПЦР для определения отсутствия генетического материала *Coxiella burnetii*.
4. Использовать разработанную тест-систему в лабораториях АПК РФ для своевременной идентификации *Histophilus somni* у животных с подозрением на гистофилез и исключения передачи возбудителя через сперму быков.
5. Использовать разработанную методику для контроля развития устойчивости *H. somni* к аминогликозидам и сульфаниламидам и скринингового тестирования культур микроорганизма на наличие генов *strA*, *strB* и *sul2*, детерминирующих устойчивость к антибиотикам.
6. Для исключения микоплазменной контаминации спермы быков использовать разработанный алгоритм лабораторных исследований, включающую скрининговое тестирование, направленное на выявление ДНК микроорганизмов

семейства *Mycoplasmataceae*, последующее исследование микробиологическим методом для подтверждения жизнеспособности микоплазм и идентификацию патогенных видов микоплазм методом ПЦР в полученных культурах. Включать информацию о выявлении ДНК микоплазм в документы на спермопродукцию.

7. Использовать разработанные ПЦР-методики выявления *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovis genitalium*, *Mycoplasma californicum* и *Ureaplasma diversum* при проведении диагностических исследований животных с репродуктивными и респираторными патологиями, а также при исследованиях нативной спермы быков и смывов со спермоприемников.

8. Применять разработанную ПЦР-методику выявления ДНК вируса герпеса КРС 6 типа для дальнейшего изучения вируса и выявления загрязнения этим вирусом материала от животных, живых вакцин, клеточных культур и сывороток КРС, используемых для культуральных работ.

9. Использовать полученные данные по полным последовательностям генома *H. somni*, депонированные в базе данных GenBank (BioProject: PRJNA736593), для проведения сравнительных исследований изменений геномов изолятов *H. somni*, циркулирующих на территории Российской Федерации.

10. Использовать полученную информацию о микробном составе спермы быков в научных исследованиях и разработке методик оценки качества спермы быков по морфофункциональным параметрам.

11. В единый перечень продукции, подлежащей обязательной сертификации, утвержденный постановлением Правительства Российской Федерации от 01.12.2009 № 982 включить сперму сельскохозяйственных животных.

12. Включить в Положение о Федеральной службе по ветеринарному и фитосанитарному надзору, утвержденное Постановлением Правительства Российской Федерации от 30.06.2004 № 327, пункт «Осуществление мероприятий, направленных на обеспечение биологической безопасности племенной продукции».

13. В ГОСТы, устанавливающие требования к качеству и безопасности спермы сельскохозяйственных животных внести изменения в части дополнения требованиями по отсутствию патогенных микоплазм и вирусов, передающихся половым путем при искусственном осеменении животных.

8 ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

Амплификатор – автоматический прибор, выполняющий необходимые для ПЦР циклы нагрева и охлаждения с заданными условиями;

Амплификация ДНК – процесс, многократно увеличивающий число копий фрагмента генома какого-либо организма;

ВОЗЖ – Всемирная организация по охране здоровья животных;

ВКО – Внутренний Контрольный Образец - неконкурентный внутренний контроль, представляющий собой мишень, амплифицируемую одновременно со специфической мишенью;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ДНК-полимераза – термостабильный фермент (ДНК-зависимая ДНК-полимераза), катализирующий циклический синтез ДНК;

дНТФ – Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дАТФ, дТТФ, дГТФ дЦТФ), являющихся материалом для синтеза новых комплементарных цепей ДНК);

кДНК - комплементарная ДНК, получаемая в результате реакции обратной транскрипции на матрице РНК;

КРС – крупный рогатый скот;

Коп/см³ – копий ДНК в 1 мл;

НК – нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК);

Нуклеотидная последовательность – порядок чередования нуклеотидных остатков в ДНК;

Отжиг – гибридизация праймера с комплементарной последовательностью нуклеиновых кислот в заданных условиях;

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией. Ферментативная реакция для проведения ПЦР с РНК в качестве исходного материала. В реакционной пробирке последовательно проходят процессы обратной транскрипции и ПЦР.

Отрицательный контроль выделения (контроль чистоты выделения, Кв) – контроль, прошедший все этапы выделения ДНК, но в отсутствие анализируемой пробы

Отрицательный контроль ПЦР (К-) – реакционная смесь для проведения ПЦР, заведомо не содержащая целевой нуклеиновый материал

Праймер – олигонуклеотид с определенной длиной и последовательностью, комплементарный фрагменту аналитически значимой последовательности ДНК;

Продукт ПЦР – фрагмент ДНК, амплифицированный в ПЦР;

п.н. – пара нуклеотидов, пара двух азотистых оснований на комплементарных цепочках нуклеиновых кислот;

т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ПКО – положительный контрольный образец, рекомбинантная плазмида, содержащая искусственно синтезированный целевой фрагмент ДНК;

Положительный контроль ПЦР (К+) – реакционная смесь для проведения ПЦР, заведомо содержащая целевой нуклеиновый материал;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

Секвенирование по Сенгеру – определение последовательности нуклеотидов ДНК с помощью подхода, основанного на обрыве цепи (классический метод секвенирования);

Специфичность – способность применяемого метода распознавать исключительно целевую последовательность ДНК и отличать ее от сходных последовательностей и загрязняющих примесей;

G+C состав – процентный состав суммы всех гуанинов (G) и цитозинов (C) по отношению к сумме всех остатков нуклеотидов рассматриваемой нуклеотидной последовательности. Используется для прогнозирования температуры отжига праймеров с матричной ДНК. Является одной из характеристик генома организмов;

ЦПД - цитопатическое действие, деструктивные изменения отдельных клеток и клеточного монослоя, возникающие в результате действия вирусов;

Bluetongue virus (BTV) - вирус Блютанг,

Bovine Coronavirus (BCOV) – коронавирус КРС,

Bovine herpesviruses (BHV) – группа вирусов герпеса крупного рогатого скота разных типов, в которую входят альфа- и гамма-герпесвирусы

Bovine leukemia virus (BLV) – вирус лейкоза КРС,

Bovine parainfluenza virus type-3 (BPIV-3) – вирус парагриппа КРС 3 типа.

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) – вирус вирусной диареи крупного рогатого скота;

Lumpy skin disease virus (LSDV) – вирус заразного узелкового дерматита КРС (нодулярного дерматита);

MDBK – культура клеток почки теленка;

Schmallenberg virus (SBV)- вирус Шмалленберг;

Ct – значение цикла амплификации, на котором флуоресценция от расщепленного зонда превысила значение фоновой флуоресценции. Значение порогового цикла ПЦР.

Next-generation sequencing (NGS), секвенирование «нового поколения» – технология определения нуклеотидной последовательности ДНК посредством параллельного секвенирования миллионов небольших фрагментов ДНК.

SD (Standard Deviation)- стандартное отклонение.

9 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абед, А. М. Молекулярно-биологические методы диагностики микоплазмозов крупного рогатого скота: Автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук 4.2.3. / А. М. Абед. – Текст : непосредственный. – Владимир, 2023. – 23 с.
2. Андреев, Г. М. Критерий оценки оплодотворяющей способности спермы быков-производителей / Г. М. Андреев, В. У. Давыдов. – Текст : непосредственный // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: сб. науч. тр. – Санкт-Петербург: СПбГАВМ. – 2015. – №124. – С. 5-6.
3. Анипченко, П. С. Влияние L-карнитина на качество спермы производителей: дисс. ... канд. ветеринар. наук 06.02.06 / П. С. Анипченко. – Текст : непосредственный. – Санкт-Петербург, 2020. – 122 с.
4. Барышникова, А. В. Влияние генотипа на показатели спермопродукции быков-производителей / А. В. Барышникова, Т. Н. Бабкана – Текст : непосредственный // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2016. – № 13. – С. 105-106.
5. Белоусов В.И. Лептоспироз животных в Российской Федерации и меры борьбы с ними / Белоусов В.И., Абрамов В.Н., Калмыков М.В. // Лептоспироз: материалы 10-й Всерос. науч.-практ. конф. по лептоспирозу, Анапа. – 2003. – С. 6-10.
6. Болезнь Шмалленберга: молекулярно-биологические особенности вируса и клиническая картина (обзор) / А. В. Спрыгин, А. В. Кононов, Ю. Ю. Бабин, В. А. Мищенко. – Текст : непосредственный // Сельскохозяйственная биология. – 2012. – №6. – С. 24-34.
7. Бондарева, Н.Т. Механизмы персистенции хламидий и совершенствование диагностики хронических хламидийных инфекций : дис. ... канд. мед. наук : 03.02.03 / Бондарева Наталия Евгеньевна; [Место защиты: ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения

- Российской Федерации]. – Москва, 2020. – 172 с. – Текст : непосредственный.
8. Борисевич, С. В. Эколого-эпидемиологические особенности возбудителя лихорадки Ку в Российской Федерации и странах Европы / С. В. Борисевич, Э. А. Яковлев. – Текст : непосредственный.
 9. Борунова, С. М. Комплексная оценка морфофункциональных и микробиологических показателей половых клеток быков - производителей: дис. ... д-ра биол. наук 06.02.01 / Борунова С. М. – Текст : непосредственный. – Москва, 2019. – 379 с.
 10. Борунова, С. М. Показатели семени быков-производителей казахской белоголовой породы / С. М. Борунова, А. И. Абилов, Йе Эрлан-Хиэрмаола [и др.] – Текст : непосредственный // Зоотехния. – №12. – 2017. – С. 25-28.
 11. Борхсениус, С.Н. Микоплазмы: молекулярная и клеточная биология, взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика / С.Н. Борхсениус, О.А. Чернова, В.М. Чернов [и др.].– Санкт-Петербург : Наука, 2002. – 319 с.
 12. Бугров А. Д. Микробная контаминация при трансплантации эмбрионов / А.Д. Бугров, И.М. Величко. – Текст : непосредственный // Тезисы докладов симпозиума по трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота. – Тарту, 1986. – С. 38.
 13. Ваганова, А. Н. Адаптация полимеразной цепной реакции для диагностики лептоспироза и эпидемиологического надзора за лептоспирозной инфекцией / А. Н. Ваганова, Н. А. Стоянов, Н. К. Токаревич. – Текст : непосредственный // ЗНиСО. – 2012. – №1.
 14. Ваганова, А. Н. Наружная мембрана патогенных представителей рода *Leptospira* / А. Н. Ваганова. – Текст : непосредственный // Инфекция и иммунитет. – 2011. - Т. 1, № 1. – С. 29-42.
 15. Ветеринарно-санитарные и биологические показатели качества спермы быков в зависимости от сезона года и чувствительность микроорганизмов к

- антибиотикам / В. П. Музыка, И. Е. Атаманюк, А. П. Паньч. – Текст : непосредственный // Ученые Записки УО ВГАВМЮ – 2012. – Т.48, Вып. 2.
- 16.Валидация разработанной методики индикации возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота / А. А. Сухинин, С. А. Макавчик, С. П. Яцентюк [и др.] – Текст : непосредственный. // Ветеринария. – 2019. – № 8. – С.62-64.
- 17.Ветеринарно-санитарный контроль спермопродукции крупного рогатого скота в Российской Федерации / С. П. Яцентюк, С. М. Борунова, Е. П. Агринская [и др.] – Текст : непосредственный. // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2021. – № 4. – С. 72-77.
- 18.Вирус болезни Шмалленберг: пути заражения и диагностика / Д. Колбасов, Н. Сальников, Е. Никитина [и др.]. – Текст : непосредственный // Агро-Рынок. – 2012. – октябрь. – С. 48-49.
- 19.Войтенко, Л. Г. Бесплодие животных : учебное пособие / Донской ГАУ; сост. Л. Г. Войтенко, Д. И. Заякина. – Персиановский : Донской ГАУ, 2021. – 69 с. – Текст : непосредственный.
- 20.Выделение вируса болезни Шмалленберга у импортируемого скота на территории Российской Федерации / О.Г. Губенко, О.П. Бьядовская, А.В. Спрыгин [и др.]. – Текст : непосредственный // Сельскохозяйственная биология. – 2019. – Том 54. – №6. – С. 1247-1256.
- 21.Выявление ДНК *Histophilus somni* в сперме крупного рогатого скота методом полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени / С. П. Яцентюк, Д. А. Рудняев, Ю. И. Поболелова [и др.]. – Текст : непосредственный // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2020. – № 1. – С. 58-59.
- 22.Выявление ДНК герпесвируса четвертого типа у крупного рогатого скота при помощи ПЦР в режиме реального времени / А. В. Нефедченко, А. Г. Южаков, С. В. Котенева [и др.]. – Текст : непосредственный // Вопросы вирусологии. – 2019. – № 64(4). – С. 178-184.

23. Выявление генетического материала вируса Шмалленберг в 2017 году / С. П. Яцентюк, А. Ю. Бирюкова, О. В. Клименкова [и др.]. – Текст : электронный // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2018. – Т. 16. – С. 205-214.
24. Выявление устойчивости к антибиотикам у возбудителя гистофилеза крупного рогатого скота *Histophilus somni* / С. П. Яцентюк, Ю. И. Поболелова, Д. А. Рудняев [и др.]. – Текст : непосредственный // Сельскохозяйственная биология. – 2021. – Т. 56. – № 2. – С. 304-314.
25. Гаврилова, Е. А. Совершенствование средств мониторинга блютанга на основе полимеразной цепной реакции : автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук : 06.02.02 / Е. А. Гаврилова; [Место защиты: Всерос. науч.-исслед. ин-т ветеринар. вирусологии и микробиологии]. – Покров, 2010. – 25 с. – Текст : непосредственный.
26. Гарафутдинова, Н. Ю. Биологические качества спермы быков-производителей татарстанского типа разных линий и эффективность их использования: автореф. дис. ... канд. биол. наук 06.02.07/ Н. Ю. Гарафутдинова; [Место защиты: ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»].— Казань, 2018. – 22 с. – Текст : непосредственный.
27. Гистофилёз крупного рогатого скота / А. В. Капустин, Н. В. Моисеева, А. И. Лаишевцев [и др.]. – Текст : непосредственный // RJOAS. – 2017. – №10(70).
28. Гистофилёз крупного рогатого скота и выявление ДНК *Histophilus somni* методом ПЦР в режиме «реального времени» / С. П. Яцентюк, Д. А. Рудняев, Ю. И. Поболелова [и др.]. – Текст : непосредственный // Ветеринария. – 2020. – № 11. – С. 28-33.
29. Глотов, А. Г. Диагностика инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота методом молекулярной гибридизации / А. Г. Глотов, С. Ф. Орешкова. – Текст : непосредственный // Ветеринария. — 1996. – № 6. – С. 24-27.
30. 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 : 16.00.03, 16.00.04 / Т. И. Глотова ; Ин-т эксперим. ветеринар. Сибири и Дал. Востока. – Новосибирск, 2006. – 39 с. – Текст : непосредственный.

- 31.ГОСТ 26030-2015. Средства воспроизводства. Сперма быков замороженная. Технические условия : Дата введения 2016-07-01. – Текст : электронный // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов: сайт. – Москва, © АО «Кодекс», 2023. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200121491> (дата обращения: 23.09.2023).
- 32.ГОСТ 33955-2016. Средства воспроизводства. Сперма быков, разделенная по полу замороженная. Технические условия: Дата введения 2018-01-01. – Текст : электронный // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов: сайт. – Москва, © АО «Кодекс», 2023. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200141404> (дата обращения: 23.09.2023).
- 33.ГОСТ 32198-2013. Средства воспроизводства. Сперма. Методы микробиологического анализа : Дата введения 2013-09-06. – Текст : электронный // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов: сайт. – Москва, © АО «Кодекс», 2023. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200105526> (дата обращения: 23.05.2023).
34. ГОСТ Р 70150-2022. Тест-системы для диагностики болезней животных методом полимеразной цепной реакции. Общие требования и методы испытаний. Дата введения 2022-12-01. – Текст : электронный // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов: сайт. – Москва, © АО «Кодекс», 2023. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200184802> (дата обращения: 20.05.2023).
- 35.ГОСТ ISO 16140-2011 Микробиология продуктов питания и кормов для животных. Протокол валидации альтернативных методов. Дата введения 2011-12-13. – Текст : электронный // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов: сайт. – Москва, © АО «Кодекс», 2023.

- URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200093840> (дата обращения: 14.05.2023).
- 36.ГОСТ ISO 8607-2015. Средства воспроизводства. Сперма племенных быков замороженная. Подсчет живых аэробных микроорганизмов. Дата введения 2016-07-01. Текст : электронный // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов: сайт. – Москва, © АО «Кодекс», 2023.
– URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200121497> (дата обращения: 16.06.2023).
- 37.Грибов К. П. Распространение послеродовых эндометритов у коров, вызванных *Haemophilus somnus* / К. П. Грибов, А. Г. Ключников, С. Н. Карташов. – Текст : непосредственный // Ветеринарная патология – 2011. – № 1-2. – С. 18-19.
- 38.Грязнева, Т. Н. Антибиотикорезистентность *Mycoplasma bovis*, выделяемой из спермы быков-производителей / Т. Н. Грязнева, С. М. Борунова. – Текст : непосредственный // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – № 2. – 2017. – С. 22-27.
- 39.Дифференциация *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma californicum* и выявление *Ureaplasma diversum* методом ПЦР в реальном времени / А. Д. Козлова, Н. С. Горбачева, Р. Ф. Хаерова [и др.]. – Текст : непосредственный //Сельскохозяйственная биология. – 2019. – Т. 54. – № 2. – С. 378-385.
- 40.Евтух, Л. Г. Факторы, влияющие на качественные и количественные показатели нативной спермопродукции быков ОАО «Красноярскагроплем» / Л. Г. Евтух. – Текст : непосредственный // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2014. – № 12. – С. 13-15.
- 41.Ескин, Г. В. К вопросу качества импортного племенного материала / Г. Ескин, И. Турбина, Н. Комбарова. – Текст : непосредственный // Молочное и мясное скотоводство. – 2010. – №4. – С. 2-5.
- 42.Желудков, М. М. Бруцеллез в России: современная эпидемиология и лабораторная диагностика : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 14.00.30, 03.00.07

- / М. М. Желудков; [Место защиты: Науч.-исслед. ин-т эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН]. – Москва, 2009. – 51 с. – Текст : непосредственный.
43. Заболеваемость лихорадкой Ку в Российской Федерации и странах Европы: реалии и проблемы / Э. А. Яковлев, С. В. Борисевич, А. Ю. Попова, [и др.]. – Текст : непосредственный // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. - № 4. – С. 49-54.
44. Зиновьева, Н.А. Роль ДНК-диагностики в контроле и элиминации рецессивных наследственных аномалий у сельскохозяйственных животных / Н. А. Зиновьева, Е. А. Гладырь, О. В. Костюнина [и др.] – Текст : непосредственный // Достижения науки и техники АПК. – 2012. - № 11. – С. 37-40.
45. Изучение кишечных микробных профилей *Equus Fergus Caballus* методом NGS-секвенирования / Е. И. Алексеева, А. В. Дубровин, Г. Ю. Лаптев [и др.] – Текст : непосредственный // Сельскохозяйственная биология. – 2020. – № 55. – Р. 671-681.
46. Иммуногенные свойства возбудителя гистофилеза (стадного бесплодия) крупного рогатого скота / А. В. Капустин, А. И. Лаишевцев, Е. В. Иванов [и др.]. – Текст : непосредственный // Ветеринария, Зоотехния и Биотехнология. – 2020. – №7. – С. 31-41.
47. Использование полимеразной цепной реакции для идентификации вирусов КЛЮ и ЭГБО / К. А. Снетков, Н. Н. Власов, С. Ж. Цыбанов [и др.]. – Текст : непосредственный // Генодиагностика инфекционных заболеваний : материалы Всероссийской научно-практической конференции. – Москва, 2002. – С.366-368.
48. Кидун, К. А. Митохондриальная дисфункция сперматозоидов в патогенезе патоспермий при окислительном стрессе (обзор литературы) / К. А. Кидун, Т. С. Угольник Т. С. – Текст : непосредственный // Проблемы здоровья и экологии. – 2013. – № 2 (36). – С. 20-24.

49. Кобувирус крупного рогатого скота / А. С. Хишов, И. В. Солтынская, Е. В. Крылова [и др.]. – Текст : непосредственный // Ветеринария. – 2021. – № 6. – С. 8-11.
50. Кодекс здоровья наземных животных – Текст : электронный // World Organisation for Animal Health (WOAH) [сайт]. – URL: https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/?id=169&L=1&htmlfile=chapitre_coll_semen.htm (дата обращения 28.04.2023).
51. Кольцов, А. Ю. Разработка средств молекулярно-генетического анализа вируса блютанга 14 серотипа, выделенного в Российской Федерации: дис. ... канд. биол. наук : 03.02.02: защищена 2017 / А. Ю. Кольцов. – Покров, 2017. – 161 с. – Текст : непосредственный.
52. 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 ; Ин-т эксперим. ветеринар. Сибири и Дал. Востока. – Новосибирск, 2006. – 19 с. – Текст : непосредственный.
53. Красочко, П. П. Молекулярно-генетические, иммунологические и физические основы борьбы с инфекционным ринотрахеитом крупного рогатого скота : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.01.06 / П. П. Красочко; [Место защиты: Всерос. науч.-исслед. и технол. ин-т биол. пром-сти]. – Щёлково, 2018. – 46 с. – Текст : непосредственный.
54. Литусов, Н. В. Кампилобактерии. Иллюстрированное учебное пособие / Н.В. Литусов. – Екатеринбург: Изд-во ГБОУ ВПО УГМА, 2012. - 18 с. – Текст : непосредственный.
55. Лобан, К. М. Лихорадка Ку / К. М. Лобан ; Ун-т дружбы народов им. Патриса Лумумбы. Кафедра инфекц. болезней. - Москва : [б. и.], 1974. - 105 с. – Текст : непосредственный.
56. Малахов, Ю. А. Лептоспироз животных / Ю. А. Малахов, А. Н. Панин, Г. Л. Соболева. – Москва : Медгиз, 2000. – 621 с. – Текст : непосредственный.

- 57.Метод ПЦР в лабораторной диагностике бруцеллеза / Ю. К. Кулаков, М. М. Желудков, Т. А.Толмачева. – Текст : непосредственный // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2010. – №2.
- 58.Методы лабораторной диагностики лептоспирозов: особенности постановки, преимущества и недостатки / Е. Ю. Киселева, Н. В. Бренева, А. К. Носков [и др.]. – Текст : непосредственный // Acta Biomedica Scientifica. – 2015. – №3 (103).
- 59.Микоплазмы и их устойчивость к антибиотикам: проблемы и перспективы контроля микоплазменных инфекций и контаминаций клеточных культур / О. А. Чернова, Е. С. Медведева, А. А. Музыкантов [и др.]. – Text : direct // Acta Nature. – 2016. – Vol. 2 (29). – P. 27-38
- 60.Милованов, В. К. Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных / В. К. Милованов. – 4-изд., перераб. –Москва : Сельхозгиз, 1938 (Образцовая тип.). – 368 с. – Текст : непосредственный.
- 61.Мищенко, В.А. Проблема борьбы и профилактики инфекционного ринотрахеита - инфекционного пустулезного вульвовагинита крупного рогатого скота – Текст : непосредственный / В. А. Мищенко, Г. А. Джаилиди, О.Ю. Черных и др. // Ветеринария Кубани. - 2012. - № 6. - С. 3-5.
- 62.Мониторинг инфицированности спермы быков-производителей вирусами на головном племпредприятии / А. В. Нефедченко, С. В. Котенева, Т. И. Глотова, А. Г. Глотов – Текст : непосредственный // Ветеринария. – 2022. – № 9. – С. 18-23. – (doi: 10.30896/0042-4846.2022.25.9.18-23).
- 63.Музыка, В. П. Эффективность применения антибактериальных препаратов для санации спермы быков / В. П. Музыка В. П. Музыка, Т. И. Стецко, М. В. Пашковская.– Текст : непосредственный – "Актуальные проблемы и инновации в современной ветеринарной фармакологии и токсикологии".– 2015. – Витебск. – С .304-308.
- 64.Наборы реагентов для ПЦР- и ИФА-диагностики в ветеринарии. – Текст : электронный // ИЛС [сайт]. – URL:

<https://interlabservice.ru/catalog/reagents/?sid=1257> (дата обращения 28.04.2023).

65. 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 : специальность 06.02.02: дис. ... д-ра ветеринар. наук / А. В. Нефедченко. – Краснодар, 2018. – 434 с. – Место защиты : Кубан. гос. аграр. ун-т. – Текст : непосредственный.
66. Новый saniрующий препарат для спермы быков-производителей / Сергиенко [и др.]. – Текст : непосредственный // Материалы Всеросс. научной и учебно-методической конф. по акушерству, гинекологии и биотехнологии размножения животных. 25-27 октября 1994 г. – Воронеж : ВНИВИ, 1994. – С. 191-192.
67. Об утверждении Стратегии развития агропромышленного и рыбохозяйственного комплексов Российской Федерации на период до 2030 года: Распоряжение Правительства РФ от от 08.09.2022 N 2567-р. – Текст : электронный // Информационно-правовой портал ГАРАНТ.РУ. – Москва, 2023 © ООО "НПП "ГАРАНТ-СЕРВИС". – URL : <https://base.garant.ru/405272287/> (дата обращения 20.03.2023).
68. Обнаружение вирусов и бактерий в замороженной сперме племенных быков / Б. Т. Стегний, В. И. Стеценко, Р. А. Кучерявенко [и др.]. – Текст : непосредственный // Ветеринарная медицина. – 2013. – № 97. – С. 240-241.
69. Обухов, И. Л. Молекулярно-генетическая характеристика хламидий и экспресс-диагностика хламидиоза : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 16.00.03 / Всерос. н.-и. ин-т контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов; лаб. гибридных клеточных культур н.-и. ин-т вирусных препаратов РАМН. – Москва, 2000. – 35 с. – Текст : непосредственный.
70. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности: Методические Указания МУ 1.3.25-69-09. – Москва

- : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 51 с.
71. Орлова, С. Т. Усовершенствование методов обнаружения микоплазм у собак и кошек : дис. ... канд. биол. наук : 06.02.02 / С. Т. Орлова ; [Место защиты: ФГБНУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук»]. – Москва, 2019. – 142с.
72. Панферова, А. В. Генотипирование серотипов вируса блютанга : дис. ... канд. биол. наук : 03.02.02 / А. В. Панферова; [Место защиты: Всерос. науч.-исслед. ин-т ветеринар. вирусологии и микробиологии]. – Покров, 2012. – 130 с. – Текст : непосредственный.
73. Панферова, Ю. А. Молекулярно-генетические основы физиологии патогенности *Coxiella burnetii* / Ю. А. Панферова. – Текст : непосредственный // Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2, № 3. – С. 615-626.
74. Патогенные микоплазмы крупного рогатого скота *Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium* и *M. dispar*: краткая характеристика возбудителей (обзор) / А. М. Абед, В.В.Кирпиченко, С.П. Яцентюк [и др.] – Текст : непосредственный // Сельскохозяйственная биология. – 2021. – Т. 56. – № 2. С. 245-260.
75. Приказ Минсельхоза России от 02.06.2022 N 336 "Об утверждении требований к видам племенных хозяйств". – Текст : электронный // Информационно-правовой портал ГАРАНТ.РУ. – Москва, 2023 © ООО "НПП "ГАРАНТ-СЕРВИС". – URL : <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/405117125/> (дата обращения 10.10.2023).
76. Постановление Правительства РФ от 23.12.2021 N 2425 "Об утверждении единого перечня продукции, подлежащей обязательной сертификации, и единого перечня продукции, подлежащей декларированию соответствия, внесении изменений в постановление Правительства Российской Федерации от 31 декабря 2020 г. N 2467 и признании утратившими силу некоторых актов

- Правительства Российской Федерации". – Текст : электронный // Информационно-правовой портал ГАРАНТ.РУ. – Москва, 2023 © ООО "НПП "ГАРАНТ-СЕРВИС". – URL : <https://base.garant.ru/403335697/> (дата обращения 15.10.2023).
77. Применение метода ПЦР для выявления возбудителей инфекционных болезней в сперме крупного рогатого скота / А. Д. Козлова, Н. С. Горбачева, О. В. Клименкова [и др.]. – Текст : электронный // Сборник материалов Международной научно-практической конференции «Перспективы и актуальные проблемы развития высокопродуктивного молочного и мясного скотоводства». – Витебск. – 2017. – С. 89-95. – URL: <https://repo.vsavm.by/bitstream/123456789/1263/1/k-2017-9-9-89-95.pdf>
78. Пестивирусы крупного рогатого скота – контаминанты биологических препаратов / А. Г. Глозов, Т. И. Глотова, С. В. Котенева [и др.] – Текст : непосредственный // Сельскохозяйственная биология. – 2023.
79. Петрянкин, Ф. П. Бактериальная контаминация спермы быков / Ф. П. Петрянкин, В. А. Зудилов // Ветеринария. – 1976. – №7. – С. 84-85.
80. Пчельников, А. В. Герпесвирус крупного рогатого скота 6 типа / А. В. Пчельников, С. П. Яцентюк [и др.]. – Текст : непосредственный // Ветеринария. – 2022. – № 6. – С. 20-24.
81. Пчельников, А. В. Детекция генетического материала гаммагерпесвирусов в животноводческих хозяйствах Московской и Тверской области / А. В. Пчельников, С. П. Яцентюк – Текст : непосредственный // Ветеринария. – 2021. – № 7. – С. 22-26.
82. Пчельников, А. В. Эпизоотическая ситуация по ИРТ КРС на территории Московской и Тверской областей / А. В. Пчельников, С. П. Яцентюк – Текст: непосредственный // Ветеринария и кормление. – 2021. – № 2. – С. 38-41.
83. Разработка современных требований и правил мониторинга качества спермы быков производителей по эпизоотическим, генетическим и репродуктивным параметрам. – Текст : непосредственный: отчет о НИР (заключ.) / Всерос. госуд. центр. качес. и станд. лекарст. средств. для жив. и кормов; рук.

Борунова С.М.; исполн. Давыдова Е.Е., Яцентюк С.П., Солтынская И.В. [и др.]. – М. 2019. – 231 с. – № НИОКТР АААА-А16-116060710172-8.

84. Распространение микоплазмозов крупного рогатого скота на животноводческих фермах в российской федерации в период с 2015 по 2018 год / М. А. Алхуссен, А. А. Нестеров, В. В. Кирпиченко [и др.]. – Текст : непосредственный // Ветеринария сегодня. – 2020. – № 2 – С. 102-108.
85. Распространенность бактерий семейства Pasteurellaceae у крупного рогатого скота хозяйств Московской и Тверской областей / А.Д. Козлова, С.П. Яцентюк, Д. А. Рудняев [и др.]. – Текст : непосредственный // Ветеринария и кормление. – 2021. – № 4. – С. 32-35.
86. Распространенность бактерий семейства Pasteurellaceae у крупного рогатого скота в различных регионах российской федерации / Ю. И. Поболелова, С. П. Яцентюк, А. Д. Козлова [и др.]. – Текст : непосредственный // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2021. – № 5. – С. 18-25.
87. Решение Комиссии таможенного союза ЕврАзЭС от 18 июня 2010 г. № 317 “О применении ветеринарно-санитарных мер в таможенном союзе» – Текст : электронный // Информационно-правовой портал ГАРАНТ.РУ. – Москва, 2022 © ООО "НПП "ГАРАНТ-СЕРВИС". – URL : <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/12076813/> (дата обращения 10.03.2022).
88. Рудаков, Н. В. Лихорадка Ку: эколого-эпидемиологические аспекты: информационное письмо / Н. В. Рудаков, С. Ю. Зеликман, С. Н. Шпынов; ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора. – Омск: Издательский центр КАН, 2021. – 28 с. – Текст : непосредственный.
89. Рудняев, Д. А. Молекулярно-генетическая идентификация антибиотикорезистентных штаммов *Histophilus somni* и лечебные мероприятия при гистофилёзе крупного рогатого скота : дис. ... канд. ветеринар. наук 06.02.01 / Д. А. Рудняев. – Текст : непосредственный. – Москва, 2022. – 157 с.

90. Снетков, К. А. Идентификация возбудителей блютанга и эпизоотической геморрагической болезни оленей с помощью полимеразной цепной реакции: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.06: защищена 2003 / К. А. Снетков. – Покров, 2003. – 124 с. – Текст : непосредственный.
91. Скляр О.Д. Совершенствование системы контроля бруцеллеза животных в российской федерации по состоянию на 2022 год – Текст : непосредственный / О. Д. Скляр, А. Н. Иванова // Сборник материалов Международной научно-практической конференции. Экономически и социально значимые инфекции сельскохозяйственных животных: меры профилактики и борьбы. – Москва. – 2022. - С. 103-118.
92. Скрининговые исследования спермы быков в ПЦР для выявления патогенов / Е. А. Лазарева, А. Д. Козлова, М. С. Красникова [и др.]. – Текст : непосредственный // Ветеринария. – 2019. – № 10. – С. 42-47.
93. Совершенствование методики исследования спермы быков-производителей на инфицирование кампилобактериями : Диагностика, терапия и профилактика акушерско-гинекологической патологии у животных / В. Н. Родина, В. З. Бондаренко, В. Н. Козлов [и др.]. – Текст : непосредственный. – Москва, 1994. – С. 82-85.
94. Сравнительное исследование ПЦР-наборов для выявления ДНК вируса АЧС / М. С. Красникова, С. П. Яцентюк, М. Б. Брюсова [и др.]. – Текст : непосредственный // Ветеринария сегодня. – 2021. – № 3. – С. 209-215.
95. Сушкова, М. А. Микробиологические исследования свежеполученной спермы быков-производителей на племпредприятии / М. А. Сушкова, И. Я. Строганова, С. А. Счисленко. – Текст : непосредственный // Ветеринария сегодня. – 2022. – 11 (4). – С. 303-308.
96. Тимченко, Л. Д. Ку-лихорадка (коксиеллез) : ретроспектива и современное состояние вопроса : монография / Л.Д.Тимченко, Е. Л. Тинькова. - Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2007. – 264 с. – Текст : непосредственный.

97. Федотова, Т. А. Изучение биологических свойств бактерий вида *Pseudomonas stutzeri* / Т. А. Федотова, А. Г. Шестаков, Д. А. Васильев. – Текст : непосредственный // Вестник Ульяновской ГСХА. – 2019. – №3.
98. Челнокова, М. И. Вирус Шмалленберг - потенциальная угроза скотоводству России / М. И. Челнокова, А. Г. Шутенков, Ф. И. Сулейманов. – Текст : непосредственный // Известия Великолукской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. – №3. – С. 23-27.
99. Шуляк, Б.Ф. Руководство по бактериальным инфекциям собак. Грамположительные бактерии, молликуты и спирохеты / Б. Ф. Шуляк. – Москва : Олита, 2003. - Т.1. - 544 с. - ISBN 5-98040-011-7. – Текст : непосредственный.
100. Экологические особенности герпесвируса крупного рогатого скота 4 типа / А. В. Мищенко, В. В. Думова, В. А. Мищенко [и др.]. – Текст : непосредственный // Ветеринария Кубани. – 2013. – № 2. – С. 11-13.
101. Эрнст, Л. К. Характеристика региональных популяций быков производителей по генам наследственных заболеваний / Л. К. Эрнст, Е. А. Гладырь, П. В. Горелов [и др.] – Текст : непосредственный // Достижения науки и техники АПК. – 2011. - № 10. – С. 28-30.
102. Этиологическая структура лептоспироза животных в республике Саха (Якутия) / Л. П. Корякина, А. А. Никитина, А. И. Павлова. – Текст : непосредственный // Инновации и продовольственная безопасность. – 2021. – (1). – С. 106-112.
103. Ющенко, Н. Замораживание семени быка в гранулах жидким азотом /Н. Ющенко. – Текст : непосредственный // Пути интенсификации кормопроизводства и животноводства в центральном районе Нечерноземной зоны. – Москва, 1979. –С. 101-103.
104. С. П. Яцентюк, С. П. Изучение микробного состава криоконсервированной спермы быков / С. П. Яцентюк, А. В. Капустин. – Текст : непосредственный // Труды Всероссийского НИИ

- Экспериментальной Ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. – 2023. – № 83. – С. 161-164.
105. Яцентюк, С.П. Изучение метагенома спермы быков / С. П. Яцентюк. – Текст : непосредственный // Инновации и продовольственная безопасность. – 2023. – № 3 (41). – С. 31-39.
106. Яцентюк, С. П. Проблема контаминации спермы быков-производителей инфекционными агентами бактериальной и вирусной природы / С. П. Яцентюк, С. М. Борунова, Т. Н. Грязнева. – Текст : непосредственный // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2021. – № 9. – С. 26-30.
107. Яцентюк, С. П. Сравнительное изучение ПЦР-наборов для выявления РНК вируса гриппа А / С. П. Яцентюк, М. С. Красникова, М. Б. Брюсова. – Текст : непосредственный // Ветеринария. – 2021. – № 6. – С. 30-33.
108. Яцентюк, С. П. Альфагерпесвирусы BHV-1 и BHV-5 в криоконсервированной сперме быков– Текст : непосредственный / С. П. Яцентюк, А. В. Пчельников, М. С. Красникова // Сборник тезисов выступлений участников международной научно-практической конференции. – Казань. – 2022. - С. 103-118.
109. 16S rDNA and DGGE: a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species / L. McAuliffe, R. Ellis, J. Lawes [et al]. – Text : direct // *Journal of Medical Microbiology*. – 2005. – Vol. 54. P. 1-9.
110. A duplex real-time RT-PCR for the detection of bluetongue virus in bovine semen / T. Vanbinst, F. Vandebussche, E. Dernelle [et al]. – Text : direct // *J. Virol. Methods*. – 2010. – Vol. 169. – 162-168.
111. A field investigation of the effects of bovine viral diarrhoea virus infection around the time of insemination on the reproductive performance of cattle / M. R. McGowan, P. D. Kirkland, B. J. Rodwell. – Text : direct // *Theriogenology*. – 1993. – Vol.39. – 443-449.

112. A meta-analysis of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevalences in the global cattle population / B. Scharnbock, F. F. Roch, V. Richter [et al]. – Text : direct // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 8. – P.14420. – doi: 10.1038/s41598-018-32831-2.
113. A novel MHC-II targeted BVDV subunit vaccine induces a neutralizing immunological response in guinea pigs and cattle / A. Pecora, M. Acosta, J. M. Escribano [et al]. – Text : direct // *Transbound Emerg Dis.* – 2020. – doi: 10.1111/tbed.13952. Epub ahead of print. PMID: 33300298.
114. A novel rapid DNA microarray assay enables identification of 37 mycoplasma species and highlights multiple mycoplasma infections / C. Schnee, S. Schulsse, H. Hotzel [et al]. – Text : direct // *PLoS One.* –2012. – Vol.7. – P. e33237.
115. A PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism combination identifying the 3 primary *Mycoplasma* species causing mastitis / S. Boonyayatra, L. K. Fox, T. E. Besser [et al]. –Text : direct // *J Dairy Sci.* – 2012. – Vol.95(1). – P.196-205. – doi: 10.3168/jds.2011-4531 PMID: 22192198.
116. A polymerase chain reaction based method for detecting *Mycoplasma/Acholeplasma* contaminants in cell culture / J. Tang, M. Hu, S. Lee [et al]. – Text : direct // *J Microbiol Meth.* – 2000. – Vol.39(2). – P. 121-126.
117. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines / Clinton Jones, Shafiqul Chowdhury. – Text : electronic // *Animal Health Research Reviews.* – 2007. – Vol. 8 (2). – P. 187-205.
118. A study of the predominant genotypes of BHV-1 found in UK / S. Edwards, H. White, P. Nixon. – Text : direct // *Veterinary Microbiology.* – 1990. – Vol. 22. – P.213-223.
119. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses / B. Hoffmann, K. Depner, H.Schirrmeier [et al]. – Text : direct // *J. Virol. Methods.* – 2006. – Vol. 136. – P.200-209.

120. Achour, H.A. Serological and virological studies on the infectious bovine rhinotracheitis in Algeria / H.A. Achour, A.Moussa. – Text : direct// Zentralbl Veterinarmed B. -1996. - Vol.43. –P. 251-256.
121. Acquired resistance to the 16-membered macrolides tylosin and tilmicosin by *Mycoplasma bovis* / U. Lerner, E. Amram, R. D. Ayling [et al]. – Text : direct // Vet Microbiol. – 2014. – Vol.168(2-4). – P. 365-371. – doi: 10.1016/j.vetmic.2013.11.033.
122. Alegre, M. Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of bovine herpesvirus-1 and -5 / M. Alegre, M. Nanni, N. Fondevila. – Text : direct // J Vet Med B. – 2001. – Vol. 48. – P. 613-621.
123. Almquist, J. O. The effect of a combination of Penicillin and Streptomycin upon the livability and bacterial content of bovine semen / J. O. Almquist, P. J. Glantz, H. E. Shaffers. – Text : direct // J Dairy Sci. – 1949. – Vol.32(2). – P. 183-190. – [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(49\)92025-1](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(49)92025-1).
124. American College of Veterinary Internal, M. Control of bovine viral diarrhea virus in ruminants /P.H. Walz, D. L. Grooms, T. Passler. – Text : direct // J. Vet. Intern. Med. – 2010. – Vol.24. – P.476–486.
125. A new inactivated BVDV genotype I and II vaccine. An immunisation and challenge study with BVDV genotype I / M. Beer, H. R. Hehnen, A. Wolfmeyer [et al]. – Text : direct // Veterinary Microbiology. – 2000. – 77. – 195-208.
126. Amin, A. S. Comparison of polymerase chain reaction and cell culture for the detection of *Chlamydomphila* species in the semen of bulls, buffalo-bulls, and rams / A. S. Amin. – Text : direct // Vet J. – 2003. – Vol.166(1). – P. 86-92.
127. Amin, A. S. Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay / A. S. Amin, M. E. Hamdy, A. K. Ibrahim. – Text : direct // Vet Microbiol. – 2001. – Vol. 83(1). – P. 37-44. – doi: 10.1016/s0378-1135(01)00401-1.
128. 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]. – Text : direct // *Am J Vet Res.* – 1994. – Vol. 55(9). – P. 1206-1212.
129. A one-health review on brucellosis in the United States. / T. Pinn-Woodcock, E. Frye, C. Guarino, [et al]. – Text : direct // *J Am Vet Med Assoc.* –2023. – Vol. 1. –261(4). – P. 451-462. doi: 10.2460/javma.23.01.0033. PMID: 36862545.
130. An assessment of bovine herpes virus 4 as a causative agent in abortions and neonatal death. Onderstepoort / S. B. Dağalp, A. R. Babaoglu, F. J. Doğan [et al]. – Text : direct// *J Vet Res.* – 2020. – №87(1). – P. e1-e5. – doi:10.4102/ojvr.v87i1.1761.
131. Analytical sensitivity of assays used for detection of bovine viral diarrhoea virus in semen samples from the Southeastern United States / M. D. Givens, A. M. Heath, R. L. Carson [et al]. – Text : direct // *Vet Microbiol.* –2003. – Vol.96(2). – P. 145-155. – doi: 10.1016/s0378-1135(03)00213-x.
132. Andersen, A. A. Chlamydiosis / A. A. Andersen. – Text : direct // *Infectious Diseases of livestock* / J. A. W. Coetzer, R. C. Tustin (eds). – Oxford : Oxford University Press. – 2004. – P.550-564.
133. Angelakis, E. Q Fever /E. Angelakis, D. Raoult. - Text : direct // *Vet. Microbiol.* – 2010. – Vol.140. – P. 297-309.
134. Angen, Q. Development of a PCR test for identification of *Haemophilus somnus* in pure and mixed cultures / Q. Angen, P. Ahrens, C.Tegtmeier. – Text : direct // *Vet Microbiol.* – 1998. – Vol. 63. – P.39-48.
135. Angerholm, J. *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals-a critical review / J. Angerholm. – Text : direct // *Acta Veterinaria Scandinavica.* – 2013. –Vol. 55. – P.13.
136. Antimicrobial resistance and associated genetic background of *Histophilus somni* isolated from clinically affected and healthy cattle. / Y. Ueno, K. Suzuki, Y. Takamura [et al]. – Text : direct // *Front Vet Sci.* – 2022. – Vol. 25. – P. 104-266.
137. Antimicrobial susceptibilities of *Mycoplasma* isolated from bovine mastitis in Japan / K. Kawai, H. Higuchi, H. Iwano [et al]. – Text : direct // *Anim Sci J.* – 2014. – Vol. 85(1). – P. 96-99. – doi: 10.1111/asj.12144. Epub 2013 Nov 21.

138. Antimicrobial treatment of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections / D. Maes, F. Boyen, F. Haesebrouck [et al]. – Text : direct // *The Veterinary Journal*. – 2020. – P. 259-260. – doi: 10.1016/j.tvjl.2020.105474.
139. Animal and Plant Health Agency (APHA) [официальный сайт]. Text: electronic – 2021. – URL: <http://apha.defra.gov.uk/documents/bip/iin/bstc-1.pdf>, (дата обращения 25.10.2021)
140. Apoptotic and developmental effects of bovine herpesvirus type-5 infection on in vitro-produced bovine embryos / C. Silva-Frade, R. Gameiro, A. Martins [et al]. – Text : direct // *Theriogenology*. – 2010. – Vol.74. – P. 1296-1303.
141. Arbeitsgemeinschaft Deutscher Tierzüchter [официальный сайт]. Text: electronic – 2023. – URL: https://www.adt.de/services/files/allgemein/expla/SBV_paper_October_2018_V4.pdf (дата обращения 21.10.2021).
142. Artificial insemination encountered with *Haemophilus somnus* infection in cattle / N. Atyabi, P. Havarashti, M. Vojgani [et al]. – Text : direct // *Iran. J. Vet. Res.* – 2005. – Vol. 6(1). – P. 62-65.
143. Artificial insemination: A tool to improve livestock productivity / Gaurang kumar Patel, Nilufar Haque, Mahesh Madhavatar [et al]. – Text : direct// *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. – 2017. – №6. – P. 307-313.
144. Ashwani, K. Detection of serum antibodies to *Mycoplasma bovis* and *M. bovis genitalium* in mastitic cows and buffaloes by ELISA, indirect haemagglutination test and agar-gel-immunoprecipitation test /K. Ashwani, D. N. Garg, D.N. Kumar. – Text : direct // *Indian Veterinary Journal*. – 1996. – Vol. 73. – P. 603–606.
145. Aslan, M. E. Epidemiology and genetic characterization of BVDV, BHV-1, BHV-4, BHV-5 and *Brucella* spp. infections in cattle in Turkey / M. E. Aslan, A. K. Azkur, S. Gazyagci. – Text : direct // *Journal of Veterinary Medical Science*. – 2015. – Vol. 77 (11). – P. 1371-1377.
146. Assessment of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* molecular diagnosis using clinical samples of bulls / M. F. Silva, A. Duarte, G. Pereira [et al]. – Text :

- direct // BMC Vet Res. – 2020. – Vol. 16. – P.410. – <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02634-7>.
147. Association between *Coxiella burnetii* shedding in milk and subclinical mastitis in dairy cattle / J. Barlow, B. Rauch, F. Welcome [et al]. – Text : direct // Vet. Res. – 2008. – Vol. 39. – P. 7-9.
148. Association of clinical signs after acute Schmallenberg virus infection with milk production and fertility in Swiss dairy cows / I. Lechner, M. Wüthrich, M. Meylan [et al]. – Text : direct // Prev Vet Med. – 2017. – Vol.146. – P. 121-129.
149. Bachmann, N. L. Chlamydia genomics: providing novel insights into chlamydial biology / N. L. Bachmann, A. Polkinghorne, P. Timms. - Text : direct // Trends in microbiology. – 2014. – Vol. 22, № 8. – P. 464-472.
150. Bacterial communities in bovine ejaculates and their impact on the semen quality / M. Ďuračka, L. Belić, K. Tokárová K. [et al]. – Text : direct // Syst Biol Reprod Med. – 2021. – Vol. 67(6). – P. 438-449.
151. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality / S. L. Weng, C. M. Chiu, F. M. Lin [et al]. – Text : direct // PLoS One. – 2014. – Vol. – 23. – № 9 (10). – doi: 10.1371/journal.pone.0110152. PMID: 25340531; PMCID: PMC4207690.
152. Ball, H.J. Use of bovine sheath washings for screening for mycoplasmas / Ball, H.J. – Text : direct // Veterinary Record. – 1990. – Vol. – 127. – P. 16-17.
153. Barry, CE 3rd. Nucleoid condensation in *Escherichia Coli* that express a chlamydial histone homolog /C. E. 3rd Barry, S. F. Hayes, T. Hackstadt. - Text : direct// Science. - 1992. – Vol.256. – P. 377-379.
154. Bartha, A. Isolation of a bovine herpesvirus from calves with respiratory disease and keratoconjunctivitis / A. Bartha, M. Juhász, H. Liebermann. –Text : direct //Acta Vet. Acad. Sci. Hung. – 1966. – Vol. 16. – P. 357-358.
155. Bastida-Corcuera, F. D. Binding of bovine IgG2a and IgG2b allotypes to protein A, protein G, and *Haemophilus somnus* IgBPs / F. D. Bastida-Corcuera, K.

- H. Nielsen, L. B. Corbeil. – Text : direct // *Vet Immunol Immunopathol.* – 1999. – Vol. 71. – P.143-149.
156. Bauermann, F.V. HoBi-like viruses – the typical “atypical bovine pestivirus” / F. V. Bauermann, J. F. Ridpath. – Text : direct // *Animal Health Research Reviews.* – 2015. – Vol.16(1). – P. 64-69.
157. Baumgartner, B. Diagnostik und bekämpfung von mykoplasmen-mastitiden des rindes im westlichen teil des landes brandenburg – ein ruckblick. (Diagnosis and control of bovine mastitis caused by *Mycoplasma* spp. in the western region of Brandenburg – a retrospective study) / B. Baumgartner. – Text : direct// *Praktische-Tierarzt.* – 1999. – Vol. 80. – P. 896–898.
158. Beker, M. Integrative and Conjugative Elements (ICEs) in Pasteurellaceae Species and Their Detection by Multiplex PCR / M. Beker, S. Rose, C. A. Lykkebo, S. Douthwaite. – Text : direct // *Front Microbiol.* – 2018. – Vol. 26. – P. 13-29.
159. Bellows, D. S. Review: Cost of reproductive diseases and conditions in cattle / D. S. Bellows, S. L. Ott, R. A. Bellows. – Text : direct // *The Professional Animal Scientist.* – 2002. – Vol. 18(1). – P. 26-32. – doi: 10.15232/S1080-7446(15)31480-7.
160. Bennett, R. H. *Mycoplasma alkalescens*-induced arthritis in dairy calves / R. H. Bennett, D. E. Jasper. –Text : direct // *Journal of the American Veterinary Medical Association.* – 1978. – Vol. 172. – P. 484-488.
161. *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3: The Firmicutes* / P. Vos, G. Garrity, D Jones [et al]. – New York City : Springer Science, Business Media, 2011. – 1450 p. – Text : direct.
162. BICON Australian Biosecurity Import Conditions[официальный сайт]. Text: electronic – 2021. – URL: <https://bicon.agriculture.gov.au/BiconWeb4.0/ImportConditions/Search/> (дата обращения 25.10.2021).
163. Biochemical and immunological properties of *Coxiella burnetii* cell wall andpeptidoglycan-protein complex fractions / K. J. Amano, C. Williams, T. E. McCaul [et al]. - Text : direct // *J. Bacteriol.* – 1984. – Vol.160. – P.982-988.

164. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environment persistence and survival / L. McAuliffe, R. J. Ellis, K. Miles [et al]. – Text : direct // Microbiology. – 2006. – Vol. 152. – P. 913-922.
165. Biological and biochemical comparison of bovid herpesvirus-4 strains / J. Dubuisson, E. Thiry, F. Thalasso [et al]. – Text : direct // Vet. Microbiol. – 1988. – Vol. 16. – P.339-349.
166. Bitsch, V. Infectious bovine rhinotracheitis virus infection in bulls, with special reference to preputial infection / V. Bitsch. – Text : direct // Appl Microbiol. –1973. – Vol.26. – P. 337-343.
167. Blinded, controlled field trial of two commercially available Mycoplasma bovis bacterin vaccines in veal calves / M. K. Soehnen, A. Aydin, E.J. Lengerich [et al].– Text : direct // Vaccine. – 2011. – VOL. 29. – P. 5347–5354.
168. Blom, E. Mycoplasmas: Demonstration in semen and preputial washings from bulls /E. Blom, N. F. Friis. –Text : direct //Acta Vet Scand. – 1983. –Vol. 24. – P. 238-240.
169. Bluetongue disease reaches Switzerland. / M. Hofmann, C. Griot, V. Chaignat [et al]. – Text : direct // Schweiz Arch. Tierheilk. – 2008. – Vol.150. – P. 49-56. – doi: 10.1024/0036-7281.150.2.49.
170. Bluetongue serotype 2 and 9 modified live vaccine viruses as causative agents of abortion in livestock: a retrospective analysis in Italy / G. Savini, A. Lorusso, P. Alessio [et al]. – Text : direct // Transboundary and emerging diseases. – 2012. – Vol. 61. 10.1111/tbed.12004.
171. Bolin, S. R. Control of bovine viral diarrhoea infection by use of vaccination / S. R.Bolin. – Text : direct // Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. – 1995. – Vol. 11. – P.615-625.
172. Booth, P. J. Detection of bovine viral diarrhoea virus antigen and RNA in oviduct and granulosa cells of persistently infected cattle / P. J. Booth, D. A. Stevens, M. E. Collins, J. Brownlie. – Text : direct // Journal of Reproduction and Fertility. –1995. – Vol. 105. – P. 17-24.

173. Boughton, E. *Mycoplasma canadense* from bovine fetuses / E. Boughton, S. A. Hopper, P. J. Gayford. – Text : direct // *Vet Rec.* – 1983. – Vol. 22. P.87. – doi: 10.1136/vr.112.4.87-a. – PMID: 6829152.
174. Bovine alphaherpesvirus 1 and 5 in semen from bulls presenting genital lesions under field conditions in Brazil / P. F. Henzel, A. K. Salla, M. Mascitti [et al]. – Text : direct // *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* – 2019. – Vol.71, no.1. – P.197-203.
175. Bovine herpes virus infections in cattle / S. Nandi, M. Kumar, M. Manohar, R. S. Chauhan. – Text : electronic // *Animal health research reviews.* – 2009. – Vol. 10. – P. 85-98. – doi: 10.1017/S1466252309990028. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19558751/>.
176. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis / B. Muylkens, J. Thiry, P. Kirten [et al]. – Text : direct // *Veterinary Research.* – 2007. – Vol. 38. – P.181-209.
177. Bovine herpesvirus 4 in Parana State, Brazil : Case report, viral isolation, and molecular identification Brazilian / E. R. Kruger, T. R. Penha, D. Reginai [et al]. – Text : direct // *Journal of Microbiology.* – 2015. – Vol. 283. – P. 279-283.
178. Bovine herpesvirus 4-associated postpartum metritis in a Spanish dairy herd / A. Monge, L. Elvira, J. V. Gonzalez, S. Astiz. – Text : direct // *Research in Veterinary Science.* – 2006. – Vol. 80(1). – P. 120-125. – <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.04.001>.
179. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene / L. I. Gomes, M. A. Rocha, J. G. Souza [et al]. – Text : direct // *Vet. Res. Commun.* – 2003. – Vol. 27. – P. 495-504.
180. Bovine herpesvirus 6 in buffaloes (*Bubalus bulalis*) from the Amazon region, Brazil / C. H. de Oliveira, F. G. de Oliveira, M. R. Gasparini [et al]. – Text : direct // *Trop. Anim. Health Prod.* – 2015. – Vol.47(2). – P. 465-468.
181. Bovine herpesvirus type 4 (BHV-4) infection in relation to fertility in repeat breeder dairy cows / Kale, M., Ata, A., Kocamüftüoğlu, M. – Text : direct // *Acta veterinaria.* – 2011. – Vol. 61. – P. 13-19.

182. Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs / P. A. Esteves, F. R. Spilki, A. C. Franco [et al]. – Text : direct // *Vet. Rec.* –2003. – Vol.152(21). – P. 658-659.
183. Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) – a re-emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis / Suman Biswas, Samiran Bandyopadhyay, Umesh Dimri [et al]. – Text : direct // *Veterinary Quarterly.* – 2013. – Vol.33(2). – P. 68-81. – doi:10.1080/01652176.2013.799301.
184. Bovine herpesvirus-4 (BOHV-4) infection in cattle / E. Thiry, M. Bublot, J. Dubuisson [et al]. – Text : direct // *Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs* / G. Wittmann (ed.). – Boston, Mass : Kluwer, 1989. – P. 96–115.
185. Bovine lymphotropic herpesvirus in a UK dairy herd / S. P. Cobb, M. Banks, C. Russell [et al]. – Text : direct // *Vet Rec.* – 2006. –158(23). – P.807-808.
186. Bovine lymphotropic herpesvirus detected in Belgium / M. M. Garigliany, C. Bayrou, D. Cassart [et al]. – Text : direct // *Vet Rec.* – 2013. – Vol. 172. – P. 535-536.
187. Bovine Mastitis Disease. Pathogenicity: Evidence of the Potential Role of Microbial Biofilms / Gomes, F, Saavedra M. J., Henriques M. –Text : direct // *Pathogens and Disease.* – Tom Coenye – 2016. – Vol. 74(3).
188. OEC World [официальный сайт]. – 2023. – URL: <https://oec.world/en/profile/hs/bovine-semen> (дата обращения: 25.04.2023).
189. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in relation to fertility in heifers / M. Kale, S. Yavru, A. Ata [et al]. – Text : direct // *Journal of Veterinary Medical Science.* – 2011. – Vol. 73. – P. 331-336.
190. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis / S. R. Lanyon, F. I. Hill, M. P. Reichel [et al]. – Text : direct // *Veterinary Journal.* – 2014. – Vol. 199. – P. 201-209.
191. Bowen, R. A. Transmission of bluetongue virus by intrauterine inoculation or insemination of virus-containing bovine semen / R. A. Bowen, T. H. Howard. – Text : direct // *Am J Vet Res.* – 1984. – Vol. 45(7). – P.1386-1388.

192. Bowen, R. Seminal shedding of bluetongue virus in experimentally infected bulls /R. Bowen, T. Howard, B. Pickett [et al]. - Text : direct //Prog. Clin. Biol. Res. – 1985. – Vol.178. – P. 91-96.
193. Breckon, R.D. Bluetongue virus in bovine semen: viral isolation / R. D. Breckon, A.J. Luedke, T.E. Walton. - Text : direct // American journal of veterinary research. – 1980. – Vol. 41 (3). – P.439-442 .
194. Bretschneider, G. Haemophilus somnus: una revisión sobre su implicancia en el tracto reproductivo bovino / G. Bretschneider, A. Cipolla. – Text : direct // Therios. – 1999. – Vol. 28. – P. 251-260.
195. Brock, K. V. Embryo transfer from donor cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus / K. V. Brock, D. R. Lapin, D. R. Skrade. – Text : direct //Theriogenology. –1997. – Vol.47. – P. 837-844.
196. Brownlie, J. Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) – the bovine pestivirus / J. Brownlie, L. B. Hooper, I. Thompson, M. E. Collins. – Text : direct // Clinical and Diagnostic Virology. – 1998. – Vol. 10. – P.141-150.
197. Brucella Genomics: Macro and Micro Evolution / M. Suárez-Esquivel, E. Chaves-Olarte, E Moreno [et al]. - Text : direct // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol.21, no. 20. – P. 7749. - <https://doi.org/10.3390/ijms21207749>.
198. Bürki, S. Virulence, persistence and dissemination of Mycoplasma bovis /S. Bürki, J. Frey, P. Pilo – Text : direct// Veterinary Microbiology. – 2015. –Vol. 179(1-2). – P. 15-22. – doi: 10.1016/j.vetmic.2015.02.024.
199. Campylobacter fetus subspecies venerealis surface array protein from bovine isolates in Brazil / A.de Vargas, M. Costa, M. Vainstein [et al]. – Text : direct // Curr Microbiol. – 2002. – Vol. 45. – P. 111-114.–doi.org/10.1007/s00284-001-0090-9.
200. Campylobacter fetus subspecies: comparative genomics and prediction of potential virulence targets / A. Ali, S. C. Soares, A. R. Santos [et al]. – Text : direct // Gene. –2012. – Vol 25. –508(2). – P. 145-56. doi: 10.1016/j.gene.2012.07.070.

201. *Campylobacter infection in man and animals* / Jean Paul Butzler. – 1st ed. – Boca Raton, FL: CRC Press, 1984. – 256 p. – Text : direct.
202. Caswell, J.L. *Mycoplasma bovis pneumonia in cattle* /J.L. Caswell, M. Archambault. – Text : direct // *Animal Health Research Reviews*. – 2007. – Vol. 8(2). – P. 161-186. – doi: 10.1017/S1466252307001351.
203. Centers for Disease Control and Prevention [официальный сайт]. – 2023. – URL: <https://www.cdc.gov/qfever/stats/index.html> (дата обращения 16.06.2023).
204. Challacombe, J. F. *Comparative genomics of Pasteurellaceae* / J. F. Challacombe, T. J. Inzana. – Text : direct // *Pasteurellaceae: biology, genomics and molecular aspects* / P. Kuhnert, H. Chistensen (eds). – Norfolk : Caister Academic Press, 2008. – P.53-77.
205. *Changes in antimicrobial susceptibility of Mycoplasma bovis isolates from Great Britain* / R. D. Ayling, R. S. Rosales, G. Barden, F. L. Gosney. – Text : direct. // *Vet Rec*. – 2014. – Nov 15. – Vol. 175(19). – P. 486.
206. Chapter 9. *Herpesvirales*. – Text : direct // *Veterinary Virology* / Editor(s): N. James MacLachlan, Edward J. Dubovi Fenner's. – Fifth Edition). – Academic Press, 2017. – P. 189-216. – ISBN 9780128009468. – doi.org/10.1016/B978-0-12-800946-8.00009-X.
207. *Characterization and purification of recombinant bovine viral diarrhea virus particles with epitope-tagged envelope proteins* / A. Wegelt, I. Reimann, H. Granzow. – Text : direct// *J Gen Virol*. – 2011. – Vol.92. – P.1352–1357. – doi: 10.1099/vir.0. 029330-0.
208. *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, T. Tsuboi [et al]. – Text : direct // *The Journal of Veterinary Medical Science*. – 2006. –Vol.68(2). – P. 189–193. –<https://doi.org/10.1292/jvms.68.189>.
209. *Chladek, D. W. Bovine abortion associated with H. somnus* / D. W. Chladek. – Text : direct // *Am J Vet Res*. – 1975. – Vol.36. – P.1034.
210. *Chlamydia pan-genomic analysis reveals balance between host adaptation and selective pressure to genome reduction* / O. M. Sigalova, A. V. Chaplin, O. O.

- Bochkareva [et al]. - Text : direct // BMC Genomics. - 2020. - Vol.20. – P. 710. - <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6059-5>.
211. Chlamydial metabolism revisited: interspecies metabolic variability and developmental stage-specific physiologic activities / Anders Omsland, Barbara Susanne Sixt, Matthias Horn [et al]. - Text : direct // FEMS Microbiol Rev. – 2001. – Vol.38, no.4. – P. 779-801.
212. Chmielewski, T. Q fever at the turn of the century / T. Chmielewski, S. Tylewska-Wierzbanska. - Text : direct // Polish journal of microbiology. - 2012. – Vol.61(2). – P.81-93.
213. Clark, B. L. Review of bovine vibriosis / B. L. Clark. – Text : direct// Aust Vet J. – 1971. – Vol. 47. – P.103-107.
214. Claus, G. W. Haemophilus / G. W. Claus, Y. Rikihisa. – Text : direct // Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology / G. R. Carter (editor). – 3 rd ed. – Philadelphia : Lea & Febiger, 1986. – P.172-175.
215. Comparative Genome Analysis of *Campylobacter fetus* Subspecies Revealed Horizontally Acquired Genetic Elements Important for Virulence and Niche Specificity / S. Kienesberger, H. Sprenger, S. Wolfgruber [et al]. - Text : direct // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9(1). – P. e85491. - [doi:10.1371/journal.pone.0085491](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085491).
216. Comparison of culture and a multiplex probe PCR for identifying *Mycoplasma* species in bovine milk, semen and swab samples / A. M. Parker, J. K. House, M. S. Hazelton [et al]. – Text : direct // PLoS One. – 2017. – Vol. 12. – P. e0173422.
217. Comparison of Schmollenberg virus sequences isolated from mammal host and arthropod vector / J. Kesik-Maliszewska, A. Antos, J. Rola [et al]. – Text : direct// Virus Genes. – 2018. – Vol. 54(6). – P. 792-803.
218. Complete genome sequence of *Haemophilus somnus* (*Histophilus somni*) strain 129Pt and comparison to *Haemophilus ducreyi* 35000HP and *Haemophilus influenzae* RD / J. F. Challacombe, A. J. Duncan, T. S. Brettin [et al]. – Text : direct // J Bacteriol. – 2007. – Vol. 189. – P.1890-1898.

219. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii* / R. Seshadri, I. T. Paulsen, J. A. Eisen [et al]. - Text : direct // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2003. – Vol. 100(9). – P.5455-5460.
220. Control of bovine viral diarrhoea virus in ruminants / P. H. Walz, D. L. Grooms, T. Passler [et al]. – Text : direct // Journal of Veterinary Internal Medicine. – 2010. – Vol. 24. – P. 476-486.
221. Corbeil, L. B. Immunity to bovine reproductive infections / L. B. Corbeil, R. H. Bondurant. – Text : direct // Immunology. – 2001. – Vol. 17. –P. 567-583.
222. *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows / R. Guatteo, F. Beaudeau, A. Joly [et al]. – Text : direct // Vet Res. – 2007. – Vol.38. – P. 849-860.
223. *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States / S. G. Kim, E. H. Kim, C. J. Lafferty [et al]. – Text : direct // Emerg. Infect. Dis. – 2005. – Vol. 11. – P. 619-621.
224. Culture-positive persistence and serum agglutinating antibody response after intrauterine inoculation of *Haemophilus somnus* in virgin heifers / K. H. Hoblet, G. K. Haibel, J. J. Kowalski [et al]. – Text : direct // Am J Vet Res. – 1989. – Vol. 50. – P.1009-1014.
225. Davison, A. J. Herpesvirus systematics/ A. J. Davison. – Text : direct // Vet Microbiol. – 2010. – Vol.143(1). – P. 52-69.
226. Deas, D. W. The isolation and transmission of the virus of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis / D. W. Deas, W. S. Johnston. – Text : direct // Vet Rec. – 1973. – Vol. 92. – P. 636-639.
227. Dennett, D. P. Infectious bovine rhinotracheitis virus: studies on the venereal carrier status in range cattle / D. P. Dennett, J. O. Barasa, R. H. Johnson. – Text : direct // Res Vet Sci. – 1976. – Vol. 20. – P. 77-83.
228. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism / M. B. Heinemann, J. F. Garcia, C. M. Nunes [et al]. – Text : direct // Vet Microbiol. – 2000. – Vol. 73(4). – P.261-267.

229. Detection and differentiation of *Mycoplasma* species by rDNA PCR and DGGE fingerprinting / L. McAuliffe, R. Ellis, R. D. Ayling [et al]. – Text : direct // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2003. – Vol. 41. – P. 4844-4847.
230. Detection of a novel bovine lymphotropic herpesvirus / J. Rovnak, S. L. Quackenbush, R. A. Reyes [et al]. – Text : direct // *Journal of Virology*. – 1998. – Vol. 72. – P. 4237-4242.
231. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls / M. Oliveira, F. Campos, M. Dias [et al]. – Text : direct // *Theriogenology*. – 2011. – Vol. 75. – P. 1139-1145. – doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.025.
232. Detection of bovine herpesvirus 4 glycoprotein B and thymidine kinase DNA by PCR assays in bovine milk / G. J. Wellenberg, E. R. Verstraten, S. Belák [et al]. – Text : direct // *J Virol Methods*. – 2001. – Vol. 97(1-2). – P. 101-112. – doi: 10.1016/S0166-0934(01)00341-x.
233. Detection of bovine herpesvirus type 4 antibodies and bovine lymphotropic herpesvirus in New Zealand dairy cows / M/ W. de Boer, T. Zheng, B. M. Buddle, S. McDougall. – Text : direct // *N Z Vet J*. – 2014. – Vol. 62(6). – P. 351-355.
234. Detection of bovine viral diarrhea virus in bovine semen using nested-PCR / M. Daliri, S. Ghorashi, D. Morshedi [et al]. – Text : direct // *Iranian Journal of Biotechnology*. – 2007. – Vol. 5(1). – P. 48-51.
235. 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]. – Text : direct // *American Journal of Veterinary Research*. – 2003. – Vol. 64. – P. 428-434.
236. Detection of *Leptospira* and *Brucella* genomes in bovine semen using polymerase chain reaction / R. Vinodh, G. D. Raj, R. Govindarajan [et al]. – Text : direct // *Trop Anim Health Prod*. – 2008. – Vol. 40(5). – P. 323-329. – doi: 10.1007/s11250-007-9110-5.
237. Detection of bacterial pathogens from clinical specimens using conventional microbial culture and 16S metagenomics: a comparative study. / Abayasekara,

- L.M., Perera, J., Chandrasekharan, V. [et al]. – Text : direct // *BMC Infect Dis.* – 2017. – V.17. – P.631.
238. Detection of *Leptospira* spp. in the semen and urine of bulls serologically reactive to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo / F. Magajevski, R. Girio, L. Mathias [et al]. – Text : direct // *Brazilian Journal of Microbiology - BRAZ J MICROBIOL.* – 2005. – Vol. 36. – 10.1590/S1517-83822005000100009.
239. Detection of leptospire in bovine semen by polymerase chain reaction / M. B. Heinemann, J. F. Garcia, C. M. Nunes [et al]. – Text : direct // *Aust Vet J.* – 1999. – Vol. 77(1). – P. 32-34.
240. Detection of multiple *Mycoplasma* species in bulk tank milk samples using real-time PCR and conventional culture and comparison of test sensitivities / Anne Justice-Allen, J. Trujillo, Greg Goodell [et al]. – Text : direct // *Journal of dairy science.* – 2011. – Vol. 94. – P. 3411-3419. –10.3168/jds.2010-3940.
241. Detection of *Mycoplasma bovis* with an improved pcr assay / M. Tenk, A. Balint, L. Stipkovits [et al]. –Text : direct // *Acta Vet Hung.* – 2006. – Vol.54. – P. 427-435.
242. Detection of *Ureaplasma diversum* in bovine semen straws for artificial insemination / L. M. Marques, M. Buzinhani, R. L. Neto [et al]. – Text : direct // *Veterinary Record.* – 2009. – Vol. 165. – P.572-573.
243. Development and validation of a triplex realtime 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]. – Text : direct // *J. Virol. Methods.* – 2011. – Vol. 174 (1–2). – P.77-84.
244. Development of a pan-Simbu real-time reverse transcriptase PCR for the detection of Simbu serogroup viruses and comparison with SBV diagnostic PCR systems / Melina Fischer, Horst Schirrmeier, Kerstin Wernike [et al]. – Text : direct // *Virology journal.* – 2013. – Vol. 10. – P. 327. – 10.1186/1743-422X-10-327.
245. Development of an APC-targeted multivalent E2-based vaccine against Bovine Viral Diarrhea Virus types 1 and 2 / A. Pecora, D. A. Malacari, M. S. Perez

- Aguirreburualde [et al]. – Text : direct // *Vaccine*. – 2015. – Vol.33(39). – P. 5163-5171. – doi: 10.1016/j.vaccine.2015.07.106.
246. Dewey, K. J. Environmental survival of *Haemophilus somnus* and influence of secretions and excretions / K. J. Dewey, P. B. Little. – Text : direct // *Can J Comp Med*. – 1984. – Vol.48. – P. 23-26.
247. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella* / E. Jumas-Bilak, S. Michaux-Charachon, G. Bourg [et al]. - Text : direct // *Mol. Microbiol*. – 1998. – Vol.27. – P.99-106.
248. Diarrhea and loss of production on Dutch dairy farms caused by the Schmallenberg virus / J. Muskens, A.J.G. Smolenaars, Wim Poel [et al]. – Text : direct // *Tijdschrift voor diergeneeskunde*. – 2012. – Vol. 137. – P.112-115.
249. Direct identification of chlamydiae from clinical samples using a DNA microarray assay-A validation study / N. Borel, E. Kempf, H. Hotzel [et al]. – Text : direct // *Molecular and Cellular Probes*. – 2008. – Vol. 22. – P. 55-64.
250. Discovery of insertion element ISCfe1: a new tool for *Campylobacter fetus* subspecies differentiation / C. Abril, E. M. Vilei, I. Brodard [et al]. – Text : direct // *Clin. Microbiol. Infect*. – 2007. – Vol. 13. – P. 993-1000.
251. Distribution of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in the genital system tissues of cattle / I. Firat, S. Ak, H. H.Bozkurt [et al]. – Text : direct // *Veterinarski Arhiv*. –2002. – Vol. 72. – P.235-248.
252. Domman, D. Following the footsteps of chlamydial gene regulation / D. Domman, M. Horn. - Text : direct // *Molecular Biology and Evolution*. - 2015. – Vol. 32, no.12. – P.3035-3046.
253. Donofrio, G. A. Bovine macrophage cell line supports bovine herpesvirus 4 persistent infection / G. Donofrio, V. van Santen. – Text : direct // *J. Gen. Virol*.– 2001. – Vol. 82. – P.1181-1185.
254. Drolet, R. The role of bovine herpesvirus type-4 (DN 599) infection in Minnesota cattle / R. Drolet, R. Werdin, S. Goyal [et al]. – Text : direct // *Proceeding of the annual meeting of American Association of veterinary laboratory diagnosticians*. – 1986. –Vol. 29. – P. 335-346.

255. Dudek, K. Recent developments in vaccines for bovine mycoplasmoses caused by *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* / K. Dudek, E. Szacawa, N. Robin. – Text : direct // *Vaccine*. – 2021. –9(6). –549. – doi: 9.10.3390/vaccines9060549.
256. Eaglesome, M. D. A detection assay for *Campylobacter fetus* in bovine semen by restriction analysis of PCR amplified DNA / M. D. Eaglesome, M. I. Sampath, M. M. Garcia. – Text : direct // *Vet Res Commun*. – 1995. – Vol.19(4). – P. 253-263. – doi: 10.1007/BF01839307.
257. Eaglesome, M. D. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen / M. D. Eaglesome, M. M. Garcia // *Rev Sci Tech*. – 1997. – 16(1). P. 215-225. – doi: 10.20506/rst.16.1.1017. – PMID: 9329119.
258. Edwards, S. The virulence of British isolates of BHV-1 in relationship to viral genotype/ S. Edwards, R. H. Newman, H. White. – Text : direct // *British Veterinary Journal*. – 1991. – Vol. 47. – P. 216–231.
259. Effect of bovine viral diarrhoea virus on the ovarian functionality and in vitro reproductive performance of persistently infected heifers / E. A. Gonzalez Altamiranda, G. G. Kaiser, N. C. Mucci [et al]. – Text : direct // *Veterinary Microbiology*. –2013. – Vol. 165. – P. 326-332.
260. Effects of bluetongue virus infection on sperm quality in bulls: A preliminary report /U. Müller, K. Kemmerling, D. Straet [et al]. -Text : direct // *Vet. J*. – 2009. – Vol.186. – P.402-403.
261. Effects of bovine herpesvirus type 5 on development of in vitro produced bovine embryos / C. Silva-Frade, A Martins, Junior, A.C. Borsanelli [et al]. – Text : direct // *Theriogenology*. – 2010. – Vol.73. – P. 324-331.
262. Effects of bovine viral diarrhoea virus on the fertility of cows / S. Yavru, M. Kale, M. S. Gulay [et al]. – Text : direct // *Acta Veterinaria Hungarica*. – 2013. – Vol. 61. – P. 281-289.
263. Effects of *Campylobacter fetus* on bull sperm quality / C. I. Cagnoli, M. L. Chiapparrone, C. S. Cacciato [et al]. – Text : direct // *Microb Pathog*. – 2020. – Vol. 149. – P. 104-486.

264. Effects of infection with bovine virus diarrhoea virus on health and reproductive performance in 213 dairy herds in one county in Sweden / R. Niskanen, U. Emanuelson, J. Sundberg [et al]. –Text : direct // Preventive Veterinary Medicine. –1995. – Vol. 23. – P.229-237.
265. Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 5 ml French straws / M. M. Pace, J. J. Sullivan, F. I. Elliott [et al]. – Text : direct // Journal of Animal Science. – 1981. – Volume 53. – Issue 3. – P. 693-701.
266. Efficacy of bovine viral diarrhoea virus vaccination to prevent reproductive disease: a meta-analysis / B. W. Newcomer, P. H. Walz, M. D. Givens. – Text : direct // Theriogenology. – 2014. – Vol. 83. – P. 360-365.
267. Elliott, R. M. Molecular biology of the Bunyaviridae / R. M. Elliott. – Text : direct // J Gen Virol. – 1990. – Vol. 71(3). – P. 501-522.
268. 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 [et al]. – Text : direct // International Journal of Veterinary Science and Medicine. – 2020. –Vol. 8 (1). – P. 106-114.
269. Elwell, C. Chlamydia cell biology and pathogenesis / C. Elwell, K. Mirrashidi, J. Engel. - Text : direct// Nature Reviews Microbiology. – 2016. – Vol. 14, no.6. – P.385-400.
270. Environmental survival of *Mycoplasma bovis* on a white veal farm /R. Piccinini, F. Gosney, G.G.M. Snel [et al]. – Text : electronic // Vet. Rec. –2015. – URL:<http://dx.doi.org/10.1136/vetreccr-2015-000207>.
271. Epidemiologic analysis of *Mycoplasma* spp. isolated from bulk-tank milk samples obtained from dairy herds that were members of a milk cooperative / J. H. Kirk, K. Glenn, L. Ruiz [et al]. – Text : direct // Journal of the American Veterinary Medical Association. – 1997. – Vol. 211(8). – P.1036-1038.
272. Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of *Mycoplasma bovis* variable surface lipoproteins / K. Sachse, J.H.

- Helbig, I. Lysnyansky [et al]. – Text : direct // *Infection and Immunity*. – 2000. – Vol. 68(2). – P. 680-687. – doi: 10.1128/iai.68.2.680-687.2000.
273. Erno, H. Bovine mycoplasmas: Identification of 100 strains isolated from semen of bulls /H. Erno. –Text : direct // *Acta Vet Scand*. –1975. –Vol. 16. – P. 321-323.
274. Erno, H. Mycoplasmosis: Experimental and spontaneous infections of the genital tract of bulls / H. Erno, E. Blom. – Text : direct // *Acta Vet Scand*. – 1972. –Vol. 13. – P. 161-174.
275. Erythritol triggers expression of virulence traits in *Brucella melitensis* / Erik Petersen, Gireesh Rajashekara, Neelima Sanakkayala. – Text : direct // *Microbes and Infection*. – 2013. – Vol. 15 (6–7). – P. 440-449. – doi:10.1016/j.micinf.2013.02.002.
276. Establishment of a reverse genetics system for Schmollenberg virus, a newly emerged orthobunyavirus in Europe / R. M. Elliott, G. Blakqori, I. C. van Knippenberg [et al]. – Text : direct // *J Gen Virol*. – 2013. – Vol.94(4). – P. 851.
277. Establishment of conditions for the detection of bovine herpesvirus-1 by polymerase chain reaction using primers in the thymidine kinase region / C. V. Yason, L. M. Harris, P. K. McKenna. – Text : direct // *Can J Vet Res*. –1995. – Vol.59(2). – P. 94-101.
278. Estes, P. C. Histopathology of bovine vibriosis and the effects of *Vibrio fetus* extracts on the female genital tract / P. C. Estes, J. H. Bryner, P. A. O'Berry. – Text : direct // *The Cornell veterinarian*. – 1966. – Vol. 56. – P. 610-622.
279. European interlaboratory comparison of Schmollenberg virus (SBV) real-time RT-PCR detection in experimental and field samples: The method of extraction is critical for SBV RNA detection in semen / C. Schulz, W. H. van der Poel, C. Ponsart [et al]. – Text : direct // *J Vet Diagn Invest*. – 2015. – Vol.27(4). – P. 422-430.
280. Evaluation of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* real-time quantitative polymerase chain reaction for direct analysis of bovine preputial

- samples / B. Chaban, S. Chu, S. Hendrick [et al]. – Text : direct // Can J Vet Res. – 2012. – Vol. 76(3). – P. 166-173.
281. Evaluation of fetal protection against experimental infection with type 1 and type 2 bovine viral diarrhoea virus after vaccination of the dam with a bivalent modified-live virus vaccine / K. K. Fairbanks, C. L. Rinehart, W. C. Ohnesorge [et al]. – Text : direct // Journal of the American Veterinary Medical Association. – 2004. – Vol. 225. – P.1898-1904.
282. Evaluation of molecular assays for identification *Campylobacter fetus* species and subspecies and development of a *C. fetus* specific real-time PCR assay / L. Van der Graaf-Van Bloois, M. A. P. van Bergen, F. J. Van Der Wal[et al]. – Text : direct // J. Microbiol. Methods. – 2013. – Vol.95. – P. 93-97.
283. Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*: a collaborative trial / J. B. Bashiruddin, J. Frey, M. H. Königsson [et al]. – Text : direct // The Veterinary Journal. – 2005. – Vol. 169. – P. 268–275.
284. Evaluation of *eryC* as a molecular marker for the quantitative detection of *Brucella* spp. by real-time PCR in food samples / D. Rodríguez-Lázaro, L. López-Enríquez, A. A. Ocampo-Sosa [et al]. – Text : direct // Food Anal. Methods. – 2017. – Vol. 10. – P. 1148–1155. – <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0822-5>.
285. Evidence of excretion of Schmallenberg virus in bull semen / Claire Ponsart, Nathalie Pozzi, Emmanuel Breard [et al]. – Text : direct // Vet Res. – 2014. – Vol. 45 (1). – P.37. – doi: 10.1186/1297-9716-45-37.
286. Evidence of extensive renewed Schmallenberg virus circulation in Belgium during summer of 2016 — increase in arthrogryposis- hydranencephaly cases expected / C. Sohier, I. Deblauwe, T. VanLoo [et al]. – Text : direct// Transbound. Emerg. Dis. – 2017. – Vol. 64(4). – P. 1015-1019.
287. Evolutionary History of Contagious Bovine Pleuropneumonia Using Next Generation Sequencing of *Mycoplasma Mycoides* Subsp. *Mycoides* “Small Colony” / Virginie Dupuy 1, Lucía Manso-Silván, Valérie Barbe [et al]. – ,Text :

- direct // PLoS ONE. – 2012. – 7(10). – P. e46821. – doi: 10.1371/journal.pone.0046821.
288. Experimental abortion and the systemic immune response to *Haemophilus somnus* in cattle / P. R. Widders, L. Paisley, G. Gogolewski [et al]. – Text : direct // *Infect. Immun.* – 1986. – Vol. 54. – P. 555-560.
289. Experimental bovine uterine mycoplasmosis /H. A. Hartman, M. E. Tourtellotte, S. W. Nielsen [et al]. – Text : direct // *Research in Veterinary Science.* – 1964. – Vol. 5. – P. 303-310.
290. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes / N. Arricau Bouvery, A. Souriau, P. Lechopier [et al]. – Text : direct // *Veterinary research.* – 2003. – Vol.34(4). – P. 423-433. – doi: 10.1051/vetres:2003017.
291. Experimental genital infection of heifers with ureaplasmas / H. J. Ball, W. J. McCaughey, D. P. Mackie [et al]. – Text : direct // *Research in Veterinary Science.* –1981. – Vol. 30. – P. 312-317.
292. 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]. – Text : direct // *Vet Microbiol.* – 1989. –Vol. 21(2). – P. 97-114.
293. Experimental intrauterine inoculation of cows at oestrus with a bovine *Ureaplasma* strain / H. J. Ball, D.Armstrong,S.Kennedy [et al]. – Text : direct // *Irish Veterinary Journal.* –1987. – Vol.41. – 371-372.
294. Farstad, W. Outbreak of infectious granulomatous vaginitis in cattle caused by *Ureaplasma diversum*. / W. Farstad, A. Krogenæs, N. F. Friis – Text : direct // *Norsk Veterinærtidsskrift.* – 1996. – Vol. 108(3). – P. 159-164.
295. Favier, P. A. Role of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) in diseases of cattle. Recent findings on BoHV-5 association with genital disease / P. A. Favier, M. S. Marin, S. E. Pérez. – Text : direct // *Open Vet J.* – 2012. – Vol.2(1). – P. 46-53.
296. Feng Xue. Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes / Feng Xue, Jie Yan, Mathieu Picardeau. - Text : direct // *Microbes Infect.* – 2009. – Vol.11, № 3. – P. 328-333.

297. Firehammer, B. D. Bovine abortion due to *Haemophilus* species / B. D. Firehammer. – Text : direct // *J Am Vet Med Assoc.* – 1959. – Vol. 135. – P.421-422.
298. First report of bovine herpesvirus 5 in bull semen / Rodriguez Medina, Majela, Barrera, Maritz, Ramos [et al]. – Text : direct// *Archives of virology.* – 2012. – Vol.157. – P. 1775-1778.
299. Fish, N. A. The distribution of mycoplasmas and ureaplasmas in the genital tract of normal artificial insemination bulls /N. A. Fish, S. Rosendal, R. B. Miller. – Text : direct // *Can Vet.* – 1985. –Vol. 26. P. 13-15.
300. Florent, A. Les deux vibrioses génitales de la bête bovine : La vibriose vénérienne, due à *Vibrio foetus venerialis*, et la vibriose d'origine intestinale due à *V. foetus intestinalis* / Florent, A. –Text : direct // *Proceedings 10th International Veterinary Congress.* – 1959 – Madrid : [s.n.]. – Vol. 2. – P. 953-957.
301. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa / D. L. Garner, C. A. Thomas, H. W. Joerg [et al]. – Text: electronic // *Biol.Reprod.* – 1997. – Vol. 57(6). – P. 1401–1406. – doi: 10.1095/biolreprod57.6.1401. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9408246/>.
302. Fluoroquinolone resistance mechanism of clinical isolates and selected mutants of *Pasteurella multocida* from bovine respiratory disease in China / L. C. Kong, D. Gao, Y. H. Gao [et al]. – Text : direct // *J Vet Med Sci.* – 2014. – Vol. 76(12). – P.1655-1657.
303. Foote, R. H. Artificial insemination from its origins up to today / R. H. Foote ; V. Russo, S. Dall 'Olio ; L. Fontanesi [ed.]. – Reggio Emilia : Spallanzani Int. Symp., 1999. – PP. 23-67. – Text : direct.
304. Foote, R. H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables / R. H. Foote. – Text : direct // *J Anim Sci.* – 2002. – 80. – P.1-10.
305. Fray, M. D. Immunohistochemical evidence for the localization of bovine viral diarrhea virus, a single-stranded RNA virus, in ovarian oocytes in the cow / M. D. Fray, H. Prentice, M. C. Clarke, B.Charleston. – Text : direct // *Veterinary Pathology.* –1998. – Vol. 35. – P. 253-259.

306. Fray, M. D. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control / M. D. Fray, D. J. Paton, S. Alenius. – Text : direct // *Animal Reproduction Science*. – 2000. – Vol. 60–61. – P. 615-627.
307. Fredriksen, B. Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus / B. Fredriksen, C. M. Press, T. Loken, S. A. Odegaard. – Text : direct // *Veterinary Microbiology*. – 1999. – Vol.64. – P. 109-122.
308. Friis, N. F. Isolation of mycoplasmas from Danish cattle /N. F. Friis,H. V. Krogh –Text : direct // *Nord Vet Med*. – 1983. – Vol. 35. – P. 74-81.
309. Ftacek, P. Phase variation of *Coxiella burnetii* strain Priscilla: influence of this phenomenon on biochemical features of its lipopolysaccharide / P. Ftacek, L. Skultety, R. Toman. - Text : direct // *Journal of endotoxin research*. – 2000. – Vol.6(5). – P. 369-376.
310. Fulton, R. W. Bovine respiratory disease research (1983–2009) / R.W. Fulton. – Text : direct // *Anim Health Res Rev*. – 2009. – Vol.10(2). – P.131-139.
311. Fulton, R. W. Laboratory test descriptions for bovine respiratory disease diagnosis and their strengths and weaknesses: gold standards for diagnosis, do they exist? / R. W. Fulton, A. W. – Text : direct // *Confer. Can Vet J*. – 2012. – Vol. 53. – P. 754-761.
312. Gale, S. P. Kingscote B F: Failure of a seropositive bull to transmit *Leptospira interrogans* serovar Hardjo infection to heifers / S. P.Gale, B. F. Kingscote. - Text : direct // *J. Vet. Res*. – 1989. – Vol.30. – P.65-67.
313. Gap analysis of *Mycoplasma bovis* disease, diagnosis and control: An aid to identify future development requirements / M. J. Calcutt, I. Lysnyansky, K. Sachse [et al]. – Text : direct // *Transboundary and Emerging Diseases*.– 2018. –Vol. 65(1). – P. 91-109. – doi: 10.1111/tbed.12860.
314. Garg, D. N. Detection of mycoplasmal antibodies in bovines with reproductive disorders / D. N. Garg, P.K. Kapoor, Y. Singh. – Text : direct // *Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases*. – 1999. – Vol. 20. – P. 32-35.

315. Gautier-Bouchardon, A. V. Antimicrobial Resistance in *Mycoplasma* spp. / A. V. Gautier-Bouchardon A. V. – Text : direct // *Microbiol Spectr.* – 2018. – Jul. 6 (4). – doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0030-2018. – PMID: 30003864.
316. Genetic diversity and tetracycline resistance genes of *Histophilus somni* / G. H. D'Amours, T. I. Ward, M. R. Mulvey [et al]. – Text : direct // *Vet Microbiol.* – 2011. – Vol. 2. – P. 362-72.
317. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis / M. Picardeau, D. M. Bulach, C. Bouchier [et al]. - Text : direct // *PLoS ONE.* – 2008. – Vol.3, no.2. – P. e1607.
318. 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. Pérez [et al]. – Text : direct // *Vet. Microbiol.* – 2012. – Vol. 160. – P. 1-8.
319. Genomic comparisons of *Brucella* spp. and closely related bacteria using base compositional and proteome based methods / J. Bohlin, L. Snipen, A. Cloeckert [et al]. – Text : direct // *Bmc Evol. Biol.* – 2010. – Vol.10. – P. 249.
320. Gibbs, E. P. J. Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1 / E. P. J. Gibbs, M. M. Rweyemamu. – Text : direct // *Veterinary Bulletin.* – 1999. –Vol. 47. – P. 317-318.
321. Gilbert, R. O. An outbreak of granulomatous vulvitis in feedlot heifers. 1990 Mar;61(1):41-3. PMID: 2269990. / R. O. Gilbert, E.E. Oettlé. – Text : direct // *J S Afr Vet Assoc.* – 1990. – Vol. 61. – Issue 1. – P. 41-43.
322. Givens, M. D. Review: Risks of disease transmission through semen in cattle Animal / Givens M. D. – Text : direct // *An International Journal of Animal Bioscience.* – 2018. – Vol. 12. – P. 165-171.
323. Glazov, E.A. Characterization of microRNAs encoded by the bovine herpesvirus 1 genome / E.A. Glazov [et al.]. – Text : direct // *J. of Gen. Virol.* – 2010. – Vol. 91. – P.32-41.

324. 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 / David A Graham. – Text : electronic // *Ir Vet J.* – 2013. – Vol. 66 (1). – P. 15. – doi: 10.1186/2046-0481-66-15. – <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23916092/>.
325. Granulo-pustular vulvovaginitis (Jackal bite) an emerging disease: *Mycoplasma bovis* and *M. canadense* infection of dairy cattle in Israel / J. Brenner, I. Lysnyansky, D. Elad [et al]. – Text : direct // *Israel Journal of Veterinary Medicine.* – 2009. – Vol. 64(4). – P. 103-107.
326. Grooms, D. L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus *The Veterinary Clinics of North America* / D. L. Grooms. – Text : direct // *Food Animal Practice.* – 2004. – Vol. 20(1). – P. 5-19.
327. Gülmez Sağlam, A. *Coxiella burnetii* in samples from cattle herds and sheep flocks in the Kars region of Turkey / Aliye Gülmez Sağlam, Mitat Sahin. – Text : direct // *Veterinárni Medicína.* – 2016. – Vol. 61. – 17-22. – 10.17221/8678-VETMED.
328. *Haemophilus somnus* infection in the cow as a possible contributing factor to weak calf syndrome: isolation and animal inoculation studies / D. G. Waldhalm, R. F. Hall, W.A. Meinershagen [et al]. – Text : direct // *Am J Vet Res.* – 1974. – Vol. 35. – P.1401-1403.
329. Herd-level prevalence of selected endemic infectious diseases of dairy cows in Great Britain / M. Velasova, A. Damaso, B. C. Prakashbabu. – Text : direct // *Journal of Dairy Science.* – 2017. – Vol. 100. – P. 215-233.
330. Herpesvirus in infertile bull's testicle / E. Thiry, P.P. Pastoret, C. Dessy-Doise [et al]. – Text : electronic // *Vet Rec.* – 1981. – 109(19). – P. 426. – doi: 10.1136/vr.108.19.426.
331. High frequency of leptospiral vaginal carriers among slaughtered cows / A. P. Loureiro, C. Pestana, M. A. Medeiros [et al]. - Text : direct // *Anim Reprod Sci.* – 2017. – Vol.178. – P. 50–54. - doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.01.008.

332. High level of B19 strain detection in Brazilian cattle semen / M. P. S. Lourencetti, M.A. Souza, M.R. Ganda [et al]. – Text : direct // Trop Anim Health Prod. – 2018. – Vol. 50. – P. 433-439. – doi.org/10.1007/s11250-017-1455-9.
333. Hirth, R. S. Characterization and comparative genital tract pathogenicity of bovine mycoplasmas /R. S. Hirth, S. W. Nielsen, M. E. Tourtellotte. –Text : direct //Infect Immun. – 1970. – Vol. 2. – P. 101-104.
334. Hirth, R.S. Bovine Salpingo-oophoritis produced with semen containing a Mycoplasma / R. S. Hirth, S. W. Nielsen, W. N. Plastringe. – Text : direct //Path Vet. –1966. – P. 616-632.
335. Histophilus somni survives in bovine macrophages by interfering with phagosome-lysosome fusion but requires IbpA for optimal serum resistance / Y. Pan, Y. Tagawa, A. Champion [et al]. – Text : direct // Infect Immun. – 2018. – Vol. 86(12). – P. e00365-18.
336. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses / F. V. Bauermann, J. F. Ridpath, R. Weiblen [et al]. – Text : direct //J Vet Diagn Invest. – 2013. – Vol. 25. – P.6–15. – doi: 10.1177/1040638712473103.
337. Hoffmann, Bernd. First detection of Schmollenberg virus RNA in bovine semen, Germany, 2012 / Bernd Hoffmann, Claudia Schulz, Martin Beer. –Text : direct // Veterinary microbiology. – 2013. – Vol. 167 (3-4). – P. 289-295. – 10.1016/j.vetmic.2013.09.002.
338. Horizontal gene transfer in Histophilus somni and its role in evolution of pathogenic strain 2336, as determined by comparative genomic analyses / S. Siddaramappa, J. F. Challacombe, A. J. Duncan [et al]. – Text : direct // BMC Genom. – 2011. – Vol.12. – P.570.
339. Hosseinzadeh, S. PCR detection of Campylobacter fetus subspecies venerealis in smegma samples collected from dairy cattle in Fars / S. Hosseinzadeh, M. Kafi, M. Pour-Teimouri. – Text : direct // Iran. Vet Res Forum. – 2013. – Vol.4(4). – P. 227-231.

340. Houe, H. Survivorship of animals persistently infected with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) / H. Houe. – Text : direct // Preventive Veterinary Medicine. –1993. – Vol. 15. – P. 275-283.
341. How is Europe positioned for a re-emergence of Schmallenberg virus? / A. Stavrou, J. M. Daly, B. Maddison [et al]. – Text : direct // Vet J. – 2017. – Vol. 230. – P. 45-51.
342. Huismans, H. Identification of the serotype-specific and groupspecific antigens of bluetongue virus/ H. Huismans, B. J. Erasmus. – Text : direct // Onderstepoort J Vet Res . – 1981. – Vol. 48. – P. 51-58.
343. Identification and Differentiation of the Twenty Six Bluetongue Virus Serotypes by RT–PCR Amplification of the Serotype-Specific Genome Segment 2. / N. S. Maan, S. Maan, M. N. Belaganahalli [et al]. – Text : direct // PLoS ONE. –2012. –Vol. 7(2). – P. e32601. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032601>.
344. Identification of Bull Semen Microbiome by 16S Sequencing and Possible Relationships with Fertility / A. Cojkic, A. Niazi, Y. Guo [et al]. – Text : direct. // Microorganisms. – 2021. – Vol. 25. – № 9(12). – P. 24-31.
345. Identification of *Mycoplasma bovirhinis* and *Mycoplasma canadense* from outbreaks of granulopapular vulvovaginitis in dairy cattle in Israel / I. Lysnyansky, J. Brenner, M. Bernstein [et al]. – Text : direct // Veterinary Record. – 2009. – Vol. 165(11). –P. 319-322. – doi: 10.1136/vr.165.11.319.
346. Immunogenicity evaluation of recombinant *Lactobacillus casei* W56 expressing bovine viral diarrhoea virus E2 protein in conjunction with cholera toxin B subunit as an adjuvant / S. Jia, X. Huang, H. Li [et al]. – Text : direct // Microb Cell Fact. – 2020. –Vol. 19. – P. 186. – doi: 10.1186/s12934-020-01449-3/.
347. In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma alkalescens* and *Mycoplasma bovirhinis* by PCR /H. Kobayashi, K. Hirose, A. Worarach. –Text : direct // Journal of Veterinary Medical Science. – 1998. – Vol. 60. – P. 1299–1303.

348. In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolated in Israel from local and imported cattle / I. Gerchman, S. Levisohn, I. Mikula [et al]. – Text : direct // *Vet Microbiol.* – 2009. – Vol. 137(3-4). – P. 268-275.
349. In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* clinical isolates recovered from bison (*Bison bison*) / M. Suleman, T. Prysliak, C. Windeyer. – Text : direct // *Can J Microbiol.* – 2016. – Vol.62. – P. 272-278.
350. Increase in the occurrence of abortions associated with exposure to the Bluetongue virus serotype 8 in naïve dairy herds / Simon Nusinovici, Henri Seegers, Alain Joly [et al]. – Text : direct // *Theriogenology.* – 2012. – Vol. 78. – P. 1140-1151. - 10.1016/j.theriogenology.2012.05.010.
351. Infectious meningo-encephalitis in cattle, caused by a *Haemophilus*-like organism / P. C. Kennedy, E. L. Biberstein, J. A. Howarth [et al]. – Text : direct // *Am J Vet Res.* – 1960. – Vol. 21. – P. 403-409.
352. Infectious Schmallenberg virus from bovine semen, Germany / C. Schulz, K. Wernike, M. Beer, B. Hoffmann. – Text : electronic// *Emerg Infect Dis.* – 2014. – Vol. 20(2). – P.338-340. – doi: 10.3201/eid2002.131436.– URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24447824/>.
353. Infectivity of pestivirus following persistence of acute infection / M. E. Collins, J. Heaney, C. J. Thomas [et al]. – Text : direct// *Veterinary Microbiology.* – 2009. – Vol. 138. – P. 289-296.
354. Infertility and venereal disease in cattle inseminated with semen containing bovine herpesvirus type 5 / P. D. Kirkland, A. I. Poynting, X. Gu [et al]. – Text : direct // *Vet. Rec.* – 2009. – Vol. 165. – P. 111-113.
355. Inhibition of bovine sperm-zona binding by bovine herpesvirus-1 / S. Tanghe, G. Vanroose, A. Van Soom. – Text : direct // *Reproduction.* – 2005. – Vol. 130. – P. 251-259.
356. Insemination of cattle with semen from a bull transiently infected with pestivirus / P. D. Kirkland, M. R. McGowan, S. G. Mackintosh [et al]. – Text : direct // *Vet Rec.* – 1997. – Vol.140. – P. 124-127.

357. Integrative Conjugative Element ICEHs1 Encodes for Antimicrobial Resistance and Metal Tolerance in *Histophilus somni* / K. Bhatt, E. Timsit, N. Rawlyk [et al]. – Text : direct // *Front Vet Sci.* – 2018. – Vol. 10. – P. 153.
358. Interaction of different *Chlamydiae* species with bovine spermatozoa / Thomas Eckert, Sandra Goericke-Pesch, Carsten Heydel [et al]. – Text : direct // *BMC Microbiology.* – 2019. – Vol. 19. – 10.1186/s12866-019-1392-z.
359. Interrogating the bovine reproductive tract metagenomes using culture-independent approaches: a systematic review / C. T. Ong, C. Turni, P. J. Blackall [et al]. – Text : direct // *Anim Microbiome.* – 2021. – Vol. 9. P. 41. – doi: 10.1186/s42523-021-00106-3. – PMID: 34108039. – PMCID: PMC8191003.
360. 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. – Text : direct // *Veterinary Microbiology.* – 2004. – Vol. 98. — P. 185-196.
361. Investigation of *Campylobacter fetus* in breeding bulls of private farms in Bangladesh / N. Hoque, S. S. Islam, M. J. I. Saddam [et al]. – Text : direct // *Vet Med Sci.* – 2023. – Vol. 9(1). – P. 417-428.
362. Investigation of *Chlamydiaceae* in semen and cauda epididymidis and seroprevalence of *Chlamydophila abortus* in breeding bulls / A. C. Karlsson, S. Alenius, C. Björkman [et al]. – Text : direct // *Acta Vet Scand.* – 2010. – Vol.52(1). – P.2. – doi: 10.1186/1751-0147-52-2.
363. Investigation of postpartum dairy cows' uterine microbial diversity using metagenomic pyrosequencing of the 16S rRNA gene / V. S. Machado, G. Oikonomou, M. L. Bicalho [et al]. – Text : direct. // *Vet Microbiol.* – 2012. – Vol.159. – P. 460-469.
364. In-Vitro Amplification of the 16s Ribosomal-RNA Genes from *Mycoplasma-Bovis* and *Mycoplasma-Agalactiae* by Pcr / Y. R. C. Gonzalez, C. R. Bascunana, G. Bolske [er al]. – Text : direct // *Vet Microbiol.* – 1995. – Vol. 47(1-2). – P.183-190.

365. Inzana, T. J. Development of a defined medium for *Haemophilus somnus* isolated from cattle / T.J. Inzana, L. B. Corbeil. – Text : direct // *Am J Vet Res.* – 1987. – Vol. 48. – P.366-369.
366. Irons, P. C. Excretion of lumpy skin disease virus in bull semen. / P. C. Irons, E. S. Tuppurainen, E. H. Venter – Text : direct // *Theriogenology.* – 2005. –Vol. 15. –63(5). –P. 1290-1297.
367. Isolation of bovine herpesvirus type 5 from the semen of a healthy bull in Australia / I. S. Diallo, G. R. Hewitson, J. Hoad [et al]. – Text : direct // *Aust. Vet. J.* – 2010. – Vol. 88. – P.93-95.
368. Isolation of *Brucella* and its quantification in semen by real time PCR / A. N. Kanani, L. Jain, B. Bhanderi [et al]. – Text : direct // *Indian journal of comparative microbiology immunology and infectious disease.* – 2009. – Vol. 30. – P. 101-104.
369. Isolation of *Mycoplasma bovis* from the brain tissue of calves /R. D. Ayling, R. A. J. Nicholas, J. Wessells [et al]. – Text : direct // *Veterinary Record.* – 2005. – Vol. 156. – P. 391–392.
370. Ivan R. Tizard. Chapter 16. Bovine vaccines / Ivan R. Tizard. – Text : direct // *Vaccines for Veterinarians* / Editor(s): Ian R. Tizard. – Isevier, 2021. – P. 193-214. – doi.org/10.1016/B978-0-323-68299-2.00025-3.
371. Jackson, G. A mild outbreak of bovine mastitis associated with *Mycoplasma bovis* /G. Jackson, E. Boughton. – Text : direct// *Veterinary Record.* – 1991. – Vol. 129. – P. 444–446.
372. Jain, U. PCR based detection of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical specimens / U. Jain, A. K. Verma, B. C. Pal. – Text : direct // *The Indian Veterinary Journal.* – 2012. – Vol. 89. – P. 61-63.
373. Janey, L. Chapter 125. Feedlot Vaccination Protocols / Janey L. Gordon, U. Daniel. – Text : direct // *Food Animal Practice* / Editor(s): David E. Anderson, D. Michael Rings. – Fifth Edition. – W.B. Saunders, 2009. – P. 652-658. – doi.org/10.1016/B978-141603591-6.10125-3.

374. Jasper, D.E. Bovine mycoplasma mastitis / D.E. Jasper. – Text : direct //Advances in Veterinary Science. –1981. – Vol.25. – P.121-159.
375. Jasper, D. E. Epidemiologic observations on mycoplasma mastitis /D. E. Jasper, J. M. Al-Aubaidi. – Text : direct //Cornell Vet. –1974. – Vol. 64. –P. 407-415.
376. Joya, M. Infectious agents affecting fertility of bulls, and transmission risk through semen: Retrospective analysis of their sanitary status in Colombia / M. Joya, A. Gongora, C. Jimenez. – Text : direct // Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. – 2010. – Vol. 24. – P. 623-633.
377. Kalaycioglu, A. T. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) diversity and vaccination: A review / A. T. Kalaycioglu. – Text : direct //The Veterinary quarterly. – 2007. – Vol. 29. – P. 60-67. – 10.1080/01652176.2007.9695228.
378. Kaltenboeck, B. Bovine Chlamydia spp. infection: Do we underestimate the impact on fertility? / B. Kaltenboeck, H. R. Hehnen, A. Vaglenov. – Text : direct // Veterinary Research Communications. – 2005. – Vol. 29. – P.1-15.
379. Kaltenboeck, B. Evidence of numerous omp1 alleles of porcine Chlamydia trachomatis and novel Chlamydia species obtained by PCR / B. Kaltenboeck, N. Schmeer, R. Schneider. – Text : direct // J. Clin. Microbiol. – 1997. –Vol.35. – P. 1835-1841.
380. Kapoor, P. K. Isolation of Mycoplasma subsp. mycoides (LC variant, Y-goat) from naturally aborted bovine fetuses / P. K. Kapoor, D. N. Garg, S. K. Mahajan. – Text : direct // Theriogenology. – 1989. – Vol.32. – P. 683-691.
381. Kastelic, J. P. Male involvement in fertility and factors affecting semen quality in bulls / J. P. Kastelic. – Text : direct // Animal Frontiers. –2013. – Vol. 3(4). – P. 20–25. – doi: 10.2527/af.2013-0029.
382. Kendrick, J. W. The effect of artificial insemination with semen contaminated with IBR-IPV virus / J. W. Kendrick, K. McEntee. – Text : direct //Cornell Vet. – 1967. – Vol. 57. – P. 3-11.
383. Kennedy, M. Veterinary microbiology / M. A. Kennedy; M. M. Chengappa; D. Scott McVey. –3rd ed. – Wiley-Blackwell, 2013. – 656 p. – Text : direct.

384. Khamesipour, Faham. Molecular Detection of *Brucella* spp. in the Semen, Testis and Blood Samples of Cattle and Sheep / Faham Khamesipour, Abbas Doosti, Hamed Taheri. –Text : direct // *Journal of Pure and Applied Microbiology*. – 2013. – Vol. 7. – P. 495-500.
385. Khan, L. A. Hydrogen peroxide production by *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* and effect of in vitro passage on a *Mycoplasma bovis* strain producing high levels of H₂O₂ / L. A. Khan, R. J. Miles, R. A. J. Nicholas. – Text : direct//*Veterinary Research Communications*. – 2005. –Vol. 29(3). –P. 181-188. – doi: 10.1023/b:verc.0000047506.04096.06.
386. King, S. The prevalence of leptospirosis in cattle herds of the Western Division of New South Wales – a serological survey / S. King. – Text : direct // *Aust Vet J*. – 1991. – Vol. 68(9). – P. 307-308. – doi: 10.1111/j.1751-0813.1991.tb03267.x. – PMID: 1953566.
387. Kirkbride, C. A. *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, and *Acholeplasma* infections of bovine genitalia /C. A. Kirkbride. –Text : direct // *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. – 1987. – Vol. 3(3). – P. 575-91. – doi: 10.1016/s0749-0720(15)31131-2.
388. Kirkland, P. D. A comparison of laboratory and “wild” strains of bluetongue virus – is there any difference and does it matter? / P. D. Kirkland, R. A. Hawkes. – Text : direct// *Vet Ital*. – 2004. – Vol. 40. – P. 448-455.
389. Kirkland, P. D. Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections / P. D. Kirkland, S. G. Richards, J. T. Rothwell, D. F. Stanley. – Text : direct // *Veterinary Record*. –1991. – Vol. 128. – P. 587-590.
390. 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. – Text : direct // *Veterinary Record*. – 1994. – Vol. 135. – P. 527-529.
391. Kishimoto, R. A. Q fever: diagnosis, therapy, and immunoprophylaxis / R. A. Kishimoto, R. Wtockman, C. L. Redmond. – Text : direct // *Military medicine*. - 1979. – Vol.144(3). – P.183-187.

392. Kokotovic, B. *Mycoplasma alkalescens* demonstrated in the bronchial lavage of cattle in Denmark / B. Kokotovic, N. F. Friis, P. Ahrens. – Text : direct // *Acta Veterinaria Scandinavica*. – 2007. – Vol. 49. – P. 2.
393. Kommisrud, E. Bovine virus diarrhoea virus in semen from acutely infected bulls / E. Kommisrud, T. Vatn, J. R. Lang-Ree, T. Loken. – Text : direct // *Acta Veterinaria Scandinavica*. – 1996. – Vol. 37. – P. 41-47.
394. Koziol, J. H. Composition and diversity of the seminal microbiota in bulls and its association with semen parameters / J. Koziol, T. Sheets, C. L. Wickware, T. A. Johnson. – Text : direct // *Theriogenology*. – 2022. – Vol. 1. – P. 17-25.
395. Kruszewska, D. Isolation of *Coxiella burnetii* from bull semen / D. Kruszewska, S. Tylewska-Wierzbanowska. – Text : direct // *Research in veterinary science*. – 1997. – Vol. 62(3). – P. 299-300.
396. Kubiś, P. Comparison of nested PCR and qPCR for the detection and quantitation of BoHV6 DNA / P. Kubiś, M. Materniak, J. J. Kuźmak. – Tekst: bezpośredni // *Viol. Meth.* – 2013. – Vol. 194. – P. 94-101.
397. Kumar, A. *Mycoplasma bovis*, a multi disease producing pathogen: an overview / A. Kumar, A. K. Verma, A. Rahal. – Text : direct // *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. – 2011. – Vol. 6(6). – P.537-546. – doi: 10.3923/ajava.2011.537.546.
398. Kuo, C. Family I. Chlamydiaceae / C. Kuo, R. Stephens. – Text : direct // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / B. William Whitman (editors). – 2nd ed. – New York : Springer Science/ Business Media, 2011. – P. 845.
399. Kwiecien, J. M. Isolation of pathogenic strains of *Haemophilus somnus* from the female bovine respiratory tract / J. M. Kwiecien, P. B. Little. – Text : direct // *Can J Vet Res*. – 1992. – Vol. 56. – P.127-134.
400. 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]. – Text : direct // *Veterinary Microbiology*. – 2014. – Vol. 170. – P. 246-257.

401. Large scale assessment of the effect associated with bovine viral diarrhoea virus infection on fertility of dairy cows in 6149 dairy herds in Brittany (Western France) / A. Robert, F. Beaudeau, H. Seegers [et al]. –Text : direct // *Theriogenology*. – 2004. – Vol. 61. – P. 117-127.
402. Larsson, B. Natural infection with bovine virus diarrhoea virus in a dairy herd: a spectrum of symptoms including early reproductive failure and retained placenta / B. Larsson, R. Niskanen, S. Alenius. – Text : direct // *Animal Reproduction Science*. –1994. – Vol. 36. – P. 37-48.
403. Laureyns, J. Control of bovine virus diarrhoea at the herd level: reducing the risk of false negatives in the detection of persistently infected cattle / J. Laureyns, S. Ribbens, A. de Kruif. – Text : direct // *Veterinary Journal*. – 2010. – Vol. 184. – P. 21-26.
404. Le Mouël, C. How can we feed the world in 2050? A review of the responses from global scenario studies / C. Le Mouël, A. Forslund. – Text : direct // *European Review of Agricultural Economics*. – 2017. – Vol. 44(4). – P. 541-591.
405. Lein, D. H. The current role of *Ureaplasma*, *Mycoplasma*, and *Haemophilus somnus* in bovine reproductive disorders:in Proceedings of the 11th Technical Conference on AI and Reproduction / D. H. Lein. – Text : direct// *National Association of Animal Breeders*. – 1986. – P. 27-32.
406. Leptospirosis: Rising Nuisance for Cattle and Threat to Public Health / Muhammad Fakhar Kulyar, Fakhar Muhammad, Amjad Aqib [et al]. –2018. - DOI:10.5772/intechopen.82211. – Text : electronic.
407. Levett, P. N. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae Minutes of the closed meeting, 10 July 2019, Vancouver, British Columbia, Canada / P. N. Levett, M.Picardeau. - Text : direct // *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2021. – Vol. 71(8). – P. 5002. - doi: 10.1099/ijsem.0.005002.
408. Lindberg, A. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control /A. Lindberg, H. Houe. – Text : direct // *Preventive Veterinary Medicine*. – 2005. – Vol. 72. – P. 55-73.

409. Longbottom, D. Animal chlamydioses and zoonotic implications / D. Longbottom, L. J. Coulter. – Text : direct // *J Comp Pathol.* – 2003. – Vol. 128. – P. 217-44.
410. Ludwig, H. Bovine herpesviruses / H. Ludwig. – Text : direct // *The herpesviruses. Vol. 2* / B. Roizman (ed.). – New York : Plenum Press, 1983. – P. 135-214.
411. Luedke, A. J. Detection of Bluetongue Virus in Bovine Semen / A. J. Luedke, T. E. Walton, R.H. Jones. - Text : direct // *Proc. Wld. Vet. Cong.* – 1975. – Vol.20. – P.2039- 2041.
412. Luedke, A. J. Effects of Natural Breeding of Heifers Using a Bluetongue Carrier Bull / A. J. Luedke, T. E. Walton. - Text : direct // *Abstract. Proc. Conf. Res. Workers in Animal Disease.* – 1978. – Vol. 59. – P. 109.
413. Mackie, D.P. Isolation of *Mycoplasma californicum* from an outbreak of bovine mastitis and the experimental reproduction of the disease / D. P. Mackie, H. J. Ball, E. F. Logan. – Text : direct // *Veterinary Record.* – 1982. – Vol. 110(25). – P. 578-580. – doi: 10.1136/vr.110.25.578.
414. MacLaren, A. P. Infertility in cattle in south-west Scotland caused by an 'intermediate' strain of *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* (formerly *Campylobacter fetus intestinalis*) / A. P. MacLaren, G. J. Agumbah. – Text : direct// *Br Vet J.* – 1988. – Vol.144(1). – P. 29-44. – doi: 10.1016/0007-1935(88)90150-9. PMID: 3345413.
415. Malignant catarrhal fever: polymerase chain reaction survey for ovine herpesvirus 2 and other persistant herpesvirus and retrovirus infections of dairy cattle and bison / J. K. Collins, C. Bruns, T. L. Vermedahl, A. L. Schiebel [et al]. – Text : direct // *J Vet Diagn Invest.* – 2000. – Vol. 12. – P. 406-411.
416. Mammary lesions associated with bovine herpesvirus Type 4 in a cow with clinical mastitis / H. Miyano, M. Haritani, H. Sentsui, T. Tsuboi [et al]. – Text : direct // *The Journal of Veterinary Medical Science.* – 2004. – Vol. 66(4). – P. 457–460. – <https://doi.org/10.1292/jvms.66.457>.

417. Markers for the molecular diagnosis of brucellosis in animals / V. K. Gupta, S. Nayakwadi, A. Kumar [et al]. – Text : direct // *Adv. Anim. Vet. Sci.* – 2014. – Vol. 2 (3S). – P. 31-39.
418. Markey, B. Cullinane *Haemophilus* and *Histophilus* species / B. Markey, L. Finola, M. Archambault. – Text : direct // *Clinical Veterinary Microbiology.* – 2013. – P. 349-354.
419. Mastitis and abortion in dairy cattle associated with *Leptospira* of the serotype hardjo /R. J. Higgins, J. F. Harbourne, T. W. Little. - Text : direct// *Vet Rec.* – 1980. – Vol.1107(13). – P.307-310. - doi: 10.1136/vr.107.13.307. PMID: 7210429.
420. Mastitis, polyarthritis and abortion caused by *Mycoplasma* species bovine group 7 in dairy cattle / S. Hum, A. Kessell, S. Djordjevic [et al]. – Text : direct // *Aust Vet J.* – 2000. – Vol.78(11). – P. 744-750. – doi: 10.1111/j.1751-0813.2000.tb10444.x. PMID: 11194719.
421. Maunsell, F.P. *Mycoplasma bovis* infections in young calves /F.P. Maunsel, G.A Donovan. – Text : direct // *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* – 2009. –Vol. 25(1). – P. 139-177. – doi: 10.1016/J.CVFA.2008.10.011.
422. Maurin, M. Q fever / M. Maurin, D. Raoult. - Text : direct // *Clinical microbiology reviews.* – 1999. – Vol.12(4). – P. 518-553.
423. McCaul, T. F. Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations / T. F. McCaul, J. C. Williams. - Text : direct // *Journal of bacteriology.* - 1981. – Vol.147(3). – P.1063-1076.
424. McGowan, M. R. Early reproductive loss due to bovine pestivirus infection / M. R. McGowan, P. D. Kirkland. – Text : direct // *British Veterinary Journal.* – 1995. – Vol. 151. – P.263-270.
425. McGowan, M. R. Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination / M. R. McGowan, P. D. Kirkland, S. G. Richards. – Text : direct // *Veterinary Record.* –1993. – Vol.133. – P. 39-43.

426. McNutt, S. H. Sporadic bovine encephalomyelitis // S. H. McNutt, E. F. Waller. – Text : direct // *The Cornell Veterinarian*. – 1940. – Vol. 30. – P.437-448.
427. Mechanisms of infertility in genital tract infections due to *Chlamydia psittaci* transmitted through contaminated semen / R. A. Bowen, P. Spears, J. Storz [et al]. – Text : direct // *Journal of Infectious Diseases*. –1978. – Vol.138. – P. 95-98.
428. Merwe, J. van der. Invasion of bovine peripheral blood mononuclear cells and erythrocytes by *Mycoplasma bovis* / J. van der Merwe, T. Prysliak, J. Perez-Casal. –Text : direct// *Infection and Immunity*.– 2010. – Vol. 78(11). – P. 4570-4578. –doi:10.1128/IAI.00707-10.
429. Michael, G. B. Antimicrobial Resistance in Pasteurellaceae of Veterinary Origin / G. B. Michael, J. T. Bossé, S. Schwarz. – Text : direct // *Microbiol Spectr*. – 2018. – Vol. 6(3).
430. Microbiological evaluation of bovine frozen semen samples in West Bengal, India / J. Mitra, S. Chowdhury, S. Panda [et al]. – Text : direct // *Explor Anim Med Res*. – 2016. – Vol. 6(2). P. 185–191.
431. Microbiome of Slovak Holstein Friesian Breeding Bulls' Semen / J. Medo, J. Žiarovská, M. Ďuračka, [et al]. – Text : direct // *Core Animals (Basel)*. – 2021. – Vol. Nov 22. – № 11(11). – P. 3331.
432. Microbiota and Its Impact on Semen Parameters / D. Baud, C. Pattaroni, N. Vulliemoz [et al]. – Text : direct // *Sperm Front Microbiol*. – 2019. – Feb. 12. – P. 234.
433. Microorganisms in cryopreserved semen and culture media used in the in vitro production (IVP) of bovine embryos identified by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS) / D. Zampieri, V. G. Santos, P. A. Braga [et al]. – Text : direct // *Theriogenology*. – 2013. – Vol. 1. P. 337-345. – doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.04.020.
434. Ministry for Primary Industries [официальный сайт]. – 2023. – <https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/6160/direct> (дата обращения 10.03.2023).

435. Mishra, N. Bovine viral diarrhoea virus / N. Mishra, S. Kalaiyarasu. – Text : direct // *Recent Advances in Animal Virology* / Y. S. Malik, R/ K/ Singh, M. P. Yadav [et al]. – Bhopal: Indian Council of Agricultural Research-National Institute of High Security Animal Diseases, 2019. – doi: 10.1007/978-981-13-9073-9_14.
436. Mohanty, S. B. A new bovine herpesvirus and its effect on experimentally infected calves / S. B. Mohanty, R. C. Hammond, M. G. Lillie. – Text : direct // *Arch. Gesamte Virusforsch.* – 1971. – Vol. 34. – P. 394-395.
437. Molecular biology of bovine herpesvirus type 4 / E. Thiry, M. Bublot, J. Dubuisson [et al]. – Text : direct // *Veterinary Microbiology.* – 1992. – Vol. 33, P. 79-92. – [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(92\)90037-T](https://doi.org/10.1016/0378-1135(92)90037-T).
438. Molecular Characterization of the First Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4) Strains Isolated from In Vitro Bovine Embryos production in Argentina / Erika González Altamiranda, Julieta M Manrique, Sandra E Pérez [et al]. – Text : electronic // *PLoS ONE.* – 2015. – Vol. 10(7). – e0132212. – doi:10.1371/journal.pone.0132212.
439. Molecular characterization of bacterial microbiota associated with infectious bovine keratoconjunctivitis in Michoacán, Mexico. / Ríos-Alanís, Ana M, López-Meza, Joel E, Ochoa-Zarzosa, Alejandra [et al]. – Text : electronic // *Rev Colom Cienc Pecua.* – 2021. – vol.34. – n.1. –pp.18-28.
440. Molecular detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus in Western China/ L. Chang, Y. Qi, D. Liu [et al]. – Text : direct // *BMC Vet Res.* – 2021. – Vol. 17. – P.66. – doi: 10.1186/s12917-021-02747-7.
441. Moreno, E. Genome evolution within the alpha Proteobacteria: Why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? / E. Moreno. - Text : direct // *Fems Microbiol. Rev.* –1998. – Vol. 22. – P.255-275.
442. Morphology and molecular composition of purified bovine viral diarrhoea virus envelope / N. Callens, B. Brügger, P. Bonnafous [et al]. – Text : direct // *PLOS Pathog.* – 2016. – Vol.12. – P. e1005476. – doi: 10.1371/journal.ppat.1005476.

443. Morrell, J. M. Alternatives to Antibiotics in Semen Extenders: A Review / J. M. Morrell, M. Wallgren. – Text : electronic. – Pathogens. – 2014. – Vol. 3 (4). – P. 934-946. – doi: 10.3390/pathogens3040934.
444. Morton, J. M. Isolation of Mycoplasma spp. and serological responses in bulls prior to and following their introduction into Mycoplasma bovis-infected dairy herds / J. M. Morton, K. L. Bosward, P. A. Sheehy [et al]. – Text : direct // Journal of Dairy Science. – 2018. – Vol. 101. P. – 7412-7424. – doi: 10.3168/jds.2018-14457.
445. Multiple locus variable number tandem repeat analysis of Mycoplasma bovis isolated from local and imported cattle / E. Amram, M. Freed, N. Khateb [et al]. – Text : direct // Vet. J. –2013. – Vol. 197. – P. 286–290.
446. Munoz-Zanzi, C. A. Effect of bovine viral diarrhea virus infection on fertility of dairy heifers / C. A. Munoz-Zanzi, M. C. Thurmond, S. K. Hietala. – Text : direct// Theriogenology. –2004. – Vol. 61. – P.1085-1099.
447. Mycoplasma bovis infections in Swiss dairy cattle: a clinical investigation /M. Aebi, van den Borne, B. H. P. Raemy [et al]. – Text: electronic//Acta Vet. Scand. –2015. – Vol.5 (10). – URL: <http://dx.doi.org/10.1186/s13028-015-0099-x>.
448. Mycoplasma bovis NADH oxidase functions as both a NADH oxidizing and O₂ reducing enzyme and an adhesion /G. Zhao, H. Zhang, X. Chen [et al]. – Text : direct // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7(1). – P. 44. – doi: 10.1038/s41598-017-00121-y.
449. Mycoplasma bovis real-time polymerase chain reaction assay validation and diagnostic performance / K. A. Clothier, D. M. Jordan, C. J. Thompson [et al]. – Text : direct // Journal of veterinary diagnostic investigation. – 2010. – Vol. 22. – P. 956-960.
450. Mycoplasma bovis infections in cattle / F. P. Maunsell, A. R. Woolums, D. Francoz [et al]. – Text : direct // J Vet Intern Med. – 2011. – Vol. 25. – P. 772-783.
451. Mycoplasma infection in the uterus of early postpartum dairy cows and its relation to dystocia and endometritis / M. E. Ghanem, H. Higuchi, E. Tezuka [et

- al]. – Text : direct // *Theriogenology*. – 2013. –Vol. 79(1). –P. 180-185. – doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.09.027.
452. *Mycoplasma otitis* in California calves. / C. G. Lamm, I. Munson, M. C. Thurmond [et al]. – Text : direct // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 2004. – Vol. 16. – P. 397-402.
453. Nebel, R. L. Evaluation of systematic breeding programs for lactating dairy cows: A review / R. L. Nebel, S. M. Jobst. – Text: electronic // *J. Dairy Sci.* – 1998. –Vol. – 81. – P. 1169-1174. – doi: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75679-6. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9594406/>.
454. New antimicrobial susceptibility data from monitoring of *Mycoplasma bovis* isolated in Europe /U. Klein, A. de Jong, M. Youala [et al]. – Text : direct // *Veterinary Microbiology*. – 2019. – Vol. 238. – P. 108432. – doi: 10.1016/j.vetmic.2019.108432.
455. Newcomer, B. W. Diagnosis and control of viral diseases of reproductive importance infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhoea The Veterinary clinics of North America / B. W. Newcomer, D. Givens. – Text : direct // *Food Animal Practice*. – 2016. – Vol. 32 (2). – P. 425-441.
456. Nicholas, R.A. *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* (small colony variant): the agent of contagious bovine pleuropneumonia and member of the "Mycoplasma mycoides cluster". /R. A. Nicholas, J. B Bashiruddin. –Text : direct // *J Comp Pathol*.– 1995. – Vol. 113. – P. 1-27.
457. Nicholas, R. A. J. *Mycoplasma bovis*, disease, diagnosis and control. R.A.J. Nicholas, R.D. Ayling [et al].– Text : direct // *Research in Veterinary Science*. – 2003. – Vol. 74. – P.105–112.
458. Nicholas, R. *Mycoplasma* diseases of ruminants. R. Nicholas, R. Ayling, L. McAuliffeeds.– Wallingford,UK: CABI, 2008.– Text : direct.
459. Nicholas, R.A.J. *Mycoplasma* mastitis in cattle: To cull or not to cull /R.A.J. Nicholas, L.K. Fox, I. Lysnyansky. – Text : direct // *The Veterinary Journal*. – 2016. –Vol. 216. – P. 142-147. – doi: 10.1016/J.TVJL.2016.08.001.

460. Nikolin, V. Presence of Bovine herpesvirus type 4 (BHV-4) infection in bulls for artificial insemination in Serbia / V. Nikolin, V. Milicevic, V. Radosavljevic. – Text : direct // *Acta Veterinaria*. – 2008. – Vol. 58. – 10.2298/AVB0803267N.
461. Ning, Z. Molecular characterization of cloned variants of *Coxiella burnetii* isolated in China / Z. Ning, S. R. Yu, Y. G. Quan. - Text : direct // *Acta virologica*. – 1992. – Vol.36(2). – P. 173-183.
462. Nishikawa, Y. History and development of artificial insemination in the world / Y. Nishikawa. – Text : direct // *Proceedings of the 5th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Trento, Italy / Veterinary Institute, Skopje*. – 1964. – Vol. 7. – 163–259.
463. Nocard, R. The Microbe of Pleuropneumonia. 1896 / R. Nocard. – Text : direct // *Reviews of Infectious Diseases*. – 1990. –Vol. 12. – P. 354-358.
464. Novel gammaherpesvirus functions encoded by bovine herpesvirus 6 (bovine lymphotropic virus) / J. Jia, G. Delhon, E. R. Tulman [et al]. – Text : direct // *J Gen Virol*. – 2014. – Vol. 95(Pt 8). – P. 1790-1798.
465. Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011 / B. Hoffmann, M. Scheuch, D. Hoper [et al]. – Text : direct // *Emerg Infect Dis*. – 2012. – Vol. 18(3). – P. 469-472.
466. NSs protein of Schmallenberg virus counteracts the antiviral response of the cell by inhibiting its transcriptional machinery / G. Barry, M. Varela, M. Ratinier [et al]. – Text : direct // *J Gen Virol*. – 2014. – Vol. 95(8). – P. 1640-1646.
467. Nunes, A. Evolution, phylogeny, and molecular epidemiology of *Chlamydia Infection* / A. Nunes, J. P. Gomes.- Text : direct// *Genetics and Evolution*. –2014. – Vol.23. – P. 49-64.
468. Occurrence of *Haemophilus somnus* in bovine semen and in the prepuce of bulls and steers / J. D. Humphrey, P. B. Little, D. A. Barnum [et al]. – Text : direct // *Can. J. CoTp. Med*. – 2002. – P. 215-217.
469. Ogata, M. Recovery and identification of canine and feline mycoplasmas. In: *Methods in Mycoplasmology. Volume II: Diagnostic Mycoplasmology* / M. Ogata.

- Text : direct // Edited by J.G. Tully, S. Razin. – NY : Academic Press, 1983. – P. 105-113.
470. Oguejiofor, C. F. Mechanisms linking bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection with infertility in cattle / C. F. Oguejiofor, C. Thomas, Z. Cheng, D. C. Wathes. – Text : direct // Animal Health Research Reviews. –2019. – Vol.20(1). – P. 72-85. – doi.org/ 10.1017/S1466252319000057.
471. OIE. Collection and processing of bovine, small ruminant and porcine semen Chapter 4.7. – Text : electronic // Terrestrial Animal Health Code. – Paris : Office International des Epizooties, 2016. – URL : https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/?id=169&L=1&htmlfile=chapitre_coll_semen.htm. (дата обращения 16.08.2021)
472. Olafson, P. An apparently new transmissible disease of cattle / P. Olafson, C. A. Mac, F. H. Fox. – Text : direct // Cornell Vet. – 1946. – Vol. 36. – P.205-213.
473. Oral exposure, reinfection and cellular immunity to Schmallenberg virus in cattle / K. Wernike, M. Eschbaumer, H. Schirmer [et al]. – Text : direct // Vet Microbiol. – 2013/ – Vol. 165(1). – P.155-159.
474. Oren, A. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes / A. Oren, G. M. Garrity G. M. [et al]. – Text : direct // J Syst Evol Microbiol. – 2021. – 71(10). – doi: 10.1099/ijsem.0.005056. PMID: 34694987.
475. Organ distribution of Schmallenberg virus RNA in malformed newborns / S. Bilk, Ch. Schulze, M. Fischer [et al]. – Text : direct // Veterinary microbiology. – 2012. – Vol. 159. – P. 236-238. – 10.1016/j.vetmic.2012.03.035.
476. Orlova, S. T. Optimization of methods for sampling and cultivation of mycoplasmas from the mucous membranes of the respiratory tract and conjunctiva of dogs and cats / S. T. Orlova, A. A. Sidorchuk, T. V. Grebennikova. – Text : direct // Veterinary Animal Science and Biotechnology. – 2018. – Vol. 12. – P. 6-15.

477. Osburn, B. I. The impact of bluetongue virus on reproduction. *Comp. Immunol / B.I. Osburn.* - Text : direct // *Microbiol. Infect. Dis.* – 1994. – Vol. 17. – P.189-196.
478. Osterman, B. International committee on systematics of prokaryotes; subcommittee on the taxonomy of *Brucella*: minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. / Osterman B, Moriyon I. - Text : direct // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2006. –56(5). –P.1173–1175.
479. Outbreak of bovine virus diarrhea on Dutch dairy farms induced by a bovine herpesvirus 1 marker vaccine contaminated with bovine virus diarrhea virus type 2 / H. W. Barkema, C. I. Bartels, L. Van Wuijckhuise [et al]. – Text : direct // *Tijdschrift voor Diergeneeskunde.* – 2001. – Vol. 126. – P.158-165.
480. Parkinson, T. J. *Veterinary Reproduction and Obstetrics* /T. J. Parkinson. – Text : direct // *Specific Infectious Diseases Causing Infertility and Subfertility in Cattle.* – 2019 – P. 434–466. – doi:10.1016/B978-0-7020-7233-8.00024-0 2019.
481. Parsonson, I. M. The effect of natural and artificial breeding using bulls infected with, or semen contaminated with, infectious bovine rhinotracheitis virus / I. M. Parsonson, W. A. Snowdon. –Text : direct // *Austral Vet J.* – 1975. – Vol. 5. – P. 365-369.
482. Pathogens of bovine respiratory disease in North American feedlots conferring multidrug resistance via integrative conjugative elements / C. L. Klima, R. Zaheer, S. R. Cook [et al]. – Text : direct // *J Clin Microbiol.* –2014. – Vol.52(2). – P. 438-448.
483. Pathological and immunohistochemical studies of natural and experimental *Mycoplasma bovis pneumonia* in calves / F. Rodríguez, D.G. Bryson, H.J. Ball [et al]. – Text : direct // *Journal of Comparative Pathology.* – 1996. – Vol. 115(2). – P. 151-162. – doi: 10.1016/S0021-9975(96)80037-5.
484. PCR detection of genital infections in bull semen from different regions of Ukraine, 2013 - 2016 / M. M. Isakov, O. S. Solodiankin, V. I. Bolotin [et al]. – Text : direct // *AVM.* – 2016. – Vol.9, no. 2. – P. 63-70.

485. Penoposthitis associated with infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in a stud of bulls / R. A. Huck, P. G. Millar, D. H. Evans [et al]. – Text : direct // *Vet Rec.* – 1971. – Vol.88. – P. 292-297.
486. Pérez, D. S. *Histophilus somni*: pathogenecity in cattle an update / D.S. Pérez, F.A Pérez, G. Bretschneider. – Text : direct // *An. Vet. Murcia.* – 2012. – Vol. 26. – P. 5-21.
487. Phase variation analysis of *Coxiella burnetii* during serial passage in cell culture by use of monoclonal antibodies / A. Hotta, M. Kawamura, H. To [et al]. - Text : direct// *Infection and immunity.* – 2002. – Vol. 70(8). – P. 4747-4749.
488. Phylogenetic Relatedness Among Plasmids Harbored by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolated From Retail Meats / Daya Marasini, Anand B.Karki, Mark A. Buchheim [et al]. - Text : direct // *Frontiers in Microbiology.* – 2018. – Vol. 9. – P. 2167. - doi:10.3389/fmicb.2018.02167.
489. Phylogeny and molecular typing of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* by multilocus sequencing / Lucía Manso-Silván, Virginie Dupuy, Inna Lysnyansky [et al]. – Text : direct // *Veterinary Microbiology.* – 2012. – Vol.161(1-2). –104-112.
490. Picardeau, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis / M. Picardeau. - Text : direct // *Med Mal Infect.* – 2013. – Vol. 43(1). – P. 1-9. - doi: 10.1016/j.medmal.2012.11.005. Epub 2013 Jan 18. PMID: 23337900.
491. Polymerase chain reaction for detection of *Ureaplasma diversum* from urogenital swabs in cattle in Australia / A. Smith, K. K. Chousalkar, P. C. Chenoweth [et al]. – Text : direct // *Aust Vet J.* – 2012. – Vol. 90(7). – P. 275-276.
492. Potential Pathogenic Bacteria in Seminal Microbiota of Patients with Different Types of Dysspermatism / H. Yang, J. Zhang, Z. Xue [et al]. – Text : direct // *Sci Rep.* – 2020. – Vol. 23. – № 10 (1). – doi: 10.1038/s41598-020-63787-x.
493. Preliminary study on the effects of enrofloxacin, flunixin meglumine and pegbovigrastim on *Mycoplasma bovis pneumonia* / K. Dudek, D. Bednarek, R.D. Ayling [et al]. – Text : direct // *BMC Vet. Res.* – 2019. – Vol. 15. – P. 371.

494. Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome / S. Michaux, J. Paillisson, M. J. Carles-Nurit [et al]. - Text : direct // *J. Bacteriol.* -1993. – Vol. 175. – P. 701-705.
495. 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]. – Text : direct // *J Dairy Sci.* – 2013. – Vol. 96(10). – P. 6336-6346.
496. Prevalence and distribution of *Haemophilus somnus* in the male bovine reproductive tract / J. D. Humphrey, P. B. Little, L. R. Stephens [et al]. – Text : direct // *Am J Vet Res.* – 1982. – Vol.43. – P.791-795.
497. Prevalence of bovine viral diarrhea virus in dairy cattle herds in eastern China / P. Hou, G. Zhao, H. Wang, H. He. – Text : direct // *Trop Anim Health Prod.* – 2019. – Vol. 51. – P. 791–798. – doi: 10.1007/s11250-018-1751-z.
498. Prevalence of chlamydiae in semen and genital tracts of bulls, rams and bucks / K. Teankum, A. Pospischil, F. Janett [et al]. – Text : direct // *Theriogenology.* – 2007. – Vol. 67(2). – P. 303-310.
499. Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar hardjo in the genital and urinary tracts of non-pregnant cattle / W. A. Ellis, J. G. Songer, J. Montgomery, J. A. Cassells. – Text : direct // *Vet Rec.* – 1986. – Vol. 4. – P. 11-13. – doi: 10.1136/vr.118.1.11. PMID: 3511601.
500. Prevalence, risk factors and molecular detection of *Campylobacter* in farmed cattle of selected districts, Bangladesh / N. Hoque, S. S. Islam, M. N. Uddin [et al]. – Text : direct // *Pathogens.* – 2021. – № 10(3). – C. 3–17.
501. Prevention of disease transmission by semen in cattle / G. H. Wentink, K. Frankena, J. C. Bosch [et al]. – Text : direct // *Livest. Prod. Sci.* – 2000. – Vol. 62. – P. 207–220.
502. Prokhvatilova, L. B. The use of polymerase chain reaction for the manifestation of herpesvirus cattle type 4 in the pathological material. In: Diseases of Agricultural Animals of Viral and Other Etiologies and Measures to Combat Them: Materials of the Scientific-Practical Conference [Bolezni sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh virusnoy i drugikh etiologiy i mery bor'by

- s nimi / L. B. Prokhvatilova, A. A. Gusev. – Text : direct // Materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii]. – Novosibirsk : Revik-K, 2001. – C. 25-26.
503. Proposal of *Histophilus somni* gen. nov., sp. nov. for the three species incertae sedis 'Haemophilus somnus', 'Haemophilus agni' and 'Histophilus ovis' / O. Angen, P. Ahrens, P. Kuhnert [et al]. – Text : direct // Int J Syst Evol Microbiol. – 2003. – Vol.53. – P.1449-1456.
504. *Pseudomonas Mendocina* Bacteremia: A Case Study and Review of Literature / M. Gani, S. Rao, M. Miller [et al]. – Text : direct // J Case Rep. – 2019. – Vol. 5. – № 20. – P. 453-458.
505. Q fever in Egypt: Epidemiological survey of *Coxiella burnetii* specific antibodies in cattle, buffaloes, sheep, goats and camels / Jessica Klemmer, John Njeru, Aya Emam. - Text : direct // PLOS ONE. – 2018. – Vol. 13. – P. e0192188. - 10.1371/journal.pone.0192188.
506. Q fever in pregnant goats: pathogenesis and excretion of *Coxiella burnetii* / H. J. Roest, B. van Gelderen, A. Dinkla [et al]. - Text : direct // PLoS One. – 2012. – Vol.7(11). – P. e48949. - doi: 10.1371/journal.pone.0048949.
507. Q fever infection in dairy cattle herds: increased risk with high wind speed and low precipitation / S. Nusinovici, J. Frossling, S. Widgren [et al]. – Text : direct // Epidemiol Infect. – 2015. – Vol. 143, no.15. – P. 1-11. – doi: 10.1017/S0950268814003926.
508. Quantitative Detection of *Chlamydia psittaci* and *C. pecorum* by high-sensitivity real-time PCR reveals high prevalence of vaginal infection in Cattle / F. J. DeGraves, D. Gao, H. R. Hehnen [et al]. – Text : direct // J Clin Microbiol. – 2003. – Vol. 4. – P. 1726-1729.
509. Quebec: detection of bovine lymphotropic herpesvirus DNA in tissues of a bovine aborted fetus / C. A. Gagnon, O. Allam, R. Drolet [et al]. – Text : direct // Can Vet J. – 2010. – Vol. 51(9). – P.1021-1022.
510. Radostits, O. M. Veterinary medicine : a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats / O.M.Radostits, S.H. Done. – London : Elsevier Saunders, 2007. – 2156 p. – Text : direct.

511. Rae, A.G. Isolation of mycoplasmas from bovine semen /A. G. Rae. – Text: direct // *Vet Rec.* – 1982. – Vol. 111. – P. 462.
512. Raghavan, R. Toxic introns and parasitic intein in *Coxiella burnetii*: legacies of a promiscuous past / R. Raghavan, L. D. Hicks, M. F. Minnick. - Text : direct// *Journal of bacteriology.* – 2008. – Vol.190(17). – P. 5934-5943.
513. Rapid and sensitive detection of the bovine viral diarrhoea virus genome in semen / N. Da Silva, R. Zardoya, G. Santurde [et al]. – Text : direct // *J Virol Methods.* – 1995. – Vol. 55(2). – P. 209-218. – doi: 10.1016/0166-0934(95)00059-4.
514. 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]. – Text : direct // *J Virol Methods.* – 2005. – Vol.128. – P. 183-188.
515. Rapid detection for *Mycoplasma dispar* and *Mycoplasma bovirhinis* using an allele specific PCR / K. Miles, L. McAuliffe, R. D. Ayling [et al]. – Text : direct // *Veterinary Research Communications.* –2005. – Vol. 241. – P. 103–107.
516. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 (BHV 1) using the polymerase chain reaction / S. Vilcek, P. F. Nettleton, J. A. Herring [et al]. – Text : direct // *Vet Microbiol.* – 1994. – Vol. 42(1). – P.53-64.
517. 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]. – Text : direct // *Can J Vet Res.* – 1996/ – Vol. 60(2). – P.100-107.
518. Rapid identification of *Mycoplasma bovis* strains from bovine bronchoalveolar lavage fluid with matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry after enrichment procedure / J. Bokma, L. Van Driessche, P. Deprez [et al]. – Text : direct // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2020. – Vol. 58(6). P. 4-20. – doi: 10.1128/JCM.00004-20.
519. Rapid spread and association of Schmallenberg virus with ruminant abortions and foetal death in Austria in 2012/2013 / A. Steinrigl, P. Schiefer, C.

- Schleicher [et al]. – Text : direct // *Prev Vet Med.* – 2014. – Vol.116(4). – P. 350-359.
520. Razin, S. Molecular biology and genetics of mycoplasmas (Mollicutes) / S.Razin. – Text : direct // *Microbiol Rev.* – 1985. - Vol. 49. – P. 419-455. – doi: 10.1128/MR.49.4.419-455.1985.
521. Razin, S. Mycoplasma adhesion / S. Razin, E. Jacobs. –Text : direct // *Journal of General Microbiology.* – 1992. –Vol. 138(3). – P. 407-422. – doi: 10.1099/00221287-138-3-407.
522. Razin, S. Highlights of mycoplasma research—an historical perspective / S. Razin, L. Hayflick. – Text : direct // *Biologicals.* – 2010. – Vol. 38. – P.183-190. – doi: 10.1016/j.biologicals.
523. Reassortment between two serologically unrelated bluetongue virus strains is flexible and can involve any genome segment / A. E. Shaw, M. Ratinier, S. F. Nunes [et al]. – Text : direct // *J Virol.* – 2013. – Vol.87. – P. 543-557. – doi: 10.1128/JVI.02266-12.
524. Recent advances on the bovine viral diarrhea virus molecular pathogenesis, immune response, and vaccines development / Al-Kubati, Anwar, Hussien [et al]. – Text : direct // *Frontiers in Veterinary Science.* – 2021. – Vol.8. – P.665128. – doi :10.3389/fvets.2021.665128.
525. Recurrent detection of *Histophilus somni* in the genital tract of dairy cattle with reproductive failures in Italy / Luca Bano, M. Bonci, I. Drigo [et al]. – Text : direct // *Ilenia Large Animal Review.* – 2011. – Vol. 17. – P.171-176.
526. Red, A. A. Bacteriospermia and Sperm Quality of Cryopreserved Bull Semen Used in Artificial Insemination of Cows in South Wollo Zone, Ethiopia / A. A. Reda, G. Almaw, S. Abreha [et al]. – Text : direct // *Vet Med Int.* – 2020. – Vol. 23.
527. Reid, S. W. Ureaplasma vulvovaginitis and infertility in eight southern Ontario dairy herds / S. W. Reid, D.G. Madhill, A.H. Vreugdenhil. – Text : direct // *Canadian Veterinary Journal.* –1989. –Vol. 30. – P. 255.

528. Reinhold, P. Chlamydiaceae in cattle: Commensals, trigger organisms, or pathogens? / P. Reinhold, K. Sachse, B. Kaltenboeck. – Text : direct // The Veterinary Journal. –2011. – Vol. 189. – P. 257-267.
529. Research article bovine brucellosis vaccine strain S19 detected in calves before vaccination / C. Mantovani, C. O. Soares, L. R. Santos [et al]. – Text : direct // Genetics and Molecular Research. – 2020. – Vol. 19(3).
530. Reshedko, G.K. The value of enzymatic modification of aminoglycosides in the development of resistance in bacteria / G. K. Reshedko. – Text : direct // Clin. Micr. Antim. Chem. – 1999. – Vol.1(1). – P.40-50.
531. Revell, S. G. Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine virus diarrhoea virus / S. G. Revell, D. Chasey, T. W. Drew, S. Edwards. – Text : direct// The Veterinary Record. –1988. – Vol. 123. – P. 122-125.
532. Roberts, S. J. Bovine Obstetrics and Genital Diseases / S. J. Roberts. –3rd ed. – NY: Published by the author, 1986. – 981 p. – Text : direct.
533. Robinson, A. Guidelines for Coordinated Human and Animal Brucellosis Surveillance / A. Robinson. - Rome: FAO Agriculture Department, 2003. – 45 p. - Text : direct.
534. Rossetti, B. C. Direct detection of *Mycoplasma bovis* in milk and tissue samples by real-time PCR / B. C. Rossetti, J. Frey, P. Pilo – Text : direct // Molecular and cellular probes. – 2010. – Vol. 24. – P. 321–323. –doi: 10.1016/J.MCP.2010.05.001.
535. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1 / J. Thiry, V. Keuser, B. Muylkens [et al]. – Text : direct // J Virol. – 2018. – Vol.26. – P.92.
536. Rziha, H. J. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein / M. Fuchs, P. Hübert, J. E. Detterer. – Text : direct // J Clin Microbiol. – 1999. – Vol. 37(8). – P. 2498-507. – doi: 10.1128/JCM.37.8.2498-2507.1999.

537. Saacke, R. G. Observations on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa / R. G. Saacke, C. E. Marshall. – Text: electronic // *J. Reprod.Fertil.* – 1968 – Vol. 16(3). – P. 511–514. – doi: 10.1530/jrf.0.0160511.
538. Saed, O. M. Infertility of heifers caused by pathogenic strain of *Mycoplasma bovis* / O. M. Saed, J. M. Al-Aubaidi. – Text : direct // *Cornell Vet.* – 1983. – Vol. 73. – P. 125-130.
539. Salient lesions in domestic ruminants infected with the emerging so-called Schmallenberg virus in Germany / V. Herder, P. Wohlsein, M. Peters [et al]. – Text : direct // *Vet Path Online.* – 2012. – Vol. 49(4). – P. 588-591.
540. Salisbury, G. W. Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle / G. W. Salisbury, N. L. VanDemark, J. R. Lodge. – 2d ed. – San Francisco : W. H. Freeman, 1978. – 798 p. – Text : direct.
541. Sandal, I. A genomic window into the virulence of *Histophilus somni* / I. Sandal, T. J. Inzana. – Text : direct // *Trends Microbiol.* – 2010. – Vol. 18. – P. 90-99.
542. Santos, C. S. Current and alternative trends in antibacterial agents used in mammalian semen technology / C. S. Santos, A. R. Silva. – Text : direct // *Anim Reprod.* – 2020. – Vol.17(1). – P. e20190111. – <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0111>.
543. Santos, T. M. Diversity and succession of bacterial communities in the uterine fluid of postpartum metritic, endometritic and healthy dairy cows / T. M. Santos, R. C. Bicalho. – Text : direct. // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. –doi: 10.1371/journal.pone.0053048
544. Schmallenberg virus detection in bovine semen after experimental infection of bulls / Wim Poel, Joyce Parlevliet, E. Verstraten [et al]. – Text : direct // *Epidemiology and infection.* – 2013. – Vol. 142. – P.1-6. – 10.1017/S0950268813002574.
545. Schmallenberg virus in Dutch dairy herds: Potential risk factors for high within-herd seroprevalence and malformations in calves, and its impact on

- productivity / A. M. B. Veldhuis, D. SC-v, L. van Wuijckhuise [et al]. – Text : direct // *Vet Microbiol.* – 2014. – Vol.168(2–4). – P. 281-293.
546. Schmallenberg virus: a systematic international literature review (2011-2019) from an Irish perspective / A. B. Collins , M. L. Doherty, D. J. Barrett [et al]. – Text : direct // *Ir Vet J.* – 2019. – Oct 9. – 72:9. – doi: 10.1186/s13620-019-0147-3.
547. Schmallenberg virus pathogenesis, tropism and interaction with the innate immune system of the host / M. Varela, E. Schnettler, M. Caporale [et al]. – Text : direct // *PLoS Pathogens.* – 2013. – Vol. 9(1). – P. e1003133.
548. Schmidt, T. Evaluation of PCR assays for the detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial scrapings and the identification of subspecies in South African field isolates / T. Schmidt, E. H. Venter, J A. Picard. – Text : direct // *J. S. Afr. Vet. Assoc.* – 2010 . – Vol.81(2). – P. 87-92.
549. Search for the genome of bovine herpesvirus types 1, 4 and 5 in bovine semen / P.E. Morán, P.A. Favier, M. Lomónaco [et al]. – Text : direct // *Open Veterinary Journal.* – 2013. – Vol. 3(2). – P.126-130.
550. Seleem, M. N. Sriranganathan N. Brucellosis: A reemerging zoonosis / M. N. Seleem, S. M. Boyle. – Text : direct // *Vet Microbiol.* – 2010. – Vol. 140. – P. 392-398.
551. Semen as a source of *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy herds / Haapala V, Pohjanvirta T, Vähänikkilä N [et al]. – Text : direct // *Vet Microbiol.* – 2018. –Mar. V. 216 – P. 60-66.
552. Seroprevalence and comparison of isolates of endometriotropic bovine herpesvirus-4 / K. Frazier, C. Baldwin, M. Pence [et al]. – Text : direct // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2002. – Vol. 14. – P. 457-462.
553. Sharifzadeh, Ali. Frequency of *haemophilus somnus* in the semen of bulls in Iran as determined by polymerase chain reaction / Ali Sharifzadeh, Abbas Doosti, Payam Ghasemi-Dehkordi. – Text : direct // *Scientific Research and Essays.* – 2011. – Vol. 6. – P.1458-1460.

554. Sidi-Boumedine, K. Molecular epidemiology of Q fever: a review of *Coxiella burnetii* genotyping methods and main achievements / K. Sidi-Boumedine, E. Rousset. – Text : direct // EuroReference. – 2011. – No. 5. –P. 30-37.
555. Smith, G.A. Emergence of a new bovine herpesvirus 1 strain in Australian cattle / G.A. Smith, F.L. Young, K.C. Reed. – Text : direct // Arch Virol. – 1995. – Vol.140. – P.599- 603.
556. Smole, I. Repression of common bull sperm flora and in vitro impairment of sperm motility with *Pseudomonas aeruginosa* introduced by contaminated lubricant / I. Smole, A. Thomann, J. Frey [et al]. – Text : direct // Reprod Domest Anim. – 2010. – Vol. 45. – P. 737-742.
557. Snowdon, W. A. The IBR-IPV virus: reaction to infection and intermittent recovery of virus from experimentally infected cattle / W. A. Snowdon. – Text : direct // Aust Vet J. – 1965. – Vol.41. – P.135-142.
558. Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC* genes by PCR / S. Subramaniam, D. Bergonier, F. Poumarat [et al]. – Text : direct // Mol Cell Probe. – 1998. – Vol.12(3). – P. 161-169.
559. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction / S. E. Ashbaugh, K. E. Thompson, E. B. Belknap [et al]. – Text : direct // J Vet Diagn Invest. –1997. – Vol. 9. – P. 38-394.
560. Spinosa, H. S. Farmacologia aplicada à medicina veterinária / H. S. Spinosa, S. L. Gorniak, M. M. Bernardi. – 5nd ed. – Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2011. – Text : direct.
561. Spread and impact of the Schmallenberg virus epidemic in France in 2012-2013 / M. Dominguez, K. Gache, A. Touratier [et al]. – Text : direct // BMC Vet Res. – 2014. – Vol.10(1). – P. 248.
562. Storz, J. Etiological studies on epizootic bovine abortion / J. Storz, D. G. McKercher. – Text : direct // Zentralb 1 Veterinarmed. – 1962. – Vol.9. – PP. 411-427, 520-541.

563. Studdert, M. J. Infectious pustular vulvovaginitis virus infection of bulls / M. J. Studdert, C. A. V. Barker, M. A. Sayan. – Text : direct // *J Vet Res.* – 1964. – Vol.25. – P.303-314.
564. Studdert, M.J. Bovine Herpesviruses / M.J. Studdert. – Text : direct // *Encyclopedia of Virology* / Editor(s): Brian Mahy, H. V Marc, Van Regenmortel. – Third Edition. – Academic Press, 2008. – P. 362-368. – ISBN 9780123744104. – doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00352-6.
565. Studies of in vivo distribution of bovine herpesvirus type 4 in the natural host / L. Egyed, A. Ballagi-Pordány, A. J. Bartha [et al]. –Text : direct // *J. Clin. Microbiol.* – 1996. – Vol. 34. – P. 1091-1095.
566. Suppression subtractive hybridization as a basis to assess *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* genomic diversity and species-specific sequences / M. S. Marena, E. Sagne, F. Poumarat [et al]. –Text : direct // *Microbiology.* – 2005. – Vol.151. – P.475-489.
567. Sviland, S. Import risk assessment for frozen cattle semen from Norway to Iceland / S. Sviland, H. R. Høgåsen, T. Mørk. – Text : direct // *Norwegian Veterinary Institute's Report Series.* – 2014. – Vol. 16.
568. Symptomless intrauterine transmission of bovine herpesvirus 4 to bovine fetuses / L. Egyed, G. Sassi, J. Tibold [et al]. – Text : direct // *Microbial Pathogenesis.* – 2011. – Vol. 50(6). – P. 322-325. – DOI: 10.1016/j.micpath.
569. The essential and non-essential genes of bovine herpesvirus 1 / K. E. Robinson, J. Meers, J. L. Gravel [et al.]. – Text : direct// *Journal of General Virology.* – 2008.– Vol. 89. – P.2851-2863.
570. The effect of bovine viral diarrhoea virus on fertility in dairy cows: two case-control studies in the province of Styria, Austria / J. Burgstaller, W. Obritzhauser, S. Kuchling [et al]. – Text : direct // *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift.* –2016. – Vol. 129. – P. 103-110.
571. The effects of antibiotic additions to extenders on fresh and frozen-thawed bull semen / A. Gloria, A. Contri, L. Wegher [et al]. – Text : direct // *Anim Reprod Sci.* – 2014. Nov 10. – P. 15-23.

572. The effect of infection with bovine viral diarrhea virus on the fertility of Swiss dairy cattle / J. Rufenacht, P. Schaller, L. Audige [et al]. – Text : direct // *Theriogenology*. –2001. – Vol. 56. – P. 199-210.
573. The effect of infection with bovine viral diarrhea virus on the fertility of cows and heifers / M. Kale, A. Ata, S. Yavru [et al]. – Text : direct // *Acta Veterinaria*. –2006. – Vol. 56. – P. 467-477.
574. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses / B. Roizman, R. C. Desrosiers, B. Fleckenstein. – Text : electronic // *Arch Virol*. – 1992. – Vol. 123. – P.425-449. – doi: 10.1007/BF01317276. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1562239/>.
575. The live attenuated bovine viral diarrhea virus components of a multi-valent vaccine confer protection against fetal infection / F. Kovacs, T. Magyar, C. Rinehart [et al]. – Text : direct // *Veterinary Microbiology*. – 2003. – Vol. 96. – P. 117-131.
576. The presence of bacteria species in semen and sperm quality / E. Moretti, S. Capitani, N. Figura [et al]. – Text : direct // *J Assist Reprod Gen*. – 2009. – Vol. 26. – P. 47-56.
577. The prevalence of Chlamydiae of bulls from six bull studs in Germany / J. Kauffold, K. Henning, R. Bachmann [et al]. – Text : direct // *Animal Reproduction Science*. –2007. – Vol.102. – P. 111-121.
578. The Q fever epidemic in The Netherlands: history, onset, response and reflection / H. I. Roest, J. J. Tilburg, W. van der Hoek [et al]. - Text : direct // *Epidemiol Infect*. – 2011. – Vol. 139(1). – P. 1-12. – doi: 10.1017/s0950268810002268.
579. The sensitivity of the PCR method for detection of *Coxiella burnetii* in the milk Samples, Zahedan / M. Kargar, A. Rashidi, A. Doosti [et al]. – Text : direct // *J Res Med Sci*. – 2015. – Vol.17(6). – doi: 1.17795/zjrms988.
580. The use of reproductive and molecular biotechnology in Animal Genetic Resources management: a global overview / D. Pilling, R. Cardellino, M. Zjalic [et

- al]. – Text : direct // Animal Production and Health Division. – Rome : Cambridge University Press, 2007. – Vol.40. – P.1-13.
581. Thompson, H. A. Genetics of *Coxiella burnetii* / H. A. Thompson, M. L. Suhan. - Text : direct // FEMS microbiology letters. – 1996. – Vol.145(2). – P.139-146.
582. Three temporal classes of gene expression during the *Chlamydia trachomatis* developmental cycle /E. I. Shaw, C. A. Dooley, E. R. Fischer [et al]. - Text : direct // Molecular microbiology. – 2000. – Vol. 37, no. 4. – P. 913-925.
583. Transmission of Bluetongue Virus Serotype 8 by Artificial Insemination with Frozen-Thawed Semen from Naturally Infected Bulls / K. De Clercq, L. Vandaele, T. Vanbinst [et al]. – Text : direct // Viruses. – 2021. – Vol.13(4). – P. 652. - doi: 10.3390/v13040652.
584. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by rectal examination /J. R. Lang-Ree, T. Vatn, E. Kommisrud [et al]. – Text : direct // Veterinary Record. – 1994. – Vol. 135. – P. 412-413.
585. Transmission of bovine viral diarrhoea virus through the semen of acutely infected bulls under field conditions / U. Rikula, L. Nuotio, U. I. Laamanen [et al]. – Text : direct // Veterinary Record. – 2008. – Vol. 162. – P.79-82.
586. Trichard, C.J.V. Mycoplasmas recovered from bovine genitalia, aborted foetuses and placentas in the Republic of South Africa / C. J. V. Trichard, E. P. Jacobsz // Vet Res. –1985. – Vol. 52. – P. 105-110.
587. Unusual history and initial clinical signs of *Mycoplasma bovis* mastitis and arthritis in first-lactation cows in a closed commercial dairy herd / D. J. Wilson, R. T. Skirpstunas, J. D. [et al].– Text : direct // Journal of the American Veterinary Medical Association. – 2007. – Vol. 230(10). – P. 1519-1523. –doi: 10.2460/javma.230.10.1519.
588. Uphoff, C.C. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures /C. C. Uphoff, H. G. Drexler. – Text : direct // Current Protocols in Molecular Biology. – 2014. – Vol.106(1). – P. 24-28. – doi: 10.1002/0471142727.mb2804s106.

589. Use of a novel real-time PCR technique to monitor and quantitate *Mycoplasma bovis* infection in cattle herds with mastitis and respiratory disease / Konrad Sachse, Hala S. H. Salam, Roland Diller [et al]. – Text : direct // *Vet J.* – 2010. – Vol.186. – P.299-303.
590. Vaccination Failure in Eradication and Control Programs for Bovine Viral Diarrhea Infection / A. Antos, P. Miroslaw, R. Jerzy [et al]. – Text : direct // *Frontiers in Veterinary Science.* – 2021. – Vol. 8. – P. 580. – DOI=10.3389/fvets.2021.688911.
591. Vaginal microbial communities from synchronized heifers and cows with reproductive disorders / C. Gonzalez Moreno, C. Fontana, P. S. Cocconcelli [et al]. – Text : direct. // *J Appl Microbiol.* – 2016. –Vol. 121. –P. 123-141.
592. Valle, P. S. Time to first calving and calving interval in bovine virus diarrhoea virus (BVDV) sero-converted dairy herds in Norway / P. S. Valle, S. W. Martin, E. Skjerve. – Text : direct // *Preventive Veterinary Medicine.* – 2001. – Vol. 51. – P. 17-36.
593. Van der Maaten, M. J. Isolation of a herpes-like virus from lymphosarcomatous cattle / M. J. Van der Maaten, A. D. Boothe. – Text : electronic // *Arch Gesamte Virusforsch.* – 1972. – Vol. 37(1). – P. 85-96. – doi: 10.1007/BF01241154. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4554212/>.
594. Van Oirschot, J. T. Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review / J. T. van Oirschot. – Text : electronic // *Veterinary Quarterly.* – 1995. – Vol. 17. – P. 29–33. – doi: 10.1080/01652176.1995.9694526. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7610554/>.
595. Vector-borne transmission imposes a severe bottleneck on an RNA virus population / N. L. Forrester, M. Guerbois, R. L. Seymour [et al]. – Text : direct // *PLoS Pathog.* – 2012. – Vol. 8(9). – P. e1002897.
596. Veron, M. Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron / M. Veron, R. Chatelain. – Text : direct // *Int. J. Syst. Bacteriol.* –1973. – Vol. 23. – P. 122-134.

597. Veterinary Microbiology and Microbial Disease /P. J. Quinn, B. K. Markey, F. C. Leonard [et al]. – Oxford: John Wiley & Sons, 2011. – Text : direct.
598. Veterinary Virology / F. A. Murphy, E. P. J. Gibbs, M. C. Horzinek, M. J. Studdert. – 3rd edn. – New York: Academic Press, 1999. – 629 p. – Text : direct.
599. Virakul, P. Fertility of cows challenged with a cytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus during an outbreak of spontaneous infection with a noncytopathic strain / P. Virakul, M. L. Fahning, H. S. Joo, R. Zemjanis. – Text : direct // Theriogenology. – 1988. – Vol. 29. – P. 441-449.
600. Virulence and genotype of a bovine herpesvirus 1 isolate from semen of a subclinically infected bull / J. T. van Oirschot, F. A. Rijsewijk, P. J. Straver [et al]. – Text : direct // Veterinary Record. – 1995. – Vol. 137. – P. 235–239.
601. Voges, H. Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, nonviraemic bull / H. Voges, G. W. Horner, S. Rowe, G. . Wellenberg. – Text : direct // Veterinary Microbiology. – 1998. – Vol. 61. – P. 165-175.
602. Walter, C. T. Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses / C. T. Walter, J. N. Barr. – Text : direct // J Gen Virol. –2011. – Vol. 92(11). – 2467-2484.
603. Walton, T. E. The history of bluetongue and a current global overview / T. E. Walton. – Text : direct // Vet Ital. – 2004. – Vol. 40(3). – P. 31-38.
604. Wang, J. Genetic characterization of bovine herpesvirus 1 in New Zealand /J. Wang, G.W. Horner, J.S. O’Keefe. – Text : direct // N Z Vet J. – 2006. – Vol.54. – P.61-66.
605. Wassenaar, T. The Genus Campylobacter / Trudy Wassenaar, Diane Newell. - Text : direct // The Prokaryotes. – 2006. - 10.1007/0-387-30747-8_4.
606. Ways to improve the biosecurity of bovine semen / L. de Ruigh, J. C. Bosch, M. C. Brus [et al]. – Text : direct // Reprod Domest Anim. – 2006. – Vol. 41(4). – P. 268-74. – doi: 10.1111/j.1439-0531.2006.00727.x. – PMID: 16869880.

607. What about the bull? A systematic review about the role of males in bovine infectious infertility within cattle herds / C. Polo, T. García-Seco, A. Díez-Guerrier [et al]. – Text : direct // *Vet Anim Sci.* – 2023. – Vol. 4. – P. 100-284.
608. Whatmore, A. M. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing / A. M. Whatmore, L. L. Perrett, A.P. MacMillan. - Text : direct // *BMC Microbiol.* – 2007. – Vol.7. – P.34.
609. White, M. B. The breeding record of cows inseminated with a batch of semen contaminated with infectious bovine rhinotracheitis virus / M. B. White, W. A. Snowdon. – Text : direct// *Aust Vet.* – 1973. – Vol.49. – P. 501-506.
610. Whole-genome sequencing of *Histophilus somni* strains isolated in Russia / S. P. Yatsentyuk, J. Pobolelova, V. D. Gordeeva, I. Timofeeva. – Text : direct // *Veterinary World.* – 2023. – T. 16. – № 2. – C. 272-280.
611. Whole-genome sequencing of *Leptospira interrogans* from southern Brazil: genetic features of a highly virulent strain / Sérgio Jorge, Frederico Schmitt Kremer, Natasha Oliveira. - Text : direct// *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* – 2018. – Vol. 113. – P. 80-86. - 10.1590/0074-02760170130.
612. Wickware, C. L. Composition and diversity of the preputial microbiota in healthy bulls / C. L. Wickware, T. A. Johnson, J. H. Koziol. – Text : direct. // *Theriogenology.* – 2020. – Vol.145. – P. 231-237.
613. Viral contamination of bull semen used for artificial insemination / S. P. Yatsentyuk; S. M. Borunova, L. A. Gnezdilova [et al]. – Text : electronic // *AIP Conference Proceedings* – 2023. – Vol. 2817. – № 1. – URL: <https://doi.org/10.1063/5.0148879> (дата обращения 21.04.2023).
614. WOAH. Bluetongue. Chapter 3.1.3. – Text : electronic // *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.* – https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.03_BLUETONGUE.pdf (дата обращения 21.04.2023).
615. WOAH. Bovine genital campylobacteriosis Chapter 3.4.4. – Text : electronic // *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, twelfth edition 2023.* – URL : <https://www.woah.org/>

- fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.04_BGC.pdf (дата обращения 14.04.2023).
616. WOAH. Brucellosis (infection with *Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) Chapter 3.1.4. – Text : electronic // Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, twelfth edition 2023. – URL : https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELLOSIS.pdf (дата обращения 18.04.2023).
617. WOAH. Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. Chapter 3.4.11. – Text : electronic // Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, twelfth edition 2023. – URL : https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.11_IBR_IPV.pdf (дата обращения 10.06.2023).
618. WOAH. Lumpy skin disease. Chapter 3.4.12. – Text : electronic // Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, twelfth edition 2023. – URL: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.12_LSD.pdf (дата обращения 15.06.2023).
619. WOAH. Q fever Chapter 3.1.17. – Text : electronic // Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, twelfth edition 2023. – URL: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.17_Q_FEVER.pdf
620. Wrathall, A.E. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilisation with virus-infected semen / A. E. Wrathall, H. A. Simmons, A. Van Soom. – Text : direct // *Theriogenology*. – 2006. – Vol. 65. – PP. 247-274.
621. 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. – Text : direct // *Can J Vet Res*. – 1995. – Vol. 59. – P. 102-109.

622. Yaeger, Michael J. Current Therapy in Large Animal Theriogenology / Michael J. Yaeger. – Text : direct // Bacterial Causes of Bovine Infertility and Abortion. – 2007. – P.389-399. – doi:10.1016/B978-072169323-1.50052-0
623. Yatsentyuk, S. P. Mycoplasma contamination of bull semen used for artificial insemination / S.P. Yatsentyuk. – Text : direct // Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture. – 2022. – Vol. 14. – № 4. – P. 260-270.
624. Yatsentyuk, S. P. PCR detection of Coxiella burnetii from bull semen samples used for artificial insemination / S.P. Yatsentyuk, E.A. Lazareva, N.S. Gorbacheva [et al]. – Text : direct // Russian Journal of Agricultural and SocioEconomic Sciences. – 2019. – № 8 – Vol. 92. – P. 293-295.

10 ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А1 – Штаммы микроорганизмов, использованные в работе

№ образца	Наименование образца
1.	<i>Mycoplasma bovis</i> ATCC25523
2.	<i>Histophilus somni</i> ATCC700025
3.	<i>Pasterella multocida</i> ATCC43137
4.	<i>Pasterella multocida</i> ATCC23639
5.	<i>Pasterella multocida</i> ATCC11039
6.	<i>Pasterella multocida</i> ATCC15742
7.	<i>Mannheimia haemolytica</i> 7-2019
8.	<i>Haemophilus parasuis</i> ATCCS19417
9.	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> ATCC33377
10.	<i>Ureaplasma diversum</i>
11.	<i>Mycoplasma bovirhinis</i> ATCC27748
12.	<i>Mycoplasma bovigenitalium</i> ATCC19852
13.	<i>Campylobacter fetus</i> 25936
14.	<i>Brucella abortus</i> 82 сеп. 022 07.01.1980 г.
15.	<i>Yersinia enterocolitica</i> № Му 03 ВНИПЧИ «Микроб»
16.	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
17.	<i>Salmonella</i> Dublin 6
18.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
19.	<i>Staphylococcus aureus</i> ВКПМВ 6646
20.	<i>Mycobacterium bovis</i> AN5 2/5-69-MS-07
21.	<i>Mycobacterium intracellulare</i> 539
22.	<i>Mycobacterium avium</i> D-4
23.	<i>Leptospira interrogans</i> Pomona ВГНКИ-6
24.	<i>Bacillus cereus</i> ВКПМВ-8076
25.	<i>Arcanobacterium pyogenes</i> ATCC-8164
26.	<i>Neospora caninum</i> ATCC-50977
27.	<i>Escherichia coli</i> 0157:H7
28.	<i>Clostridium perfringens</i> тип С «ВТ»
29.	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615
30.	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
31.	<i>Aspergillus brasiliensis</i> (niger) ATCC 16404
32.	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
33.	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659


№ образца	Наименование образца
34.	<i>Chlamydia spp.</i> (положительный материал)
35.	<i>Campylobacter sputorum subsp. bubulus</i>
36.	Bovine Herpesvirus 1 MBA 2
37.	Bovine Herpesvirus 2 ATCC-VR-845
38.	Bovine Herpesvirus 4 DN-599
39.	Lumpy skin disease virus SIS Neethling-type
40.	Bovine viral diarrheavirus Орегон С24V 04.02.98
41.	Bovine viral diarrhea virus NADL 23.05.91
42.	Штамм вируса парагриппа КРС ПТК 45186
43.	Вирус Шмалленберг (положительный материал)
44.	<i>Biberstenia trehalosi</i> (положительный материал)
45.	Вирус респираторно-синцитиальной инфекции КРС (положительный материал)
46.	<i>Bordetella bronchiseptica</i> В-С2
47.	<i>Pasteurella multocida</i> 20.03.2008
48.	<i>Pasteurella multocida</i> “5” 15.04.04
49.	<i>Pasteurella multocida</i> “15”18.05.05
50.	<i>Pasteurella multocida</i> “Elephant” 23.03.03
51.	<i>Pasteurella multocida</i> “796” 15.04.04
52.	<i>Pasteurella multocida</i> “1997” 20.03.00
53.	<i>Pasteurella multocida</i> “1059” 23.03.00
54.	<i>Pasteurella multocida</i> “Liver” 23.03.00
55.	<i>Pasteurella multocida</i> “AB” 18.04.05
56.	Equine Herpesvirus 1 (положительный материал)
57.	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> Wittling №3
58.	Bovine Herpesvirus 6 (положительный материал)
59.	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356
60.	<i>Klebsiella oxitoca</i> (положительный материал)
61.	<i>Mycoplasma arginini</i> ATCC 23838-TTR
62.	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> Q-AG141264
63.	<i>Mycoplasma orale</i> Q-AG101891
64.	<i>Mycoplasma fermentans</i> Q-AG112834
65.	<i>Mycoplasma hyorhinis</i> Q-AG149841
66.	<i>Mycoplasma synoviae</i> ATCC 25204

Таблица А2 – Наборы реагентов для ПЦР, использованные в работе

Детектируемый возбудитель	Наименование набора	Производитель набора
Вирус герпеса КРС 1 типа	LSI VetMAX™ IBR gB	Life Technologies Corporation (Франция)
	Тест-система "РИНОКОР"	АмплиСенс (Россия)
	Тест-система для диагностики инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени	ВетБиоХим (Россия)
Вирус герпеса КРС 4 типа	LSI VetMAX™ Bovine Herpes Virus Type 4	Life Technologies Corporation (Франция)
Вирус лейкоза КРС	Тест-система "ЛЕЙКОЗ"	АмплиСенс (Россия)
Вирус нодулярного дерматита КРС	Набор для выявления вируса нодулярного дерматита КРС (Lumpy skin disease)	Фрактал Био (Россия)
	Комплект реагентов «ПЦР-НОДУЛЯРНЫЙ ДЕРМАТИТ-КРС-ФАКТОР»	Вет Фактор (Россия)
Вирус диареи КРС	LSI VetMAX™ BVDV4ALL	Life Technologies Corporation (Франция)
	Тест-система «ВД»	АмплиСенс (Россия)
Вирус Шмалленберг	Тест-система «SBV»	АмплиСенс (Россия)
Вирус блютанга	LSI VetMAX™ Bluetongue Virus NS3 – All genotypes	Life Technologies Corporation (Франция)
	Набор для выявления РНК вируса блютанга	Фрактал Био (Россия)
Коронавирус КРС	Набор-реагентов «ПЦР-КОРОНАВИРУС-КРС-ФАКТОР»	Вет Фактор (Россия)
Вирус парагриппа 3 КРС	«ПЦР-ПАРАГРИПП-3-КРС-ФАКТОР»	Вет Фактор (Россия)
Виды рода <i>Chlamydia</i> <i>Coxiella burnetii</i>	Тест-система "ХЛА-КОМ"	АмплиСенс (Россия)
	LSI VetMAX™ Triplex <i>Coxiella burnetii</i> and <i>Chlamydia</i> spp	Life Technologies Corporation (Франция)
Виды рода <i>Mycoplasma</i>	Тест-система "МИК-КОМ"	АмплиСенс (Россия)
	LSI VetMAX™ <i>Mycoplasma bovis</i>	Life Technologies Corporation (Франция)
Виды рода <i>Campylobacter</i>	LSI VetMAX™ <i>Campylobacter</i> spp.	Life Technologies Corporation (Франция)
	LSI VetMAX™ <i>Campylobacter fetus</i>	Life Technologies Corporation (Франция)
	Тест-система «КАМ-БАК»	АмплиСенс (Россия)
<i>Histophilus somni</i>	LSI VetMAX™ <i>Histophilus somni</i>	Life Technologies Corporation (Франция)
<i>Coxiella burnetii</i> , <i>Chlamydia</i> spp., <i>Listeria monocitogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Campylobacter fetus</i> , <i>Leptospira</i> spp., <i>Anaplasma phagocytophila</i> , <i>Bovine herpes virus type 4</i>	VetMax™ Ruminant Abortion Screening Rit	Life Technologies Corporation (Франция)
Патогенные микроорганизмы рода <i>Leptospira</i>	Тест-система «ЛПС»	АмплиСенс (Россия)
Патогенные микроорганизмы рода <i>Brucella</i>	Тест-система «БРУ-КОМ»	АмплиСенс (Россия)
<i>Neospora caninum</i>	LSI VetMAX™ <i>Neospora caninum</i>	Life Technologies Corporation (Франция)
<i>Staphylococcus aureus</i>	«ВЕТСКРИН СТАФИПОЛЬ»	Литех (Россия)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	«ВЕТСКРИН АРУГИПОЛЬ»	Литех (Россия)
<i>Proteus</i> spp.	«ВЕТСКРИН ПРОТЕПОЛЬ»	Литех (Россия)

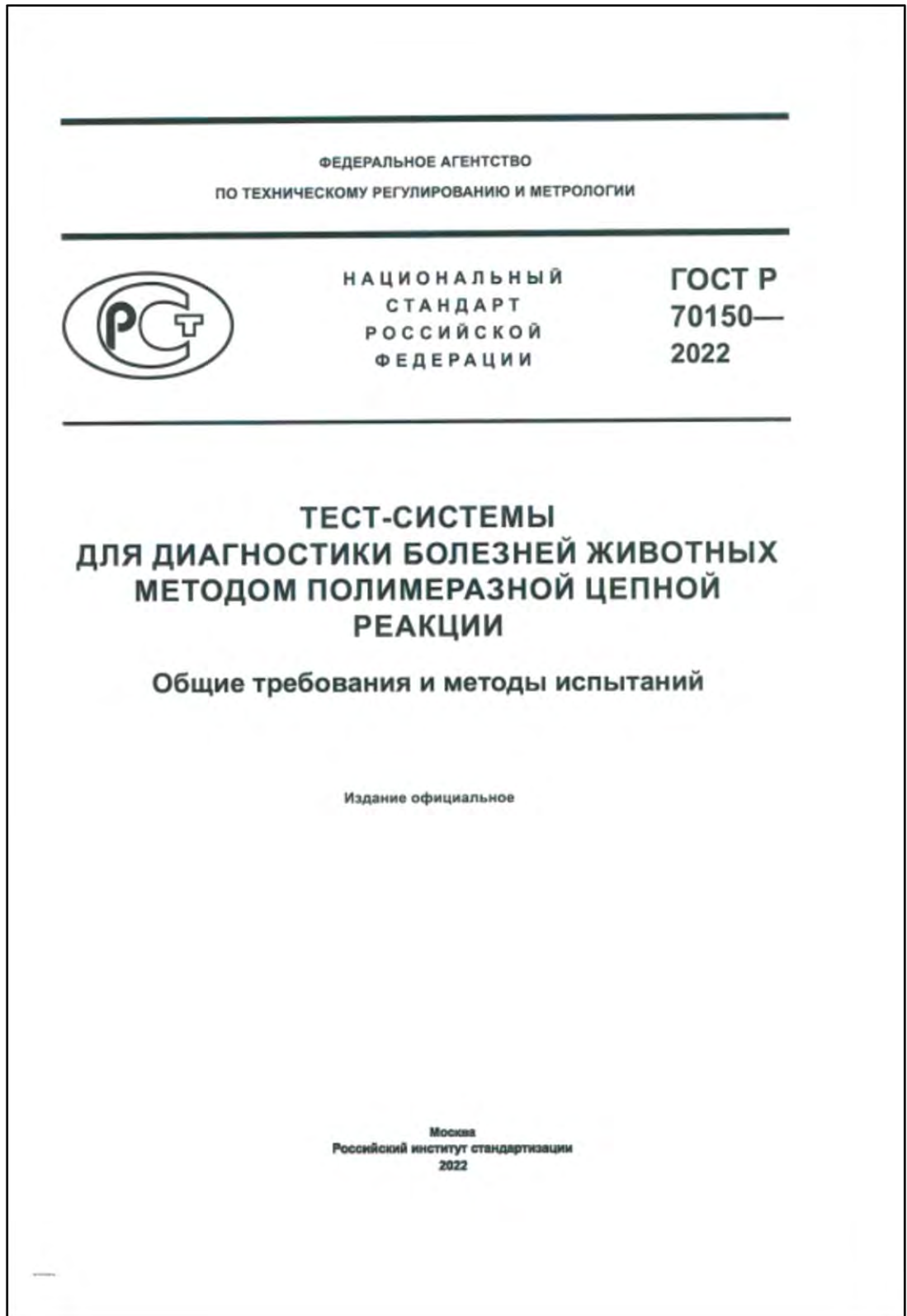
ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Письмо Исполнительного комитета Содружества Независимых Государств

СОДРУЖЕСТВО НЕЗАВИСИМЫХ ГОСУДАРСТВ		
Исполнительный комитет Высший комитет Выявляющий комитет Аграрный комитет Аварийный комитет Советский комитет		Исполнительный комитет Комитет вчрема Ученый комитет Ижрой комитет Выдающий комитет
ИСПОЛНИТЕЛЬНЫЙ КОМИТЕТ		
ул. Корень, д. 17, 220030, Минск, тел. (37517) 215 50 01, 215 50 23, факс (37517) 215 50 24 Отделение Исполнительного комитета СНГ в Российской Федерации Софийская наб., д. 34, стр. 1, Москва, 115035, тел. (7495) 190 54 00, факс (7495) 190 54 83		
E-mail: cnis@cnis.by		
27-июня 2023г	№ 5-4/01090	
Проректору по науке и инновациям Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина		
Гнездиловой Л.А.		
О взаимодействии		
Уважаемая Лариса Александровна!		
Информируем, что государства – участники СНГ приступили к реализации Комплекса совместных действий государств – участников СНГ по обеспечению биологической безопасности генетического материала при воспроизводстве сельскохозяйственных животных на период до 2026 года, утвержденного на заседании Совета глав правительств СНГ 20 мая 2022 года в г. Минске.		
Выражаем благодарность сотрудникам федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» Агринской Е.П., Боруновой С.М., Солтынской И.В., Яцентнюк С.П. за активное участие в разработке и согласовании указанного Комплекса совместных действий.		
Надеемся на дальнейшую плодотворную работу не только по реализации Комплекса совместных действий, но и при разработке других стратегически важных документов в области ветеринарии на пространстве СНГ.		
С уважением,		
Заместитель Генерального секретаря СНГ		И.Т.Нематов
Белякова Татьяна Михайловна (7495) 190 54 17, belyakova@e-cn.is.info		

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Титульный лист ГОСТ Р 70150-2022 и подписной лист окончательной редакции документа



ГОСТ Р*(проект, окончательная редакция)*

УДК 619:543.061:543.9:006.354 ОКС 11.220

Ключевые слова: ПЦР, тест-система, набор реагентов, полимеразная цепная реакция, диагностика инфекционных болезней животных, чувствительность, специфичность, стабильность, сходимость, воспроизводимость

Руководитель разработки:

Зав. отделом генодиагностики
инфекционных болезней животных
ФГБУ «ВГНКИ»

С.П. Яцентюк

Исполнители:

Ведущий научный сотрудник
отдела генодиагностики
инфекционных болезней животных

М.Б. Брюсова

Ведущий научный сотрудник
отдела генодиагностики
инфекционных болезней животных

А.Д. Козлова

Старший научный сотрудник
отдела генодиагностики
инфекционных болезней животных

М.С. Красникова

Старший специалист сектора
Технического регулирования
и стандартизации

О.Е. Гришина

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Описание изобретения к патенту № 2657609

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 657 609** (13) **C1**(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 1/30 (2006.01)ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/48 (2018.02); G01N 1/30 (2018.02); G01N 2001/305 (2018.02); G01N 1/312 (2018.02); G01N 21/6458 (2018.02)

(21)(22) Заявка: 2017128368, 08.08.2017

(24) Дата начала отчета срока действия патента:
08.08.2017Дата регистрации:
14.06.2018Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 08.08.2017

(45) Опубликовано: 14.06.2018 Бюл. № 17

Адрес для переписки:
109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23,
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Московская государственная
академия ветеринарной медицины и
биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина",
научно-исследовательский отдел

(72) Автор(ы):

Слесаренко Наталья Анатольевна (RU),
Борунова Сидфатима Мировна (RU),
Иолчиев Байлар Саррадинович (RU),
Давыдова Екатерина Евгеньевна (RU),
Яцентюк Светлана Петровна (RU),
Абрамов Павел Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Московская государственная
академия ветеринарной медицины и
биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина"
(ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К.И.
Скрябина) (RU),
Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Всероссийский
государственный Центр качества и
стандартизации лекарственных средств для
животных и кормов" ФГБУ "ВГНКИ" (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: EP 2191021 B1, 29.04.2015.
BALLACHEY B.E. et al. The sperm chromatin
structure assay. Relationship with alternate tests
of semen quality and heterospermic
performance of bulls. J Androl. 1988 Mar-Apr;
9(2): 109-15. RU 2568845 C1, 20.11.2015.(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНДЕКСА ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК СПЕРМАТОЗОИДОВ У
ЖИВОТНЫХ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области
биотехнологии и предназначено для определения
индекса фрагментации ДНК сперматозоидов у
животных-производителей. Осуществляют
подготовку мазка спермопробы к окрашиванию
и приготовление красителя смешиванием
раствора лимонной кислоты, гидрофосфата
натрия и 1%-го акридин оранжевого. Погружаютобразец в краситель. Выполняют микроскопию.
Подсчитывают сперматозоиды с
фрагментированной ДНК и нормальных, при
этом сперматозоиды с фрагментированной ДНК
окрашиваются в красный, желтый или оранжевый
цвета, нормальные - в зеленый цвет. При
выявлении индекса фрагментации более 30%
спермопроба выбраковывается и не допускается

Стр. 1

RU 2 6 5 7 6 0 9 C 1

RU 2 6 5 7 6 0 9 C 1

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Титульный лист патента № 2752893

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ
НА ИЗОБРЕТЕНИЕ
№ 2752893

**НАБОР ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ И СПОСОБ
ИДЕНТИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ДНК БАКТЕРИИ
Histophilus somni МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО
ВРЕМЕНИ**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное учреждение "Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов" (ФГБУ "ВГНКИ") (RU)*

Авторы: *Яценюк Светлана Петровна (RU), Козлова Александра Дмитриевна (RU), Поболелова Юлия Илдаровна (RU), Красникова Мария Сергеевна (RU), Брюсова Мария Борисовна (RU), Рудняев Данил Александрович (RU)*

Заявка № **2020124793**
Приоритет изобретения **16 июля 2020 г.**
Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **11 августа 2021 г.**
Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **16 июля 2040 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*


Г.П. Ивлиев



ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Титульный лист патента № 27770204



ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Описание изобретения к патенту № 2787048

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) RU (11) 2 787 048⁽¹³⁾ C1(51) МПК
C12Q 1/68 (2006.01)ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12Q 1/68 (2022.08)

(21)(22) Заявка: 2022114259, 27.05.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.05.2022Дата регистрации:
28.12.2022Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 27.05.2022

(45) Опубликовано: 28.12.2022 Бюл. № 1

Адрес для переписки:
123022, Москва, Звенигородское ш. 5. ФГБУ
"ВГНКИ", Отдел научного планирования и
НИР, Филатова Ольга Александровна

(72) Автор(ы):

Яцентюк Светлана Петровна (RU),
Козлова Александра Дмитриевна (RU),
Горбачева Наталья Сергеевна (RU),
Красникова Мария Сергеевна (RU),
Пчельников Александр Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Всероссийский
государственный Центр качества и
стандартизации лекарственных средств для
животных и кормов" (ФГБУ "ВГНКИ") (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: ЯЦЕНТЮК С.П. и др.
Использование метода пцр для выявления
возбудителей инфекционных болезней в
сперме крупного рогатого скота, RJOAS,
10(70), October 2017, с. 331-337, DOI
<https://doi.org/10.18551/rjoas.2017-10.47>,
https://rjoas.com/issue-2017-10/article_47.pdf. P.E.
MORÁN, et al., Search for the genome
of bovine herpesvirus types 1, 4 (см. прод.)

(54) Способ детекции ДНК вируса герпеса КРС 6 типа в биологическом материале крупного рогатого скота методом ПЦР в режиме реального времени

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, ветеринарной вирусологии и может применяться для выявления вируса герпеса КРС 6 типа. Способ предполагает проведение ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с использованием набора олигонуклеотидов, комплементарных области гена ДНК-полимеразы (ORF9) ВоHV-6, включающего: прямой праймер BHV6-pol-F (5'-

ACAGACGGGCAGCAGATAAG -3'), обратный п р а й м е р В Н В 6 - p o l - R (5' - ATGGTTCGCCCTGTAGAGT -3') и флуоресцентно-меченый зонд BHV6-pol-Z (5'-(R6G)CAGGACGGGATACCAGGGCGCTACAG (BHQ-1) -3'). Способ обладает высокой специфичностью и может быть использован при тестировании сыворотки и криоконсервированной спермы КРС. 3 ил., 1 табл., 3 пр.

(56) (продолжение):

and 5 in bovine semen, Open Veterinary Journal, (2013), Vol. 3(2): 126-130 https://www.researchgate.net/publication/259495695_Search_for_the_genome_of_bovine_herpesvirus_types_1_4_and_5_in_bovine_semen. ROVNAK J, et


ПРИЛОЖЕНИЕ И

Титульный лист Методики выявления и дифференциации *Mycoplasma bovis* и *Mycoplasma californicum* на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации и выписка из протокола заседания секции «Зоотехния и ветеринария» РАН.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И
СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ»
ФГБУ «ВГНКИ»

«У Т В Е Р Ж Д А Ю»

Зам. руководителя Секции
«Зоотехния и ветеринария»
отделения сельскохозяйственных наук РАН
Академик РАН
М.И. Гулюкин


« 8 » августа 2017 г.

МЕТОДИКА ВЫЯВЛЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ МИКОПЛАЗМ КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА *MYCOPLASMA BOVIGENITALIUM* И *MYCOPLASMA*
***CALIFORNICUM* НА ОСНОВЕ ПЦР С ГИБРИДИЗАЦИОННО-**
ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Москва 2017

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
 Отделение сельскохозяйственных наук РАН
 Секция «Зоотехния и ветеринария»

ВЫПИСКА

Из протокола № 63 заседания секции «Зоотехния и ветеринария» отделения
 сельскохозяйственных наук РАН

от 24 января 2017 г.

Слушали: рассмотрение Методических рекомендаций «Выявления и дифференциации микоплазм крупного рогатого скота *Mycoplasma bovis* и *Mycoplasma californicum* на основе ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов», представленных Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ФГБУ «ВГНКИ»).

Методические рекомендации разработаны отделом генодиагностики инфекционных болезней животных ФГБУ «ВГНКИ» (Яцентюк С.П., к.б.н. Козловой А.Д., к.б.н. Горбачевой Н.С., Ярловой Е.А.)

Методические рекомендации предназначены для использования исследования спермопродукции в племенных центрах страны, научных лабораториях области биотехнологии и репродукции животных, центрах воспроизводства продуктивных и не продуктивных животных.

В рецензии доцента кафедры диагностики болезней, терапии, акушерства и репродукции животных ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА им. К.И. Скрябина к.б.н. Абрамова П.Н. дана положительная оценка на представленные методические рекомендации.

Постановили: одобрить Методические рекомендации «Выявления и дифференциации микоплазм крупного рогатого скота *Mycoplasma bovis* и *Mycoplasma californicum* на основе ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов» и представить на утверждение.

Зам. руководителя секции «Зоотехния и ветеринария»
 отделения сельскохозяйственных наук РАН
 Академик РАН

Секретарь
 кандидат биологических наук



М.И. Гулюкин

Л.А. Иванова

ПРИЛОЖЕНИЕ К

Методические рекомендации по оздоровлению отечественных скотоводческих хозяйств, неблагополучных по инфекционным заболеваниям, вызванным антибиотикорезистентными штаммами бактерий (молекулярно-генетический метод выявления гистофилеза крупного рогатого скота и способ его лечения)

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «МОСКОВСКАЯ
ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ
И БИОТЕХНОЛОГИИ – МВА ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА»

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель секции
зоотехнии и ветеринарии
Отделения сельскохозяйственных
наук РАН, академик РАН
В.В. Калашников
2021 г.



Методические рекомендации по оздоровлению скотоводческих хозяйств, неблагополучных по инфекционным заболеваниям, вызванных антибиотикорезистентными штаммами бактерий (молекулярно-генетический метод выявления гистофилеза крупного рогатого скота и способы его лечения)



Москва – 2021

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ «МОСКОВСКАЯ
ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ И
БИОТЕХНОЛОГИИ – МВА имени К.И. СКРЯБИНА»

РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРЕССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И
СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И
КОРМОВ» (ФГБУ «ВГНКИ»)

Киш Л.К., Яценюк С.П., Воронова С.М., Руднев Д.А.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
по оздоровлению скотоводческих хозяйств, неблагополучных по инфекционным
заболеваниям, вызванным антибиотикорезистентными штаммами бактерий
(молекулярно-генетической метод выявления гистофилем
крутого рогатого скота и способы его лечения)

Москва – 2021

ПРИЛОЖЕНИЕ Л
Диплом выставки «Золотая осень 2021»

ЗОЛОТАЯ | 20
ОСЕНЬ | 21



XXIII ВСЕРОССИЙСКАЯ АГРОПРОМЫШЛЕННАЯ ВЫСТАВКА

ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЕТСЯ
ЗОЛОТОЙ МЕДАЛЬЮ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»), г. Москва

*«За разработку методики:
идентификации и титрования изолатов возбудителя гемифилеза крупного рогатого скота *Histophilus somni* методом ПЦР с гибридоциционно- флуоресцентной детекцией продуктов амплификации;
выявления и идентификации возбудителей пастереллеза *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica* методом ПЦР с гибридоциционно- флуоресцентной детекцией в режиме реального времени»*

Министерство сельского хозяйства
и продовольствия Российской Федерации

Д.Н. ПАТРУШЕВ

ПРИЛОЖЕНИЕ М

Первый лист инструкции по применению тест-системы для идентификации и типирования изолятов возбудителя гемофилеза крупного рогатого скота *Histophilus somni* методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБУ «ВГНКИ»

И.К.Киш
2019 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению тест-системы для идентификации и типирования изолятов возбудителя гемофилеза крупного рогатого скота *Histophilus somni* методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Тест-система предназначена для выявления ДНК *Histophilus somni* и генов устойчивости к антибиотикам в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Тест-система рассчитана на постановку 55 реакций амплификации, включая контроли.

Тест-система состоит из следующих компонентов:

Комплект реагентов «Выявление ДНК <i>Histophilus somni</i> »	
ПЦР-смесь-1-FRT <i>H.somni</i>	1 пробирка, 0,6 см ³ (мл)
ПЦР-буфер	2 пробирки, 0,6 см ³ (мл)
Полимераза (TaqF)	1 пробирка, 0,09 см ³ (мл)
ПКО ДНК <i>H.somni</i>	1 пробирка, 0,1 см ³ (мл)
ДНК-буфер	1 пробирка, 0,5 см ³ (мл)
К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:	
ОКО	1 пробирка, 1,2 см ³ (мл)
ВКО	1 пробирка, 1,0 см ³ (мл)
Дополнительные реагенты - комплект реагентов «Антибиотикорезистентность».	
ПЦР-смесь-1-FRT Sul2	1 пробирка, 0,6 см ³ (мл)
ПЦР-смесь-1-FRT StrA/B	1 пробирка, 0,6 см ³ (мл)
ПКО ДНК Sul2	1 пробирка, 0,1 см ³ (мл)
ПКО ДНК StrA/B	1 пробирка, 0,1 см ³ (мл)

В тест-систему не входят реактивы для выделения ДНК. Выделение ДНК может проводиться с помощью наборов реагентов для экстракции ДНК на основе сорбционного или преципитационного метода.

Упаковка и маркировка.

Комплекты вкладывают в коробку (застегивающийся пакет из полиэтилена). На пробирках с каждым компонентом должна быть наклеена этикетка с указанием краткого наименования компонента, количества препарата в пробирке, номера серии и даты изготовления, а также условий хранения. На каждую упаковку наклеивают этикетку, на

ПРИЛОЖЕНИЕ Н

Письмо о подтверждении включения разработанных методик в область аккредитации Испытательного центра ФГБУ «ВГНКИ» RA.RU.21ФВ02



РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
 БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
 «ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
 ЦЕНТР КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ
 ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ
 ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ»
 (ФГБУ «ВГНКИ»)

По месту требования

123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5
 тел.: (495) 982-50-84, факс (499) 253-14-91
 ИНН 7703056867, КПП 770301001
 E.mail: vgnki@fsvps.gov.ru
 http://vgnki.ru

20.01.2023 № 111/1

Настоящим письмом подтверждаем, что следующие методики, разработанные под руководством заведующего отделом генодиагностики инфекционных болезней животных Федерального государственного бюджетного учреждения "Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов" (ФГБУ "ВГНКИ") Яцентюк С.П., входят в область аккредитации Испытательного центра. Уникальный номер записи об аккредитации в реестре аккредитованных лиц - RA.RU.21ФВ02:

1. Методика по выявлению и дифференциации *Mycoplasma bovis* и *Mycoplasma californicum* на основе ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации, ФГБУ «ВГНКИ»;
2. Методика выявления ДНК *Mycoplasma bovis* на основе ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации; ФГБУ «ВГНКИ»;
3. Методика выявления ДНК *Ureaplasma diversum* на основе ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации; ФГБУ «ВГНКИ»;

4. Методика выявления генома вируса болезни Шмалленберг на основе ПЦР с гибридационнофлуоресцентной детекцией продуктов амплификации ФГБУ «ВГНКИ»;
5. Методика выявления ДНК вируса нодулярного дерматита на основе ПЦР с гибридационнофлуоресцентной детекцией продуктов амплификации; ФГБУ «ВГНКИ»;
6. Методика идентификации и типирования изолятов возбудителя гемофилеза крупного рогатого скота *Histophilus somni* методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации, ФГБУ «ВГНКИ».

За период с 2020 по 2023 гг. в Испытательном центре ФГБУ «ВГНКИ» проведены исследования 355 образцов (1022 исследования) спермы быков, из них положительных 67 образцов (18,9%) (132 исследований – 12,9%).

Заместитель директора



М.А. Гергель

ПРИЛОЖЕНИЕ П

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И
СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И
КОРМОВ»
(ФГБУ «ВГНКИ»)

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБУ «ВГНКИ»

В.В. Никулин
«» 2018 г.
ДОКУМЕНТ


МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

МЕТОДИКА ПО ВЫЯВЛЕНИЮ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ *Mycoplasma bovis* И *Mycoplasma californicum* НА ОСНОВЕ ПЦР С ГИБРИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Москва 2018

Предисловие

Данные методические рекомендации разработаны федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»).

Разработчики:

Зав. отделением биотехнологии



И.А. Капитова

Зав. отделом генодиагностики
инфекционных болезней животных
Зам. зав. отделом генодиагностики
инфекционных болезней животных



С.П. Яценюк



Е.А. Ярлова

Научный сотрудник отдела генодиагностики
инфекционных болезней животных



А.Д. Козлова

Младший научный сотрудник отдела
генодиагностики инфекционных болезней
животных



Н.С. Горбачева

Телефон/факс: (499) 253-14-68 / (499) 253-14-91
E-mail: kanc@vgnki.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ Р

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И
СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И
КОРМОВ»
(ФГБУ «ВГНКИ»)

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБУ «ВГНКИ»
Л.К.Кит
« 9 » Мая » 2018 г.



МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
МЕТОДИКА ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК *UREAPLASMA DIVERSUM* НА ОСНОВЕ ПЦР С
ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ ПРОДУКТОВ
АМПЛИФИКАЦИИ

Москва 2018

Предисловие

Данные методические рекомендации разработаны федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»).

Разработчики:

Зав. отделением биотехнологии



М.А. Гергель

Зав. отделом генодиагностики
инфекционных болезней животных
Зам. зав. отделом генодиагностики
инфекционных болезней животных



С.П. Яцентюк



Е.А. Яралова

Научный сотрудник отдела генодиагностики
инфекционных болезней животных



А.Д. Козлова

Младший научный сотрудник отдела
генодиагностики инфекционных болезней
животных



Н.С. Горбачева

ПРИЛОЖЕНИЕ С

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И
СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И
КОРМОВ»
(ФГБУ «ВГНКИ»)

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБУ «ВГНКИ»

Л.К.Киш

«9» _____ 2018 г.



МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
МЕТОДИКА ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК *Mycoplasma bovis* НА ОСНОВЕ ПЦР С
ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ ПРОДУКТОВ
АМПЛИФИКАЦИИ


Москва 2018

Предисловие

Данные методические рекомендации разработаны федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»).

Разработчики:

Зав. отделением биотехнологии

 М.А. Гергель

Зав. отделом генодиагностики
инфекционных болезней животных

 С.П. Яцентюк

Научный сотрудник отдела генодиагностики
инфекционных болезней животных

 А.Д. Козлова

Младший научный сотрудник отдела
генодиагностики инфекционных болезней
животных

 Н.С. Горбачева

ПРИЛОЖЕНИЕ Т

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ»
(ФГБУ «ВГНКИ»)

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБУ «ВГНКИ»
Л.К. Киш
« 2018 г.



МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

МЕТОДИКА ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА ШМАЛЕНБЕРГ В СПЕРМЕ КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА НА ОСНОВЕ ПЦР С ГИБРИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ
ДЕТЕКЦИЕЙ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Москва 2018

Предисловие

Данные методические рекомендации разработаны федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»).

Разработчики:

Зав. отделением биотехнологии



М.А.Гергель

Зав. отделом генодиагностики
инфекционных болезней животных



С.П. Яцентюк

Старший научный сотрудник отдела
генодиагностики инфекционных болезней
животных



А.Д. Козлова

Научный сотрудник отдела генодиагностики
инфекционных болезней животных



М.С. Красникова

Телефон/факс: (499) 253-14-68 / (499) 253-14-91
E-mail: kanc@vgnki.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ У

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И
СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И
КОРМОВ»
(ФГБУ «ВГНКИ»)

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБУ «ВГНКИ»
Л.К.Ким
« 30 » 2019 г.



МЕТОДИКА ИДЕНТИФИКАЦИИ И ТИПИРОВАНИЯ ИЗОЛЯТОВ
ВОЗБУДИТЕЛЯ ГЕМОФИЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА *HISTOPHILUS*
SOMNI МЕТОДОМ ПЦР С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ
ДЕТЕКЦИЕЙ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Москва 2019

Предисловие

Данная методика разработана федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»).

Телефон/факс: (499) 253-14-68 / (499) 253-14-91
E-mail: kanc@vgnki.ru

Разработчики:

Зав. отделом генодиагностики
инфекционных болезней животных



Яцентюк С.П.

Ведущий научный сотрудник отдела
генодиагностики инфекционных болезней
животных



Брюсова М.Б.

Старший научный сотрудник отдела
генодиагностики инфекционных болезней
животных



Козлова А.Д.

Старший научный сотрудник отдела
генодиагностики инфекционных болезней
животных



Красникова М.С.

Старший научный сотрудник отдела
генодиагностики инфекционных болезней
животных



Поболелова Ю.И.

Аспирант отдела генодиагностики
инфекционных болезней животных



Руднев Д.А.



Герболь М.А.

ПРИЛОЖЕНИЕ Ф

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ
МЕДИЦИНЫ И BIOTEХНОЛОГИИ имени К.И. Скрябина.

Базовая Кафедра «Биологическая безопасность объектов ветеринарного
надзора и обращения лекарственных средств в ветеринарии»

Проректор по учебной работе Пигина С.Ю., проректор по науке и инно-
вациям Гнездилова Л.А. профессор Борунова С.М. доценты: Грицюк
В.А., Агринская Е.П., Кисс И.В., Яцентюк С.П.

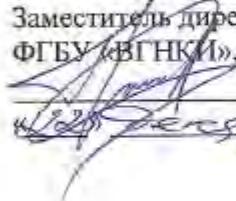
Концепция и доктрина продовольственной безопасности России

Москва 2021

ПРИЛОЖЕНИЕ X

РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР

**Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский
государственный Центр качества и стандартизации
лекарственных средств для животных и кормов»
ФГБУ «ВГНКИ»**

Согласовано
Заместитель директора
ФГБУ «ВГНКИ», к.х.н.
 А.В. Третьяков
2022 г.

Утверждаю
Директор ФГБУ «ВГНКИ»,
к.вет.н.
 Л.К. Киш
2022 г.


РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ

**«Современные методы лабораторной диагностики
бактериальных болезней животных»**

Группа научных специальностей
4.2. ЗООТЕХНИЯ И ВЕТЕРИНАРИЯ

Научная специальность
4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

Уровень высшего образования
**Подготовка кадров высшей квалификации
(подготовка научных и научно-педагогических
кадров в аспирантуре)**

Форма обучения
Очная

Москва 2022

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА СОСТАВЛЕНА НА ОСНОВАНИИ:

- ФГТ - федеральных государственных требований к структуре программ подготовки научных и научно-педагогических кадров в аспирантуре (Адъюнктуре), условиям их реализации, срокам освоения этих программ с учетом форм обучения, образовательных технологий и особенностей отдельных категорий аспирантов (адъюнктов), утвержденных приказом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации от 20.10.2021 № 951;

- паспорта научной специальности 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных, утвержденного приказом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации от 24.02.2021 № 118 «Об утверждении номенклатуры научных специальностей, по которым присуждаются ученые степени, и внесении изменения в Положение о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, утвержденное приказом Министерства образования и науки Российской Федерации от 10.11.2017 № 1093;

- основной профессиональной образовательной программы по направлению подготовки 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных ФГБУ «ВГНКИ».

РАЗРАБОТЧИКИ:

заведующий отделением биотехнологии,
к.в.н.


 О.Е. Иванова

заведующий отделом генодиагностики
инфекционных болезней животных,
к.биол.н.

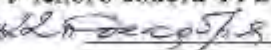

 С.П. Яцентюк

РЕЦЕНЗЕНТ:

главный научный сотрудник отдела
санитарной и клинической микробиологии, д.биол.н.,
доцент

 С.М. Борупова

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ РАССМОТРЕНА И ОДОБРЕНА:

на заседании Учёного совета ФГБУ «ВГНКИ»,
протокол от  2022 г. № 

Ученый секретарь, д.биол.н., профессор

 Н.К. Букова