

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении "Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов" (ФГБУ «ВГНКИ»)

Научный консультант:

Капустин Андрей Владимирович, доктор биологических наук, доцент, заместитель директора по научной работе ФГБНУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

Официальные оппоненты:

Марзанов Нурбий Сафарбиевич - доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики сельскохозяйственных животных ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста» (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста);

Мымрин Владимир Сергеевич – доктор биологических наук, профессор кафедры зоотехнии ФГБОУ ВО «Уральский государственный аграрный университет» (ФГБОУ ВО Уральский ГАУ);

Кузьмин Владимир Александрович – доктор ветеринарных наук, профессор кафедры эпизоотологии имени В.П. Урбана ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГУВМ).

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук» (СФНЦА РАН).

Защита диссертации состоится «04» июня 2024 г. в 11-00 ч. на заседании диссертационного совета 24.1.249.03, созданного при ФГБНУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» по адресу: 123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, д. 5.

Телефон: 8 (499) 256-35-81, E-mail: yniivshe@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВНИИВСГЭ - филиала ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН по адресу: 123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, д. 5, и на сайтах: www.viev.ru и www.vak.minobrnauki.gov.ru

Автореферат разослан « _____ » _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор биологических наук _____ Денисова Елизавета Аркадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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. 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. Криоконсервированная сперма быков производится внутри страны на племенных предприятиях, а также весьма активно импортируется на территорию России [Борунова, 2019]. 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). 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. 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 [Eaglesome et al., 1997; Joya et al., 2010; Naarala et al., 2018]. 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 [Стегний и др., 2013; Wentink et al., 2000; de Ruigh et al., 2006].

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 [Бугров, 1986; Музыка и др., 2012; Грязнева и др., 2017; Гарафутдинова, 2018; Анипченко, 2020; Нефедченко и др., 2022; Сушкова, 2022; Абед Алхуссен 2023; Moretti et al., 2009; Sharifzadeh et al., 2011; Givens, 2018 и др.]. Отечественные специалисты при оценке качества и безопасности спермы быков-производителей основное внимание уделяли морфофункциональным особенностям половых клеток [Андреев, 2015; Евтух, 2014; Ескин и др., 2010; Кидун и др., 2013; Борунова, 2017]. В последние годы происходит

внедрение молекулярно-генетических технологий во все сферы племенного молочного 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 [Эрнст и др., 2011; Зиновьева и др., 2012; Борунова, 2019]. При этом проблеме выявления в спермопродукции возбудителей инфекционных болезней крупного рогатого скота уделяется все еще недостаточно внимания. Традиционно при тестировании спермопродукции используются культуральные методы [Борунова, 2019; Сушкова, 2022], в последнее время все больше исследователей используют методы амплификации нуклеиновых кислот для детекции генетического материала бактерий и вирусов [Стегний и др., 2013; Нефедченко и др., 2022; Абед Алхуссен, 2023]. 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 крупного рогатого скота б 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. При выполнении данной работы предложены оригинальные методики на основе ПЦР с гибридационно-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. 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.

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 гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации».

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)».

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».

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» и редакции ГОСТ 32198-2013 «Средства воспроизводства. Сперма. Методы микробиологического анализа».

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

- Методика по выявлению и дифференциации *Mycoplasma bovis* и *Mycoplasma californicum* на основе ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации»;

- Методика выявления ДНК *Ureaplasma diversum* на основе ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации;

- Методика выявления ДНК *Mycoplasma bovis* на основе ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации;

- Методика выявления генома вируса болезни Шмалленберг на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации;

- Методика идентификации и типирования изолятов возбудителя гемофилеза крупного рогатого скота *Histophilus somni* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Методика переведена в формат тест-системы. Разработан и рассмотрен на заседании научно-технического совета Россельхознадзора 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».

Получены патенты:

- № 2657609 на способ определения индекса фрагментации ДНК сперматозоидов у животных-производителей;

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

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

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

Материалы диссертационной работы использованы при подготовке программ обучения студентов кафедры «Биологическая безопасность объектов ветеринарного надзора и обращения лекарственных средств в ветеринарии» ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, повышения квалификации «ПЦР-диагностика инфекционных болезней животных» и подготовки научных и научно-педагогических кадров в аспирантуре, реализуемых в ФГБУ «ВГНКИ».

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.

- Результаты анализа нормативно-правовой базы, регулирующей обращение племенной продукции в Российской Федерации.
- Обоснование требований к ПЦР-тест-системам, используемым для тестирования спермопродукции.
- Результаты тестирования образцов криоконсервированной спермы быков-производителей наличие генетического материала 11 вирусных и 14 бактериальных патогенов.
- 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 *H. somni*.
- Результаты изучения последовательностей полного генома изолятов *H. somni*, выделенных на территории Российской Федерации.
- Алгоритм контроля и принятия решений при тестировании микоплазменного загрязнения спермопродукции с применением ПЦР и культуральных методов.
- 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 НТС Россельхознадзора (Москва, 2017–2021 гг.), секции Зоотехния и ветеринария Отделения сельскохозяйственных наук РАН (Москва, 2018, 2021), а также на следующих научных конференциях: «Молекулярная диагностика», (Москва, 2017 г., 2018 г., 2021); «Перспективы и актуальные проблемы развития высокопродуктивного молочного и мясного скотоводства» (Витебск, 2017 г.); «Генетический материал - стратегический запас страны. Требования к проведению контроля качества генетического материала» (Быково, 2017 г.); Конгресс Европейской ассоциации ветеринарной лабораторной диагностики (Брюссель, 2018 г., Севилья, 2022 г.); «Научное обеспечение агропромышленного комплекса» (Краснодар, 2019 г.); «Достижения молодых ученых - в ветеринарную практику», (Владимир, 2019 г.); АгроЕвразия 2021 «Климат, экология, сельское хозяйство Евразии» (п. Молодежный, 2021 г.); «Инновационные решения актуальных вопросов биобезопасности» (Казань, 2022 г.); «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии, биотехнологии и экспертизы сырья и продуктов животного происхождения» (Москва, 2022 г.); «Устойчивое развитие: ветеринария, сельское хозяйство, аграрная техника и экология» (VMAEE2022) (Москва, 2022); «Сохранение и преумножение генетических ресурсов микроорганизмов» (Санкт-Петербург, 2023), «Обеспечение продовольственной безопасности: стратегия и решения» (Екатеринбург, 2023 г.), «Достижения и проблемы ветеринарной медицины на крайнем севере Российской Федерации» (Якутск, 2023).

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. Участие всех соавторов отражено в совместных публикациях.

Публикации. Автором по теме диссертации опубликована 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.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обзор литературы.

В разделе представлены данные по использованию и рискам искусственного осеменения в современном животноводстве, инфекционных агентах, выявляемых в спермопродукции быков-производителей. Представлены данные об использовании молекулярно-генетических методик и ПЦР-тест-систем при выявлении инфекционных агентов в сперме и требования к племенной продукции в разных странах.

Материалы и методы исследований.

Работа выполнена в период с 2016 по 2023 гг. в отделении биотехнологии ФГБУ «ВГНКИ». Исследовали спермодозы от быков из племенных центров Российской Федерации, Нидерландов, Великобритании, США. В работе также использовали биологический материал от животных разных возрастных, половых и физиологических

групп с признаками респираторных и репродуктивных поражений. Для оценки специфичности разрабатываемых методик использовали штаммы и изоляты микроорганизмов фонда «Всероссийская государственная коллекция штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве» ФГБУ «ВГНКИ». Культивирование микроорганизмов семейства *Mycoplasmataceae* проводили на специфических средах по методу М. Ogata с модификациями [Orlova et al., 2018]. Для выявления *H. somni* использовали шоколадный агар и питательную среду CM0898В с добавлением саплимента FD117. Чувствительность изолятов *H. somni* к антибактериальным препаратам определяли диско-диффузионным методом, сравнивая зоны задержки роста микроорганизма с использованием рекомендаций Института клинических и лабораторных стандартов США (CLSI). Вирусологические исследования проводили общепринятыми методами, выборочное культивирование образцов спермы быков проводили в перевиваемой культуре клеток почки теленка (MDBK).

Экстракцию нуклеиновых кислот проводили вручную с использованием коммерческих наборов нескольких производителей. Также применяли автоматизированное выделение ДНК с помощью станции NucliSENS easyMAG (bioMérieux). Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора реагентов «Реверта-L» (ФБУН «ЦНИИЭ») по инструкции производителя. Выбор олигонуклеотидных праймеров и TaqMan-зондов осуществляли на основе анализа нуклеотидных последовательностей целевых микроорганизмов, представленных в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) с использованием программ «Clustal», «Vector NTI Suite» и др. Комплиментарность гомологичным последовательностям оценивали с использованием алгоритма BLAST на поисковом интернет-ресурсе www.ncbi.nlm.nih.gov.

Выявление инфекционных агентов в сперме быков проводили с использованием 29 тест-систем и наборов реагентов для ПЦР разных производителей, а также с применением собственных разработанных методик. Для амплификации ДНК использовали TaqF ДНК-полимеразу и 5X ПЦР-буфер (ФБУН «ЦНИИЭ»), смесь дНТФ 25мМ (ООО «Синтол») и олигонуклеотиды. ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторах Rotor-Gene Q (Qiagen) и CFX96 (BioRad) в оптимизированном режиме, классическую ПЦР - в амплификаторах «Терцик» (ДНК-Технология). Положительные контрольные образцы (ПКО) получали методом трансформации компетентных клеток *E.*

coli плазмидами pAL2-T, содержащими целевые фрагменты. Секвенирование фрагментов амплификации по Сенгеру выполняли с использованием капиллярного автоматического секвенатора ABI-3100 PRISM Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Секвенирование «нового поколения» проводили на платформе Illumina Miseq по стандартным протоколам. Для биоинформатического анализа при метагеномных исследованиях использовали встроенное программное обеспечение Illumina «Metagenomics 16S rRNA», а также пакет программ QIIME2. Сборку геномов de novo проводили с помощью программы SPAdes_2.11.1. Поиск 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/>).

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Анализ современного состояния контроля биобезопасности племенного материала.

В результате анализа информации о ввозимой через границу криоконсервированной сперме быков-производителей за период с 2017 по 2022 год показано, что основной объем племенной продукции в Российскую Федерацию поступает из-за рубежа (таблица 1).

Таблица 1 – Ввоз спермодоз на территорию Российской Федерации за 2017-2022 годы

| 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 |

Изучение нормативной базы и требований к качеству и безопасности племенной продукции выявило существующие проблемы с контролем загрязнения спермы, в частности, вирусными агентами и микоплазмами.

Исследования 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 возбудителей: вируса герпеса КРС 1 типа (BHV-1), вируса герпеса 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).

Генетический материал LSDV, BCOV, BPIV-3, SBV, BTV, BLV не был выявлен ни в одном из исследованных образцов. ДНК BHV-1 и BHV-4 была выявлена как в российской (0,94% и 0,47% исследованных образцов соответственно), так и в импортированной спермопродукции (1,7% и 1,28% соответственно), в то время как генетический материал BVDV обнаруживали только в импортируемой из США племенной продукции (0,45% всех исследованных образцов).

Вирусологическое исследование случайным образом отобранных образцов криоконсервированной спермы быков подтвердило результаты ПЦР и показало наличие в одном из исследованных восьми образцов жизнеспособного BHV-1. Для поиска новых возможных вирусных контаминантов спермы быков был проведен подбор олигонуклеотидных праймеров для ПЦР-тестирования спермы на наличие фрагментов генома вируса герпеса КРС 6 типа (BHV-6) и кобувируса (Bovine kobuvirus). Геном кобувируса выявлен не был, а ДНК BHV-6 была детектирована в образцах спермы быков из отечественных (34,1%) и иностранных племенных центров (6,86%). В связи с высокой частотой выявления в спермопродукции генетического материала BHV-6 была проведена разработка способа выявления ДНК этого вируса на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Разработку этой и других приведенных в работе методик на основе ПЦР в режиме «реального времени» проводили по схеме, представленной на рисунке 3.

Разработка методики выявления ДНК BHV-6.

При выборе олигонуклеотидов для детекции ДНК BHV-6 (таблица 2) рассчитывали температуру отжига, изучали возможность формирования димеров и вторичную структуру олигонуклеотидов, кроме того, учитывали структуру праймеров, используемых для амплификации внутреннего контроля (ВКО). Подобранные праймеры и зонд для ПЦР в реальном времени позволили проводить амплификацию и детекцию в амплификаторах RotorGene Q или CFX96 в мультиплексном формате. Специфичность методики выявления ДНК BHV-6 показана при тестировании панели образцов,

содержащей ДНК/кДНК 36 различных микроорганизмов и вирусов, вызывающих инфекционные заболевания КРС.

Рисунок 3. Схема проведения разработки методик на основе ПЦР в режиме «реального времени».

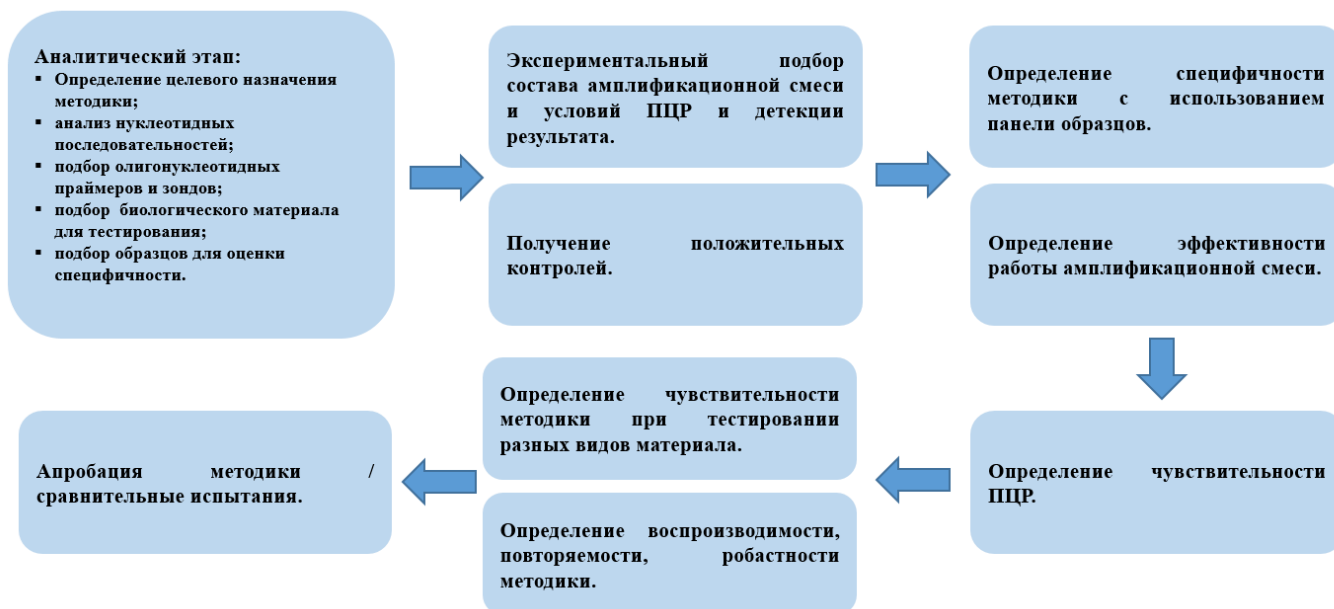


Таблица 2 – Олигонуклеотиды и программа для амплификации и детекции ДНК ВНУ-6

| Название праймера | Нуклеотидная последовательность 5'-3' | Ген-мишень | Программа |
|-------------------|--|------------|--|
| BHV6-pol-F | ACAGACGGGCAGCAGATAAG | Dpol | 95°-15 мин 95°-10сек 60°-20сек 72°-10 сек 95°-10сек 55°-20сек 72°-10 сек |
| BHV6-pol-R | ATGGTTCGCCCCTGTAGAGT | | |
| BHV6-prb | R6GCACGGACGGATACCAGGGCGCTACAGBHQ1 | | |
| | | 5 | |
| | | 35* | |

По результатам амплификации последовательных десятикратных разведений образца ПКО чувствительность работы системы олигонуклеотидов при тестировании спермы КРС составила 4×10^3 коп/мл (рис. 4). Исследование образцов спермы показало 100% соответствие результатов тестирования, полученных при применении классической ПЦР. В дальнейшем методика была валидирована для тестирования сыворотки и цельной крови КРС и использована при проведении исследований материала от животных.

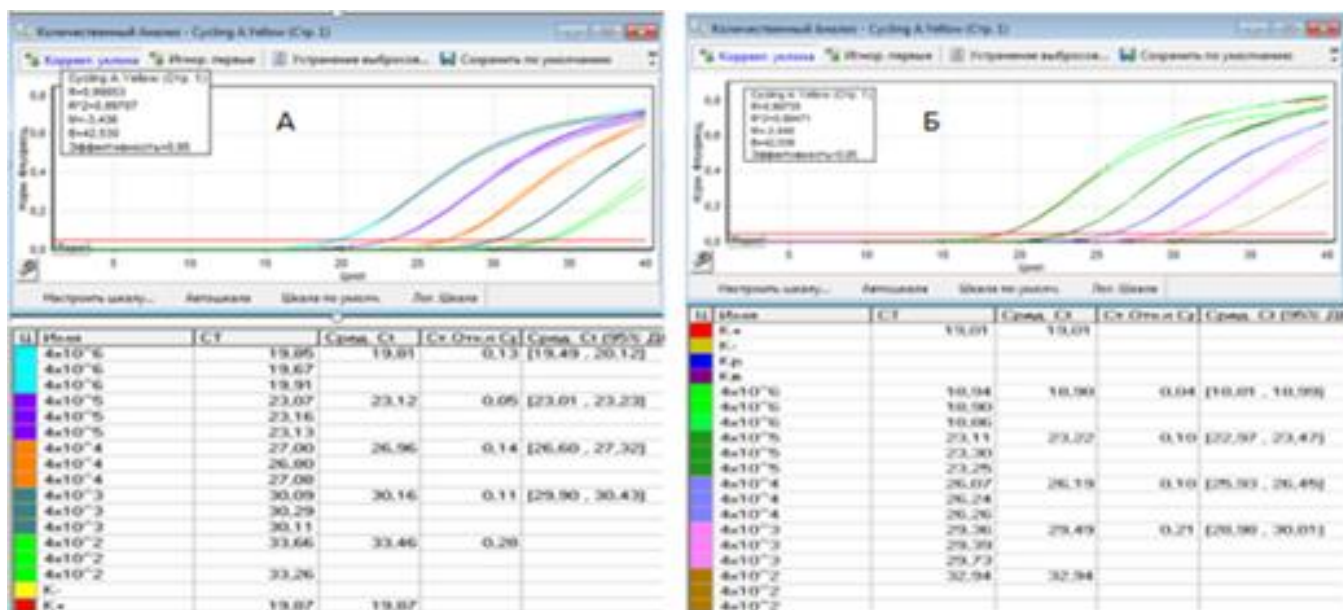


Рисунок 4. Определение чувствительности ПЦР для детекции BHV-6 в сперме (А) и РНК-буфере (Б).

Исследования спермы быков для выявления бактериальных инфекционных агентов.

Для скрининговых исследований спермы для выявления следующих бактериальных агентов: *Chlamydia spp.*, *Campylobacter spp.*, *C. jejuni*, *C. fetus*, *Histophilus somni*, *Leptospira spp.*, *Brucella spp.*, *Coxiella burnetii*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* были использованы коммерческие тест-системы и наборы для ПЦР-диагностики. По результатам молекулярно-генетических исследований ни в одном из 444 образцов спермы быков не была выявлена ДНК микроорганизмов родов *Chlamydia*, *Leptospira* и *Brucella*. Результаты детекции генетического материала других бактерий представлены в таблице 3.

При исследовании образцов спермы с помощью тест-системы, предназначенной для выявления ДНК микроорганизмов рода *Campylobacter*, положительный результат ПЦР был получен как для племенной продукции отечественных хозяйств, так и для импортированной спермы быков. Дополнительное исследование, направленное на идентификацию видов *C. fetus* и *C. jejuni* в спермопродукции, показало, что генетический материал *C. jejuni* обнаруживается в продукции разных племенных центров, но ДНК *C. fetus* была выявлена только в образцах из отечественных хозяйств.

Таблица 3 – Результаты выявления бактерий в образцах спермопродукции, полученные при использовании коммерческих ПЦР-наборов

| Выявляемый патоген | Сперма из российских племенных центров | | Сперма из иностранных племенных центров | | Общее количество образцов | |
|-------------------------------|--|------|---|------|---------------------------|------|
| | 211 образцов | | 233 образца | | 444 образца | |
| | Обнаружена ДНК | % | Обнаружена ДНК | % | Обнаружена ДНК | % |
| <i>Mycoplasma</i> spp. | 182 | 86,3 | 134 | 57,5 | 316 | 71,2 |
| <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</i> spp. | 3 | 1,4 | 2 | 0,8 | 5 | 1,1 |
| <i>Campylobacter</i> spp. | 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 |
| <i>Coxiella burnetii</i> | 0 | 0 | 32 | 13,7 | 32 | 7,2 |

Результаты выявления *C. jejuni* подтверждают мнение ученых о том, заражение этим патогеном препуциальной области связано с наличием микроорганизма в фекалиях КРС [Hoque et al., 2021,2023] и говорит о нарушениях при отборе спермы. Выявленное в нашей работе в спермодозах присутствие *C. fetus* свидетельствует о недостаточном ветеринарно-санитарном контроле в племенном хозяйстве, а спермопродукция, содержащая такие микроорганизмы, представляет собой источник опасного патогена.

ДНК *C. burnetii* была обнаружена в 32 образцах спермы быков, импортированных из племенных центров США. Присутствие ДНК *C. burnetii* было дополнительно подтверждено секвенированием по Сенгеру.

Анализ состава сред, используемых в разных племенных центрах для разбавления и хранения спермы, который показал, что производители криоконсервированной спермы в племенных хозяйствах США часто используют молоко в средах для разбавления, защиты спермы и поддержания ее биологических свойств. Следует отметить, что о распространении *C. burnetii* с молоком хорошо известно [Guatteo et al., 2007; Angerholm, 2013]. При исследовании молока, проведенном в 2001-2003 гг. в США, *C. burnetii* была обнаружена в более чем 94% образцов [Kim et al., 2005]. Возможно, обнаружение ДНК *C. burnetii* в образцах спермы в нашем исследовании связано с

использованием в средах для разбавления спермы загрязненного молока, содержащего *C. burnetii*. Наши исследования показывают, что существует риск передачи *C. burnetii* животным через сперму. Нужно отметить, что возбудитель коксиеллеза животных и Ку-лихорадки человека из-за высокой инфицирующей способности и устойчивости коксиелл 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.

Полученные результаты тестирования спермопродукции также говорят о высокой частоте встречаемости в образцах возбудителя гистофилеза КРС *H. somni* и микроорганизмов рода *Mycoplasma*. ДНК *Mycoplasma spp.* была детектирована в 71.2%, а ДНК *H. somni* - в 73,9% исследованных спермодоз. В связи с отсутствием на момент проведения исследований отечественных наборов для выявления ДНК патогенных микоплазм КРС и *H. somni* была проведена разработка собственных методик на основе ПЦР в режиме «реального времени».

Разработка методики выявления ДНК H. somni.

Для детекции *H. somni* были выбраны области посадки прямого и обратного праймеров, фланкирующие участок длиной 153 п.н. гена 16S рРНК микроорганизма и подобрана структура TaqMan зонда для флуоресцентной детекции продукта ПЦР (таблица 4). Экспериментально были подобраны условия реакции, 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.

Таблица 4 – Олигонуклеотиды для амплификации и детекции ДНК *H. somni*

| Название праймера | Нуклеотидная последовательность 5'-3' | Ген-мишень |
|-------------------|---|------------|
| H.smn_F | GGAAGGCGATTAGTTTAAGAG | 16S рРНК |
| H.smn_R_A | ССТСАСТТААГТСАССАССТ | |
| H.smn_probe | ROXCACAGAAGAAGCACCGGСТААСТССГТВНQ1 | |

Тестирование панели образцов, содержащей нуклеиновые кислоты 9 вирусных и 33 бактериальных патогенов, в том числе представителей *Pasteurellaceae* – *Mannheimia*

haemolytica, *Bibersteinia trehalosi*, *Actinobacillus spp.*, *Pasteurella multocida* показало отсутствие неспецифических реакций.

В проведенных экспериментах эффективность ПЦР варьировала от 0,94 до 0,96 при использовании разных амплификаторов. Чувствительность детекции ДНК *H. somni* в мультиплексной реакции с системой амплификации ВКО при экстракции ДНК из спермы, молока, смывов и суспензии органов составила 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 КРС ДНК возбудителя обнаруживали в 52,75% исследованных проб, в легких - в 32,07% образцов. Сравнение результатов ПЦР-тестирования 54 образцов биологического материала, полученных при использовании методики и набора реагентов LSI VetMAX™ показало, что методика и данный набор демонстрируют сопоставимые результаты.

Изучение свойств культур H. somni

Проведены микробиологические и молекулярно-генетические исследования культур *H. somni*, выделенных из спермопродукции и различного биологического материала как здоровых, так и больных животных. Результаты оценки фенотипической устойчивости 12 выделенных изолятов, показали, что чувствительность выделенных *H. somni* к бета-лактамам антибиотикам и тетрациклинам находится в пределах 75-100%, к фторхинолонам и амфениколам - на уровне 66-75% (таблица 5). Наиболее часто исследованные изоляты *H. somni* были устойчивы к аминогликозидам. Резистентными к стрептомицину были 50% культур, а устойчивыми к неомицину - 42%. Достаточно высокой была устойчивость протестированных изолятов к сульфаниламидам (33%).

С использованием ПЦР проведено тестирование изолятов *H. somni* на наличие генов устойчивости к антимикробным средствам: *blaOXA-2* (устойчивость к пенициллинам), *tetH* (устойчивость к тетрациклинам), *aadA25*, *strA*, *strB*, *aphA1* (устойчивость к аминогликозидам), *sul2* (устойчивость к сульфаниламидам) и *floR* (устойчивость к амфениколам).

Таблица 5 – Фенотипическая антибиотикорезистентность 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%) |

Для трех генов антибиотикорезистентности (*strA*, *strB*, *sul2*) были разработаны ПЦР-методики с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

Чувствительность ПЦР детекции гена *strB* составила 6×10^3 коп/мл, *strA* - 7×10^4 коп/мл. Предел детекции разработанной методики выявления гена *sul2* составил $6,4 \times 10^3$ коп/мл. Эффективность реакции амплификации генов *strA* (рис.5), *strB*, *sul2* находилась в диапазоне от 0,93 до 1,04.

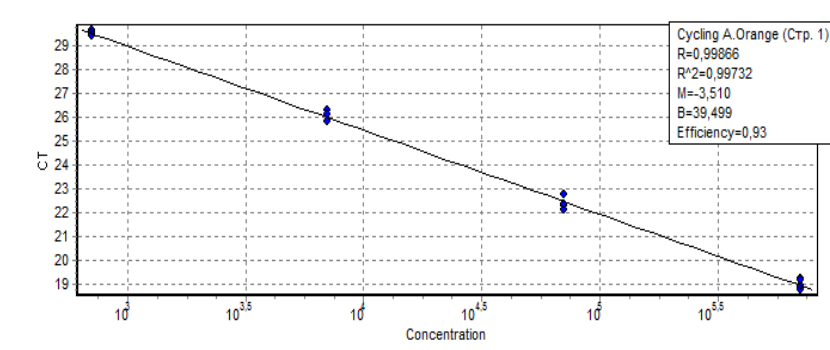


Рисунок 5. Результаты расчета эффективности реакции амплификации фрагмента гена *strA* *H. somni* при использовании десятикратных разведений плазмиды с целевой вставкой

ПЦР-тестирование показало отсутствие генов *tetH* и *blaOXA-2* во всех исследованных изолятах *H. somni*. Чаще всего в образцах выявляли гены устойчивости к аминогликозидам: гены *strA* и *strB* выявили в 44% образцов, ген *aadA25* - в 39%, ген *aphA1* - в 11% образцов. Ген *sul2* был выявлен в трех, ген *floR* – в двух образцах. 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 6.

Таблица 6 – 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, НД – нет данных

Сравнительный анализ полных геномов изолятов *H. somni*

Полученные результаты показали, что сперма быков может нести жизнеспособные *H. somni*, устойчивые к разным группам антимикробных средств, а метод ПЦР может использоваться в качестве скринингового метода контроля распространения резистентности *H. somni* к аминогликозидам и сульфаниламидам. Для определения локализации выявленных генов антибиотикорезистентности, а также для изучения факторов вирулентности изолятов *H. somni* было проведено полногеномное секвенирование и анализ полных геномов образцов *H. somni*. 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.

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. Полученные последовательности полных геномов были депонированы в международную базу данных GenBank (BioProject: PRJNA736593). При сравнении полученных геномов изолятов с геномом патогенного штамма *H. somni* 2336 было установлено, что общими для всех являются 1242 гена, а при сравнении с геномом непатогенного штамма 129Pt - 1220 генов (рис.6).

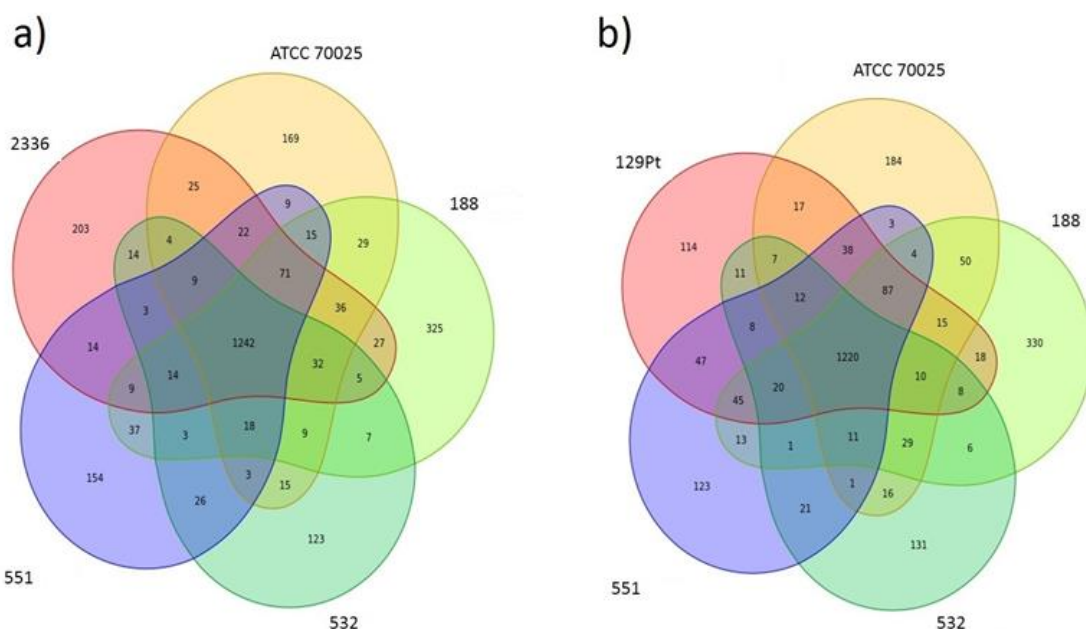


Рисунок 6. Сравнение геномов *H. somni* ATCC 700025, 188, 551 и 532 с последовательностями а) патогенного штамма 2336 б) непатогенного 129Pt

Было показано, что образцы *H. somni* 551 и 532, выделенные из спермы быков, различаются по наличию детерминант вирулентности (таблица 7). Проведенный анализ полных геномов позволил предположить, что образец 532 имеет гены, ассоциированные с вирулентностью и потенциал для преодоления защиты хозяина.

Сравнительное изучение генов устойчивости к антибиотикам выделенных изолятов показало наличие в геноме изолята 551 генов устойчивости к аминогликозидам - AAC-6-Ia+APH-2'' и aadA25. В обоих изолятах из спермы было показано наличие генетической детерминанты фенотипической устойчивости к фторхинолонам - мутации в положении 83 гена *gyrA* (рис.7).

Таблица 7 – 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>licD</i> | ЛОС холинфосфотрансфераза | + | + | + | + | + | + |
| <i>neuA</i> | Синтаза CMP-N-ацетил-5-нейраминовой кислоты | + | +/- | + | + | +/- | + |
| <i>siaA</i> | Сиалилтрансфераза | + | +/- | + | + | +/- | + |
| <i>lsgB</i> | CMP-N-ацетилнейрамин-бета-галактозамид-альфа-2,3-сиалилтрансфераза | + | - | +/- | +/- | - | - |

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

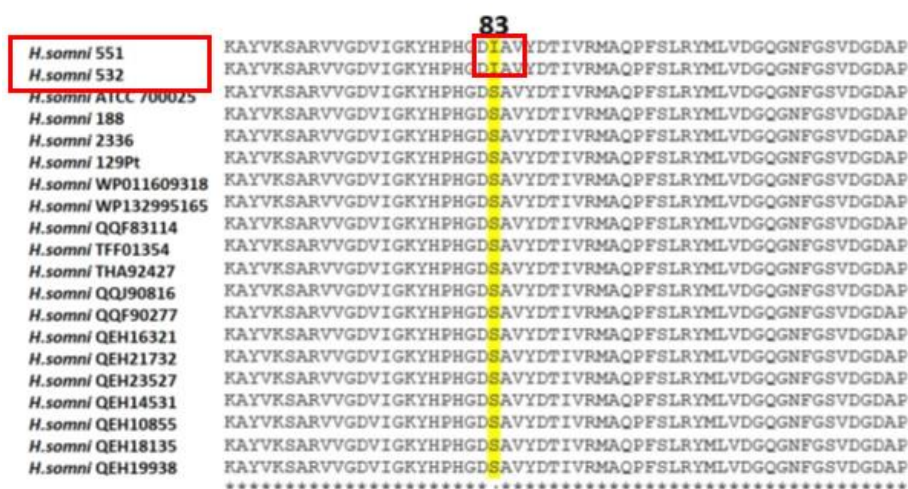


Рисунок 7. Фрагмент выравнивания аминокислотных последовательностей топоизомеразы II изолятов *H. somni*.

Интересно, что оба штамма *H. somni* 551 и 532 были выделены из канадской спермопродукции. Проведенный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей *gyrA* изолятов *H. somni* из Канады, депонированных в базу данных GenBank в 2015 году показал, что такой замены в геноме канадских изолятов *H. somni* ранее не наблюдалось. Можно предположить, что в последние годы у *H. somni*, циркулирующих в Канаде, повысилась резистентность к фторхинолонам. Таким образом, анализ особенностей полных геномов образцов *H. somni* показал, что сперма быков потенциально может быть источником не только патогенных, но устойчивых к различным антибиотикам *H. somni*.

Выявление микроорганизмов рода Mycoplasma

При исследовании образцов спермы на присутствие ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma* 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%). Проведенное секвенирование полученных продуктов ПЦР показало встречаемость в спермопродукции *M. bovis genitalium*, *M. californicum* и *Ureaplasma diversum*. Анализ результатов секвенирования 44,1% образцов показал неоднородность чтения матрицы, что свидетельствует о наличии в образце нескольких видов *Mycoplasma*.

Разработка методик выявления ДНК M. bovis, M. californicum, M. bovis genitalium и U. diversum на основе ПЦР в режиме «реального времени»

Широко используемые в России наборы для ПЦР-диагностики микоплазмоза животных не предназначены для дифференциации патогенных микоплазм КРС, что сделало актуальным разработку ПЦР-методик для выявления видов *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. californicum* и *U. diversum*.

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. (CP019639.1 поз. 697986-698133) для *M. bovis*, 96 п.н. (CP007521.1 поз. 504837-504932) для *M. californicum*, 127 п.н. (AY974058.1 поз. 131-257) для *M. bovis genitalium*, 114 п.н. (GU227397.1 поз. 119-232) для *U. diversum*.

Для детекции продуктов амплификации в режиме «реального времени» были подобраны TaqMan-зонды, несущие флуоресцентные красители R6G и ROX, которые позволяют одновременно выявлять и дифференцировать *M. californicum*/*M. bovis* и *M. bovis*/*U. diversum* в мультиплексном формате. Экспериментальное тестирование панели образцов, включавшей генетический материал 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 абсолютной чувствительности праймеров были созданы 4 ПКО на основе вектора pAL2-T, в который были искусственно встроены продукты амплификации ДНК *M. californicum*, *M. bovis* и *U. diversum*, соответственно. Условия амплификации и детекции оптимизировали на приборах RotorGene Q и CFX96. Была подобрана следующая программа амплификации: 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 соответствующих красителям каналах). Концентрация олигонуклеотидов в мультиплексных реакционных смесях была подобрана 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»). Амплификация *M. bovis* проводилась совместно с амплификацией ВКО с детекцией на двух каналах, *M. californicum* и *M. bovis* и ВКО – одновременно на трех каналах. ПЦР и детекция *U. diversum* – вместе с ВКО на двух каналах.

Определение эффективности амплификации и абсолютной чувствительности праймеров, проведенное по результатам амплификации 10-кратных разведений ПКО с известной концентрацией плазмидной ДНК в РНК-буфере, показало, что средняя эффективность амплификации фрагментов генома *M. bovis* и *M. californicum* при проведении мультиплексной реакции составляет 78% и 94%, соответственно. Значения абсолютной чувствительности систем праймеров и зондов - $7,5 \times 10^3$ копий/мл

для *M. bovis genitalium* 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% (рис. 8).

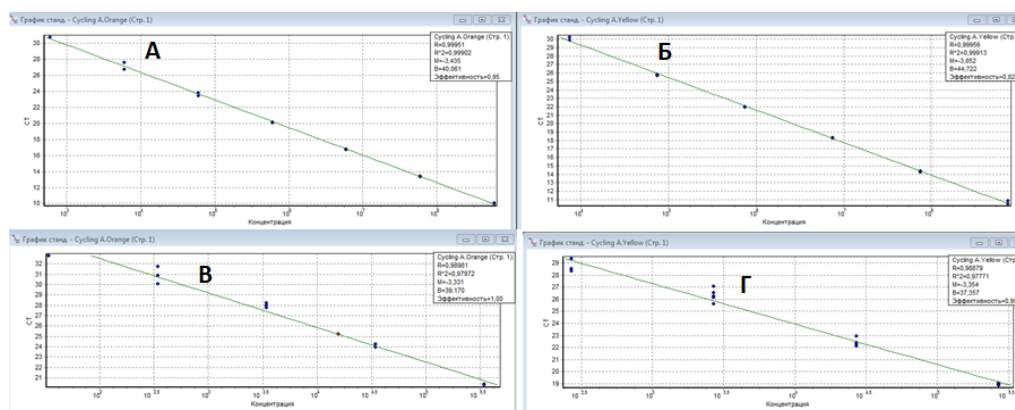


Рисунок 8. Расчет эффективности амплификации, проведенный с помощью программного обеспечения амплификаторов RotorGene Q по результатам ПЦР 10-кратных разведений ПКО

А – *M. californicum*; Б – *M. bovis genitalium*; В – *U. diversum*; Г – *M. bovis*

Оценку аналитической чувствительности каждой из методик 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. Чувствительность разработанных методик для разных матриц варьировала от $2,7$ до $7,5 \times 10^3$ копий/мл (таблица 8, рис.9).

Таблица 8 – Аналитическая чувствительность разработанных методик

| Выявляемый инфекционный агент | Чувствительность (копий/мл) | | | |
|-------------------------------|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Тестируемый материал | | | |
| | Сперма быков | Молоко | Смывы со слизистой | Суспензия органов |
| <i>U. diversum</i> | $3,45 \times 10^3$ | $3,45 \times 10^3$ | $3,45 \times 10^2$ | $3,45 \times 10^3$ |
| <i>M. bovis genitalium</i> | $7,5 \times 10^3$ | $7,5 \times 10^3$ | $7,5 \times 10^3$ | $7,5 \times 10^3$ |
| <i>M. californicum</i> | $6,0 \times 10^3$ | $6,0 \times 10^3$ | $6,0 \times 10^2$ | 6×10^3 |
| <i>M. bovis</i> | $2,7 \times 10^3$ | $2,7 \times 10^3$ | $2,7 \times 10^3$ | $2,7 \times 10^3$ |

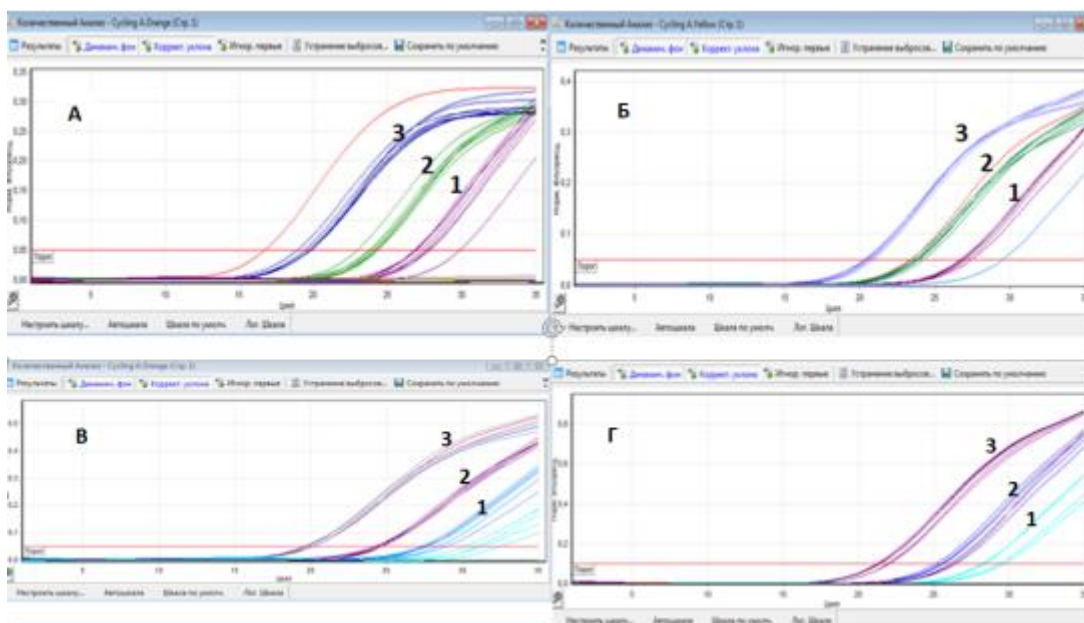


Рисунок 9. Определение чувствительности ПЦР для детекции *U. diversum* (А), *M. bovigentalium* (Б), *M. bovis* (В), *M. californicum* (Г) в сперме быков. 1-3 — ДНК-мишени в концентрации $N \times 10^3$, $N \times 10^4$, $N \times 10^5$ копий/мл

Таким образом, было показано, что разработанные методики можно использовать как для детектирования *M. bovigentalium*, *M. californicum*, *U. diversum* и *M. bovis* при проведении контроля спермопродукции, так и для проведения диагностических исследований при тестировании различного биологического материала КРС. 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. Было показано, что 20% изменение объема реагентов не оказывает существенного влияния на результат исследования.

Разработанные методики выявления ДНК *M. californicum*, *M. bovigentalium*, *M. bovis* и *U. diversum* использовали для тестирования образцов патологического материала КРС и диких жвачных копытных, смывов со слизистой животных, молока, смывов со спермоприемников и криоконсервированной спермы КРС. Всего с применением разработанных методик было исследовано более 1200 различных образцов. Результаты тестирования спермы быков из отечественных и иностранных племенных центров

представлены в таблице 9.

Таблица 9 – 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</i> | 0 | 0 | 8 | 3,3 | 8 | 1,7 |
| <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 |

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™ подтвердило полученные результаты. При этом выявление ДНК *M. bovis* в нашей работе было ниже, чем в более поздних исследованиях, согласно которым *M. bovis* была детектирована в 11,6% спермодоз из отечественных племенных хозяйств [Алхуссен и др., 2020]. Это говорит об актуальности проблемы и разном уровне контроля здоровья быков в племенных хозяйствах, поставляющих сперму для искусственного осеменения.

Для значительного числа исследованных образцов спермы нами было отмечено присутствие сразу нескольких видов микоплазм. Сочетанная инфекция наблюдалась в 128 образцах из отечественных хозяйств, что составляет 55,8% исследованных образцов, и в 37 (15,4%) образцах спермы из зарубежных племенных центров. Наиболее часто было выявлено одновременное присутствие *M. californicum*/*M. bovis genitalium* (22,1%) и *M. bovis genitalium*/*U. diversum* – в 91 образце (19,4 %). Сочетание *M. bovis genitalium*, *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%). В одном образце спермы, полученной из США, были выявлены все четыре вида детектируемых представителей семейства *Mycoplasmataceae* - *M. californicum*, *M.*

bovigenitalium, *M. bovis* и *U. diversum*. В двух образцах наблюдалось присутствие генетического материала *M. bovis*, *M. bovigenitalium* и *M. californicum* и еще в двух образцах - *M. bovis* с *M. bovigenitalium*.

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

Несмотря на высокую чувствительность и способность метода ПЦР детектировать микоплазмы и определять их видовую принадлежность, 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*. Для 94% образцов спермы быков, положительных по результатам ПЦР был зафиксирован рост на селективных питательных средах, при этом наблюдали равномерное или неравномерное помутнение среды, изменение pH, 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. bovigenitalium* и *M. californicum* были выявлены в 27,9% и 16,2% исследованных культур. *U. diversum* была обнаружена в 16,2% культур. Также было подтверждено присутствие и сохранение жизнеспособности в замороженной спермопродукции нескольких видов микоплазм. Полученные результаты показывают наличие жизнеспособных микоплазм в племенной продукции и подчеркивают актуальность скрининговых исследований спермопродукции КРС, направленных на выявление *Mycoplasma bovis*, *M. bovigenitalium*, *M. californicum* и *U. diversum* для подтверждения качества спермы быков и предотвращения распространения микоплазменной инфекции. 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 был предложен алгоритм лабораторных исследований для выявления контаминации спермопродукции микоплазмами с применением ПЦР и культуральных методов (рис. 10).

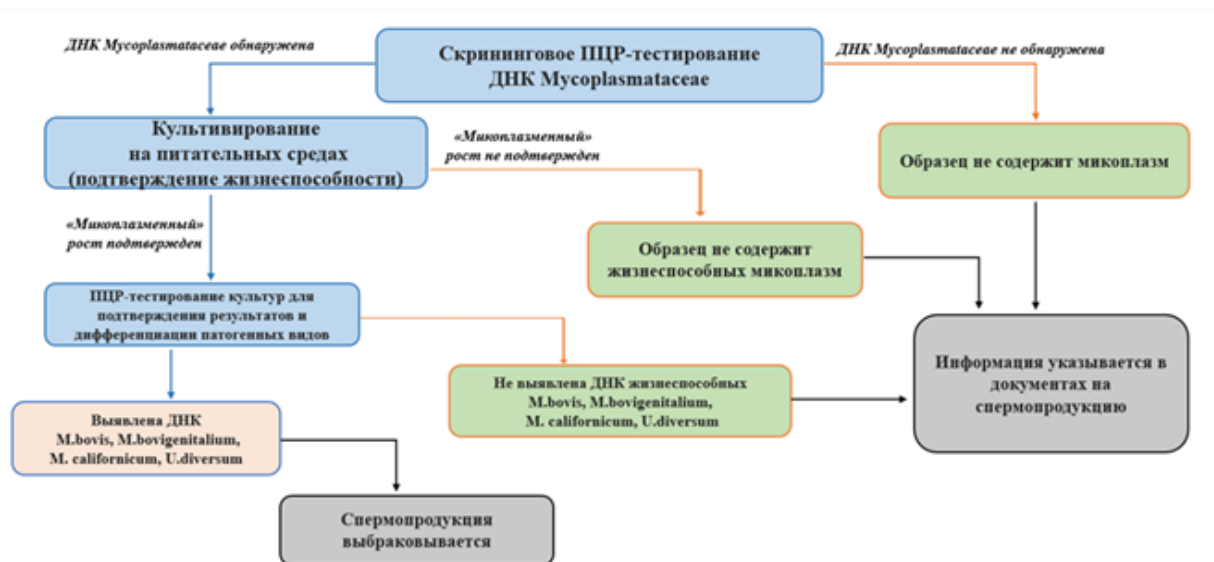


Рисунок 10. Алгоритм проведения экспертизы микоплазменного загрязнения спермопродукции

При данном подходе на первом этапе проводится скрининговое тестирование, направленное на выявление ДНК микроорганизмов семейства *Mycoplasmataceae*. При получении 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 выявления 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*.

Изучение метагенома образцов спермы быков

Проведены исследования случайным образом отобранных 34 образцов спермопродукции: 10 образцов спермы, расфасованной в облицованные гранулы в отечественных племенных хозяйствах и 24 образцов спермы быков из иностранных племенцев.

Полученные данные полногеномного секвенирования показали невысокую бактериальную обсемененность образцов, в сравнении с традиционно анализируемыми образцами для метагеномных исследований, такими как, например, кишечник или образцы фекалий. В образцах спермы было выявлено до 19 известных типов и 18 классов бактерий, однако, только 6 типов и 11 классов выявлены хотя бы в одном из исследованных образцов с частотой выше 5%. Анализ двух отдельных групп образцов из отечественных и иностранных племенных хозяйств, показал различия во встречаемости основных представителей бактериальной микрофлоры (таблица 10).

Таблица 10 - Количественные результаты исследования филогенетического профиля на уровне типа для спермы отечественных и иностранных быков

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

SD - стандартное отклонение, *-статистически значимые значения (95% доверительный интервал)

В образцах выявляли от 13 до 15 родов микроорганизмов. Для каждого образца наблюдался свой микробный состав, но были отмечены определенные закономерности. На первом месте по частоте встречаемости были бактерии рода *Fusobacterium* и неидентифицированного рода из порядка *Clostridiales*. На третьем месте – бактерии рода *Campylobacter*. Анализ встречаемости и сочетаний микроорганизмов в сперме быков проведенный ранее [Koziol et al., 2022] показал, что *Campylobacter* и *Fusobacterium* наиболее часто встречаются в сперме с неудовлетворительными морфофункциональными показателями. В нашем исследовании также были выявлены *Pseudomonas spp.* и *Prevotella spp.*, наличие которых также связывают с аномальными параметрами качества спермы [Baud et al., 2019]. Кроме того, в образцах был детектирован вид *Campylobacter ureolyticus*, обладающий зоонозным потенциалом.

Полученная в нашей работе информация о микробиоме спермы в целом согласуется с выводами о низком качестве спермопродукции, используемой на

территории России [Борунова, 2019]. Проведенный метагеномный анализ показал неоднородность состава микробного сообщества в образцах спермопродукции. Вероятно, на микробиом спермы быка оказывают влияние иммунный статус быка и микробный состав других систем органов животного. Также необходимо учитывать, что на состав микробиома криоконсервированной спермопродукции влияет соблюдение санитарно-гигиенических норм при отборе спермы, ее подготовке, разбавлении и фасовке.

Результаты метагеномных исследований 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. bovis genitalium*, 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%. Больше содержание фрагментов ДНК микроорганизмов этого вида было продемонстрировано для исследованных образцов спермопродукции из иностранных племенных центров. 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.

Накопление информации о составе микробного сообщества и ее связи с показателями качества спермы все еще происходит 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.

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 *M. bovis genitalium* и *M. californicum*; для детекции *M. bovis*, выявления *U. diversum*, обнаружения *H. somni* и детектирования его генов устойчивости к аминогликозидам и сульфаниламидам. Специфичность методик была оценена с использованием панелей образцов, включающих 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 быков-производителей.

При исследовании спермопродукции выявлена высокая частота встречаемости микроорганизмов семейства *Mycoplasmataceae*, среди которых преобладают виды *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 были сделаны 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. bovis genitalium* (22,1%) и *M. bovis genitalium/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 notiфицируемые болезни ВОЗЖ позволит контролировать и подтверждать биобезопасность спермопродукции, поступающей на отечественный рынок, и обеспечивать продовольственную безопасность Российской Федерации.

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». В результате работы 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 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 *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. californicum* и *U. 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.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Работы, входящие в издания базы Scopus

1. **Yatsentyuk, S.P.** Mycoplasma contamination of bull semen used for artificial insemination/ Yatsentyuk S.P.//Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture. – 2022. – Т. 14. – № 4. – С. 260-270.
2. **Yatsentyuk, S.P.** Whole-genome sequencing of Histophilus somni strains isolated in Russia / Yatsentyuk S.P., Pobolelova Ju., Gordeeva V.D., Timofeeva I.//Veterinary World. – 2023. – Т. 16. – № 2. – С. 272-280.
3. Абед Алхуссен М. Патогенные микоплазмы крупного рогатого скота Mycoplasma bovis, M. bovis genitalium и M. dispar: краткая характеристика возбудителей (обзор) / М. Абед Алхуссен, В.В. Кирпиченко, **С.П. Яцентюк**, А.А. Нестеров, О.П. Бьядовская, Т.В. Жбанова, А.В. Спрыгин //Сельскохозяйственная биология. –2021. – Т. 56. – № 2. – С. 245-260.
4. **Яцентюк, С.П.** Выявление устойчивости к антибиотикам у возбудителя гистофилеза крупного рогатого скота Histophilus somni /С.П. Яцентюк, Ю.И. Поболелова, Д.А. Рудняев, А.И. Лаишевцев, А.В. Капустин //Сельскохозяйственная биология. – 2021. – Т. 56. – № 2. – С. 304-314.
5. Козлова, А.Д. Дифференциация Mycoplasma bovis, Mycoplasma bovis genitalium, Mycoplasma californicum и выявление Ureaplasma diversum методом ПЦР в реальном времени / А.Д. Козлова, Н.С. Горбачева, Р.Ф. Хаерова, М.С. Красникова, Е.А. Лазарева, **С.П. Яцентюк**//Сельскохозяйственная биология. –2019. – Т. 54. – № 2. – С. 378-385.

Работы в рецензируемых научных изданиях перечня ВАК РФ

6. **Яцентюк, С.П.** Выявление бактерий рода Campylobacter в используемой для искусственного осеменения сперме быков/С.П. Яцентюк //Ветеринария, зоотехния и биотехнология. –2023. –№ 10. – С. 112-119.
7. **Яцентюк, С.П.** Проблема контаминации спермы быков-производителей инфекционными агентами бактериальной и вирусной природы /С.П. Яцентюк, С.М. Борунова, Т.Н. Грязнева. //Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2021. – № 9. – С. 26-30.
8. **Яцентюк, С.П.** Изучение метагенома спермы быков / С.П. Яцентюк. //Инновации и продовольственная безопасность. – 2023. – № 3 (41). – С. 31-39.
9. Лазарева, Е.А. Скрининговые исследования спермы быков в ПЦР для выявления патогенов /Е.А. Лазарева, А.Д. Козлова, М.С. Красникова, С.М. Борунова, **С.П. Яцентюк** //Ветеринария. – 2019. – № 10. – С. 42-47.

10. **Яцентюк, С.П.** Ветеринарно-санитарный контроль спермопродукции крупного рогатого скота в Российской Федерации /С.П. Яцентюк, С.М. Борунова, Е.П. Агринская, К.В. Патрушева, А.Р. Кучина, А.В. Борунов, А.Д. Филонова, А.А. Алексеенко //Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2021. –№ 4. – С. 72-77.
11. **Яцентюк, С.П.** 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, А.Д. Козлова //Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2020. – № 1. – С. 58-59.
12. **Яцентюк, С.П.** Гистофилёз крупного рогатого скота и выявление ДНК *Histophilus somni* методом ПЦР в режиме «реального времени» / С.П. Яцентюк, Д.А. Рудняев, Ю.И. Поболелова, М.С. Красникова, А.Д. Козлова //Ветеринария. – 2020. – № 11. – С. 28-33.
13. Пчельников, А. В. Герпесвирус крупного рогатого скота 6 типа /А.В. Пчельников, **С.П. Яцентюк** //Ветеринария. – 2022. – № 6. – С. 20-24.
14. Пчельников, А.В. Детекция генетического материала гаммагерпесвирусов в животноводческих хозяйствах Московской и Тверской области/ А.В. Пчельников, **С.П. Яцентюк** //Ветеринария. –2021. –№ 7. – С. 22-26.
15. Пчельников, А.В. Эпизоотическая ситуация по ИРТ КРС на территории Московской и Тверской областей / А.В. Пчельников, **С.П. Яцентюк** //Ветеринария и кормление. – 2021. – № 2. – С. 38-41.
16. Козлова, А.Д. Распространенность бактерий семейства Pasteurellaceae у крупного рогатого скота хозяйств Московской и Тверской областей / А.Д. Козлова, **С.П. Яцентюк**, Д.А. Рудняев, Ю.И. Поболелова //Ветеринария и кормление. –2021. –№ 4. – С. 32-35.
17. Поболелова, Ю.И. Распространенность бактерий семейства Pasteurellaceae у крупного рогатого скота в различных регионах российской федерации / Ю.И. Поболелова, **С.П. Яцентюк**, А.Д. Козлова, Д.А. Рудняев //Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2021. – № 5. – С. 18-25.
18. Хишов, А.С. Кобувироз крупного рогатого скота /А.С. Хишов, И.В. Солтынская, Е.В. Крылова, **С.П. Яцентюк**, М.А. Гергель//Ветеринария. –2021. – № 6. – С. 8-11
19. Мохаммад Абед Алхуссен Распространение микоплазмозов крупного рогатого скота на животноводческих фермах в Российской Федерации в период с 2015 по 2018 год / Мохаммад Абед Алхуссен, А.А. Нестеров, В.В. Кирпиченко, **С.П. Яцентюк**, А.В. Спрыгин, О.П. Бьядовская, А.В. Кононов// Ветеринария сегодня. –2020. – № 2 (33). – С. 102-108.

Публикации в других изданиях и материалах конференций

20. **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, M.S. Krasnikova, A.D. Kozlova, A.I. Laishevtcev //Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2019. – № 8 (92). – С. 293-295.
21. **Yatsentyuk, S.P.** Viral contamination of bull semen used for artificial insemination / S. P. Yatsentyuk, S. M. Borunova, L. A. Gnezdilova, S. Yu Pigina, S. V. Pozyabin, P. N. Abramov// AIP Conference Proceedings 2817, 020021, - 2023. -

<https://doi.org/10.1063/5.0148879>.

22. **Yatsentyuk, S.** PCR detection of infection agents in frozen bull semen in Russia / S. Yatsentyuk, A. Kozlova, N. Gorbacheva // Abstract book 5th EAVLD Congress. Brussels – 2018. – P.123-124.
23. Kozlova, A. Development of the real-time PCR for the detection and differentiation of *Mycoplasma californicum*, *M. bovis genitalium*, *M. bovis* and *U. diversum* // A. Kozlova, N. Gorbacheva, **S. Yatsentyuk** // Abstract book 5th EAVLD Congress. Brussels – 2018. – P.125-126.
24. **Яцентюк, С.П.** Использование метода ПЦР для выявления возбудителей инфекционных болезней в сперме крупного рогатого скота /С.П. Яцентюк, Н.С. Горбачева, Е.А. Яралова, А.Д. Козлова// Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2017. – № 10 (70). – С. 331-337.
25. Капустин, А.В. Гистофилёз крупного рогатого скота / А.В. Капустин, Н.В. Моисеева, А.И. Лаишевцев, М.А. Лучко, **Яцентюк С.П.**, Н.С. Горбачёва// Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2017. – № 10 (70). – С. 319-326.
26. **Яцентюк, С.П.** Изучение микробного состава криоконсервированной спермы быков/ С.П. Яцентюк, А.В. Капустин// Труды ВИЭВ – 2023. – № 83. – С. 161-164.
27. Козлова, А.Д. Выявление *Ureaplasma diversum* в образцах биологического материала крупного рогатого скота методом ПЦР в режиме "реального времени" / А.Д. Козлова, Н.С. Горбачева, А.Ю. Бирюкова, Р.Ф. Хаерова, **С.П. Яцентюк**// Труды ВИЭВ – 2018. – Т. 80. – № 1. – С. 223-228.
28. **Яцентюк, С.П.** Изучение метагенома спермы быков / С.П. Яцентюк, В.Д. Гордеева, Л.А. Гнездилова// Сохранение и преумножение генетических ресурсов микроорганизмов. Сборник тезисов II Всероссийской школы-конференции. Москва. – 2023. – С. 100-101.
29. **Яцентюк, С.П.** Альфагерпесвирусы BHV-1 и BHV-5 в криоконсервированной сперме быков / С.П. Яцентюк, А.В. Пчельников, М.С. Красникова, С.М. Борунова, Л.А. Гнездилова // Инновационные решения актуальных вопросов биобезопасности: Сборник материалов международной научно-практической конференции. Казань. - 2022. – С. 275-279.
30. **Яцентюк, С.П.** Сравнительный анализ геномов штаммов *Histophilus somni* / С.П. Яцентюк, Ю.И. Поболелова, В.Д. Гордеева, И.А. Тимофеева //Экономически и социально значимые инфекции сельскохозяйственных животных: меры профилактики и борьбы. Материалы Международной научно-практической конференции Москва. – 2022. — С. 197-205.
31. Пчельников, А.В. Распространенность гамагерпесвирусов КРС в животноводческих хозяйствах / А.В. Пчельников, **С.П. Яцентюк**// Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии, биотехнологии и экспертизы сырья и продуктов животного происхождения. Сборник трудов научно-практической конференции. Москва. – 2022. – С. 189-190.
32. Козлова, А.Д. Разработка методики выявления *Histophilus somni* на основе ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией / А.Д. Козлова, М.С. Красникова, М.Б.

- Брюсова, Ю.И. Поболелова, Р.Ф. Хаерова, Е.А. Лазарева, **С.П. Яцентюк**// Научное обеспечение агропромышленного комплекса. Сборник тезисов по материалам Всероссийской конференции. Краснодар. – 2019. – С. 109-110.
33. **Яцентюк, С.П.** Выявление возбудителей инфекционных болезней в сперме племенных животных молекулярно-генетическими методами / С.П. Яцентюк, Н.С. Горбачева, О.В. Клименкова, А.Д. Козлова //Молекулярная диагностика 2017. Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции. Москва. – 2017. – С. 402-403.
34. Лазарева, Е.А. Выявление вирусов герпеса КРС 1 и 4 типа в сперме крупного рогатого скота методом ПЦР / Е.А. Лазарева, М.С. Красникова, Н.С. Горбачева, А.Д. Козлова, **С.П. Яцентюк** // Научное обеспечение агропромышленного комплекса. Сборник тезисов по материалам Всероссийской конференции. Краснодар. – 2019. – С. 113-114.
35. Лазарева, Е.А. Выявление возбудителей микоплазмоза в сперме КРС с использованием молекулярно-биологических и микробиологических методов / Е.А. Лазарева, А.Д. Козлова, Н.С. Горбачева, С.Т. Орлова, **С.П. Яцентюк**// Достижения молодых ученых - в ветеринарную практику. Материалы V Международной конференции. – Владимир. – 2019. – С. 84-92
36. Козлова, А.Д. Применение полимеразной цепной реакции для выявления *Histophilus somni* / А.Д. Козлова, Ю.И. Поболелова, М.С. Красникова, М.Б. Брюсова, **С.П. Яцентюк** // Достижения молодых ученых - в ветеринарную практику. Материалы V Международной конференции. – Владимир – 2019. – С. 100-108.
37. Горбачева, Н.С. ПЦР в режиме реального времени для обнаружения *Mycoplasma bovis* /Горбачева Н.С., Козлова А.Д., Клименкова О.В., Бирюкова А.Ю., **Яцентюк С.П.** //Молекулярная диагностика 2018. Сборник трудов международной научно-практической конференции. Минск. – 2018. – С. 516-517
38. Козлова, А.Д. Применение метода ПЦР для выявления возбудителей инфекционных болезней в сперме крупного рогатого скота /А.Д. Козлова, Н.С. Горбачева, О.В. Клименкова, Е.А. Яралова, **С.П. Яцентюк** //Актуальные проблемы развития высокопродуктивного молочного и мясного скотоводства. Сборник материалов Международной научно-практической конференции. Витебск. – 2017. – С. 89-95
39. Яцентюк, С.П. Ветеринарно-санитарный контроль спермопродукции крупного рогатого скота в российской федерации /С.П. Яцентюк, С.М. Борунова, Е.П. Агринская //Органика – здоровье нации России. Сборник научно-практических материалов Международной научно-практической конференции. Казань. – 2023. – С. 122-130.
40. Рудняев, Д.А. Выявление генетических детерминант устойчивости к антибиотикам возбудителя гистофилеза КРС *Histophilus somni* / Д.А. Рудняев, **С.П. Яцентюк**, А.В. Капустин, Т.Н. Грязнева //В книге: Актуальные вопросы биологии, биотехнологии, ветеринарии, зоотехнии, товароведения и переработки сырья животного и растительного происхождения. Москва. – 2021. – С. 85-86.

Патенты РФ

41. **Яцентюк С.П.** Способ идентификации ДНК бактерии *Ureaplasma diversum* в сперме крупного рогатого скота методом ПЦР в режиме реального времени /Яцентюк С.П., Козлова А.Д., Поболелова Ю.И., Горбачева Н.С., Лазарева Е.А.//Патент на изобретение RU 2770204 С1, 14.04.2022.
42. **Яцентюк С.П.** Способ детекции ДНК вируса герпеса КРС 6 типа в биологическом материале крупного рогатого скота методом ПЦР в режиме реального времени /Яцентюк С.П., Козлова А.Д., Горбачева Н.С., Красникова М.С., Пчельников А.В.//Патент на изобретение RU 2787048 С1, 28.12.2022.
43. **Яцентюк С.П.** Набор олигонуклеотидов и способ идентификации и детекции ДНК бактерии *Histophilus somni* методом ПЦР в режиме реального времени /Яцентюк С.П., Козлова А.Д., Поболелова Ю.И., Красникова М.С., Брюсова М.Б., Рудняев Д.А.// Патент на изобретение RU 2752893 С1, 11.08.2021.
44. Слесаренко Н.А. Способ определения индекса фрагментации ДНК сперматозоидов у животных-производителей /Слесаренко Н.А., Борунова С.М., Иолчиев Б.С., Давыдова Е.Е., **Яцентюк С.П.**, Абрамов П.Н. // Патент на изобретение RU 2657609 С1, 14.06.2018.

Благодарности

Автор выражает искреннюю признательность за помощь и поддержку сотрудникам ФГБУ «ВГНКИ» Боруновой С.М., Козловой А.Д., Горбачевой Н.С., Брюсовой М.Б., Красниковой М.С., Поболеловой Ю.И., Лазаревой Е.А., Гордеевой В.Д., Крыловой Е.В., Солтынской И.В.

Отдельная благодарность научному консультанту Капустину А.В, а также профессору Буковой Н.К., профессору Сидорчуку А.А., профессору Гнездиловой Л.А., Орловой С.Т., Пчельникову А.В., Лайшевцеву А.И. и всем коллегам и соавторам, оказавшим техническую, консультативную и методическую помощь при выполнении работы и подготовке совместных публикаций.