

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова»

На правах рукописи

ПОЧЕПНЯ ЕКАТЕРИНА СЕРГЕЕВНА

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПРОТИВОЛЕЙКОЗНЫХ
МЕРОПРИЯТИЙ НА ТЕРРИТОРИИ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СОВРЕМЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ**

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор ветеринарных наук, профессор
Агольцов Валерий Александрович

Саратов – 2025

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Общие сведения о лейкозе крупного рогатого скота.....	10
1.2. Причины, механизмы и факторы, способствующие возникновению лейкоза крупного рогатого скота.....	12
1.3. Диагностические исследований крови и молока и других биологических объектов на лейкоз с использованием РИД и ПЦР и их эффективность.....	15
1.4. Применение электронного картографирования при эпизоотическом процессе лейкоза крупного рогатого скота.....	19
1.5. Подходы и программы, разработанные и испытанные по профилактике и ликвидации лейкоза крупного рогатого скота и их эффективность.....	22
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	30
2.1. Материалы и методы исследований.....	30
2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	33
2.2.1. Анализ эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в хозяйствах Саратовской области.....	33
2.2.2. Картографический анализ эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота на территории Саратовской области.....	38
2.2.3. Пространственный анализ возникновения свежих очагов лейкоза крупного рогатого скота в Саратовской области.....	44
2.2.4. Результаты сравнительных диагностических исследований крови и молока на лейкоз с использованием РИД и ПЦР.....	52
2.2.5. Расчёт годовых затрат на проведение лабораторных исследований сыворотки крови крупного рогатого скота на лейкоз в Саратовской области.....	55
2.2.6. Подбор олигонуклеотидных праймеров для идентификации генетического материала вируса лейкоза крупного рогатого скота полимеразно-цепной реакцией.....	58
2.2.7. Совершенствование эпизоотологического надзора за лейкозом крупного рогатого скота на территории Саратовской области.....	64

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	66
ВЫВОДЫ	74
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	76
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	78
ПРИЛОЖЕНИЯ	102

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В Российской Федерации в структуре инфекционных болезней крупного рогатого скота с 1997 года лейкоз занимает приоритетные позиции, составляя до 60 % всей инфекционной патологии данного вида животных. Согласно данным Информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота эндемичная, тяжело поддается анализу и надзору как пространственному, так и временному [3, 5, 7, 8]. Для оценки риска передачи возбудителей инфекционных болезней при перемещении скота необходим картографический анализ [143].

Экономический ущерб при лейкозе связан со снижением репродуктивной эффективности в следствии недополучение молодняка крупного рогатого скота, снижением продуктивности лактирующих коров и качественных характеристик молока, ранней выбраковкой продуктивных животных, а также торговыми ограничениями, которые накладываются на неблагополучный по заболеванию крупный рогатый скот и полученную от него животноводческую продукцию [3, 5, 8, 10, 13].

В связи с широким распространением в мире, значительным воздействием на здоровье животных и весомым экономическим ущербом энзоотический лейкоз крупного рогатого скота (международное обозначение лейкоза крупного рогатого скота) включен в перечень болезней World Organisation for Animal Health, как болезнь, подлежащая обязательной нотификации (уведомлению международного сообщества) [3, 5, 143, 179].

Большинство животных, инфицированных возбудителем лейкоза, длительно являются бессимптомными носителями вируса, у которых в течение долгого времени не проявляются клинические признаки, что способствует дальнейшему скрытому процессу распространения болезни. Кроме того, проведение серологической диагностики в период стельности может не отражать правильный инфекционный статус здоровья животного из-за физиологических различий в концентрациях антител [3, 5, 28, 29, 109].

Напряженность эпизоотического процесса лейкоза зависит от целого ряда факторов. Для успешной борьбы с лейкозом важно применение ветеринарными специалистами современных методов ранней диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота и создание учёными новых диагностических платформ и внедрение их в производство [3, 5, 23, 30].

Степень разработанности темы. Опыт снижения инфицированности крупного рогатого скота вирусом лейкоза без снижения поголовья успешно применяется в Краснодарском крае [11]. Предположено исследованиями, что в период между плановыми диагностическими исследованиями на лейкоз, молоко коров может служить объектом для анализа в классической полимеразно – цепной реакции (ПЦР) [26].

В ряде стран широко применяется идентификация гаплотипов рекомбинационным анализом для выявления молекулярных перестроек среди последовательностей вируса лейкоза, для отслеживания путей его распространения [199].

Цель исследования – совершенствование эпизоотологического надзора за лейкозом крупного рогатого скота в Саратовской области с использованием научно обоснованных элементов ГИС – технологий и лабораторных скрининговых исследований для повышения эффективности мероприятий по профилактике и ликвидации этой инфекции.

Задачи исследования:

1. Провести ретроспективный пространственный анализ эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в хозяйствах Саратовской области.
2. Осуществить картографический анализ эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота на территории Саратовской области.
3. Провести сравнительные диагностические исследования крови и молока коров на лейкоз, с использованием реакции иммунодиффузии в геле агара (РИД) и ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).
4. Подобрать праймеры для идентификации генетического материала вируса лейкоза крупного рогатого скота методом ПЦР – РВ.

Научная новизна. Проведен картографический анализ, позволивший выявить эпизоотологические особенности лейкоза крупного рогатого скота на территории Саратовской области.

Подобраны олигонуклеотидные праймеры для идентификации генетического материала изолята вируса лейкоза крупного рогатого скота, циркулирующего на территории Саратовской области, методом ПЦР-РВ.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Диссертационное исследование носит фундаментальный и прикладной характер. Полученные данные дополняют сведения об инфекционном и эпизоотологическом процессах лейкоза крупного рогатого скота. На основании полученных данных разработан картографический анализ эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота на территории Саратовской области. Установлены факторы, способствующие развитию эпизоотического процесса лейкоза среди поголовья крупного рогатого скота на территории Саратовской области.

Получен патент на изобретение: «Олигонуклеотидные праймеры для выявления РНК вируса энзоотического лейкоза крупного рогатого скота полимеразно – цепной реакцией» (№ 2824666 от 12.08.2024). Подобранные нуклеотидные праймеры для идентификации генетического материала вируса лейкоза крупного рогатого скота, ПЦР в реальном времени, позволяют сконструировать диагностический набор для проведения молекулярно-генетических исследований.

По материалам диссертационной работы опубликованы «Рекомендации по совершенствованию противолейкозных мероприятий на территории Саратовской области» (в соавторстве с Агольцовым В.А., Бирюковой О.П., Падило Л.П., 2022 г.), которые приняты к практическому использованию Управлением ветеринарии Правительства Саратовской области; Управлением Россельхознадзора по Саратовской и Самарской области и Минсельхозом Саратовской области, что подтверждено актами о внедрении от 15.04.2024 г. (приложение А, Б, В).

Результаты исследований используются в учебном процессе на кафедре «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза» при чтении лекций по дисциплине «Эпизоотология и инфекционные болезни животных» обучающимся специальности Ветеринария в ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова».

Методология и методы исследований. За методологическую основу взяты труды отечественных и зарубежных ученых по эпизоотологическому анализу лейкоза крупного рогатого скота, использования ГИС-технологий и подбору праймеров для идентификации генетического материала вируса лейкоза крупного рогатого скота методом ПЦР-РВ.

В работе использован комплекс общенаучных и специальных методов. Общенаучные методы представляют совокупность общетеоретических и эмпирических методов. Специальные методы представлены эпизоотологическими, гематологическими, иммунологическими, молекулярно-генетическими исследованиями, выполненными на поверенном оборудовании научных подразделений ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова», ГБУ «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория», г. Кропоткин, Краснодарский край.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Сопряжённый пространственно-временной картографический анализ эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в Саратовской области свидетельствует об энзоотичности болезни на исследуемой территории.
2. Использование РИД и ПЦР-РВ при исследовании молока коров позволяет дополнительно выявлять инфицированных вирусом лейкоза животных.
3. Подобранные последовательности нуклеотидных праймеров для идентификации генетического материала вируса лейкоза крупного рогатого скота можно использовать при конструировании дианостикумов для постановки ПЦР-РВ.

Работа выполнена на кафедре «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза» Федерального государственного бюджетного

образовательном учреждении высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова».

Степень достоверности и апробация работы. Степень достоверности подтверждается существенным объемом исследований фактического биологического материала, а также достаточным анализом эпизоотической ситуации по изучаемой болезни со статистической составляющей. Достоверность разности результатов средних значений определялась методами математической статистики.

Результаты исследований были представлены на следующих конференциях: конференции профессорско-преподавательского состава и аспирантов по итогам научно-исследовательской, учебно-методической и воспитательной работы за 2022 год (Саратов, 2023); Международной научно-практической конференции «Современные способы повышения продуктивных качеств сельскохозяйственных животных» (Саратов, 2023); Международная научно-практическая конференция «Молодые учёные науке и практике АПК» (Витебск, 2024); Международной научно-практической конференции «Инновации, современные тенденции развития животноводства и зоотехнической методы, технологии, экологическая безопасность производства и переработки сельскохозяйственной продукции» (Саратов, 2024).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 работ, в том числе 6 статей из перечня рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и 1 патент.

Личный вклад соискателя. Состоит в анализе литературных данных, формулировании цели и задач проводимых исследований, освоении современных методик исследования, подготовке и проведении экспериментальной части работы, получении первичных данных, обработке и анализе результатов, апробации материалов исследований на различных конференциях, подготовке научных публикаций по теме.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, материалы и методы исследований, результаты исследований, заключение, выводы, список литературы, включающий 222 источников, из которых 191 иностранных и 31 отечественных авторов, а также список сокращений и приложения. Работа изложена на 106 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 15 рисунками и 4 таблицами.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие сведения о лейкозе крупного рогатого скота

Вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) является причиной лейкоза крупного рогатого скота и злокачественной формы В-клеточной лимфомы [169].

Лейкоз может причинить ущерб селекции и выращиванию ценных чистых пород высокопродуктивных животных. Племенные хозяйства из-за лейкоза не могут реализовывать ценных в генетическом плане бычков и телочек, в связи с этим хозяйства становятся товарными производителями мяса и молока. Также помимо ущерба и огромных затрат на ветеринарно-гигиенические мероприятия, лейкоз негативно влияет на общеэкономические показатели производства животноводческой продукции [22].

Как и другие ретровирусы, ВЛКРС, вызывает множественные нарушения иммунной системы, влияя как на клеточный, так и на гуморальный иммунитет, которые, влияют на снижение выработки молока и уменьшение продолжительности продуктивной жизни [169]. ВЛКРС является наиболее важным заболеванием крупного рогатого скота. У большинства крупного рогатого скота инфекция протекает бессимптомно, что способствует чрезвычайно высокой скорости распространения вируса. В среднем стойкий лимфоцитоз наблюдается у 30% из зараженных, с вариативными клиническими симптомами; лишь у немногих животных (менее 5%) наблюдаются клинические признаки ВЛКРС. На молочных фермах заболевание наносит, как прямые, так и косвенные потери. Потери связаны со снижением продуктивности животных и продолжительности жизни коров, а также в связи с ограничениями, вводимыми на вывоз животных и продуктов животноводства из неблагополучных территорий. Так как не существует действенной вакцины против лейкоза крупного рогатого скота данное заболевание сложно поддается контролю. В связи с данным обстоятельством ранняя диагностика заболевания имеет большое значение [114, 166].

ВЛКРС представляет собой дельтаретровирус, относящийся к семейству *Retroviridae*. Он тесно связан с вирусом Т-клеточного лейкоза человека типов 1 и 2 (HTLV-1 и -2) и с вирусами Т-клеточного лейкоза обезьян. Возбудитель ВЛКРС является наиболее распространенным неопластическим заболеванием молочного и мясного крупного рогатого скота [166, 167].

В большинстве случаев инфекция ВЛКРС (около 70%) протекает бессимптомно (субклинически). Следовательно, существует чрезвычайно высокая вероятность быстрого распространения вируса в стаде и контроль над ним становится невозможным [166, 170].

Около 30% крупного рогатого скота, инфицированного ВЛКРС, формируют стойкий лимфоцитоз, а примерно у 1–5% после длительного латентного периода (от одного до восьми лет) могут сформироваться опухоли в форме злокачественной В-клеточной лимфосаркомы [161, 166].

Даже на латентной стадии лейкемии у инфицированного крупного рогатого скота нарушается функционирование иммунной системы, что сказывается и на продуктивности животных. В целом болезнь причиняет значительный экономический ущерб из-за снижения производства молока, нарушения репродуктивной функции и ограничений по импорту из неблагополучных районов, в связи с этим коров вынужденно досрочно выбраковывают [62, 90, 166].

По этим причинам Всемирная организация здравоохранения животных (МЭБ) включили ВЛКРС в список болезней, которые оказывают большое влияние на международную торговлю. Например, ВЛКРС заражает более 40% поголовья крупного рогатого скота в США, а ежегодные экономические потери оцениваются в 525 миллионов долларов США только от потерь молока [25, 54, 166].

Что касается опасности ВЛКРС для здоровья людей, окончательный вывод на сегодняшний день ещё не сделан. Провирусная ДНК ВЛКРС была выявлена в молочных и мясных продуктах, что не исключает возможности передачи заболевания человеку через данные продукты питания. А также возможной связи между ВЛКРС и развитием рака молочной железы у женщин. Сравнение данных

между распространенностью рака молочной железы в некоторых странах сопоставляют с процентом потребления мяса говядины и молока [166, 180].

1.2. Причины, механизмы и факторы, способствующие возникновению лейкоза крупного рогатого скота

Инфекция ВЛКРС распространена по всему миру. Наиболее широко он распространен в США, в ряде стран Центральной Европы, Швеции, Странах Ближнего Востока, Африки, Австралии [11, 12, 14, 17]. Согласно исследованиям, распространённость ВЛКРС составляет 38,6% в США, 18,29% в Китае, 2,28% в Турции и 0,04% в Италии. В Японии лейкоз крупного рогатого скота является заболеванием, подлежащим обязательной регистрации, и с 1997 года за ним ведется пассивное наблюдение. С 2009 по 2011 год распространенность ВЛКРС среди животных в этой стране составила 35,2% [30, 57, 166].

Вирус лейкоза крупного рогатого скота был завезен в СССР из Германии с 1945-1947 гг. В дальнейшем вирус лейкоза распространился практически во всех субъектах Российской Федерации.

Передача ВЛКРС в популяциях животных происходит путем переноса инфицированных лимфоцитов от инфицированных животных и зачастую связана с проведением лечебно-диагностических мероприятий, в которых участвует человек (ятрогенный путь). Это, например происходит при многократном использованием игл, через поврежденную кожу и слизистые, при обеззараживании рогов и ректальной пальпации. с использованием обычного рукава. Кроме того, при совместном содержании инфицированных ВЛКРС и здоровых животных был выявлен прямой контактный путь передачи вируса. Завоз крупного рогатого скота из неблагополучных по лейкозу ферм является основным фактором риска передачи вируса между стадами. По этой причине необходимо использовать данные о благополучии или наоборот неблагополучии скота, с использованием геоинформационных технологий [93, 107, 166].

Так как вирус лейкоза крупного рогатого скота находится в форменных элементах крови - лимфоцитах, его передача может осуществляться горизонтальным и вертикальным путем. Факторами передачи может быть свежая

кровь, сперма, слюна, молоко, выделения из носа от больных животных, у которых преобладает стойкий лимфоцитоз, а также имеется провирусная ДНК [92].

Весомый риск горизонтального распространения вируса лейкоза представляют жалящие мухи и кровососущие насекомые, во время укусов с кровью могут выступать в качестве переносчиков. Ключевая роль жалящих мух в распространении ВЛКРС была зафиксирована при эпизоотологических исследованиях в различных странах. Нашествие слепней летом в Японии, стало причиной возникновения лейкоза внутри стада крупного рогатого скота. После того, как владельцы ввели жесткий контроль над насекомыми, поддерживали чистоту в помещениях, не допускали скопления навоза и кормовых отходов, использовали инсектициды, обрабатывали места возможного скопления насекомых, в стадах мясного скота не наблюдалось новых случаев возникновения лейкоза. Данное исследование показало, что патоген HTLV-1 или HTLV-2 обеспечивает передачу через кровь [65, 92, 124].

Значительная передача ВЛКРС возможна вертикально, т.е. от инфицированной матери к плоду или при выпаивании молозива или молока. Такой механизм передачи коррелирует с уровнем и временем инфицирования матери [40, 87, 92].

Искусственное и естественное осеменение и оплодотворение (зиготы при трансплантации) также могут быть факторами в вертикальном распространении ВЛКРС. Хотя риск заражения спермой быков, инфицированных ВЛКРС, незначителен, использование инфицированных быков при естественном осеменении может быть связано с распространением ВЛКРС. Описаны случаи заражения коров после естественного спаривания с инфицированными быками. Таким образом, быки, используемые для искусственного и естественного осеменения, должны быть проверены на отсутствие ВЛКРС перед сезоном размножения, чтобы предотвратить распространение вируса [49, 92, 201].

Клинические проявления заболевания могут включать в себя следующие проявления: отсутствие аппетита, расстройство пищеварения, снижение надоев

молока, хроническое вздутие живота, смещение сычуга, диарея, запор, увеличение поверхностных лимфатических узлов, хромота, паралич, потеря веса, слабость или общее изнурение, а иногда и неврологические проявления [92, 171].

Крупный рогатый скот с лимфосаркомой в большинстве случаев погибает скоропостижно, либо через некоторое время после появления признаков, в зависимости от пораженных органов. Злокачественные новообразования ВЛКРС поражают органы различных систем (репродуктивную, пищеварительную, мочевыделительную, сердечно-сосудистую и иммунную) [92, 113, 212].

Ранее было высказано предположение, что инфекция ВЛКРС снижает эффективность производства энергии у коров, так как вероятно вирус влияет на микробиоту рубца и кишечника, что может частично объяснить негативные эффекты, связанные с ВЛКРС. Вместе с тем, ВЛКРС вызывает дисфункцию моноцитов и нейтрофилов, что в следствии приводит к иммуносупрессии. Оба эти явления могут прояснить повышенную восприимчивость животных к другим инфекциям, снижение их молочной продуктивности и репродуктивную непроизводительность [33, 92].

Передача возбудителя через лейкоциты является наиболее эффективным путем передачи ВЛКРС, так как вирус присутствует в лимфоцитах периферической крови инфицированного крупного рогатого скота [206]. Ранее сообщалось, что инфицированные ВЛКРС клетки могут присутствовать в молоке и молозиве ВЛКРС-положительных самок. Ватануки и др. обнаружили провирус ВЛКРС в пробах молока и молозива. Однако устойчивость телят к инфекции, передающейся через молоко, можно объяснить наличием вируснейтрализующих антител, которые все телята, вскармливаемые ВЛКРС-положительными самками, приобретают через молозиво и сохраняют в сыворотке крови до 6 месяцев. Кроме того, Кониши и др. продемонстрировали, что антитела в молоке и молозиве ВЛКРС - положительных самок могут защищать от ВЛКРС -инфекции *in vitro*. Передача ВЛКРС через молоко, по сравнению с контактной передачей, происходит с меньшей эффективностью передачи (около 6-16%). Таким образом, критическая оценка этих данных подтверждает вывод о том, что передача ВЛКРС

происходит и через молоко. Поэтому крайне важно оценить инфекционность молока и молозива от ВЛКРС-инфицированных коров, проведя детальное исследование [211].

1.3. Диагностические исследования крови и молока и других биологических объектов на лейкоз с использованием РИД и ПЦР и их эффективность

Отсутствие вакцинации и эффективного лечения наносит крупный экономический ущерб хозяйствам. Для диагностики ВЛКРС существует множество методов, основанных на серологических (РИД и ИФА), а также молекулярно-генетических (ПЦР) исследованиях [1].

Вирус лейкоза КРС обладает способностью к персистенции в организме животных в виде провируса, в связи, с чем происходит постоянная продукция специфических антител. Для их выявления используются серологические методы – реакция иммунной диффузии и иммуноферментный анализ, основанные на выявлении антитела к антигену ВЛКРС [17].

Реакция ПЦР позволяет обнаружить вирус лейкоза крупного рогатого скота в крови животных уже на ранних стадиях заболевания. На сегодняшний день известно большое количество синтетических олигонуклеотидных праймеров для обнаружения РНК вируса лейкоза КРС с помощью ПЦР-РВ. Для выявления РНК лейкоза используют олигонуклеотидные праймеры. Праймеры амплифицируют участки двух целевых генов, фланкирующие фрагменты консервативного гена *pol* и гена *tax*, выявляемых на самых ранних стадиях инфекции, которые комплементарны выбранным областям генома вируса лейкоза КРС. Однако следует отметить, что недостатком данного способа диагностики является длительность проведения ПЦР в режиме реального времени и высокая стоимость [17, 24].

Предложены праймеры и способ выделения РНК вируса лейкоза КРС, основанный на ПЦР в режиме реального времени, состоящий из выделения РНК, включающий использование прямого и обратного олигонуклеотидного праймера, с добавлением в реакционную смесь олигонуклеотидного зонда с флуоресцентной

меткой для выявления фрагмента гена р24 провируса лейкоза крупного рогатого скота [15].

Чтобы повысить распознавание инфицирования ВЛКРС и отслеживать распространение инфекции, требуется разрабатывать методы диагностики для повседневного упрощенного применения. В настоящее время для скрининга используются различные серологические тесты. Серологические тесты могут обеспечить быструю идентификацию, но их нельзя применять для тестирования любого биологического материала, и они менее чувствительны по сравнению с другими тестами. Серологические тесты нельзя использовать для выявления ранних и переходных уровней ВЛКРС-инфекции, для чего можно использовать ПЦР-тест [122].

По рекомендациям МЭБ серологические тесты *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) — иммуноферментный анализ и *Agar Gel Immuno Diffusio* (AGID) — иммунодиффузия в агаровом геле являются стандартными методами выявления антител к ВЛКРС. ELISA имеет более высокую чувствительность [65, 110, 122].

Инкубационный период при экспериментальном заражении длится 60-750 сут, а при спонтанном от 2 до 6 лет. При ранней диагностике лейкоза КРС методом РИД невозможно выявлять зараженных животных в инкубационный период. Данный метод диагностики эффективен только в период образования определённого титра специфических антител. В случае нахождения в стаде крупного рогатого скота хотя бы одного инфицированного вирусом животного существует опасность заражения остального здорового поголовья. По этой причине разрабатываются методы диагностики, способные выявить инфицированных вирусом животных до образования специфических антител. К таким методам относится молекулярно-генетическая диагностика, которая позволяет выявлять вирус лейкоза у крупного рогатого скота уже на стадии инфицирования [16, 27, 177, 178, 192].

В сопоставлении с серологическими тестами разработка высокочувствительных и более специфичных молекулярных методов, особенно на основе различных типов ПЦР, произвело переворот в диагностике ВЛКРС и

других вирусных заболеваний. Обнаружение провирусной ДНК ВЛКРС является полезным приспособлением для определения, инфицировано ли животное ВЛКРС или нет [25, 122].

У инфицированного крупного рогатого скота ПЦР-тесты могут напрямую обнаружить наличие провирусной ДНК, даже при низкой инфицированности и временно отсутствующих антител. Благодаря проведению ПЦР секвенирования и филогенетического анализа появляется возможность исследовать распространение генотипов ВЛКРС по всему миру [81, 122].

Существуют разные виды ПЦР-тестов, которые подходят для разных целей. С помощью данного метода можно диагностировать обнаружение вируса на ранних стадиях ВЛКРС в образцах различного биологического материала. Гораздо более высокие результаты и уровни чувствительности обеспечивают полугнездовые и вложенные тесты, чем одиночная ПЦР [46, 87, 122].

Другим быстрым и простым типом ПЦР, не требующим ни трудозатрат, ни времени является система прямой ПЦР [75, 163, 122].

Поскольку провирусная нагрузка ВЛКРС играет значительную роль как в прогрессировании заболевания, так и в прогнозе, необходимость в некоторых молекулярных методах количественного определения копий вируса у инфицированного животного стала обязательной как для диагностики, так и для стратегий ликвидации лейкоза крупного рогатого скота. Количественная ПЦР в реальном времени на ВЛКРС, основанная на асимметричных цианиновых красителях семейства (SYBR), является подтверждающим методом, который показывает высокую чувствительность при обнаружении провирусной нагрузки ВЛКРС у инфицированного крупного рогатого скота [101, 122].

Еще один вид анализа - индукция люминесцентного синцития (LuSIA) представляет собой простой, высокочувствительный и быстрый метод. Его также можно использовать для чувствительного и раннего обнаружения как клеточной, так и внеклеточной инфекции ВЛКРС [77, 122].

Помимо упомянутых ранее подходов к диагностике ВЛКРС, индикатором ВЛКРС-инфекции могут служить изменения гемато-биохимического и

оксидантного статуса животных. Инфекция ВЛКРС связана с селективным снижением активности глутатионпероксидазы без каких-либо изменений уровней общих маркеров окислительного стресса в плазме (т.е. гидроперекисей, конъюгированных диенов и малонового диальдегида) [30, 48, 122]. Лейкемическая лимфоцитарно-клеточная инфильтрация в тканях печени и почек способствует нарушению функции печени и почек, ухудшению фильтрационной способности нефронов вследствие их поражения, возникающего на ранней стадии лейкоза [53, 64, 108, 122, 197].

Молоко и молозиво инфицированных животных содержат ВЛКРС-инфицированные клетки, которые являются одним из основных путей передачи ретровирусов животных следующему поколению. Раннее выявление и изоляция зараженного скота от здорового – единственный способ предотвратить передачу инфекции другим животным [122, 154, 202].

Инфекционность молочных клеток инфицированных ВЛКРС самок была успешно определена с использованием анализа индукции синцитиального свечения (LuSIA) [211]. Среди образцов молока от 10 коров исследованных традиционной LuSIA, положительных на провирус ВЛКРС, клетки молока от одной ВЛКРС-инфицированной матери с лимфомой, обладали инфекционностью. Поэтому был разработан новый высокочувствительный LuSIA, оптимизированный для исследования клеток молока. Шесть ВЛКРС-инфицированных, но здоровых самок без лимфомы, обладали инфекционностью, что было определено с помощью улучшенного LuSIA. Это первый отчет, указывающий на инфекционную способность клеток молока от ВЛКРС-инфицированных коров *ex vivo*. Таким образом, эти результаты позволяют предположить, что передача ВЛКРС крупному рогатому скоту может быть вызвана потреблением сырого молока и его исследование является очень важным. Хотя ранее сообщалось, что антитела в молоке и молозиве ВЛКРС - положительных самок защищают от ВЛКРС-инфекции *in vitro*. Поэтому важно оценить влияние нейтрализующих антител на инфекционность образцов молока с помощью улучшенного LuSIA [36, 116, 211].

1.4. Применение электронного картографирования при эпизоотическом процессе лейкоза крупного рогатого скота

Одним из основных результатов эпизоотологических исследований и активно применяемым в последующим дополнительным диагностическим инструментом является эпизоотологическая карта – топографическая карта местности с визуально зафиксированной информацией об эпизоотическом состоянии территории. Карта используется для оценки обстановки по инфекционным болезням животных, определения благополучия территорий, групп животных, времени и факторов риска, на основе которых проводится планирование профилактической и противоэпизоотической работы на данной территории. Применение электронного картографирования значительно упрощает решение данных задач [22].

В международной и отечественной практике известны примеры эффективного использования ГИС для контроля эпидемических и эпизоотических ситуаций с четко выраженной привязкой к географическим факторам [27, 69, 125, 155].

Странами Европейского союза создана информационная система болезней животных (ADIS). Она предназначена для регистрации и документирования развития ситуации с важными инфекционными болезнями животных, выявляемых в процессе категоризации, выполняемом в рамках Закона о здоровье животных (AHL) [14].

ADIS обеспечивает единые условия для осуществления уведомлений и отчетности Союза, как это предусмотрено Регламентом ЕС 2020/2002 [28, 78].

Это инструмент управления болезнями, который обеспечивает немедленное уведомление и предупреждение, а также подробную информацию о вспышках наиболее важных болезней животных в странах, которые подключены к приложению [26].

Это обеспечивает немедленный доступ к информации о вспышках заразных болезней животных и обеспечивает реализацию системы раннего оповещения,

позволяющей оперативно реагировать на контроль эпидемиологической ситуации [26, 85, 200].

ADIS оказывает прямое влияние на торговлю живыми животными и продуктами их переработки, как на внутреннем рынке, так и на международной торговле с третьими странами [26, 133].

Хотя ADIS представляет собой систему, не связанную напрямую с безопасностью пищевых продуктов, она оказывает влияние на общественное здравоохранение в отношении всех зоонозных заболеваний, входящих в ее сферу действия [26, 39].

Для оценки риска заноса инфицированного ВЛКРС крупного рогатого скота Косуке Ноцу с сотр. в 2020г. было проведено исследование, в результате которого было установлено, перемещение крупного рогатого скота в значительной степени способствует передаче вируса ВЛКРС между фермами. В этом исследовании представлен риск заноса ВЛКРС на уровне фермы с использованием анализа географического перемещения крупного рогатого скота. Обобщенная линейная смешанная модель, прогнозирующая долю крупного рогатого скота, инфицированного ВЛКРС, была построена на основе взвешенной централизации. Полученные результаты предполагают положительную связь между взвешенной центральностью по степени и предполагаемым количеством завезенного ВЛКРС-инфицированного крупного рогатого скота [166, 172].

Для изучения распространения болезней при перемещении животных обширно используется анализ социальных сетей (SNA). Этот метод помогает оценивать риск распространения и применения, надзорных мер контроля, через передвижения крупного рогатого скота [44, 166].

В конечном итоге использование анализа сети перемещения крупного рогатого скота с учетом инфекционного статуса ВЛКРС позволило исследователям оценить риск завоза инфицированного ВЛКРС скота между фермами, расположенных в различных регионах. Количественные результаты показали, что фермы с большим количеством завезенного крупного рогатого скота, скорее всего, занесут ВЛКРС в свои стада. Эти результаты показывают, что

стратегия контроля ВЛКРС, ориентированная на перемещение скота между фермами, крайне необходима. Кроме того, это исследование подчеркнуло важность контроля ВЛКРС на родильных фермах. Эти основанные на оценке риска подходы к оценке и контролю очень полезны и эффективны не только при ВЛКРС, но и при других инфекционных заболеваниях животных [166, 183].

Данные о перемещениях крупного рогатого скота исследователем Косуке Ноцу и др. были получены из службы поиска индивидуальной идентификационной информации крупного рогатого скота, управляемой Национальным центром животноводства (NLBC). История перемещения каждого животного включала идентификацию и регион для всех ферм, рынков, упаковщиков и боен, где находились на протяжении всей жизни животные. Префектура, где родился крупный рогатый скот, бойня, дата убоя, соотношение ELISA S/P (проба к положительному результату), пол, возраст, порода и масса туши всего крупного рогатого скота указаны в дополнительном наборе данных [31, 79, 166].

Статическая невзвешенная направленная сеть, показывающая перемещения крупного рогатого скота на протяжении всей жизни, была построена с помощью пакета «igraph», оснащенного программой R (v. 3.6.2; основная группа R, Вена, Австрия). В первую очередь учитывались ключевые узлы нахождения животных. Узел относился к каждому помещению, включая фермы, рынки и бойни, а направленная привязка указывала передвижение скота [166, 203].

Применение электронного картографирования в эпизоотическом процессе широко применяется в Европе, например в городе Тулча в Румынии данные об эпизоотической ситуации по ВЛКРС были собраны в Дирекции ветеринарной и пищевой безопасности одноимённого округа, которая представляет собой административно-территориальную структуру национального компетентного органа в данной области. Для анализа данных были рассчитаны описательные статистические данные, такие как заболеваемость и распространенность ВЛКРС, с таблицами частот. Такие параметры, как количество мест со вспышками, инфицированных животных и общее количество поголовья крупного рогатого

скота за каждый год, использовались для расчета заболеваемости и распространенности болезни ВЛКРС в год в округе Тулча. Вспышка инфекции в определенной местности определялась как точка распространения заболевания. Распространенность рассчитывали, как количество зараженных животных от общего числа протестированных животных. Количество протестированных животных было основано на опросах фермеров о лейкозе крупного рогатого скота в их стадах. Показатели распространенности рассчитывались с учетом количества животных для каждой территории отдельно (дельта Дуная и материк). Тесты на пропорции (Prtesti) рассчитывались в программе Stata 15® (StataCorp LLC, США) и использовались для сравнения распространенности и показателей заболеваемости в разных регионах и в различные годы. Наблюдения с неправдоподобными значениями удалялись и проверялись на наличие двойных записей.

На уровне Европейского Союза действуют протоколы, касающиеся эпизоотического статуса каждого государства-члена и региона. Эта работа является частью действия SOUND-control COST, основанного на эпизоотической ситуации по инфекционным заболеваниям крупного рогатого скота и экономических последствий внутри сообщества, целью которого является исследование требований и потребностей в единой общей нормативной базе, основанной на полученных результатах [64, 90, 155].

1.5. Подходы и программы, разработанные и испытанные по профилактике и ликвидации лейкоза крупного рогатого скота и их эффективность

Программы борьбы с вирусом лейкоза крупного рогатого скота обычно используют меры, направленные на снижение передачи вируса, тем самым предотвращая новые инфекции. Внедрение передовых методов управления, которые предотвращают возникновение новых случаев инфекции, путем разделения или выбраковки зараженного скота или комбинации этих методов. Крупный рогатый скот с положительным тестом на лейкоз изолируют, заменяя

инфицированных животных на здоровых. Использование любых программ оздоровления от лейкоза финансово затратны. В любом случае, в процессе принятия решения фермерами о необходимости борьбы с болезнью на сельхозпредприятиях, потери молочной продукции при лейкозе будут сопоставляться с экономическими преимуществами его искоренения [89].

Программа модели дерева решений использовалась для оценки экономических аспектов снижения 40% распространенности ВЛКРС внутри стада на молочных фермах путем внедрения различных стратегий контроля в течение 10 лет. Исследованными стратегиями были (1) все стратегии управления, включая 3 варианта управления молозивом; (2) некоторые стратегии управления; (3) тестирование и отбраковка; и (4) протестировать и отделить. Каждую из этих стратегий сравнивали с бесконтрольным подходом на ферме. Предполагалось, что распространенность этого подхода без контроля останется постоянной с течением времени. Каждая стратегия борьбы повлекла за собой определенные ежегодные затраты и привела к ежегодному снижению распространенности, тем самым влияя на годовой частичный чистый доход. Предполагалось, что заражение ВЛКРС приведет к снижению надоев молока, уменьшению продолжительности жизни коров и увеличению брака при убое туш крупного рогатого скота с лейкозом крупного рогатого скота, тем самым снижая чистый доход [173].

На основе разработанной и представленной модели, реализация любой из 4 предложенных стратегий контроля на ферме (все стратегии управления, некоторые стратегии управления, тестирование и выбраковка, тестирование и сегрегация) привела к положительной чистой выгоде для среднего молочного предприятия на ферме со 146 коровами и 40% распространенностью вируса ВЛКРС в стаде, независимо от выбранной стратегии. Кроме того, модель также выявила значительные экономические потери из-за заражения ВЛКРС. Эти результаты должны способствовать осуществлению программ контроля ВЛКРС и его искоренению на молочных фермах [48, 173].

Недавние исследования показывают, что вероятность вертикальной передачи ВЛКРС на фермах зависит от вирусной нагрузки организма коровы.

Коровы с более высоким титром вируса могут быть источником материнской инфекции, передающейся телятам. Телята, рожденные от самок с высокой провирусной нагрузкой, в большинстве случаев являются сероположительными. Крупный рогатый скот с высокой вирусной нагрузкой является потенциальным распространителем инфекции в стаде, животные с низкой вирусной нагрузкой редко являются источником возбудителя [135, 173, 202].

Предполагают, что передачу и распространенность ВЛКРС внутри стада можно снизить путем выявления и удаления (выбраковки или сегрегации) ELISA - положительных коров. Проведённое пилотное полевое испытание на трех стадах, в ходе которого напряженность измерялась у крупного рогатого скота, положительного по ELISA, для выявления крупного рогатого скота, который предположительно был наиболее заразным, чтобы их можно было удалить или отделить от вирус-отрицательного крупного рогатого скота стада, с целью снижения передачи и распространенности вируса в этих стадах. Таким образом, в случае сокращения производительности, приоритетное удаление коров с высокой вирусной нагрузкой может позволить быстро снизить вероятность заражения ВЛКРС, что, в свою очередь, может помочь в повышении эффективности производства молока в оставшемся стаде [60, 88].

Словения до 2005 года имела статус неблагополучной страны по лейкозу крупного рогатого скота. В стране осуществлялся надзор на основе серологического тестирования репрезентативного количества стад и осмотра туш при убое или вскрытии. Отсутствие мотивации фермеров участвовать в добровольных программах борьбы с болезнями, а также внедрять и соблюдать строгие меры биобезопасности являлись насущной проблемой в улучшении состояния здоровья словенского крупного рогатого скота [115, 213].

В 2005 году ЕС предоставил Словении официальный статус страны, свободной от ВЛКРС (<0,2% зараженных стад). Последний зарегистрированный случай, выявленный в ходе активного надзора, был в 2006 году, и с тех пор в Словении было зарегистрировано восемь случаев у импортированного крупного рогатого скота. В Словении теперь действует программа эпизоотологического

надзора, подтверждающая национальный статус страны, свободной от ВЛКРС. При обнаружении ВЛКРС-положительных животных следует принять меры по ликвидации. Все отборы проб и анализы оплачиваются государством, все остальные расходы несет владелец [36, 151].

Чтобы сохранить национальный официально благополучный статус, в Словении действует программа активного надзора, которая включает серологическое тестирование крупного рогатого скота старше 12 месяцев. Все положительные и подозрительные случаи подтверждаются повторным тестированием серологическими и молекулярными методами. Пассивный надзор осуществляется на бойнях при исследовании туш, при котором образцы всех туш с опухолеподобными поражениями исследуются на наличие ВЛКРС. Та же процедура используется, когда при патологоанатомическом вскрытии обнаруживаются опухолеподобные поражения. Пассивный надзор осуществляется также на местах, где ветеринары должны регистрировать животных с увеличенными лимфатическими узлами, недостаточно выраженным или явным лимфоцитозом, при котором лимфоциты составляют более 65% всех лейкоцитов. Затем ветеринарный врач должен провести эпизоотологическое расследование и обеспечить серологическое тестирование всех животных в хозяйстве. Запрещается любое перемещение животных, кроме как для убоя, все животные с подозрением на заражение должны быть изолированы, а на въезде в хозяйство и загоны должны быть установлены дезинфекционные барьеры. Если ВЛКРС подтверждается серологическими или молекулярными тестами или патологоанатомическим исследованием, все положительные животные и любое потенциально инфицированное потомство инфицированных самок должны быть выбракованы в течение 30 дней после того, как владелец и ветеринарный врач будут проинформированы о результатах теста. Любое перемещение продуктов животного происхождения с фермы запрещено. Очистку и дезинфекцию должна проводить аккредитованная для этих целей организация. Стадо восстанавливает благополучный статус после выбраковки всех положительных животных. Всех остальных животных старше 12 месяцев проверяют дважды: через 3 месяца после

удаления последнего положительного животного и ещё через 4-12 месяцев. Все тесты должны быть отрицательными [44, 151, 182].

В Австрии в 2007 году было применено, а в последующие годы уже установлено общенациональное массовое тестирование молока и, начиная с 2007 года, каждый год тестировалось около 35 000 хозяйств [105].

Последнее животное с положительным результатом теста было обнаружено в Австрии в 2006 году, без каких-либо последствий для инфицирования здоровых животных. Статус благополучия в этой стране сохраняется до тех пор, пока 99,8% поголовья не заражены возбудителем болезни [83, 105].

Программа искоренения является обязательной и полностью финансируется правительством. Ежегодно в племенных хозяйствах весь крупный рогатый скот старше 12 месяцев подвергается серологическим исследованиям. Раньше эталонным тестом была РИД, но в настоящее время используется иммуноферментный анализ (ELISA) из-за его более высокой чувствительности [50].

Положительные реагирующие в ИФА животные считаются инфицированными и незамедлительно уничтожаются с выплатой фермеру компенсации. Более того, инфицированные стада неоднократно проверяются для подтверждения отсутствия дальнейших случаев заболевания [50, 71].

Искоренение ВЛКРС в некоторых странах Европы было достигнуто за счет комбинированного управления, сегрегации и выбраковки. Хотя применение передовых практик управления, направленных на профилактику передачи ВЛКРС, привело к снижению распространенности ВЛКРС внутри стада, оно не привело к полному искоренению ВЛКРС в стаде. Таким образом, необходимо дальнейшее изучение контроля и искоренения ВЛКРС только с помощью передовых методов управления. Кроме того, была исследована роль провирусной нагрузки у инфицированного крупного рогатого скота. Крупный рогатый скот с высокой провирусной нагрузкой, по-видимому, с большей вероятностью заразит других, тогда как скот с очень низкой провирусной нагрузкой, по-видимому, имеет низкий риск передачи ВЛКРС. Информация о провирусной нагрузке может

быть принята во внимание при контроле ВЛКРС в стадах с высокой заболеваемостью. Существует необходимость в детальных, крупномасштабных исследованиях, изучающих роль конкретных путей передачи, зная провирусную нагрузку инфицированных коров [49, 125, 136].

Программы ликвидации ВЛКРС в Европейском Союзе и других странах применяли подходы тестирования и выбраковки, в результате чего частое тестирование всего восприимчивого крупного рогатого скота и выбраковка особей с положительным результатом теста снизило распространенность и в конечном итоге удалило вирус из стад. В отличие от ситуации в Северной Америке, распространенность ВЛКРС внутри и между стадами в европейских странах остаётся низкой [125, 174].

Поскольку распространенность вируса ВЛКРС внутри стада в Северной Америке значительно варьируется, вероятно, необходимы различные подходы к эффективным стратегиям борьбы с ВЛКРС. Хотя выбраковка животных с положительным результатом теста возможна в стадах с низкой распространенностью, это часто экономически нецелесообразно или практически невозможно в стадах с высокой распространенностью. В этих стадах могут быть реализованы альтернативные подходы к контролю ВЛКРС, такие как сегрегация крупного рогатого скота с положительным тестом на ВЛКРС и внедрение лучших практик управления, направленных на снижение или предотвращение передачи ВЛКРС внутри стада [62, 125].

После выявления ВЛКРС обычно используются три стратегии борьбы по отдельности или в сочетании: (1) выбраковка крупного рогатого скота с положительным тестом, (2) физическое разделение крупного рогатого скота с положительным и отрицательным тестом в отдельных коровниках, загонах внутри коровника или пастбища, и (3) внедрение исследований для снижения передачи ВЛКРС [127, 155].

В последнее время наибольший интерес вызывает влияние провирусной нагрузки у крупного рогатого скота, инфицированного ВЛКРС, на динамику передачи. Результаты были сочтены актуальными для борьбы с ВЛКРС на

фермах, особенно в ситуациях, когда распространенность в начале программы борьбы относительно высока [125, 134].

На сегодняшний день надежная идентификация крупного рогатого скота с высокой провирусной нагрузкой зависела от относительно дорогих методов на основе ПЦР, что затрудняло их использование. К счастью, титрование антител на основе ELISA потенциально может стать более дешевой альтернативой, поскольку титры антител р24 (антиген ВЛКРС) напрямую коррелируют с провирусной нагрузкой. Кроме того, значения оптической плотности ELISA напрямую коррелировали с негативными производственными эффектами инфекции ВЛКРС [125, 147].

Другим экономически эффективным подходом может быть дифференциация клеток крови, при которой увеличение количества лейкоцитов можно использовать в качестве индикатора высокой провирусной нагрузки [155].

Несмотря на эти различия в подходах, стало ясно, что инфицированный вирусом крупный рогатый скот содержит в своих клетках разное количество провируса, обычно выражающееся в низкой или высокой провирусной нагрузке [114, 155].

До сих пор об успешной ликвидации ВЛКРС сообщалось только при применении стратегий выбраковки или сегрегации. Однако со временем диагностические методики усовершенствовались [120, 155, 167].

Искоренение и снижение распространенности ВЛКРС, по-видимому, зависело от приверженности фермера борьбе с ВЛКРС (т.е. усилий по выбраковке или сегрегации). Чем больше усилий по борьбе было предпринято, тем более эффективным был контроль ВЛКРС, хотя неконтролируемые или неизвестные факторы могли помешать усилиям по искоренению. Таким образом, в исследованиях с использованием тестов с низкой чувствительностью (например, иммунодиффузионного теста в агаровом геле) могли быть упущены коровы, которые были бы идентифицированы как положительные с помощью современных более чувствительных методов (например, ELISA) и, следовательно, неверно сообщали об успешной эрадикации ВЛКРС. Аналогичным образом,

усилия по ликвидации можно ускорить с помощью современных серологических методов или молекулярной диагностики (например, ПЦР), поскольку лейкоз КРС можно идентифицировать более надежно и в более ранние сроки заражения [61, 155, 182].

Таким образом ни одно из исследований не продемонстрировало, что применение только методов управления привело бы к искоренению ВЛКРС на ферме, а истинный эффект стратегий борьбы зависит от многих составляющих.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований

Для анализа эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в Саратовской области были использованы данные ежегодных статистических отчетов управления ветеринарии Правительства Саратовской области, аналитические отчеты по эпизоотической ситуации в Российской Федерации информационно-аналитического центра Россельхознадзора, данные по поголовью скота в Саратовской области Территориального органа Федеральной службы государственной статистики по Саратовской области за 2011-2023гг. Информация по эпизоотической ситуации лейкоза крупного рогатого скота вводилась в базу данных, разработанную на основе системы Microsoft Office Excel. Структура базы данных содержала разделы о вспышках, распространении, и инфицированных вирусом лейкоза (серологически позитивных) животных. Проводили расчеты коэффициента очаговости (КО), индекса эпизоотичности (ИЭ), степени распространения болезни (К), коэффициента напряженности эпизоотической ситуации (W) [2].

Для картографического анализа эпизоотической ситуации в настоящем исследовании использовали программное обеспечение ArcGIS Desktop 10.4. и Методические рекомендации по использованию географической информационной системы ArcGIS в эпизоотологическом анализе [14].

Для определения диагностической ценности РИД и ПЦР-РВ совместно с ветеринарными врачами ОГУ «Красноармейская районная ветеринарная лаборатория СББЖ» и сотрудниками Кропоткинской ветеринарной лаборатории Краснодарского края были проведены скрининговые лабораторно-диагностические исследования на лейкоз проб крови и молока крупного рогатого скота.

Параллельные исследования проб крови проводили серологическим методом – РИД и молекулярно-генетическим – ПЦР-РВ.

Исследования проб сыворотки крови на лейкоз в РИД проводили по стандартной общепризнанной методике. Для проведения исследований необходимо: сыворотка крови; набор для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота (ТУ 10-19-442-87), изготовленный в БиоК ФКП «Курская биофабрика», в состав которого входят: сухой специфический антиген вируса лейкоза крупного рогатого скота, разбавитель антигена, специфическая преципитирующая сыворотка (СПС) к вирусу лейкоза, солевая смесь агара (ССА) и разбавитель ССА, контрольные сыворотки: отрицательная, положительная, слабоположительная и положительная с антителами к р-24 антигену ВЛКРС.

Скрининговые исследования проб крови на лейкоз проводили после получения двух фракций: сыворотки и клеток форменных элементов (эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов, включая лимфоциты). Всего исследовано 418 проб крови и 418 проб молока от коров возраста от 4 до 6 лет из хозяйств Саратовской области, Красноармейского района, имеющих статус благополучных и неблагополучных, которые при ранних обследованиях давали в РИД отрицательные результаты.

Выделение нуклеиновых кислот из крови и молока осуществляли методом нуклеосорбции на силикогеле, как наиболее эффективным для исследования данного биоматериала [19].

Аmplификацию проводили в термоциклере «Ампли-4» фирмы «Биоком» (Москва) с использованием набора «ЛЕЙКОЗ» производства «ИнтерЛабСервис» (РФ). Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального гельэлектрофореза на оборудовании производства фирмы «Биоком» [4].

Созданными олигонуклеотидными праймерами для выявления РНК вируса энзоотического лейкоза крупного рогатого скота методом ПЦР в режиме реального времени были исследованы 12 проб сыворотки крови от крупного рогатого скота в ГБУ Краснодарского края «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория». В качестве положительного контроля использовали изолят вируса, выделенный от коровы в Саратовской области в 2022 году. Выделение РНК из

крови и суспензии органов животного проводили с применением набора «ЛЕЙКОЗ» («ИнтерЛабСервис», РФ) в соответствии с инструкцией производителя [4, 8].

Для постановки ПЦР-РВ использовали следующую реакционную смесь (на одну пробу): дистиллированная вода 10 мкл; 5×буфер для ПЦР-5 мкл; смеси специфических олигонуклеотидных праймеров (10 пкМ каждого) - 2 мкл; зонд флуоресцирующий – 0,5 мкл, раствор MgCl₂ (25 mM) - 1 мкл; смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов dNTP (10 mM) - 1 мкл; Taq-полимераза (5 ед/мкл) - 0,5 мкл, 5 мкл РНК исследуемого образца ВЛКРС.

Общий объем реакционной смеси составило 25 мкл для фрагмента гена ENV прямой праймер (F) 5'-GGGCACTGGCTTAGTGGAAT-3'; обратный праймер (R) 5'-TGCAACAGGGCGTAAAAAGC-3'. Учет результатов реакции осуществлялся на экране монитора компьютера в виде графика интенсивности сигнала флюоресценции.

Аmplification осуществляли при следующих условиях: денатурация 95°C 3 мин 1 цикл, 95°C 20 сек; 2) отжиг праймеров 55°C 20 с.; 3) элонгация 72°C 25 с.

Цикл: денатурация – отжиг – элонгация повторяют 35 раз по каналам HEX (yellow) и по каналу FAM (green).

Детекцию исследуемых образцов с использованием разработанных олигонуклеотидов осуществляли на амплификаторе «CFX 96 Bio-Rad (США)». Накопление флуоресцентного сигнала измеряли по двум каналам: HEX/yellow и FAM/green. После окончания реакции были получены изображения с кривыми накоплениями флуоресцентного сигнала по каждому из образцов каналов.

Полученные результаты анализов обрабатывали методами вариационной статистики с использованием сервисных программ и статистических функций программы Microsoft Excel с определением критерия достоверности по Стьюденту [13, 22].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1.1. Анализ эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в хозяйствах Саратовской области

По данным Территориального органа Федеральной службы государственной статистики по Саратовской области на 1 января 2023 г., по численности поголовья крупного рогатого скота Саратовская область занимает 4 место среди регионов Приволжского федерального округа и 11 место среди всех субъектов Российской Федерации. По сравнению с предыдущим годом в хозяйствах всех категорий произошло снижение поголовья крупного рогатого скота на 0,8% и составило 432,4 тыс. голов, в том числе поголовья коров на 0,3% – 194,7 тыс. голов, т.е. практически вернулось к показателям 2020 года. В данных условиях состояние здоровья поголовья и благополучие по острым и хроническим инфекциям может оказать значительное влияние на развитие животноводства [3].

Лейкоз устойчиво занимает первые позиции в инфекционной патологии крупного рогатого скота в Российской Федерации и представляет серьезную угрозу для развития скотоводства, том числе и в Саратовской области.

Для объективной оценки эпизоотической обстановки и эффективности противолейкозных мероприятий в скотоводческих хозяйствах требуется проведение ретроспективного эпизоотологического анализа данных не менее чем за последние 5-10 лет.

За период с 2011 по 2022 гг. появление новых случаев лейкоза крупного рогатого скота было зарегистрировано на территории 17 муниципальных районов области (Рисунок 1).

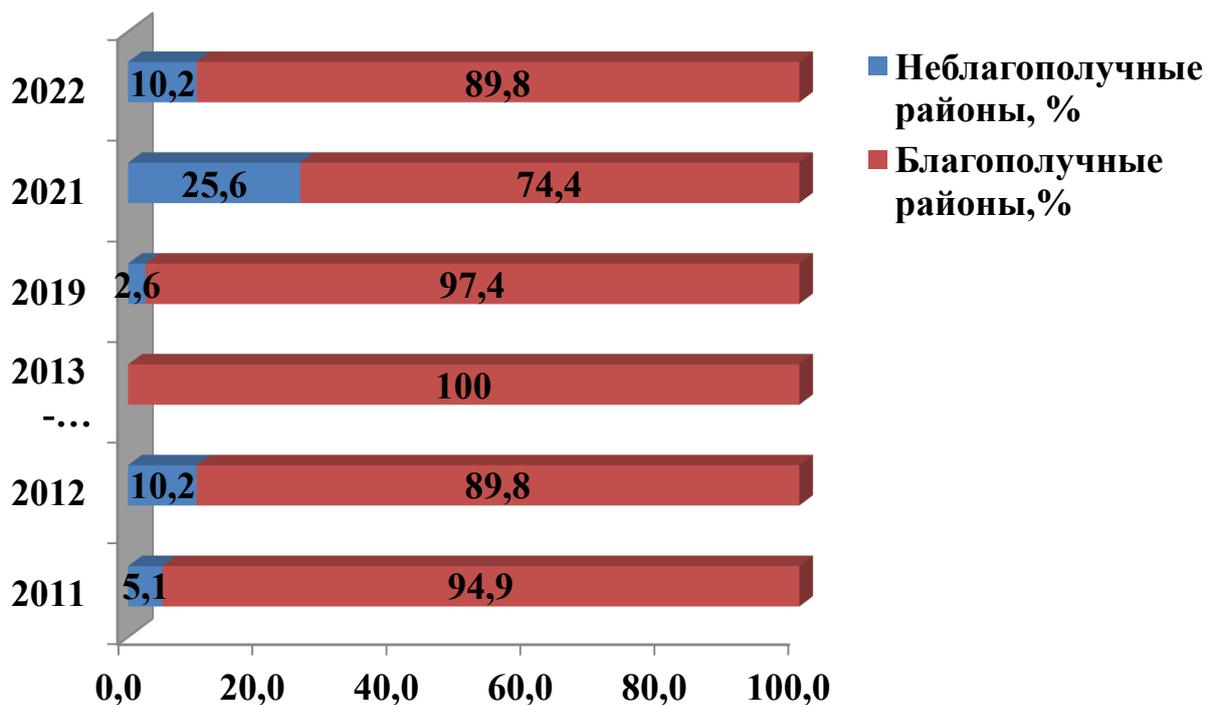


Рисунок 1 – Структура неблагополучия муниципальных районов Саратовской области по новым случаям лейкоза крупного рогатого скота за период 2011-2022 гг.

Возникновение болезни чаще наблюдалось на правобережной части территории Саратовской области (Рисунок 2).

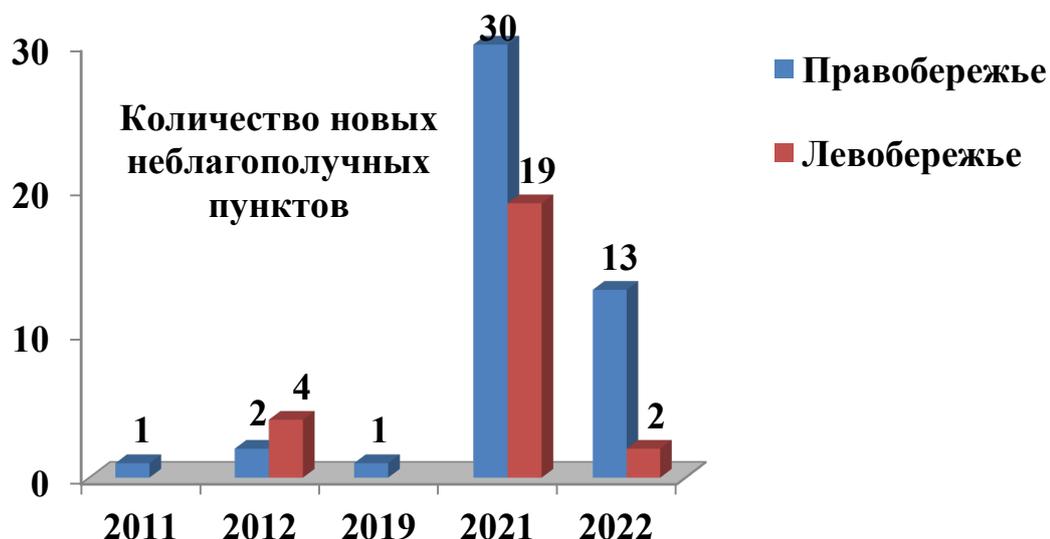


Рисунок 2 – Динамика эпизоотического процесса при лейкозе крупного рогатого скота в условиях право- и левобережных зон Саратовской области за период 2011-2022 гг.

В 2011 году на территории Аткарского и Красноармейского муниципальных районов было зарегистрировано 2 свежих эпизоотических очага лейкоза крупного рогатого скота, в 2012 году зарегистрировано 6 новых эпизоотических очагов, соответственно в Красноармейском – 2, в Краснопартизанском – 1, Марксовском – 1 и Энгельском – 2 эпизоотических очага.

До 2019 года обстановка по лейкозу в Саратовской области была относительно благополучна, но в апреле 2019 года заболевание снова было обнаружено, теперь среди крупного рогатого скота ООО АПК «Малиновка» Аркадакского муниципального района. Поголовье восприимчивых животных в ООО АПК «Малиновка» на тот момент составляло 613 голов, среди которых было выявлено 134 инфицированных животных. В ходе дальнейших исследований 16 инфицированных животных приобрели статус «больное животное», т.к. в их крови были обнаружены характерные для лейкоза крупного рогатого скота гематологические изменения. Показатель заболеваемости составил почти 22%. Значительное распространение болезни обусловило выбор метода оздоровления хозяйства – систематические исследования, в ходе которых зараженных вирусом лейкоза животных размещали отдельно от здоровых животных на ферме. Инфицированных животных каждые 6 месяцев исследовали гематологически.

Особенно напряженной эпизоотической ситуацией по лейкозу стала в 2021 году, когда на территории 10 муниципальных районов области (Аркадакского, Балаковского, Балашовского, Красноармейского, Краснопартизанского, Новобурасского, Ровенского, Саратовского, Турковского и Энгельского) было зарегистрировано 49 новых очагов лейкоза. Максимально лейкоз регистрировали в Балашовском районе, где в ходе плановых диагностических исследований были выявлены инфицированные животные в 17 населенных пунктах.

Резкий рост показателей заболеваемости и распространения лейкоза наблюдается не только в Саратовской области, но и по всей стране. Введение новых Ветеринарных правил по лейкозу крупного рогатого скота ужесточило требования к проведению противоэпизоотических мероприятий: населенным пунктам присваивается статус неблагополучных при выявлении серопозитивных

животных при проведении серологической диагностики (РИД). В результате выполнения данных требований произошел скачок зарегистрированных неблагополучных пунктов во втором полугодии 2021 года.

В 2022 году эпизоотическая обстановка несколько улучшилась: по состоянию на 01.11.2022 г. новые случаи заболевания лейкозом среди крупного рогатого скота выявлены в 15 населенных пунктах 4 районов области (Аркадакского, Екатериновского, Красноармейского и Саратовского). В настоящее время наибольшее количество эпизоотических очагов зарегистрировано в Аркадакском районе (4 эпизоотических очага).

Следует отметить значительную продолжительность реализации противоэпизоотических мероприятий по ликвидации лейкоза крупного рогатого скота как инфекционного заболевания с длительным латентным течением.

81,1 % неблагополучных пунктов по лейкозу – это личные подсобные хозяйства населения, 8,1 % – крестьянские (фермерские) хозяйства. Вовлеченность мелких и средних хозяйств в эпизоотический процесс во многом обусловлена их наибольшим удельным весом в структуре распределения поголовья крупного рогатого скота (Рисунок 3). Количество вспышек лейкоза крупного рогатого скота в районах Саратовской области за 2022-2023 гг. представлено на рисунке 4.

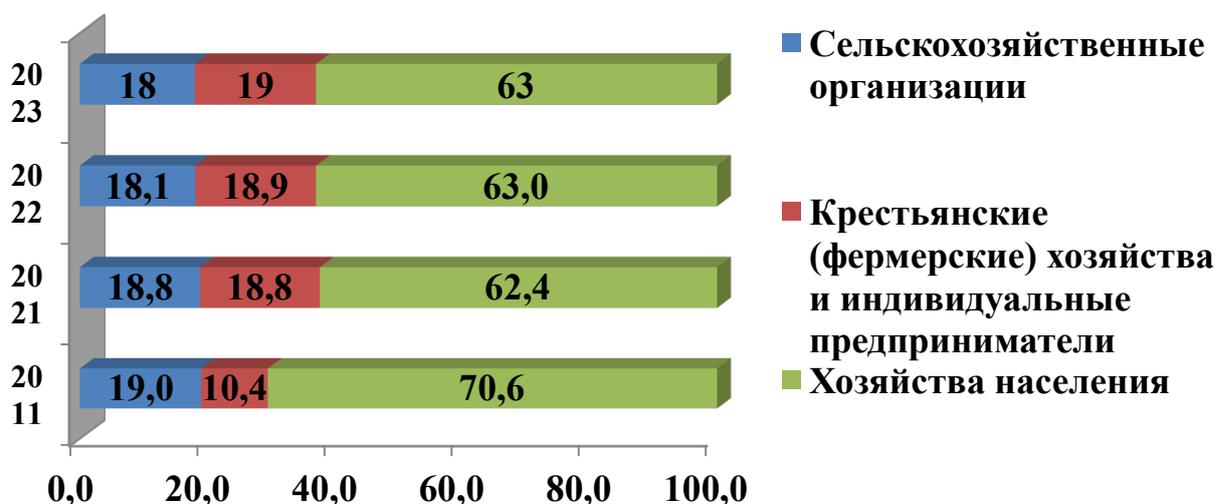


Рисунок 3 – Структура поголовья крупного рогатого скота по категориям хозяйств

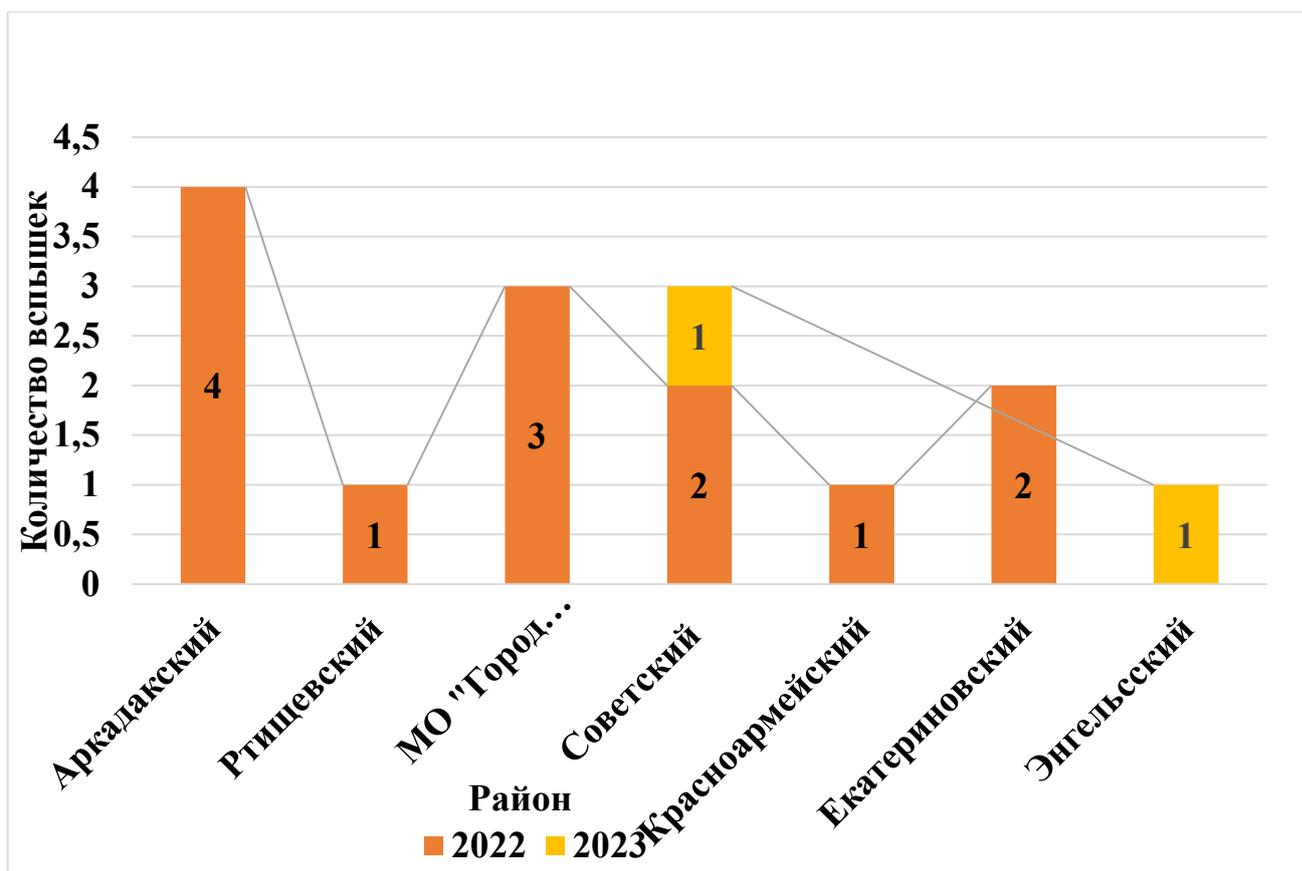


Рисунок 4 – Количество вспышек лейкоза крупного рогатого скота в районах Саратовской области за 2022-2023 гг.

Из рисунка 4 следует, что наибольшее количество вспышек в 2022 году на территории области было зарегистрировано в Аркадакском районе, что соответствует 4 вспышкам (2 вспышки в сельской местности: с. Алексеевка и с. Баклуши по одной вспышке соответственно), в городе Аркадаке было зарегистрировано 2 вспышки болезни. На территории муниципального образования (МО) «Город Саратов» было зарегистрировано 3 вспышки лейкоза КРС. В Советском и Екатериновском районах по 2 вспышки соответственно. В Красноармейском и Ртищевском районах по 1 вспышке соответственно. За 2023 год в Саратовской области было зарегистрировано 2 вспышки лейкоза КРС, одна в Советском и одна в Энгельском районах.

Проведенные исследования по изучению региональных особенностей эпизоотического процесса при лейкозе крупного рогатого скота и совершенствование общих и специальных противолейкозных мероприятий на

территории Саратовской области свидетельствуют, что ареал распространения лейкозной инфекции в Саратовской области начале анализируемого периода характеризовался как сплошной. За последние два года наблюдается его концентрация в правобережной зоне области, новые очаги лейкоза в левобережье локализуются вдоль р. Волга.

В 2022 году зафиксировано смещение ареала распространения с северо-запада Саратовской области (Балашовский район, Аркадакский) в юго-западном направлении (Саратовский район, Лысогорский район). 81,1 % неблагополучных пунктов по лейкозу – это личные подсобные хозяйства населения, 8,1 % – крестьянские (фермерские) хозяйства.

Вовлеченность мелких и средних хозяйств в эпизоотический процесс во многом обусловлена их наибольшим удельным весом в структуре распределения поголовья крупного рогатого скота по категориям хозяйств, а также значительными погрешностями в выполнении организационно-хозяйственных и ветеринарно-санитарных мероприятий на территории таких хозяйств, что в свою очередь является значимым фактором распространения возбудителя лейкоза и поддерживает напряженность эпизоотического процесса.

2.1.2. Картографический анализ эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота на территории Саратовской области

Проведя ретроспективный эпизоотологический анализ имеющихся данных, можно с уверенностью утверждать, что большинство неблагополучных по лейкозу хозяйств – это личные подсобные хозяйства с небольшим поголовьем.

Данный вид хозяйствования не предполагает четкого выполнения регламентированных действий при покупке, продаже, сдаче на убой, транспортировке, размещении на пастбище восприимчивых животных, реализации животноводческой продукции, полученной от них.

Организационно-хозяйственное и санитарное состояние многих скотоводческих хозяйств оставляет желать лучшего, что с учетом особенностей биологии возбудителя (о которых упоминалось ранее) в сочетании с неизвестным

статусом восприимчивого животного может привести к резкому ухудшению эпизоотологической ситуации.

В большинстве случаев заражение происходит при тесном контакте с инфицированным животным или объектами внешней среды, загрязненными его выделениями, в которых присутствует кровь. В этом случае к объективным причинам распространения лейкоза присоединяется человеческий фактор.

Одним из основных результатов эпизоотологических исследований и активно применяемым в дальнейшем диагностическим инструментом является эпизоотологическая карта – топографическая карта местности с визуально зафиксированной информацией об эпизоотологическом состоянии территории.

Карта используется для оценки обстановки по инфекционным болезням животных, определения территорий, групп животных, времени и факторов риска, на основе которых проводится планирование профилактической и противоэпизоотической работы на данной территории. Применение электронного картографирования значительно упрощает решение данных задач.

В международной и отечественной практике известны примеры эффективного использования ГИС для контроля эпидемиологических и эпизоотических ситуаций с четко выраженной привязкой к географическим факторам.

В ходе создания и анализа картографических данных нами установлено, что ареал распространения лейкозной инфекции в начале анализируемого периода был сплошной. Последние два года наблюдалось его концентрация в правобережной зоне области, новые очаги лейкоза в левобережье локализовались вдоль р. Волга.

В 2022 году зафиксировано смещение ареала распространения с северо-запада Саратовской области (Балашовский район, Аркадакский) в юго-западном направлении (Саратовский район, Лысогорский район). Эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в Саратовской области с 2011 по 2022 гг. представлена на рисунках 5-7.

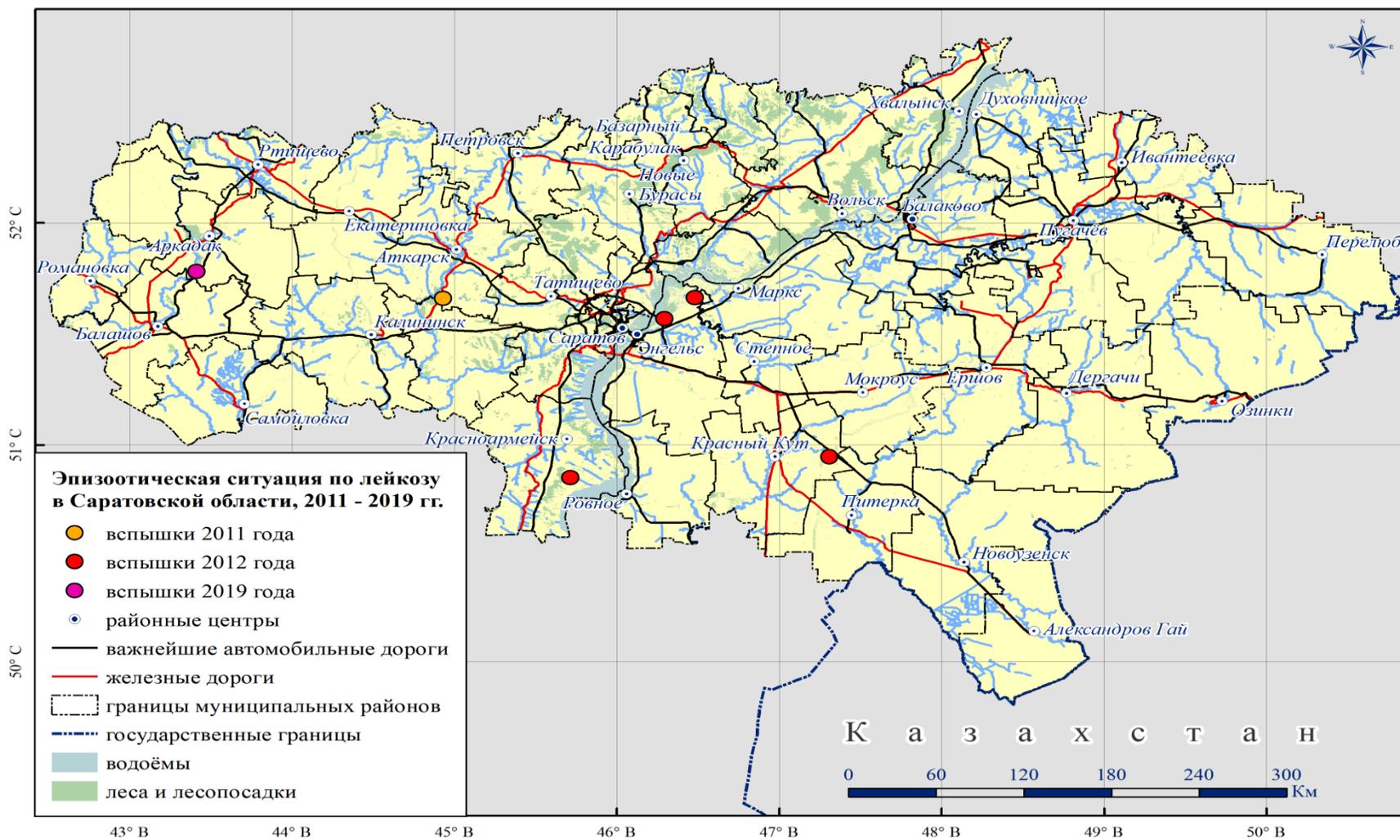


Рисунок 5 – Эпизоотическая ситуация по лейкозу КРС в Саратовской области, 2011-2019 гг.

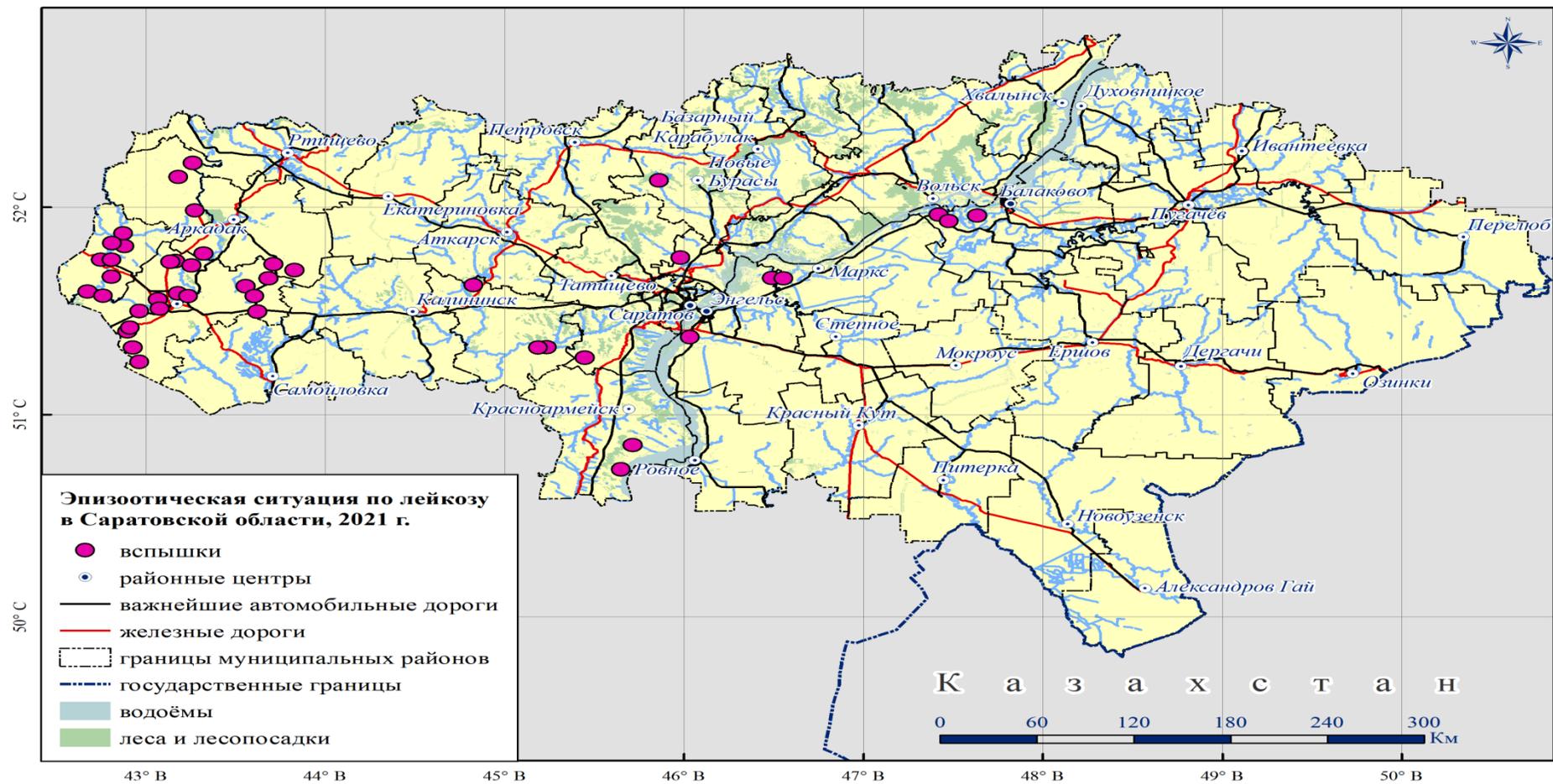


Рисунок 6 – Эпизоотическая ситуация по лейкозу КРС в Саратовской области, 2021 г.

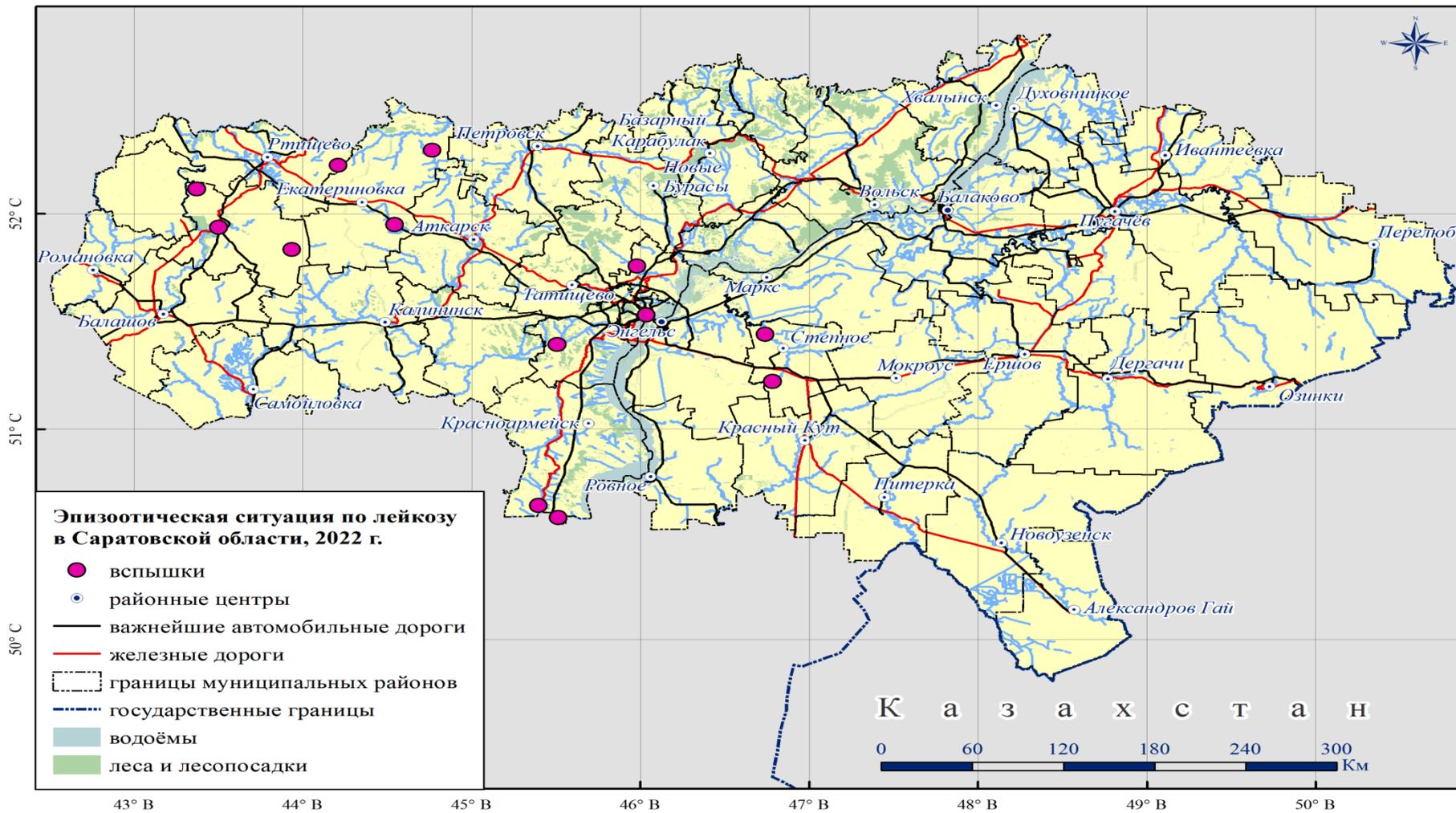


Рисунок 7 – Эпизоотическая ситуация по лейкозу КРС в Саратовской области, 2022 г.

На рисунке 8 отражены две новые вспышки лейкоза КРС, которые были зарегистрированы в Энгельском и Советском районах Саратовской области в 2023г. Из зарегистрированных очагов лейкоза КРС в 2022 году, были ликвидированы на территории Аркадакского, Балашовского и Екатериновского районах по 3 очага, в МО «Город Саратов» и Красноармейском районе по 2 очага, а в Энгельском районе - 1 эпизоотический очаг.

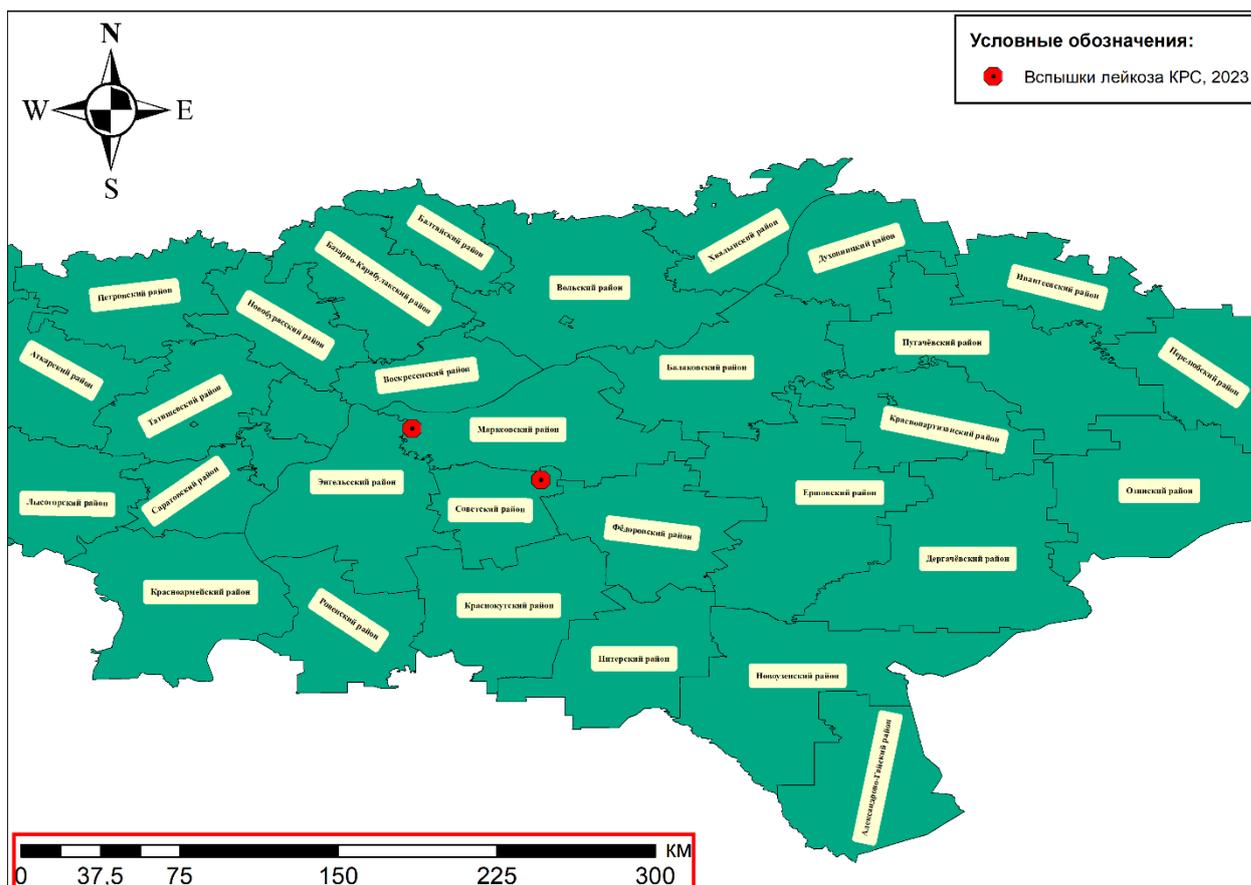


Рисунок 8 – Эпизоотические очаги лейкоза КРС в Саратовской области, выявленные в 2023 г.

Таким образом, система профилактических и оздоровительных противолейкозных мероприятий должна выстраиваться с учётом особенностей ведения животноводства и обязательно включать действия по предотвращению заноса возбудителя на территорию хозяйства; действия по предотвращению горизонтального распространения крови и жидкостей, содержащих клетки крови, от инфицированных животных к восприимчивым здоровым животным;

компенсацию затрат при отчуждении инфицированных и больных животных, адекватную затратам собственника животных; проведение активной разъяснительной и просветительской работы с населением.

В ходе создания и анализа картографических данных нами установлено, что ареал распространения лейкозной инфекции в начале анализируемого периода был сплошной. Последние два года наблюдалось его концентрация в правобережной зоне области, новые очаги лейкоза в левобережье локализовались вдоль р. Волга. В 2022 году зафиксировано смещение ареала распространения с северо-запада Саратовской области (Балашовский район, Аркадакский) в юго-западном направлении (Саратовский район, Лысогорский район), который в 2023г переместился через р. Волга в Энгельсский и соседний Советский район, сформировано два новых очага лейкоза.

Картографирование динамики пространственно-временного изменения эпизоотической ситуации позволяет существенно повысить эффективность анализа происхождения, формирования и распространения эпизоотических очагов инфекционных болезней. На примере отдельно взятого региона неблагополучного по лейкозу крупного рогатого скота установлены активность проявления вспышки инфекции, пути её распространения, а в целом возможность проведения оценки эффективности проводимых оздоровительных мероприятий.

2.1.3. Пространственный анализ возникновения свежих очагов лейкоза крупного рогатого скота в Саратовской области

Первичный анализ ситуации осуществляли с использованием построения эпизоотологической карты – карты распространения болезни на территории Саратовской области.

В ретроспективе 2011-2022 гг. за последние два года зарегистрировано максимальное количество новых очагов инфекции.

С 2011 по 2019 гг. случаи возникновения ВЛКРС в Саратовской области носили единичный характер.

В 2011 году на территории Саратовской области были зарегистрированы 2 неблагополучных пункта на территории Аткарского и Красноармейского районов.

В 2012 году эпизоотический процесс начал развиваться активнее. В регионе было зафиксировано 6 неблагополучных пунктов в 4 районах области (Красноармейском, Краснокутском, Марксовском, Энгельском). Таким образом, в ранее неблагополучном Красноармейском районе сформировалось еще два неблагополучных пункта.

Результаты мониторинга по муниципальным районам региона по уровню инфицированности и числу больных лейкозом животных за 2015-2016 гг. представлены на рисунке 9.



Рисунок 9 – Количество неблагополучных по лейкозу КРС пунктов на территории Саратовской области на начало 2015 и 2016 гг.

На территории Саратовской области на 01.01.2015 г. (Рисунок 9) было 24 неблагополучных пункта в 11-ти муниципальных районах области. За анализируемый год в 6 районах области было оздоровлено 9 неблагополучных пунктов.

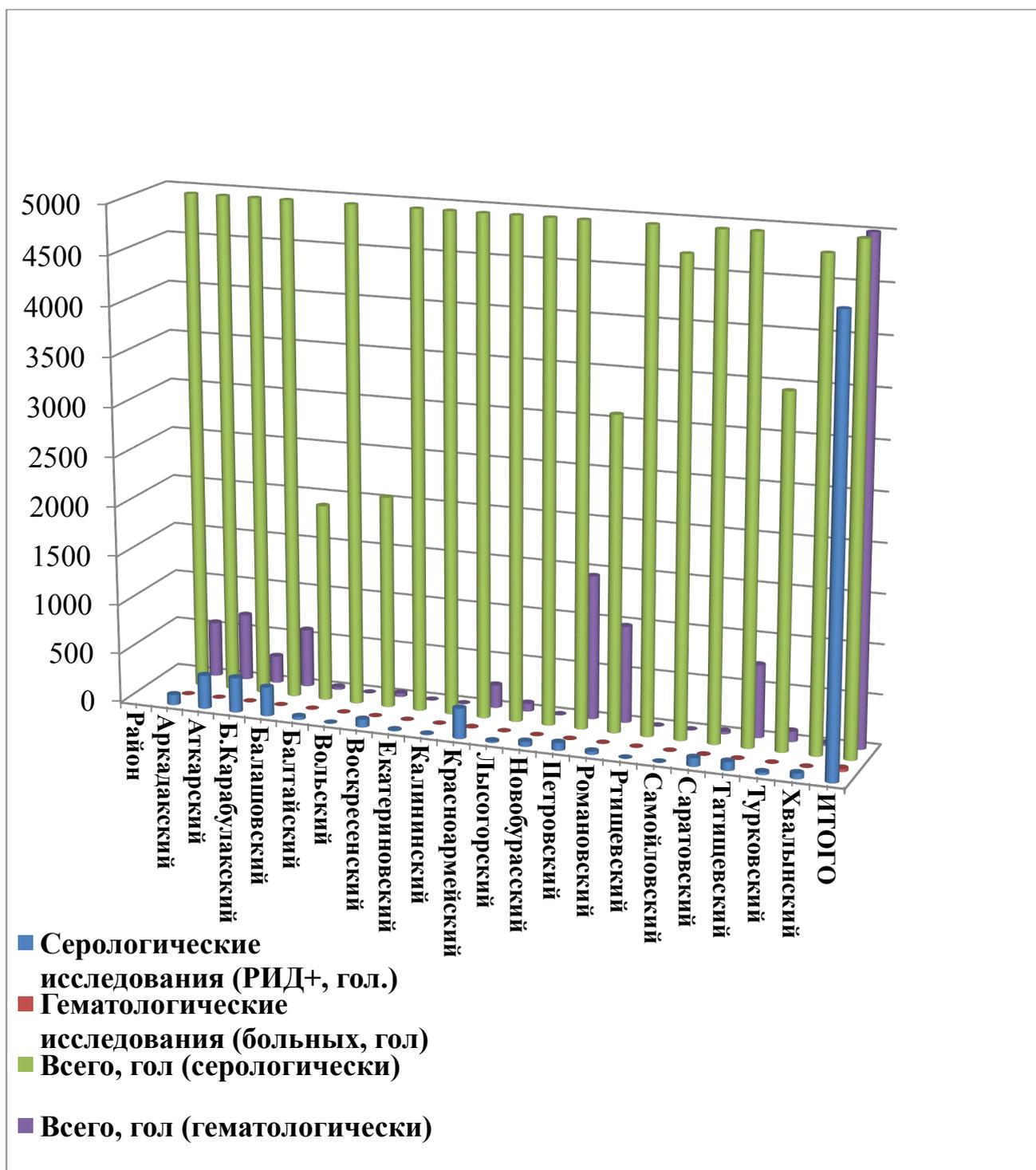


Рисунок 10 – Результаты диагностических исследований на лейкоз КРС в Саратовской области за 2015 год в правобережных МО

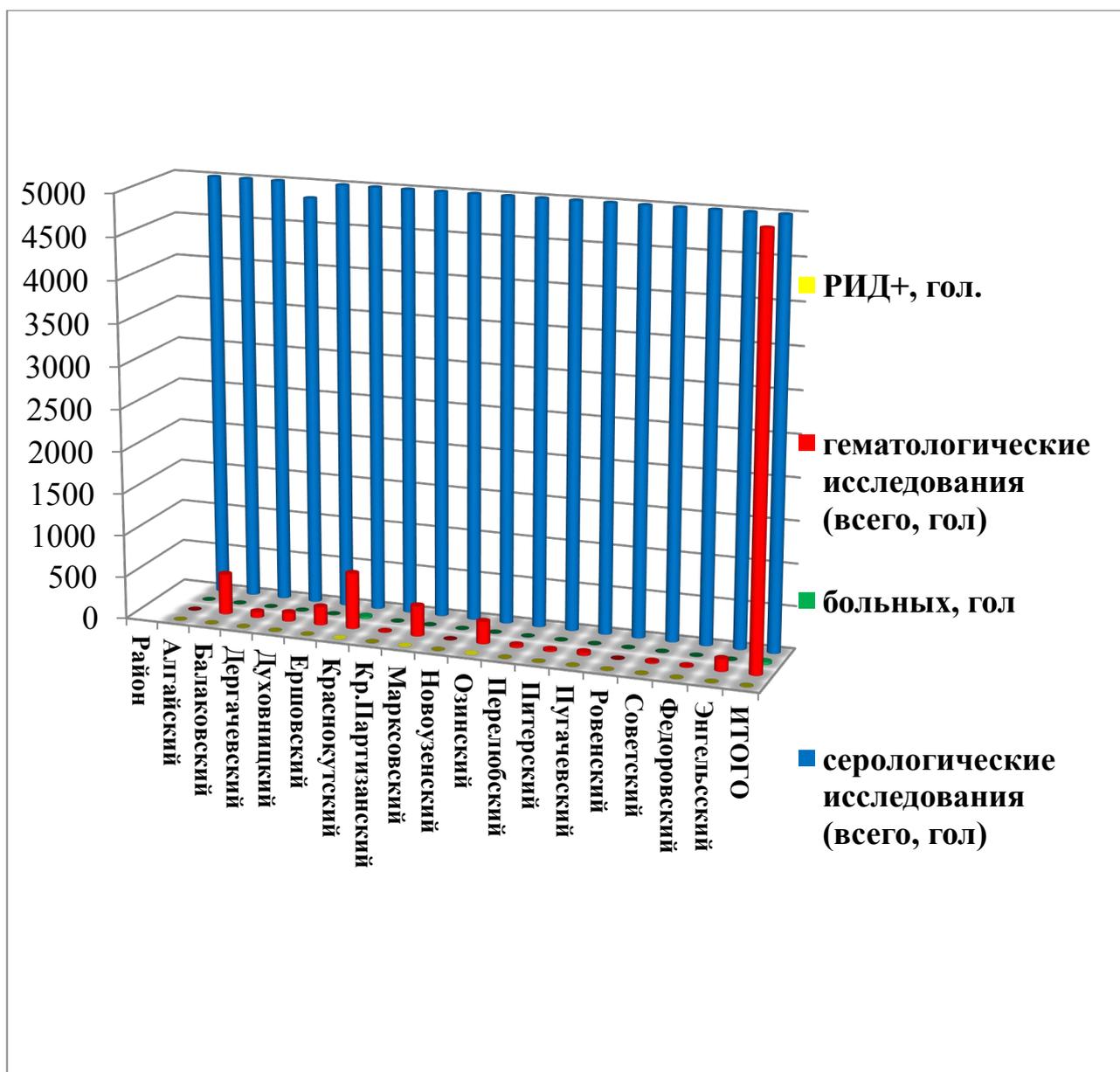


Рисунок 11 – Результаты диагностических исследований на лейкоз КРС в Саратовской области за 2015 год в левобережных МО

Представленные на рисунках 10 и 11 данные свидетельствуют, что инфицированность скота вирусом в регионе была около 1%, а количество заболевших - 0,5%.

Ретроспективный эпизоотологический анализ по муниципальным районам региона, свидетельствует о длительном циркулировании вируса, а это требует комплексного подхода к совершенствованию лабораторной диагностики и применения геоинформативных технологий позволяющих разработать и внедрить

научно – обоснованную программу сдерживания и ликвидации заболевания. Основы этой работы были заложены при разработке планы борьбы с лейкозом на период с 2016 по 2020гг.

В 2019 году в Саратовской области был зафиксирован только один новый пункт неблагополучия по лейкозу, который располагался в Аркадакском районе (Рисунок 12).

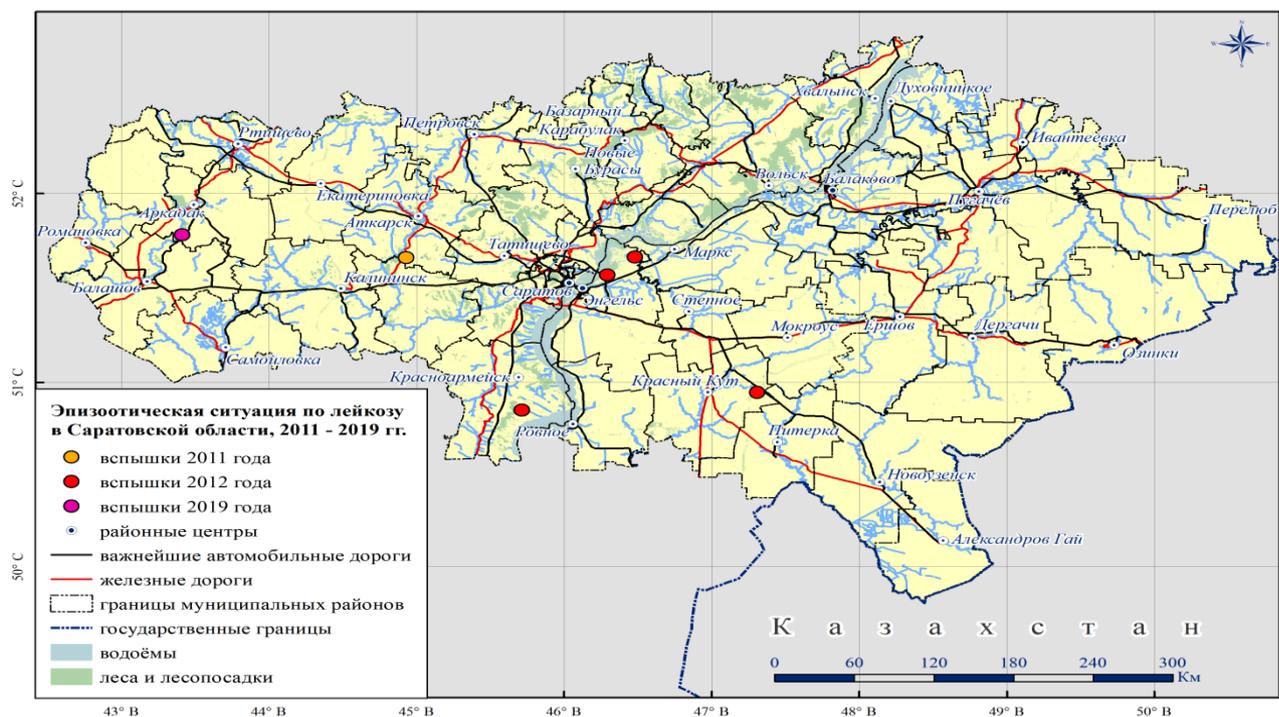


Рисунок 12 – Распределение новых неблагополучных пунктов по лейкозу крупного рогатого скота на территории Саратовской области, 2011-2019 гг.

Ситуация значительно ухудшилась в 2021 году, когда на территории Саратовской области было зарегистрировано 49 новых неблагополучных по ВЛКРС пунктов (Рисунок 13). Их распределение было достаточно закономерным. Практически половина неблагополучных пунктов сконцентрировалась в западной и северо-западной части области в 3 районах: в ранее неблагополучном Аркадакском районе (4 неблагополучных пункта), а также в расположенных на сопредельных территориях Балашовском (17 пунктов) и Турковском (3 пункта) районах.

В Красноармейском районе снова было зарегистрировано еще 2 новых неблагополучных пункта.

Остальные свежие эпизоотические очаги возникли в 6 районах, где ранее болезнь не регистрировалась (Саратовском – 3 неблагополучных пункта, Новобураском – 1, Балаковском – 3, Энгельском – 5, Ровенском – 8 и Краснопартизанском – 3).

Новые случаи заболевания преобладали в правобережной зоне области (30 из 49 неблагополучных пунктов). Случаи болезни в левобережной части области располагались вдоль русла р. Волга.

Резкий рост неблагополучия по лейкозу в 2021 году во многом объясняется переходом на более жесткую систему регистрации случаев заболевания, которая предписывалась новыми ветеринарными правилами по лейкозу крупного рогатого скота (№ 156 от 24.03.2021).

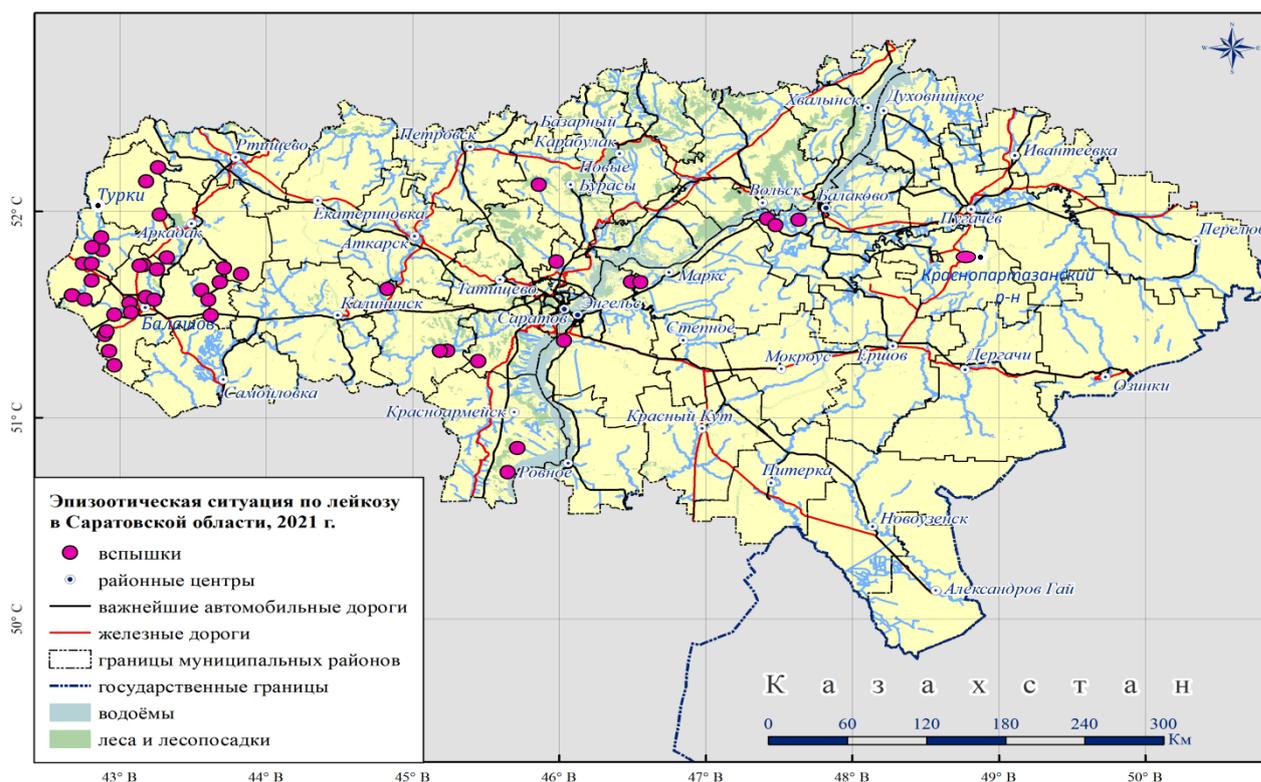


Рисунок 13 – Распределение новых неблагополучных пунктов по лейкозу крупного рогатого скота на территории Саратовской области, 2021 г.

В 2022 году эпизоотическая обстановка значительно улучшилась (Рисунок 14). Новые случаи заболевания лейкозом среди крупного рогатого скота были выявлены в 15 населенных пунктах 6 районов области (Аркадакском – 4 неблагополучных пункта, Гагаринском – 3, Екатериновском – 3, Красноармейском – 2, Ртищевском – 1, Советском – 2). Наибольшее количество свежих эпизоотических очагов снова было зарегистрировано в Аркадакском районе.

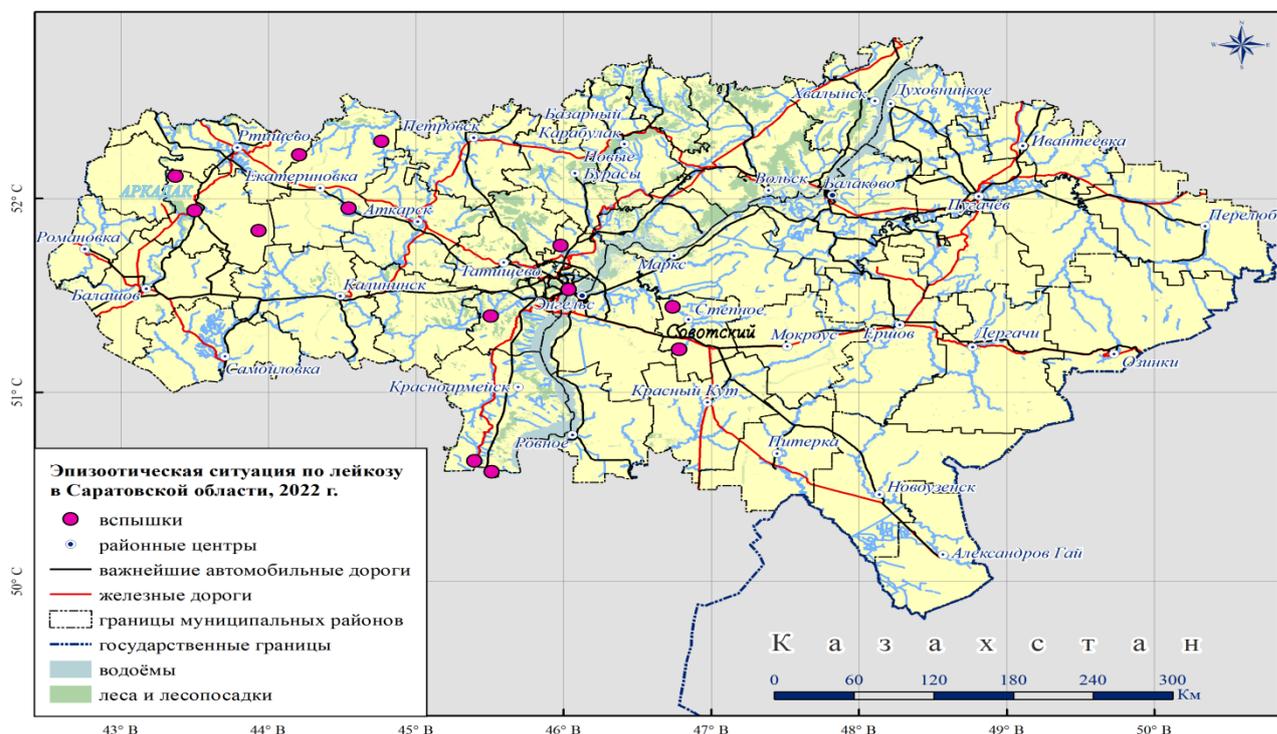


Рисунок 14 – Распределение новых неблагополучных пунктов по лейкозу крупного рогатого скота на территории Саратовской области, 2022 г.

Проведение сопряженного картографического анализа показало, что:

1. Болезнь энзоотична, в течение последних двенадцати лет постоянно присутствует на территории Саратовской области.

2. Тенденции распространения лейкоза крупного рогатого скота в Саратовской области схожи с общероссийской ситуацией, в том числе с резким всплеском неблагополучия в 2021 году.

3. На распространение болезни практически не влияют природно-климатические условия местности. Случаи заболевания ВЛКРС наблюдается как

в право-, так и в левобережной части Саратовской области, имеющих значительные отличия в рельефе местности, температурных и влажностных режимах. Однако в течение 10 лет ареал болезни концентрируется в правобережных районах области, что связано, скорее всего, с последовательным распространением инфекции из расположенных здесь первичных очагов.

4. Ареал болезни не статичен, имеет динамику перемещения из западных районов на северо-запад и из северо-восточных районов области в южном направлении.

5. Плотность размещения восприимчивых животных в районах области напрямую не влияет на темпы распространения инфекции. Аркадакский район, как территория, где в 2019, 2021 и 2022 гг. появились новые неблагополучные пункты по лейкозу, имеет плотность размещения крупного рогатого скота 4,25 гол/км² (занимает 15 место среди муниципальных районов области по числу животных на 1 км²). Ровенский район (неблагополучен с 2021 года, 8 неблагополучных населенных пунктов) занимает 4 место среди муниципальных районов области по числу животных на 1 км² (7,35 гол/км²), однако в 2022 году новых случаев распространения болезни в этом районе не выявлено.

6. Для вируса ВЛКРС характерна передача восприимчивым животным путем естественного контакта с инфицированными лимфоцитами крови, молозива и молока, а также при ятрогенных манипуляциях [186, 56]. В этом случае значительную роль в распространении лейкоза играют внутрихозяйственные факторы: соблюдение/несоблюдение зоогигиенических и ветеринарно-санитарных правил кормления, содержания и эксплуатации животных, а также их бесконтрольные перемещения.

7. При анализе выявленных случаев болезни за период исследования установлено, что в структуре неблагополучных пунктов по лейкозу 60-89,8% – это личные подсобные хозяйства населения, 6,1-33,4% – крестьянские (фермерские) хозяйства. Такая вовлеченность в эпизоотический процесс мелких хозяйств во многом обусловлена не только особенностями ведения хозяйства, но

и наибольшим удельным весом данных форм хозяйствования в структуре распределения поголовья крупного рогатого скота по категориям хозяйств.

Таким образом, картографирование эпизоотической ситуации позволяет существенно повысить эффективность анализа случаев появления новых очагов болезни и выявления зависимости эпизоотического процесса от территориальных факторов различного происхождения.

Тенденции распространения лейкоза в Саратовской области схожи с общероссийской ситуацией.

Проведенный сопряжённый пространственный анализ территориального распределения лейкоза крупного рогатого скота в Саратовской области позволяет сделать выводы об энзоотичности болезни, отсутствии корреляции трендов болезни с климатическими и географическими факторами, плотностью размещения крупного рогатого скота. Вовлеченность в эпизоотический процесс мелких хозяйств может являться значимым фактором распространения возбудителя лейкоза и поддержки напряженности эпизоотического процесса.

Эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота плохо поддается пространственному и временному анализу. Сложившаяся ситуация требует дальнейшего совершенствования имеющихся методов сбора и обработки данных для выявления региональных особенностей эпизоотического процесса с использованием функциональных возможностей геоинформационных технологий, что имеет большое значение для снижения темпов распространения болезни и экономических потерь, которые вызывает лейкоз среди крупного рогатого скота.

2.1.4. Результаты сравнительных диагностических исследований крови и молока на лейкоз с использованием РИД и ПЦР

Согласно действующим ветеринарным правилам в благополучных по лейкозу фермах исследования проводят 1 раз в год, а в неблагополучных хозяйствах исследуют каждые 6 месяца. Длительные сроки без исследования способствуют распространению вируса среди здорового поголовья [5, 7].

Для определения диагностической ценности РИД и ПЦР коллективом авторов совместно с ветеринарными врачами ОГУ «Красноармейская районная ветеринарная лаборатория СББЖ» и сотрудниками ГБУ «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория» Краснодарского края были проведены скрининговые лабораторно-диагностические исследования на лейкоз проб крови и молока крупного рогатого скота.

Параллельные исследования проб крови проводились серологическим методом - РИД и молекулярно-генетическим – ПЦР-РВ.

В РИД с пробами сыворотки крови, полученными от 418 голов крупного рогатого скота, положительные результаты (наличие антител против ВЛКРС) выявлены в 66 пробах, которые также показали наличие провирусной ДНК и в ПЦР-РВ (Таблица 1).

Таблица 1 – Результаты скрининговых исследований крови в РИД и ПЦР-РВ

Количество проб	РИД		ПЦР-РВ	
	количество положительных проб	% положительных проб	количество положительных проб	% положительных проб
418	66	15,79	149	35,65

Результаты РИД и ПЦР-РВ исследований сыворотки крови оказались идентичными в 39 % случаев.

Результаты РИД и ПЦР-РВ исследований сыворотки крови показали, что диагностическая ценность ПЦР-РВ значительно выше, чем РИД. Кроме того, при проведении РИД следует учитывать возрастные и физиологические показатели тестируемых животных, т.к. уровень антител у них в процессе жизни может значительно варьировать.

В результате исследования проб крови в ПЦР-РВ с использованием тест-систем «Лейкоз» наличие провирусной ДНК ВЛКРС было выявлено в 149 из 418 исследованной пробы. ДНК возбудителя обнаруживалась как в цельной крови, так

и в сыворотке, а также в ресуспензированном с забуференным физиологическим раствором кровяном сгустке и в цельном молоке от больных животных. То есть параллельными исследованиями постановкой ПЦР-РВ дополнительно было выявлено 83 головы крупного рогатого скота, инфицированного вирусом.

Для исследования молока в РИД предварительно получали лактосыворотку по оригинальной методике.

Из исследованных 418 проб молока лактосеропозитивными признана 61 корова. Исследования в РИД с молочной сывороткой подтвердило результаты, полученные в РИД с сывороткой крови более чем у 90% коров. Исследованием молока методом ПЦР-РВ на наличие провируса лейкоза положительный результат был получен в 154 пробах (Таблица 2).

Таблица 2 – Результаты скрининговых исследований молока в РИД и ПЦР-РВ

Количество проб	РИД		ПЦР-РВ	
	количество положительных проб	% положительных проб	количество положительных проб	% положительных проб
418	61	14,59	154	36,84

Анализируя полученные результаты, хотелось бы подчеркнуть, что окончательная диагностика такого заболевания как лейкоз крупного рогатого скота подразумевает комплексный подход, т.к. ни один из разработанных и применяемых диагностических приёмов не может быть одинаково чувствительным и строго специфичным при выявлении возбудителя или маркеров его присутствия.

Диагностика заболевания у коров должна представлять комбинацию диагностических тестов с учетом патогенеза и стадии развития болезни. Полное

оздоровление неблагополучных по лейкозу крупного рогатого скота должно проводиться с использованием скрининговых исследований.

Таким образом, внедрение в систему профилактических и оздоровительных противолейкозных мероприятий молекулярно-генетических исследований крови и молока позволит своевременно выбраковывать инфицированных вирусом животных.

2.1.5. Расчёт годовых затрат на проведение лабораторных исследований сыворотки крови крупного рогатого скота на лейкоз в Саратовской области

В целях доказательства отсутствия циркуляции возбудителя лейкоза среди крупного рогатого скота в хозяйствах специалистами государственной ветеринарной службы проводятся отбор проб крови для серологических исследований:

- от восприимчивых животных старше 6-месячного возраста (за исключением быков-производителей (доноров), коров-доноров эмбрионов, восприимчивых животных, используемых для получения крови или сыворотки крови в целях производства биологических препаратов (далее - животные-продуценты) – 1 раз в год;

- от животных – продуцентов – 2 раза в год с интервалом не менее 180 календарных дней.

В данном случае используются серологические методы диагностики: реакция иммунодиффузии (РИД), иммуноферментный анализ (ИФА).

При оздоровлении неблагополучных хозяйств наряду с указанными лабораторными тестами используется ПЦР.

Используются средства диагностики:

- набор для диагностики лейкоза крупного рогатого скота в реакции иммунодиффузии (РИД);

- набор для диагностики лейкоза крупного рогатого скота в реакции иммуноферментного анализа (ИФА);

- набор для диагностики лейкоза крупного рогатого скота в реакции иммуноферментного анализа (ИФА) с контрольным отрицательным антигеном;

- диагностическая система для выявления вируса лейкоза КРС методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Расчёты коэффициентов исследований крупного рогатого скота на лейкоз в РИД в Саратовской области в 2023 г.

По данным Территориального органа Федеральной службы государственной статистики по Саратовской области на 1 января 2024 г., по численности поголовья крупного рогатого скота Саратовская область занимает 4 место среди регионов Приволжского федерального округа и 11 место среди всех субъектов Российской Федерации. По сравнению с предыдущим годом в хозяйствах всех категорий произошло снижение поголовья крупного рогатого скота на 0,8% и составило 432,4 тыс. голов.

Следовательно, всего поголовья КРС составляет 432,4 тыс. голов, а количество вирусоносителей 476 голов:

$$432\,400 - 476 = 431\,924 \text{ голов, клинически здоровых.}$$

Расчет коэффициента исследований для **благополучных** по лейкозу хозяйств:

$$K = \frac{44(1)+6(1)+19(1)+31(1)+35(1)}{100} = 1,350$$

Следовательно, при расчёте количества исследований для проведения серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота в благополучных хозяйствах необходимо применять коэффициент - 1,350.

Пример: Среднегодовое количество крупного рогатого скота в благополучных по лейкозу хозяйствах Саратовской области – 431 924 тыс. голов, следовательно, необходимо проведение исследований: $431\,924 * 1,350 = 583\,097,4$.

Расчёт коэффициента исследований для эпизоотического очага

Серологические исследования в условиях неблагополучия проводят каждые 3 месяца:

$$K = \frac{44(4)+6(4)+19(4)+31(2)+35(2)}{100} = 4,080$$

Следовательно, при расчёте количества исследований в неблагополучных хозяйствах необходимо применять коэффициент - 4,080.

Пример: Среднегодовое количество крупного рогатого скота в неблагополучных по лейкозу хозяйствах Саратовской области – 476 голов, следовательно необходимо провести исследований: $476 * 4,080 = 1\,942,08$.

В эпизоотическом очаге при проведении оздоровительных мероприятий осуществляется отбор проб крови с интервалом 90 календарных дней в целях проведения серологических исследований восприимчивых животных до получения двукратных отрицательных результатов.

Расчёты потребности количества средств диагностики, предназначенных для лабораторных исследований на лейкоз крупного рогатого скота

Для определения потребности количества средств диагностики, предназначенных для лабораторных исследований, применяют формулу:

$$V = \frac{K}{B * C} * (1 + c),$$

где:

V – объём препарата для ветеринарного применения, выражается в наборах;

K – плановое количество исследований в год;

B – количество исследований в наборе препарата для ветеринарного применения;

C – коэффициент использования набора – 0,85;

c – коэффициент перестановки исследуемых проб при нечётко выраженной (сомнительной и/или положительной) реакции – 0,1.

а) Плановая диагностика поголовья методом РИД составляет 585 036,48 исследований (583 094,4+1 942,08), при этом количество исследований в благополучных пунктах – 583 097,4 и количество исследований в неблагополучных пунктах – 1 942,08 (на примере использования «Набора для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота». Организация разработчик – ФКП «Курская биофабрика – фирма «БИОК»», инструкция по применению утверждена ФКП «Курская биофабрика – фирма «БИОК» 17.02.2017).

$$V = \frac{K}{B * C} * (1 + c) = \frac{585\ 036,48}{1000 * 0,85} * (1 + 0,1) = 757,13 \text{ набора};$$

б) Плановое обследование поголовья на лейкоз методом ИФА составляет 300 исследований, один набор рассчитан на проведение 176 исследований;

$$V = \frac{K}{B * C} * (1 + c) = \frac{300}{176 * 0,85} * (1 + 0,1) = 3 \text{ набора};$$

в) Плановое обследование поголовья на лейкоз методом ИФА с контрольным отрицательным антигеном составляет 100 исследований.

Данный набор предназначен для подтверждения специфичности антител в пробах сыворотки крови и молока крупного рогатого скота, исследованных с положительным результатом в ИФА, и как самостоятельный диагностический тест.

Один набор рассчитан на проведение 88 исследований, соответственно, для исследования 100 проб необходимо:

$$V = \frac{K}{B * C} * (1 + c) = \frac{100}{88 * 0,85} * (1 + 0,1) = 2 \text{ набора}.$$

Таким образом, исходя из вышеизложенного, применение расчётов коэффициентов потребности средств диагностики для проведения лабораторных исследований в РИД и ИФА проб крови крупного рогатого скота на лейкоз в зависимости от эпизоотического состояния животноводческих хозяйств способствует рациональному планированию противоэпизоотической работы, в том числе по контролю эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота на территории Саратовской области.

2.1.6. Подбор олигонуклеотидных праймеров для идентификации генетического материала вируса лейкоза крупного рогатого скота полимеразно-цепной реакцией

Вирус лейкоза КРС преимущественно поражает В-лимфоциты и вызывает персистентный лимфоцитоз у 30-70% инфицированного скота. В настоящее время не существует лечения против вируса лейкоза крупного рогатого скота. Возбудитель размножается в лимфоидных клетках животных [9]. Естественный

хозяин вируса лейкоза в природе представляет собой крупный рогатый скот. Пораженный вирусом КРС остается до конца жизни инфицированным [14]. Мероприятиями по профилактике и контролю заболевания на сегодняшний день являются: охрана благополучных по болезни хозяйств от заноса ВЛКРС, оздоровление неблагополучных по лейкозу хозяйств (изоляция больных и подозрительных по заболеванию животных), проведение диагностических исследований инфицированных коров и повышение требований при осуществлении ветеринарно-гигиенических мероприятий в хозяйствах [7].

Вследствие отсутствия вакцинации и эффективного лечения мероприятия по профилактике и ликвидации лейкоза крупного рогатого скота основаны на проведении лабораторной диагностики и удалению инфицированных ВЛКРС животных. Для диагностики ВЛКРС существует целый спектр методов, основанных на серологических (РИД и ИФА), а также молекулярно-генетических (ПЦР) исследований.

На сегодняшний день известно большое количество синтетических олигонуклеотидных праймеров для обнаружения РНК вируса лейкоза КРС с помощью ПЦР-РВ.

Задача нашего изобретения – это создание олигонуклеотидных праймеров для выявления РНК вируса энзоотического лейкоза крупного рогатого скота полимеразно-цепной реакцией.

Техническим результатом изобретения является сокращение времени для проведения массовых исследований проб на наличие генома вируса энзоотического лейкоза КРС.

Сущность изобретения состоит в том, что при помощи указанных олигонуклеотидных праймеров ENV (F) и ENV (R) проводят ПЦР-РВ для выявления генома ВЛКРС. В качестве мишени был выбран фрагмент гена гликопротеина (ENV) вируса лейкоза КРС, участвующий в кодировании двух белков gp85 и gp37, данные белки синтезируются как единый полипептид, который проходит процессинг и транспортируется к клеточной мембране, где они остаются связанными дисульфидными связями. Белок gp85 содержит

детерминанты подгрупповой специфичности, нейтрализации и связывания с рецептором.

Полученные нами праймеры позволят осуществлять идентификацию изолятов и штаммов РНК вируса лейкоза КРС.

Изобретение позволяет выявить возбудитель лейкоза КРС у изолятов и штаммов по гену env, и использовать их в качестве диагностики.

Способ осуществляют следующим образом.

1. Выделение РНК из крови и суспензии органов животного проводили с применением набора «ЛЕЙКОЗ» («ИнтерЛабСервис», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

2. Для постановки ПЦР в режиме реального времени использовали следующую реакционную смесь (на одну пробу): дистиллированная воды 10 мкл; 5×буфер для ПЦР-5 мкл; смеси специфических олигонуклеотидных праймеров (10 пкМ каждого) - 2 мкл; зонд флуоресцирующий – 0,5 мкл, раствор MgCl₂ (25 mM) - 1 мкл; смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов dNTP (10 mM) - 1 мкл; Taq-полимераза (5 ед/мкл) - 0,5 мкл, 5 мкл РНК исследуемого образца ВЛКРС.

Общий объем реакционной смеси составил 25 мкл для фрагмента гена ENV прямой праймер (F) 5'-GGGCACTGGCTTAGTGGAAT-3'; обратный праймер (R) 5'-TGCAACAGGGCGTAAAAAGC-3'. Учет результатов реакции осуществляли на экране монитора компьютера в виде графика интенсивности сигнала флуоресценции.

Аmplификацию осуществили при следующих условиях: денатурация 95°C 3 мин 1 цикл, 95°C 20 сек; 2) отжиг праймеров 55°C 20 с.; 3) элонгация 72°C 25 с.

Цикл: денатурация – отжиг – элонгация повторяли 35 раз по каналам HEX (yellow) и по каналу FAM (green) (Таблица 3).

Таблица 3 – Температурный режим проведения ПЦР-РВ

Параметры			
Процесс	Температура	Время	Циклы
Начальная денатурация	95°C	3 мин	1
Денатурация	95°C	20 сек	35
Отжиг	55°C	20 сек	
Элонгация	72°C	25 сек	

Праймеры для специфической амплификации представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Характеристика праймеров для специфической амплификации

Последовательность праймеров для идентификации env				
Ген	Название праймера	Позиция в геноме	Длина фрагмента п.о.	Последовательность праймера (5' → 3')
env	F	6198-6217	20	5'-GGGCACTGGCTTAGTGGAAT-3'
	R	6606-6587		5'-TGCAACAGGGCGTAAAAAGC-3'

Детекцию исследуемых образцов с использованием разработанных олигонуклеотидов осуществляли на амплификаторе «CFX 96 Bio-Rad (США)». Температурно-временной режим проведения ПЦР в режиме реального времени представлен в таблице 3.

Накопление флуоресцентного сигнала измеряли по каналу HEX/yellow и по каналу FAM/green. После окончания реакции были получены изображения с кривыми накоплениями флуоресцентного сигнала по каждому из образцов каналов (Рисунок 15).

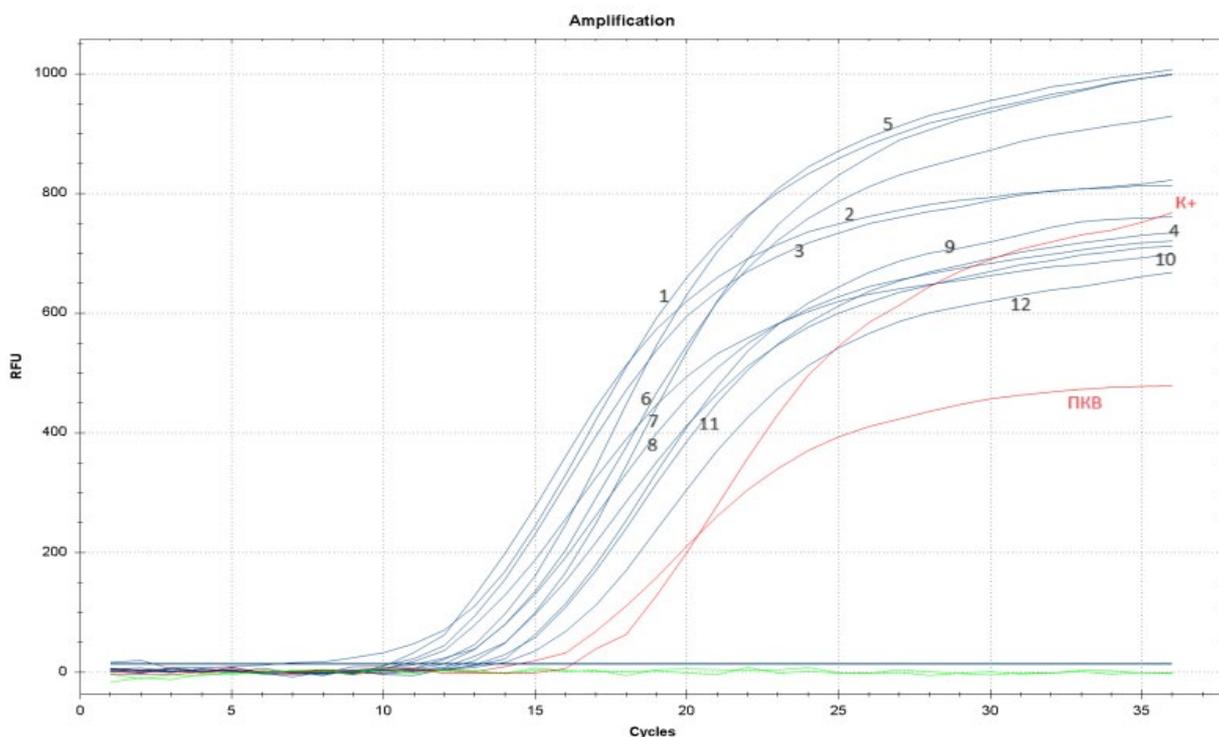


Рисунок 15 – Накопления флуоресцентного сигнала по каждому из образцов каналов

Во всех исследуемых образцах кривая флуоресценции пересекала линию threshold и возвышалась над ней. Полученный результат свидетельствовал о наличии в образце генома вируса лейкоза КРС.

Пример использования праймеров.

Пример 1. Применение реакции амплификации для обнаружения РНК вируса лейкоза КРС с использованием разработанных специфических олигонуклеотидных праймеров.

Для проведения анализа методом ПЦР-РВ были взяты 33 пробы сыворотки крови от крупного рогатого скота в ГБУ «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория» в Краснодарском крае, г. Кропоткин. В качестве положительного контроля использовали изолят выделенный на территории Саратовской области в 2022 году.

Выделение РНК из крови животных проводили с применением набора «ЛЕЙКОЗ» («ИнтерЛабСервис», Россия) в соответствии с инструкцией

производителя. Полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени проводили в амплификаторе «CFX 96 (BioRad, США).

Выполняли амплификацию, используя реакционную смесь для следующего состава (на одну пробу): дистиллированная вода 10 мкл; 5×буфер для ПЦР-5 мкл; смеси специфических олигонуклеотидных праймеров (10 пкМ каждого) - 2 мкл; зонд флуоресцирующий – 0,5 мкл, раствор $MgCl_2$ (25 mM) - 1 мкл; смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов dNTP (10 mM) - 1 мкл; Taq-полимераза (5 ед/мкл) - 0,5 мкл, 5 мкл РНК исследуемого образца ВЛКРС. Постановку ПЦР проводят в общем объеме 25 мкл (20 мкл реакционной смеси и 5 мкл РНК пробы).

Программа амплификации для фрагмента гена *env* была следующей: денатурация 95°C 3 мин 1 цикл, 95°C 20 сек; 2) отжиг праймеров 55°C 20 с.; 3) элонгация 72°C 25 с.

Цикл: денатурация – отжиг – элонгация повторяют 35 раз по каналам HEX (green).

В процессе конструирования дизайна олигонуклеотидных праймеров основными параметрами были следующие: степень гомологии, отсутствие самокомплементарных участков внутри праймеров, процентное содержание гуанина и цитозина (GC-состав) (допустимо 50-55%), длина олигонуклеотида (18-24 нуклеотидов) и комплементарность друг другу, близость значений температур плавления (допустимо различие в 3- 6°C).

В результате проведенного анализа ПЦР-РВ были обнаружены 34 кривых флуоресценции, вместе с положительным контролем пересекающие линию Threshold. Значения показателя «Ct» составило от 18 до 35. Представленные результаты проведенных реакций говорят об их хорошей воспроизводимости и достоверности.

Таким образом, в результате практических испытаний с использованием наших синтезированных олигонуклеотидных праймеров с помощью ПЦР в режиме реального времени удалось обнаружить РНК вируса эндемичного лейкоза КРС.

В ходе проведенной реакции отмечена высокая специфичность, чувствительность идентификации вируса. Простота, быстрота и дешевизна постановки реакции позволяет получить результат в кратчайшие сроки.

Разработанные нами праймеры на лейкоз КРС можно применять научно-исследовательских и диагностических целях при проведении лабораторных исследований.

2.1.7. Совершенствование эпизоотологического надзора за лейкозом крупного рогатого скота на территории Саратовской области

Выполнение организационно-хозяйственных и ветеринарно-санитарных мероприятий владельцами крупного рогатого скота, обслуживающим персоналом, ветеринарными специалистами в соответствии с требованиями ветеринарных правил является приоритетным, как при профилактике лейкоза, так и при оздоровлении хозяйств от этой инфекции.

Необходим строгий контроль над выполнением регламентированных действий при покупке, продаже, сдаче на убой, транспортировке, размещении на пастбище восприимчивых животных, реализации животноводческой продукции, полученной от них в личных подсобных хозяйствах с небольшим поголовьем.

Появление животных с неизвестным статусом (без ветеринарных сопроводительных документов) может привести к резкому ухудшению эпизоотологической ситуации по лейкозу. Поэтому необходим жесткий контроль над проведением учёта и идентификации крупного рогатого, начиная с момента его рождения.

В большинстве случаев заражение вирусом лейкоза происходит при тесном контакте с инфицированным животным или объектами внешней среды, загрязненными его выделениями, в которых присутствует кровь. В этом случае к объективным причинам распространения лейкоза присоединяется человеческий фактор. В связи с данным обстоятельством и с учетом особенностей биологии возбудителя, необходимо упорядочивание организационно-хозяйственных мероприятий и повышение санитарного состояния скотоводческих хозяйств.

Диагностика заболевания лейкозом у коров должна представлять комбинацию диагностических тестов и различных биологических проб (крови, молока) с учетом патогенеза и стадии развития болезни. Полное оздоровление неблагополучных по лейкозу крупного рогатого скота должно проводиться с использованием скрининговых исследований.

Картографирование динамики пространственно-временного изменения эпизоотической ситуации, на примере отдельно взятого региона – Саратовской области неблагополучной по лейкозу крупного рогатого скота отражает характер проявления инфекции, путей её распространения, а в целом возможность проведения оценки эффективности проводимых оздоровительных мероприятий.

Таким образом, проведенный сопряжённый пространственный анализ территориального распределения лейкоза крупного рогатого скота в Саратовской области позволяет сделать выводы об энзоотичности болезни, отсутствии корреляции трендов болезни с климатическими и географическими факторами, плотностью размещения крупного рогатого скота. Вовлеченность в эпизоотический процесс мелких хозяйств может являться значимым фактором распространения возбудителя лейкоза и поддержки напряженности эпизоотического процесса.

Картографирование эпизоотической ситуации позволяет существенно повысить эффективность анализа случаев появления новых очагов болезни и выявления зависимости эпизоотического процесса от территориальных факторов различного происхождения, а внедрение в систему профилактических и оздоровительных противолейкозных мероприятий молекулярно-генетических исследований крови и молока позволит своевременно выбраковывать инфицированных вирусом животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВЛКРС, как и другие ретровирусы, вызывает множественные нарушения иммунной системы, затрагивая как клеточный, так и гуморальный иммунитет, которые, вероятно, ответственны за все больше документально подтвержденные связи со снижением продукции молока и снижением продуктивной продолжительности жизни [166].

Болезнь причиняет огромные экономические потери во всем мире за счет как прямых, так и косвенных затрат: непосредственно из-за снижения производства молока болезнь оказывает огромное влияние на воспроизводство, и некоторых коров приходится преждевременно выбраковывать; и косвенно, потому что импорт животных из районов, зараженных ВЛКРС, ограничен. У большинства крупного рогатого скота, инфицированного ВЛКРС, симптомы отсутствуют, что способствует чрезвычайно высокой скорости выделения вируса во многих популяциях крупного рогатого [118, 166].

ЛКРС в целом ряде экономически развитых стран имеет широкое распространение. В целом ряде стран, на пример в Японии, распространенность ВЛКРС-инфекции среди животных в стране составила 35,2% и это несмотря на то, что начиная с 1997 года проводится целенаправленная работа по его искоренению [166, 178].

Передача ВЛКРС в популяциях животных происходит путем переноса инфицированных лимфоцитов от ВЛКРС-инфицированных животных. Потенциальная возможность передачи инфекции внутри фермы в основном связана с методами ведения сельского хозяйства [117, 166].

Не исключается и трансмиссивный путь передачи вируса [51, 114, 166].

Небольшая часть инфекций ВЛКРС может возникать вертикально, через путь передачи от матери к плоду или при проглатывании молозива и молока, содержащих провирус или свободные вирусные частицы. Такая передача положительно коррелирует с провирусной нагрузкой, измеренной у самки. Таким образом, провирусная нагрузка ВЛКРС и титр антител в молоке играют прямую роль в инфицировании и защите телят от заболевания [157].

Применение искусственного осеменения, также, как и естественное оплодотворение коров и тёлочек при невынужденном травмировании репродуктивных органов может быть причиной вертикального пути распространения ВЛКРС.

Недавно В.У. Ма, Q.L. Gong, С.У. Sheng et al. При проведении молекулярно-генетических исследований обнаружили провирус ВЛКРС в пробах молока и молозива, что по их, мнению стало причиной распространения вируса лейкоза на телятах [96, 157].

По мнению многих учёных, занимающихся проблемой лейкоза (Н. Barzegar, Н. Mirshahabi, N. Motamed et al., 2021) необходима разработка программы профилактики и контроля для снижения распространённости и скорости передачи вируса среди популяций крупного рогатого скота, а также для обеспечения отсутствия инфицированных пищевых продуктов на рынке, в частности молока [122, 175].

Проведенные исследования по изучению региональных особенностей эпизоотического процесса при лейкозе крупного рогатого скота на территории Саратовской области свидетельствуют, что ареал распространения лейкозной инфекции в Саратовской области начале анализируемого периода характеризовался как сплошной. За последние два года наблюдается его концентрация в правобережной зоне области, новые очаги лейкоза в левобережье локализуются вдоль р. Волга. В 2022 году зафиксировано смещение ареала распространения с северо-запада Саратовской области (Балашовский район, Аркадакский) в юго-западном направлении (Саратовский район, Лысогорский район). 81,1 % неблагополучных пунктов по лейкозу – это личные подсобные хозяйства населения, 8,1 % – крестьянские (фермерские) хозяйства. Вовлеченность мелких и средних хозяйств в эпизоотический процесс во многом обусловлена их наибольшим удельным весом в структуре распределения поголовья крупного рогатого скота по категориям хозяйств, а также значительными погрешностями в выполнении организационно-хозяйственных и ветеринарно-санитарных мероприятий на территории таких хозяйств, что в свою

очередь является значимым фактором распространения возбудителя лейкоза и поддерживает напряженность эпизоотического процесса.

Проведенный сопряжённый пространственный анализ территориального распределения лейкоза крупного рогатого скота в Саратовской области позволяет сделать выводы об энзоотичности болезни, отсутствии корреляции трендов болезни с климатическими и географическими факторами, плотностью размещения крупного рогатого скота. Вовлеченность в эпизоотический процесс мелких хозяйств может являться значимым фактором распространения возбудителя лейкоза и поддержки напряженности эпизоотического процесса.

В странах ЕС действуют правила, по которым положительно реагирующие в РИД животные считаются инфицированными и незамедлительно уничтожаются. За изъятых и уничтоженных кров и телок фермерам производится компенсационная выплата. На фермах, где были зарегистрированы инфицированные и в последующем удалённые из стада животные в последующем неоднократно проверяются с использованием серологических и молекулярно-генетических исследований [48, 60].

Среди серологических тестов ELISA и AGID являются эталонными методами, рекомендованными МЭБ для диагностики инфекции ВЛКРС путем выявления антител, направленных к белкам gp51 и p24 ВЛКРС. Хотя AGID является золотым стандартом, ELISA часто используется из-за его более высокой чувствительности. Более того, в одном исследовании тест AGID не смог обнаружить инфекцию у 30% животных, у которых другие методы оказались положительными на ВЛКРС, и не смог обнаружить ВЛКРС-инфицированных животных в больших масштабах из объединенной сыворотки или пробы молока, тогда как некоторые коммерчески доступные ИФА оказались эффективными в таких случаях с различной степенью чувствительности (от 97% до 100%) и специфичности (от 78% до 100%) [107, 122].

ПЦР-тесты могут напрямую выявить наличие провирусной ДНК у крупного рогатого скота, инфицированного ВЛКРС, с низкими, временными или отсутствующими титрами антител. После проведения ПЦР секвенирования и

филогенетического анализа становится возможным изучить распространение генотипов ВЛКРС по всему миру [122, 176].

На сегодняшний день известно большое количество синтетических олигонуклеотидных праймеров для обнаружения РНК вируса лейкоза КРС с помощью ПЦР-РВ.

В ходе проведения исследований нами были предложены олигонуклеотидные праймеры для выявления РНК вируса энзоотического лейкоза крупного рогатого скота полимеразно-цепной реакцией.

Техническим результатом изобретения является сокращение времени для проведения массовых исследований проб на наличие генома вируса энзоотического лейкоза КРС.

Сущность изобретения состоит в том, что при помощи указанных олигонуклеотидных праймеров ENV (F) и ENV (R) проводят ПЦР-РВ для выявления генома ВЛКРС. В качестве мишени был выбран фрагмент гена гликопротеина (ENV) вируса лейкоза КРС, участвующий в кодировании двух белков gp85 и gp37, данные белки синтезируются как единый полипептид, который проходит процессинг и транспортируется к клеточной мембране, где они остаются связанными дисульфидными связями. Белок gp85 содержит детерминанты подгрупповой специфичности, нейтрализации и связывания с рецептором.

Количественная ПЦР в реальном времени на ВЛКРС, основанная на красителях семейства SYBR, является подтверждающим методом, который показывает высокую чувствительность при обнаружении провирусной нагрузки ВЛКРС у инфицированного крупного рогатого скота с низкими, временными или неопределяемыми уровнями антител на ранней стадии заболевания. Его использование рекомендуется для выяснения статуса заболевания ВЛКРС у животных, которые показывают неопределенные результаты ELISA при тестировании их сыворотки [122, 130].

Проведённые нами исследования проб крови в ПЦР-РВ с использованием тест-систем «Лейкоз» наличие провирусной ДНК BLV было выявлено в 149 из

418 исследованной пробы. Полученные нами результаты ПЦР-РВ не только подтвердили результаты исследования РИД в 39 % случаев, но и удалось дополнительно выявить 83 головы крупного рогатого скота, инфицированного вирусом.

ДНК возбудителя обнаруживалась как в цельной крови, так и в её сыворотке, а также в ресуспензированном с забуференным физиологическим раствором кровяном сгустке и в цельном молоке от больных животных.

Для оценки риска заноса инфицированного ВЛКРС крупного рогатого скота было проведено исследование, в результате которого было установлено, перемещение крупного рогатого скота в значительной степени способствует передаче вируса ВЛКРС между фермами. В этом исследовании количественно оценен риск заноса ВЛКРС на уровне фермы с использованием географического анализа перемещения крупного рогатого скота. Обобщенная линейная смешанная модель, прогнозирующая долю крупного рогатого скота, инфицированного ВЛКРС, была построена на основе взвешенной централизации по степени. Полученные результаты предполагают положительную связь между взвешенной центральностью по степени и предполагаемым количеством завезенного ВЛКРС-инфицированного крупного рогатого скота [31, 58, 166].

В ряде экономически развитых странах для оценки риска передачи возбудителей болезни при перемещении скота между стадами, применяют анализ имеющейся информации в социальных сетях [166].

Данный анализ также применим для оценки риска заноса возбудителей болезней на уровне ферм, поскольку отражает источники заражения и пути их распространения [123, 166].

В конечном итоге использование анализа сети перемещения крупного рогатого скота с учетом инфекционного статуса ВЛКРС позволило исследователям оценить риск завоза инфицированного ВЛКРС скота между фермами. Количественные результаты показали, что фермы с большим количеством завезенного крупного рогатого скота, скорее всего, внесут ВЛКРС в свои стада. Эти результаты показывают, что стратегия контроля ВЛКРС,

ориентированная на перемещение скота между фермами, крайне необходима. Кроме того, это исследование подчеркнуло важность контроля ВЛКРС в родильных отделениях ферм. Эти основанные на оценке риска подходы к оценке и контролю очень полезны и эффективны не только при ВЛКРС, но и при других инфекционных заболеваниях животных [166, 180, 194].

Программы борьбы с вирусом лейкоза крупного рогатого скота обычно используют меры, направленные на снижение передачи вируса, тем самым предотвращая новые инфекции. В конечном счете, крупный рогатый скот с положительным тестом можно заменить скотом с отрицательным тестом, тем самым снижая распространенность внутри стада. Этого можно достичь путем внедрения передовых методов управления, которые предотвращают новые инфекции, путем разделения или выбраковки зараженного скота или комбинации этих методов [44].

Программа искоренения в большинстве стран является обязательной и полностью финансируется правительством. Ежегодно в племенных хозяйствах весь крупный рогатый скот старше 12 месяцев подвергается серологическим исследованиям. Раньше эталонным тестом была иммунодиффузия в агаровом геле (AGID), но в настоящее время используется иммуноферментный анализ (ELISA) из-за его более высокой чувствительности [60, 82].

Агропромышленный комплекс России взял курс на цифровизацию. В деловых программах многочисленных мероприятий в сфере ветеринарии эта тема вышла на первые строчки наряду с сертификацией, оформлением сопроводительных документов, экспортом продукции. В настоящее время использование цифровых технологий в сельском хозяйстве затрагивает многие сферы, и в первую очередь ветеринарию. ВетИС — это федеральная государственная информационная система (ГИС) в области ветеринарии, в которой обрабатывают и хранят информацию об обороте животноводческой продукции.

Оператором ГИС является Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор). Россельхознадзор осуществляет

деятельность по созданию, развитию и эксплуатации, в том числе автоматизированный сбор, хранение, обработку, обобщение информации, содержащейся в ее базах данных, а также предоставление этой информации заинтересованным лицам. Одной из целей ГИС является регистрации данных и результатов ветеринарно-санитарной экспертизы, лабораторных исследований и отбора проб для них. Одним из составляющих элементов ГИС является компонент «Хорриот». Этот компонент предназначен для представления в ФГИС ВетИС информации об идентификации и учете животных, о проведенных профилактических, диагностических (за исключением лабораторных исследований), лечебных и иных мероприятиях, об установлении или отмене ограничительных мероприятий (карантина).

В последние годы активно применяемым диагностическим инструментом является эпизоотологическая карта – топографическая карта местности с визуально зафиксированной информацией об эпизоотологическом состоянии территории. Применение электронного картографирования значительно упрощает решение данных задач.

Использование элементов геоинформационных технологий для анализа эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота на территории Саратовской области позволяет совершенствовать организацию и проведение профилактических и оздоровительных мероприятий.

Эффективность проведения оздоровительных противолейкозных мероприятий можно повысить с помощью применения современных методов диагностики, таких как, ПЦР-РВ, поскольку этим методом можно идентифицировать инфицированный скот вирусом лейкоза скот значительно раньше и с более высокой степенью достоверности.

Результаты параллельных исследований РИД и постановки ПЦР с сывороткой крови и молока показали, что диагностическая ценность ПЦР-РВ значительно выше, чем РИД.

Полученные нами олигонуклеотидные праймеры позволят осуществлять идентификацию изолятов и штаммов РНК вируса лейкоза КРС по гену env, что повысит эффективность лабораторной диагностики.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что в структуре неблагополучных пунктов по лейкозу крупного рогатого скота в районах Саратовской области в последние годы личные подсобные хозяйства населения занимают 60-89,8%, крестьянские (фермерские) хозяйства 6,1-33,4%, что препятствует проведению оздоровительных мероприятий.

2. Использованием картографирования эпизоотического процесса лейкоза подтверждено, что система профилактических и оздоровительных противолейкозных мероприятий должна выстраиваться с учётом особенностей ведения животноводства и обязательно включать действия по предотвращению заноса возбудителя на территорию хозяйства.

3. Параллельное применение серологического и молекулярно – генетического методов диагностики повышает эффективность оздоровительных противолейкозных мероприятий, за счёт большего на 39,6-44,2% выявления инфицированных ВЛКРС.

4. Использование синтезированных олигонуклеотидных праймеров позволяет выявлять РНК изолята вируса эндемичного лейкоза КРС в ПЦР-РВ.

Практические предложения

Использование картографического анализа эпизоотической ситуации необходимо использовать при проведении надзорных мероприятий, а также для профилактики и ликвидации лейкоза крупного рогатого скота. Для повышения эффективности выявления инфицированных животных следует использовать скрининговые диагностические исследования крови и молока коров на лейкоз, с использованием РИД и ПЦР-РВ.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Настоящее аналитическое исследование лейкоза крупного рогатого скота на территории Саратовской области показало, что использование картографического анализа эпизоотической ситуации и скрининговых исследований крови и молока в

РИД и ПЦР-РВ, повышает эффективность проведения надзорных мероприятий, в связи, с чем необходимо полноформатное применение ГИС – технологий и молекулярно – генетических исследований для научно – обоснованного обеспечения программ по профилактике и искоренению этой патологии в неблагополучных регионах.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АПК – агропромышленный комплекс.

АФСВСПП – администрация Республики Словения по безопасности пищевых продуктов, ветеринарии и защите растений.

ВЛКРС – вирус лейкоза крупного рогатого скота.

ГБУ – государственное бюджетное учреждение.

Гены ВЛКРС env, gag и pol – три основных белка, кодируемых в ретровирусном геноме: Gag, Pol и Env.

ГИС-технологии – геоинформационные системы.

Гнездовая ПЦР – это модификация ПЦР, предназначенная для повышения чувствительности и специфичности аналитической реакции. Метод включает использование двух наборов праймеров, направленных против одной и той же мишени, и двух последовательных реакций.

ДНК – макромолекула (дезоксирибонуклеиновая кислота).

ДНК – полимеразы taq - термостабильная ДНК-полимераза.

ЕО – естественное оплодотворение.

ИИ – искусственное оплодотворение.

ИФА – иммуноферментный анализ.

Клетки CC81-BLU3G, CC81-GREMG и CC81-GREMG-CAT1 – протокол LuSIA с использованием клеток для измерения инфекционности ВЛКРС.

МЭБ – Всемирная организация здравоохранения животных.

МЭБ – Всемирная организация здравоохранения животных.

ПЛ – постоянный (стойкий) лимфоцитоз.

ПЦР – полимеразная цепная реакция.

РИД – реакция иммунодиффузия в агаровом геле.

ЭЛКРС (ЭЛБ, EBL) – энзоотический лейкоз крупного рогатого скота.

(SNA) картографический анализ.

Agar Gel Immuno Diffusio (AGID) – иммунодиффузия в агаровом геле

BLV – вирус бычьего лейкоза.

BLV-CoCoMo-qPCR – система ПЦР для обнаружения BLV-провируса в режиме реального времени.

CPE – цитопатический эффект.

EBL (франц.) – энзоотический лейкоз крупного рогатого скота

EGFP – усиленный зеленый флуоресцентный белок.

ELISA – иммуноферментный анализ

FBL – клетки легких плода быка.

FDA – управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов.

HTLV-1 и -2 – вирусом Т-клеточного лейкоза человека типов 1 и 2

IGRAPH – программное обеспечение.

LC – количество лимфоцитов.

LuSIA – люминесцентно-индукционный анализ синцития.

MDBK – клетки бычьей почки Мадина-Дарби.

NLBC – национальным центр животноводства.

PBMC – мононуклеарная клетка периферической крови.

PBS – фосфатно-солевой буферный раствор.

PCR – полимеразная цепная реакция

PVL – провирусная нагрузка.

sBL – спорадическая лимфома Беркитта.

SNA – анализ социальных сетей.

SYBR – асимметричный цианиновый краситель.

Tax и Env – кодируемые синтетические пептиды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горошникова, Г.А. Эффективность методов диагностики лейкоза крупного рогатого скот / Г.А. Горошникова, Д.Д. Сотникова //Актуальные исследования. – 2023. – №52 (182). – С. 6-8.
2. Джупина, С.И. Теория эпизоотического процесса / С.И. Джупина // Инновации и продовольственная безопасность. – 2004. – №3 (5). – С. 123.
3. Изучение эпизоотической ситуации и динамики эпизоотического и инфекционного процессов инфекции лейкоза крупного рогатого скота /А.А. Русинович, Н.С. Мотузко, А.А. Лысенко [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2020. – № 6. – С. 5-7.
4. Интерлабсервис : [сайт]. – 2002. – URL: <https://interlabservice.ru/catalog/reagenty/ptsr-diagnostika/veterinariya/leykoz.html> (дата обращения: 15.01.2023). – Текст : электронный.
5. Карамзина, А.А. Эпизоотическая обстановка по лейкозу КРС и эффективность противолейкозных мероприятий в Тавдинском районе Свердловской области /А.А. Карамзина, Л.А. Глазунова, Ю.В. Глазунов // Вестник ГАУ Северного Зауралья. – 2016.– № 2. – С. 32-38.
6. КонсорциумКОДЕКС : [сайт]. – 1991. – URL:<https://docs.cntd.ru/document/1200118749> (дата обращения: 15.01.2023). – Текст : электронный.
7. Кузнецова А.Е., Ласкавый В.Н., Тихомирова Е.И. Разработка диагностической реакции агглютинации цитратной крови крупного рогатого скота на лейкоз. //Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2015. – №2. – С. 403-405.
8. Красникова, Е.С. Гемато-биохимический статус коров при *BLV*- и *BIV*-инфекции / Е.С. Красникова, В.А. Агольцов, А.В. Кудинов // Научная жизнь. - 2016. – №2. – С. 159-168.
9. Красникова, Е.С. О необходимости ужесточения мер контроля над энзоотическим лейкозом крупного рогатого скота / Е.С. Красникова, Т.А. Плютина // Труды Кубанского ГАУ. - 2014. – №5(50). – С. 131-133.

10. Лейкоз крупного рогатого скота - диагностика, оздоровление, антропозоонозный потенциал (история вопроса) /И.М. Донник, М.И. Гулюкин, В.А. Бусол Кривонос [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2021. – № 2. – С. 230-244.
11. Ликвидация лейкоза крупного рогатого скота в условиях промышленного производства / И.М. Донник, О.И. Пономарева, Р.А. Кривонос [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2021. – № 2. – С. 3-8.
12. Логинов, С.И. Анализ эффективности применения иммуноферментного анализа для диагностики лейкоза крупного рогатого скота при проведении оздоровительных мероприятий / С.И. Логинов // Вестник НГАУ (Новосибирский государственный аграрный университет). – 2020. – № 4 (57). – С. 95-102.
13. Малинин М.Л., Кузнецова А.Е., Шibaева М.А., Караблин П.М., Тихомирова Е.И., Ласкавый В.Н. Зависимость восприимчивости крупного рогатого скота к лейкозу от биохимических показателей крови // Фундаментальные исследования. – 2013. – №10. С. 132-136.
14. Методические рекомендации по использованию географической информационной системы ArcGIS в эпизоотологическом анализе / Ф.И. Коренной, М.В. Дудорова, В.М. Гуленкин [и др.] // ФГУ «ВНИИЗЖ». – 2010. – С. 22.
15. Миронов, А.Н. Борьба с лейкозом крупного рогатого скота на территории Кемеровской области / А.Н. Миронов, Т.В. Зубова, В.А. Плешков // Инновационный конвент «Кузбасс: образование, наука, инновации»: Мат. Инновац. конвента, Кемерово, 14 декабря 2018 года / Департамент молодежной политики и спорта Кемеровской области. – Кемерово: Сибирский государственный индустриальный университет.– 2019. – С. 469-470.
16. Макаров, В.В. Эпизоотологические особенности современного лейкоза крупного рогатого скота / В.В. Макаров, Д.А. Лозовой // Вестник российской сельскохозяйственной науки. – 2020. – № 1. – С. 53-58.
17. Макаров, В.В. Лейкоз крупного рогатого скота – современная концепция: лекционное пособие / В.В. Макаров, Д.А. Лозовой // Владимир: Федеральное

государственное бюджетное учреждение "Федеральный центр охраны здоровья животных". – 2020. – С. 52.

18. Мустафаев, А.Р. Применение реакции иммунодиффузии, как один из способов послеубойной диагностики лейкоза крупного рогатого скота / А.Р. Мустафаев // Ветеринария сегодня. – 2022. – Т. 11.– № 1. – С. 49- 52.

19. Мустафаев, А.Р. Сравнительные аспекты диагностики лейкоза крупного рогатого скота при применении реакции иммунодиффузии и иммуноферментного анализа / А.Р. Мустафаев, М.О. Баратов // Ветеринария сегодня. – 2023. – Т. 12.– № 1. – С. 52-56.

20. Мустафаев, А.Р. Сравнительный анализ реакции иммунодиффузии и иммуноферментного анализа в диагностики лейкоза крупного рогатого скота / А.Р. Мустафаев, М.О. Баратов // Актуальные вопросы научно – технологического развития агропромышленного комплекса: материалы Всероссийской научно-практической конференции (с международным участием), Махачкала, 27 апреля 2023 года. – Махачкала: ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Республики Дагестан».– 2023. – С. 509-516.

21. Проблема лейкоза крупного рогатого скота / В.А. Мищенко, О.Н. Петрова, А.К. Караулов, А.В. Мищенко.– Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2018. – С. 38 .

22. Патент 2644233 Российская Федерация. Способ экспресс-диагностики лейкоза крупного рогатого скота / А.И. Никитин, К.В. Усольцев, Т.Х. Фаизов, А.Н. Чернов, И.И. Усольцева, М.Е. Семенова, Н.И. Хаммадов, З.З. Алеева, Ф.А. Хусниев, Р.М. Ахмадеев, Ш.З. Валидов, Э.А. Шуралев., заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». – № 2016109396; заявл. 15.03.2016; опубл. 08.02.2018, Бюл. № 4. – С. 1-14.

23. Патент 2694617 Российская Федерация. Способ диагностики лейкоза крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции / Н.Г. Козырева, Л.А. Иванова, Т.В. Степанова, М.И. Гулюкин., заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ФНЦ-ВНИИЭВ имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук». – № 2018116549; заявл. 04.05.2018; опубл. 16.07.2019.

24. Патент 2700245 Российская Федерация. Способ выявления ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота (Bovine leukosis virus, BLV) / О.Ю. Черных, В.А. Баннов, Д.В. Малышев, А.А. Котельникова, И.М.Донник, Ю.Д. Дробин, С.А. Мирошников, Р.А. Кривонос, В.Н. Шевкопляс, П.В. Шаравьев, А.Г. Кощаев, М.П. Семененко, Л.А. Дайбова, А.В. Молчано., заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина». – № 2018134803; заявл. 01.10.2018; опубл. 13.09.201, Бюл. № 26. – С. 1-13.
25. Патент 2824666 Российская Федерация. Олигонуклеотидные праймеры для выявления РНК вируса энзоотического лейкоза крупного рогатого скота полимеразно – цепной реакцией / В.А. Агольцов, Л.П. Падило, А.К. Сибгатуллова, Е.С. Почепня, О.Ю. Черных, О.П. Бирюкова, О.М. Попова., заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова». – № 2024105841; заявл. 06.03.2024; опубл. 12.08.2024, Бюл. № 23– С. 1-8.
26. Сравнительная диагностическая оценка серологического и молекулярно - генетического методов лабораторных исследований на лейкоз крупного рогатого скота / В.А. Агольцов, Е.С. Красникова, А.А. Щербаков [и др.] // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2012. – № 4(90). – С. 56-59.
27. Статистический анализ в MS Excel : [сайт]. – 2015. – URL: <https://stataliz.info/> (дата обращения: 15.05.2023). – Текст : электронный.
28. Фаизов Т.Х. Разработка тест-системы для обнаружения участка гена ТАХ провирусной ДНК лейкоза КРС / Т.Х. Фаизов, К.В. Усольцев // От теории к практике: вопросы современной ветеринарии, биотехнологии и медицины: мат. Междунар. науч.-практич. конф. – Саратов, 2011. - С. 332-335.
29. Фаизов, Т.Х. Диагностика лейкоза КРС методом ПЦР / Т.Х. Фаизов, К.В. Усольцев, А.В. Иванов, Р.Х. Юсупов // От теории к практике: вопросы современной ветеринарии, биотехнологии и медицины: мат. Междунар. науч.-практич. конф. – Саратов, 2011. - С. 335-338.

30. Эпизоотология лейкоза коров: мониторинг, диагностика, прогнозирование / И.С. Пономарёва, Р.М. Нургалиева, А.С. Урясова, А.Д. Панова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета, Оренбург.– 2022. – С. 210-212.
31. Эпизоотическое районирование Западно-Казахстанской области по инфицированности лейкозом крупного рогатого скота / У.Ж. Кужебаева, В.С. Власенко, Ж.К. Кошематов, Е.С. Борисов // Фундаментальные и прикладные аспекты ветеринарной медицины на границе веков: Сборник материалов международной конференции, посвященной 100-летию СибНИВИ-ВНИИБТЖ, Омск, 30 ноября 2021 года. – Омск: ИП Макшеевой Е.А.– 2021. – С. 230-237.
32. A novel medium-throughput biological assay system for HTLV-1 infectivity and drug discovery / M.F. Abdizadeh, M. Makvandi, A. Samarbafzadeh, K. Azadmanesh // Iran J Basic Med Sci. – 2017. – V.20. – P.1109-1118.
33. Ansari-Lari, M. Causes of culling in dairy cows and its relation to age at culling and interval from calving in Shiraz, Southern Iran / M. Ansari-Lari, M. Mohebbi-Fani, A. Rowshan-Ghasrodashti.–Vet. Res. Forum. – 2012. – V. 3 (4). – P.233-237.
34. Available online: [website]. – 2021. – URL: https://ec.europa.eu/food/animals/animal-diseases/animal-disease-information-system-adis_en . – Text: electronic.
35. Approaches for disease prioritization and decision-making in animal health, 2000-2021: a structured scoping review/ K. Replacement, K.M. McIntyre, N. Magee [et al.] // Front Vet. Sci. – 2023. – V. 10. – P. 1-17.
36. Association between bovine leukemia virus infection, reproductive performance and milk production in water buffaloes and dairy cattle in Egypt / E. Manaa, M.A. Marawan, A. Abdelhady [et al.] // Adv. Anim. Vet. Sci. – 2020. –V.8 (11). – P. 1109-1113.
37. Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): bovine viral diarrhoea (BVD) / S. More, A. Bøtner, A. Butterworth [et al.] // EFSA J. – 2017. – V. 15 (8). – P. 1–45.

38. Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds / R.J. Erskine, P.C. Bartlett, T.M. Byrem [et al.] // *J. Dairy Sci.* – 2012.–V.95 (2). –P. 727-734.
39. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis / M. Polat, S.N. Takeshima, K. Hosomichi [et al.] // *Retrovirology.* – 2016. – V. 13. –P. 4.
40. A sensitive luminescence syncytium induction assay (LuSIA) based on a reporter plasmid containing a mutation in the glucocorticoid response element in the long terminal repeat U3 region of bovine leukemia virus / H. Sato, S. Watanuki, L. Bai [et al.] // *Virology.* – 2019. – V. 16. – P. 66.
41. BLV: Lessons on vaccine development / A. Abdala; I. Alvarez; H. Brossel [et al.] // *Retrovirology.* –2019. – V.16. – P. 26.
42. Bovine Leukemia Virus Infection Affects Host Gene Expression Associated with DNA Mismatch Repair / L. Bai, T. Hirose, W. Assi [et al.] // *Pathogens.*– 2020.– V. 9 (11).– P. 909.
43. Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds / P.C.Bartlett, B. Norby, T. M. Byrem [et al.] // *J. Dairy Sci.* –2013. –V. 96.–P.1591-1597.
44. Breeding bulls as a potential source of bovine leukemia virus transmission in beef herds / O.J.Benitez, J.N.Roberts, B.Norby[et al.] // *J. Am. Vet. Med. Assoc.* – 2019. – V. 254 (11). – P. 1335-1340.
45. Boylen. Much does manure management cost you? / K. How, Boylen // *Progressive Dairyman.* – 2017.
46. Brunner, M.A.Experiences with the New York State bovine leukosis virus eradication and certification program / M.A.Brunner, D.H. Lein, E.J. Dubovi // *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*–1997.–V. 13 (1).–P. 143-150.
47. Brown, P.Age, values, farming objectives, past management decisions, and future intentions in New Zealand agriculture / P. Brown, A. Daigneault, J.Dawson // *J Environ Manage.*– 2019. –V. 231 (7). – P. 110–120.

48. Bovine leukemia virus: Experimental infection in buffaloes and evaluation of diagnostic test reliability / F.Feliziani,A.Martucciello, C. Iscaro [et al.] // Res. Vet. Sci. – 2017. – V. 114. – P. 450-454.
49. Bovine leukemia virus detection and dynamics following experimental inoculation / H.C. Hutchinson, B. Norby, C.J. Droscha [et al.] // Res. Vet. Sci. – 2020.– V. 133. – P. 269-275.
50. BLV-CoCoMo-qPCR: quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm / M. Jimba, S.N. Takeshima, K. Matoba [et al.] // Retrovirology. – 2010. – V. 7. – P. 91.
51. BLV-CoCoMo-qPCR: a useful tool for evaluating bovine leukemia virus infection status / M. Jimba, S.N. Takeshima, H. Murakami [et al.] // BMC Vet Res. – 2012. –V. 8. – P.167.
52. Bovine leukemia virus / R. Kettmann, A. Burny, I. Callebaut [et al.] // Curr. Top Microbiol Immunol. New York, NY, USA. –1994. –V. 112. – P. 1-19.
53. Bovine leukemia virus detected in the breast tissue and blood of Iranian women / M. Khalilian, S.M. Hosseini, O. Madadgar // Microb. Pathog. – 2019. – V. 135. – P. 1-6.
54. Bovine leukemia virus reduces anti-viral cytokine activities and NK cytotoxicity by inducing TGF- β secretion from regulatory T cells. / K. Ohira, A. Nakahara, S. Konnai [et al.] // Immun Inflamm Dis. – 2016. – V. 4 (1). – P.52-63.
55. Bovine leukaemia virus DNA in fresh milk and raw beef for human consumption / N.N. Olaya-Galan, A.P. Corredor-Figueroa, T.C. Guzman-Garzon [et al.] // Epidemiol Infect. – 2017. –V. 145. – P. 3125-3130.
56. Bovine Leukemia Virus Infection in Neonatal Calves. Risk Factors and Control Measures / V. Ruiz, N.G. Porta, M. Lomónaco [et al.] // FrontVet Sci. – 2018. – V. 5. – P. 267.
57. Bluetongue serotype 2 and 9 modified live vaccine viruses as causative agents of abortion in livestock: A retrospective analysis in Italy / G. Savini, A. Lorusso, C. Paladini [et al.] // Transbound Emerg Dis. – 2014. – V. 61. –P. 69-74.

58. BLV-CoCoMo-qPCR-2: improvements to the BLV-CoCoMo-qPCR assay for bovine leukemia virus by reducing primer degeneracy and constructing an optimal standard curve / S.N. Takeshima, Y. Kitamura-Muramatsu, Y. Yuan [et al.] // *Arch Virol.* – 2015. – V. 160. – P. 1325-1332.
59. Bovine leukemia virus infection in cattle of China: association with reduced milk production and increased somatic cell score / Y. Yang, W. Fan, Y. Mao [et al.] // *J Dairy Sci.* – 2016. – V. 99 (5). – P. 3688-3697.
60. Biert, V. The economics of milk production in Alberta 2015. Vol. 75. Alberta Government, Alberta Agriculture and Forestry, Economics and Competitiveness Branch, Economics Section / V. Biert, P. Dairy // *Cost Study.* – 2016. – V. 6. – P. 25-32.
61. CAT1/SLC7A1 acts as a cellular receptor for bovine leukemia virus infection / L.Bai, H.Sato, Y. Kubo [et al.] // *FASEB J.* – 2019. – V. 33. – P. 14516–14527.
62. Current Developments in the Epidemiology and Control of Enzootic Bovine Leukosis as Caused by Bovine Leukemia Virus / P.C.Bartlett, V.J.Ruggiero, H.C.Hutchinson [et al.] // *Pathogens.* – 2020. – V. 9 (12). – P. 1058.
63. Co-Circulation of Bovine Leukemia Virus Haplotypes among Humans, Animals, and Food Products: New Insights of Its Zoonotic Potential / A.P Corredor-Figueroa, N.N Olaya-Galán, S. Velandia-Álvarez [et al.] // *Int J Environ Res Public Health.* – 2021. – V. 18 (9). – P. 4883.
64. Characterization of colostrum from dams of BLV endemic dairy herds / G. Gutierrez, M. Lomonaco, I. Alvarez, F. Fernandez [et al.] // *Vet Microbiol.* – 2015. – V. 177. – P. 366-369.
65. Cross-sectional study to describe bovine leukemia virus herd and within-herd ELISA prevalence and bovine leukemia virus proviral load of convenience-sampled Kansas beef cow-calf herds / S.M. Huser, R.L. Larson, T.M. Taxis [et al.] // *Am J Vet Res.* – 2022. – V. 84 (2). – P. 42.
66. Cattle with a low bovine leukemia virus proviral load are rarely an infectious source / H. Mekata, M. Yamamoto, T Hayashi [et al.] // *J. Jpn. J. Vet. Res.* . – 2018. – V. 10 (8). – P. 157-163.

67. Control of bovine leukaemia virus transmission by selective culling of infected cattle on the basis of viral antigen expression in lymphocyte cultures / J. B. Molloy, C. K. Dimmock, F.W. Eaves [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 1994. –V. 39 (3-4) –P. 323-333.
68. Controlling bovine leukemia virus in dairy herds by identifying and removing cows with the highest proviral load and lymphocyte counts / V.J. Ruggiero, B. Norby, O.J. Benitez [et al.] // *J Dairy Sci.* – 2019. – V. 102 (10). – P. 9165-9175.
69. Control of paratuberculosis: Who, why and how. A review of 48 countries / R. Whittington, K. Donat, M.F. Weber [et al.] // *BMC Vet. Res.* – 2019. – V. 15. – P. 198.
70. Development of a new recombinant p24 ELISA system for diagnosis of bovine leukemia virus in serum and milk / L.Bai, K.Yokoyama, S.Watanuki [et al.] // *Arch. Virol.*–2019.–V.–164.–P. 201–211.
71. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* / J.Chi, A. Weersink, G.P. Keefe // *Prev. Vet. Med.* –2002. – V. 55 (2). – P. 137-153.
72. Decreto Ministeriale : [website]. – 1996. – URL: https://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie_generale/caricaDettaglioAtto/originario?atto.dataPubblicazioneGazzetta=1996-07-10&atto.codiceRedazionale=096G0379 (date of access: 25.10.2021). – Text : electronic.
73. Dean, A. Open source epidemiologic statistics for public health, version 3.01 / A.Dean,K. Sullivan, M. Soe // *OpenEpi*: Accessed Jul. –2019.
74. Dynamics of perinatal bovine leukemia virus infection / G.Gutiérrez, I. Alvarez, R. Merlini [et al.] // *BMC Vet. Res.*–2014.–V. 10. –P. 82.
75. Detection and molecular characterization of bovine leukemia virus in Egyptian dairy cattle / R.Hamada,S. Metwally,MPolat [et al.] // *Front. Vet. Sci.* – 2020. – V. 7. – P. 608.
76. Diagnostic Measures of Disease Progression in Cattle Following Natural Infection with Bovine Leukemia Virus / H.C. Hutchinson, V.J. Ruggiero, B. Norby [et al.] // *Pathogens.* – 2021. –V. 10. – P. 987.

77. Development and implementation of a risk assessment and management program for bovine enzootic leukemia in Atlantic Canada / E.E. John, G. Keefe, M. Cameron // *J Dairy Sci.* – 2020. – V. 103 (9). – P. 8398-8406.
78. Detection and molecular characterization of bovine leukemia virus in various regions of Iran / M. Kazemimanesh, O. Madadgar, F. Steinbach [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2019. – V. 100. – P. 1315-1327.
79. Detection and genotyping of bovine leukemia virus (BLV) in Vietnamese cattle / D.T. Le, N. Yamashita-Kawanishi, M. Okamoto [et al.] // *J. Vet. Med. Sci.* – 2020. – V. 82(7). – P. 1042–1050.
80. Detection by immunodiffusion- and radioimmunoassay-tests of antibodies to bovine leukemia virus antigens in sera of experimentally infected sheep and cattle / M. Mammerrickx, D. Portetelle, A. Burny, J. Leunen // *Zentralbl Veterinärmed.* – 1980. – V. 27 (4). – P. 291-303.
81. Development of a luminescence syncytium induction assay (LuSIA) for easily detecting and quantitatively measuring bovine leukemia virus infection. / H. Sato, S. Watanuki, H. Murakami [et al.] // *Arch Virol.* – 2018. – V. 163. – P. 1519-1530.
82. Detection of the BLV provirus from nasal secretion and saliva samples using BLV-CoCoMo-qPCR-2: comparison with blood samples from the same cattle. / Y. Yuan, Y. Kitamura-Muramatsu, S. Saito [et al.] // *Virus Res.* – 2015. – V. 210. – P. 248-254.
83. Enzootic Bovine Leukosis: Surveillance Measures and Control Program in the Northern Dobruja Area of Romania Between 2017 and 2020 / E. Irimia, M. Mincu, E.N. Pogurschi [et al.] // *Front Vet Sci.* – 2021. – V. 8. – P. 10–15.
84. Enzootic bovine leukosis / B.Charlotte, B. Howard, A. Koeijer [et al.] // *Scientific opinion* –2015.–V. 13 (7). – P. 1-63.
85. European Union : [website]. – 2021. – URL: https://eurlex.europa.eu/eli/reg_impl/2021/620/oj (date of access: 12.05.2022). – Text : electronic.
86. European Union : [website]. – 2016. – URL: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2016/429/oj> (date of access: 11.09.2021). – Text : electronic.
87. European Union : [website]. – 2020. – URL: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_

impl/2020/2002/oj (date of access: 10.06.2022). – Text : electronic.

88. European Union : [website]. – 2017. – URL: https://eur-lex.europa.eu/eli/dec_impl/2017/1910/oj (date of access: 15.09.2021). – Text : electronic.

89. European Union : [website]. – 2018. – URL: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_del/2018/1629/oj (date of access: 15.05.2022). – Text : electronic.

90. European Union : [website]. – 2018. – URL: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2018/1882/oj (date of access: 15.05.2022). – Text : electronic.

91. European Union : [website]. – 2020. – URL: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_del/2020/689/oj (date of access: 15.05.2022). – Text : electronic.

92. Establishment of a novel diagnostic test for Bovine leukaemia virus infection using direct filter PCR / H.Daous, S.Mitoma, E. Elhanafy [et al.] // *Transbound. Emerg. Dis.* – 2020. – V. 67 (4). – P. 1671-1676.

93. Estimating potential epidemic size following introduction of a long-incubation disease in scale-free connected networks of milking-cow movements in Ontario, Canada / C.Dubé, C. Ribble, D. Kelton, B. McNab // *Prev. Vet. Med.* – 2011. – V. 99 (2-4). – P. 102-111.

94. Escalera-Zamudio, M. On the classification and evolution of endogenous retrovirus: human endogenous retroviruses may not be human after all / M. Escalera-Zamudio, A.D. Greenwood // *APMIS.* – 2016. – V. 124 (1-2). – P. 44-51.

95. Evermann, J.F. Transmission of bovine leukosis virus by blood inoculation / J.F. Evermann, R.F. DiGiacomo, J.F. Ferrer, S.M. Parish // *Am J Vet Res.* – 1986. – V. 47. – P. 1885.

96. Enzootic bovine leucosis in Italy: Update epidemiological situation and analysis of rules provided by the national eradication plan and the regional surveillance plans / C. Iscaro, A. Felici, S. Costarelli [et al.] // *Large Anim. Rev.* – 2014. – V. 20. – P. 187-193.

97. Economic evaluation of 4 bovine leukemia virus control strategies for Alberta dairy farms / A. Kuczewski, H. Hogeveen, K Orsel [et al.] // *J Dairy Sci.* – 2019. – V. 102 (3). – P. 2578-2592.

98. Effect of freezing treatment on colostrum to prevent the transmission of bovine leukemia virus / T. Kanno, R. Ishihara, S. Hatama [et al.] // *J. Vet. Med. Sci.* – 2014. – V. 76. – P. 255-257.
99. Evaluation of a new antibody-based enzymelinked immunosorbent assay for the detection of bovine leukemia virus infection in dairy cattle / G.E. Monti, K. Frankena, B. Engel [et al.] // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2005. – V. 17. – P. 451-457.
100. Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukaemia virus / H. Mekata, S. Sekiguchi, S. Konnai [et al.] // *J. Vet. Rec.* – 2015. – V. 176. – P. 254-257.
101. Estimation of bovine leukemia virus (BLV) proviral load harbored by lymphocyte subpopulations in BLV-infected cattle at the subclinical stage of enzootic bovine leucosis using BLV-CoCoMo-qPCR / C.J. Panei, S.N. Takeshima, T. Omori [et al.] // *BMC Vet Res.* – 2013. – V. 9. – P. 95.
102. Evaluation of a new antibody-based enzymelinked immunosorbent assay for the detection of bovine leukemia virus infection in dairy cattle. / G. E. Monti, K. Frankena, B. Engel [et al.] // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2005. – V. 17. – P.451–457.
103. Economic evaluation of participation in a voluntary Johne's disease prevention and control program from a farmer's perspective –The Alberta Johne's Disease Initiative / R. Wolf, F. Clement, H.W. Barkema, K. Orsel // *J. Dairy Sci.* – 2014. – V. 97. – P. 2822-2834.
104. Enzootic Bovine Leukosis in Italy: Epidemiological Issues after Free Status Recognition and Measures Applied to Tackle the Last Persistent Clusters / C. Righi, C. Iscaro, S. Petrini [et al.] // *Pathogens.* – 2021. – V. 10(11). – P. 1475.
105. Enzootic bovine leukosis (bovine lymphosarcoma). in *Veterinary Medicine—A Book of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats* / O. M. Radostits, C.C. Gay, K.W. Hinchcliff, P.D. Constable // 10th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA. – 2007. – V. 11. – P. 1209-1221
106. Eradication of enzootic bovine leucosis from Finland / L. Nuotio, H. Rusanen, L. Sihvonen, E. Neuvonen // *Prev. Vet. Med.* – 2003. – V.59. – P. 43-49.
107. Establishment of a bovine leukemia virus-free dairy herd in Korea. / G. H. Suh, J. C. Lee, C. Y. Lee [et al.] // *J. Vet. Sci.* – 2005. – V. 6. – P. 227-230.

108. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: Comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency / C. Simard, S. Richardson, P. Dixon [et al.] // *Can. J. Vet. Res.* – 2000. –V. 64. –P. 101-106.
109. Examination of the fecal microbiota in dairy cows infected with bovine leukemia virus / J. Uchiyama, H. Murakami, R. Sato [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2020. –V. 240. – P. 108547.
110. Ferrer, J.F. Milk of dairy cows frequently contains a leukemogenic virus / J.F. Ferrer, S.J. Kenyon, P. Gupta // *Science.*– 1981. –V. 213. – P. 1014-1016.
111. Foley, C. Technical note: comparative analyses of the quality and yield of genomic DNA from invasive and noninvasive, automated and manual extraction methods / C. Foley, C. O’Farrelly , K.G. Meade // *J Dairy Sci.* – 2011. – V. 94. – P. 3159-3165.
112. Frie, M.C. Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle /M.C. Frie, P.M. Coussens // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2015. –V. 163 (3-4). – P. 103-114.
113. Factors affecting rearing practices and health of calves on family farms / Relic R, Lakic N, Jankovic L, [et al.] // *Spanish J Agric Res.* – 2021. –V. 19(1). – P. 44-85.
114. Godden, S. Colostrum management for dairy calves / S. Godden // *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* –2008. –V. 24 (1). – P. 19-39.
115. Government of Alberta : [website]. – 2015. – URL: <https://alis.alberta.ca/occinfo/> (date of access: 22.05.2023). – Text : electronic.
116. Government of Canada : [website]. – 2017. – URL: <https://agriculture.canada.ca/en/sector/animal-industry/canadian-dairy-information-centre/statistics-market-information/dairy-animal-genetics/culling-replacement> (date of access: 21.06.2022). – Text : electronic.
117. Genotyping bovine leukemia virus in dairy cattle of Heilongjiang, northeastern China / C. Yu, X. Wang, Y. Zhou [et al.] // *BMC Vet. Res.* – 2019. – V. 15. – P. 179.

118. Herd-level risk factors for infection with bovine leukemia virus in Canadian dairy herds / O. Nekouei, J. VanLeeuwen, J. Sanchez [et al.] // *Prev. Vet. Med.* – 2015. – V. 119. – P. 105-113.
119. Herd-level determinants of bovine leukaemia virus prevalence in dairy farms / P.C. Bartlett, T.M. Byrem, C. L. Render [et al.] // *J. Dairy Res.* – 2012. – V.79 (4). – P. 445-450.
120. Heat-treated colostrum and reduced morbidity in preweaned dairy calves: results of a randomized trial and examination of mechanisms of effectiveness / D.J. Smolenski, M. Donahue, J. M. Oakes [et al.] // *J. Dairy Sci.* – 2012. – V. 95 (7). – P. 4029-4040.
121. Heikkila, R. Dairy cost study, the economics of milk production in Alberta 2009. Alberta Government, Alberta Agriculture and Forestry, Economics and Competitiveness Branch, Economics Section / R.Heikkila // *P. Van Biert.* – 2010. – V. 69. – P. 66-69.
122. Heikkila, R. Dairy cost study, the economics of milk production in Alberta 2011. Alberta Government, Alberta Agriculture and Forestry, Economics and Competitiveness Branch, Economics Section / R.Heikkila // *P. Van Biert.*–2012. – V. 71. – P. 6-9.
123. Heikkila, R. Dairy cost study, the economics of milk production in Alberta 2014. Alberta Government, Alberta Agriculture and Forestry, Economics and Competitiveness Branch, Economics Section / R.Heikkila // *P. Van Biert.* – 2015. – V. 74. – P. 4-8.
124. Hostni, P. Novi premiki za obvladovanje bolezni IBR / P. Hostni, J. Starič // *Vestn Vet Zb Slov.* – 2016. – V. 8. – P. 32-33.
125. Hopkins, S.G. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle / S.G. Hopkins, R.F. DiGiacomo // *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* – 1997. – V. 13. – P. 107-128.
126. Hot topic: Bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle / M.A., Juliarena, C.N. Barrios, M. Carolina Ceriani, E.N. Esteban // *J. Dairy Sci.* – 2016. – V. 99. – P. 4586-4589.

127. Horizontal transmission of bovine leukemia virus from lymphocytotic cattle, and beneficial effects of insect vector control / M. Ooshiro, S. Konnai, Y. Katagiri [et al.] // *Vet. Rec.* – 2013. – V. 173 (21). – P. 527.
128. Horizontal transmission and phylogenetic analysis of bovine leukemia virus in two districts of Miyazaki, Japan / H. Mekata, S. Sekiguchi, S. Konnai [et al.] // *J. Vet. Med. Sci.* – 2015. – V. 77. – P. 1115-1120.
129. Inconsistency of diagnosis of bovine leukemia: serological differences in the periparturient period / M.F. Arabi, J. Magid, E.V. Carneiro [et al.] // *Image W Microbiol.* – 2022. – V. 53 (1). – P. 513-516.
130. Identification of bovine leukemia virus in raw milk samples in North-West of Iran / H. Barzegar, H. Mirshahabi, N. Motamed [et al.] // *Vet Res Forum.* – 2021. – V. 12 (2). – P. 223-227.
131. Intrauterine infection with bovine leukemia virus in pregnant dam with high viral load / Y. Sajiki, S. Konnai, A. Nishimori [et al.] // *J. Vet. Med. Sci.* – 2017. – V. 79. – P. 2036-2039.
132. Identification of an atypical enzootic bovine leukosis in Japan by using a novel classification of bovine leukemia based on immunophenotypic analysis / A. Nishimori, S. Konnai, T. Okagawa [et al.] // *Clin Vaccine Immunol.* – 2017. – V. 24 (9). – P. 17.
133. Invited review: Bovine leukemia virus-Transmission, control, and eradication / A. Kuczewski, K. Orsel, H.W. Barkema [et al.] // *J Dairy Sci.* – 2021. – V. 104 (6). – P. 6358-6375.
134. Implications of cattle trade for the spread and control of infectious diseases in Slovenia / T. Knific, M. Ocepek, A. Kirbiš, H.K. Lentz // *Front Vet Sci.* – 2020. – V. 6. – P. 454.
135. Invited review: Determinants of farmers' adoption of management-based strategies for infectious disease prevention and control / C. Ritter, J. Jansen, S. Roche [et al.] // *J. Dairy Sci.* – 2017. – V. 100. – P. 3329-3347.
136. L'Italia ha finalmente raggiunto i requisiti di indennità nei riguardi della Leucosi Bovina Enzoistica / F. Feliziani, R. Lomolino, C. Iscaro [et al.] // *Large Animal Review.* – 2018. – V. 24 (3). – P. 9.

137. Leukemic exotics of cattle. *Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia* / S. Hirsch, R.K. Leite, J. Magid [et al.] // ROCA, Rio de Janeiro. – 2016.– V. 68. – P. 736-741.
138. Lawson, J.S. Oncogenic Viruses and Breast Cancer: Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV), Bovine Leukemia Virus (BLV), Human Papilloma Virus (HPV), and Epstein-Barr Virus (EBV) / J.S. Lawson, B. Salmons, W.K. Glenn // *Front. Oncol.* – 2018. –V. 8. –P. 1
139. Molecular characterization of Italian strains of bovine leukaemia virus; Proceedings of the 12th Annual Meeting of EPIZONE, ESVV; Vienna, Austria / F.Feliziani, M.Bazzucchi, M.Giammarioli [et al.] // Ghent, Belgium: European Society for Veterinary Virology. – 2018. –V. 164 (6). –P. 1697-1703.
140. Massive depletion of bovine leukemia virus proviral clones located in genomic transcriptionally active sites during primary infection / N.A. Gillet, G. Gutiérrez, S.M. Rodriguez [et al.] // *PLoS Pathog.*– 2013. –V. 9 (10). –P. 23.
141. Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus in Taiwan dairy cattle / J.C. Hsieh, C.Y. Li, W.L. Hsu, S.T. Chuang // *Front. Vet. Sci.* – 2019. – V. 6. – P. 427.
142. Mitsouras, K. Saliva as an alternative source of high yield canine genomic DNA for genotyping studies. / K. Mitsouras, Faulhaber E.A. // *BMC Res Notes.* – 2009. –V. 2. – P. 219.
143. Molecular detection and risk factors for *Anaplasma platys* infection in dogs from Egypt / A. Selim, H. Almohammed, A. Abdelhady [et al.] // *Parasites Vectors.* – 2021. – V. 14. – P. 1-6.
144. Mother-to-child transmission of human T-cell-leukemia/lymphoma virus type I: Implication of high antiviral antibody titer and high proviral load in carrier mothers / A. Ureta-Vidal, C. Angelin-Duclos, P. Tortevoeye [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 1999. –V. 82. – P. 832-836.
145. Molecular detection and characterization of genotype 1 bovine leukemia virus from beef cattle in the traditional sector in Zambia / M.M. Phiri, E. Kaimoyo, K. Changula [et al.] // *Arch. Virol.* – 2019. –V. 164. – P. 2531-2536.

146. Molecular characterization of bovine leukemia virus reveals existence of genotype 4 in Chinese dairy cattle / Y. Yang, L. Chen, M. Dong [et al.] // *Virol. J.* – 2019. – V. 16. – P. 1-7.
147. Molecular Characterization of the env Gene of Bovine Leukemia Virus in Cattle from Pakistan with NGS-Based Evidence of Virus Heterogeneity / M. Rola-Łuszczak, A. Sakhawat, A. Pluta [et al.] // *Pathogens.* – 2021. – V. 10. – P. 910.
148. Nekouei, O. Diagnostic performance of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect bovine leukemia virus antibodies in bulk-tank milk samples / O. Nekouei, J. Durocher, G. Keefe // *Can. Vet. J.* – 2016. – V. 57 (7). – P. 778–780.
149. Naturally occurring bovine leukosis virus in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Brazil. / E. Molnar, L. Molnar, V.T.M. Guedes, E.S.C. De Lima // *Vet. Rec.* – 2000. – V. 146 (24). – P. 705–706.
150. New evidence of bovine leukemia virus circulating in Myanmar cattle through epidemiological and molecular characterization / K.K. Moe, M. Polat, L. Borjigin [et al.] // *PLoS ONE.* – 2020. – V. 15 (2). – P. 15.
151. Overview of Control Programs for Twenty-Four Infectious Cattle Diseases in Italy / M. Tamba, I. Pallante, S. Petrini [et al.] // *Front Vet Sci.* – 2021. – V. 8. – P. 665607.
152. Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle / P. C. Bartlett, L. M. Sordillo, T. M. Byrem [et al.] // *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2014. – V. 244 (8). – P. 914–922.
153. OIE : [website]. – 2018. – URL: <https://www.woah.org/en/disease/enzootic-bovine-leukosis/> (date of access: 21.06.2023). – Text : electronic.
154. OIE : [website]. – 2018. – URL: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.09_EBL.pdf (date of access: 21.06.2023). – Text : electronic.
155. Ordinanza Ministeriale : [website]. – 2015. – URL: <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2015/06/24/15A04879/sg> (date of access: 21.06.2023). – Text : electronic.
156. Ordinanza Ministeriale : [website]. – 2023. – URL: <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2023/06/24/23A04879/sg>

- it/eli/id/2023/12/30/23A07201/sg (date of access: 21.01.2024). – Text : electronic.
157. Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle / P.C.Bartlett, L.M.Sordillo, T.M.Byrem [et al.] // JAVMA. – 2014. – V. 244. – P. 914–922.
158. OIE (World Organisation for Animal Health : [website]. – 2018. – URL: www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online (date of access: 11.01.2022). – Text : electronic.
159. Overview of Slovenian Control Programmes for Cattle Diseases Not Regulated by the European Union / J.J. Hodnik, T. Knific, J. Starič [et al.] // Front Vet Sci. – 2021. – V. 8. – P. 1-12.
160. Ott, S. L. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms / S.L Ott, R. Johnson, S.J. Wells. // Prev. Vet. Med. – 2003. – V. 61. – P. 249-262.
161. Prevalence and molecular epidemiology of bovine leukemia virus in Colombian cattle / A.P. Salas, S. Olaya-Galán, N.N. Quintero [et al.] // Infect. Genet. Evol. – 2020. – V. 80. – P. 104171.
162. Preferences of cost factors for mastitis management among Dutch dairy farmers using adaptive conjoint analysis / K.Huijps, , H. Hogeveen, T. J. G. M. Lam, R. B. M. Huirne // Prev. Vet. Med. – 2009. – V. 92. – P. 351-359.
163. Pilot implementation of a newly developed bovine leukemia virus control program on 11 Alberta dairy farms / A. Kuczewski, S. Mason, K. Orsel, F. Meer // J Dairy Sci. – 2021. – V. 104 (4). – P. 4549-4560.
164. Prevalence of bovine leukemia virus antibodies in US dairy cattle / R.M. LaDronka, S. Ainsworth, M.J. Wilkins [et al.] // Vet. Med. Int. – 2018. – V 11. – P. 58-63.
165. Provirus load in breast milk and risk of mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type I / H.C. Li, R. J. J. Biggar, W. J. J. Miley [et al.] // J. Infect. Dis. – 2004. – V. 190 (7). – P. 1275–1278.
166. Prevalence of bovine leukemia in 1983–2019 in China: A systematic review and meta-analysis / B.Y. Ma, Q.L. Gong, C.Y. Sheng [et al.] // Microb. Pathog. – 2020. – V. 150. – P. 142–150.

167. Phylogenetic analysis of env gene of bovine leukemia virus strains spread in Miyazaki prefecture, Japan / M.A. Marawan, H. Mekata, T. Hayashi [et al.] // *J. Vet. Med. Sci.* – 2017. – V. 79 (5). – P. 912-916.
168. Perpar, T. Indeks osemenitev / T. Perpar, J. Jeretina // *Ljubljana.* – 2020. – V. 8. – P. 6.
169. Polat, M. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus / M. Polat, S.N. Takeshima, Y. Aida // *Virol J.* – 2017. – V. 14 (1). – P. 209.
170. Phylogenetic Analysis of South African Bovine Leukaemia Virus (BLV) Isolates. / A. Suzuki, R. Chapman, N. Douglass [et al.] // *Viruses.* – 2020. – V. 12. – P. 898.
171. Production effects of pathogens causing bovine leukosis, bovine viral diarrhea, paratuberculosis, and neosporosis / A. Tiwari, J. A. VanLeeuwen, I. R. Dohoo [et al.] // *J. Dairy Sci.* – 2007. – V. 90. – P. 659-669.
172. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: Lessons for HTLV / S.M. Rodríguez, A. Florins, N. Gillet [et al.] // *Viruses.* – 2011. – V. 3. – P. 1210-1248.
173. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: Lessons for HTLV / S. M. Rodríguez, A. Florins, N. Gillet [et al.] // *Viruses.* – 2011. – V. 3. – P. 1210-1248.
174. Quantitative Risk Assessment for the Introduction of Bovine Leukemia Virus-Infected Cattle Using a Cattle Movement Network Analysis / K. Notsu, A. Wiratsudakul, S. Mitoma [et al.] // *Pathogens.* – 2020 – V. 9 (11). – P. 903.
175. Quantification of bovine leukemia virus proviral DNA using a low-cost real-time polymerase chain reaction / M.I. Petersen, I. Alvarez, K.G. Trono, J.P. Jaworski // *J Dairy Sci.* – 2018. – V. 101. – P. 6366-6374.
176. Raghavan, E. Suggested fee guide for large animal procedures / E. Raghavan, E. Stiles // *Canadian Veterinary Medical Association and Alberta Veterinary Medical Association.* – 2017. – V. 1. – P. 1-39.
177. Reduced humoral immunity and atypical cell-mediated immunity in response to vaccination in cows naturally infected with bovine leukemia virus / M.C.Frie, K.R.

- Sporer, J.C. Wallace [et al.] // *Vet. Immunol. Immunopathol.* –2016. – V. 182. – P. 125-135.
178. Risk factor for breast cancer development under exposure to bovine leukemia virus in Colombian women: A case-control study / N.N. Olaya-Galán, S.P. Salas-Cárdenas, Rodríguez-Sarmiento [et al.] // *PLoS ONE.* – 2021. –V. 16 (9). – P. 11-14.
179. Risk factors associated with increased bovine leukemia virus proviral load in infected cattle in Japan from 2012 to 2014 / A. Ohno, S.N. Takeshima, Y. Matsumoto, Y. Aida // *Virus Res.* – 2015. –V. 210. – P. 283-290.
180. Recurrent enzootic leukemia of cattle on a cattle farm in Lithuania: a clinical case / E. Rapalite, E. Stonchute, M. Masiulis [et al.] // *Veterinary and Animal Science.* – 2020. –V. 99 (29). – P. 31.
181. Reber, A.J. Effects of the ingestion of whole colostrum or cell-free colostrum on the capacity of leukocytes in newborn calves to stimulate or respond in one-way mixed leukocyte cultures / A.J. Reber, A.R. Hippen, D.J. Hurley // *Am J Vet Res.* – 2005. –V. 66. – P. 1854-1860.
182. Rhodes, J. K. Economic implications of bovine leukemia virus infection in mid-Atlantic dairy herds // J.K. Rhodes, K.D. Pelzer, Y.J. Johnson // *J. Am. Vet. Med. Assoc.* – 2003. – V. 223. – P. 346-352.
183. Rollin, E.K. The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool / E.K. Rollin, C. Dhuyvetter, M.W. Overton // *Prev. Vet. Med.* – 2015. – V. 122. – P. 257-264.
184. Roche, F. Review of EU unregulated cattle disease mitigation programs in Austria / F. Roche, B. Konradi // *Front Jet Ski.* – 2021. –V. – P. 321-326.
185. Rola, M. The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR-ELISA / M. Rola, J. Kuzmak // *J. Virol. Methods.* – 2002. – V. 99. – P. 33-40.
186. Rhodes, J. K. Economic implications of bovine leukemia virus infection in mid-Atlantic dairy herds / J.K. Rhodes, K.D. Pelzer, Y.J. Johnson // *J. Am. Vet. Med. Assoc.* – 2003. – V. 223. – P. 346-352.

187. Ruggiero, V.J. Control of bovine leukemia virus in three US dairy herds by culling ELISA-positive cows // V.J. Ruggiero, P.C. Bartlett // *Vet. Med. Int.* –2019. –V. 2. – P. 1-6.
188. Rezultati kontrole priraje mleka in mesa Slovenija 2019. Results of Dairy and Beef Recording Slovenia / M. Sadar, J. Jeretina, B. Logar [et al.] // *Kmetijski inštitut Slovenije.* – 2020. – V. 110. – P. 89.
189. Rezultati kontrole priraje mleka in mesa Slovenija 2018. Results of Dairy and Beef Recording Slovenia 2018. / M. Sadar, J. Jenko, J. Jeretina [et al.] // *Front Vet Sci.* – 2021. – V. 8. – P. 1-12.
190. Risk factor analysis of bovine leukemia virus infection in dairy cattle in Egypt / A. Selim, A.A. Megahed, S. Kandeel, A. Abdelhady // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* – 2020. – V. 72. – P. 101517.
191. Risk Factors and Molecular Identification of Bovine Leukemia Virus in Egyptian Cattle. / A. Selim, E. Manaa, A. Alanazi [et al.] // *Animals.* – 2021. – V. 11. – P. 319.
192. Statistics Explained : [website]. – 2018. – URL: <https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?oldid=406560> (date of access: 22.05.2021). – Text : electronic.
193. Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds / J.A. Vanleeuwen, , J.P. Haddad, I.R. Dohoo [et al.] // *Prev. Vet. Med.* – 2010. –V. 93. –P. 129-138.
194. Standardizing output-based surveillance to control non-regulated cattle diseases: Aspiring for a single general regulatory framework in the European Union / L. Costa, E.L. Duarte, T. Knific [et al.] // *Prev Vet Med.*–2020.–V. 183.–P. 105-130.
195. Sistemi informativi per la sanità animale: Realizzazione di un nuovo strumento per il monitoraggio delle attività del piano di sorveglianza ed eradicazione della Leucosi Bovina Enzootica / C. Iscaro, R. Lomolino, D. Palma [et al.] // *Proceedings of the XIX Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.Matera, Italy.* – 2019. –V. 1. – P.187.
196. Short communication: Relationship between the level of bovine leukemia virus antibody and provirus in blood and milk of cows from a naturally infected herd / J.P.

- Jaworski , N.G. Porta, G. Gutierrez [et al.] // *J Dairy Sci.* – 2016.–V. 99 (7). – P. 5629-5634.
197. Seroprevalence of Bovine Leukemia Virus (BLV) in Cattle from the North West of Pakistan / M.F. Khan, U. Siddique, A.A. Shah [et al.] // *Pak. Vet. J.* – 2019. – V. 40. – P. 127-129.
198. Sato, H. Overexpression of bovine leukemia virus receptor SLC7A1/CAT1 enhances cellular susceptibility to BLV infection on luminescence syncytium induction assay (LuSIA) / H. Sato, L. Bai, L. Borjigin, Y. Aida // *Viol. J.* – 2020. – V. 17. – P. 1-6.
199. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, *Neospora caninum*, bovine leukemia virus, and bovine viral diarrhea virus infection among dairy cattle and herds in Alberta and agroecological risk factors associated with seropositivity / H.M. Scott, O. Sorensen, J. T. Y. Wu [et al.] // *Can. Vet. J.* – 2006. –V. 47. – P. 981-991.
200. Statistics Canada : [website]. – 2017. – URL: <https://www150.statcan.gc.ca/t1/tbl1/en/tv.action?pid=3210007701> (date of access: 11.01.2023). – Text : electronic.
201. Shaghayegh, A. Detection and identification of Enzootic Bovine Leukosis (EBL) in Calves in Iran / A. Shaghayegh // *Arch. Razi Inst.* – 2019. – V. 74. – P. 321-325.
202. Seroprevalence and molecular characterization of *Brucella* species in naturally infected cattle and sheep / A. Selim, K. Attia, E. Ramadan [et al.] // *Prev. Vet. Med.* – 2019. – V. 171. – P. 104756.
203. Seroprevalence of bovine leukemia virus in cattle, buffalo, and camel in Egypt / A. Selim, M.A. Marawan, A.F.F. Ali [et al.] // *Trop Anim Health Prod.* – 2020. –V.52. – P. 1207-1210.
204. Selim, A. Seroprevalence and molecular characterization of West Nile Virus in Egypt / A. Selim, A. Radwan // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* – 2020. – V. 71. – P. 101473.
205. Selim, A. Seroprevalence and risk factors for *C. burentii* infection in camels in Egypt / A. Selim, A.F. Ali // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* – 2020. –V. 68. – P. 101402.

206. Slovenian Agriculture in Numbers / T. Travnikar, M. Bedrač, S. Bele [et al.] // Ljubljana. – 2019.
207. The hidden cost of bovine leukemia virus on dairy cows / P.C.Bartlett, P. Durst, H. Straub [et al.] // JDS Communications. – 2017. – V. 3. – P. 185-188.
208. The EU Veterinarian / H.Batho, H.J. Bendixen, H. Meyer-Gerbaulet [et al.] // European Commission. –2008.
209. The implication of BLV infection in the productivity, reproductive capacity and survival rate of a dairy cow / J.Brenner, M. Van-Haam, D. Savir, Z. Trainin // Vet. Immunol. Immunopathol. – 1989. –V. 22 (3). –P. 299–305.
210. The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania / J.Acaite, V.Tamosiunas, K. Lukauskas [et al.] // Prev. Vet. Med. – 2007. –V. 82. – P. 83–89.
211. The chemokines CCL2 and CXCL10 produced by bovine endometrial epithelial cells induce migration of bovine B lymphocytes, contributing to transuterine transmission of BLV infection / K.Andoh, A.Nishimori; R. Sakumoto [et al.] // Vet. Microbiol. – 2020. – V. 24. – P.242.
212. The effectiveness of colostrum antibodies for preventing bovine leukemia virus (BLV) infection in vitro / M. Konishi, H. Ishizaki, K.I. Kameyama [et al.] // BMC Vet Res. – 2018. – V. 14. – P. 419.
213. The role of neighboring infected cattle in bovine leukemia virus transmission risk / S. Kobayashi, T. Tsutsui, T. Yamamoto [et al.] // J. Vet. Med. Sci. – 2015. – V. 77. –P. 861-863.
214. The voluntary programme for control and eradication of bovine viral diarrhoea virus infections in Slovenia. In: Petrović T. editors. One health–new challenges, First International Symposium of Veterinary Medicine / I. Toplak, P. Hostnik, D. Rihtarič, J. Grom // Serbia: Novi Sad: Scientific Veterinary Institute, Novi Sad. – 2021. – V. 8. – P. 36-41.
215. Trainin, Z. The direct and indirect economic impacts of bovine leukemia virus infection on dairy cattle / Z. Trainin, J. Brenner // Isr. J. Vet. Med. – 2005. –V. 60. – P. 94-105.

216. Using a herd profile to determine age-specific prevalence of bovine leukemia virus in Michigan dairy herds / R.J.Erskine, P.C. Bartlett, T.M. Byrem [et al.] // *Vet. Med. Int.* – 2012.–V. 20.–P. 12.
217. USDA : [website]. – 2008. – URL: https://www.aphis.usda.gov/sites/default/files/dairy07_is_blv.pdf (date of access: 11.01.2022). – Text : electronic.
218. Virus Taxonomy; Classification and Nomenclature of Viruses / E. Hunter, J. Casey, B. Hahn [et al.] // editors. Academic Press; San Diego, CA, USA. – 2000.–V. 26. –P. 13-32.
219. Visualizing bovine leukemia virus (BLV)-infected cells and measuring BLV proviral loads in the milk of BLV seropositive dams / S. Watanuki, S.N. Takeshima, L. Borjigin [et al.] // *Vet Res.* – 2019. – V. 50 (1). – P. 102.
220. What dairy veterinarians should know about bovine leukemia virus / P. C. Bartlett, R. M. Ladronka, V. J. Ruggiero, H. Hutchinson // *Bov. Pract.* – 2018. –V. 52 (1). – P. 1–7.
221. Walsh, R.B.R.B. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays performed on milk and serum samples for detection of neosporosis and leukosis in lactating dairy cows / R.B.R.B. Walsh // *Can. Vet. J.* – 2013. – V. 54. – P. 347-352.
222. Zyrianova, I.M. Bovine leukemia virus tax gene/Tax protein polymorphism and its relation to Enzootic Bovine Leukosis / I.M. Zyrianova, S.N. Kovalchuk // *Virulence.* – 2020. – V. 11. – P. 80-87.

ПРИЛОЖЕНИЯ

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной и инновационной
работе ФГБОУ ВО Вавиловский
университет

К.Е. Денисов

« 15 » апреля 2024г

Акт**о внедрении НИОКР в производство**

Мы, нижеподписавшиеся, представитель ФГБОУ ВО Вавиловский университет руководитель ВТК Агольцов В.А. с одной стороны и представитель потребителя научно-технической продукции (далее НТП) заместитель министра сельского хозяйства Саратовской области по развитию отрасли животноводства Молчанов А.В. с другой стороны, составили настоящий акт в том, что НТП – «Изучение региональных особенностей эпизоотического процесса при лейкозе крупного рогатого скота и совершенствование общих и специальных противолейкозных мероприятий на территории Саратовской области», соответствует современному уровню достижений науки и технологии и принята к практическому использованию.

НТП представлена потребителю в форме печатного издания: Рекомендации по совершенствованию противолейкозных мероприятий на территории Саратовской области / В.А. Агольцов, О.П. Бирюкова, Л.П. Падило, Е.С. Почепня. – Саратов: ООО «Центр социальных агроинноваций СГАУ», 2022. – 44 с.

Представитель
Вавиловского университета


В.А. Агольцов

Представитель потребителя НТП


А.В. Молчанов



УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной и инновационной
работе ФГБОУ ВО Вавиловский
университет



К.Е. Денисов

«15» апреля 2024г.

Акт

о внедрении НИОКР в производство

Мы, нижеподписавшиеся, представитель ФГБОУ ВО Вавиловский университет руководитель ВТК Агольцов В.А. с одной стороны и представитель потребителя научно-технической продукции (далее НТП) заместитель начальника Управления ветеринарии Правительства Саратовской области Козлов И.Г., с другой стороны, составили настоящий акт в том, что НТП – «Изучение региональных особенностей эпизоотического процесса при лейкозе крупного рогатого скота и совершенствование общих и специальных противолейкозных мероприятий на территории Саратовской области», соответствует современному уровню достижений науки и технологии и принята к практическому использованию.

НТП представлена потребителю в форме печатного издания: Рекомендации по совершенствованию противолейкозных мероприятий на территории Саратовской области / В.А. Агольцов, О.П. Бирюкова, Л.П. Падило, Е.С. Почепня. – Саратов: ООО «Центр социальных агроинноваций СГАУ», 2022. – 44 с.

Представитель
Вавиловского университета


В.А. Агольцов

Представитель потребителя НТП



И.Г. Козлов

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной и инновационной
работе ФГБОУ ВО Вавиловский
университет


К.Е. Денисов

« 15 » сентября 2024г

Акт

о внедрении НИОКР в производство

Мы, нижеподписавшиеся, представитель ФГБОУ ВО Вавиловский университет руководитель ВТК Агольцов В.А. с одной стороны и представитель потребителя научно-технической продукции (далее НТП) руководитель Управления Россельхознадзора по Саратовской и Самарской областям Частов А.А., с другой стороны, составили настоящий акт в том, что НТП – «Изучение региональных особенностей эпизоотического процесса при лейкозе крупного рогатого скота и совершенствование общих и специальных противолейкозных мероприятий на территории Саратовской области», соответствует современному уровню достижений науки и технологии и принята к практическому использованию.

НТП представлена потребителю в форме печатного издания: Рекомендации по совершенствованию противолейкозных мероприятий на территории Саратовской области / В.А. Агольцов, О.П. Бирюкова, Л.П. Падило, Е.С. Почепня. – Саратов: ООО «Центр социальных агроинноваций СГАУ», 2022. – 44 с.

Представитель
Вавиловского университета


В.А. Агольцов

Представитель потребителя НТП


А.А. Частов

