

ПОЧЕПНЯ ЕКАТЕРИНА СЕРГЕЕВНА

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

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Общая характеристика работы

Актуальность темы. На территории Российской Федерации в структуре инфекционной патологии крупного рогатого скота с 1997 года лейкоз занимает лидирующие 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, плохо поддается анализу и контролю как пространственному, так и временному (Карамзина, А.А. и др., 2016; Кузнецова А.Е., 2016; Красникова Е.С., 2017; Русинович А.А. и др., 2020). При оценке риска передачи возбудителей инфекционных болезней при перемещении скота необходим картографический анализ (Notsu K. et al, 2020).

Заболевание наносит значительный экономический ущерб, который связан с нарушением иммунной функции организма больных животных, снижением их репродуктивной эффективности и недополучением молодняка, снижением продуктивности лактирующих коров и значительными потерями качества молока, преждевременной выбраковкой продуктивных животных, а также торговыми ограничениями, налагаемыми на неблагополучный по заболеванию крупный рогатый скот и полученную от него животноводческую продукцию (Красникова Е.С., и др. 2012; Карамзина А.А., и др. 2016; Логинов, С.И., 2020; Русинович А.А. и др., 2020).

В связи с широким распространением в мире, значительным воздействием на здоровье животных и весомыми экономическими последствиями энзоотический лейкоз крупного рогатого скота (международное обозначение лейкоза крупного рогатого скота) включен в перечень болезней World Organisation for Animal Health, (OIE), как болезнь, подлежащая обязательной нотификации (уведомлению международного сообщества) (Карамзина А.А. и др., 2016; Русинович А.А. и др., 2020; Гулюкин М.И. и др., 2021; Пономарева И.С., 2022; Ruggiero V.J. et al., 2019; Selim A. et al., 2020).

Большинство животных, инфицированных возбудителем лейкоза, длительно являются бессимптомными носителями вируса, долгое время не проявляющими никаких клинических признаков, тем самым способствующими дальнейшему скрытому процессу распространения болезни. Кроме того, проведение серологической диагностики в период родов может не отражать правильный инфекционный статус здоровья животного из-за физиологических различий в концентрациях антител (Красникова Е.С. и др., 2014; Карамзина А.А. и др., 2016; Русинович А.А. и др., 2020; Yu C. et al., 2019).

Напряженность эпизоотического процесса лейкоза зависит от многообразия факторов. Для успешной борьбы с лейкозом важно применение ветеринарными специалистами современных методов ранней диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота, создание учёными новых диагностических платформ и внедрение их в производство (Донник И.М., 2012; Карамзина А.А. и др., 2016; Русинович А.А. и др., 2020; Кужебаева У.Ж. и др., 2021).

Степень разработанности темы. Опыт снижения инфицированности крупного рогатого скота вирусом лейкоза без снижения поголовья успешно применяется в Краснодарском крае (Донник И.М. и др., 2021). Предположено

исследованиями, что в период между плановыми диагностическими исследованиями на лейкоз, молоко коров может служить объектом для анализа в классической полимеразно – цепной реакции (ПЦР) (Агольцов В.А. и др., 2012).

В ряде стран широко применяется идентификация гаплотипов рекомбинационным анализом для выявления молекулярных перестроек среди последовательностей вируса лейкоза, для отслеживания путей его распространения (Bartlett P.C. et al, 2019).

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 ПЦР – РВ, циркулирующего на территории Саратовской области.

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 праймеры для идентификации генетического материала вируса лейкоза крупного рогатого скота методом, циркулирующего на территории Саратовской области 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, подтверждено актами о внедрении от 15.04.2024 г.

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, использование ГИС – технологий и подбор 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, иммунологическими, молекулярно-генетическими исследованиями, выполненными на высокотехнологичном 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.

2. Использование для исследования в РИД и ПЦР-РВ молока позволяют выявлять инфицированных вирусом лейкоза коров.

3. Подобранные последовательности праймеров для идентификации генетического материала вируса лейкоза крупного рогатого скота можно использовать при конструировании диагностикумов для постановки ПЦР – РВ.

Работа выполнена на кафедре «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения 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», ФГБОУ ВО Вавиловский университет (Саратов, 2023); Международная научно – практическая конференция «Молодые учёные науке и практике АПК» Витебская ордена «Знак почёта» академия ветеринарной медицины (Витебск, 2024); Международной научно – практической конференции «Инновации, современные тенденции развития животноводства и зоотехнической методы, технологии, экологическая безопасность производства и переработки сельскохозяйственной продукции», Саратов, 24–25 апреля 2024 года.

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.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

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. Проводились расчеты коэффициента очаговости (КО), индекса эпизоотичности (ИЭ), степени распространения болезни (К), коэффициента напряженности эпизоотической ситуации (W) (Джупин С.И., 2004).

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 (Коренной Ф.И. и др., 2010).

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.

Исследования проб сыворотки крови на лейкоз в РИД проводили по стандартной общепризнанной методике (КонсорциумКОДЕКС, 1991).

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.

Выделение нуклеиновых кислот из крови и молока осуществляли методом нуклеосорбции на силикогеле, как наиболее эффективным для исследования данного биоматериала (Агольцов В.А. и др., 2012).

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» (Интерлабсервис, 2002).

Создание олигонуклеотидных праймеров для выявления РНК вируса энзоотического лейкоза крупного рогатого скота методом ПЦР – РВ 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 (Интерлабсервис, 2002).

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 – полимеразы (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' – GGGCACTGGCTTAGTGGGAAT – 3'; обратный праймер (R) 5' – TGCAACAGGGCGTAAAAAGC – 3'. Учет результатов реакции осуществлялся на экране монитора компьютера в виде графика интенсивности сигнала флуоресценции.

Аmplификацию 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 обрабатывались методами вариационной статистики с использованием сервисных программ и статистических функций программы Microsoft Excel с определением критерия достоверности по Стьюденту (Статистический анализ, 2015).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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.

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

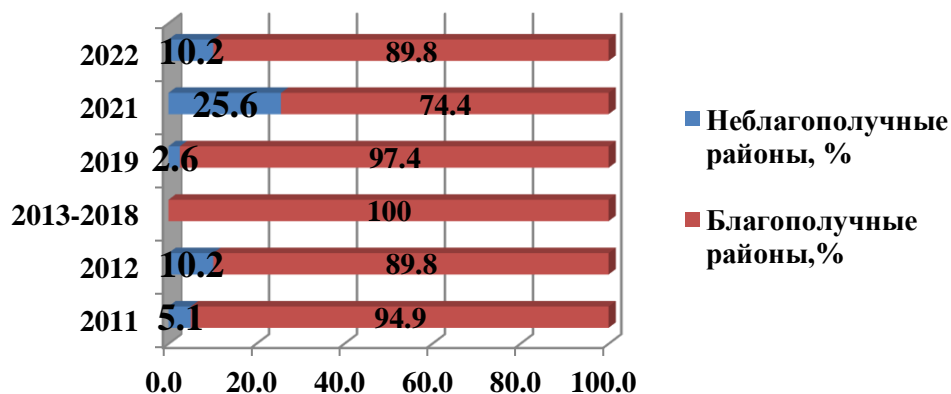


Рисунок 1 – Структура неблагополучия муниципальных районов Саратовской области по новым случаям лейкоза крупного рогатого скота за период 2011-2022 гг.

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

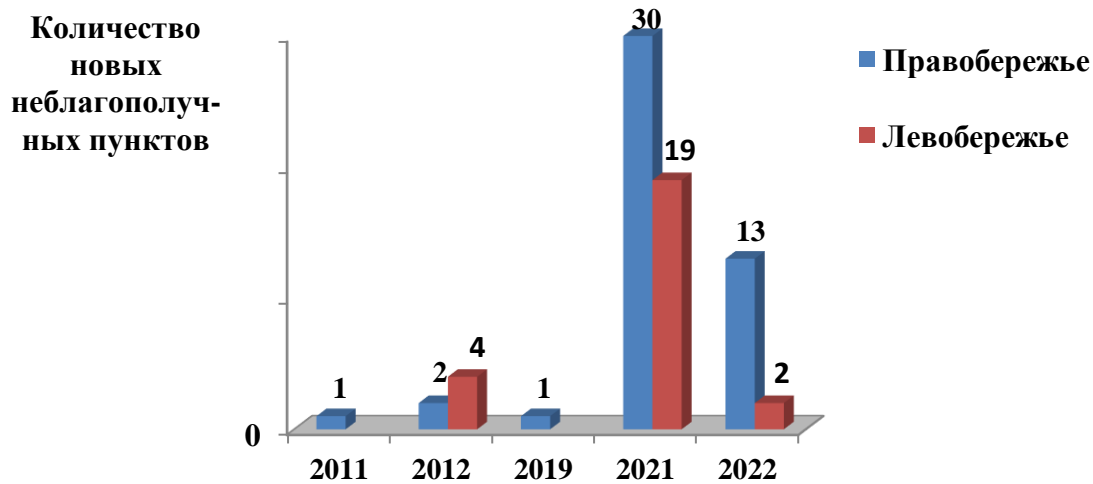


Рисунок 2 – Динамика эпизоотического процесса при лейкозе крупного рогатого скота в условиях право – и левобережных зон Саратовской области за период 2011-2022 гг.

Вовлеченность мелких и средних хозяйств в эпизоотический процесс во многом обусловлена их наибольшим удельным весом в структуре распределения поголовья крупного рогатого скота (Рисунок 3).

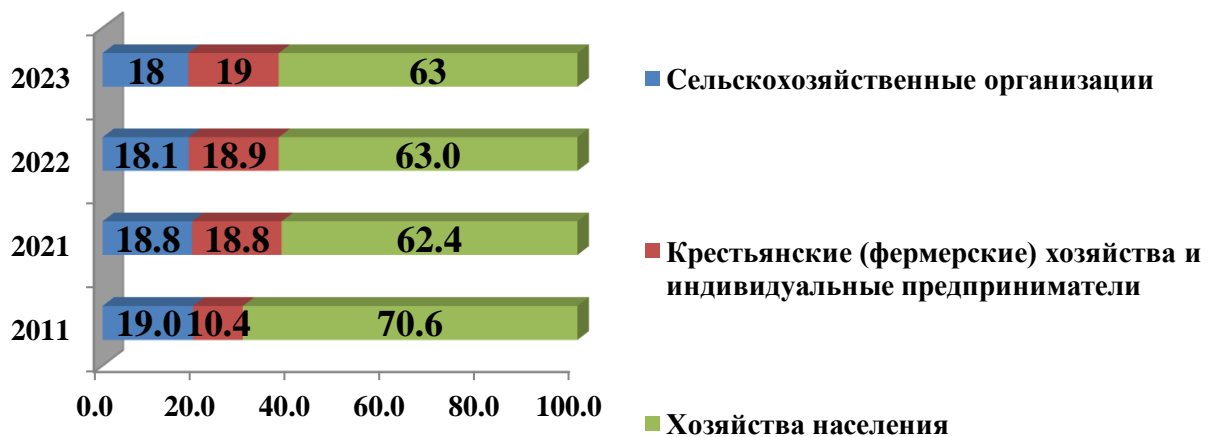


Рисунок 3 – Структура поголовья крупного рогатого скота по категориям хозяйств

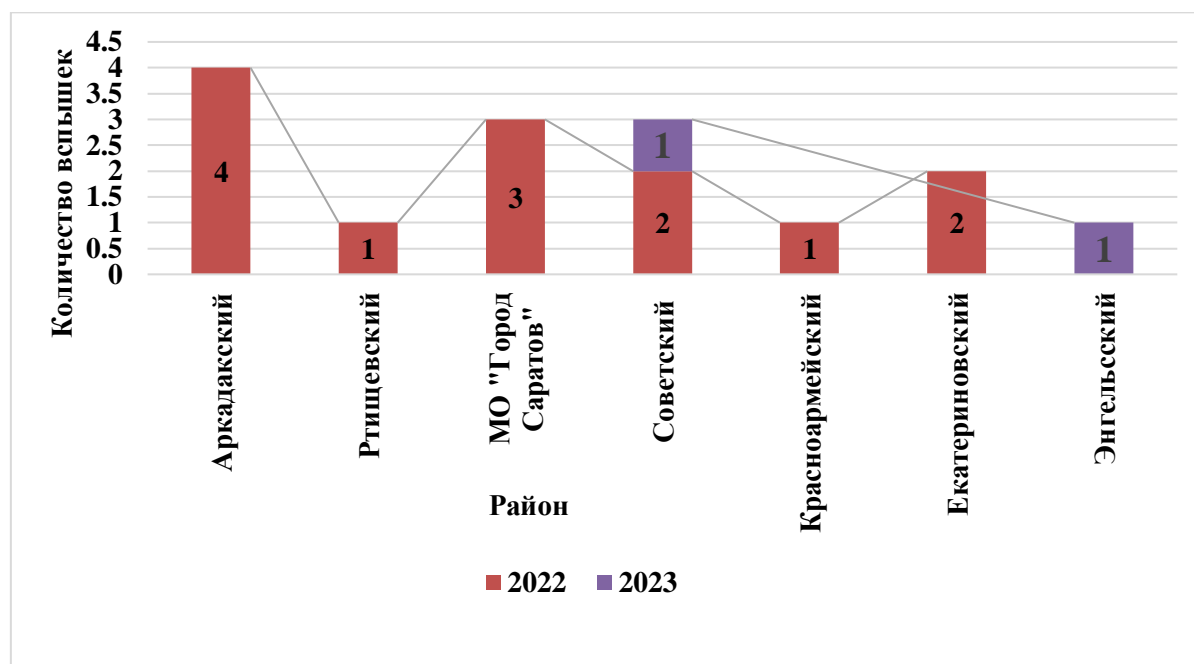


Рисунок 4 – Количество вспышек лейкоза крупного рогатого скота в районах Саратовской области за 2022-2023 гг.

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 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, в 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.

Пространственно – временной анализ возникновения очагов лейкоза крупного рогатого скота в 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 появилось еще два неблагополучных пункта.

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

Ситуация значительно ухудшилась в 2021 году, когда на территории Саратовской области было зарегистрировано 49 новых неблагополучных по вирусу лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) пунктов. Их распределение было достаточно закономерно. 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).

В 2022 году эпизоотическая обстановка значительно улучшилась (Рисунок 7). 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.

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.

Картографический анализ эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота на территории саратовской области

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.

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

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). С 2011 по 2019 гг. случаи возникновения ВЛКРС в Саратовской области носили единичный характер. Эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в Саратовской области с 2011 по 2022 гг. представлена на рисунках 5-7.

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 появилось еще два неблагополучных пункта.

В 2019 году в Саратовской области был зафиксирован только один новый пункт неблагополучия по лейкозу, который располагался в Аркадакском районе (Рисунок 5).

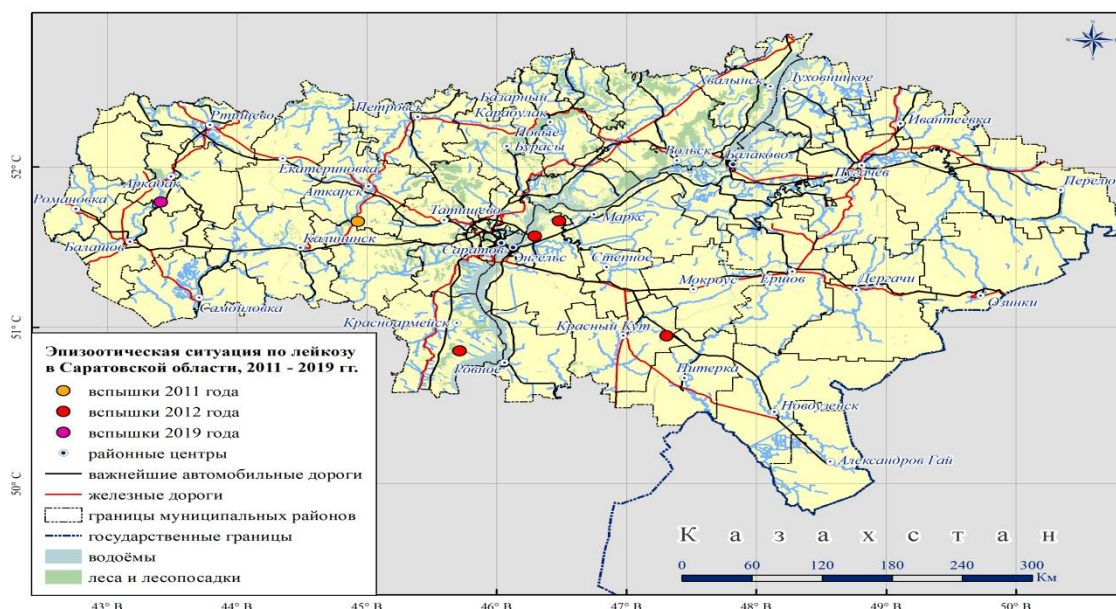


Рисунок 5 – Распределение новых неблагополучных пунктов по лейкозу крупного рогатого скота на территории Саратовской области, 2011-2019 гг.

В ретроспективе 2011-2022 гг. за последние два года зарегистрировано максимальное количество новых очагов инфекции. Ситуация значительно ухудшилась в 2021 году, когда на территории Саратовской области было зарегистрировано 49 новых неблагополучных по ВЛКРС пунктов (Рисунок 6). Их распределение было достаточно закономерно. 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, Новобурасском – 1, Балаковском – 3, Энгельском – 5, Ровенском – 8 и Краснопартизанском – 3) (Рисунок 6).

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 24.03.2021г.).

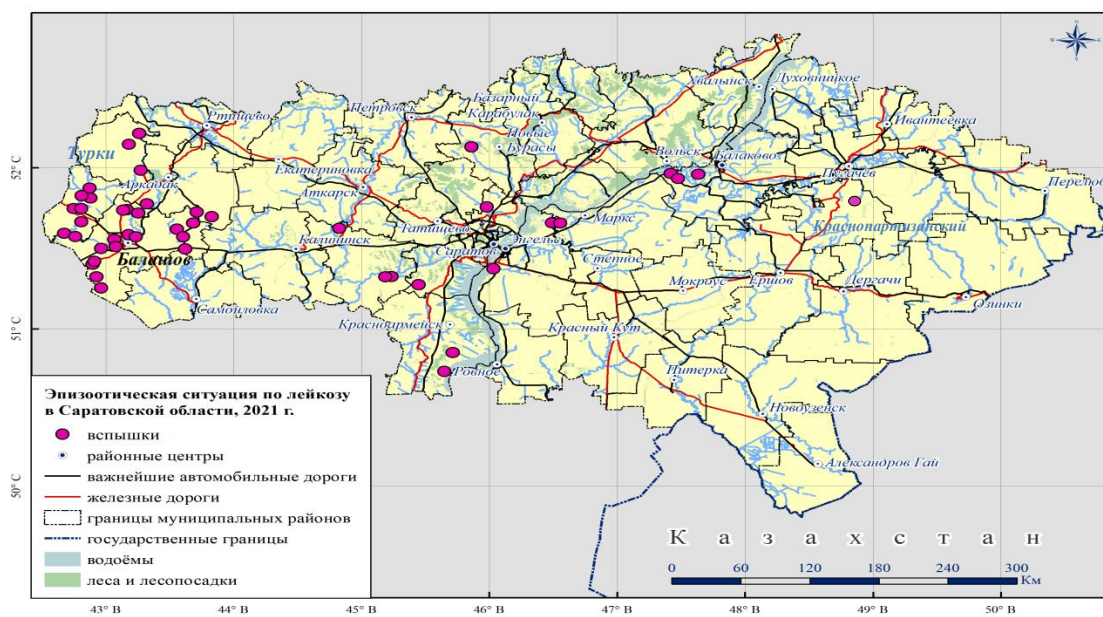


Рисунок 6 – Распределение новых неблагополучных пунктов по лейкозу крупного рогатого скота на территории Саратовской области, 2021 г.

В 2022 году эпизоотическая обстановка значительно улучшилась. 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 7).

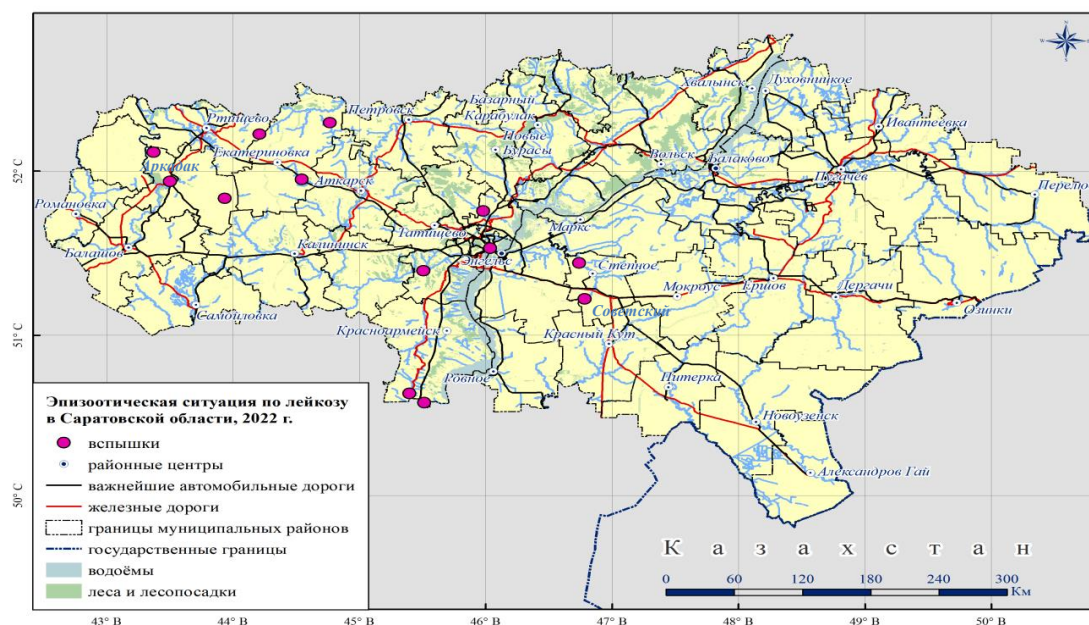


Рисунок 7 – Распределение новых неблагополучных пунктов по лейкозу крупного рогатого скота на территории Саратовской области, 2022 г.

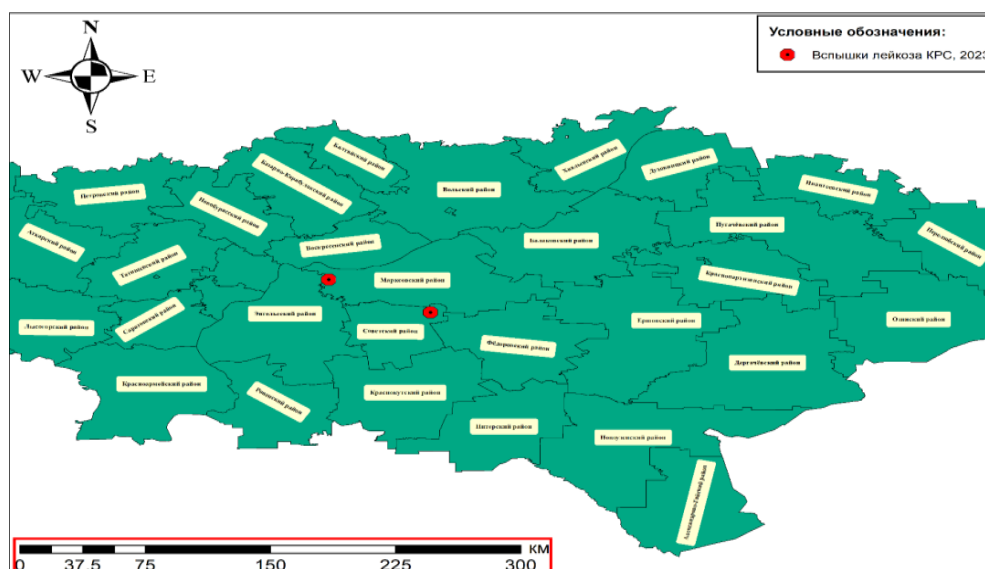


Рисунок 8 – Эпизоотические очаги лейкоза КРС в Саратовской области, выявленные в 2023 г.

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

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. 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.

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.

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 год, а в неблагополучных хозяйствах исследуют каждые 6 месяца. Длительные сроки без исследования способствуют распространению вируса среди здорового поголовья.

Для определения диагностической ценности РИД и ПЦР коллективом авторов совместно с ветеринарными врачами ОГУ «Красноармейская районная ветеринарная лаборатория СББЖ» 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.

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

Таблица 1 – Результаты скрининговых исследований крови в РИД и ПЦР

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

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

Результаты РИД и ПЦР исследований сыворотки крови показали, что диагностическая ценность ПЦР 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 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 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 признано 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 на наличие провируса лейкоза положительный результат был получен в 154 пробах (Таблица 2).

Таблица 2 – Результаты скрининговых исследований молока в РИД и ПЦР

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

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

Ряд регионов РФ, в том числе и Саратовская область, являются неблагополучными по лейкозу крупного рогатого скота (КРС). Поголовье КРС составляет 432,4 тыс. голов, а количество вирусоносителей 476 голов: $432\,400 - 476 = 431\,924$ голов, клинически здоровых. Для расчета коэффициента исследований для благополучных по лейкозу хозяйств цифровые значения вводили в формулу: $K = (44(1) + 6(1) + 19(1) + 31(1) + 35(1))/100 = 1,350$. При коэффициенте исследований КРС на лейкоз в РИД в благополучных хозяйствах области в 2023 г. составил 1,350 при среднегодовом поголовье КРС в благополучных хозяйствах области – 431 924 тыс. голов, а, следовательно, необходимо проведение 583 097,4 исследований ($431\,924 * 1,350 = 583\,097,4$). При расчёте количества исследований в неблагополучных хозяйствах необходимо применять коэффициент – 4,080, так как среднегодовое количество КРС в неблагополучных хозяйствах области – 476 голов, то, следовательно: $476 * 4,080 = 1\,942,08$ тыс. исследований. Для определения потребности количества средств диагностики, предназначенных для лабораторных исследований, применяют формулу: $V = K/(B * C) * (1 + c)$, 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) Плановое обследование поголовья методом РИД составляет 585 036,48 исследований, при этом количество исследований в благополучных пунктах – 583 097,4 и количество исследований в неблагополучных пунктах – 1 942,08. $V = K/(B * C) * (1 + c) = (585\,036,48)/(1000 * 0,85) * (1 + 0,1) = 757,13$ набора; б) Плановое обследование поголовья на лейкоз методом ИФА составляет 300 исследований, один набор рассчитан на проведение 176 исследований; $V = K/(B * C) * (1 + c) = 300/(176 * 0,85) * (1 + 0,1) = 3$ набора; в) Плановое обследование поголовья КРС на лейкоз методом ИФА с контрольным отрицательным антигеном составляет 100 исследований. Один набор рассчитан на проведение 88 исследований, соответственно, для исследования 100 проб необходимо: $V = K/(B * C) * (1 + c) = 100/(88 * 0,85) * (1 + 0,1) = 2$ набора.

Подбор олигонуклеотидных праймеров для идентификации генетического материала вируса лейкоза крупного рогатого скота полимеразно – цепной реакцией

Для сокращения времени проведения массовых исследований проб на наличие генома вируса энзоотического лейкоза крупного рогатого скота необходимы олигонуклеотидные праймеров для выявления РНК вируса полимеразно – цепной реакцией.

Сущность нашего изобретения состоит в том, что при помощи 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.

Способ осуществляли 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 – полимеразы (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 флуоресценции.

3. Амплификацию 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 повторяли 35 раз по каналам HEX (yellow) и по каналу FAM (green) Температурно – временной режим проведения ПЦР в режиме реального времени представлен в таблице 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				
ен	Праймер	Позиция в геноме	Длина фрагмента п.о.	Последовательность праймера (5' → 3')
nv	F	6198 – 6217	20	5' – GGGCACTGGCTTAGTGGAAT – 3'
	R	6606 – 6587		5' – TGCAACAGGGCGTAAAAAGC – 3'

Детекцию исследуемых образцов, с использованием разработанных нами олигонуклеотидов осуществляли на амплификаторе «CFX 96 Bio – Rad (США)».

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 9).

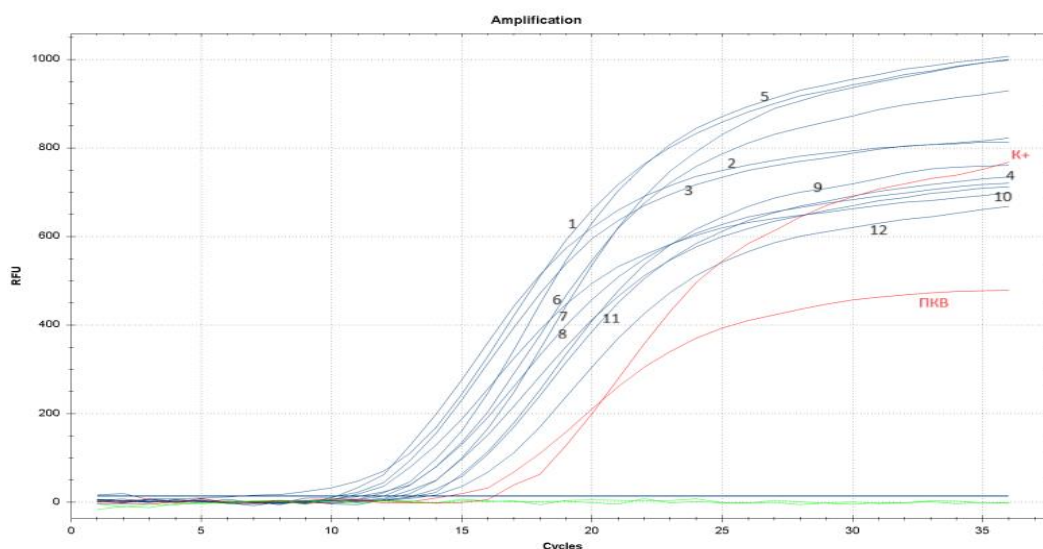


Рисунок 9 – Накопления флуоресцентного сигнала по каждому из образцов каналов

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

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.

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 хозяйств 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 представляется возможным установления активности проявления вспышки инфекции, путей её распространения, а в целом возможность проведения оценки эффективности проводимых оздоровительных мероприятий. 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.

Заключение

Эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота с трудом поддается пространственному и временному анализу. Сложившаяся ситуация на территории Саратовской области 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.

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.

Для ликвидации лейкоза следует использовать, как серологический метод (РИД), так молекулярную диагностику (ПЦР). Использование ПЦР позволяет выявлять инфицированный ВЛКРС более полно и значительно раньше.

Создание олигонуклеотидных праймеров для выявления РНК вируса энзоотического лейкоза крупного рогатого скота ПЦР значительно сокращает время для проведения массовых исследований проб биоматериала на наличие генома вируса энзоотического лейкоза КРС и удешевляет стоимость проведения исследования.

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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК
Минобрнауки России:*

1. Результаты сравнительных диагностических исследований крови и молока на лейкоз, с использованием РИД и ПЦР / С. В. Ларионов, **Е. С. Почепня**, В. А. Агольцов, О.Ю. Черных, О.П. Бирюкова, Л.П. Падило // Научная жизнь. – 2023. – Т. 18, № 5 (131). – С. 812-818.
2. Анализ эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в хозяйствах Саратовской области / В. А. Агольцов, О. П. Бирюкова, **Е. С. Почепня**, Л.П. Падило, О.М. Попова, А.К. Сибгатуллова // Научная жизнь. – 2023. – Т. 18, № 6 (132). – С. 930-939.
3. Картографический анализ эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота на территории Саратовской области / В. А. Агольцов, О. П. Бирюкова, **Е. С. Почепня**, Л.П. Падило, О.М. Попова, А.К. Сибгатуллова // Научная жизнь. – 2023. – Т. 18, № 6 (132). – С. 940-949.
4. Применение интенсивных и экстенсивных эпизоотологических показателей для ретроспективного анализа лейкоза крупного рогатого скота / В. А. Агольцов, **Е. С. Почепня**, О. П. Бирюкова, Л.П. Падило, О.М. Попова, А.К. Сибгатуллова // Научная жизнь. – 2024. – Т. 19, № 1(133). – С. 123-134.
5. Анализ распространения лейкоза крупного рогатого скота в Саратовской области / О.П. Бирюкова, В.А Агольцов, **Е.С Почепня**, Л.П. Падило, М.И. Калабеков // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2024. – Т. 258, № 2. – С. 20-25.
6. Расчёт годовых затрат на проведение лабораторных исследований сыворотки крови крупного рогатого скота на лейкоз (на примере Саратовской области) / **Е.С. Почепня**, О.П. Бирюкова, В.А. Агольцов, С. В. Ларионов, Л.П. Падило // Научная жизнь. – 2024. – Т. 19, № 1(133). – С. 232-234.
7. 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.

Публикации в сборниках и материалах конференций:

8. **Почепня, Е.С.** Анализ эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в хозяйствах Саратовской области / **Е.С. Почепня**, О.П. Бирюкова, В.А. Агольцов // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий: Материалы Международной научно – практической конференции, Саратов, 14–16 февраля 2023 года. – Саратов: Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова. – 2023. – С. 64-68.

9. Результаты сравнительных диагностических исследований крови и молока на лейкоз, с использованием РИД и ПЦР / В.А. Агольцов, О.П. Бирюкова, Л.П. Падило, **Е.С. Почепня**. – «Молодые ученые – науке и практике АПК»: Материалы Международной научно – практической конференции молодых ученых, Витебск, 25-26 апреля 2024 года. – Витебск: УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины. – 2024. – С. 376-379.