*На правах рукописи*

Бабошко Дмитрий Алексеевич

# ВСТРЕЧАЕМОСТЬ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В РЕСПУБЛИКЕ ДАГЕСТАН И НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

1.5.10. Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2026

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

| | |
|---|---|
| **Научный руководитель:** | **Гашникова Наталья Матвеевна,** кандидат биологических наук, и.о. заведующего отделом ретровирусов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора |
| **Официальные оппоненты:** | **Петропавловский Максим Валерьевич,** доктор ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник Уральского научно-исследовательского ветеринарного института структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук». |
| | **Алексеев Александр Юрьевич,** кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории экспериментальной биологии патогенных микроорганизмов Научно-исследовательский институт вирусологии, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины». |
| **Ведущая организация:** | Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук. |

Защита состоится «30» октября 2026 г. в 11:00 на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, тел. (383) 363-47-10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора http://www.vector.nsc.ru

Автореферат разослан «  » _____ 20___ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук,
доцент Т.Н. Ильичева

# ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.** Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота (ЭЛКРС) – хроническое лимфопролиферативное заболевание вирусной природы, вызываемое вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) – ретровирусом рода Deltaretrovirus, поражающим преимущественно В-лимфоциты и формирующим пожизненную персистенцию провирусной ДНК в геноме клеток хозяина. Большинство инфицированных животных длительно остаются субклиническими носителями, примерно в 30% случаев у КРС старше трёх лет развивается персистентный лимфоцитоз, а у 2–5% – злокачественные лимфосаркомы с летальным исходом.

Экономический ущерб от ЭЛКРС проявляется уже на субклинических стадиях: у ВЛКРС-положительных животных отмечаются снижение удоя на 2,5–2,7%, снижение коэффициента оплодотворения около 7%, рост выбраковки и восприимчивости к инфекционным заболеваниям, а также угнетение вакцинационного ответа. Вирус передаётся горизонтально – контактно, ятрогенно и вертикально – внутриутробно и через молозиво/молоко, особенно при высокой провирусной нагрузке (HPVL) у коровы.

В России ЭЛКРС занимает первое место среди причин смертности КРС: около 7% поголовья (924 тысячи из 15,5 миллионов животных) инфицированы ВЛКРС, а число неблагополучных пунктов в отдельных субъектах исчисляется сотнями. Глобально ВЛКРС представлен 12 генотипами (G1–G12), в России преобладают генотипы G4 и G7, зафиксирована также циркуляция G1 и G8. Стандартом генотипирования и филогенетического анализа служит область гена env-gp51, сочетающая высокую вариабельность с достаточной консервативностью для надёжного выравнивания последовательностей.

Вместе с тем в России представлена лишь ограниченная информация о циркулирующих вариантах ВЛКРС, а актуальные данные об их молекулярно-генетических особенностях и филогенетических связях практически отсутствуют. Дефицит таких данных снижает эффективность молекулярной диагностики, затрудняет разработку вакцинных препаратов и ограничивает возможности эпизоотологического мониторинга и контроля распространения инфекции. Дополнительную актуальность исследованию придаёт дискуссия о потенциальной зоонозной опасности ВЛКРС, в литературе описана ассоциация фрагментов генома вируса с онкологическими и предраковыми изменениями тканей молочной железы у женщин, что не исключает онкогенного потенциала ВЛКРС для человека.

Для изучения генетического разнообразия ВЛКРС были выбраны две географически и структурно контрастные территории – Новосибирская область и Республика Дагестан. Новосибирская область – крупнейший животноводческий

регион Сибири с преобладанием промышленного КРС (351,8 тыс. голов на конец 2024 г.) и высокой интенсивностью технологических контактов между животными. Республика Дагестан занимает первое место в России по поголовью КРС (914,3 тыс. голов по итогам 2025 г.), при этом около 78% животных содержится в личных подсобных и крестьянско-фермерских хозяйствах, что формирует принципиально иные условия поддержания и передачи инфекции. Таким образом, сочетание данных регионов обеспечивает необходимую географическую и структурную репрезентативность для характеристики генетического разнообразия ВЛКРС, циркулирующего на территории Российской Федерации.

Генотипирование ВЛКРС методом ПЦР в сочетании с количественной оценкой провирусной нагрузки обеспечивает максимальную информативность для трассировки источников заноса инфекции, оптимизации диагностических панелей, приоритизации ВЛКРС-положительных животных к изоляции или выбраковке и оценки эффективности мер биобезопасности. Всё вышесказанное определяет актуальность настоящего исследования.

**Цель исследования** – изучить особенности географического распределения, генетическое разнообразие и эволюционные связи вариантов ВЛКРС, циркулирующих на отдельных территориях России.

**Задачи исследования:**

1. Провести анализ пораженности скота ВЛКРС в частных подворьях и крупных хозяйствах Новосибирской области и Республике Дагестан;
2. Изучить представленность геновариантов и охарактеризовать генетическое разнообразие циркулирующих вариантов ВЛКРС в Новосибирской области и Республике Дагестан;
3. Изучить филогенетические отношения ВЛКРС внутри хозяйств, отдельных территорий и между регионами России;
4. Для изученных геновариантов ВЛКРС описать особенности нуклеотидных/аминокислотных последовательностей фрагмента гена env-gp51, являющегося критической мишенью для нейтрализующих антител;
5. Описать структуру и особенности аминокислотных последовательностей расшифрованных полных геномов российских геновариантов ВЛКРС G4 и G7;
6. На основе созданной базы данных нуклеотидных последовательностей ВЛКРС разработать лабораторные тесты на основе ПЦР для диагностики ВЛКРС и оценки провирусной нагрузки;
7. На основе данных, полученных при проведении мониторинга ВЛКРС в хозяйствах различных типов, разработать практические рекомендации по ключевым мероприятиям по контролю и элиминации инфекции.

**Научная новизна.** Комплексное молекулярно-генетическое исследование, проведённое в период с 2020 по 2025 г., позволило получить новые данные о генетическом разнообразии ВЛКРС, циркулирующего на территориях Новосибирской области и Республики Дагестан. Установлено доминирование генотипа G4 при значительном вкладе генотипа G7 в структуру популяции вируса среди молочного скота, а также выявлено их неравномерное географическое распределение по хозяйствам регионов. В международную базу данных GenBank депонировано 417 новых последовательностей env ВЛКРС, что вдвое расширило объём депонированных российских последовательностей.

Впервые на основании анализа 547 нуклеотидных последовательностей гена env–gp51 ВЛКРС, выделенных от инфицированных животных Новосибирской области и Республики Дагестан, проведено филогенетическое исследование популяции вируса и описаны внутригенотипические филогенетические связи генотипов вируса G4 и G7. Впервые с использованием методов Maximum Likelihood, Median Joining Network и SplitNetwork проанализированы 154 полногеномные последовательности ВЛКРС, что позволило получить новые знания о встречаемости ВЛКРС в России.

Впервые на основании анализа полных геномов охарактеризованы мутации во всех основных генах вируса (gag, pro, pol, env, tax/rex, R3, G4) и функционально аннотированы мутации, специфичные для генотипов G4 и G7, в том числе в рецептор-связывающем домене (RBD), нейтрализующих детерминантах (ND1–ND3), эпитопах $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток гликопротеина gp51, домене активации белка Tax (LAD), а также в областях R3/G4 рамки считывания pX. Впервые проведено сравнительное определение провирусной нагрузки (PVL) ВЛКРС генотипов G4 и G7 в различных возрастных группах КРС на территории РФ, установлена достоверно более высокая провирусная нагрузка у животных, инфицированных генотипом G4, по сравнению с инфицированными генотипом G7.

**Теоретическая и практическая значимость.** Результаты, полученные в ходе выполнения настоящего исследования, существенно дополняют имеющуюся информацию о молекулярно – генетических особенностях вируса лейкоза крупного рогатого скота на территориях Российской Федерации и расширяют представления мирового научного сообщества о генетическом разнообразии ВЛКРС генотипов G4 и G7, включая их мутационные профили, рекомбинационный потенциал и различия в уровне провирусной нагрузки.

В практике ветеринарной службы на основе результатов генотипирования была разработана и внедрена стратегия поэтапного формирования ВЛКРС–свободного стада, включающая разделение поголовья по статусу инфицирования с

двойным тестированием молодняка в 3 месяца и 6 месяцев и систематический мониторинг методом ПЦР в реальном времени.

Разработан и апробирован метод на основе цифровой ПЦР (цПЦР) с использованием праймеров к генам pol ВЛКРС (полимеразный ген вируса лейкоза крупного рогатого скота) и DRA (BoLA-DRA, ген α-цепи молекул главного комплекса гистосовместимости класса II у крупного рогатого скота) для одновременного определения провирусной нагрузки ВЛКРС генотипов G4 и G7 с нормализацией по числу клеток хозяина, продемонстрировавший аналитическую чувствительность (Limit of Detection (LoD) – предел обнаружения 7 копии; Limit of Quantitation (LoQ) – предел количественного определения 10 копий, Limit of Blank (LoB) – предел холостого опыта 5 копий), превосходящую таковую у стандартных методов ПЦР–РВ и гнездовую–ПЦР. Данная система может быть рекомендована для использования в ветеринарных лабораториях для мониторинга провирусной нагрузки и оценки эффективности оздоровительных мероприятий.

Разработанная система цПЦР может быть использована для поиска генетических маркеров ВЛКРС в образцах лейкоцитарной массы, образцах биопсии и аутопсии с целью подтверждения взаимосвязи их выявления и онкологических заболеваний у человека.

В ходе исследования были расшифрованы и проанализированы 634 нуклеотидных последовательности фрагментов гена env (804 п.н.) ВЛКРС и 154 полногеномные нуклеотидные последовательности ВЛКРС (кодирующих областей gag, pro, pol, env, pX, 8214 п.н.). Полученные нуклеотидные последовательности в количестве 417 штук депонированы в международную базу данных GenBank (NCBI), что обеспечивает их доступность для мирового научного сообщества и расширяет базу референсных последовательностей ВЛКРС генотипов G4 и G7, циркулирующих на территориях Российской Федерации.

**Методология и методы исследования.** Для выполнения диссертационной работы методологическая основа была спланирована в соответствии с поставленными для достижения цели задачами исследования. В работе применялись современные молекулярно-биологические и вирусологические методы, выделение ДНК из лимфоцитов, амплификация нуклеиновых кислот в ПЦР, очистка ДНК, определение первичной структуры ДНК методом Сэнгера, определение первичной структуры ДНК полного генома ВЛКРС с использованием технологий NGS. Для диагностики ВЛКРС были использованы ПЦР с регистрацией результата в режиме реального времени и методы цифровой ПЦР. Полученные данные были проанализированы с использованием современных биоинформатических методов, множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей, филогенетический, рекомбинационный, мутационный и

статистический анализы. Визуализация данных была выполнена с использованием современных программ (таких как MEGA11, Jalview, SplitsTree и других).

**Основные положения, выносимые на защиту**

1. В Новосибирской области и Республике Дагестан существуют стада КРС с высокой долей инфицированных ВЛКРС животных и одновременно сохраняющиеся внутри этих же территорий серологически и молекулярно-генетически благополучные группы скота. Это свидетельствует об активной внутрихозяйственной передаче инфекции и указывает на необходимость внедрения целевых программ мониторинга и контроля ЭЛКРС в регионе.

2. Популяция циркулирующих ВЛКРС в хозяйствах Новосибирской области и Республики Дагестан в 2020–2025 годах является генетически неоднородной с доминированием генотипа G4 и существенной долей генотипа G7. Встречаемость в регионах России вариантов ВЛКРС характеризуются различиями не только на уровне отдельных генотипов вируса, но и внутри одного генотипа, что имеет принципиальное значение для разработки актуальных диагностических тестов, основанных на методе ПЦР. Описанные филогенетические отношения ВЛКРС позволяют установить связи циркулирующих в России геновариантов ВЛКРС и могут быть использованы для трассировки источников распространения инфекции.

3. Различия по спектру нуклеотидных и аминокислотных замен в гене env, включая области белка gp51, ассоциированные с рецепторным связыванием, нейтрализующими и Т-клеточными эпитопами, между генотипами ВЛКРС G4 и G7 отражают генотип-специфические особенности антигенной организации и молекулярной эволюции вируса под селективным давлением иммунной системы хозяина, а совокупность выявленных структурных и регуляторных молекулярно-генетических отличий уточняет представления об эволюции, патогенетическом потенциале и адаптационных возможностях этих генотипов.

4. Цифровая ПЦР обладает более высокой аналитической чувствительностью и воспроизводимостью при количественной оценке провирусной нагрузки ВЛКРС по сравнению с ПЦР в реальном времени и гнездовой ПЦР, особенно при низком содержании провируса, что обосновывает её применение не только для совершенствования противоэпизоотических мероприятий, но и для вирусологических исследований ВЛКРС, изучения особенностей биологии отдельных геновариантов вируса, оценки репродукции ВЛКРС в клетках и поиска связей ВЛКРС с развитием онкологии у человека.

5. Более высокая провирусная нагрузка животных, инфицированных ВЛКРС генотипа G4 по сравнению с инфицированными генотипом G7, позволяет рассматривать генотипическую принадлежность ВЛКРС как один из факторов,

определяющих интенсивность вирусной персистенции и эпизоотологический риск инфицированных животных.

6. Результаты внедрения молекулярно-генетического скрининга телят в систему противоэпизоотических мероприятий в ООО «Раздольное» демонстрируют эффективность этого подхода для поэтапного формирования стада, свободного от ВЛКРС, в условиях крупного молочного хозяйства.

**Соответствие паспорту научной специальности.** Диссертация отвечает требованиям, предъявляемым к научной специальности 1.5.10 «Вирусология» (биологические науки). Её содержание соответствует пунктам 4, 8 и 10 паспорта специальности.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность полученных результатов проведенного автором исследования обусловлена репрезентативным объемом выборки, а также использованием современных молекулярно–биологических, биоинформатических и статистических методов исследования. Надежность и валидность полученных результатов была обеспечена величиной уровня значимости не более 0,05 (5,0%). Сравнение пропорций между группами выполняли с применением критерия $\chi^2$ Пирсона или точного критерия Фишера при малых ожидаемых частотах.

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на 3 конференциях и конгрессах различного уровня: Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio 2022» (27–30 сентября, Кольцово); Международная конференция «Ломоносов 2023» (10–21 апреля, Москва); XXV международная конференция с элементами научной школы молодых ученых «Влияние изменения климата на биологическое разнообразие и распространение вирусных инфекций в Черноморско–Каспийском регионе» (2–4 ноября 2023, Махачкала).

**Декларация личного участия автора.** Основная часть теоретической и экспериментальной работы выполнена лично автором, в том числе проведён анализ литературы, изучена степень разработанности проблемы с определением цели, задач и дизайна исследования, выполнены выделение провирусной ДНК из клеток крови, реакции гнездовой ПЦР, ПЦР в реальном времени и цифровой ПЦР, очистка продуктов амплификации, электрофоретическая детекция, расшифровка нуклеотидных последовательностей методом Сэнгера и технологией NGS, осуществлено депонирование нуклеотидных последовательностей в базу данных GenBank, проведены филогенетический, медианного объединения, рекомбинационный и мутационный анализы, выполнено написание разделов обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение и заключение, а также статистическая обработка полученных данных. Суммарное личное участие автора

в работе составило не менее восьмидесяти процентов. Работа выполнена в 2020–2026 гг. под руководством заведующей отделом ретровирусов, к.б.н. Н.М. Гашниковой.

При участии автора проводилась разработка структур специфических олигонуклеотидных праймеров для ПЦР совместно с сотрудником отдела ретровирусов А.В. Тотмениным. Загрузка образцов и прогон реакций на секвенирующем оборудовании осуществлялись сотрудниками отдела геномных исследований Б.С. Малышевым и Т.В. Трегубчак. Забор образцов крови у крупного рогатого скота, а также сбор эпидемиологических и зоотехнических характеристик на территории Республики Дагестан проводились сотрудниками Комитета ветеринарии РД и Дагестанского государственного университета, а на территории Новосибирской области – при поддержке Управления ветеринарии Новосибирской области совместно с работниками агрохолдинга ООО «Раздольное».

**Публикации.** По теме диссертационной работы опубликовано 16 научных публикаций в отечественных и зарубежных изданиях, из которых 3 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для защиты диссертации по специальности 1.5.10 Вирусология, 2 статьи в других рецензируемых журналах и 11 тезисов, докладов на всероссийских и международных конференциях.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, раздела материалы и методы, собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы и двух приложений. Работа изложена на 222 страницах, иллюстрирована 21 рисунком, содержит 20 таблиц и 2 приложения. Библиографический указатель содержит 243 источника отечественных и зарубежных авторов.

## СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

**Обзор литературы.** Обзор литературы включает в себя характеристику вируса лейкоза крупного рогатого скота и вызываемый им лейкоз: описаны структура вириона и генома, функции белков, патогенез и молекулярные механизмы онкогенеза. Приведены сведения о глобальной встречаемости и генетическом разнообразии ВЛКРС, описаны 12 генотипов и их генотип-специфичные аминокислотные особенности. Проанализированы современные методы диагностики (РИД, ИФА, различные форматы ПЦР, цифровая ПЦР), стратегии контроля инфекции и состояние разработки вакцин. Отдельное внимание уделено дискуссионной роли ВЛКРС как потенциального фактора возникновения рака молочной железы у человека. В заключении обобщены современные представления о вирусе и обоснована актуальность дальнейших исследований.

**Материалы и методы исследования.** В разделе приводится подробное описание использованных в работе материалов (коммерческих наборов, оборудования, образцов крови крупного рогатого скота и олигонуклеотидных проб) и методов, включая выделение геномной ДНК, гнездовую ПЦР, электрофорез в агарозном геле, определение первичной структуры ДНК методом Сэнгеру, высокопроизводительное секвенирование (NGS), ПЦР в реальном времени, цифровую ПЦР, филогенетический анализ и анализ точечных мутаций.

**Результаты и их обсуждение.**

**Встречаемость и генетическое разнообразие ВЛКРС в Новосибирской области.** На начальном этапе исследования проведён скрининг КРС в хозяйствах Коченевского района Новосибирской области. Одномоментно собрано 317 образцов крови: 200 – из крупного мясомолочного хозяйства ООО «Раздольное» и 117 – от животных индивидуальных хозяйств пяти населённых пунктов (Коченёво, Шагалово, Казаково, Прокудское, Светлый). ДНК провируса ВЛКРС обнаружена в 60,3% образцов (191/317). Поражённость в ООО «Раздольное» (71,5%; 143/200) была статистически значимо выше, чем в совокупности частных подворий (41,0%; 48/117; $p < 0{,}00001$).

На втором этапе работы для изучения генетического разнообразия ВЛКРС в целом по области дополнительно собраны образцы в пяти отдалённых районах от ВЛКРС-положительных животных (Болотнинский, Татарский, Тогучинский, Барабинский, Доволенский). Из 543 образцов выделены и успешно секвенированы фрагменты гена env-gp51 в 417 случаях. Филогенетический анализ показал принадлежность всех вариантов ВЛКРС к двум генотипам – G4 (75,2%; 313/417) и G7 (24,8%; 104/417) ($p < 0{,}00001$). Генотип G4 доминировал в 5 из 6 районов; исключением являлся Тогучинский район, где G7 составлял 83,3% ($p < 0{,}00001$) (Рисунок 1, Таблица 1).

Таблица 1 – Генотипы ВЛКРС, выявленные в районах Новосибирской области.

| **Район** | **n** | **G4, n (%)** | **G7, n (%)** |
|---|---|---|---|
| Коченевский | 191 | 161 (84,7) | 30 (15,3) |
| Болотнинский | 60 | 60 (100,0) | 0 (0,0) |
| Татарский | 60 | 39 (65,0) | 21 (35,0) |
| Тогучинский | 54 | 9 (16,7) * | 45 (83,3) * |
| Барабинский | 35 | 33 (94,3) | 2 (5,7) |
| Доволенский | 17 | 11 (64,7) | 6 (35,3) |
| Всего | 417 | 313 (75,2) | 104 (24,8) |

* В Тогучинском районе доля G7 статистически значимо превышала долю G4 ($p < 0{,}00001$)

Внутри хозяйств выявлены генетически близкие кластеры ВЛКРС (коэффициент поддержки ветвей 90-100), что подтверждает горизонтальную передачу инфекции между животными внутри хозяйств.

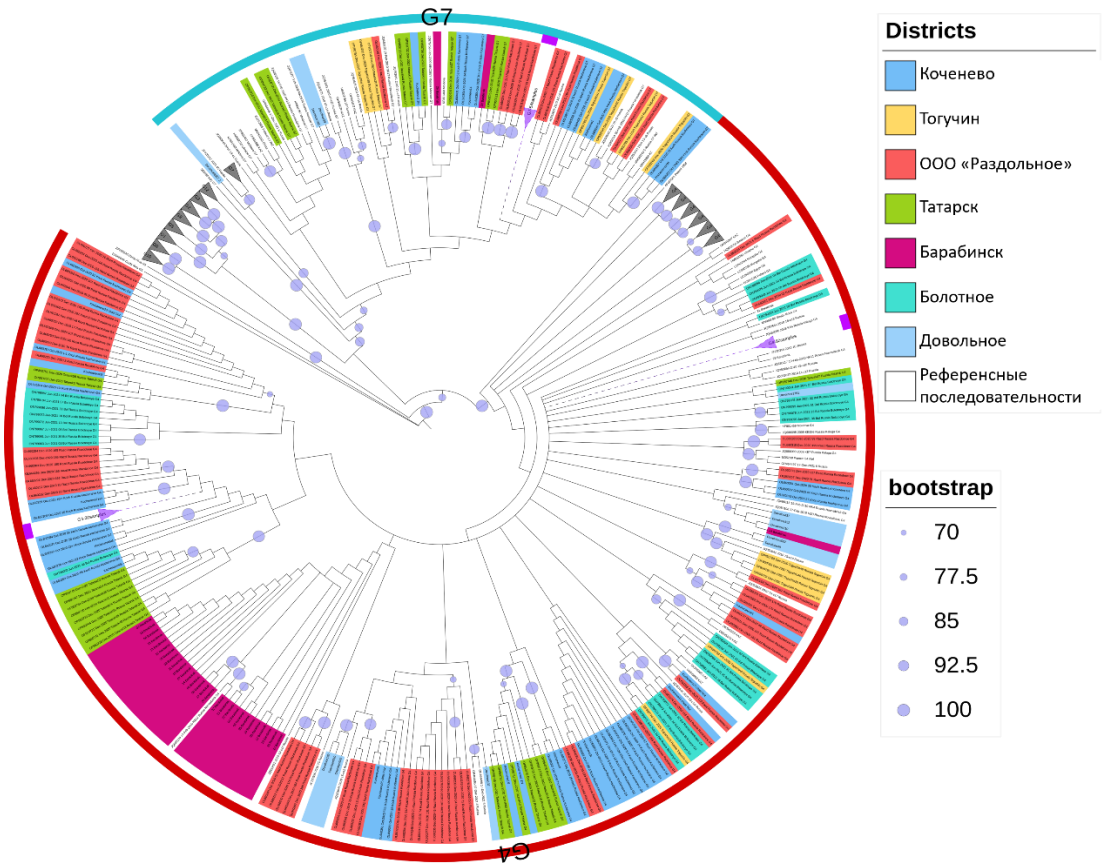


Рисунок 1 – Филогенетическое дерево, построенное для исследованных фрагментов гена env ВЛКРС, выделенных в НСО (дерево масштабировано, при этом длины ветвей представляют количество замен на сайт. Происхождение образцов обозначено цветовой кодировкой. Размер кружков у внутренних узлов отражает величину бутстреп–поддержки ветвей (больший кружок соответствует более высокому значению бутстрепа); отображены только значения ≥70%)

**Формирование стада свободного от ВЛКРС в ООО «Раздольное».** На основании результатов ПЦР-диагностики (71,5% поражённости) совместно с руководством ООО «Раздольное» разработан план оздоровления стада. Ключевыми элементами программы стали: тестирование телят методом ПЦР в реальном времени в возрасте 2–3 месяцев с разделением поголовья на ВЛКРС-позитивных и ВЛКРС-негативных животных; повторное тестирование телят в возрасте 6 месяцев и круглогодичный мониторинг после; выпаивание молозивом исключительно от здоровых первотёлок; содержание негативных телят в изолированных секциях с двойным контролем дезинфекции; поэтапное строительство новых помещений для здорового поголовья.

В период 2023–2025 гг. протестировано 642 телёнка: 87 (13,6%) оказались ВЛКРС-позитивными. Сопоставление результатов ПЦР и ИФА у телят 3–9 месяцев выявило существенные различия (ПЦР: 13,6% vs ИФА: 24,8%; $p < 0{,}00001$), что объясняется присутствием колостральных антител, дающих ложноположительный результат в ИФА (Таблица 2).

Таблица 2 – Сравнение методов диагностики ВЛКРС в ООО «Раздольное». Различия в выявляемости между ПЦР и ИФА у телят статистически значимы (p <0,00001)

| Метод | n тестировано | ВЛКРС (+), n (%) | Возраст животных |
|---|---|---|---|
| РИД | 1584 | 158 (9,9) | ~5 лет |
| ГЕМ+ | 3951 | 50 (1,3) | ~5 лет |
| ПЦР (взрослые) | 200 | 143 (71,5) | 3,0 ± 0,8 лет |
| ПЦР (телята) | 642 | 87 (13,6) | до 3 месяцев |
| ИФА (телята) | 1584 | 393 (24,8) | 3–9 месяцев |

Благодаря реализации разработанной программы оздоровления поражённость КРС снизилась с 71,5% (2021 г.) до 13,6% (2025 г.) – статистически значимое снижение как по тесту Кохрана–Армитажа (тренд; p <0,00001), так и при прямом сравнении начальной и конечной долей инфицированных животных (p <0,00001). Впервые в Сибири начато формирование стада, свободного от вируса лейкоза КРС на основе ПЦР диагностики и реализация программы «test–and–manage».

**ВЛКРС на территории Республики Дагестан.** В Республике Дагестан собраны 643 образца крови КРС из семи районов, представляющих три природно-географические зоны (равнинную, предгорную и горную): Кизлярский, Бабаюртовский, Карабудахкентский, Буйнакский, Кумторкалинский, Унцукульский и Табасаранский. Животные выбирались случайным образом; ПЦР-диагностика проводилась аналогично таковой для НСО. ДНК ВЛКРС обнаружена в 21,2% образцов (136/643), при этом инфицированность варьировала от 0% (Унцукульский район) до 56,1% (Кизлярский район). В крупных животноводческих хозяйствах поражённость (45,7%; 111/243) была статистически значимо выше, чем в фермерских (6,3%; 25/400; p <0,00001), что согласуется с результатами, полученными в НСО (Таблица 3).

Таблица 3 – Результаты ПЦР-диагностики и генотипирования ВЛКРС в районах Республики Дагестан. Доля G4 статистически значимо преобладала над долей G7 (p <0,00001)

| Район | n | ДНК ВЛКРС (+), n (%) | G4, n | G7, n |
|---|---|---|---|---|
| Кизлярский | 155 | 87 (56,1) | 85 | 2 |
| Табасаранский | 88 | 24 (27,3) | 18 | 6 |
| Бабаюртовский | 237 | 21 (8,9) | 9 | 7 |
| Карабудахкентский | 40 | 2 (5,0) | 2 | 0 |
| Буйнакский | 30 | 1 (3,3) | 0 | 0 |
| Кумторкалинский | 77 | 1 (1,3) | 1 | 0 |
| Унцукульский | 16 | 0 (0,0) | 0 | 0 |
| Всего | 643 | 136 (21,2) | 115 | 15 |

Среди 130 исследованных образцов генотип G4 составил 88,5% (115/130), G7 – 11,5% (15/130). Выявлены внутрихозяйственные кластеры генетически близких

вирусов (поддержка 84–90), указывающие на горизонтальную передачу ВЛКРС. Один крупный кластер G4 включал образцы из четырёх районов РД и штаммы из Казахстана и Ростовской области, что свидетельствует о заносе вируса при закупках племенного скота (Рисунок 2).

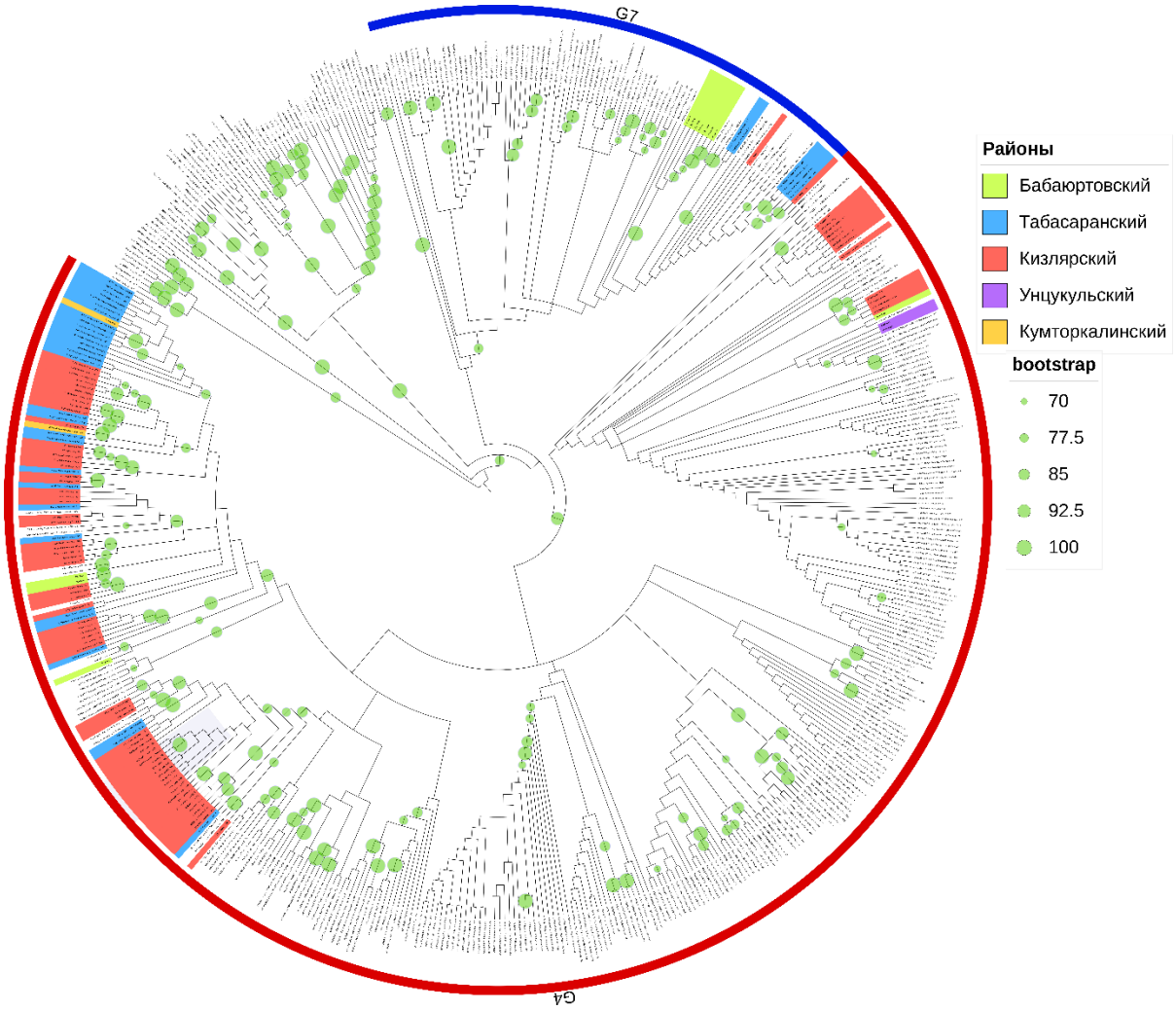


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево вариантов ВЛКРС, выделенных в Республике Дагестан (происхождение образцов обозначено цветовой кодировкой. Чёрным представлены эталонные последовательности ВЛКРС, полученные из базы данных GenBank. Размер кружков у внутренних узлов отражает величину бутстреп–поддержки ветвей (больший кружок соответствует более высокому значению бутстрепа); отображены только значения ≥70%)

**Сравнительный молекулярно-генетический анализ ВЛКРС в НСО и РД.** Общая поражённость ВЛКРС в НСО (60,3%) была статистически значимо выше, чем в РД (21,2%; z = 12,02; p <0,00001). В обоих регионах доминировал генотип G4, однако его доля в РД (88,5%) была значимо выше, чем в НСО (75,2%; p <0,00001). Соотношение G4/G7 составило 3,0:1 в НСО против 7,7:1 в РД (p = 0,0014). Уникальное преобладание G7 зафиксировано лишь в Тогучинском районе НСО (83,3%; p <0,00001).

Сравнительный филогенетический анализ показал, что геноварианты из РД

(кластер, обозначенный красным) и НСО образуют отдельные клады в пределах генотипов G4 и G7 и не формируют общих кластеров (за исключением кластера, обозначенного жёлтым), что свидетельствует о независимых путях происхождения инфекции на этих территориях. Образцы из РД демонстрируют тесное филогенетическое родство со штаммами из Казахстана, Молдовы и Ростовской области, тогда как образцы из НСО группируются преимущественно внутри хозяйств (Рисунок 3).

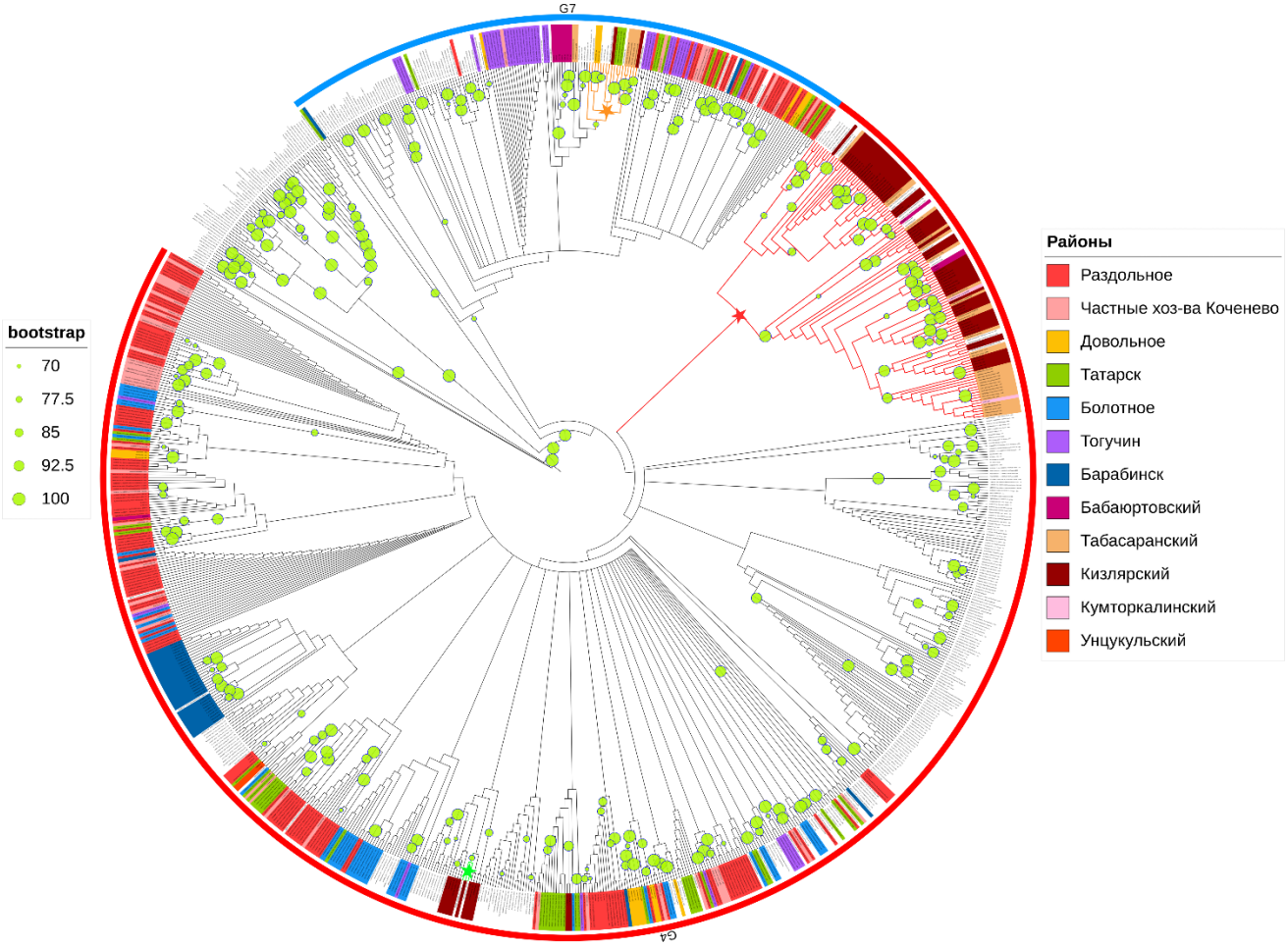


Рисунок 3 – Филогенетическое дерево, построенное для области env–gp51 образцов ВЛКРС, выделенных в Республике Дагестан и на территориях Новосибирской области (происхождение образцов обозначено цветовой кодировкой. Чёрным представлены эталонные последовательности ВЛКРС, полученные из базы данных GenBank. Размер кружков у внутренних узлов отражает величину бутстреп–поддержки ветвей (больший кружок соответствует более высокому значению бутстрепа), отображены только значения ≥70%)

**Анализ мутаций гена env провирусов ВЛКРС.** Из 417 последовательностей ВЛКРС НСО выделено 78 уникальных нуклеотидных вариантов. Сравнительный анализ аминокислотных замен относительно референсного штамма FLK-ВЛКРС выявил 74 замены: 44 в G4 и 30 в G7. Мутации A15T, S49F, K41R и S221L присутствовали в >97% последовательностей обоих генотипов и, по всей видимости, являются ключевыми детерминантами

приспособленности вируса в регионе. Специфичный для российских вариантов G4 набор замен (S23F, A40P, R88H, I111T) указывает на локальную адаптацию. Анализ кодонов по dN/dS (среднее 0,181 ± 0,255; 96,4% сравнений с dN/dS < 1,0; p < 0,001) подтверждает преобладание очищающего отбора.

В Республике Дагестан из 130 последовательностей выделено 90 уникальных вариантов, выявлено 52 аминокислотные замены (28 в G4, 24 в G7). Впервые описаны три мутации, специфичные для данного региона: L116V в нейтрализующем домене 1 (ND1; 20% образцов G4), K117R в ND1 (~50% образцов G4 и G7) и S156N в ND2 (11% образцов G4). Мутации L116V и K117R не выявлены ни в вариантах ВЛКРС из НСО, ни в других опубликованных последовательностях, что позволяет рассматривать их как региональные молекулярные маркеры ВЛКРС Дагестана.

**Анализ нуклеотидного разнообразия и мутаций полных геномов ВЛКРС.** Анализ аминокислотных замен проводили для 154 полногеномных провирусов ВЛКРС (НСО + РД), полученных методом NGS. Множественное выравнивание в программе Jalview относительно референсного штамма FLK-BLV выявило характерные для каждого генотипа паттерны мутаций во всех функциональных и структурных генах генома. В гене gag в матриксном домене p15-MA зарегистрированы P5A (28% образцов, G4+G7), N29D (56% G4, маркер G4), H48Y (40%, G4+G7), инсерция AP-90-91 (100% G7, маркер G7). В капсидном белке p24-CA – I279V (56% G4) и V319I/T (98%, оба генотипа). В нуклеокапсидном домене p12-NC – V324I (97%, оба генотипа) и P344S (57%, оба генотипа).

В гене pol в RT-домене почти фиксированной является замена A2T (98% образцов). В palm-субдомене вблизи каталитических мотивов YXDD выявлены абсолютные маркеры генотипов: E214D – G4 (100%), T216M – G7 (100%). Умеренно встречаются S154P (42%), I267V (45%). В домене эндонуклеазы (интегразы) доминируют R609K (89%) и D821N (98%), характерные для обоих генотипов. В гене env абсолютные маркеры G4 – I28V и S34P (100% G4, 0% G7), G7 – A258V/A291V в эпитопе A gp51 и S485P/V504A в TM-домене gp30. Для образцов из РД описаны L116V и K117R в нейтрализующем домене ND1. В регуляторных генах pX (Tax/Rex/R3) выявлены генотип-специфичные замены: у G4 – S220T, C256Y, L277I (Tax) и R73Q, H65L, E28D (Rex/R3); у G7 – L172P, S280P, A94T (Tax) и N21D (R3). Совокупность замен в структурных и регуляторных генах обеспечивает чёткую молекулярную дифференциацию генотипов G4 и G7 на уровне полного генома.

Нуклеотидное разнообразие (π) рассчитывали методом скользящего окна (100 н.о., шаг 25 н.о.) в программе DnaSP v.6 для 154 полногеномных последовательностей (Рисунок 4). Среднее значение π по всему геному составило

0,0174 ± 0,0078. Распределение π вдоль генома неоднородно: 15 статистически значимых пиков (95-й перцентиль: π ≥ 0,030) сосредоточены исключительно в генах env (8 пиков, π max = 0,038) и pX (7 пиков, π max = 0,037). Максимальный пик разнообразия в гене env (π = 0,038) локализован в области 6468–6692 п.н. и охватывает участок нейтрализующих доменов gp51, а максимальный пик в pX (π = 0,037) приходится на область 7343–7693 п.н., соответствующую перекрывающимся рамкам считывания R3/G4 и C-концевому домену активации белка Tax. Ни одно из 282 скользящих окон в генах gag и pol не превысило порогового значения π, что свидетельствует о преобладании очищающего отбора на структурные и ферментативные домены. Среднее π для env = 0,0183 ± 0,0087 – максимум среди структурных генов; для gag и pol оно составляет 0,0151 ± 0,0062 и 0,0172 ± 0,0062 соответственно. Анализ dN/dS подтвердил локально повышенное значение (>1) для вариабельных доменов env и pX, что указывает на действие положительного отбора в этих регионах.

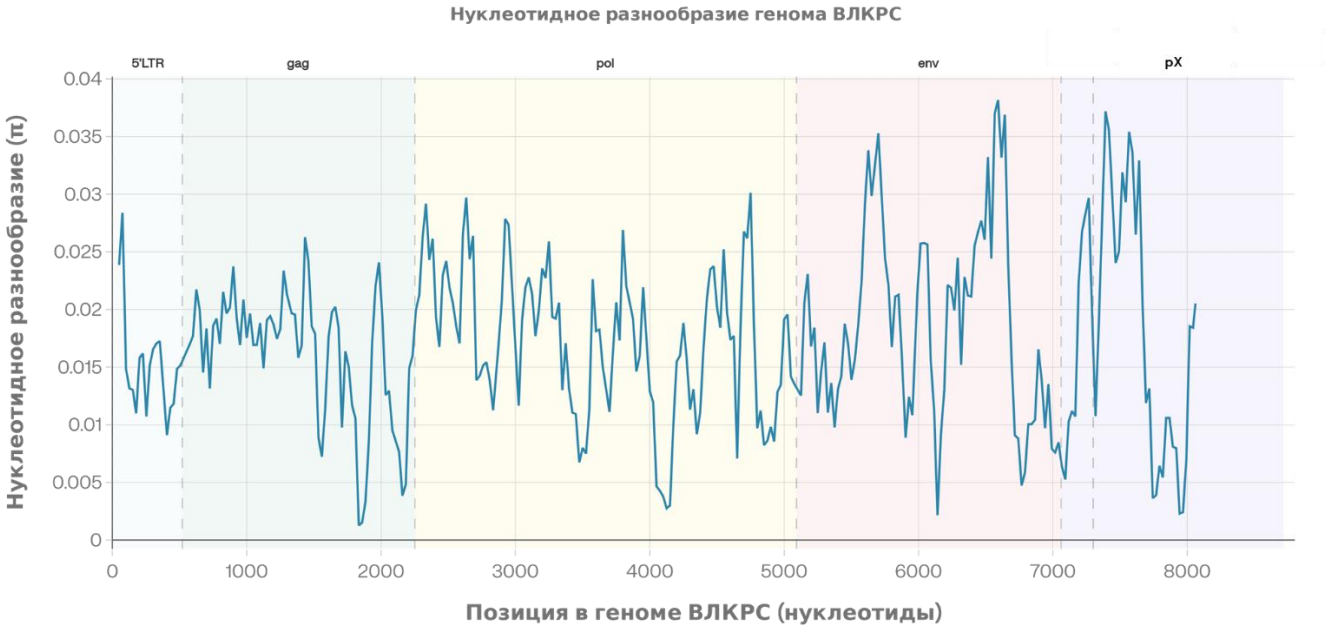


Рисунок 4 – Распределение нуклеотидного разнообразия (π) вдоль генома ВЛКРС (по оси абсцисс отложена позиция в геноме (нуклеотиды), по оси ординат – значение нуклеотидного разнообразия π, рассчитанное методом скользящего окна (размер окна 100 н.о., шаг 25 н.о.) на основе множественного выравнивания 154 полных геномов ВЛКРС в программе DnaSP v.6. Выделены основные кодирующие регионы генома: 5'LTR, gag, pol, env и pX)

Для выявления ретикулярных эволюционных взаимосвязей, не обнаруживаемых классическим филогенетическим деревом, был проведён анализ 154 полногеномных последовательностей методами Median Joining Network и SplitNetwork в программе SplitsTree v.4.19.2 (ε = 0, метрика Hamming) (Рисунок 5).

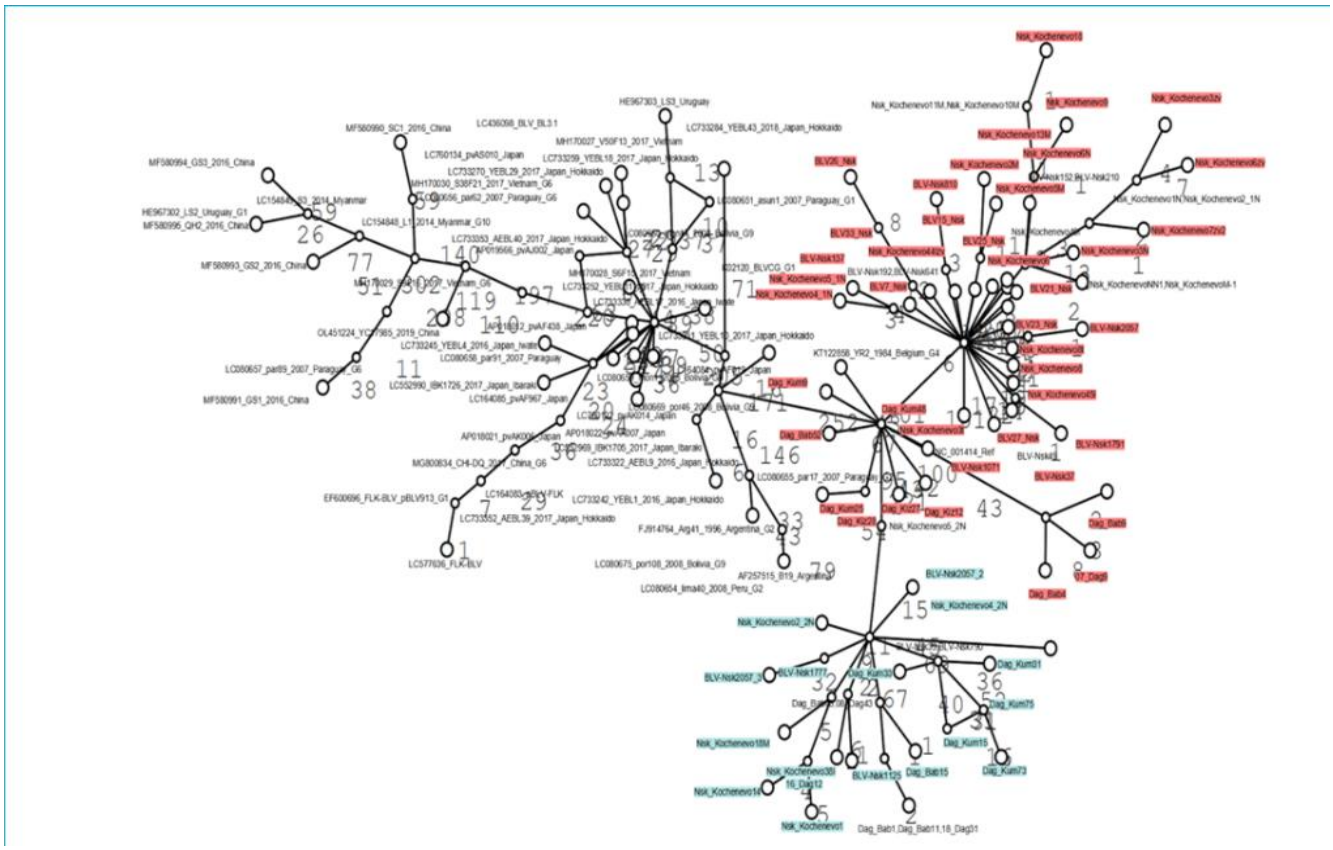

Рисунок 5 – Филогенетические сети ВЛКРС, построенные для полученных в работе 154 последовательностей полных геномов методом Median Joining в программе SplitsTree (красным цветом выделены образцы генотипа G4 ВЛКРС, голубым выделены образцы генотипа G7 ВЛКРС, чёрным представлены эталонные последовательности ВЛКРС, полученные из базы данных GenBank)

Построенная MJN-сеть включает 50 узлов (154 исходных последовательности + 7 гипотетических медианных векторов, отражающих предковые состояния). Топология сети демонстрирует генотип-специфическую кластеризацию: вирусы G4 формируют компактный радиальный кластер с малыми внутригрупповыми расстояниями (медиана рёбер – 32 замены), тогда как G7 характеризуется большей внутригрупповой неоднородностью (максимальное расстояние – 66 замен). Наибольшие генетические дистанции зафиксированы между G4 и G7, что согласуется с их выраженной филогенетической дивергенцией. Анализ SplitNetwork выявил четыре основные группы образцов (Рисунок 6).

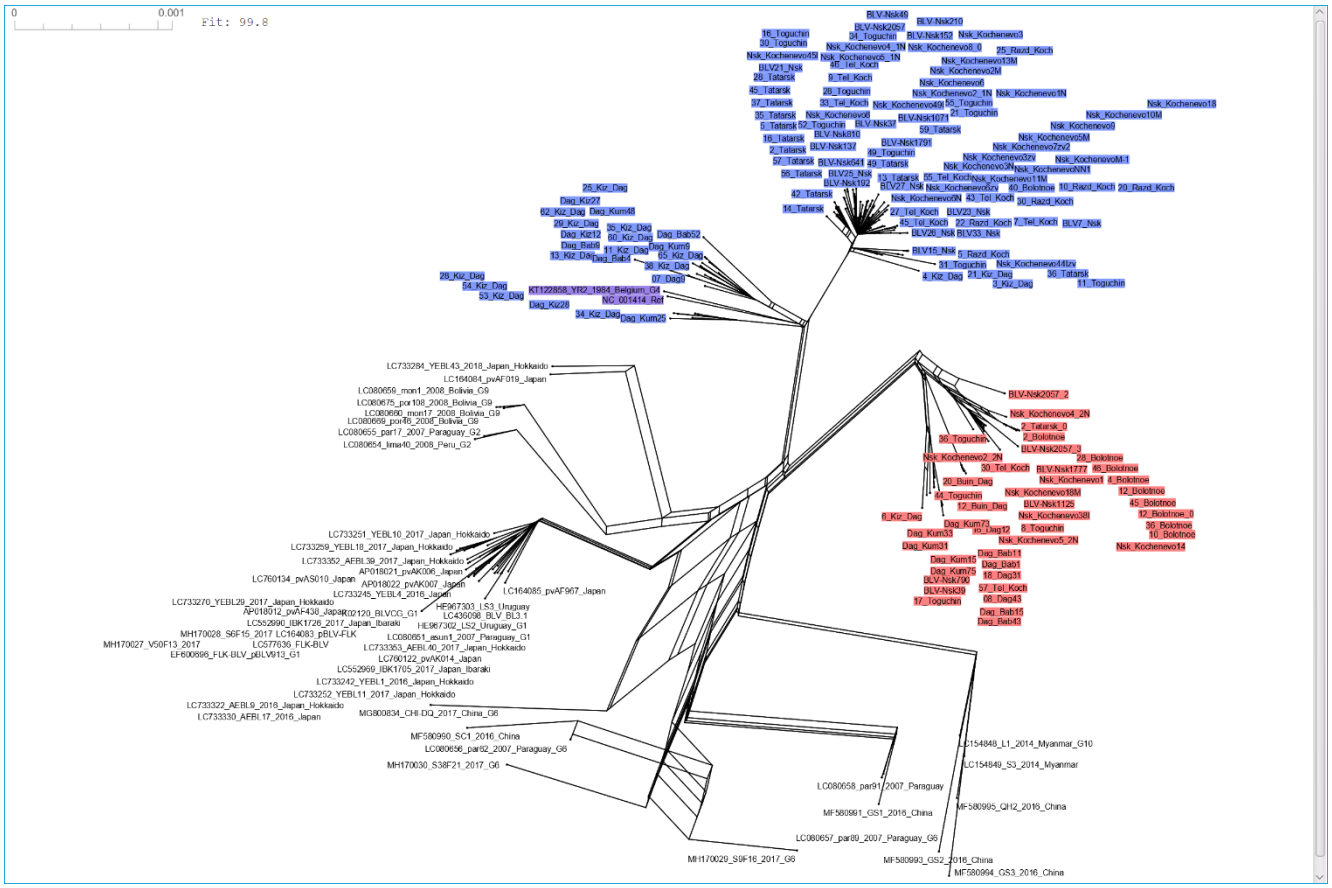


Рисунок 6 – Филогенетические сети ВЛКРС, построенные методом SplitNetwork в программе SplitsTree (синим цветом обозначены образцы ВЛКРС 4 генотипа, красным обозначены образцы 7 генотипа, фиолетовым обозначены эталонные образцы 4 генотипа из базы данных GenBank. Чёрным представлены эталонные последовательности ВЛКРС, полученные из базы данных GenBank)

Внутри генотипа G7 чётко разграничены новосибирская и дагестанская популяции. При этом 5 новосибирских образцов G7 занимали промежуточное положение между двумя территориальными группами, что вероятнее всего, указывает на занос этих вариантов из европейской части России через торговлю племенным скотом (Рисунок 7). Особый интерес представлял образец BLV_Nsk_2057_2 (выделен желтым), который в сети был связан длинными ветвями, содержащими множественные несовместимые разбиения. Такое топологическое положение является характерным признаком рекомбинационной природы последовательности и указывает на возможное происхождение данного варианта в условиях суперинфекции или смешанной циркуляции близкородственных геновариантов внутри популяции генотипа G7.

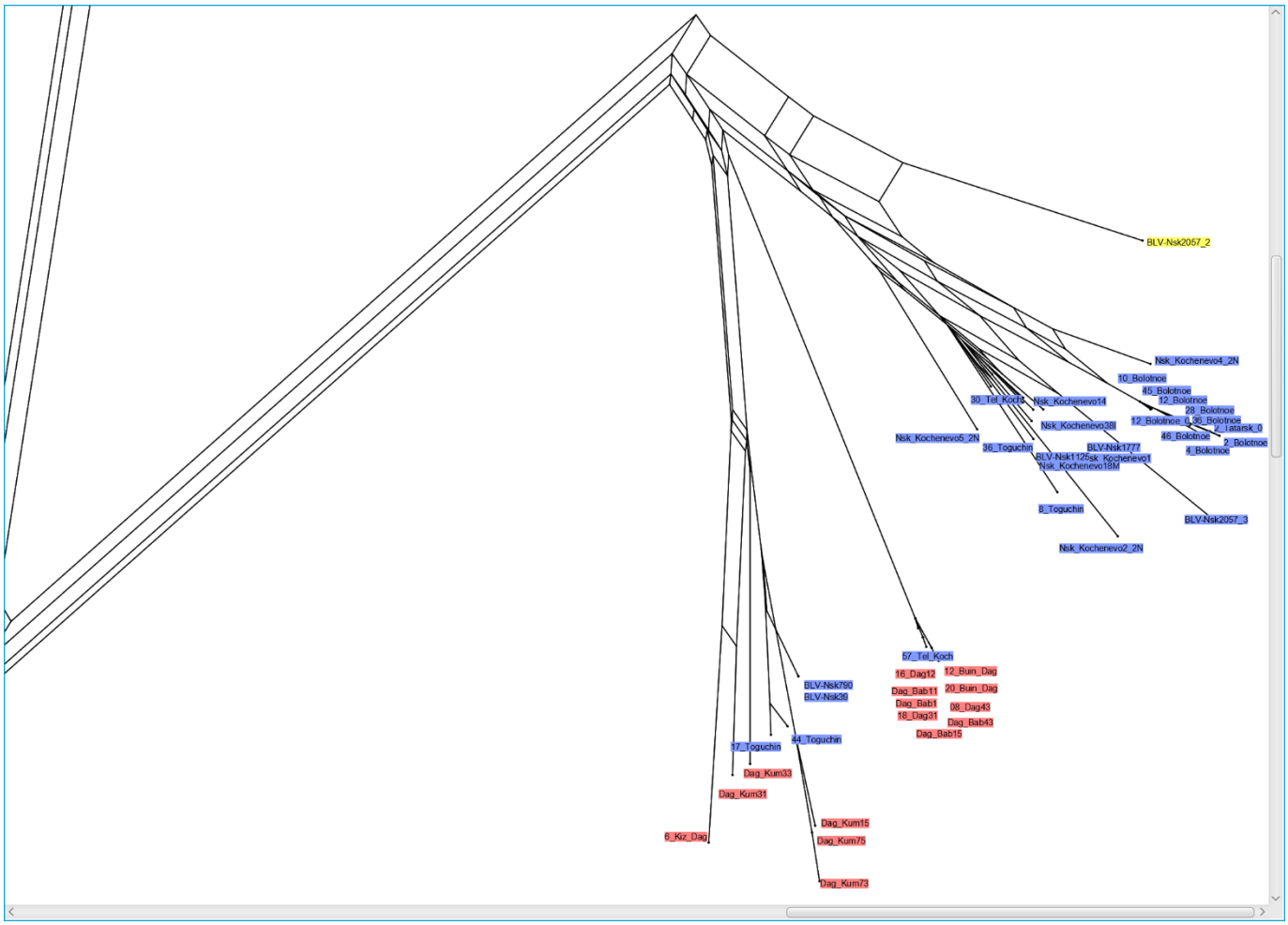


Рисунок 7 – Филогенетические сети ВЛКРС 7 генотипа, построенные методом SplitNetwork в программе SplitsTree (синим цветом обозначены образцы ВЛКРС, собранные в НСО, красным обозначены образцы, собранные в Республике Дагестан, желтым обозначен образец с возможной рекомбинацией. Чёрным представлены эталонные последовательности ВЛКРС, полученные из базы данных GenBank)

Анализ образцов генотипа G4 также выявил разделение на две основные группы, соответствующие последовательностям из Новосибирской области и Республики Дагестан. Вместе с тем в пределах одной из групп определялась подгруппа, объединявшая геноварианты из обоих регионов, что может отражать происхождение этих вариантов из общего источника, а не прямой односторонний перенос из одного региона в другой (Рисунок 8).

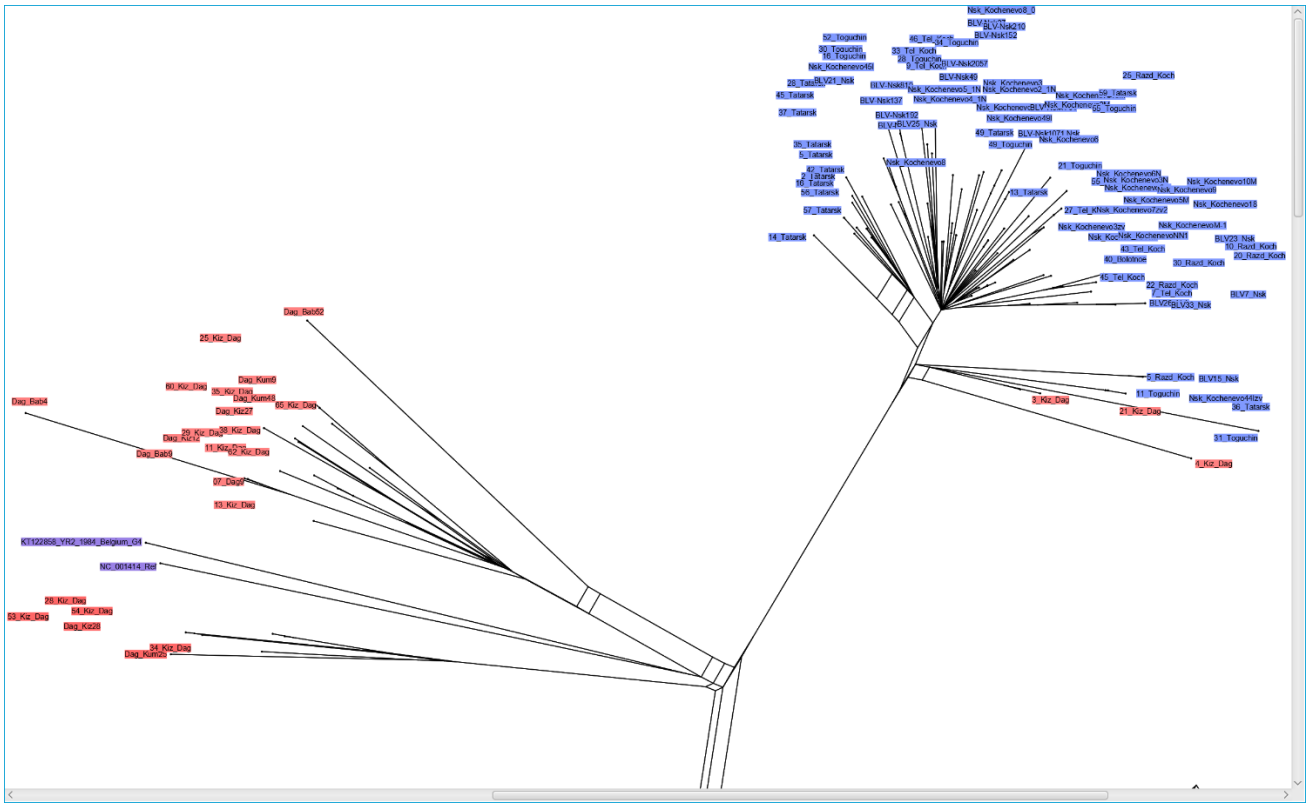

Рисунок 8 – Филогенетические сети ВЛКРС 4 генотипа, построенные методом SplitNetwork в программе SplitsTree (синим цветом обозначены образцы ВЛКРС, собранные в НСО, красным обозначены образцы, собранные в Республике Дагестан. Фиолетовым обозначены референсные образцы из GenBank генотипа 4. Чёрным представлены эталонные последовательности ВЛКРС, полученные из базы данных GenBank)

Статистическая проверка рекомбинационного сигнала методом PHI-теста (Pairwise Homoplasy Index) в программе SplitsTree подтвердила значимое отклонение от строго клональной эволюции внутри генотипа G7 ($p = 1{,}599\times10^{-4}$), тогда как для генотипа G4 признаков достоверной рекомбинации не выявлено, что согласуется с более компактной и однородной топологией его MJN-сети.

Интеграция результатов MJN, SplitNetwork и анализа π даёт комплексное представление об эволюционной динамике ВЛКРС: умеренно-консервативный геном с локализованными очагами изменчивости в env и pX, которые являются ключевыми мишенями иммунного давления и регуляторной адаптации вируса к хозяину.

**Разработка мультиплексной цифровой ПЦР для диагностики ВЛКРС и оценка провирусной нагрузки.** Разработана мультиплексная цифровая ПЦР (цПЦР) для одновременного выявления генотипов G4 и G7 ВЛКРС с нормализацией на клеточный ген DRA. Установленные аналитические параметры: предел холостого бланка (LoB) ≈ 5 капель/образец; предел обнаружения (LoD) ≈ 7 копий/образец (probit-анализ: LoD-95% = 1,3–1,5 копии/лунку); предел количественного определения (LoQ) = 10 копий/лунку. Система позволяет надёжно

обнаруживать низкую провирусную нагрузку, характерную для части вариантов G7, а по точности обнаружения провируса превосходит стандартные методы ПЦР-РВ и гнездовую ПЦР.

Для оценки провирусной нагрузки сформирована выборка образцов клеток крови от 90 тёлок из НСО и РД с известным генотипом и возрастом (от 3 месяцев до 12 лет). У молодняка до 1 года нагрузка G4 была в 7,1 раза выше, чем G7 (344220 ± 149759 vs 48581 ± 39143 провирусов/$10^6$ клеток; p = 0,0003). В группе 1–3 лет нагрузка G4 снижалась на 72,1% (p = 0,0037), что может отражать формирование адаптивного иммунного ответа. В группе 4–5 лет нагрузка G4 вновь возрастала (p = 0,018), тогда как нагрузка G7 оставалась стабильно низкой (p >0,05 для всех межгрупповых сравнений) (Рисунок 9). Полученные данные свидетельствуют о более высоком патогенном потенциале генотипа G4 по сравнению с G7.

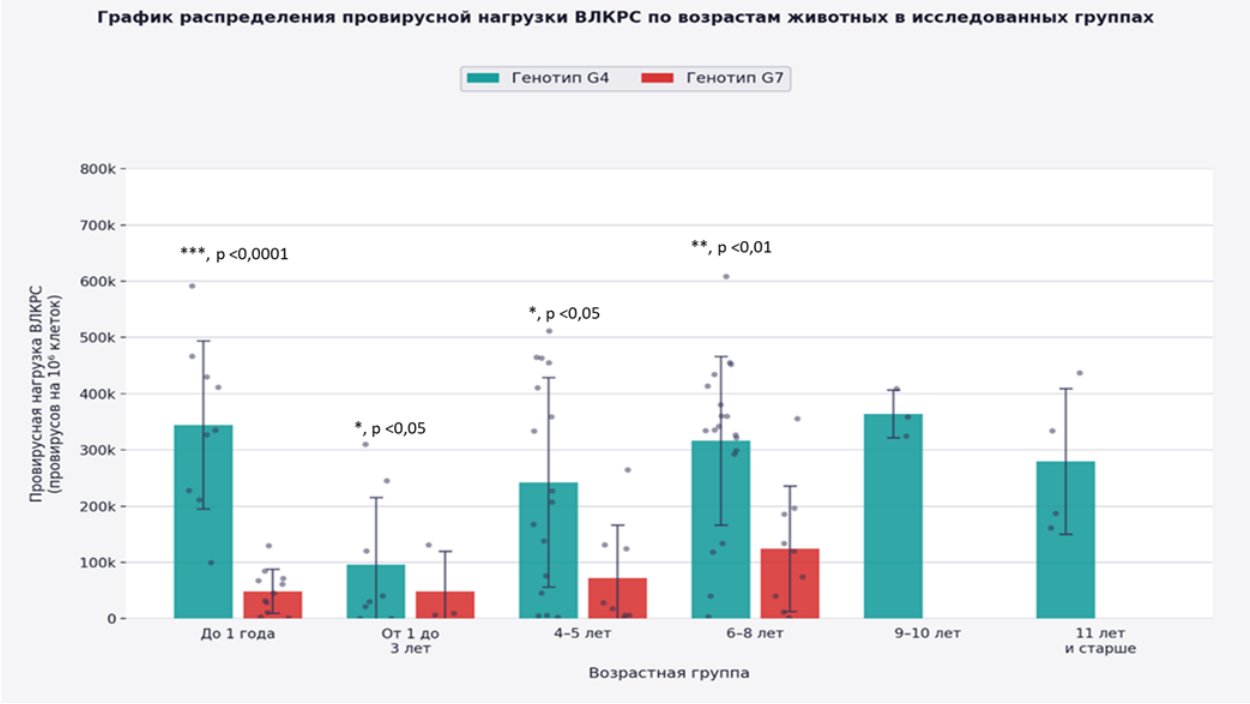


Рисунок 9 – График распределения провирусной нагрузки ВЛКРС по возрастам животных в исследованных группах (по оси X обозначены возрастные группы КРС, по оси Y – уровень провирусной нагрузки ВЛКРС. Синим обозначен генотип G4, красным обозначен генотип G7)

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лейкоз крупного рогатого скота, вызываемый вирусом лейкоза КРС (ВЛКРС), остаётся одной из наиболее экономически значимых инфекций в животноводстве России. Отсутствие коммерческой вакцины и ограничения существующих диагностических подходов обуславливают необходимость углублённого изучения генетического разнообразия возбудителя и разработки высокочувствительных методов его выявления.

Суммируя результаты проведённого исследования, можно заключить, что на

территориях Новосибирской области и Республики Дагестан циркулируют два генотипа ВЛКРС – G4 (доминирующий, 75,2 %) и G7 (24,8 %), причём их соотношение значительно варьирует между хозяйствами. Впервые с помощью мультиплексной цифровой ПЦР показано, что провирусная нагрузка у животных, инфицированных генотипом G4, в 7,1 раза превышает таковую у носителей генотипа G7, что определяет приоритетность выбраковки G4-позитивных животных при планировании оздоровительных мероприятий.

Разработанный прототип цПЦР продемонстрировал аналитическую чувствительность на уровне 10 копий провируса, превосходя стандартные методы ПЦР в реальном времени и гнездовой ПЦР. Такой уровень аналитической чувствительности делает разработанную тест-систему пригодной не только для целей эпизоотологического мониторинга, но и для изучения возможного онкогенного потенциала ВЛКРС у человека – в частности, для поиска генетических маркеров вируса в образцах лейкоцитарной массы, биопсийном и аутопсийном материале с целью подтверждения взаимосвязи их выявления с онкологическими заболеваниями молочной железы.

В ходе проведения настоящего исследования впервые в мире получены полногеномные последовательности ВЛКРС генотипа G7, а для генотипа G4 впервые из России. Всего депонировано 417 нуклеотидных последовательностей фрагмента гена env, что удвоило объём российских данных в международной базе GenBank. Проведённый анализ полных геномов выявил генотип-специфические мутации во всех основных генах вируса, в том числе в ключевых функциональных доменах гена env-gp51, используемых в диагностике, что создаёт основу для верификации и обновления тест-систем.

Выявленные генотип-специфичные мутации в регуляторных генах tax/rex и рамке считывания R3/G4, в том числе замены S220T и C256Y в домене активации белка Tax (LAD) у генотипа G4 и L172P, S280P у генотипа G7, потенциально затрагивают эффективность взаимодействия Tax с клеточным коактиватором CBP/p300 и могут вносить вклад в различия транскрипционной активности провируса, что рассматривается как одно из вероятных молекулярных объяснений более высокой провирусной нагрузки у животных, инфицированных генотипом G4, по сравнению с генотипом G7.

На основе полученных данных впервые в России разработана и внедрена стратегия поэтапного формирования ВЛКРС-свободного стада, включающая двукратное ПЦР-тестирование молодняка в возрасте 3 и 6 месяцев и постоянный молекулярно-генетический мониторинг циркулирующих вариантов вируса. Реализованный комплексный подход полностью решил поставленные задачи и создаёт перспективную методическую и информационную базу для эффективного

контроля и элиминации ВЛКРС на территории Российской Федерации.

## ВЫВОДЫ

1. Встречаемость ВЛКРС в хозяйствах Новосибирской области носит неравномерный характер, молекулярно–генетический скрининг 317 животных Коченевского района показал, что средняя встречаемость ВЛКРС в стадах КРС составила 60,3%, при этом уровень встречаемости вируса в крупном хозяйстве (71,5%) был значимо выше (p <0,00001), чем в частных подворьях (0-79%).

2. Для 6 крупных хозяйств Новосибирской области охарактеризована генотипическая структура популяции ВЛКРС. Установлено значимое доминирование генотипа G4 (75,2%) по сравнению с генотипом G7 (24,8%) ВЛКРС (p <0,00001).

3. Получены молекулярно–генетические данные и показатели встречаемости ВЛКРС в хозяйствах Республики Дагестан. Средняя поражённость КРС составила 21,2% при значимом (p <0,00001) доминировании генотипа G4 (88,5%) по сравнению с генотипом G7 (11,5%).

4. Хозяйства НСО характеризуются большей пораженностью скота ВЛКРС по сравнению с РД (60,3% против 21,2%, p <0,00001), при этом для НСО характерна преимущественно внутрихозяйственная передача ВЛКРС с формированием локальных кластеров, тогда как в Дагестане также выявлены признаки заноса из Казахстана.

5. При анализе нуклеотидных и аминокислотных последовательностей фрагмента гена env–gp51 циркулирующих в России геновариантов ВЛКРС G4 и G7 установлен ограниченный генотип–специфический набор замен в доменах RBD и ND1–ND3, а также в участках $CD4^+$– и $CD8^+$–Т–клеточных эпитопов, отражающий особенности антигенной организации каждого генотипа.

6. Впервые расшифрованы и охарактеризованы 154 полных генома ВЛКРС генотипа G7 и генотипа G4 (регионы gag, pro, pol, env, pX). Выявлены генотип–специфические аминокислотные замены во всех структурных и регуляторных генах, в том числе в домене LAD белка Tax, регионах R3/G4, а также специфические мутации, отличающие российские последовательности от референс–генома FLK и зарубежных последовательностей ВЛКРС.

7. Впервые в России разработан и апробирован прототип диагностической тест–системы на основе цифровой ПЦР (цПЦР) с мишенью в гене pol ВЛКРС и референс–гене КРС BoLA–DRA, обеспечивающий одновременное выявление и количественную оценку провирусной нагрузки геновариантов G4 и G7 с нормализацией по числу клеток хозяина, аналитическая чувствительность которого (LoD 7 копий/образец, LoQ 10 копий/образец) достоверно превосходит таковую для РВ–ПЦР и гнездовой ПЦР.

8. С использованием цПЦР показано: у животных, инфицированных генотипом G4, провирусная нагрузка во всех возрастных группах была статистически значимо выше, чем при инфицировании генотипом G7 ($p < 0,05$), что подтверждает более агрессивный характер персистенции генотипа G4.

9. Предложенный поэтапный подход к элиминации ВЛКРС, основанный на внедрении ПЦР–мониторинга в виде двукратного тестирования молодняка (в 3 и 6 месяцев) и реализации программы «test–and–manage» с поэтапным формированием ВЛКРС–свободного поголовья, продемонстрировал снижение пораженности скота ВЛКРС в хозяйстве с 71,5% до 13,6% ($p < 0,00001$).

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРАТЦИИ

### Список статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК

1. Genetic Genetic Diversity of the BLV env Gene and gp51 Mutations in Genotypes G4 and G7 Circulating in Dairy Cattle in the Novosibirsk Region / **Baboshko D.A.,** Elfimov K.A., Achigecheva P.Yu., Osipova I.P., Vlasov G., Rozhkov O.A., Boyko M., Totmenin A.V., Agaphonov A.P., Gashnikova N.M. // Pathogen. – 2026. – Vol. 15(4), – Article 405. – DOI: 10.3390/pathogens15040405.

2. Оценка пораженности крупного рогатого скота вирусом лейкоза в Республике Дагестан с помощью ПЦР-диагностики / **Бабошко Д.А.,** Елфимов К.А., Даудова М.Г., Койчуев Х.Г., Гапизова Х.Ф.-К., Гашникова Н.М. // Юг России: экология, развитие. – 2023. – Т. 18 – № 4. – С. 114–124. – DOI: 10.18470/1992-1098-2023-4-114-124.

3. Генетическое разнообразие вируса лейкоза крупного рогатого скота и его распространение в районах Республики Дагестан / **Бабошко Д.А.,** Даудова М.Г., Ачигечева П.Ю., Елфимов К.А., Дандамаев Д.К., Шахбанова З.Р., Тотменин А.В., Гашникова Н.М. // Юг России: экология, развитие. – 2025. – Т. 20 – № 2. – С. 37–53. – DOI: 10.18470/1992-1098-2025-2-3.

### Другие публикации в рецензируемых научных журналах

1. Формирование свободного от энзоотического лейкоза крупного рогатого скота стада на основе ПЦР-диагностики телят / Бабошко Д.А., Елфимов К.А., Кузьмин А.И., Рожков О.А., Флеер М.В., Тотменин А.В., Гашникова Н.М. // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2024. – Т. 54 – № 12. – С. 68–79. – DOI: 10.26898/0370-8799-2024-12-8

2. Генетическое разнообразие ВЛКРС, распространённых на территории Коченевского района Новосибирской области / Бабошко Д.А., Гашникова Н.М., Тотменин А.В., Нефедова А.А., Осипова И.П., Екушов В.Е., Кузьмин А.И., Рожков О.А., Флеер М.В. // Ветеринария и кормление. – 2022. – № 2. – С. 17–19. – DOI: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2022-2-4.

**Благодарности**

Автор приносит благодарность своим коллегам из отдела ретровирусов, сотрудникам отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, а именно: К.А. Елфимову, А.В. Тотменину, П.Ю. Ачигечевой, И.П. Осиповой, А.И. Мурзину, Т.В. Трегубчак, Б.С. Малышеву и др. Автор выражает признательность сотрудникам Дагестанского государственного университета: М.Г. Даудовой, Х.Г. Койчуеву и др. Автор приносит благодарность директору ООО «Раздольное» Г.В. Власову за многолетнее сотрудничество, а также сотрудникам Управления ветеринарии Новосибирской области и Комитета ветеринарии Республики Дагестан. Особую благодарность автор выражает своему научному руководителю Н.М. Гашниковой за поддержку и помощь в подготовке диссертационной работы. Автор также выражает благодарность семье и близким за поддержку при подготовке работы.