



ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-167>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023



Циркуляция вирусов герпеса крупного рогатого скота (Herpesviridae: *Varicellovirus*) и диареи крупного рогатого скота (Flaviviridae: *Pestivirus*) среди диких парнокопытных животных Московской области

Пчельников А.В.^{1,2}, Яцентюк С.П.^{1,2}, Красникова М.С.¹

¹ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор), 123022, г. Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, 109472, г. Москва, Россия

Введение. Пестивирусы и вирусы семейства Herpesviridae широко распространены среди разных видов копытных, однако основная информация об этих возбудителях связана с их влиянием на сельскохозяйственных животных. Данные о случаях выявления вирусов диареи (BVDV) и герпеса крупного рогатого скота (КРС) у диких копытных, полученные в разных странах в последние годы, ставят вопрос о роли диких животных в эпизоотологии болезней КРС.

Цель работы – изучение распространённости герпесвирусов и пестивирусов в популяции диких парнокопытных Московской области.

Материалы и методы. Образцы паренхиматозных органов и смывы со слизистых от 124 диких парнокопытных (лосей и косуль), добытых в рамках спортивной и любительской охоты сезонов 2019–2022 гг. на территории Московской области, исследовали молекулярно-генетическими (ПЦР) и серологическими методами на наличие генетического материала и антител к возбудителям инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи КРС.

Результаты. Генетический материал BVDV выявили в образце от одного лося, ДНК герпесвирусов КРС – в образцах от 3 косуль и 2 лосей, отстрелянных на территории Московской области. Антитела к вирусам находили у животных разного пола и возраста, общая серопревалентность диких парнокопытных к герпесвирусам и пестивирусам составила 46 и 29% соответственно.

Заключение. Дикие жвачные парнокопытные Московской области могут быть естественным резервуаром герпесвирусов КРС, и это необходимо учитывать при планировании и организации мероприятий по контролю и оздоровлению территории от инфекционного ринотрахеита КРС. Случаи инфицирования диких парнокопытных животных BVDV носят менее распространённый характер, поэтому для окончательного установления их роли в эпизоотологии этой болезни у КРС необходимы дополнительные исследования.

Ключевые слова: вирус диареи крупного рогатого скота; BVDV; вирус герпеса крупного рогатого скота; ВоHV; дикие копытные; ПЦР; антитела

Для цитирования: Пчельников А.В., Яцентюк С.П., Красникова М.С. Циркуляция вирусов герпеса крупного рогатого скота (Herpesviridae: *Varicellovirus*) и диареи крупного рогатого скота (Flaviviridae: *Pestivirus*) среди диких парнокопытных животных Московской области. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(2): 142–151. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-167> EDN: <https://elibrary.ru/dtkibo>

Для корреспонденции: Пчельников Александр Владимирович, канд. вет. наук, доцент кафедры эпизоотологии и организации ветеринарного дела, ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, 109472, г. Москва, Россия. E-mail: vetdr-mom@list.ru

Участие авторов: Пчельников А.В. – проведение исследований, подбор литературы, подготовка иллюстративного материала, написание текста статьи; Яцентюк С.П. – общее руководство, подбор литературы, научное редактирование, написание текста статьи; Красникова М.С. – проведение исследований.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 22-26-00093, <https://rscf.ru/project/22-26-00093/>)

Благодарности. Авторы выражают искреннюю благодарность коллективу Государственной ветеринарной службы Московской области за помощь в проведении отбора проб патологического материала животных. Отдельная признательность выражается специалисту ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» К.Г. Долинской за помощь в подготовке образцов и заместителю директора ФГБУ «Центр ветеринарии» к.б.н. А.Е. Гогину за консультации по оформлению карт, опубликованных в статье.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (Протокол № 125 от 16 апреля 2020 г.).

Поступила 03.03.2023

Принята в печать 17.04.2023

Опубликована 30.04.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-167>

Circulation of bovine herpesvirus (Herpesviridae: *Varicellovirus*) and bovine viral diarrhoea virus (Flaviviridae: *Pestivirus*) among wild artiodactyls of the Moscow region

Aleksander V. Pchelnikov^{1,2}, Svetlana P. Yatsentyuk^{1,2}, Maria S. Krasnikova¹¹All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Animals and Feed, 123022, Moscow, Russia;²Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MBA named after K.I. Skryabin, 109472, Moscow, Russia

Introduction. Pestiviruses and viruses of the Herpesviridae family are widely distributed among different species of ungulates, but the main information about these pathogens is related to their effect on farm animals. Data on detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine herpes virus (BoHV) in wild ungulates reported from different countries in recent years raises the question of the role of wild animals in the epidemiology of cattle diseases.

Aim of work. To study the prevalence of herpesviruses and pestiviruses in the population of wild artiodactyls of the Moscow region.

Materials and methods. Samples of parenchymal organs and mucosal swabs from 124 wild deer (moose and roe deer) shot during hunting seasons 2019–2022 in Moscow Region were examined by PCR, virological and serological methods for the presence of genetic material and antibodies to bovine infectious rhinotracheitis and viral diarrhoea.

Results. BVDV RNA was found in a sample from one moose, BoHV DNA was detected in samples from three roe deer and two moose shot in the Moscow region. Seropositive animals were of different sex and age, the total BoHVs and BVDV seroprevalence rates in wild artiodactyls were 46 and 29%, respectively.

Conclusion. Wild ruminant artiodactyls of the Moscow Region can be a natural reservoir of BoHV-1, and this must be taken into account when planning and organizing measures to control the infectious bovine rhinotracheitis. Cases of BVDV infection in wild artiodactyls are less common, so more research is needed to definitively establish their role in the epidemiology of this disease in cattle.

Keywords: bovine diarrhoea virus; BVDV; bovine herpes virus; BoHV; wild ungulates; PCR; antibodies

For citation: Pchelnikov A.V., Yatsentyuk S.P., Krasnikova M.S. Circulation of bovine herpesvirus (Herpesviridae: *Varicellovirus*) and bovine viral diarrhoea virus (Flaviviridae: *Pestivirus*) among wild artiodactyls of the Moscow region. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(2): 142-151 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-167> EDN: <https://elibrary.ru/dtkibo>

For correspondence: Aleksander V. Pchelnikov, PhD (Vet.), Associate Professor of the Department of Epizootology and Organization of Veterinary Affairs, Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MBA named after K.I. Scriabin, 109472, Moscow, Russia. E-mail: [vetdr-mom@list.ru](mailto:vetr-mom@list.ru)

Information about the authors:Pchelnikov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-9712-3079>Yatsentyuk S.P., <https://orcid.org/0000-0002-4819-2131>Krasnikova M.S., <https://orcid.org/0000-0002-6248-419X>

Contribution: Pchelnikov A.V. – conducting research, selecting literature, preparing illustrative material, writing the text of the article; Yatsentyuk S.P. – general guidance, selection of literature, scientific editing, writing the text of the article; Krasnikova M.S. – researching.

Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation under grant No. 22-26-00093 (<https://rscf.ru/project/22-26-00093/>).

Acknowledgement. The authors express their sincere gratitude to the staff of the State Veterinary Service of the Moscow region for their assistance in sampling pathological animal material. Special thanks are expressed to the specialist of All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Animals and Feed K.G. Dolinskaya for the assistance in sample preparation and to the Deputy Director of the Center for Veterinary Medicine, PhD (Biol.) A.E. Gogin for advice on the design of maps published in the article.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Animals and Feed (Protocol No. 125 dated 16 April 2020).

Received 03 March 2023

Accepted 17 April 2023

Published 30 April 2023

Введение

В течение двух последних десятилетий в мировой научной литературе прослеживается повышенный интерес к изучению распространения возбудителей инфекционных болезней крупного рогатого скота (КРС) в популяции диких парнокопытных животных. Особый интерес исследователей вызывают вирусы герпеса КРС 1-го типа (BoHV-1) и диареи КРС (BVDV) как возбудители инфекционного ринотрахеита (ИРТ) КРС и вирусной диареи (ВД) КРС – болезней, строго контролируемых Всемирной организацией здоровья животных (МЭБ).

В 2007 г. исследования популяции аляскинского карibu показали серопревалентность животных к BoHV-1 на уровне 47% [1]. Исследования материала от яков, обитающих в Цинхай-Тибетском нагорье Китая, проведённые в 2011–2012 гг., показали, что антитела к BoHV-1 присутствуют у 27,9–44,6% яков из разных исследованных районов [2].

Исследования буйволов, проведённые в 2014 г. в Аргентине, позволили выделить несколько изолятов BoHV-1 [3]. Проведённое годом позже масштабное исследование диких копытных 59 лесных районов Польши показало, что антитела к BoHV-1 присутствуют у 54,2% животных. Наиболее часто антитела выявляли у благородных оленей (25,6%) и ланей (23,1%), а реже всего – у косуль (1,7%) [4].

Изучение муфлонов (*Ovis orientalis*), диких козлов (*Capra aegagrus*), индийских газелей (*Gazella bennettii*) и джейранов (*Gazella subgutturosa*), проведённое в 13 разных районах Ирана, показало отсутствие антител к BoHV-1, однако методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК BoHV-1 была обнаружена в 1,5% случаев [5]. В более поздних исследованиях, проведённых на территории Ирана, от диких буйволов были выделены изоляты BoHV-1 [6].

Очень высокая серопревалентность диких жвачных к BoHV-1 была выявлена в Колумбии. Она составила 94,7% [7].

В Австралии учёные в 2009 г. постарались проследить связь серопревалентности интродуцированных диких оленей к BoHV-1 с интенсивностью домашнего животноводства в этом же районе. На основании результатов качественного анализа рисков авторы пришли к выводу, что вероятность инфицирования домашнего скота при прямом контакте с дикими парнокопытными жвачными животными является очень высокой [8]. Однако этот вывод требует дополнительных подтверждений.

Надо отметить, что значительный антигенный перекрёст не позволяет дифференцировать BoHV-1 от антигенно родственных α -герпесвирусов, которые могут встречаться у диких жвачных копытных [9–11]. Дело в том, что BoHV-1 входит в кластер близкородственных вирусов семейства Alphaherpesvirinae, включающий, помимо этого вируса и герпесвируса КРС 5-го типа (BoHV-5), ещё несколько вирусов жвачных парнокопытных, например, герпесвирус буйвола 1-го типа (BuHV-1), герпесвирус коз 1-го ти-

па (CpHV-1), герпесвирус оленей 1-го типа (CvHV-1), герпесвирус оленей 2-го типа (CvHV-2) и герпесвирус лосей 1-го типа (ElkHV-1) [12]. Таким образом, антитела в организме диких животных могут вырабатываться в ответ на инфицирование любым вирусом рассматриваемой группы.

В отношении распространённости разных пестивирусов в популяциях диких жвачных копытных животных информации в научной литературе значительно меньше. Род *Pestivirus*, в который входит возбудитель ВД КРС, с 2018 г. решением Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) разделён на 11 видов, а ранее выделяемые BVDV 1, 2 и 3-го типа (BVDV-1, -2, -3), вирус классической чумы свиней (КЧС, CSFV) и вирус пограничной болезни (BDV) отнесены к отдельным видам: *Pestivirus A* (ранее – BVDV-1), *Pestivirus B* (BVDV-2), *Pestivirus C* (CSFV), *Pestivirus D* (BDV), *Pestivirus H* (BVDV-3, HoBi-like pestivirus) [13].

Несмотря на антигенное родство, описанное ещё в 1960-е гг. для BVDV и вируса КЧС [14], диапазон естественных хозяев вируса КЧС ограничивается домашними свиньями и дикими кабанами, в то время как BVDV-1 и BVDV-2 (*Pestivirus A* и *B*) и BDV способны проникать через межвидовые барьеры и заражать широкий круг парнокопытных [15].

Большинство исследователей диких парнокопытных животных изучают исключительно распространённость BVDV-1, и объём подобных исследований в популяциях в мире не менее значителен, чем в отношении BoHV-1. Ещё в 1983 г. L.G. Doyle и W.P. Heuschele опубликовали результаты исследования диких парнокопытных зоопарковых животных на наличие антител к вирусу BVDV. Серопревалентность животных, не вакцинированных против ВД КРС, составила 4,3% [16].

В более поздних исследованиях американским учёным удалось изолировать нецитопатический вирус против ВД КРС типа 1a из материала, отобранного от годовалой самки оленя-мула (*Odocoileus hemionus*) из северо-западного Вайоминга (США). Это второй описанный в литературе случай изоляции BVDV от свободно живущих оленей в Северной Америке и первый от оленя этого вида. Дополнительные серологические исследования, проведённые авторами в популяции *Odocoileus hemionus*, позволили установить, что общая серопревалентность к BVDV достигает 60% [17].

В 2008 г. исследователи, изучив в эксперименте восприимчивость к BVDV белохвостого оленя (*Odocoileus virginianus*), указали на необходимость корректировки программ борьбы с ВД КРС на территории США с учётом дальнейшего изучения эпизоотической ситуации по этой болезни в дикой фауне [18].

Ряд последующих исследований, проведённых европейскими учёными, позволил определить дополнительный круг диких парнокопытных животных, которые могут быть естественными резервуарами BVDV, а также установить возможность передачи возбудителя ВД от диких парнокопытных животных

домашнему КРС и наоборот. В 2006 г. в Германии подтверждена возможность естественного заражения КРС от экспериментально инфицированного мышного оленя (*Tragulus javanicus*) [19].

J. Casaubon и соавт. в 2012 г. впервые детектировали генетический материал BVDV у альпийской серны (*Rupicapra rupicapra*) в Швейцарии. По итогам проведенной работы авторы сделали вывод, что инфицирование BVDV швейцарских диких жвачных животных носит спорадический характер, в связи с чем дикие жвачные в настоящее время являются случайными переносчиками вируса, а не резервуарами для BVDV в Швейцарии [20].

К разным выводам пришли испанские учёные в 2016 и 2019 гг. X. Fernández-Aguilar и соавт. полагают, что пестивирусные инфекции у диких жвачных животных спорадические и, скорее всего, дикие животные заражаются исключительно от домашнего скота, а не наоборот [21]. В то же время V. Rodríguez-Prieto и соавт. утверждают, что BVDV циркулирует между популяциями КРС и благородного оленя (*Cervus elaphus*) и необходимы дальнейшие исследования для изучения роли благородного оленя как резервуара BVDV [22]. С этим выводом согласны и итальянские учёные, которые в 2019 г. сделали вывод о широком распространении BVDV в дикой фауне. Субгенотип BVDV-1c был впервые обнаружен у косули (*Capreolus capreolus*) и апеннинской серны (*Rupicapra pyrenaica ornata*) в Центральной Италии. В связи с этим авторы призывают к более детальному изучению роли этих животных в эпизоотологии ВД КРС [23].

Помимо исследований, посвящённых изучению распространения конкретного возбудителя, в литературе не менее широко описаны случаи регистрации ассоциаций возбудителей вирусной природы в одной и той же популяции диких парнокопытных животных. В частности, довольно часто встречаются упоминания об одновременном выявлении BoHV-1 и BVDV [24, 25].

Результаты приведённых исследований свидетельствуют о том, что BoHV-1 и BVDV в разной мере присутствуют в популяции диких жвачных животных по всему миру, в то время как в работах отечественных учёных этот вопрос затрагивается только поверхностно, а полномасштабные исследования распространённости вирусных патогенов КРС в популяции диких жвачных животных России единичны [26, 27].

Целью данной работы было изучение распространённости α -герпесвирусов КРС и пестивирусов КРС в популяции диких парнокопытных животных Московской области.

Материалы и методы

Пробы патологического материала (кусочки паренхиматозных органов, смывы со слизистой оболочки носовой полости, кровь из сердца) отбирались от диких парнокопытных животных, отстрелянных в зимние сезоны охоты 2019–2022 гг. на территории Московской области. Отбор проб проводили посмертно

ветеринарные врачи Государственной ветеринарной службы Московской области. Всего было отобрано 460 проб от 124 животных, в том числе:

- от 99 лосей (*Alces alces*);
- 15 косуль (*Capreolus capreolus*);
- 10 животных без информации о виде.

Все особи на основе морфологических характеристик (размер тела, износ зубов, рост рогов) были разделены на три возрастные категории: оленёнок (менее 1 года), годовалый (от 1 до 2 лет) и взрослый (более 2 лет). Большинство животных были взрослыми особями ($n = 68$), значительно меньше исследовано годовалых ($n = 16$) и оленят ($n = 14$). Для 26 животных примерный возраст в сопроводительных документах не был указан. Самцы ($n = 55$) и самки ($n = 54$) были представлены практически одинаково, в 26 случаях, включённых в исследование, половая принадлежность животных в сопроводительных документах была не указана.

От указанных животных был исследован 371 образец внутренних органов (носовая перегородка, верхние кольца трахеи, кусочки лёгкого, сердца, печени, почки), 48 проб смывов со слизистых и 41 проба сыворотки крови (кровь отбиралась посмертно пункцией полостей сердца). Образцы замораживали при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. В ходе пробоподготовки из тканей органов вырезали фрагмент объемом 1 см^3 , который измельчали на гомогенизаторе Homogenizer type 302 (Mechanika Precyzyjna, Польша) в 10 мл физиологического раствора с добавлением 100 мг стрептомицина и 100 ЕД пенициллина. В дальнейшем гомогенат центрифугировали на центрифуге ОПН-8УХЛ4.2 (Россия) при 3000 об/мин в течение 5 мин, супернатант отбирали и использовали для дальнейших исследований.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с “Consensus author guidelines for animal use” (IAVES 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (Протокол № 125 от 16 апреля 2020 г.).

Культура клеток. Для репродукции вирусов использовалась перевиваемая культура клеток почки телёнка (MDBK).

Вирус. В работе использовался полевой изолят вируса ИРТ КРС «Куйбышев-2006» и цитопатогенный штамм вируса ВД КРС Т-04 из коллекции ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук».

Культивирование клеток. Культивирование проводили в полистироловых культуральных матрасах с площадью роста 75 см^2 и неvented крышкой в условиях термостата при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. В качестве ростовой питательной среды использовали среды Игла DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 7% сыво-

ротки КРС (HyClone, США). Пересев культуры проводили 1 раз в неделю в соотношении 1 : 4.

Заражение культуры вирусами. Заражение культуры клеток проводили после формирования полного монослоя на 1–2-й день после посева клеток. Ростовую питательную среду сливали. Клеточный монослой дважды отмывали питательной средой Игла DMEM. После этого в матрас вносили вирусосодержащий материал из расчета 1,0 ТЦД₅₀/кл и помещали в термостат при 37 °С на 1 ч. Через 1 ч содержимое матраса сливали, а в матрас вносили поддерживающую питательную среду (Игла DMEM без добавления сыворотки) без предварительного промывания монослоя. После этого матрас помещался в отдельный термостат при 37 °С. Цитопатическое действие вирусов учитывали ежедневно визуально под малым увеличением инвертированного микроскопа до отслоения большей части монослоя от субстрата. Вирусосодержащую суспензию использовали в дальнейших исследованиях. Определение инфекционного титра вируса проводили по методу Рида и Менча.

Реакция нейтрализации. Реакцию нейтрализации с постоянной дозой вируса 2 lg ТЦД₅₀/мл проводили микротитром, используя полистироловые 96-луночные культуральные планшеты. Каждая проба сыворотки крови исследовалась в двух повторах по три разведения в каждом (1 : 2 – 1 : 8). Результаты учитывали через 72 ч после постановки реакции. Учитывая низкое качество и количество сыворотки в предоставленных пробах, а также невозможность повторного отбора проб у тех же животных, учёт результатов реакции проводился качественно (без расчёта титра антител в исследуемой сыворотке). Животное считалось серопозитивным при получении положительного результата (отсутствие цитопатического действия вируса) хотя бы в первом разведении сыворотки одного из повторов.

Полимеразная цепная реакция. Выделение нуклеиновых кислот проводили из 100 мкл образца с помощью набора «РИБО-преп» (ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора» (ЦНИИЭ), Россия) по инструкции производителя. ПЦР для выявления ДНК герпесвирусов КРС проводили с использованием тест-системы «РИНОКОР» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия). Для идентификации родственных α -герпесвирусов проводили амплификацию участка гена *gB* вирусов с использованием гнездовой ПЦР с праймерами CR30, CR31, CR32, CR33 [28]. Первый раунд с праймерами CR30, CR31 проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2,5× PCR-mix2 blue («АмплиСенс», Россия), 0,25 мМ dNTP, 0,6 мкМ прямого и обратного праймера и 10 мкл выделенной из образца ДНК. Реакцию проводили в амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) по следующей программе: 5 мин–95 °С, 40 циклов (20 сек–95 °С, 20 сек–61 °С, 30 сек – 72 °С), 5 мин – 72 °С. Второй раунд с праймерами CR32, CR33 проводили в аналогичной смеси по программе: 5 мин – 95 °С, 40 циклов (20 сек–95 °С, 20 сек–63 °С, 20 сек–72 °С), 5 мин–72 °С с использованием в качестве матрицы 1 мкл реакционной смеси первого раунда.

Секвенирование очищенных ампликонов проводили с использованием набора реагентов BrilliantDye V3.1 на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies, США). Полученные нуклеотидные последовательности анализировали с помощью алгоритма BLAST на поисковом интернет-ресурсе National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Для выявления генетического материала BVDV использовали методику, разработанную в ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» для выявления генетического материала вирусов рода *Pestivirus* (групп А, В, С, D, H) в ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени [29]. Амплификацию и детекцию продуктов ПЦР и ОТ-ПЦР проводили в режиме реального времени на приборе RotorGene Q (QIAGEN GmbH, Германия).

Статистическая обработка результатов. Статистическая обработка результатов и построение диаграмм проводились в программе Microsoft Excel 2016.

Картографический анализ. Карты строили в программе ArcGIS10.8.

Результаты

Из 124 парнокопытных, добытых на территории Московской области, пробы сыворотки крови отобраны только у 41 животного, в том числе от 36 лосей и 5 косуль. Трудности с отбором были связаны с большим промежутком времени между гибелью животного и проведённым отбором проб, а также с низкой температурой воздуха в зимний период, что приводило к частичному гемолизу крови, полученному незначительному объёму сыворотки и, как следствие, определённым трудностями при её исследовании в реакции нейтрализации. В образцах сыворотки 19 животных (16 лосей, 3 косули) были детектированы антитела к α -герпесвирусам КРС. Антитела к пестивирусам КРС детектированы в сыворотке крови 12 лосей. При этом антитела к обоим группам возбудителей определены в сыворотке крови 8 лосей.

В результате молекулярно-генетических исследований (ПЦР) 371 образца патологического материала и 48 проб смывов со слизистых от 124 диких парнокопытных, добытых на территории Московской области, ДНК α -герпесвирусов КРС была выявлена в образцах от 5 животных:

– в носовых смывах 2 косуль, добытых в 2019 г. на территории г.о. Луховицы;

– в образцах органов 2 лосей (в образце лёгкого одного, а также в образцах почки и сердца другого животного), добытых в 2022 г. на территории г.о. Ступино;

– в носовом смыве 1 косули, добытой в 2022 г. на территории г.о. Серпухов.

Анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *gB*, полученных в результате секвенирования продуктов ПЦР с общими для α -герпесвирусов праймерами, подтвердили наличие ДНК ВоHV-5 в образце носового смыва от косули и ДНК ВоHV-1 в двух пробах

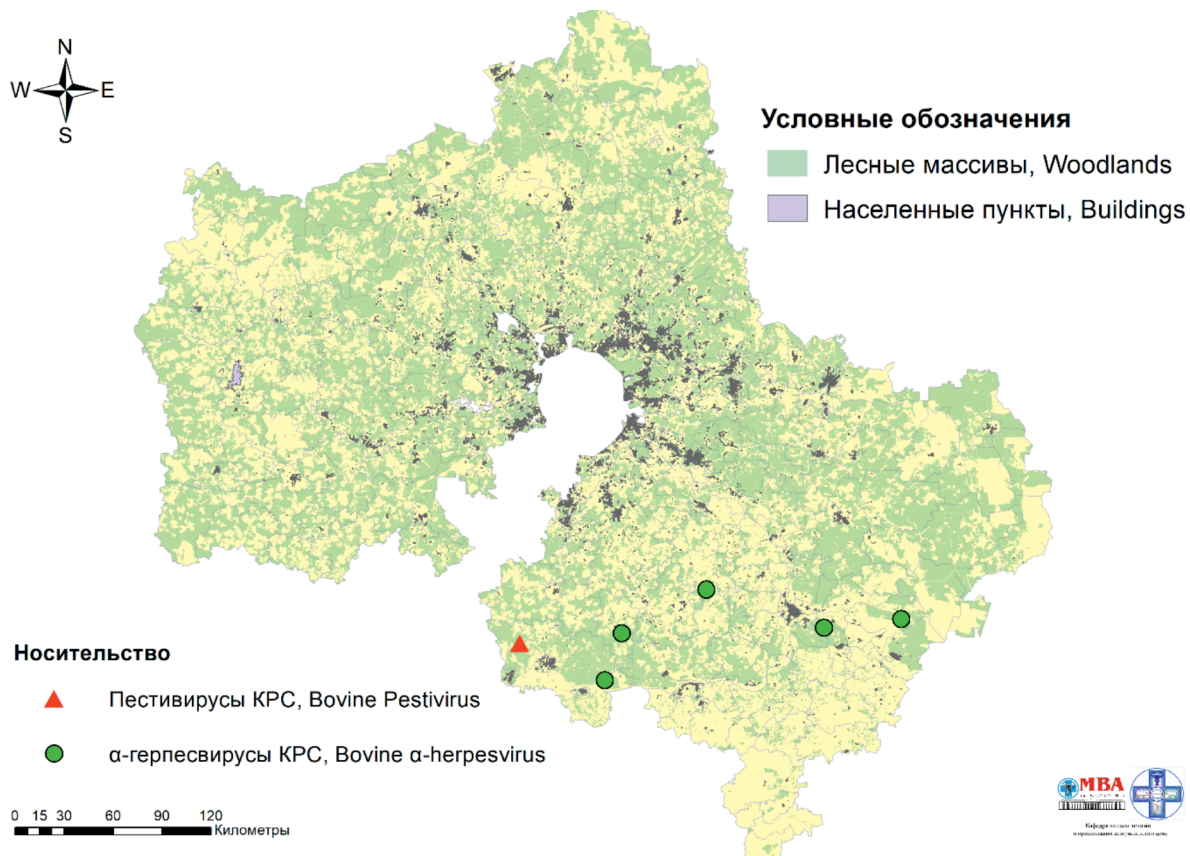


Рис. 1. Места добычи животных, в материале которых детектирован генетический материал α-герпесвирусов КРС и пестивирусов КРС, в Московской области.

Fig. 1. Locations in Moscow Region where were shot animals in which samples the genetic material of cattle α-herpesviruses and cattle pestiviruses has been detected.

органов лосей, отстрелянных в 2022 г. Для проб животных, добытых в 2019 г., из-за низкого качества образцов не удалось провести идентификацию вирусов герпеса.

В носовом смыве лося, добытого в 2022 г. на территории г.о. Серпухов, детектирован генетический материал BVDV.

Локация добычи указанных животных отображена на карте Московской области (рис. 1).

Обсуждение

Результаты, полученные в ходе исследования проб патологического материала от диких парнокопытных животных на территории Московской области, позволяют утверждать о циркуляции α-герпесвирусов КРС и пестивирусов КРС среди этих животных.

По результатам серологических исследований, общая серопревалентность диких парнокопытных Московской области к α-герпесвирусу КРС составила 46%. Серопревалентность к пестивирусам КРС составила 29%. Эти цифры варьируют в разных районах и городских округах области, но в целом положительные результаты были выявлены в районах наибольшего числа отобранных проб (рис. 2 и 3).

Антитела к α-герпесвирусам КРС и пестивирусам КРС чаще детектировали у взрослых животных (11 и 5 положительных проб соответственно), чем у оле-

нят (6 и 4 положительные пробы соответственно), количество серопозитивных самцов и самок было практически одинаковым. Реже всего антитела выявляли у годовалых животных (2 и 1 положительная проба). Кроме того, антитела к пестивирусам КРС детектированы у 2 животных, возрастная категория которых не была определена из-за отсутствия соответствующей информации (рис. 4). Полученные различия в серопозитивности возрастных групп животных можно объяснить неравномерностью выборки, а также особенностями социальной структуры групп оленей в зимнее время, которые были описаны нами ранее [30].

К сожалению, только по результатам серологических исследований, несмотря на факт отсутствия вакцинации, мы не можем точно установить носительство дикими парнокопытными Московской области возбудителя ИРТ КРС – герпесвируса КРС 1-го типа. Детектированные нами в 46% исследованных проб антитела могли выработаться в организме в ответ на инфицирование любым α-герпесвирусом КРС. Для точной дифференциации J. Thiru и соавт. в своей работе рекомендует проводить идентификацию предварительно изолированного из патологического материала возбудителя в реакции иммунофлуоресценции с моноклональными антителами [12]. Но в нашей работе изоляция возбудителей из патологического материала не проводилась.

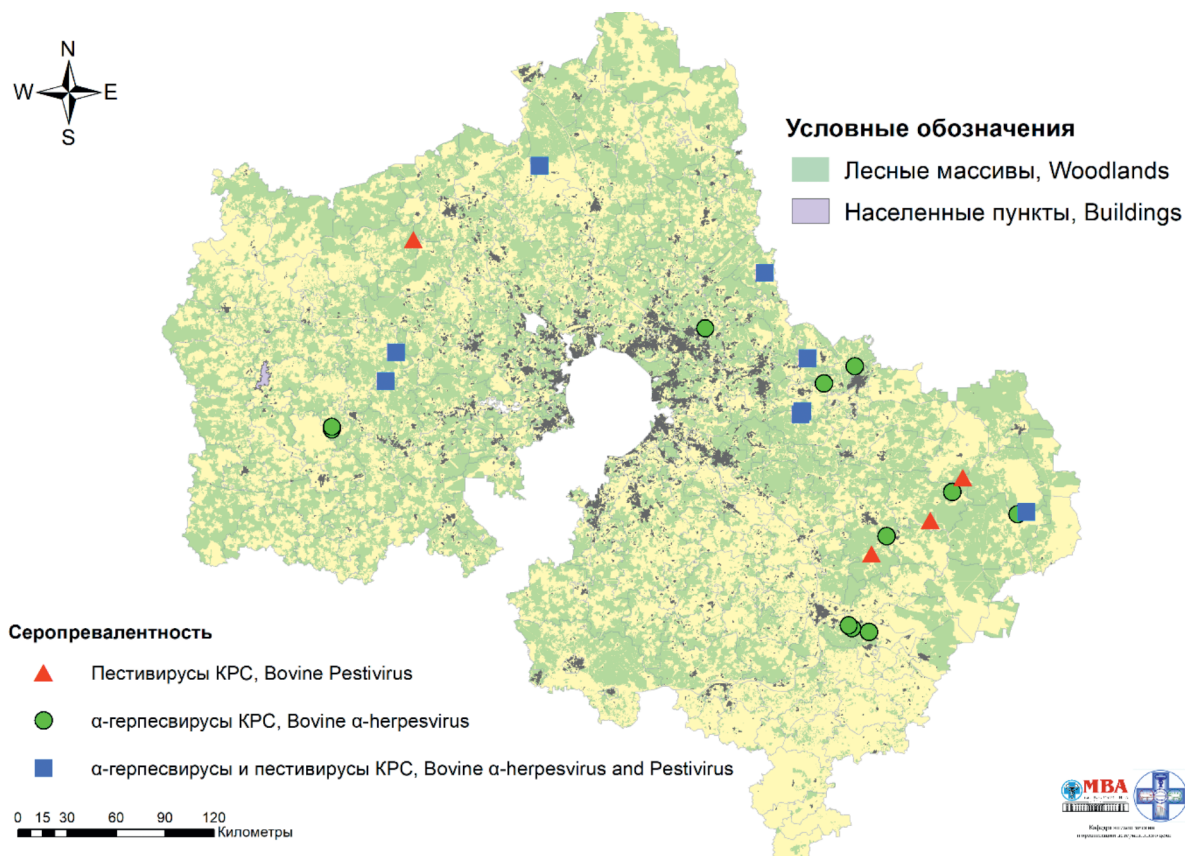


Рис. 2. Места отстрела животных, в сыворотке крови которых детектированы антитела к α-герпесвирусам КРС и пестивирусам КРС, в Московской области.

Fig. 2. Locations in Moscow Region where were shot animals in which sera antibodies to cattle α-herpesviruses and cattle pestiviruses have been detected.

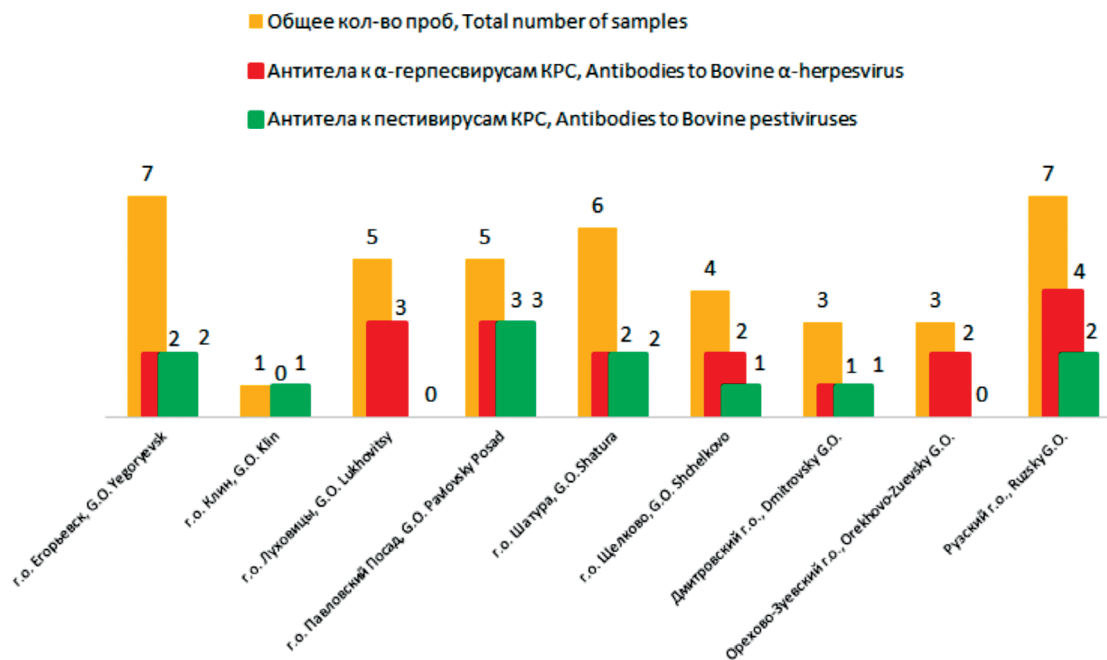


Рис. 3. Регионы Московской области, где проведён отбор проб сыворотки крови и сравнение общего количества исследованных проб и проб, в которых детектированы антитела к α-герпесвирусам КРС и пестивирусам КРС.

Fig. 3. Territories of the Moscow Region where serum samples were obtained and the comparison of total number of samples studied and samples in which antibodies to cattle α-herpesviruses and cattle pestiviruses were detected.

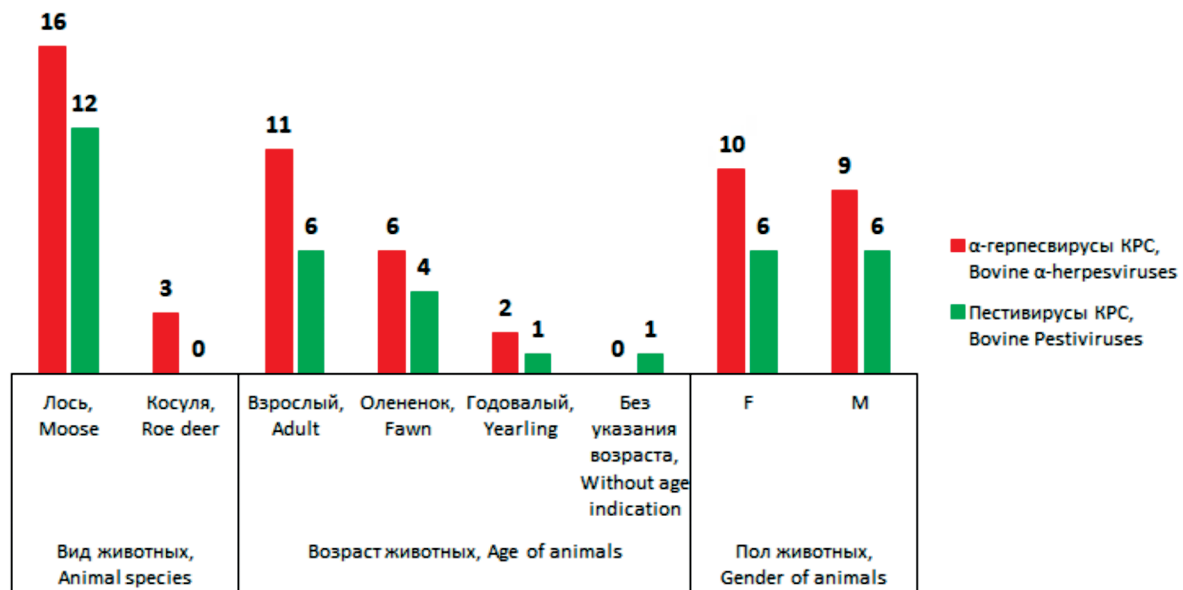


Рис. 4. Распределение общего количества проб сыворотки крови к количеству проб, в которых детектированы антитела к α-герпесвирусам КРС и пестивирусам КРС, по видовым, возрастным и половым особенностям добытых животных.

Fig. 4. Distribution of the serum samples in which antibodies to cattle α-herpesviruses of and cattle pestiviruses of were detected, in general and depending on species, age and gender characteristics of the animals.

Тем не менее мы с уверенностью можем утверждать, что герпесвирусы КРС 1-го и 5-го типа циркулируют в популяции диких парнокопытных животных на территории Московской области. Об этом говорит факт детекции генетического материала этих возбудителей в образцах материала от 3 диких парнокопытных животных. Специфичность ПЦР-исследований и описанная возможность молекулярно-генетической дифференциации родственных α-герпесвирусов, на которую указывают многие иностранные авторы [28, 31, 32], позволяет нам предположить, что циркуляция возбудителя ИРТ КРС возможна у диких копытных и на других территориях Московской области, на которых сконцентрировано относительно большее количество животных.

Факт детекции антител к пестивирусам КРС в 12 пробах сыворотки крови (серопревалентность 29%) и генетического материала BVDV в образце от одного животного говорит о циркуляции BVDV в популяции диких жвачных парнокопытных Московской области.

Заключение

По результатам наших исследований, серопревалентность диких парнокопытных Московской области к α-герпесвирусам КРС выше, чем к пестивирусам КРС. Антитела к α-герпесвирусам детектированы в 46% исследуемых проб сыворотки крови диких животных, к пестивирусам – в 29%. Такое соотношение положительных проб коррелируют с данными, полученными европейскими коллегами в разных странах [21, 25], что в целом позволяет согласиться с их выводами о роли диких жвачных животных как резервуар-

ных хозяев исследуемых возбудителей: скорее всего, дикие жвачные могут быть естественным резервуаром BoHV-1 и других α-герпесвирусов, и этот факт необходимо учитывать при организации мероприятий по контролю и ликвидации ИРТ КРС в животноводческих хозяйствах. В связи с более редкими случаями инфицирования оленей BVDV для выводов о роли диких парнокопытных животных в эпизоотологии ВД КРС необходимы дополнительные исследования.

ЛИТЕРАТУРА

- Evans A.L., das Neves C.G., Finstad G.F., Beckmen K.B., Skjerve E., Nymo I.H., et al. Evidence of alphaherpesvirus infections in Alaskan caribou and reindeer. *BMC Vet. Res.* 2012; 8: 5. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-5>
- Han Z., Gao J., Li K., Shahzad M., Nabi F., Zhang D., et al. Prevalence of circulating antibodies to bovine herpesvirus 1 in yaks (*Bos grunniens*) on the Qinghai-Tibetan plateau, China. *J. Wildl. Dis.* 2016; 52(1): 164–7. <https://doi.org/10.7589/2015-01-018>
- Maidana S.S., Konrad J.L., Craig M.I., Zabal O., Mauroy A., Thiry E., et al. First report of isolation and molecular characterization of bubaline herpesvirus 1 (BuHV1) from Argentinean water buffaloes. *Arch. Virol.* 2014; 159(11): 2917–23. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2146-8>
- Rola J., Larska M., Socha W., Rola J.G., Materniak M., Urban-Chmiel R., et al. Seroprevalence of bovine herpesvirus 1 related alphaherpesvirus infections in free-living and captive cervids in Poland. *Vet. Microbiol.* 2017; 204: 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.006>
- Hemmatzadeh F., Boardman W., Alinejad A., Hematizade A., Moghadam M.K. Molecular and serological survey of selected viruses in free-ranging wild ruminants in Iran. *PLoS One.* 2016; 11(12): e0168756. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168756>
- Hedayat N., Haji Hajikolaei M.R., Seyfi Abad Shapouri M.R., Ghadrddan Mashhadi A.R., Izadnia H., Daghari M. Isolation and identification of bubaline herpesvirus 1 (BuHV-1) from latently infected water buffalo (*Bubalus bubalis*) from Iran. *Trop. Anim. Health Prod.* 2020; 52(1): 217–26. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02007-9>

7. Conner M.M., Ebinger M.R., Blanchong J.A., Cross P.C. Infectious disease in cervids of North America: data, models, and management challenges. *Ann. NY Acad. Sci.* 2008; 1134: 146–72. <https://doi.org/10.1196/annals.1439.005>
8. Cripps J.K., Pacioni C., Scroggie M.P., Woolnough A.P., Ramsey D.S.L. Introduced deer and their potential role in disease transmission to livestock in Australia. *Mammal. Rev.* 2019; 49(1): 60–77. <https://doi.org/10.1111/mam.12142>
9. Lyaku J.R., Nettleton P.F., Marsden H. A comparison of serological relationships among five ruminant alphaherpesviruses by ELISA. *Arch. Virol.* 1992; 124(3–4): 333–41. <https://doi.org/10.1007/BF01309813>
10. Martin W.B., Castrucci G., Frigeri F., Ferrari M. A serological comparison of some animal herpesviruses. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1990; 13(2): 75–84. [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(90\)90519-y](https://doi.org/10.1016/0147-9571(90)90519-y)
11. Nixon P., Edwards S., White H. Serological comparisons of antigenically related herpesviruses in cattle, red deer and goats. *Vet. Res. Commun.* 1988; 12(4–5): 355–62. <https://doi.org/10.1007/BF00343256>
12. Thiry J., Keuser V., Muylkens B., Meurens F., Gogev S., Vanderplassen A., et al. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Vet. Res.* 2006; 37(2): 169–90. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005052>
13. International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV. Available at: <https://ictv.global/taxonomy>
14. Darbyshire J.H. A serological relationship between swine fever and mucosal disease of cattle. *Vet. Rec.* 1960; 72: 331.
15. Becher P., Ramirez R.A., Orlich M., Rosales S.C., Konig M., Schweizer M., et al. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology.* 2003; 311(1): 96–104. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(03\)00192-2](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(03)00192-2)
16. Doyle L.G., Heuschele W.P. Bovine viral diarrhea virus infection in captive exotic ruminants. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1983; 183(11): 1257–9.
17. Van Campen H., Ridpath J., Williams E., Cavender J., Edwards J., Smith S., et al. Isolation of bovine viral diarrhea virus from a free-ranging mule deer in Wyoming. *J. Wildl. Dis.* 2001; 37(2): 306–11. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-37.2.306>
18. Duncan C., Ridpath J., Palmer M.V., Driskell E., Spraker T. Histopathologic and immunohistochemical findings in two white-tailed deer fawns persistently infected with Bovine viral diarrhea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2008; 20(3): 289–96. <https://doi.org/10.1177/104063870802000305>
19. Utenthal A., Hoyer M.J., Grøndahl C., Houe H., van Maanen C., Rasmussen T.B., et al. Vertical transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in mousedeer (*Tragulus javanicus*) and spread to domestic cattle. *Arch. Virol.* 2006; 151(12): 2377–87. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0818-8>
20. Casaubon J., Vogt H.R., Stalder H., Hug C., Ryser-Degiorgis M.P. Bovine viral diarrhea virus in free-ranging wild ruminants in Switzerland: low prevalence of infection despite regular interactions with domestic livestock. *BMC Vet. Res.* 2012; 8: 204. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-204>
21. Fernández-Aguilar X., López-Olvera J.R., Marco I., Rosell R., Colom-Cadena A., Soto-Heras S., et al. Pestivirus in alpine wild ruminants and sympatric livestock from the Cantabrian Mountains, Spain. *Vet. Rec.* 2016; 178(23): 586. <https://doi.org/10.1136/vr.103577>
22. Rodríguez-Prieto V., Kukielka D., Rivera-Arroyo B., Martínez-López B., de las Heras A.I., Sánchez-Vizcaino J.M., et al. Evidence of shared bovine viral diarrhea infections between red deer and extensively raised cattle in south-central Spain. *BMC Vet. Res.* 2016; 12: 11. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0630-3>
23. Ricci S., Bartolini S., Morandi F., Cuteri V., Prezioso S. Genotyping of pestivirus A (Bovine Viral Diarrhea Virus 1) detected in faeces and in other specimens of domestic and wild ruminants at the wildlife-livestock interface. *Vet. Microbiol.* 2019; 235: 180–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.07.002>
24. Fabisiak M., Sałamaszyńska A., Stądziejek T. Detection of seroconversion to bovine herpesvirus 1 related alphaherpesvirus and bovine viral diarrhea virus in Polish free-living deer. *Pol. J. Vet. Sci.* 2018; 21(3): 437–40. <https://doi.org/10.24425/122615>
25. Lillehaug A., Vikoren T., Larsen I.L., Akerstedt J., Tharaldsen J., Handeland K. Antibodies to ruminant alpha-herpesviruses and pestiviruses in Norwegian cervids. *J. Wildl. Dis.* 2003; 39(4): 779–86. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.4.779>
26. Юров К.П., Гулюкин М.И. Контроль и пути оздоровления скота племенных хозяйств и племенных предприятий от инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи. *Российская сельскохозяйственная наука.* 2018; (1): 59–63. EDN: <https://www.elibrary.ru/ovumgb>
27. Шуляк А.Ф., Горбатов А.В., Стаффорд В.В., Лощинин М.Н., Веллико Г.Н., Соколова Н.А. и др. Смешанная инфекция у диких парнокопытных в охотхозяйстве. *Ветеринария: научно-производственный журнал.* 2020; (10): 20–5. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2020.23.10.20-25> EDN: <https://elibrary.ru/jgaust>
28. Ros C., Belák S. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine, and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37(5): 1247–53. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.5.1247-1253.1999>
29. Горбачева Н.С., Яцентюк С.П., Красникова М.С., Козлова А.Д., Брюсова М.Б. Выявление пестивирусной контаминации биопрепаратов методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. В кн.: *Экономически и социально значимые инфекции сельскохозяйственных животных: меры профилактики и борьбы: Материалы Международной научно-практической конференции.* М.; 2022: 145–7.
30. Yatsentyuk S.P., Pchelnikov A.V., Safina E.R., Krasnikova M.S. The first study on the occurrence of bovine herpesviruses in the wild fauna of the Moscow region, Russia. *Vet. World.* 2022; 15(8): 2052–8. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.2052-2058>
31. Lyaku J.R., Vilcek S., Nettleton P.F., Marsden H.S. The distinction of serologically related ruminant alphaherpesviruses by the polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease analysis. *Vet. Microbiol.* 1996; 48(1–2): 135–42. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00136-0](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)00136-0)
32. Ros C., Riquelme M.E., Forslund K.O., Belák S. Improved detection of five closely related ruminant alphaherpesviruses by specific amplification of viral genomic sequences. *J. Virol. Methods.* 1999; 83(1–2): 55–65. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(99\)00103-2](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(99)00103-2)

REFERENCES

1. Evans A.L., das Neves C.G., Finstad G.F., Beckmen K.B., Skjerve E., Nymo I.H., et al. Evidence of alphaherpesvirus infections in Alaskan caribou and reindeer. *BMC Vet. Res.* 2012; 8: 5. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-5>
2. Han Z., Gao J., Li K., Shahzad M., Nabi F., Zhang D., et al. Prevalence of Circulating Antibodies to Bovine Herpesvirus 1 in Yaks (*Bos grunniens*) on the Qinghai-Tibetan Plateau, China. *J. Wildl. Dis.* 2016; 52(1): 164–7. <https://doi.org/10.7589/2015-01-018>
3. Maidana S.S., Konrad J.L., Craig M.I., Zabal O., Mauroy A., Thiry E., et al. First report of isolation and molecular characterization of bubaline herpesvirus 1 (BuHV1) from Argentinean water buffaloes. *Arch. Virol.* 2014; 159(11): 2917–23. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2146-8>
4. Rola J., Larska M., Socha W., Rola J.G., Materniak M., Urban-Chmiel R., et al. Seroprevalence of bovine herpesvirus 1 related alphaherpesvirus infections in free-living and captive cervids in Poland. *Vet. Microbiol.* 2017; 204: 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.006>
5. Hemmatzadeh F., Boardman W., Alinejad A., Hematzaade A., Moghadam M.K. Molecular and Serological Survey of Selected Viruses in Free-Ranging Wild Ruminants in Iran. *PLoS One.* 2016; 11(12): e0168756. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168756>
6. Hedayat N., Haji Hajikolaie M.R., Seyfi Abad Shapouri M.R., Ghadrdan Mashhadi A.R., Izadnia H., et al. Isolation and identification of bubaline herpesvirus 1 (BuHV-1) from latently infected water buffalo (*Bubalus bubalis*) from Iran. *Trop. Anim. Health Prod.* 2020; 52(1): 217–26. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02007-9>
7. Conner M.M., Ebinger M.R., Blanchong J.A., Cross P.C. Infectious disease in cervids of North America: data, models, and management challenges. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008; 1134: 146–72. <https://doi.org/10.1196/annals.1439.005>
8. Cripps J.K., Pacioni C., Scroggie M.P., Woolnough A.P., Ramsey D.S.L. Introduced deer and their potential role in disease transmission to livestock in Australia. *Mammal. Rev.* 2019; 49: 60–77. <https://doi.org/10.1111/mam.12142>

9. Lyaku J.R., Nettleton P.F., Marsden H. A comparison of serological relationships among five ruminant alphaherpesviruses by ELISA. *Arch. Virol.* 1992; 124(3-4): 333–41. <https://doi.org/10.1007/BF01309813>
10. Martin W.B., Castrucci G., Frigeri F., Ferrari M. A serological comparison of some animal herpesviruses. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1998; 13(2): 75–84. [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(90\)90519-y](https://doi.org/10.1016/0147-9571(90)90519-y)
11. Nixon P., Edwards S., White H. Serological comparisons of antigenically related herpesviruses in cattle, red deer and goats. *Vet. Res. Commun.* 1988; 12(4-5): 355–62. <https://doi.org/10.1007/BF00343256>
12. Thiry J., Keuser V., Muylkens B., Meurens F., Gogev S., Vanderplasschen A., et al. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Vet. Res.* 2006; 37(2): 169–90. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005052>
13. International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV. Available at: <https://ictv.global/taxonomy>
14. Darbyshire J.H. A serological relationship between swine fever and mucosal disease of cattle. *Veterinary Record.* 1960; 72: 331.
15. Becher P., Ramirez R.A., Orlich M., Rosales S.C., König M., Schweizer M., et al. Thiel Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology.* 2003; 311: 96–104.
16. Doyle L.G., Heuschele W.P. Bovine viral diarrhoea virus infection in captive exotic ruminants. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1983; 183(11): 1257–9.
17. Van Campen H., Ridpath J., Williams E., Cavender J., Edwards J., Smith S., et al. Isolation of bovine viral diarrhoea virus from a free-ranging mule deer in Wyoming. *J. Wildl. Dis.* 2001; 37(2): 306–11. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-37.2.306>
18. Duncan C., Ridpath J., Palmer M.V., Driskell E., Spraker T. Histopathologic and immunohistochemical findings in two white-tailed deer fawns persistently infected with Bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2008; 20(3): 289–96. <https://doi.org/10.1177/104063870802000305>
19. Uttenthal A., Hoyer M.J., Grøndahl C., Houe H., van Maanen C., Rasmussen T.B., et al. Vertical transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in mousedeer (*Tragulus javanicus*) and spread to domestic cattle. *Arch. Virol.* 2006; 151(12): 2377–87. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0818-8>
20. Casaubon J., Vogt H.R., Stalder H., Hug C., Rysler-Degiorgis M.P. Bovine viral diarrhoea virus in free-ranging wild ruminants in Switzerland: low prevalence of infection despite regular interactions with domestic livestock. *BMC Vet. Res.* 2012; 8: 204. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-204>
21. Fernández-Aguilar X., López-Olvera J.R., Marco I., Rosell R., Colom-Cadena A., Soto-Heras S., et al. Pestivirus in alpine wild ruminants and sympatric livestock from the Cantabrian Mountains, Spain. *Vet. Rec.* 2016; 178(23): 586. <https://doi.org/10.1136/vr.103577>
22. Rodríguez-Prieto V., Kukielka D., Rivera-Arroyo B., Martínez-López B., de las Heras A.I., Sánchez-Vizcaíno J.M., et al. Evidence of shared bovine viral diarrhoea infections between red deer and extensively raised cattle in south-central Spain. *BMC Vet. Res.* 2016; 12: 11. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0630-3>
23. Ricci S., Bartolini S., Morandi F., Cuteri V., Prezioso S. Genotyping of Pestivirus A (Bovine Viral Diarrhoea Virus 1) detected in faeces and in other specimens of domestic and wild ruminants at the wild-life-livestock interface. *Vet. Microbiol.* 2019; 235: 180–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.07.002>
24. Fabisiak M., Sałamaszyńska A., Stajek T. Detection of seroconversion to bovine herpesvirus 1 related alphaherpesvirus and bovine viral diarrhoea virus in Polish free-living deer. *Pol. J. Vet. Sci.* 2018; 21(3): 437–40. <https://doi.org/10.24425/122615>
25. Lillehaug A., Vikøren T., Larsen I.L., Akerstedt J., Tharaldsen J., Handeland K. Antibodies to ruminant alpha-herpesviruses and pestiviruses in Norwegian cervids. *J. Wildl. Dis.* 2003; 39(4): 779–86. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.4.779>
26. Yurov K.P., Gulyukin M.I. Control and ways cattle of improvement of breederies and treatments from infectious bovine rinotracheitis and bovine viral diarrhoea. *Rossiyskaya sel'skokhozyaystvennaya nauka.* 2018; (1): 59–63. EDN: <https://www.elibrary.ru/ovumgb> (in Russian)
27. Shulyak A.F., Gorbатов A.V., Stafford V.V., Loshchinin M.N., Velichko G.N., Sokolova N.A., et al. Mixed infection among wild ruminants on hunting grounds. *Veterinariya: nauchno-proizvodstvennyy zhurnal.* 2020; (10): 20–5. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2020.23.10.20-25> EDN: <https://elibrary.ru/jgaust> (in Russian)
28. Ros C., Belák S. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine, and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37(5): 1247–53. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.5.1247-1253.1999>
29. Gorbacheva N.S., Yatsentyuk S.P., Krasnikova M.S., Kozlova A.D., Bryusova M.B. Detection of pestivirus contamination of biological products by RT-PCR in real time. In: *Economically and Socially Significant Infections of Farm Animals: Prevention and Control Measures: Materials of the International Scientific and Practical Conference [Ekonomicheski i sotsial'no znachimye infektsii sel'skokhozyaystvennykh zivotnykh: mery profilaktiki i bor'by: Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii]*. Moscow; 2022: 145–7. (in Russian)
30. Yatsentyuk S.P., Pchelnikov A.V., Safina E.R., Krasnikova M.S. The first study on the occurrence of bovine herpesviruses in the wild fauna of the Moscow region, Russia. *Vet. World.* 2022; 15(8): 2052–8. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.2052-2058>
31. Lyaku J.R., Vilcek S., Nettleton P.F., Marsden H.S. The distinction of serologically related ruminant alphaherpesviruses by the polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease analysis. *Vet. Microbiol.* 1996; 48(1-2): 135–42. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00136-0](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)00136-0)
32. Ros C., Riquelme M.E., Forslund K.O., Belák S. Improved detection of five closely related ruminant alphaherpesviruses by specific amplification of viral genomic sequences. *J. Virol. Methods.* 1999; 83(1-2): 55–65. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(99\)00103-2](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(99)00103-2)