

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КАЗАНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ  
МЕДИЦИНЫ ИМЕНИ Н.Э. БАУМАНА»

На правах рукописи

ДЖАКАИТ ДЖУЛИЕТ АКАМУРАН

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ  
ДИАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗА И ТУБЕРКУЛЕЗА  
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

Специальность: 06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:  
доктор ветеринарных наук,  
доцент Т.Р. Якупов.

Казань - 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>1 ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	11
2.1 Возбудитель лейкоза крупного рогатого скота и его структура.....	11
2.2 Эпизоотология лейкоза крупного рогатого скота.....	14
2.2.1 Эпизоотическая ситуация лейкоза крупного рогатого скота в РФ и РТ.....	17
2.2.2 Эпизоотическая ситуация лейкозо крупного рогатого скота в мире и в Африкею.....	19
2.3 Прижизненная диагностика лейкоза крупного рогатого скота.....	20
2.3.1 Клиническая диагностика.....	20
2.3.2 Серологическая диагностика.....	22
2.3.3 Гематологический метод и метод биопробы.....	25
2.3.4 Полимеразная цепная реакция.....	27
2.4 Этиология и эпизоотология туберкулеза крупного рогатого скота.....	28
2.5 Диагностика туберкулеза крупного рогатого скота.....	30
2.6 Диагностическая ценность дот-блот ИФА.....	37
<b>3 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ</b> .....	39
3.1 Материалы иметоды и исследований.....	39
3.2 Результаты собственных исследований.....	46
3.2.1 Иммуноферментный анализ в диагностике лейкоза крупного рогатого скота.....	46
3.2.2 Влияние термической обработки проб сыворотки крови на чувствительность метода ИФА рогатого скота.....	49
3.2.3 Выделение и характеристика антигенных компонентов вируса лейкоза крупного рогатого скота.....	53
3.2.4 Сравнительное изучение полученного антигена с коммерческим антигеном ИФА.....	57
3.2.5 Разработка и апробация дот-блот ИФА тест-системы	

для выявления антител к ВЛКРС.....	59
3.2.6 Разработка и апробация дот-блот ИФА тест-системы	
для выявления антител к микобактериям туберкулеза.....	63
<b>4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>66</b>
<b>5 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....</b>	<b>77</b>
<b>6 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>78</b>
<b>7 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....</b>	<b>105</b>
<b>8 ПРИЛОЖЕНИЯ.....</b>	<b>106</b>

## 1 ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Наиболее часто встречающимися хроническими инфекциями в животноводстве являются лейкоз и туберкулез крупного рогатого скота. Они представляют собой важные проблемы как в ветеринарии и животноводстве, так и в экологии и биологии в целом. Своевременная и четкая диагностика является основой оздоровительных и профилактических мероприятий в борьбе с этими инфекциями.

В структуре инфекционной патологии в РФ на долю лейкоза крупного рогатого скота приходится более 50% от других нозологий [21]. Болезнь поражает в первую очередь высокопродуктивных коров, что представляет серьезную угрозу генофонду крупного рогатого скота не только в России, но и в других странах мира [19, 28, 57, 31, 72]. Такая широкая распространенность, а также отсутствие средств профилактики и терапии определяют актуальность научных исследований в борьбе с лейкозом крупного рогатого скота [3, 5, 13, 22, 23, 30, 71, 74, 75].

Туберкулез остается одной из главных инфекционных проблем медицины и ветеринарии в мире [25, 32, 166]. Данная инфекция встречается во многих странах мира, а также начал выявляться и в тех областях, которые раньше считались благополучными по этому заболеванию [113, 115, 130].

На сегодняшний день, основой для проведения профилактических и оздоровительных мероприятий в борьбе с туберкулезом всегда была и остаётся ранняя диагностика этой инфекции. Основным и общепринятым методом диагностики туберкулеза крупного рогатого скота является внутрикожная проба с применением ППД-туберкулина для млекопитающих. Однако главным недостатком данного метода является проблема неспецифических реакций.

Высокая частота обнаружения неспецифических реакций в благополучных по туберкулезу стадах крупного рогатого скота привела к тому, что ранее оправдывавшая себя внутрикожная туберкулиновая проба потеряла значимость как дос-

товерного и эффективного метода прижизненной диагностики туберкулеза. Поэтому, усовершенствование существующих и разработка новых методов диагностики туберкулеза животных является актуальной задачей ветеринарной науки.

По мнению многих исследователей [56, 60, 93] метод иммуноферментного анализа является наиболее перспективным для выявления больных туберкулезом животных. Неоспоримым преимуществом этого метода является то, что позволяет ставить диагноз на туберкулез в лабораторных условиях одновременно у большого количества животных, прост и обладает высокой чувствительностью и специфичностью. В этой связи выделение и изучение антигенных и иммуногенных свойств антигенов микобактерий, специфических антител к ним, вероятности их применения для диагностики туберкулеза, дифференциации неспецифических реакций животных на туберкулин в иммунохимических реакциях является не менее важной задачей, в целях повышения эффективности диагностики, индикации и идентификации возбудителей туберкулеза крупного рогатого скота.

Результаты научных исследований, направленные на совершенствование методов диагностики являются базой для создания современных высокоспецифичных методов выявления инфицированности животных возбудителями лейкоза и туберкулеза и для организации наиболее достоверной системы мер борьбы с этими опасными инфекционными болезнями.

**Степень разработанности темы.** На сегодняшний день единственным наиболее эффективным методом борьбы с лейкозом крупного рогатого скота является его ранняя диагностика, изоляция и методичная выбраковка больных животных с последующим формированием свободного от вируса лейкоза стада.

В ветеринарной науке большое внимание уделяется разработке высокочувствительных методов прижизненной диагностики лейкоза крупного рогатого скота, исследованиям по изучению закономерностей и особенностей инфекционного процесса [13, 15, 20, 21, 22, 28, 29,74].

Возможность и необходимость применения иммунологических методов для диагностики лейкоза крупного рогатого скота, как наиболее чувствительных в сравнении с клинико-гематологическими исследованиями, были показаны многими исследователями [38, 50, 108, 146, 168, 206].

Ветеринарная практика нашей страны располагает большим количеством средств и методов для эффективной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота. По диагностике туберкулеза крупного рогатого скота ветеринарная наука проделала большой и сложный путь постоянного ее совершенствования. В изучение эпизоотологии, диагностики и ликвидации туберкулеза сельскохозяйственных животных огромный вклад внесли многие ученые [10, 26, 32, 39, 86, 115, 130].

Особое внимание уделяется разработке иммунологических методов диагностики туберкулеза. Определение современными методами уровня и спектра противотуберкулезных антител далеко не исчерпало себя в качестве средства иммунодиагностики и характеристики особенностей течения туберкулеза, а сами противотуберкулезные антитела не достаточно используются для характеристики микобактериальных антигенов, приготовления диагностикумов и других целей (56, 89).

**Цели и задачи исследований.** Цель - усовершенствование иммунохимических методов диагностики туберкулеза и лейкоза крупного рогатого скота. В соответствии с целью решались следующие задачи:

1. Определить диагностическую ценность ИФА и РИД при изучении эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в хозяйствах РТ;
2. Изыскать способы повышения чувствительности иммуноферментного анализа в диагностике лейкоза крупного рогатого скота;
3. Разработать способ получения антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота, обеспечивающего индикацию антител к ВЛКРС во всех стадиях развития инфекционного процесса;

4. Изучить антигенную структуру полученных препаратов и антителигенез у крупного рогатого скота к различным его компонентам;

5. Разработать дот-блот ИФА тест-системы для выявления антител к микобактериям туберкулеза и к вирусу лейкоза крупного рогатого скота;

6. Изучить возможности разработанных тест-систем в скрининговых исследованиях для выяснения эпизоотической ситуации в хозяйствах по туберкулезу и лейкозу крупного рогатого скота.

**Научная новизна.** Впервые разработан способ получения антигенов вируса лейкоза крупного рогатого скота, обеспечивающих более полное выявление противолейкозных антител в сыворотках крови крупного рогатого скота, инфицированных вирусом лейкоза, методом иммуноферментного анализа («Способ получения антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота» - патент на изобретение РФ №2564007).

Впервые разработаны тест-системы на основе дот-блот анализа для обнаружения антител к ВЛКРС и микобактериям туберкулеза крупного рогатого скота.

Доказана высокая информативность термообработки проб сыворотки крови как способ повышения чувствительности ИФА при выяснении эпизоотической ситуации хозяйств по лейкозу крупного рогатого скота.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Разработанная методика получения антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота из сыворотки крови больных лейкозом коров позволяет создать иммунохимические тест-системы для прижизненной диагностики лейкоза крупного рогатого скота.

Изучение структуры антигена ВЛКРС, выделенного из крови больных лейкозом коров методом электрофореза и иммуноблот анализа, позволяет идентифицировать различные белковые фракции вируса, что дает возможность изменить подходы к разработке тест-систем для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота.

Разработанные тест-системы на основе дот-блот ИФА для обнаружения антител к микобактериям туберкулеза и вирусу лейкоза крупного рогатого скота позволяют проводить массовые скрининговые исследования животных на лейкоз и туберкулез крупного рогатого скота в полевых условиях для выяснения эпизоотической ситуации в хозяйствах по этим инфекциям.

Результаты научных исследований апробированы в хозяйствах различных районов РТ. На основе результатов исследований подготовлены методические рекомендации по выявлению противолейкозных антител методом иммуноферментного анализа и дот-блот ИФА с использованием антигена из местных штаммов возбудителя, утвержденные НТС ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ (протокол № 8 от 18 октября 2017 г).

**Методология и методы исследования.** Методологические подходы основаны на актуальности, целях и задачах исследований, анализа данных отечественных и зарубежных публикаций по теме диссертации и результатов собственных исследований. В работе использованы биохимические, серологические и иммунологические методы исследований. Подробное описание методологии и методов проведения исследований отражено в главе «Материалы и методы исследований». Для исследования использовали пробы крови и сыворотки крови от крупного рогатого скота из благополучных и неблагополучных по лейкозу и туберкулезу хозяйств Республики Татарстан.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Иммуноферментный анализ (ИФА) - эффективный тест в диагностике лейкоза крупного рогатого скота;
2. Белковые фракции ВЛКРС из сыворотки крови больных лейкозом коров в иммунологических реакциях обеспечивают выявление специфических антител на разных стадиях болезни;
3. Тест-система дот-блот ИФА по чувствительности и специфичности не уступают классическим методам ИФА и пригодны для скрининговых



исследований по выяснению эпизоотической ситуации в хозяйствах по туберкулезу и лейкозу крупного рогатого скота.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов исследований, основных положений и научных выводов диссертации подтверждена фактическими данными, полученными на большом количестве анализированных проб. Проведена статистическая обработка цифрового материала с использованием программы Microsoft Excel 2007, достоверность различий сравниваемых показателей оценивали по порогам вероятности.

Основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на:

- международной научной конференции « Актуальные вопросы зоотехнии и ветеринарной медицины: опыт, проблемы и пути их решения», посвященной 85-летию зоотехнического образования в КГАВМ (Казань, 2015).

- международной научной конференции « Фундаментальные и прикладные проблемы медицины и биологии» (ОАЭ Дубай, 2015).

- международной научной конференции « Современные проблемы ветеринарной и аграрной науки и образования» посвященной 150-летию образования государственной ветеринарной службы России (Казань, 2016).

- международной научной конференции «Инновационные решения в ветеринарной медицине, зоотехнии и биотехнологии в интересах развития агропромышленного комплекса», (Казань, 2017).

- XII международной научно-практической конференции « Наука в современном информационном обществе» (North Charleston, USA, 2017).

**Публикация материалов исследований.** По результатам выполненных исследований, опубликовано 8 научных работ, в том числе 1 патент, 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

**Объём и структура диссертации.** Диссертация изложена на 113 страницах стандартного компьютерного текста, содержит 15 таблиц и 9 рисунков, состоит из

введения, обзора литературы, основного содержания работы, заключения, практических предложений, и приложения.

Библиографический список литературы включает 227 источников, в том числе 137 иностранных.

## 2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1 Возбудитель лейкоза крупного рогатого скота и его структура

Лейкоз крупного рогатого скота - это инфекционная болезнь опухолевой природы с хроническим течением, главным признаком которого является злокачественное возрастание клеток кроветворных органов с нарушением их созревания, что в конечном итоге приводит к диффузной инфильтрации органов этими клетками или проявляются опухоли [2, 27, 46]. Данное заболевание является асимптоматическим у 70% зараженных животных, вызывает развитие персистирующего лимфоцитоза и лимфосаркомы у 30% и 5% зараженных животных соответственно [100, 125].

Этиологическим агентом лейкоза крупного рогатого скота является вирус, который был назван вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) или Bovine Leukemia virus (BLV). Данный вирус относится к семейству *Retroviridae*, подсемейству *Oncoviridae*. Семейство *Retroviridae*, разделено на 7 родов. Чаще всего, у домашних животных встречаются представители рода *Deltaretrovirus*, объединяющий ВЛКРС и Т-лимфотропные вирусы человека (HLTV) типа 1 и 2, вирусы саркомы и лейкоза кошек, павианов, гиббонов и шерстистых обезьян [133, 136, 193], а также род лентивирусов (от лат. *Lenti* – медленный), который в свою очередь подразделяется на 5 подродов, таких как лентивирусы крупного рогатого скота, вирус иммунодефицитов приматов, лентивирусы овец и коз, лентивирусы лошадей, лентивирусы кошек.

Возбудитель лейкоза крупного рогатого впервые выделен в 1969 году [167], но в опытных условиях болезнь была воспроизведена еще в 1916 году на подопытных телятах и взрослых животных путем использования суспензии из лимфатических узлов и крови от больной лейкозом коровы в 1916 г. ВЛКРС был официально признан определяющим фактором в этиологии энзоотического лейкоза на XXI международном симпозиуме по лейкозу крупного рогатого скота.

Таблица 1 - Структура семейства ретровирусов согласно международному комитету по таксономии вирусов.

Род	Типовой вид и некоторые представители родов
Alpharetrovirus	Вирусы лейкоза, саркомы птиц, саркомы Рауса кур
Betaretrovirus	Вирус рака молочных желез мышей, эндогенный ретровирус человека, вирус обезьян Мезон-Пфайзера
Gammaretrovirus	Вирусы саркомы и лейкемии мышей, кошек, приматов
Deltaretrovirus	Вирус лейкемии крупного рогатого скота, лимфотропные вирусы Т-клеток человека (HTLV-1,-2)
Epsilonretrovirus	Вирус саркомы кожи
Lentivirus	Вирус иммунодефицита человека, вирус Мэди/Висна
Spumavirus	Пенящие вирусы человека, обезьян, бычий синцитиальный вирус

Инфекции, вызванные вирусами рода ретровирусов, имеют ряд общих признаков: продолжительный инкубационный период, латентное или хроническое течение, строго ограниченный круг восприимчивых животных, длительное сохранение вируса в организме животного [54,154]. Проникновение ретровирусов в клетку происходит путем эндоцитоза, после чего происходит освобождение РНК вируса, которая транскрибируется в двухцепочечную ДНК - копию и внедряется как провирус, в ДНК клетки хозяина. Вирус персистирует в организме на протяжении всей жизни животного [46].

Зрелый вирион состоит из сердцевины, представленного из центрально расположенного электронно-плотного нуклеотида с диаметром до 90 нм; оболочки; наружной оболочки, имеющего вид двухконтурной мембраны с шипиками длиной 8-11 нм на своей поверхности [2, 4].

Белки ВЛКРС представлены негликолизированными (p10, p12, p15, p24) и гликолизированными полипептидами. Они различаются на капсидные и нуклеокапсидные. Оболочка вириона формируются за счет двойного слоя липидов с бел-

ками gp51 и gp30. Оболочечный белок gp 51 обеспечивает узнавание клеточного рецептора вируса, и моноклональные антитела можно применять для распознавания 8 антигенных точек (участков). Участки F, Y и H обеспечивают инфекционность вируса и его способность образовать соединение (синцитии) с другими клетками. N конец гликопротеина gp 30 проникает в липидный бислой и образуя комплекс с гликопротеином gp 51 формируют оболочку вириона [139]. Часть гликопротеида gp 30 находится внутри цитоплазмы и выполняет функцию передачи сигнала к рецепторам Т- и В-лимфоцитов.

Отличительным биохимическим признаком семейства *Retroviridae* является наличие в вирионе фермента обратной транскриптазы (РНК-зависимой ДНК-полимеразы) [11,179], который необходим для репликации РНК-содержащих вирусов.

Геном вируса лейкоза существует в двух формах: геномной одноцепочечной-РНК и двухцепочечной ДНК-копии, интегрированной в ДНК клетки хозяина как провирус. Геномная РНК содержится только в зрелых вирионах. Действие геномной РНК в жизненном цикле вируса происходит только 1 раз, когда она выполняет роль матрицы для обратной транскриптазы при биосинтезе комплементарной ДНК.

Полный геном ВЛКРС состоит из 8714 нуклеотидов. На концах генов содержится последовательность нуклеотидов, называемые LTR (Long Terminal Repeat) – (длинные концевые повторы), которые в свою очередь состоят из трех регионов:  $I_3$ , R и  $I_5$ . В геноме вируса лейкоза крупного рогатого скота выделяют гены gag, prt, pol, env, tax, rex, RIII и GIV. В отличие от всех остальных ретровирусов, гены ВЛКРС имеют относительно малые размеры и менее изменчивы.

На основании данных по происхождению, по результатам анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов и ДНК секвенирования, вирус лейкоза крупного рогатого скота классифицируется в три подгруппы: японскую, бельгийскую и австралийскую. Но, существуют еще другие мнения, что этот вирус более

разнообразен, чем считалось ранее. Исследования, проведенные на основании ПДРФ анализа BLV - провируса, дали возможность классифицировать его до семи различных генотипов [96, 120, 151].

В 2013 году появились сообщения о подтвержденных фактах существования 8-го генотипа ВЛКРС, а первые сообщения об этом открытии имело место в сообщениях ученых Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э.Баумана [82].

## **2.2 Эпизоотология лейкоза крупного рогатого скота**

Наиболее восприимчивыми к ВЛКРС в естественных условиях животными являются крупный рогатый скот [117,129]. ВЛКРС-инфекция отмечается как у молодых, так и у взрослых животных всех пород и помесей, но чаще болеют животные старше 4 лет. Телята до 6-месячного возраста устойчивы к ВЛКРС, что обусловлено наличием у них колострального иммунитета [180]. К примеру, около 38% мясного и 84% молочного скота принадлежащих крупным предприятиям в США инфицированы ВЛКРС.

Кроме домашнего рогатого скота (*Bos taurus*), на лейкоз в естественных условиях восприимчивы такие виды животных как зебу (*Bos indicus*), азиатские буйволы (*Bubalus bubalis*) и яки (*Bos grunniens/mutus*) [117, 155]. В тех регионах где болезнь имеет широкое распространение, высока вероятность передачи ВЛКРС и другим домашним копытным животным, включая овец (*Ovis aries*) [145, 181] и альпаков (*Vicugna pacos*) [148].

Kettman с соавторами в 1984 году [142] доказали экспериментальное заражение овец, птиц и коз вирусом лейкоза крупного рогатого скота. Levkut и др. (1997) [150] также заразили с ВЛКРС кроликов и установили клинические проявления болезни, которые были похожие на энцефалит.

Установлено, что единственным местом локализации ВЛКРС является В – лимфоциты. Кроме того ВЛКРС также может поражать эпителиальные клетки мо-

лочных желез коров [106] и инфицированные клетки могут присутствовать в молоке коровы [106, 123]. Вирус может выделяться с кровью и любым другим секретом или экскретом, содержащим лимфоциты [163]. Различают две главные пути передачи ВЛКРС: горизонтальный (от одного животного к другому) и вертикальный (от матери к плоду) [35, 133, 163, 164, 165, 185, 186, 187, 193, 199]. Заражение плода вирусом происходит трансплацентарным путем через кровь матери во время последних 6 месяцев внутриутробной жизни. Интенсивность заражения новорожденных телят вирусом лейкоза крупного рогатого скота во многом зависит от стадии инфекционного процесса в организме матери. Установлено, что до 20% телят, полученных от коров с гематологическими проявлениями болезни, оказываются инфицированными ВЛКРС и только до 3% телят оказываются таковыми полученные от коров с бессимптомной инфекцией [45].

Заражение восприимчивого животного вирусом лейкоза возможно со всеми экскретами и секретами, содержащими инфицированные лимфоциты [64, 65, 66]. Многие исследователи утверждают, что вирус лейкоза не присутствует в секретах слюнных и слезных желез, в моче и в кале, а при попадании в них лимфоцитов, инфицированных ВЛКРС, он не может в них сохраняться в течение длительного времени и поэтому экскреты и секреты животных не могут служить основными факторами передачи ВЛКРС [77].

В числе главных факторов, обуславливающих передачу ВЛКРС, огромное значение имеет перенос возбудителя через кровь, при зоотехнических и ветеринарных мероприятиях т.е. ятрогенный способ передачи инфекции [2, 101, 136, 143, 144, 186, 222]. Доказано, что для заражения телят, достаточно внутрикожное введение около 2,5 тыс. лимфоцитов крови от зараженного животного (0,0005 мл цельной крови).

J. Kohara et al. (2006) в своих исследованиях доказывает возможность инфицирования животных ВЛКРС при ректальном исследовании. У трех животных из четырех после ректального исследования с использованием одной перчатки выяв-

ляли провирусную ДНК методом ПЦР через 1-5 недель, а антитела в РИД через 7-10 недель. Другим главным потенциальным источником в горизонтальной передаче ВЛКРС и наиболее легким путем инфицирования являются молозиво и молоко. В.П. Шишков и др. (1980) [84], установили, что парентеральное введение молока от больных лейкозом коров вызывает ре-тровирусную инфекцию у овец. При этом авторы утверждают, что вирус в молоке, у экспериментально инфицированной ВЛКРС коровы, появляется через 15 дней после инокулирования.

R.D.Schultz (1973), M.J.Van der Maatan и др. (1978) [202, 215] доказывают, что телята чаще всего заражаются вирусом лейкоза в первые часы жизни после рождения при кормлении их молозивом от больных коров-матерей. Кроме того, С.Е.Piper и др. (1979); Gutierrez и др. (2011) [132, 190] доказывают, что резистентность телят к ВЛКРС-инфекции полученных от коров более старшего возраста (больше 2 лет) выше, чем у телят от молодых животных. С другой стороны, исследованиями многих авторов, установлено, что пик инфицированности животных в большинстве случаев отмечается именно у коров в возрасте старше 2 лет [48].

По данным J.Ferrer и С.Piper (1981) [123], телята, содержащиеся в тесном контакте с ВЛКРС-инфицированными коровами, становятся позитивными на лейкоз к 26-29 месячному возрасту.

Лейкоз крупного рогатого скота является нетрансмиссивной болезнью, но кровососущие насекомые могут способствовать распространению ВЛКРС среди животных путем механической передачи инфицированных лимфоцитов через укус [101, 107]. Роль жалящих и кровососущих насекомых в распространении лейкоза на сегодняшний день считается не установленной. Однако существуют доказательства о том что, слепни могут играть огромную роль в распространении ВЛКРС в естественных условиях [134, 143, 157]. Некоторые ученые также сообщают о том, что наличие мух в стойлах является потенциальным фактором риска в распространении ВЛКРС-инфекции среди крупного рогатого скота [118, 143, 144].



## 2.2.1 Эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в РФ и в Республике Татарстан

Лейкоз крупного рогатого скота имеет широкую распространенность во многих субъектах Российской Федерации.

В начале 2015 г. в Приволжском федеральном округе Российской Федерации было выявлено 418 неблагополучных пунктов. Оздоровлено 90 и вновь выявлено 23 пункта. На конец 2015 г. остались 351 неблагополучных пункта.

Таблица 2 - Эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в Приволжском Федеральном округе за 2015 г

Субъекты РФ	Неблагополучные пункты			Результаты диагност. исследований		Движение больных животных				
	Было на 1.01.15 г.	Выявлено новых	Осталось на конец года	% в РИД	Гем. больн.	Было на 1.01.15 г.	Заболело	Сдано на убой	Осталось	Пало
<b>РОССИЯ</b>	<b>2113</b>	<b>271</b>	<b>1974</b>	<b>6,273</b>	<b>34104</b>	<b>6567</b>	<b>34216</b>	<b>35834</b>	<b>4949</b>	<b>32</b>
Респ. Башкортостан	-	-	-	0,9	-	-	-	-	-	-
Республ. Марий Эл	15	-	15	9,9	313	-	313	313	-	-
Республ. Мордовия	1	-	-	0,08	-	-	-	-	-	-
Республ. Татарстан	72	-	72	14,0	4807	-	4807	4807	-	-
Удмуртская Республ	49	1	37	0,7	173	-	173	173	-	-
Чувашская Республ.	18	3	14	2,1	73	-	73	51	22	-
Пермский край	23	-	18	0,2	138	29	138	167	-	-
Кировская область	18	2	10	0,4	70	-	70	70	-	-
Нижегородская обл.	19	2	2	17,8	592	351	592	828	115	-
Оренбургская обл.	16	-	13	11,3	2739	-	2739	2739	-	-
Пензенская область	91	-	76	24,6	680	14	680	694	-	-
Самарская обл.	63	14	75	0,08	771	189	771	916	44	-
Саратовская обл.	23	1	15	0,1	30	-	30	30	-	-
Ульяновская обл	10	-	4	9,2	7	-	7	7	-	-
<b>Итого</b>	<b>418</b>	<b>23</b>	<b>351</b>	<b>6,1</b>	<b>103393</b>	<b>583</b>	<b>10393</b>	<b>10795</b>	<b>181</b>	<b>-</b>

Наивысший уровень неблагополучия зарегистрирован в Пензенской (76 пунктов) и Самарской (75) областях, в Республике Татарстан (72) и Удмуртской Республике (37 пунктов) [18, 59].

Заболевание крупного рогатого скота лейкозом в Республике Татарстан также прогрессирует. В 1972-1979 гг. среднегодовая заболеваемость составляла

132 головы, 1988-1994 гг.- 1422 головы, 2000-2008 гг.- 6467 голов [42]. В 1999 году инфицированность исследованного скота составляла 10,9%, в 2010 году 16%. Инфицированные животные выявлены во всех 43-х районах республики.

В республике за последние 5 лет сдано 26914 голов больного лейкозом скота, что составляет около 3% от общего поголовья.

В 2015 году инфицированность поголовья крупного рогатого скота ВЛКРС в общественном секторе РТ составляла более 17%. Максимальный процент зараженности отмечали в Мамадышском, Лениногорском, Альметьевском, Нурлатском, Бугульминском районах. В Республике Татарстан ежегодно обнаруживаются не менее 5,5 тысяч больных по гематологии животных. Неблагополучная ситуация выявлена в Рыбно-Слободском, Алькеевском, Заинском, Алексеевском, Чистопольском и Тетюшском районах. То, что более 17% поголовья скота, положительно реагируют на лейкоз для республики, имеющей ежедневно три тысячи тонн товарного молока, весьма тревожный показатель [40, 41, 42]. В РТ был разработан план проведения противолейкозных мероприятий, согласно которому:

- в хозяйствах, где инфицированность вирусом лейкоза не превышает 3%, можно ограничиться выведением из ферм зараженных животных;
- если у сельхозпредприятия инфицировано от 4 до 30 % поголовья, то оздоровительные мероприятия следует осуществлять путем разделения стада;
- при более высоких показателях инфицированности скота целесообразно организовать изолированное выращивание здоровых телочек, а группу серонегативных коров использовать для получения молока, необходимого для кормления этого молодняка после обеззараживания.

### **2.2.2 Эпизоотическая ситуация в мире и в странах Африки**

Серозидемиологические исследования показывают что, ВЛКРС-инфекция является глобальным феноменом [143, 146, 172, 201, 216, 219, 227].

МЭБ регулярно сообщает о наличии лейкоза крупного рогатого скота во многих странах. В 2015 году, сообщалось о наличии данной болезни на территории 51 страны, включая 3 Африканские, 6 Азиатских, 18 Европейских и 21 Американских стран, Австралию и 1 территорию Океании. Широкая распространенность лейкоза крупного рогатого скота в мире связана, прежде всего, с торговлей молочного скота в воспроизводственных целях.

В Африке лейкоз крупного рогатого скота выявляется в таких странах как Ботсвана, Египет, Намибия, Замбия, Танзания, Зимбабве, Кения и др. [165, 201 218, 227] .

В странах, где нет программ профилактических мероприятий и современных систем производства, опухолевая стадия болезни обнаруживается у 5% молочных коров [117], которая характеризуется появлением злокачественных образований в органах системы кроветворения и за ее пределами, и заканчивается смертью животного.

Таблица 3 - Распространенность ВЛКРС-инфекции в некоторых странах мира

Страна(год)	Распространенность ВЛКРС среди животных	Ссылка
Канада(2002)	60.8% (молочный скот) 10.3% (мясной скот) 26.9% (молочный скот)	Van Leeuwen et al., (2006) [216] Scott et al., (2006) [203]
США (2007)	83.9% (молочный скот)	APHIS (2008) [95]
Аргентина (2001)	32.9% (молочный скот)	Trono et al. (2001) [213]

Чили (2009)	59% (молочный скот)	Felmer et al. (2009)[121]
Япония (2011)	35.2% (молочный и мясной скот)	Murakami et al.(2013) [178]
Китай Северо-Восток (2014) 6 областей	18.3% (молочный и мясной скота) 49.1% (молочный скот) 1.6% (мясной скот)	Sun et al. (2015) [209]  Yang et al. (2016) [225]
Иран Исфahan область	81.9% (молочный скот)	Morovati et al. (2012) [175]

### **2.3 Прижизненная диагностика лейкоза крупного рогатого скота.**

В ряду мероприятий по искоренению лейкоза крупного рогатого скота одно из самых важных мест принадлежит своевременной и точной диагностике. Ранняя и точная диагностика лейкоза является основой всех профилактических и оздоровительных противолейкозных мероприятий [8, 12, 67, 121].

#### **2.3.1 Клиническая диагностика**

Одна из особенностей лейкоза - длительный инкубационный период с появлением в крови противолейкозных антител и компонентов вириона. При спонтанном инфицировании этот период длится от 2 до 6 лет. Болезнь имеет в основном хроническое течение. Острое и подострое течение лейкоза встречаются достаточно редко, не более чем в 5-7 % случаях. Болезнь проявляется клинически при поражении лимфатических узлов, селезенки, сычуга, сердца, почек, половых органов и др. Развитие инфекционного процесса при лейкозе происходит медленно и незаметно. Клинические признаки при лейкозе подразделяются на специфические и неспецифические.

По данным многих ученых для лейкоза крупного рогатого скота характерно первичное появление неспецифических признаков и только потом специфических, по которым можно поставить диагноз [63]. В числе неспецифических признаков можно выделить нарушение сердечно-сосудистой деятельности (глухие тоны сердца, иногда их раздвоенность) животного: пульс слабого наполнения, аритмия, нерегулярная жвачка, поносы, запоры и др. Своеобразные клинические признаки характеризуются прогрессирующим увеличением поверхностных (предлопаточных, околоушных, подчелюстных, коленной складки, надвыменных) и внутренних лимфатических узлов [53].

Подострое (в редких случаях острое) течение лейкоза наблюдается у молодняка в возрасте от 8 – 9 месяцев до 1 – 2 года. Начальная стадия развития лейкоза у взрослых животных характеризуется появлением в крови специфических противолейкозных антител [62]. На этой стадии сохраняется удовлетворительная упитанность, не снижается уровень молочной продуктивности коровы и воспроизводительные функции [60]. У 30% животных, имеющих высокий титр антител к ВЛКРС, болезнь переходит в следующую стадию – персистентный лимфоцитоз [77]. При этом значительно (на 22–30%) снижается молочная продуктивность [51, 52] нарушаются физиологические процессы в клетках.

Американскими исследователями установлено, что ежегодные экономические потери, связанные с лейкозом крупного рогатого скота сельскому хозяйству США обходятся на 91 миллион долларов ежегодно [226]. У 3 – 5% вирусоносителей болезнь переходит в опухолевую стадию [58, 59, 126, 198, 207].

Несмотря на то, что ВЛКРС инфицирует CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки,  $\gamma/\delta$  Т-клетки, моноциты и гранулоциты крупного рогатого скота [169, 189, 198, 208, 223, 224], большое количество опухолевых клеток формируются от CD5+ IgM+ В-клеток субпопуляций [198]. Доказано также, что ВЛКРС провирусная нагрузка увеличивается с развитием болезни, достигая максимальных значений, в стадиях персистентного лимфоцитоза и лимфосаркомы [138].

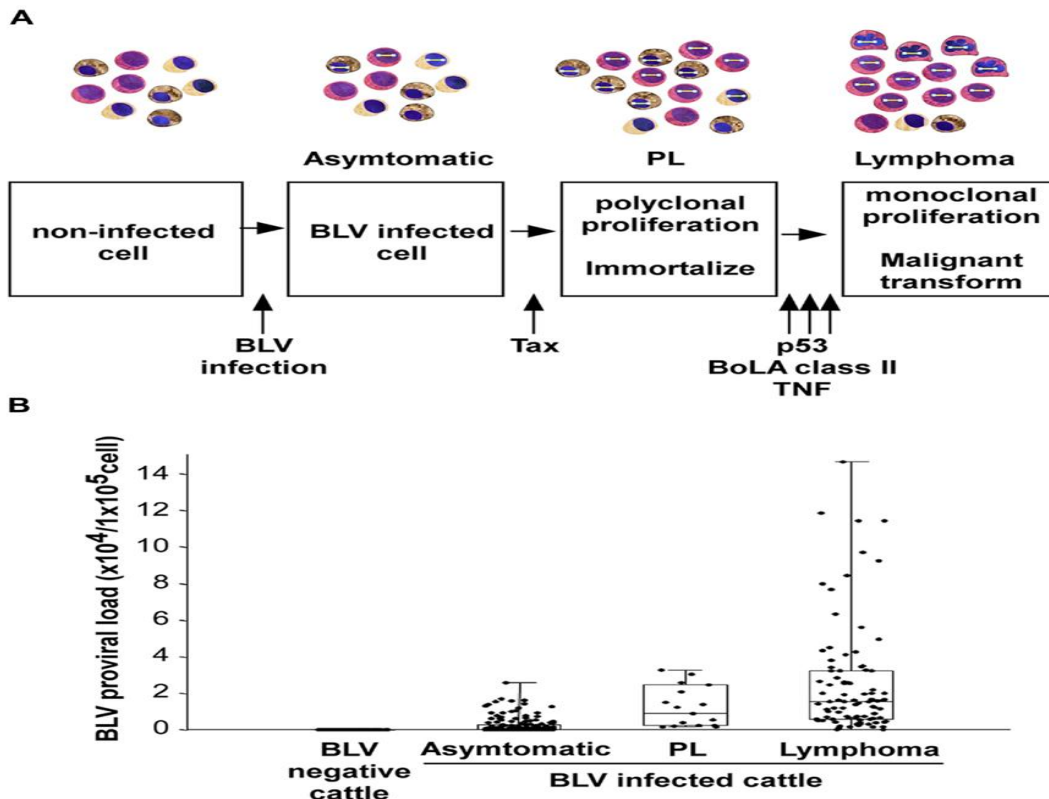


Рисунок 1 - ВЛКРС-индуцированный лейкомогенез - многоэтапный процесс. (А) Три стадии ВЛКРС-инфекции: Бессимптомная стадия, стадия персистентного лимфоцитоза и стадия лимфосаркомы. (В) Провирусная нагрузка увеличивается с развитием болезни.

### 2.3.2 Серологическая диагностика

Возможность и необходимость применения иммунологических методов для диагностики лейкоза крупного рогатого скота, как наиболее чувствительных в сравнении с клинико-гематологическими исследованиями были показаны многими исследователями [50,108, 168].

Характерной особенностью ВЛКРС инфекции у крупного рогатого скота является бессрочная персистенция вируса и вирусоспецифических антител у больных животных [14, 49, 73, 171, 143]. По этой причине, серологические методы обнаружения специфических антител в сыворотке крови являются наиболее удоб-

ными, бережливыми и широко используемыми в диагностике лейкоза крупного рогатого скота.

Иммунологические и иммунохимические методы выявления инфицированных животных нашли широкое применение почти во всех странах мира и позволили полностью искоренить лейкоз в ряде стран Западной Европы.

В настоящее время во многих странах мира в качестве основного серологического теста в диагностике лейкоза крупного рогатого скота принята реакция иммунодиффузии в геле агара (РИД). Она проста в постановке и доступна для серо-эпизоотологических исследований, осуществляемых в полевых условиях.

Реакция иммунодиффузии в агаровом геле [188], впервые применяли для диагностики лейкоза крупного рогатого скота [168], используя антиген р24 ВЛКРС. Достаточно высокая специфичность и чувствительность, а также эффективность метода в диагностике лейкоза крупного рогатого скота по сравнению с клинико-гематологическими и гистологическими исследованиями считаются доказанной, что подтверждается в работах многих авторов [14, 17, 44, 50, 124].

Реакция иммунодиффузии в агаровом геле основана на обнаружении специфических преципитирующих антител к ВЛКРС в сыворотке крови животных. Специфические антитела к ВЛКРС обнаруживают в крови через 1-2 месяца после инфицирования животного вирусом лейкоза и сохраняются в течение всей его жизни. РИД исследованиям с целью диагностики лейкоза крупного рогатого скота подвергаются животные в возрасте от 6 месяцев и старше. В настоящее время для постановки РИД биопромышленностью выпускаются различные диагностические наборы.

Согласно стандартам МЭБ (OIE. World Organization for Animal Health, 2013) узаконенными методами диагностики лейкоза крупного рогатого скота в мире являются реакция иммунодиффузии в геле агара (РИД) и метод иммуноферментного анализа (ИФА).

Хотя РИД и остается одним из главных диагностических методов, иммуноферментные методы анализа широко используются в государственных программах по борьбе с лейкозом крупного рогатого скота во многих странах Америки и Западной Европы.

Разработанный в 1972 г. Е. Энгваллом и П. Перлманом метод иммуноферментного анализа - enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA), в настоящее время стал наиболее распространенным серологическим методом диагностики болезней животных и человека.

В 1978 г. Ressang и его сотрудники, рекомендовали применять иммуноферментный анализ для выявления противолейкозных антител. Сейчас имеются много вариантов иммуноферментного анализа, включая конкурентный метод, «сэндвич»-метод и другие. Для улучшения специфичности и чувствительности метода ИФА рекомендовано применять моноклональные антитела.

Практическая и диагностическая эффективность ИФА нашло широкое освещение в литературе [23, 37, 84, 206]. Метод ИФА обладает рядом значительных преимуществ: высокая чувствительность и специфичность, возможность автоматизации процесса и сокращения времени анализа. Сравнительный анализ результатов исследований методом РИД и ИФА показывает, что последнего можно большей эффективностью применять в диагностике лейкоза крупного рогатого скота.

Чувствительность ИФА в диагностике лейкоза крупного рогатого скота, по результатам испытаний в лабораториях Германии составила 97,6%, что в 4 раза выше РИД, а специфичность - 98,1%. Метод иммуноферментного анализа позволяет обнаружить антитела в титрах в 10-100 раз меньших, чем выявляет РИД [48]. Более того, методом твелофазного иммуноферментного анализа положительно реагирующие пробы выявляются на 30-45 дней раньше с момента заражения, чем в РИД [38]. С помощью метода ИФА возможно массовое обследование стад и постановка окончательного диагноза у конкретного животного [7].





А

В

Г

Рисунок 2 - оборудование для ИФА лабораторий: А- Микропланшетный промыватель, В - Термошейкер для иммунопланшет , г - Спектрофотометр мульти-скан.

### 2.3.3 Гематологический метод и метод биопробы

Гематологический метод позволяет диагностировать лейкоз на более ранних стадиях развития заболевания. Суть метода заключается в выявлении в периферической крови повышенного числа лейкоцитов (в основном лимфоидного ряда), слабо дифференцированных клеток, а также полиморфных и атипичных клеток кроветворных органов [24].

Результаты гематологического исследования оцениваются по так называемому «лейкозному ключу». В различных странах предложено несколько вариантов «лейкозных ключей». В 1954 г. Gotze R. с соавторами предложил первый «лейкозный ключ». Он выявил, что при лейкозе происходит увеличение количества лейкоцитов в большинстве случаев за счет лимфоцитоподобных клеток. В их число автор относил различные клеточные элементы, имеющие морфологическое сходство с лимфоцитами. На их основе была создана схема диагностики, названная «Лейкозный ключ Гётце». Суть его заключалась в определении количества лейкоцитов в 1 мкл крови и процента лимфоидных клеток в лейкоцитарной формуле. В зависимости от возраста и этих показателей, животные подразделялись на гематологически отрицательные, подозрительные в заболевании и на больные

лейкозом. В опухолевой стадии лейкоза возможно снижение количественных показателей крови и применение «ключа» в таких случаях была не рекомендована.

После разработок Gotze R. многие ученые занимались усовершенствованием гематологического метода применительно к местным условиям и породам скота.

Bendixen H. В 1960 г. и Winguist G. D в 1961 г. предложили диагностировать лейкоз по абсолютному количеству лимфоцитов в 1 мкл крови.

Датский «ключ Бендиксена» для пяти возрастных групп крупного рогатого скота предусматривал определение количества лимфоцитов, характерного для здоровых, подозрительных в заболевании и больных лейкозом животных.

В СССР в результате многочисленных исследований в 1977 г. был разработан модифицированный «лейкозный ключ» [11, 47], который приведен в таблице 4. Этот ключ был включен в стандарт СЭВ, используемой при импорте и экспорте животных, а также в Государственный стандарт СССР «Крупный рогатый скот, методы лабораторной диагностики лейкозов. ГОСТ 25382-82». Этот ГОСТ используется и в настоящее время.

Таблица 4 - Модифицированный лейкозный ключ

Возраст	Здоровые животные		Подозрительные по заболеванию животные	Больные лейкозом животные
	Кол-во Лейкоцитов В 1 мкл	Процент лимфоцитов	Абсолютное количество лимфоцитов в 1 мкл	Абсолютное количество лимфоцитов в 1 мкл
1-2 года	До 12000	До 75	9000-11000	Свыше 11000
2-4 года	До 11000	До 70	8000-10000	Свыше 10000
4-6 лет	До 10000	До 65	6500-9000	Свыше 9000
Старше 6 лет	До 9000	До 60	5500-8000	Свыше 8000

В соответствии с новыми Правилами по профилактике и борьбе с лейкозом (2000) животные, у которых с помощью «лейкозного ключа» установлено подозрение на лимфоидный лейкоз, подвергаются повторным гемматологическим анализам через 2 месяца. Если при повторном гематологическом исследовании результаты оказываются отрицательными, то животные считаются клинически здоровыми.

### **2.3.4 Полимеразная цепная реакция**

В настоящее время в систему диагностических мероприятий лейкоза крупного рогатого скота все больше внедряются технологии, связанные с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) [21, 57, 74].

Метод ПЦР обладает высокой чувствительностью и специфичностью. С помощью данного метода можно обнаружить провирусную ДНК в исследуемом материале уже через 1-2 недели после заражения. Также, этот метод применим для диагностики лейкоза у молодняка старше 15 дневного возраста. Следовательно, ПЦР позволяет с высокой достоверностью выявлять инфицированных ВЛКРС животных на самых ранних стадиях заболевания [33, 54]. Все эти данные, указывающие на преимущества ПЦР, в сравнении с серологическими методами, характеризуют её как эффективного метода в диагностике лейкоза крупного рогатого скота. Однако, существующие сегодня проблемы материально-технического характера препятствуют широкому внедрению ПЦР в ветеринарную практику.

В настоящее время выпускаются специальные тест-системы ПЦР для диагностики лейкоза крупного рогатого скота. Однако предложенные наборы для ПЦР не являются универсальными. Они различаются праймерами, компоновкой реагентами, системой подготовки исследуемого материала. Кроме того, метод требует высокой квалификации исполнителя и правильного выбора праймера.

В 2010 году был разработан новый количественный метод ПЦР в реальном времени (BLV-CoCoMo-qPCR), который основан на применении общих фраг-

ментов (CoCoMo) праймеров для измерения провирусной нагрузки ВЛКРС у инфицированных ВЛКРС животных [138, 189]. Данный метод основан на амплификации копии гена хозяина, BoLA-DRA гена лейкоцита крупного рогатого скота, параллельно с вирусной геномной ДНК. В настоящее время разработаны ПЦР технологии определения вирусной нагрузки версии BLVCoCoMo-qPCR и BLV-CoCoMo-qPCR – 2.

## **2.4 Этиология и эпизоотология туберкулеза крупного рогатого скота**

Туберкулез крупного рогатого скота представляет собой зооноз, который передается от животных к человеку главным образом через ингаляцию аэрозолей или прием непастеризованного молока и употреблением инфицированного мяса [131, 177, 184].

По данным Wedlock и его сотрудников (2002), *M.bovis* является причиной в 5-10% всех человеческих туберкулезных случаев, однако уровень инфекции значительно может варьировать в различных странах [177, 220]. Туберкулез крупного рогатого скота имеет важное экономическое значение, так как вызывает значительные потери в производстве молока и мяса, влияет на воспроизводительность животных. Международная торговля и другие экономические секторы косвенно страдают от данного заболевания через вынужденные ограничения.

Туберкулез крупного рогатого скота представляет большую проблему для многих Африканских стран особенно в пустынных и полупустынных местах, где более 50% крупного рогатого скота, овец и коз держат миллионы людей, у которых основным доходом и является животноводство [222].

Lobue P. (2006), сообщил о высокой восприимчивости ВИЧ-инфицированных людей к *M.bovis* инфекции [152]. Кроме того, некоторые ученые сообщили о том, что вероятность смерти среди людей, инфицированных *M.bovis* до 6 раз выше, чем у тех, кто инфицирован *M.tuberculosis* [195].

Туберкулез крупного рогатого скота широко распространен во всем мире. К странам, которые считаются благополучными по туберкулезу крупного рогатого скота, относятся Израиль, Исландия, Эстония, Швейцария, Швейцария, Австралия, Норвегия, Канада, Финляндия, Ямайка и др. Страна считается благополучной по туберкулезу, если распространенность инфекции не превышает более чем 0,1% в течение 6 месяцев [184].

Туберкулез крупного рогатого скота особенно широко распространен в Африке, в некоторых странах Азии и в Ближневосточных странах [98]. Для многих Африканских стран туберкулез представляет потенциальную опасность для здоровья людей и животных, так как около 85% крупного рогатого скота и 82% населения людей живут в регионах, где заболевание имеет чрезвычайно широкое распространение [109,149]. Основной причиной распространения туберкулеза в этих регионах является, прежде всего, отсутствие общественной информативности, отсутствие знаний о путях передачи заболевания, клинических признаках, о значении плохих условий содержания животных и низкий уровень жизни людей.

В Кении после исследований проведенных в скотобойнях, сообщалось о распространенности туберкулеза крупного рогатого скота до 2,1% от общего поголовья [128], после исследований методом ИФА этот показатель увеличился до 3,6 % [176].

Таблица 5 - Распространенность туберкулеза крупного рогатого скота в 7-и округах Кении в 2015 г

Округ	Количество проб	Количество положительных	распространенность (%)
Лайкиия	276	11	3,99
Ваджир	85	4	4,71
Тайта Тавега	60	2	3,33
Покот	68	3	4,41
Квале	45	1	2,22
Килифи	64	0	0,00
Каджиадо	46	2	4,35
Всего	644	23	3,57

Как этиологический фактор инфицирования крупного рогатого скота, немаловажное значение имеет туберкулез среди диких животных. Так, в Великобритании и Ирландии серьезную проблему в борьбе с туберкулезом крупного рогатого скота представляют барсуки, которые служат главными резервуарами *M. Bovis*. Аналогичную проблему в Новой Зеландии представляет щёткохвостый поссум (*Trichosurus vulpecula*). В Восточной Европе, *M. bovis* был выделен от кабанов (*Sus scrofa*), в Южной Африке сообщались о том что, распространенность туберкулеза достигла высокого уровня среди Африканских буйволов (*Syncerus caffer*). *M. bovis* выделен также от бородавочников в национальном парке Уганды.

### 2.5 Диагностика туберкулеза крупного рогатого скота

В комплексе профилактических мероприятий, направленных на предотвращение возникновения туберкулеза и распространения его среди животных, особое место занимает своевременная диагностика болезни. основополагающие принципы всех программ по борьбе с туберкулезом включают строго поставленный учет, аттестацию стад, карантинирование, своевременную диагностику болезни и убой больных животных.

Постановка диагноза на туберкулез, особенно в ранее благополучных хозяйствах, представляет иногда большие трудности. Поэтому в ветеринарной практике диагноз на туберкулез ставят комплексно на основе клинических, эпизоотологических, аллергических, патологоанатомических и лабораторных исследований, включая биологическую пробу. Диагностическая ценность каждого метода в отдельности зависит от стадии болезни, ее форм, реактивности организма и других факторов.

Многолетний опыт борьбы с туберкулезом крупного рогатого скота показывает, что традиционные методы и подходы по борьбе с этой инфекцией являются несовершенными и не обеспечивают полноту диагностики болезни и прочности оздоровления хозяйств.

Клинический метод дает возможность обнаружить лишь видимые симптомы болезни, однако они не всегда наблюдаются. У многих животных при латентной форме болезни клинические признаки вообще могут отсутствовать.

Патологоанатомические исследования и обнаружение туберкулезных изменений в тушах убитых животных играет наиболее важную роль в диагностике болезни и при создании мер профилактики [105]. Поэтому инструкцией по борьбе с туберкулезом, в хозяйствах благополучных по туберкулезу крупного рогатого скота, при обнаружении даже небольшого количества реагирующих на туберкулин животных, предусмотрено подвергать их контрольному убою с последующим тщательным патологоанатомическим исследованием.

Во всех случаях, когда обнаруживают туберкулезные изменения в тканях животного и когда их не выявляют, проводят лабораторные исследования. У коров первичный туберкулезный процесс в 94% случаев локализуется в легких, бронхиальных, средостенных, а в остальных случаях - в заглочных лимфоузлах. Гранулемы обычно бывают желтыми и либо казеозными или обызвествленными и часто инкапсулированными [114].

Предварительный диагноз на туберкулез можно ставить по результатам гистологического исследования или микроскопической демонстрации кислотоустойчивых микобактерий. Прямые методы диагностики туберкулеза основаны на выделение или обнаружение бактерий в мокроте или биопсии (особенно у людей) или от туберкулезных органов после вскрытия животных. Наличие микобактерий в пробе анализируется окрашиванием по методу Циля-Нильсена с последующим микроскопией [158]. Эти методы основаны на тинкториальные свойства микобактерий и микроорганизмов рода *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium*, которые также известны как кислотоустойчивые бактерии.

Аллергическая диагностика туберкулеза основана на реакции гиперчувствительности замедленного типа в организме, которая выявляется методом внутрикожной туберкулиновой пробы [200]. Состояние повышенной гиперчувствительности замедленного типа к туберкулину развивается у животных после заражения их возбудителем туберкулеза или другими микробактериями, сходными с ним по антигенному составу. Данный метод выявляет ранние туберкулезные инфекции в пределах 3-8 недель после инфицирования животных *M.bovis*. Туберкулиновая кожная проба широко используется с того времени, когда Роберт Кох впервые ее рекомендовал 1890 г. [170]. Для выявления больных туберкулезом животных применяют сухой очищенный протейновый дериват туберкулина, полученный от штамма *M.bovis* БЦЖ.

На специфичность кожной туберкулиновой пробы влияют чистота, дозировка ППД и строгость интерпретации результатов иммунной реакции у животных, сенсбилизация животных к микобактериям окружающей среды и генетическое происхождение животных. Стандартная внутрикожная туберкулиновая проба выявляет примерно до 40-80% инфицированных животных [170].

Прижизненные тесты для выявления реакции клеточного иммунитета являются очень важными для профилактики туберкулеза крупного рогатого скота, так как они способны обнаружить животных инфицированных *M.bovis* на ранних



стадиях болезни. Внутрикожная туберкулиновая проба и интерферон-гамма тесты основаны на выявление ранней клеточно-опосредованной иммунной реакции при туберкулезной инфекции. Однако, на более поздних стадиях болезни, клеточно-опосредованная иммунная реакция снижается с повышением гуморального иммунного ответа и при этом, данные тесты могут дать отрицательные результаты [112].

Серологические тесты, которые основаны на выявление гуморального иммунного ответа, включены в программы по борьбе с туберкулезом крупного рогатого скота во многих странах мира [200, 217]. Из-за своей относительно низкой стоимости, высокой чувствительности, специфичности и скорости, они незаменимы при проведении массовых исследований.

Диагностические тесты, направленные на выявление реакций клеточного и гуморального иммунитета при туберкулезе, никак не могут конкурировать, а наоборот взаимодополняют друг друга, обогащая диагностическую информацию о разных стадиях течения болезни. Если учесть, что гуморальный иммунный ответ в основном характерен для активного туберкулезного процесса, то можно предположить что серологические тесты, которые используются для определения специфичных к микробактериям антител, намного достовернее кожных тестов.

Традиционные серологические реакции (РГА, РСК и др.) применяемые в диагностике туберкулеза, недороги, имеют небольшое время проведения анализа, нуждаются в минимуме оборудования. Однако, чувствительность их не высока, тем более, они в настоящее время устарели и эффективность их в диагностике туберкулёза возможна только при совместном использовании сразу нескольких тестов, например, РНГА+РПК+РПГ.

К современным методам серодиагностики туберкулёза, которые получили в настоящее время достаточно широкое применение, относятся дот-блоттинг, иммунохроматография, иммуноферментный и радиоиммунный анализы (ИФА и РИА).

Для серодиагностики туберкулёза в России, наибольшее распространение получили методы иммуноферментного и радиоиммунного анализов (ИФА и РИА). Для этих методов характерны высокая степень стандартизации и воспроизводимости результатов анализа. Тест-системы на их основе позволяют проводить одновременное тестирование большого количества проб, т.е. проводить скрининг. Выполнение ИФА, в отличие от РИА, не требует оборудованных для работы с радиоактивностью помещений и стоимость анализа значительно ниже. Вследствие этого, во многих лабораториях иммуноферментные тест-системы вытеснили радиоиммунные.

Иммуноферментные методы анализа антигенов и антител открыли новую эпоху в иммунодиагностике различных инфекционных и инвазионных заболеваний, в том числе и туберкулеза. С первых работ по изучению возможности применения ИФА в диагностике туберкулеза, многими учеными ведутся работы по изысканию специфической фракции туберкулезных бактерий, пригодной для использования в анализе в качестве тест-антигена и получения высокоспецифичной иммунной сыворотки.

Для диагностики туберкулеза людей используются тест №1266 (тест №1266 - Антитела суммарные IgM+IgG+IgA к *Mycobacterium tuberculosis*) [78]. В данном тесте антитела к *Mycobacterium tuberculosis* выявляют с использованием антигена А60, приготовленного из *Mycobacterium bovis*, являющийся одним из иммунодоминантных антигенов при туберкулезе и других мико-бактериальных инфекциях. При клинических исследованиях, положительный результат теста наблюдали у 87% с активным легочным туберкулезом, 83% с активным нетуберкулезным микобактериозом, 27% лиц со старым туберкулезом. Общая чувствительность теста, по данным производителя составляет 86%, специфичность – 90%.

В ветеринарии метод ИФА впервые был применен для диагностики туберкулеза у барсуков в 1979 году. Morris и соавт. используя антиген из *M.tuberculosis*,

установили наличие туберкулезных антител у 20 из 30 инфицированных животных. Аналогичные результаты были получены при использовании антигенов, приготовленных из *M.avium* и *M.paratuberculosis*. Авторы пришли к выводу, что иммуноферментный тест может иметь практическую ценность лишь в случае получения высокоспецифического антигена.

В целом метод ИФА в диагностике туберкулеза крупного рогатого скота является перспективным для определения титра антител в сыворотке крови, а также для обнаружения туберкулезного антигена в тканях исследуемых животных. Однако, имеющиеся литературные данные свидетельствуют о разноречивости диагностической ценности ИФА. По мнению некоторых авторов [80], причиной отсутствия единого мнения о целесообразности применения ИФА для диагностики туберкулеза являются: 1) слабая выявляемость антимикобактериальных антител на фоне, индуцируемого возбудителем, угнетения процессов антителопродукции и снижения содержания в крови свободных антител; 2) низкая специфичность ИФА-тестов, основанных на использовании суммарных антигенов.

Использование ИФА для диагностики бактериальных инфекций затрудняют ряд объективных причин, к которым относится и чрезвычайно сложная антигенная структура бактерий в сравнении с вирусами.

Для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота методом ИФА в разное время использовали в качестве антигена ППД, или простые и ассоциированные очищенные антигены из *M.bovis*. Например, антиген МРВ70 и его гомологичный белок МРВ83. Большинство этих антигенов позволили достичь чувствительности и специфичности тест-систем до 90% [119, 161, 221].

Исследования, проведенные в лабораториях кафедры биохимии Казанской ГАВМ, показали, что туберкулезные антигены, полученные на основе обработки микобактерий органическими растворителями, являются достаточно специфичными и пригодными для ИФА диагностики туберкулеза крупного рогатого скота [81, 92].

В последние годы в систему диагностических мероприятий при туберкулезе крупного рогатого скота, как и в другие области биоинженерных технологий, начали внедряться технологии, основанные на ПЦР.

ПЦР является надежным, высокочувствительным методом, хорошо защищенным от ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Специфичность метода уникальна, так как она обусловлена последовательностью нуклеотидов праймера и в зависимости от цели исследования можно выявить вид, группу видов или род микроорганизмов. Так, использование в качестве праймера олигонуклеотид гена *groE1* микобактерий позволяет установить наличие в образце представителей любого из 30 видов рода *Mycobacteria*: праймер IS 986 (IS 6110) - представителей любого из четырех видов возбудителей туберкулеза человека, относящихся к *Mycobacterium tuberculosis complex*; праймер IS 900 - один единственный вид - *Mycobacterium paratuberculosis* [10].

В последнее время в большинстве ветеринарных лабораторий России применяют ПЦР-тест-системы четырёх основных производителей, включая, три комплексные для выявления ДНК *Mycobacterium bovis* и *Mycobacterium tuberculosis* производства ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (ЦНИИЭ), ЗАО «ЛАГИС», ООО «Компания «БИОКОМ» и одну дифференцирующую *Mycobacterium bovis* от *Mycobacterium tuberculosis* производства НПО «НАРВАК». Для обнаружения ДНК *Mycobacterium avium* используют тест-систему «АВИУМ» производства ЦНИИЭ.

Несмотря на очевидные успехи, до последнего времени нет единого мнения о диагностической ценности и возможности применения ПЦР тест-систем при диагностике туберкулеза животных и как следствие метод не нашёл широкого применения в ветеринарной практике. Основным недостатком, препятствующим широкому использованию ПЦР в клинической практике, является относительно высокая стоимость тест-систем и необходимость транспортировки их при определенном температурном режиме. Кроме того, существует возможность получения

значительного количества ложноположительных и ложноотрицательных результатов, вызванных эндогенными ингибиторами полимеразы, гипердиагностикой за счет выявления в ПЦР не только живых, но и мертвых микобактерий, неправильным выбором антикоагулянтов крови и др. [39, 83].

## **2.6 Диагностическая ценность дот-блот ИФА.**

Существующие методы диагностики лейкоза и туберкулеза крупного рогатого скота являются достоверными, но все они занимают продолжительное время и трудоемки и требуют специального оборудования. В условиях современного сельскохозяйственного производства, особенно на крупных животноводческих комплексах, где концентрировано большое количество поголовья животных, проведение профилактических мероприятий по обеспечению надежного эпизоотического благополучия и продовольственной безопасности, разработка экспресс методов диагностики является практической необходимостью.

Методы иммунохимического анализа являются наиболее существенными в разработке экспресс-тестов для диагностики инфекционных болезней [9]. Из этого перечня используются различные технологии, среди которых важную роль играют модифицированные методы ИФА, которые в представительном арсенале методов, используемых в вирусологии, занимают особое место.

Наиболее многообещающими являются методы ИФА разной модификации в дот-блот варианте. Дот-блот ИФА основан на иммунохимической реакции антиген - антитело. Комплекс «антиген-антитело» выявляют с помощью антивидового конъюгата после добавления нерастворимого субстрата, образующего окрашенные пятна различной интенсивности в местах связывания антигена и антитела.

Основой для проведения дот-блот ИФА является иммобилизованный на твердом носителе антиген (иммобилон) [16]. Применяются различные твердофазные пористые носители. В основном используются носители на основе нитроцеллюлозы (НЦМ) так как, они являются наиболее выгодными за счет высоких сорб-

ционных свойств для белков и легкости обращения с ними [79]. Для того чтобы блокировать свободные после сорбции антигена места на НЦМ используются бычий или человеческий сывороточный альбумин.

Эффективность дот-блот ИФА тест-системы в диагностике разных инфекционных болезней доказано в работах многих исследователей [102, 111 122, 153, 162].

Mehrdad R. и др. (2006) [162] при анализе эффективности дот-блот ИФА в диагностике ВИЧ-инфекции у человека, установили 100% чувствительность и специфичность тест-системы по сравнению с результатами классического ИФА [102].

При диагностике Африканского трипаносомоза у людей методом дот-блот иммуноанализа установили 83,2% чувствительность и 100% специфичность теста.

В 1998 году, Raphael F. и его сотрудники доказали эффективность применения дот-блот тест-системы в определении антител против ньюкасльского вируса у экспериментально зараженных птиц [191].

При диагностике бешенства у людей и животных был установлено до 97,6% соответствия результатов дот-блот ИФА и теста флуоресцирующих антител, и специфичность дот-блот ИФА при этом составлял 100% [204].

Сравнительное изучение эффективности дот-блот ИФА и классического ИФА при исследовании людей больных туберкулезом на выявление против-DAT антител показало одинаковую чувствительность тестов. При этом специфичность дот-блот ИФА и классического ИФА составляла 97,14% и 94,29% соответственно [153].

Fernando S и его сотрудники (2012) анализируя эффективность дот-блот ИФА тест-системы в обнаружении антител против личиночных антигенов *Taenia solium*, установили ее высокую чувствительность и специфичность по сравнению с методом вестерн-блотинга [122].

### 3 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

#### 3.1 Материалы и методы исследований

Исследования по теме диссертации проводились в 2014-2017 годы на кафедре биологической и неорганической химии ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и в ГБУ «Республиканская ветеринарная лаборатория» РТ (г. Казань).

Объем проведенной работы и методы исследований определялись на основе поставленных задач.

Таблица 6 - Объем проведенных исследований

Метод исследований	Количество исследованных проб
Иммуноферментный анализ (ИФА) для обнаружения антител к ВЛКРС в сыворотке крови крупного рогатого скота	2439
Реакция иммунодиффузии в агаровом геле (РИД) для обнаружения антител к ВЛКРС в сыворотке крови крупного рогатого скота	2307
Иммуноферментный анализ (ИФА) для выявления антител к ВЛКРС в сыворотке крови крупного рогатого скота	197
Проведение дот-блот ИФА для обнаружения антител к ВЛКРС в сыворотке крови крупного рогатого скота	220
Проведение дот-блот ИФА для выявления антител к <i>M.bovis</i> в сыворотке крови крупного рогатого скота	121
Иммуноблот анализа	40
<b>ВСЕГО ПРОБ</b>	<b>5324</b>

Для исследования пробы крови и сыворотки крови крупного рогатого скота получали из благополучных и неблагополучных по лейкозу и туберкулезу хозяйств Республики Татарстан.

**Постановка ИФА.** Иммуноферментный анализ для выявления специфических антител к ВЛКРС и микобактериям туберкулеза использовали в непрямом варианте на полистироловых планшетах для иммуноферментных реакций

(производства «Медполимер» (г.Санкт-Петербург)) по методу описанному Woller et al. (1976).

Для учета результатов реакции ИФА использовали вертикальный сканирующий спектрофотометр. Результаты реакции оценивали по коэффициенту специфичности (К), который равняется отношению величины оптической плотности испытуемой пробы (ОПо) на величину оптической плотности контрольной пробы (ОПк).

В качестве конъюгата применяли диагностические антитела против иммуноглобулинов крупного рогатого скота, маркированные ферментом, пероксидазой (Anti-Bovine IgG-Peroxidase), производства фирмы «Сигма».

Изучение эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота - в хозяйствах разных районов РТ проводили методом ИФА с применением «Набора для выявления антител к ВЛКРС в сыворотке крови и молоке крупного рогатого скота», производства ФКП «Курская биофабрика». Учет результатов реакции проводили согласно инструкции диагностических наборов.

**Постановка РИД.** Реакцию иммунодиффузии в агаровом геле (РИД) для диагностики лейкоза крупного рогатого скота ставили согласно наставлению по применению «Набора для серодиагностики лейкоза крупного рогатого скота» производства ФКП «Курская биофабрика». Учет результатов проводили согласно инструкциям диагностических наборов.

Разливали расплавленный агаровый гель, имеющий температуру 50-60°C, слоем 2-3 мм в чистые чашки Петри и держали 1 час при комнатной температуре. Прорезали 7 лунок диаметром 5 мм в затвердевшем агаре штампом-пробойника: одна лунка в центре и семь - по периферии.

В лунки вносили разведенный антиген, контрольные и испытуемые сыворотки. Для этой цели применяли автоматические пипетки. Лунки заполняли до верхнего края, не допуская при этом переливания жидкости через край. В центральную лунку вносили антиген, а две диаметрально противоположные лунки



наполняли специфической преципитирующей и контрольной отрицательной сыворотками, четыре оставшиеся лунки - исследуемыми сыворотками. После этого, чашки Петри выдерживали в течение 2-х дней (48 часов) при температуре 18-27° С.

Анализ результатов реакции осуществляли через 48 часов и оценивали или наличие четкой контрольной линии преципитации между антигеном и специфической преципитирующей сывороткой или отсутствие таковой линии с отрицательной контрольной сывороткой.

Исследуемые пробы считались положительными при образовании между лунками с испытуемой сывороткой и антигеном линии преципитации, которая соединяется с контрольной линией и идентична ей.

Исследуемую пробу считали отрицательной, если контрольная линия преципитации продолжается до лунки с испытуемой сывороткой без изгибов.

**ИФА для выявления антител к микобактериям туберкулеза.** Для сенсibilизации планшетов для иммунологических реакций в лунки планшета вносили по 100 мкл микобактериального антигена предварительного разведенного в карбонатном буфере. В зависимости от количества исследуемых сывороток использовали от 1 до 5 планшет. При больших объемах исследований сенсibilизировали каждый планшет отдельным антигеном. При малых объемах исследований использовали следующую схему сенсibilизации планшета: в лунку А1 внесли 100 мкл антигена *M.bovis*, А2 - *M.avium.*, А3 - *M.scotochromogenes* и А4 - *M.nonchromogenes.* и.т.д. Планшеты накрывали крышкой и инкубировали при 4°С в течение 24 часов. Удаляли из лунок жидкости с помощью отсасывающего устройства и вносили по 200 мкл 0.01% раствора альбумина для блокирования свободных мест лунок планшета в течение 3 часов. Удаляли из лунок раствора белка с помощью отсасывающего устройства и проводили стандартную процедуру промывания.

Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили в непрямом твердофазном варианте по стандартной методике. В лунки планшета вносили по 100 мкл исследуемых и контрольных сывороток крови, предварительно разведенные 1:200 в фосфатно-солевом буфере (ФСБ-Т). Планшеты накрывали крышкой и инкубировали 45 минут при 37°C.

Лунки планшета освобождали от содержимого и трижды промывали ФСБ-Т, каждый раз полностью заполняя лунки буфером и вытряхивая содержимое. Во все используемые лунки планшета вносили по 100 мкл раствора конъюгата и инкубировали 20 мин при 37° С. Проводили процедуру промывания лунок не менее 5 раз и в лунки вносили по 100 мкл раствора субстрата (ТМБ-тетраметилбензидин) и инкубировали 10 мин при комнатной температуре.

Учет результатов ИФА проводили на спектрофотометре с вертикальным лучом света при длине волне 480 нм. Результаты реакции считаются достоверными, если контрольные показатели соответствуют следующим критериям:

- ОП отрицательных контролей (К-) не должны различаться не более чем на 0,02 и не превышать значения 0,2;
- ОП положительного контроля (К+) должна превышать ОП отрицательного контроля более чем на 0,2.

Наличие или отсутствие антител к антигенам в исследуемом образце сыворотки крови определяют при сравнении значений ОП каждого исследованного образца со значением ОП<sub>кри</sub>. Для это цели необходимо вычислить среднюю величину ОП (К-).

Значение ОП<sub>кри</sub> определяют по формуле:  $ОП_{кри} = ОП (К-) + 0,2$ .

Исследуемые образцы, значения ОП которых меньше ОП<sub>кри</sub>, считаются отрицательными. Образцы, значения ОП которых больше или равны ОП<sub>кри</sub>, считаются положительными.

**Получение антигена вируса лейкоза из сывороток крови больных лейкозом коров.** При выделении белковых фракции ВЛКРС из сывороток крови

больных лейкозом коров исходили из того, что вирусные частицы в основном содержатся в составе циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). Методику разрабатывали с учетом необходимости диссоциации циркулирующих иммунных комплексов и освобождения от сывороточных антител и всех остальных белков.

Для получения антигена ВЛКРС из сывороток крови больных лейкозом коров, условно выделили 3 основные стадии:

#### 1. Выделение ЦИК.

Иммунные комплексы из сыворотки крови выделяли методом преципитации в ПЭГ-6000 (полиэтиленгликоле). Для этого смешивали сыворотку крови от больных лейкозом коров с 6% раствором полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000) в 0,1М боратном буфере (рН-8,8) в соотношении 1:1, перемешивали и инкубировали 24 часа при +4°C. По истечении этого времени преципитат осаждали центрифугированием при 3000 об./мин. в течение 10 минут. Супернатант сливали, а осадок растворяли в 5-ти кратном объеме 3% раствора ПЭГ-6000 в боратном буфере и вновь центрифугировали в тех же условиях (промывка).

#### 2. Диссоциация ЦИК и удаление глобулинов.

Полученный осадок, содержащий ЦИК с компонентами вируса, растворяли в 3-х кратном объеме дистиллированной воды и выдерживали, периодически перемешивая, при 60°C в течение 1 часа. По истечении этого времени пробу смешивали равным объемом насыщенного раствора сульфата аммония, осторожно перемешивали в течение 2-3 минут при 60°C и центрифугировали при 3000 об./мин. в течение 10 минут.

#### 3. Выделение и очищение антигенного препарата.

Надосадочную жидкость осторожно отделяли и диализировали при комнатной температуре в течение 48 часов против дистиллированной воды. Диализат фильтровали через бумажный фильтр и концентрировали (не менее в 10 раз) против силикагеля L 100/250 для хроматографии.

Изучение антигенной структуры специфических антигенных компонентов ВЛКРС в полученном антигенном препарате проводили методом электрофореза.

**Электрофоретическое фракционирование антигена ВЛКРС.** Дискэлектрофорез белковых фракций ВЛКРС осуществляли по методике, описанной Laemli (1970) [147] в пластинчатом полиакриламидном геле (ПААГ) с применением додецилсульфата натрия - как детергента и  $\beta$  меркаптоэтанола – как восстановителя разрыва по S-S связям.

Раствор, содержащий акриламид и бисакриламид в соотношении 30:0,8, служил основой для приготовления концентрирующего и разделяющего гелей. В конечной концентрации, разделяющий гель содержал 0,375М трис-HCL буфер (pH 8,8), 0,1% ДСН. Концентрирующий 3% гель – 0,125М три-HCL буфер (pH 6,8), 0,1% ДСН. Катализаторами полимеризации служили аммоний надсерноокислый и тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД). Пробы растворяли в буфере для концентрирующего геля, к которому добавляли 12,5% глицерина, 1,25% ДСН и 1,25%  $\beta$  меркаптоэтанола. Перед электрофорезом их прогревали в течение 5 минут в водяной бане при 100 °С. В качестве лидирующего красителя использовали бромфеноловый синий, конечная концентрация которого в пробах составляла 0,001%. Электрофорез проводили при комнатной температуре.

Фракционированный в гелях материал фиксировали в водном растворе, содержащем 20% метилового спирта и 7% уксусной кислоты; окрашивали раствором Кумасси ярко-голубым G-250 ( R.Lamb, et al., 1976) и азотнокислым серебром (С.М.Tsai, 1986).

Для определения молекулярных масс белков, содержащихся в антигенных препаратах, использовали разгонку белковых стандартов (Broadrange производитель Сигма и био-Рад) по логарифмической кривой длины пробега маркеров по К. Weber, М. Osborn (1969) и Н.М. Филлипович (1978). Определяли также инструментально, путем оптического сканирования и денситометрирования с дал-

ьнейшей компьютерной обработкой данных с применением программы Imagemaster.

**Постановка иммуноблотинга.** Перенос белков фракционированных в ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли по способу описанному Towbin et al (1989). Для этого полиакриламидную гель (ПААГ) опускали в трис-НСl буфер с рН 10,5 на 30 минут, нитроцеллюлозную мембрану выдерживали в трис-глициновом буфере с рН 8,8 в течение 5 минут. После этого, собрали сэндвич и поставили его между катодом и анодом. Электроперенос проводили в течение 2,5 часа при напряжении 100 V и силе тока 100 mA на пластинку с охлаждением посредством хладагентов (Coolpack MC-3 laminarmedca).

**Иммуноблотинг анализ.** Нитроцеллюлозную мембрану нарезали на полоски – стрипы, маркировали, помещали их в пластиковые канавки, вносили 2 мл ФСР-Т, выдерживали 5 минут, вносили по 10 мкл исследуемых сывороток на стрип, выдерживали 2 часа при комнатной температуре на шейкере, 3 раза промывали раствором ФСБ-Т с 5 минутной инкубацией, после каждой промывки раствор аспирировали в дезинфекционную емкость с 6% перекиси водорода, вносили конъюгат в рабочем разведении, инкубировали 1 час при комнатной температуре на шейкере, стрипы 3 раза промывали раствором ФСБ-Т, вносили субстратный раствор, инкубировали до развития цветного окрашивания 15-30 минут, 3 раза промывали дистиллированной водой и высушивали. Учет реакции проводили визуально и инструментально при помощи оптического сканирования и денситометрирования по интенсивности окрашивания с использованием компьютерной программы Imagemaster, версия 1. Для изучения спектра противолейкозных антител в испытуемых пробах сывороток крови крупного рогатого скота применяли метод иммуноблот анализа на тест-системе “NEWLAVBLOT” фирмы BioRad (США).

## **3.2 Результаты собственных исследований**

### **3.2.1 Иммуноферментный анализ в диагностике лейкоза крупного рогатого скота**

Отличительным признаком ВЛКРС-инфекции является образование специфических антител, которые обнаруживаются в крови через 2-8 недель после заражения животных, и сохраняются в инфицированном организме до конца жизни. Помимо этого, установлено, что на разных стадиях развития иммунитета меняется спектр и титры антител, выявляются антитела не только основным белкам ВЛКРС но и продуктам их распада. Следовательно, серологические методы являются базовыми для прижизненной диагностики лейкоза крупного рогатого скота. На сегодняшний день в соответствии со стандартами МЭБ (Международное Эпизоотическое Бюро) признанными методами диагностики лейкоза крупного рогатого скота являются РИД и методы ИФА [183].

Диагностические исследования ВЛКРС-инфекций в РФ представлен главным образом, реакцией иммунодиффузии в геле (РИД), тогда как в других странах мира широко применяется иммуноферментный анализ.

Для сравнительного анализа эффективности РИД и ИФА в диагностике лейкозе крупного рогатого скота проанализировали 2073 пробы сыворотки крови, полученные из хозяйств разных районов РТ. Результаты исследования представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Результаты иммуноферментного анализа и реакции иммуно-диффузии для выявления антител к ВЛКРС в сыворотках крови крупного рогатого скота

№ п/п	Район	Всего проб	РИД		ИФА	
			Полож.	%	Полож.	%
1.	Дрожжановский	18	6	33,3	8	44,4
2.	Рыбно-Слобод.	362	89	24,6	119	32,9
3.	Атнинский	546	1	0,2	16	3,0
4.	Тюлячинский	343	163	47,5	188	54,8
5.	Лаишевский	99	3	3,0	7	7,0
6.	Высокогорский	184	-	-	4	2,2
7.	Актанышский	230	54	23,5	102	44,3
8.	Менделеевский	174	2	1,1	18	10,3
9.	Кировский	14	-	-	-	-
10	Сабинский	11	-	-	-	-
11.	Алькеевский	92	30	32,6	58	63,0
ВСЕГО		2073	348	16,8	520	25,1

По данным таблицы 7 видно, что инфицированность крупного рогатого скота вирусом лейкоза в исследованных районах по результатам РИД и ИФА составляет 16,8% и 25,1% соответственно. Высокая инфицированность крупного рогатого скота ВЛКРС по результатам ИФА выявлена в хозяйствах Алькеевского района. В Кировском районе г. Казани и в Сабинском районе животных инфицированных ВЛКРС не обнаружены. Это возможно из-за того, что пробы сыворотки крови были получены только от коров частного сектора. В таких районах как Атнинский, Лаишевский, Высокогорский и Менделеевский, которые считались благополучными по лейкозу крупного рогатого скота, методом ИФА установлена инфицированность животных вирусом лейкоза до 10,3%. Результаты исследований подтвердили более высокую чувствительность иммуноферментного анализа. 172 пробы отрицательные в РИД, в ИФА показали положительные результаты.

По результатам наших исследований лейкоз крупного рогатого скота имеет более широкое распространение в агропромышленных предприятиях. В частном секторе процент инфицированности составляет несколько ниже, однако в связи с относительно небольшим количеством исследованных проб делать определенных выводов не представляется возможным. Результаты исследований проб сывороток крови крупного рогатого скота методом ИФА и РИД по видам хозяйств представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Результаты иммуноферментного анализа и реакции иммунодиффузии для исследований проб сыворотки крови коров по видам хозяйств

№	Вид хозяйства	Всего проб	Положительные в			
			РИД		ИФА	
			Кол-во	%	Кол-во	%
1.	Агропромышленные предприятия	2026	341	16,7	511	25,1
2.	Индивидуальные хозяйства (частный сектор)	47	7	14,8	9	19,2
ВСЕГО		2073	348	16,7	520	25,1

Инфицированность животных в агропредприятиях по результатам РИД 16,7%, а по ИФА – 25,1%.

При сравнительном изучении эффективности ИФА и РИД в диагностике лейкозе у разных физиологических групп крупного рогатого скота установили, что лейкоз крупного рогатого скота более часто встречается у молочных коров и телят. Результаты исследований представлены в таблице 9.



Таблица 9 - Инфицированность крупного рогатого скота вирусом лейкоза крупного рогатого скота по физиологическим группам

№	Группа Животных	Исследо- вано проб	Положительные в			
			РИД		ИФА	
			Кол-во	%	Кол-во	%
1.	Молочные коровы	1810	283	15,6	450	24,8
2.	Быки-производители	10	-	-	-	-
3.	Телята до 1-го года	253	65	25,6	70	27,6
ВСЕГО		2073	348	16,8	520	25,1

Процент инфицированности молочных коров и телят до 1-го года в РИД составлял 15,6 и 25,6%, в ИФА - 24,8% и 27,6% соответственно.

Полученные данные убедительно доказывают, что эффективность ИФА в выявлении инфицированных животных гораздо выше, чем метод РИД.

### **3.2.2 Влияние термической обработки проб сыворотки крови на чувствительность ИФА**

Возбудитель лейкоза крупного рогатого скота – РНК-содержащий вирус из семейства *Retroviridae*. При хронических инфекциях, вызванных ретровирусами, а также при персистентных инфекциях, в биологических жидкостях организма или на поверхности клеток появляются иммунные комплексы «антиген-антитело» [68]. Антитела, находясь в составе иммунных комплексов, могут участвовать в элиминации инфекционного агента, вызывать гибель инфицированной клетки и даже способствовать усилению инфекции.

По исследованиям, проведенным Митиным Ю.А. (1997) [61], сходные иммунные комплексы выделенные из сыворотки крови, обладают низкой

температурной устойчивостью и могут разрушаться при инкубации в температурном диапазоне от +38°C до +40 °C (время инкубации от 30 минут до 2-х часов).

Для выявления циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), были отобраны пробы сыворотки крови из числа положительно реагирующих в иммуноферментном анализе на лейкоз. Пробы смешивали в соотношении 1: 1 с 7% раствором полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000) в 0,1М боратном буфере (рН 8,8), перемешивали и инкубировали при температуре +4°C в течение 72-х часов. Для осаждения преципитата, проводили центрифугирование смеси при 5000g в течение 20 минут и трижды промывали десятикратным объемом ПЭГ-6000 в концентрациях: 3,5%, 7% и 10,5% в боратном буфере. ПЭГ действует на белковые растворы как другие органические растворители, которые могут вызвать осаждение наряду с иммунными комплексами и свободных иммуноглобулинов. На основании данного факта, мы провели исследование по определению титра анти-ВЛКРС антител в пуле сывороток крови до и после обработки с ПЭГ-6000. В результате было выявлено, что после осаждения ЦИК из пула сывороток крови 7%-ным раствором ПЭГ-6000 титры противолейкозных антител в ИФА не изменялись и были равны титрам антител в исходной пробе.

Выделенные иммунные комплексы растворяли в физиологическом растворе и изучали их активность в ИФА. Комплексы разбивали с предварительной инкубацией проб при 60°C в течение 1 часа. Титры «связанных» анти-ВЛКРС антител в пробах достигали до 1:1024.

На следующем этапе наших исследований, пробы сывороток крови исследовали в ИФА до и после их инкубирования при 60 °C в течение 1 часа. Всего исследовано 201 проба сывороток крови коров из неблагополучных по лейкозу хозяйств, в том числе 109 проб из Агрофирмы «Кама Агро, Рыбно-Слободского района и 92 проб из ООО «Сerp и Молот» Высокогорского района. Предварительно все пробы были анализированы в РИД. Результаты исследований представлены в таблице 10.

Таблица 10 - Результаты исследования температурного воздействия на титр антител в иммуноферментном анализе при лейкозе крупного рогатого скота

№ п/п	Хозяйства	Всего проб	РИД		ИФА без инкубации проб		ИФА с инкубацией проб	
			Полож.	Отр.	Полож.	Отр.	Полож.	Отр.
1.	Агрофирма «Кама Агро»	109	24	85	49	60	52	57
2.	ООО «Серп и Молот»	92	-	92	2	90	5	87

Из таблицы 10 видно, что количество положительных проб в ИФА до и после их инкубации по сравнению с РИД значительно увеличилось. Из 85 отрицательно реагирующих в РИД проб полученных от животных Агрофирмы «Кама Агро», 28 реагировали положительно в ИФА (25 проб в ИФА без инкубации и еще 3 пробы в ИФА после инкубации). Из 92 отрицательно реагирующих в РИД проб полученных от коров и телок хозяйства ООО «Серп и Молот» - 2 стали положительными в ИФА до инкубации и дополнительно 3 реагировали положительно после инкубации при 60°C в течение 1-го часа.

В целях подтверждения полученных результатов были проведены исследования проб сыворотки крови коров из 4-х разных хозяйств Дрожжановского и Актанышского районов с определением изменений оптической плотности (ОП) лунок в ИФА. Предварительно все пробы были проанализированы в РИД. Всего исследовано по 33 пробы. Результаты изменений показателей ОП в ИФА проб сыворотки крови до и после инкубирования представлены в таблице 11.

Таблица 11- Изменение показателей оптической плотности (ОП) в ИФА

№ п/п	Хозяйства	РИД	ИФА без инкубации проб		ИФА с инкубацией проб		
			Рез-т	ОП	Рез-т	ОП	
1.	ООО «Агрофирма им. В.П.Дементьева»	+	+	1,471±0,13	+	1,786±0.16	
2.		-	-	0,163±0,02	-	0,163±0.01	
3.		+	+	1,493±0,14	+	1,550±0.14	
4.	ООО«Ак Барс Дрожанное»	+	+	1,105±0,09	+	1,380±0.13	
5.		-	-	0,159±0,01	-	0,198±0.02	
6.		+	+	1,287±0,11	+	1,689±0.16	
7.		-	-	0,173±0,02	-	0,173±0.02	
8.		-	-	0,151±0,01	-	0,151±0.01	
9.		-	-	0,126±0,01	-	0,144±0.01	
10.		+	+	1,106±0,09	+	1,407±0.13	
11.		-	+	0,800±0,07	+	1,105±0.09	
12.		+	+	1,353±0,12	+	1,705±0.16	
13.		-	-	0,420±0,03	+	0,781±0.06	
14.		-	-	0,400±0,03	+	0,987±0.01	
15.		А/Ф Актаныш	+	+	1,854±0,17	+	1,957±0.17
16.			-	-	0,152±0,01	+	0,733±0.06
17.			-	+	0,579±0,05	+	2,082±0.18
18.	-		-	0,097±0,01	+	0,647±0.05	
19.	-		-	0,067±0,01	+	1,237±0.11	
20.	-		+	0,597±0,05	+	2,077±0.18	
21.	-		+	0,550±0,04	+	2,207±0.19	
22.	-		+	0,753±0,06	+	2,082±0.18	
23.	-		-	0,354±0,03	+	1,618±0.15	
24.	-		+	0,602±0,05	+	1,937±0.17	
25.	-		+	0,563±0,04	+	2,128±0.18	
26.	-		-	0,400±0,03	+	1,987±0.17	
27.	КФА «Низамов А.А»	+	+	0,954±0,08	+	0,981±0.08	
28.		-	-	0,158±0,01	-	0,212±0.02	
29.		-	-	0,122±0,01	-	0,123±0.01	
30.		-	-	0,096±0,01	-	0,145±0.01	
31.		-	+	0,943±0,08	+	0,965±0.08	
32.		-	-	0,140±0,01	-	0,148±0.01	
33.		-	-	0,094±0,01	-	0,100±0.01	

p&lt;0,001

Из данных, представленных в таблице видно, что 8 проб сыворотки крови были положительные и 25 были отрицательные в РИД. Из 25 отрицательных проб в РИД, 8 реагировали положительно в ИФА до их нагревания и еще 7 реагировали положительно в ИФА после инкубирования при 60°C в течение 1 часа. В целом результаты оптической плотности лунок в большинстве случаев увеличиваются. Однако следует отметить, что оптические плотности лунок у некоторых отрицательных проб в РИД и в ИФА, оставались неизменными. Показатели оптической плотности в результате температурного воздействия у некоторых проб увеличились на 1,5 пунктов и более.

Проведенные исследования доказывают, что ВЛКПС-инфекция сопровождается образованием иммунных комплексов, в составе которых выявляются «скрытые» противовирусные антитела.

Увеличение титров свободных антител после инкубирования объясняется диссоциацией иммунных комплексов, спецификой динамики образования антител и иммунных комплексов при лейкозе. Таким образом, ИФА с предварительной диссоциацией ЦИК в пробах сыворотки крови нагреванием при 60°C в течение 1 часа гораздо чувствительнее и дополнительно выявляет инфицированных из числа РИД и ИФА отрицательных в классическом исполнении.

### **3.2.3 Выделение и характеристика антигенных компонентов вируса лейкоза крупного рогатого скота**

Основным препятствием при разработке иммунохимических методов диагностики инфекционных болезней является качество используемого антигена. Существующие на сегодняшний день методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота не учитывают генетическое многообразие возбудителя болезни. Результаты научных исследований последних лет подтверждают о необходимости комплексного подхода при определении, как антигенов вируса, так и антител к ним в серологической диагностике лейкоза крупного рогатого скота.

При выделении антигена ВЛКРС из сывороток крови больных лейкозом коров исходили из того, что вирусные частицы главным образом содержатся в составе ЦИК. Технологию разрабатывали с учетом необходимости диссоциации циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и избавления от сывороточных антител и всех остальных белков (см. Материалы и методы).

Проводили изучение электрофоретической подвижности полученных антигенных фракций содержащихся в диализате в 12,5% полиакриламидном геле, а также проводили иммуоблот анализ полученных фракций с сывороткой крови инфицированных и больных лейкозом коров из неблагополученного хозяйства РТ.

Молекулярные массы белков, содержащихся в антигенных препаратах, определяли в соответствии с разгонкой белковых стандартов (Broadrange изготовитель Сигма и био-Рад) по логарифмической кривой длины пробега маркеров по K.Weber, M.Osborn (1969) и Н.М.Филлипович (1978). Электроперенос белков фракционированных в ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану проводили по методике, описанной Towbin et al. (1989). (Материалы и методы).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемый антиген является комплексным, содержащим различные белковые фракции вируса лейкоза. Как видно из электрофореграммы (рисунок 3) молекулярные массы фракций составляют от 14 до 160 и более кД. И как показал иммуоблотанализ белковых компонентов ВЛКРС с сывороткой крови от гематологически больной лейкозом коровы, в зависимости от стадии инфекционного процесса против каждой из них образуются антитела (рисунок 4).

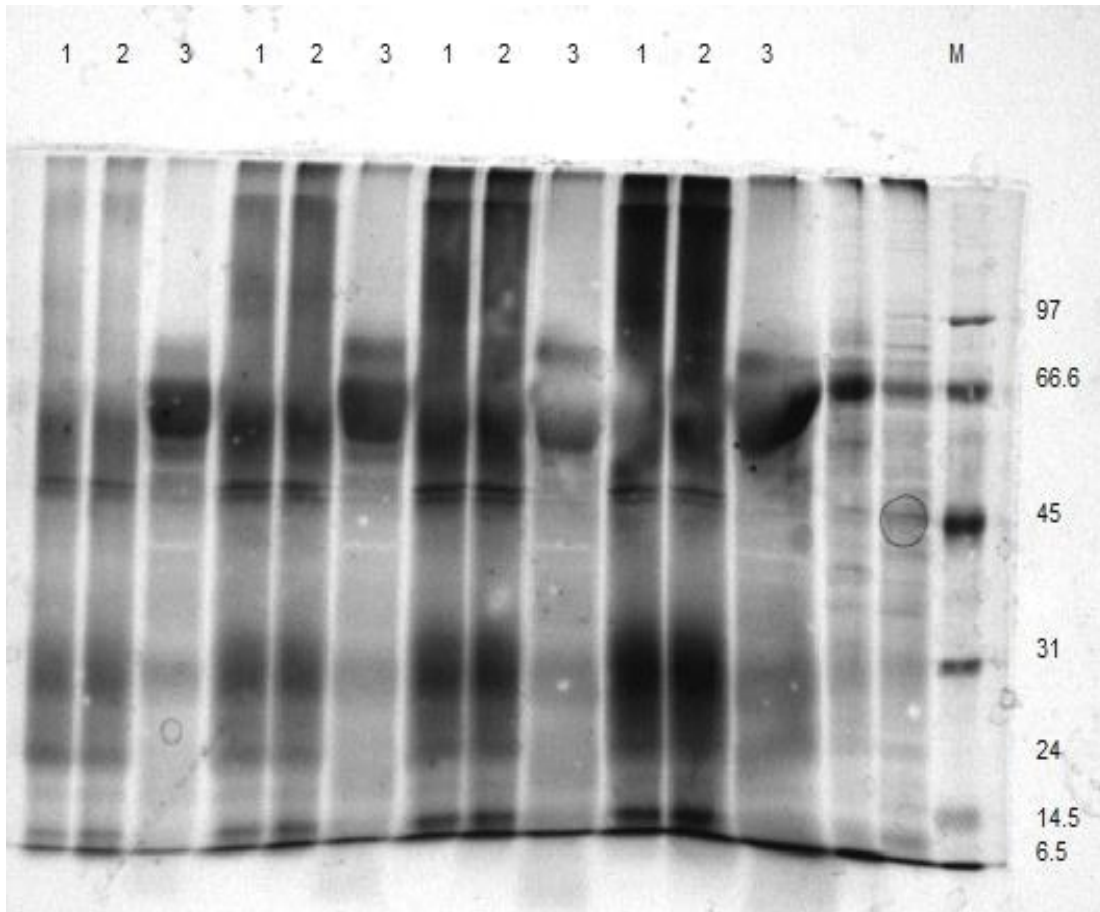


Рисунок 3 – Электрофореграмма белковых компонентов ВЛКРС окрашенных азотнокислым серебром.

Проводили иммуноблот анализ полученных фракций антигенов ВЛКРС с сывороткой крови инфицированных и больных лейкозом коров.

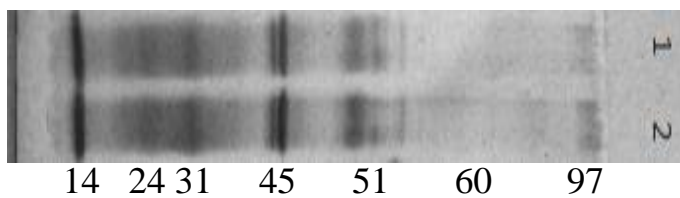


Рисунок 4 - Иммуноблотинг белковых компонентов ВЛКРС с сывороткой крови от гематологически больной лейкозом коровы.

Методом иммуноблотинга был изучен спектр антител в пробах сывороток крови коров на различных стадиях инфицированности с ВЛКРС. На рисунке 5

представлены денситограммы иммуноблотаграмм сероактивных пептидов ВЛКРС с сыворотками от коров на разной стадии инфекции.

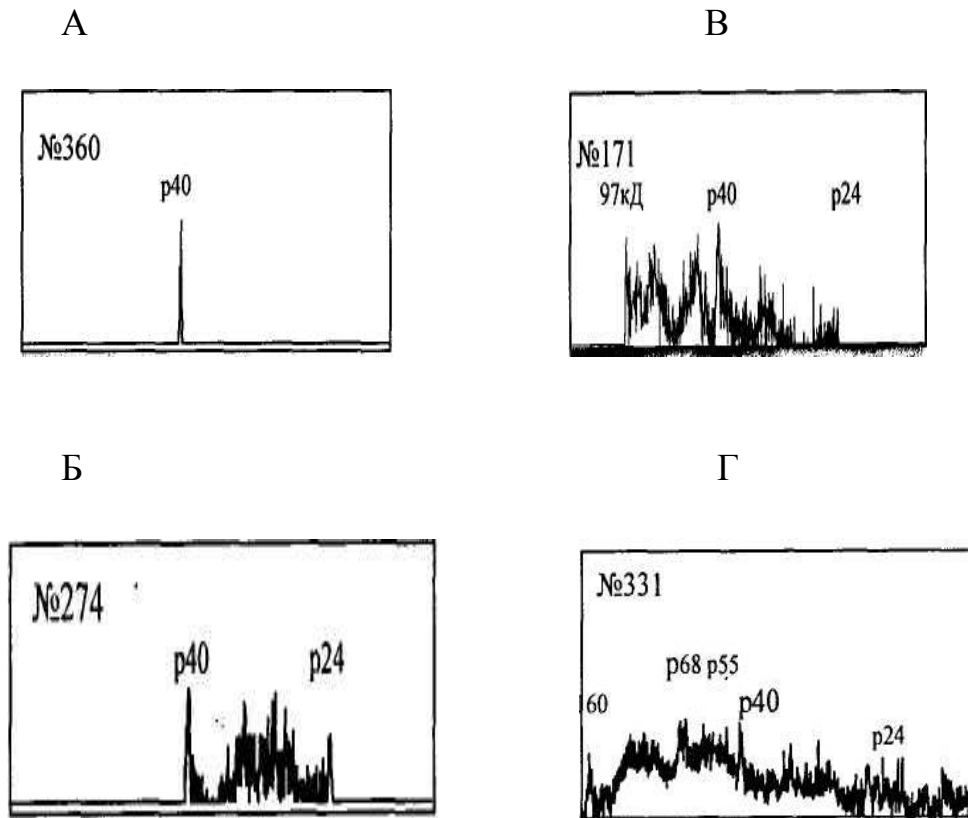


Рисунок 5 - Денситограммы иммуноблотаграмм сероактивных полипептидов ВЛКРС с сыворотками крови от инфицированных коров на разной стадии развития инфекции.

Обозначения:

А – сыворотка крови коровы в начальной стадии инфекции, впервые реагировавшей на РИД положительно;

Б и В – сыворотки крови коров на более поздних стадиях развития болезни;

Г – сыворотка крови гематологически больной коровы.

Судя по рисункам можно сказать, что спектр свободно циркулирующих в крови антител меняется с развитием инфекционного процесса. Полученный анти-



ген позволяет более полно обнаруживать антитела к возбудителю и способствовать повышению эффективности диагностических мероприятий при лейкозе крупного рогатого скота.

### **3.2.4 Сравнительное изучение полученного антигена с коммерческим антигеном в ИФА**

Вирус лейкоза крупного рогатого скота имеет выраженную антигенную активность. В организме крупного рогатого скота антитела вырабатываются главным образом, на структурные белки вириона. Несмотря на то, что диагностическое значение имеют антитела против gp51 и p24, в крови зараженных животных циркулируют антитела к p24, p15, p12, p10, gp30, gp51 и др. [70, 104, 127]. В количественном соотношении они могут коррелировать со стадией инфекционного процесса. Кроме того, установлено, что на разных стадиях развития иммунитета, при лейкозе крупного рогатого скота меняется и спектр свободно циркулирующих в сыворотке крови антител, и обнаруживаются антитела не только основным белкам вириона, но и продуктам их распада. Все эти данные свидетельствуют о необходимости комплексного подхода при определении как антигенов вируса, так и антител к ним в серологической диагностике лейкоза крупного рогатого скота.

Учитывая тот факт, что основным сдерживающим фактором при разработке иммунохимических методов анализа является качество используемого антигена, изучали антигенные свойства белковых фракций ВЛКРС выделенных из сыворотки крови больных лейкозом коров методом ИФА. Всего исследовали более 100 проб сывороток крови. Эти сыворотки предварительно были проанализированы в ИФА с использованием коммерческого набора. Учет результатов проводили согласно инструкции диагностического набора. Результаты исследований представлены в таблице 12.

Таблица 12 - Результаты ИФА проб сывороток крови коров с использованием исследуемого антигена и коммерческого набора

Пробы сывороток крови	Иммуноферментный анализ с использованием			
	Исследуемого антигена		Коммерческого набора	
	Положит-е	Отрицат-е	Полжит-е	Отрицат-е
Кол-во проб	65	35	63	37
Всего	100		100	

Результаты ИФА с использованием исследуемого антигена и коммерческого набора в целом совпали. Из 100 исследованных проб сывороток крови, установлено различие в показателях двух проб, которые при ИФА с коммерческим набором показали отрицательные, а с исследуемым антигеном - положительные результаты.

Для более полной оценки полученных результатов, повторно исследовали 10 проб сывороток крови от инфицированных ВЛКРС коров принадлежащих хозяйству СПК «Колос» Бавлинского района РТ сравнивая показатели оптической плотности (ОП) лунок в ИФА. Результаты представлены в таблице 13.

Таблица 13 - Показатели оптической плотности в ИФА с использованием разных антигенов

№ п/п	Иммуноферментный анализ с использованием	
	Исследуемого антигена	Коммерч. набора
1.	1,923±0.12	1,927±0.12
2.	1,415±0.07	1.397±0.06
3.	2,323±0.13	1,927±0.12
4.	1,312±0.06	1.315±0.06
5.	1,514±0.08	1,522±0.08
6.	1,317±0.06	1,310±0.06
7.	2,172±0.13	1,835±0.11
8.	1.651±0.09	1,473±0.08
9.	1,427±0.07	1,432±0.07
10.	1,245±0.05	1,260±0.05
Положительный контр.	1,873±0.11	2,108±0.13
Отрицательный контр.	0,189±0.01	0,187±0.01

$p < 0.001$

Из приведенных в таблице данных особый интерес представляют результаты оптической плотности проб № 3, 7 и 8. У этих проб показатели ОП гораздо выше с исследуемым антигеном. Необходимо отметить, что показатели оптической плотности положительной контрольной сыворотки с исследуемым антигеном ниже, чем у коммерческого набора. Объяснить данный факт можно только тем, что в тест-системах для диагностики лейкоза крупного рогатого скота в основном используется белки оболочки вируса – gp51. Положительные контрольные сыворотки, соответственно получены против только этого антигена.

### **3.2.5 Разработка и апробация дот-блот ИФА тест-системы для выявления антител к ВЛКРС.**

В условиях современного сельскохозяйственного производства, особенно на крупных животноводческих комплексах, где концентрировано большое количество поголовья животных, проведение профилактических мероприятий по обеспечению надежного эпизоотического благополучия и продовольственной безопасности, разработка экспресс методов диагностики инфекционных болезней является практической необходимостью.

Методы иммунохимического анализа являются наиболее значимыми для разработки экспресс-тестов в диагностике инфекционных болезней [9]. При этом применяются различные технологии, среди которых немаловажную роль играют модифицированные методы ИФА, которые в представительном арсенале методов, используемых в вирусологии, занимают главное место. В этой связи наиболее перспективными являются методы ИФА разной модификации в дот-блот варианте.

Дот-иммуноанализ основан на иммунохимической реакции антиген - антитело. Исследуемые образцы биологических жидкостей наносят на твердый носитель в виде сетчатой матрицы. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью антивидового конъюгата образующего, после добавления нерастворимого субстрата, окрашенные пятна различной интенсивности в местах связывания антигена и антитела.

Способ постановки дот-блот иммуноанализа является общеизвестной и описывается, применительно для диагностики отдельных инфекций, в работах многих авторов. Главной проблемой при разработке данной тест-системы является качество используемого антигена т.е: специфичность, степень чистоты (отсутствие клеточного дебриса, дающего ложные результаты), гомогенность и химическая природа (нативный или синтетический аналог в виде олигопептидов).

Основой для таких тест-систем является иммобилизованный на полоске нитроцеллюлозной мембраны (НЦМ) антиген возбудителя инфекционной болезни (иммобилон). Носители на основе нитроцеллюлозы считаются наиболее удобными за счет высоких сорбционных свойств для белков и простоты обращения с ними.

При разработке дот-блот ИФА тест-системы для выявления антител к ВЛКРС в качестве антигенов применяли белковые фракции ВЛКРС выделенные по разработанными нами способу.

Дот-блот ИФА на нитроцеллюлозных мембранах проводили по методу описанному ниже.

На первом этапе работы оптимизировали условия и время адсорбции антигена на полосках нитроцеллюлозной мембраны и связывания антител с иммобилизованным на НЦМ антигеном, а также время инкубации НЦМ с конъюгатом и время ферментативной реакции с субстратом. При этом основной задачей наших исследований было определение минимального временного интервала инкубации во всех случаях, не вызывающего понижения чувствительности тест-системы.

Полоски нитроцеллюлозной мембраны длиной 6 см и шириной 0,5 см маркировали карандашом на квадратики 5\*5 мм для удобства при проведении реакции (один квадратик - одна реакция). Раствор антигена в карбонатном буфере (рН – 9,6) наносили на каждый квадратик в объеме 2 мкл. Адсорбцию антигена на полосках мембраны проводили при комнатной температуре в течение 1-го часа. Для блокировки свободных после сорбции антигена мест на НЦМ использовали 0,1% раствор человеческого альбумина в дистиллированной воде. Оптимальное время инкубации НЦМ в растворе альбумина при комнатной температуре составило от двух часов и более. Полоски НЦМ промывали в твинфосфотном буфере, известном в методике классического ИФА, как промывочный раствор и подсушивали. Имобилон готов для дальнейшего использования.

Исследуемые сыворотки наносили на иммобилоны в рабочем разведении в ТФСБ (рН-7,3), определенных опытным путем. Инкубировали 40 минут при комнатной температуре, после чего полоски промывали не менее 5 раз с промывочным раствором. Конъюгат, Anti-Bovine IgG-Peroxidase - производства фирмы «Сигма» наносили на каждую точку полоски по 2 мкл и инкубировали на 15 минут при комнатной температуре. Полоски промывали не менее 6 раз и подсушили. Субстратную смесь также наносили точечным методом и инкубировали на темном месте в течение 5 - 7 минут. Появление окрашенной в синий цвет точки на месте нанесения реактивов, которые становятся желтой после нанесения стоп-раствора, свидетельствует о положительном результате.

Разработанную тест-систему испытывали для выявления антител к ВЛКРС в пробах сывороток крови коров из неблагополучных по лейкозу хозяйств. Всего исследовано 220 проб. В качестве сравнительного теста использовали ИФА в классическом варианте. 12 проб из исследованных были отрицательные, остальные - положительные в иммуноферментном анализе.



Рисунок 6 - Визуализация результатов дот-блот иммуноанализа

Результаты ИФА и дот-иммуноанализа в целом совпали, однако 10 проб положительные в ИФА, в дот-блоте были отрицательными. При этом, нужно отметить, что и в ИФА 6 из этих 10 обладали низкими коэффициентами специфичности, т.е. титры специфических антител в этих пробах были низкими.

На основе результатов проведенных исследований было установлено, что тест система дот-блот ИФА с использованием вирусных частиц выделенных из сывороток крови больных лейкозом коров, вполне применима для скрининговых исследований на лейкоз крупного рогатого скота. Она обладает меньшей чувствительностью, чем ИФА, тем не менее гораздо проще и дешевле при постановке, не требуют специального оборудования. Одним набором можно исследовать от 100 до 500 проб (в зависимости от комплектации). Постановка реакции требует гораздо меньше времени по сравнению с классическим ИФА и не зависит от количества проб.

Если для постановки классического ИФА требуется не менее 3-х часов, то для ИФА в дот-блот варианте около одного часа. При массовых исследованиях возможно нанесение раствора конъюгата и субстратной смеси методом флотации, что не влияет на чувствительность метода.

На основании полученных результатов разработаны методические рекомендации по выявлению антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота методом ИФА и дот-блот иммуноанализа с использованием антигена из местных штаммов возбудителя, утвержденные НТС ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, протокол № 8 от 18 октября 2017 г.

### **3.2.6 Разработка и апробация дот-блот ИФА тест-системы для выявления антител к микобактериям туберкулеза**

Тест-систему конструировали с использованием антигенов *M.bovis*, *M.avium* и *M.nonchromogenes* (ДМСО-антигены), полученные на кафедре биологической и неорганической химии Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э.Баумана [89]. Технологию использовали аналогичную дот-блот ИФА тест-системы для выявления антител к ВЛКРС. Основное отличие в том, что на полоски НЦМ наносили нескольких видов микобактериальных антигенов.

В целях апробации разработанной тест-системы, а также выяснения эпизоотической ситуации по туберкулезу, исследовали пробы сывороток крови из различных по эпизоотической ситуации хозяйств РТ.

Методом иммуноферментного анализа всего исследовали 197 проб, использовали антигены *M.bovis*, *M.avium* и *M.nonchromogenes*.

37 проб (18,8%) при иммуноферментном анализе показали положительные результаты на *M.bovis*. Из них, 21 пробы реагировали и с антигенами *M.nonchromogenes*.

Из 197 исследованных проб сывороток крови крупного рогатого скота, 121 были получены после проведения туберкулинизации. В таблице 14 представлены результаты ИФА проб сывороток крови в сравнении с результатами аллергических исследований этих животных.

Таблица 14 - Иммуноферментный анализ проб сывороток крови в сравнении с результатами аллергической пробы крупного рогатого скота

Районы	Всего проб	(+) на ППД	В ИФА		(-) на ППД	В ИФА	
			(+)	(-)		(+)	(-)
1. Балтасинский	23	13	2	11	10	-	10
2. Мензелинский	7	7	4	3	-	-	-
3. Камскоустинский	85	20	14	6	65	2	63
4. Петречинский	6	6	1	5	-	-	-
ИТОГО:	121	46	21	25	75	2	73
в %		38,0	17,4	20,7	62,0	1,7	60,3

Всего исследовано 121 проба сывороток крови. 46 (38,0%) из них от реагирующих, 75 (62,0%) - нереагирующих на туберкулин коров. При иммуноферментном анализе проб сывороток крови реагирующих на туберкулин животных, в 21 пробе обнаружены противотуберкулезные антитела в высоких



титрах, а в 25 пробах получены отрицательные результаты, что составляет - 45,7% и 54,3% соответственно.

При анализе методом ИФА проб сывороток крови нереагирующих на туберкулин животных (75 проб) были получены следующие результаты: 2 (2,7%) пробы – положительной реакцией, 73 (97,3%) пробы – с отрицательной реакцией.

Оценивая диагностическую эффективность разработанного теста на основе дот-блот ИФА, исследовали эти же 121 пробы. Результаты в целом оказались аналогичные таковым при исследовании классическим ИФА. Результаты исследований 46 проб из серии реагирующих на ППД представлены в таблице 15.

Таблица 15 - Результаты определения чувствительности дот-блот иммуноферментного анализа

Районы	Всего	ИФА		Дот-блот ИФА	
		(+)	(-)	(+)	(-)
Балтасинский	13	2	11	2	11
Мензелинский	7	4	3	4	3
Камскоустинский	20	14	6	12	8
Пестречинский	6	1	5	1	5
ИТОГО	46	21	25	19	27

Как видно из данных представленных в таблице, результаты исследования проб сывороток крови на туберкулез крупного рогатого скота методом ИФА и дот-блот ИФА в целом совпадают, только в 2-х пробах положительных в ИФА не обнаружен противотуберкулезных антител в дот-блот варианте.

#### 4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лейкоз находится на первом месте в структуре инфекционной патологии у крупного рогатого скота и имеет большую тенденцию к росту. Инфицированность скота ВЛКРС в РТ по данным на 2015 год составляет около 18%.

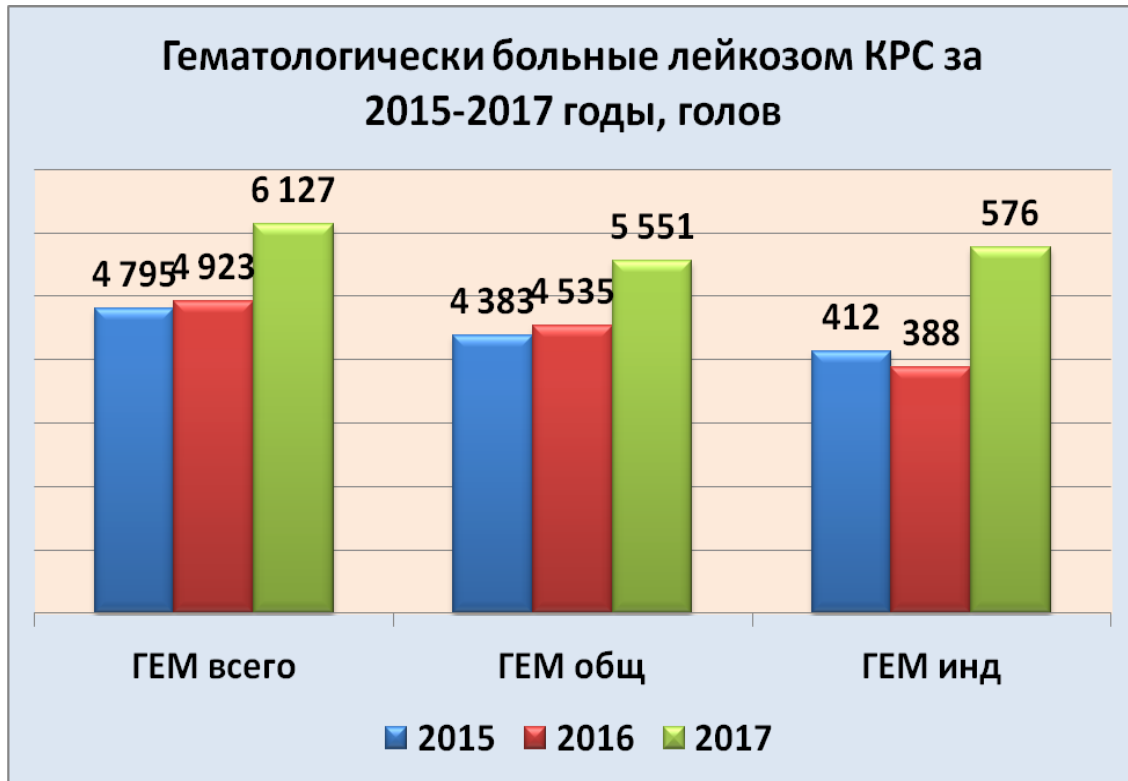


Рисунок 7 - Гематологически больные лейкозом КРС за 2015-2017 годы (голов)

Диагностические исследования лейкоз крупного рогатого скота в России представлены, главным образом реакцией иммунодиффузии в геле агара (РИД), тогда как во многих зарубежных странах используется иммуноферментный анализ, как наиболее чувствительный и специфичный.

Канадские ученые [206] которые в сравнительном аспекте изучали ИФА и РИД в диагностике лейкоза крупного рогатого скота, утверждают, что ИФА-тест с использованием антигена р24 менее чувствителен, чем даже РИД и что в 5,13% случаях показали ложноотрицательные результаты.

Ю.П.Царев (2005), отмечает, что исследования сыворотки крови методом ИФА выявляет на 25% больше антител к ВЛКРС, чем методом РИД .

Аналогичные исследования проводили и мы. С целью изучения эффективности в сравнительном аспекте, РИД и ИФА в диагностике лейкоза крупного рогатого скота было исследовано 2073 проб сывороток крови полученных от хозяйств разных районов РТ.

Проведенные исследования ещё раз доказывают высокую эффективность ИФА в выявлении инфицированных вирусом животных. В среднем на 9,7% выше выявляемость инфицированных животных методом ИФА по сравнению с РИД. В целом, в исследованных районах эффективность выявления вирусоносителей методом ИФА было выше от 3 до 31,4%. В ряде районов, считавшихся благополучными по лейкозу крупного рогатого скота, установлена инфицированность животных вирусом лейкоза до 10,3% (таблица 7).

Доказано, что единственным местом локализации ВЛКРС являются В-лимфоциты [129, 103]. Среди основных факторов, обуславливающих передачу ВЛКРС, наибольшее значение имеет перенос вируса через кровь при ветеринарных и зоотехнических обработках [144] и возможно причины широкого распространения болезни в крупных агропромышленных комплексах заключается именно в этом.

Наши исследования также показали высокую инфицированность у телят в возрасте до одного года и молочных коров. Причем, диагностическая эффективность РИД и ИФА в данном случае не сильно различались (таблица 9). По литературным данным известно, что у телят гораздо выше возможности заразиться вирусом лейкоза в первые часы жизни после рождения и телята инфицированные в этот период могут играть активную роль в распространении ВЛКРС среди восприимчивых животных, так как их провирусные нагрузки увеличиваются в течение первых 12 месяцев и сохраняются на высоком уровне пожизненно[215].

Полученные данные еще раз подтверждают, что эпизоотический статус хозяйства по лейкозу не может быть определено без результатов исследований методом иммуноферментного анализа.

Как уже было сказано, при хронических инфекциях, вызванных ретровирусами, а также при персистентных инфекциях, в биологических жидкостях организма или на поверхности клеток появляются иммунные комплексы «антиген-антитело» [68, 129, 210]. Находящиеся в сыворотке крови животных и человека, иммунные комплексы могут образоваться из любых классов и подклассов иммуноглобулинов [92, 214].

Антитела, находясь в составе иммунных комплексов, могут участвовать в элиминации инфекционного агента, вызывать гибель инфицированной клетки и даже способствовать усилению инфекции.

По данным С.И.Логинова (2003) [55], антитела при лейкозном процессе могут оказывать иммунодепрессивное действие как сами по себе, так и в комбинации с опухолевыми и вирусными антителами в составе иммунных комплексов. Это подтверждается результатами исследований многих авторов [137, 159, 210].

Связывание вируса с антителами, лишенным нейтрализующей активности, имеет одно необычное патологическое следствие: эти иммунные комплексы в результате взаимодействия с Fc-рецепторами захватываются макрофагами, в которых вирус восстанавливает свою инфекционность [1]. Вполне возможно, что одна из причин « феномена рецидивов» ВЛКРС-инфекций в ранее оздоровленных стадах именно в этом.

Учитывая, что данные иммунные комплексы, обладают низкой температурной устойчивостью и могут разрушаться в диапазоне от +38°C до +40 °C (время инкубации от 30 минут до 2-х часов) и целью выявления изменения титров свободных и связанных в иммунных комплексах антител против антигена gp51 в сыворотке крови, в своей работе, мы инкубировали пробы сыворотки крови при 60°C в течение 1-го часа.

Исследования были проведены на 201 пробе сывороток крови от одних и тех же коров полученных от неблагополучных по лейкозу хозяйств.

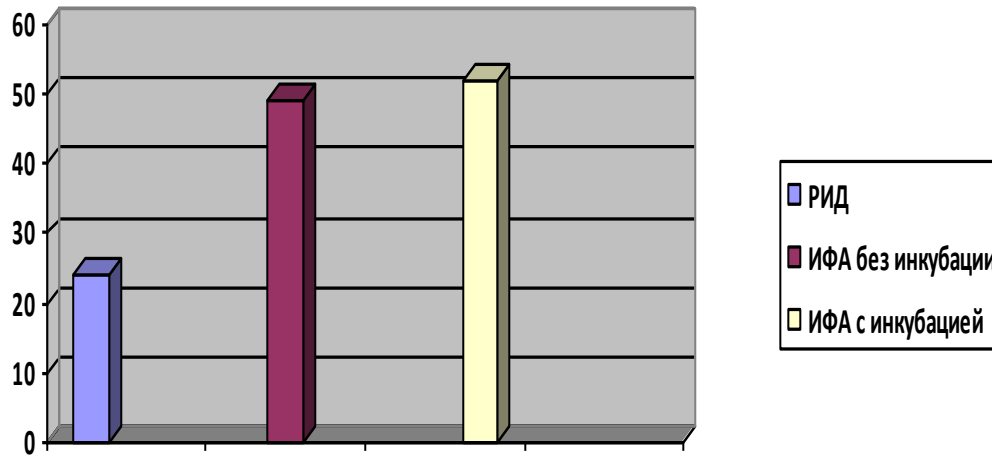


Рисунок 8 - Динамика изменений выявляемости инфицированных животных

Таким образом, мы определяли влияния диссоциации циркулирующих иммунных комплексов сыворотки крови на чувствительность ИФА-диагностики лейкоза крупного рогатого скота.

Исследования по обнаружению циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) при разных заболеваниях доказаны в работах многих исследователей [205, 196, 130].

Многие исследователи пришли к выводу, что определение циркулирующих иммунных комплексов имеет большое значение в мониторинге эпизоотической ситуации по лейкозу и может служить индикатором инфицированности животных вирусом [34, 55, 214].

Наши исследования также доказывают, что предварительная инкубация исследуемых проб сыворотки крови может служить фактором повышающим чувствительность ИФА диагностики лейкоза крупного рогатого скота.

Особенно ясно проявляется влияние диссоциации иммунных комплексов термической обработкой на эффективность ИФА диагностики лейкоза при изуче-

нии показателей оптической плотности (ОП) лунок иммунологического планшета. Показатели ОП лунок в большинстве случаев увеличиваются. Оптическая плотность лунок некоторых отрицательных проб после термической обработки практически не менялась. Есть и положительные пробы, ОП которых оставались неизменными. Данный факт означает, что титры «свободных» антител в крови животных были на пике, а ЦИК - на уровне минимальных значений.

В исследованиях некоторых ученых было доказано, что с возрастом животного и стадией болезни меняется соотношение антител в комплексах («связанные антитела») [110, 141, 210]. В большинстве случаев, при уменьшении титров свободных антител наблюдается, увеличение титров «связанных» антител, т.е. повышается степень образования циркулирующих иммунных комплексов. При этом титры свободных антител могут снижаться до минимальных значений [88]. Эти данные свидетельствуют о том, что разовые серологические тесты в диагностике лейкоза могут быть не эффективными.

По результатам наших исследований, инкубирование сыворотки крови крупного рогатого скота при 60°C в течение 1 часа привело к увеличению титров свободных противолейкозных антител, что было доказано увеличением количества положительных проб в ИФА и изменением показателя их ОП. Увеличение титров свободных антител в исследуемых пробах и количества положительных проб после их инкубирования объясняется диссоциацией циркулирующих иммунных комплексов. Таким образом, термическая обработка проб сыворотки крови при 60°C в течение 1 часа повышает чувствительность метода ИФА и делает возможным дополнительно выявить инфицированных вирусом лейкоза животных, что в свою очередь повышает эффективности проведения противозооотических мероприятий при данной болезни.

Для ликвидации и профилактики лейкоза крупного рогатого скота, необходимо своевременное выявление инфицированных животных путем анализа наличия противолейкозных антител в сыворотке крови. Основным препятствием

при разработке иммунохимических методов диагностики лейкоза крупного является качество используемого антигена.

Некоторые исследователи доказывают, что у экспериментально зараженных животных антител к gp51 проявляются раньше, чем антител к p24 и содержатся в более высоком титре [206, 213], поэтому большинство серологических реакций, направленные на выявление анти-gp51 антител. Несмотря на то, что диагностическое значение имеют антитела против gp51 и p24, в крови зараженных животных циркулируют антитела к p24, p15, p12, p10, gp30, gp51 и др [70, 104, 127].

Исследования, проведенные в лабораториях кафедры биологической и неорганической химии позволили разработать метод получения антигена ВЛКРС из сывороток больных и инфицированных лейкозом коров.

Антигенные свойства выделенных белковых фракций вирусных частиц изучали в ИФА с использованием сывороток крови инфицированных ВЛКРС и больных лейкозом коров. Всего исследовали более 100 проб сывороток крови. Результаты исследований представлены в таблице 6 и 7. В результаты исследований нами было установлено различие в показателях двух проб, которые при ИФА с коммерческим набором показали отрицательные, а с исследуемым антигеном - положительные результаты.

Кроме того, показатели оптической плотности лунок у этих проб (№ 3, 7 и 8) гораздо выше с исследуемым антигеном.

Таким образом, был установлен, что в сыворотке крови, в циркулирующих иммунных комплексах инфицированных ВЛКРС коров присутствуют различные белковые фракции вирионов. Разработанный способ позволяет их экстрагировать и использовать в качестве антигена в иммунохимических реакциях для диагностики лейкоза крупного рогатого скота. На основании разработанного способа получения антигена ВЛКРС, нами получен патент РФ на изобретение №2564007.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемый антиген является комплексным, содержащим различные белковые фракции вируса лейкоза. Как видно из электрофореграммы (рисунок 3) молекулярные массы фракций составляют от 14 до 160 и более кД. В зависимости от стадии инфекционного процесса против каждой из них образуются антитела (рисунок 4 и 5). Если учитывать, что спектр свободно циркулирующих в крови антител меняется с развитием инфекционного процесса, полученный антиген позволяет более полно обнаруживать антитела к возбудителю и способствует повышению эффективности диагностических мероприятий при лейкозе крупного рогатого скота.

Метод иммуноблотинга позволяет изучать титры и спектр антитела против всех антигенов ВЛКРС, а также продуктов их расщепления, поэтому, может стать перспективным в исключении недостатков существующих методов диагностики лейкоза крупного рогатого скота [104].

Эпизоотическая ситуация по туберкулезу крупного рогатого скота во многих странах остается напряженной [25, 166].

Преждевременная диагностика и изолирование больных животных являются основными элементами борьбы с этим заболеванием. Внутрикожная туберкулиновая проб играет ключевую роль в диагностике и контроле туберкулеза крупного рогатого скота. Однако, на сегодняшний день этот метод малоэффективен, что обусловлено его недостаточной чувствительностью и специфичностью.

Проведенными ранее исследованиями на разных видах животных показана эффективность серологической диагностики туберкулеза [85, 86]. При этом особое внимание уделяют на выбор микобактериальных антигенов, динамика выработки антител к которым в организме инфицированных животных зависит от стадии развития инфекционного процесса при туберкулезе.

При диагностике туберкулеза крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа с использованием антигенных фракций *M.bovis*, *M.avium* и *M.nonchromogenes* (ДМСО-антигенов) полученных на кафедре биологической и



неорганической химии Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана, было установлено, что метод достаточно и дает дополнительную информацию к аллергическим исследованиям. Использование ДМСО-антигенов в ИФА повышает эффективность диагностических мероприятий, что выражается в увеличении достоверности выявления реально больных туберкулезом животных, а также животных инфицированных другими видами микобактерий.

Из 121 исследованных проб сывороток крови, 46 (38,0%) из них от реагирующих, 75 (62,0%) - не реагирующих на туберкулин коров. При иммуноферментном анализе проб сывороток крови реагирующих на туберкулин животных, в 21 пробе обнаружены противотуберкулезные антитела в высоких титрах, а в 25 пробах получены отрицательные результаты, что составляет - 45,7% и 54,3% соответственно. При анализе методом ИФА проб сывороток крови не реагирующих на туберкулин животных (75 проб) были получены следующие результаты: 2 (2,7%) пробы – положительной реакцией, 73 (97,3%) пробы – с отрицательной реакцией.

Несмотря на то, что ИФА является практичным и чувствительным тестом, необходимые оборудования не всегда доступны на местах где туберкулез крупного рогатого скота является эндемичным. Поэтому, необходимо простой метод для полевых испытаний.

Нами был разработан экспресс тест-система на основе дот-блот ИФА. Основой тест-системы является иммобилизованный на полоске нитроцеллюлозной мембраны (НЦМ) антиген.

Тест-система апробировали для выявления антител к микобактериям туберкулеза и вирусу лейкоза крупного рогатого скота.

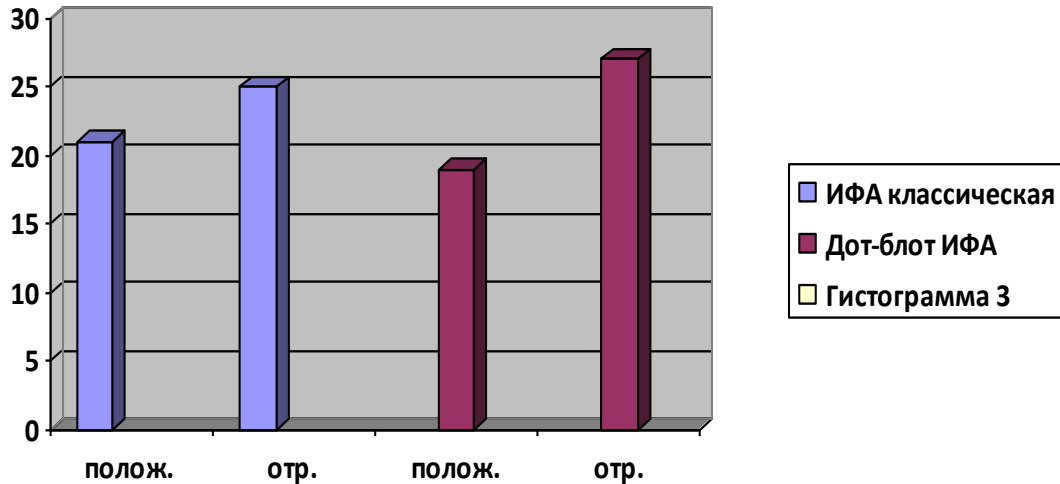


Рисунок 9 - Сравнительная эффективность классической и дот-блот ИФА выявления антител к M.Bovis

По результатам наших исследований, из 46 положительно реагирующих на ППД туберкулин, только 21 и 19 дали положительные результаты в ИФА и в дот-блот ИФА соответственно (таблица 15). В целом результаты исследований проб сывороток крови на туберкулез крупного рогатого скота методом ИФА и дот-блот ИФА совпали кроме 2-х проб, которые в ИФА были положительными и в дот-блот ИФА- отрицательными.

Разработанную тест-систему также испытывали для выявления антител к ВЛКРС в пробах сывороток крови коров из неблагополучных по лейкозу хозяйств. Всего исследовано 220 проб. В качестве сравнительного теста использовали ИФА в классическом варианте с применением «Набора для выявления антитела к ВЛКРС в сыворотке крови и молоке иммуноферментным методом» производства ФКП «Курская биофабрика - фирма «БИОК». 12 проб из исследованных были отрицательные, остальные - положительные в иммуноферментном анализе.

Несмотря на то, что чувствительность метода чуть меньше чем классического ИФА, дот-блот ИФА обладает рядом преимуществ в сравнении с ИФА: проведение анализа занимает меньше времени и не требует специального оборудования. Простота в применении и экономичность данного теста делают его более

удобным для диагностики туберкулеза и лейкоза крупного рогатого скота в полевых условиях.

Исходя из вышеизложенного можно сделать следующие выводы:

1. Диагностическая эффективность иммуноферментного анализа при лейкозе крупного рогатого скота гораздо выше, чем реакции иммунодиффузии в агаровом геле, что выражается в увеличении выявляемости животных инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота животных до 30% в зависимости от эпизоотической ситуации в хозяйствах;

2. Предварительная термическая обработка исследуемых проб сывороток крови при температуре 60 °С в течение 1 часа является важным способом повышения чувствительности иммуноферментного анализа при диагностике лейкоза крупного рогатого скота, позволяющим увеличивать выявляемость инфицированных животных дополнительно до 5,5%, что имеет важное значение в мониторинге эпизоотической ситуации по лейкозу в хозяйствах;

3. Вирусные частицы в основном содержатся в составе циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и технология, основанная на диссоциации ЦИК и избавлении от сывороточных антител и других белков, позволяет получать антиген вируса лейкоза крупного рогатого скота, обеспечивающий индикацию противолейкозных антител в инфекционном процессе;

4. Полученный антиген является комплексным, содержащим различные белковые фракции вируса лейкоза с молекулярными массами фракций от 14 до 160 кД, против каждой из них образуются антитела, спектр которых меняется с развитием инфекционного процесса.

5. Полученный антиген позволяет более полное обнаружение антител к возбудителю и способствует повышению эффективности диагностических мероприятий при лейкозе крупного рогатого скота;

6. Микобактериальные ДМСО антигены и полученный антиген вируса лейкоза крупного рогатого скота позволяют разрабатывать иммунохимические диагностические тест-системы, которые по чувствительности не уступают классическим и пригодны для массовых исследований по определению эпизоотической ситуации в хозяйствах по туберкулезу и лейкозу крупного рогатого скота.

## **5 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

1. В целях повышения эффективности диагностики лейкоза крупного рогатого скота предлагаем использовать методические рекомендации по выявлению антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота методом ИФА и дот-блот иммуноанализа с использованием антигена из местных штаммов возбудителя, утвержденные НТС ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ протокол № 8 от 18 октября 2017 г.

2. Для скрининговых исследований при диагностике лейкоза и туберкулеза крупного рогатого скота рекомендуются использовать тест-системы дот-блот ИФА.

3. Научные положения, выводы и рекомендации диссертационной работы предлагаются к использованию в учебном процессе высших учебных заведений биологического и ветеринарного профиля.

**6 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абелян, А.В. Иммунологическая нейтрализация вируса иммунодефицита человека первого типа / А.В. Абелян // Успехи современной биологии. - 1997. - Т.117.- №5.- С.549-967.
2. Авилов, В.М. Проблемы оздоровления крупного рогатого скота от лейкоза / В.М. Авилов, В.М. Нахмансон // Ветеринария. - 1995. - № 11.- С.3-6.
3. Алимов, А.М. Влияние термообработки молока на выявляемость провирусной ДНК ВЛКРС в ПЦР/ А.М. Алимов, Т.Р. Якупов, И.Р. Губадулина // Ученые записки КГАВМ. - 2011.- Т.205. - С.3-6.
4. Альштейн, А.Д. Подходы к созданию генно–инженерной вакцины против лейкоза на основе вируса осповакцины В / А.Д. Альштейн // Тез. докл. II международной научн. конф.: Биотехнология в животноводстве и ветеринарии. – М., 2000. – С. 149 – 151.
5. Амироков, М.А. Основные положения комплексной системы оздоровления и профилактики лейкоза крупного рогатого скота на сельхозпредприятиях Новосибирской области / М.А. Амироков, В.В. Храмцов, С.Н. Магер // Ветеринарный врач. - 2007. - №3. – С.5-6.
6. Аронова, Н.В. Использование препаратов липополисахарида *Fracisell Tularensis* в точечном твердофазном иммуноферментном анализе/ Н.В. Аронова, Н.В. Павлович, Н.Л. Пичурина и др.// Ростов-на Дону. Патент №2362170 от 20.07.2009.
7. Бахтаунов, Ю.Х. Изготовление иммуноглобулинового конъюгата, используемого для диагностики лейкоза в ИФА/ Ю.Х. Бахтаунов, Ш.А. Барамова, С.Н. Боровиков // Научные исследования в области ветеринарной медицины и их результаты: сб. науч. тр. КазНИВИ. – Алматы. - 2011. - Т. 57. - С.92-97.
8. Беляров, В.М. Влияние организационных мер борьбы на оздоровление хозяйств от лейкоза крупного рогатого скота/ В.М. Беляров // Тез. докл. Всесоюзн. науч. произ. конф.- Новосибирск, 1990. - С.16-17.

9. Бреус, Ю.В. Разработка и конструирование экспресс-теста для диагностики лейкоза крупного рогатого скота / Ю.В. Бреус, О.Д. Небещук, Я.В. Хоменко и др. // Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина. - 2013.-№4 (79). - С.15-21.
10. Борисова, Т.А. Полимеразная цепная реакция для индикации микобактерий с использованием различных тест-систем в животноводческих хозяйствах РТ/ Т.А. Борисова, Н.З. Хазипов, А.В. Иванов и др.// Материалы Всероссийской научно-практической конференции. Москва, 2004. - С.205-208.
11. Бурба, Л. Г. Лейкозы и злокачественные опухоли животных / Л. Г. Бурба, А. Ф. Вахилев, В. А. Горбатов // М. : Агропромиздат. - 1988. – №.399. - С.10.
12. Бусол, В.А. Результативность оздоровления неблагополучных по лейкозу стад в Украинской ССР/ В.А. Бусол // Тез.докл.респб.науч.произ.конф.- Белая Церковь. - 1976.- С. 63-64.
13. Бусол, В.А. Тест-система для выявления ВЛКРС полимеразной цепной реакцией / В.А. Бусол, О.Ю. Лиманская, А.П. Лиманский, В.И. Цымбал // Ветеринария. - 1999. - №6.- С. 27-30.
14. Валихов, А.Ф. Сывороточные преципитирующие антитела к онкорнавирусу типа С / А.Ф. Валихов // Ветеринария. - 1976. - №1.- С.43-46.
15. Верховский, О.А. Иммуноферментный анализ в диагностике лейкоза крупного рогатого скота / О.А. Верховский, В.В. Цибезов, М.В. Баландина, И.В. Непоклонова // Ветеринария. - 2002. - №12. - С. 8-10.
16. Владыко, А.С. Разработка и апробация диагностической тест-системы для выявления антител к ВИЧ методом дот-иммуноанализа / А.С. Владыко, Т.В. Школина, Л.Е. Сурикова и др.// Рубрики:76.03.41, 76.35.33. Сроки выполнения НИР: 1996-1998.
17. Галеев, Р.Ф. Теоретическое обоснование, экспериментальное подтверждение путей передачи вируса лейкоза крупного рогатого скота, усовершенствование

методов диагностики и мер борьбы с ним: дис.д-ра вет.наук / Галеев Р.Ф. – Уфа, 2000. – 276 с.

18. Гулюкин, М.И. Мониторинг эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в товарных и племенных хозяйствах РФ за 2014-2015 г // М.И. Гулюкин, И.И. Барабанов, Л.А. Иванов и др. // Журн. Ветеринария и кормления. – 2016. - №.4. – С.4-41.
19. Гулюкин, М.И. Особенности инфекционного процесса, индуцированного вирусом лейкоза крупного рогатого скота / М.И. Гулюкин, А.Ф. Валихов, В.М. Нахмансон, Л.А. Иванова и др. // Ветеринарный Консультант. - 2008. – №19. – С.7-9.
20. Гулюкин, М.И. Система мониторинга лейкоза крупного рогатого скота в Российской Федерации / М.И. Гулюкин, Г.А. Симонян, Л.А. Иванова и др. // Под редакцией академика РАСХН М.И. Гулюкина – ВИЭВ: Москва, 2007.
21. Гулюкин, М.И. Обзор эпизоотической ситуации по лейкозу в РФ / М.И. Гулюкин // Доклад на координационном совещании ВИЭВ: М., 2005. -17 с.
22. Гулюкин, М.И. Разработка эффективных мероприятий против лейкоза крупного рогатого скота / М.И. Гулюкин, Л.А. Иванова, Н.В. Замараева, Н.В. Баркова, Г.П. Грек, В.А. Храмов А.Донченко. // Ветеринария. - 2002. - № 12. - С. 3.
23. Гулюкин, М.И. Эпизоотологическая оценка методов прижизненной диагностики лейкоза КРС / М.И. Гулюкин, Е.А. Дун, Н.В. Замараева // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. - 2000. - Т.3. - С. 60 - 62.
24. Гулюкин, М.И. и др. Дифференциальная диагностика гембластозов крупного рогатого скота / М.И. Гулюкин и др. // Бюл. ВИЭВ, - М. - 1996. - №. 77. - С. 46.
25. Данко, Ю.Ю. Туберкулез пятнистых уссурийских оленей в условиях Северо-Запада России : автореф. дисс. канд. ветер. наук : 16.00.03 / Данко Юрий Юрьевич. - Санкт-Петербург, 2009. - 20 с.



26. Дзазиева, М.Ф. Диагностическая ценность полимеразной цепной реакции при туберкулезе / М.Ф. Дзазиева, Н.В. Жебуртович, А.Л. Беседнов и др. // журнал микробиологии, эпидемиологии. - 1997. - № 5. - С.85-87.
27. Донник, И.М. Эпизоотическая обстановка по лейкозу в Краснодарском крае / И.М. Донник, С.В. Тихонов // Ветеринария Кубани. - 2013. - №3. - С. 19-21.
28. Донник, И.М. Региональная молекулярно генетическая структура вируса лейкоза крупного рогатого скота / И.М. Донник, А.Т. Татарчук, А.В. Лысов, М.П. Михеев // Ветеринария Кубани. - Краснодар. - 2010. - №3. - С. 5-6.
29. Донник, И.М. Опыт борьбы с лейкозом КРС в Уральском регионе / И.М. Донник, А.Т. Татарчук, Б.М. Коритняк, С.С. Миронов // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2009. - № 1. - С.57-60.
30. Донник, И.М. Иммуный статус крупного рогатого скота инфицированного вирусом лейкоза / И.М. Донник, Е.Н. Шилова, В.Б. Шилов // Материалы международного ветеринарного конгресса - Новосибирск, 2005.- С.129.
31. Донник, И.М. Показатели иммунной системы животных, инфицированных вирусом лейкоза / И.М. Донник, Я.Б. Бейкин, С.В. Ермолаев и др. // Сб. науч. тр. – Екатеринбург, 2000. – С.307-309.
32. Донченко, А.С. Научно-практические основы профилактики туберкулеза крупного рогатого скота / А.С. Донченко // Сибирский вестник с.-х. Науки. - 2004. - № 3.- С.81-88.
33. Дробот, Е.В. Гетерогенность популяции ВЛКРС в Новосибирской области / Е.В. Дробот, П.Н. Смирнов, Е.А. Дурыманова и др. // Вестник РАСХН. – Москва. - 2007. – №1. – С.82-84.
34. Жавненко, В.М. Циркуляция антигенов, антител и иммунных комплексов в сыворотке крови коров, больных лейкозом. / В.М. Жавненко, В.В. Черняк. // Иммунология и иммунотерапия лейкозов человека и животных. Тез. докл. Всесоюз. Конф. Ташкент, 1984. - С.49-50.

35. Замараева, Н.В. Экспериментальные исследования по выявлению возможности передачи вируса лейкоза крупного рогатого скота через молоко лабораторным животным / Н.В. Замараева, М.И. Гулюкин, М.Н. Снежков // Бюлл. ВИЭВ. - 1996. - № 77. - С.66.
36. Зинатов, Ф.Ф. Молекулярная генодиагностика лейкоза крупного рогатого скота / Ф.Ф. Зинатов // Автореф. дис. канд. биол. наук. Казань. - 2008. – С.25.
37. Иванов, О.В. Возрастная динамика содержания антител к вирусу лейкоза у телят, рожденных от серопозитивных коров / О.В. Иванов, О.Ю. Иванова, В. П. Федотов, М.В. Баландина, О.А. Верховский, Ю.Н. Федоров // Сельскохозяйственная биология. - 2008. – №6. – С.87-90.
38. Иванова, Л.А. Выявление иммунного ответа на вирус лейкоз крупного рогатого скота иммуноферментным методом: Автореф. дисс.канд.наук / Иванова Л.А. - М., 2000.
39. Калмыкова, М.С. Диагностическая ценность ПЦР тест-систем при туберкулезе животных: Автореф. дис.....канд.вет.наук / Калмыкова М.С.- Москва, 2007.
40. Камалов, Б.В. Лейкоз крупного рогатого скота. Методическое пособие / Б.В. Камалов, Ф.Ф. Зинатов, Н.З. Хазипов, А.Х. Волков // Методическое пособие, Казань, 2005. - С.37.
41. Камалов, Б.В. Организация противолейкозных мероприятий в Республике Татарстан и их экономическая эффективность / Б.В. Камалов // Учёные записки КГАВМ. - 2009. - № 198. - С. 93-99.
42. Камалов, Б.В. Эпизоотология лейкоза крупного рогатого скота в республике Татарстан и организация оздоровительных мероприятий в хозяйствах / Б.В. Камалов // Ученые записки КГАВМ. - 2006. – Т. 182. – С. 171-177.
43. Колычев, Н.М. Ветеринарная микробиология и иммунология / Н.М.Колычев, Р.Г. Госманов – 3-е изд., перераб. и доп. - М.: КолосС, 2009. - С. 172-180.
44. Кондратьев, В.С. Оценка реакции иммунодиффузии в комплексе клико-лабораторных методов диагностики лейкоза крупного рогатого скота / В.С.

- Кондратьев, М.А. Хафез // Профилактика и ликвидация заразных болезней с-х животных, Л., 1985.- С.25-31.
45. Коромыслов, Г.Ф. Основные итоги и перспективы научных исследований по проблеме лейкозов сельскохозяйственных животных / Г.Ф. Коромыслов, М.И. Гулюкин, Г.А. Симонян // Тр. ВИЭВ. - М. - 1999. - Т.72. - С.3-11.
46. Крикун, В. А. Лейкоз крупного рогатого скота и иммунологическая толерантность // Ветеринария, 2002. - № 6. –С. 7–9.
47. Кудрявцева, Т.П. Лейкоз животных. – М.: Россельхозиздат, 1980. –158 с.
48. Кукайн, Р.А. Динамика изменения противовирусной и цитотоксической активности сывороток крупного рогатого скота в процессе иммунизации различными иммуногенными препаратами / Р.А. Кукайн, Л.И. Нагаева, Г.В. Куделева и др. // Инфекционные болезни крупного рогатого скота и меры борьбы с ними: Тез. докл.- Минск, 1982.- С.33-37.
49. Кукайн, Р.А. Итоги многолетних наблюдений развития экспериментального индуцированного хронического лимфолейкоза крупного рогатого скота: Этиология и иммунодиагностика лейкоза крупного рогатого скота / Р.А. Кукайн, Л.И. Нагаева, С.В. Чапенко и др// Рига: Зинатне, 1979. - С.36-40.
50. Кумков, В.Т. Результаты производственной апробации реакции иммунодиффузии в агаре при диагностике лейкоза крупного рогатого скота / В.Т. Кумков, В.А.Крикун // Теоретические и практические вопросы лейкозов и злокачественных опухолей с-х животных: Сб. Науч. Тр.МВА. - 1979.-Т.107. - С.21-24.
51. Кузнецов, А.П. Экономический ущерб, причиняемый лейкозом крупного рогатого скота / А.П. Кузнецов, И.Н. Никитин // Ветеринария. -1993. - №8. - С. 14-16.
52. Кузин, А.И. Влияние лейкоза на продуктивность коров и качество молока/ А.И.Кузин, Е.Н.Закрепина // Ветеринария, 1997. - №2.- С. 19-21.
53. Лемеш В.М. и др. Лейкоз крупного рогатого скота. – Минск: «Ураджай», 1987. - 220 с.

54. Лиманский, А. П. Типирование вируса лейкоза крупного рогатого скота, циркулирующего в Украине / А. П. Лиманский, L. Geue, О. Ю. Лиманская, D. Veier // *Вопр. вирусологии.* - 2004. - Т. 49. - № 1. - С. 39-44.
55. Логинов, С.И. Иммунные комплексы при лейкозе крупного рогатого скота / С.И. Логинов // *Ветеринарная патология: Современные достижения и проблемы клеточной биотехнологии и иммунологии в ветеринарной медицине.* - 2003. - №1. - С. 85-87.
56. Лысенко, А.П. Специфические антигены различных штаммов *M.bovis* / А.П.Лысенко // *Ветеринария.* - 1987. - №5. - С. 34-36.
57. Мальцева, Н.А. ПЦР- диагностика лейкоза крупного рогатого скота / Н.А. Мальцева, Г.О. Шайхаев, А.Г. Ирский, С.Г. Постовой, А.А. Животов, Е.Е. Шлычков, В.Ф. Ерёмин // *Ветеринарная патология.* - 2003. - №1. - С. 129 -131.
58. Мандыгра, Н.С. Крупномасштабные оздоровительные мероприятия против лейкоза крупного рогатого скота / Н.С. Мандыгра // *Тр. Свердловской НИВС,* 1995. - С. 9-12.
59. Маринин, Е.А. Прогнозирование сроков оздоровления хозяйств от лейкоза крупного рогатого скота / Е.А. Маринин, А.П. Кузнецов // *Ветеринария.* - 1997. - №.6 - С. 17-20.
60. Маслов, Е.В. Оптиматизация непрямого иммуноферментного анализа для выявления антител к *M.bovis* / Е.В. Маслов, А.А. Бойко, И.А. Хорьков // *Ветеринария.* -1986. - №10. - С. 64-68.
61. Митин, Ю.А. Иммунологические аспекты патогенеза и диагностики ВИЧ-инфекции.: Автореф. дис. доктора мед.наук / Митин, Ю.А .С. Петербург, 1997. - 40с.
62. Нахмансон, В.М. Серологический метод диагностики в системе противолейкозных мероприятий / В.М. Нахмансон, М.И. Гулюкин, Е.А. Дун // *Ветеринария.* -1997. - №3. - С.7-10.

63. Ным Э.М. Распространение лейкоза крупного рогатого скота в Эстонской ССР / Э.М. Ным // Труды АН Латвийской ССР.- Рига: Зинатне, 1970. -145 с.
64. Петров, Н.И. Диагностика и меры борьбы с лейкозом крупного рогатого скота / Н.И. Петров // Материалы Всероссийского совещания-семинара. - Брянск, 2004. - С. 104-106.
65. Петров, Н.И. Лейкоз крупного рогатого скота. Насколько он опасен? / Н.И. Петров // Зооиндустрия. - 2001. - № 3. - С. 6-7.
66. Петров, Н.И. Оздоровление хозяйств от лейкоза крупного рогатого скота / Н.И.Петров // Ветеринария. -1997.- М9.-С. 10-12.
67. Пристужалов, Ю.С. Система оздоровления и профилактики лейкоза крупного рогатого скота/ Ю.С. Пристужалов, В.И. Околелов, Г.И. Максимов // Ветеринария. - 1996. - №5. - С.50-51.
68. Ройт, А., Бростофф Дж., Миел Д. Иммунология/ Пер. с англ. - М.: Мир, 2000. - 592с.
69. Сайдулдин, Т.С. Основы серологии / Т.С.Сайдулдин. - Алма-Ата: Гылым, 1992. - 272 с.
70. Сергеев, В.А. Структура и биология вирусов животных / В.А. Сергеев, Б.Г. Орлянкин. - М, 1983.
71. Симонян, Г.А. Пути передачи онкорнавирусной инфекции в неблагополучных по лейкозу стадах крупного рогатого скота / Г.А.Симонян, Е.Ф.Бражин // Сб. Науч.тр. Донского с-х ин-та,1980. - Т.15. - В.4. - С.62-65.
72. Смирнов, П.Н. Болезнь века - лейкоз крупного рогатого скота // П.Н. Смирнов. - Новосибирск, 2007. - 301 с.
73. Смирнов, П.Н. Практические аспекты лейкоза крупного рогатого скота / П.Н. Смирнов // Ветеринарная газета, 1998. - № 13. -С.4.
74. Смирнов, А.М. Борьба с лейкозом крупного рогатого скота - важнейший элемент системы обеспечения ветеринарного благополучия российского животно-

- водства / А.М.Смирнов // Сборник научных трудов. Екатеринбург, 2005. - С.5-9.
75. Смирнов, П.Н. Практические аспекты лейкоза крупного рогатого скота / П.Н. Смирнов, В.В. Храмцов, В.В. Смирнова // Ветеринария. - 1998. - №8. - С.6-8.
76. Смирнова, В.Н. Ветеринарно - санитарная оценка мяса при лейкозе крупного рогатого скота/ В.Н. Смирнова // Сб.: Актуальные вопросы диагностики, профилактики и борьбы с лейкозами сельскохозяйственных животных и птиц - Екатеринбург, 2000 - С. 236 - 239.
77. Смирнов, Ю.П. Развитие лейкозного процесса у инфицированных ВЛКРС коров в зависимости от их возраста / Ю.П.Смирнов // Ветеринария. - 1999. - № 12. - С. 15-17.
78. Степанян, И.С. Вопрос диагностики и дифференциальной диагностики туберкулеза органов дыхания в современных условиях. РМЖ, 1999. - №17.
79. Таранин, А.В. Способ выявления антител к вирусу алеутской болезни норок/ А.В. Таранин, С.М. Мирошниченко, В.В. Перемыслов // Патент. №2074393 от 27.02.1997.
80. Татьков, С.И. Применение рекомбинантных видоспецифических белков *M.tuberculosis* для серологической диагностики туберкулеза / С.И. Татьков, О.В. Насарева, А.Н. Болдарев // Клиническая лабораторная диагностика, 2006. - №12. - С.26.
81. Хазипов, Н.З. Биохимическая структура клеточной стенки микобактерий туберкулеза / Н.З. Хазипов, Р.П. Тюрикова, А.А. Нуруллин // Сб.науч.тр.- Казань, 1986. - С.10-19.
82. Шаева, А.Ю. Генотипическая идентификация изолятов ВЛКРС, выявленных в хозяйствах Республики Татарстан / А.Ю. Шаева, Р.Р. Вафин, Н.З. Хазипов, Б.В. Камалов, А.М. Алимов, М.Ш. Тагиров // Ученые записки КГАВМ. - 2011. - Т. 208. - С.330-337.

83. Шаров, А.Н. ПЦР при туберкулезе / А.Н. Шаров, А.А. Ерошенко, И.П. Суханов и др. // Ветеринария. - 2000. - №10. - С.18-22.
84. Шишков В.П. Серологические методы выявления животных, инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота: Лейкозы и злокачественные опухоли животных / В.П. Шишков, А.В. Валихов; под ред. Шишков В.П., Бурбы Л.Г.- М.: Агропромиздат, 1998. - С.173-194.
85. Шуралев, Э.А. Мультиплексный ИФА с хемилюминесцентной меткой для диагностики туберкулеза у кабанов / Э.А. Шуралев, М.Н. Мукминов, А.Р. Валеева и др. // Ветеринария. - 2013. - №2. - С. 25-28.
86. Шуралев, Э.А. Сравнительный анализ тест-систем для диагностики туберкулеза у альпак / Э.А. Шуралев // Ветеринарный врач. - 2012. - №5. - С. 30-33.
87. Якубовский, М.В. Разработка ИФА тестсистемы для диагностики фасциоза крупного рогатого скота / М.В. Якубовский, А.П. Лысенко, И.А. Трус // Матер. междунар. науч.-практ. конф. «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов». - Щелково, 2007. - С. 381-385.
88. Якупов, Т.Р. Динамика изменений титров «свободных» и «связанных» антител у инфицированных ВЛКРС коров // Т.Р. Якупов, Н.З. Хазипов // Ученые записки КГАВМ. 2009.- Т.197.- с.150-154.
89. Якупов, Т.Р. Способ получения антигена для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота / Т.Р. Якупов, К.С. Хаертдинов, Р.А. Хамзин, И.К. Фахртдинов // Патент №2416428 от 20.04.2011.
90. Якупов, Т.Р. Способ получения антигена ВЛКРС / Т.Р. Якупов, К.С. Хаертдинов, А.С. Козлов, Д.А. Джакаит // Патент РФ на изобретение №2564007 от 31.08.2015.
91. Ababneh, M.M. Detection and molecular characterization of Bovine leukemia viruses from Jordan / M.M. Ababneh, R.K. Al-Rukibat, W.M. Hananeh, A.T. Nasar, M.B. Al-Zghoul // Arch.Virol., 2012. - V.157 (12). - P.2343-2348.

92. Alexandrov, I.I. Monoclonal antibodies to a tumor-associated antigen isolated from circulating immune complexes of bovine leukemia virus infected cattle / I.I. Alexandrov, R.A. Toshkova, K.K. Noeba et al. // institute of General and Comparative Pathology, Sofia., - 1996.
93. Amadori, M. Antibody Tests for Identification of Mycobacterium bovis- infected Bovine Herds / M. Amadori, S. Tameni, P.S. Cavirani // Journal of Clinical Microbiology, 1998. – P.556-568.
94. Anand, T. Development of Dot-ELISA for the detection of human rotavirus antigen and comparison with RNA-PAGE/ T. Anand, T.A. Narasa Raju, C. Vishnu, L.V. Venkateswar Rao, G. Sharma // Appl Microbiol, 2001-V.3. - P.176-180.
95. APHIS, Bovine leucosis virus (BLV) on U.S. Dairy Operations, 2007. Oct. 2008; available on National Animal Health Monitoring System. High prevalence of BLV in US dairy herds. <http://nahms.aphis.usda.gov/dairy/index.htm> Accessed August 1, 2010.
96. Asfaw, Y. Distribution and superinfection of bovine leukemia virus genotypes in Japan / Y. Asfaw, S. Tsuduku, M. Konishi, K. Murakami, T. Tsuboi, et al. // Arch Virol. - 2005. - №150. - P. 493-505.
97. Asfaw, Y. Distribution and superinfection of bovine leukaemia virus genotypes in Japan / S. Tsuduku, M. Konishi, K. Murakami, T. Tsuboi, et al. // Arch Virol., 2004. - P. 24-27.
98. Ayele, W. Y. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa / W.Y. Ayele, S.D. Neill, J. Zinsstag, M.G. Weiss, I. Pavli // International journal of tuberculosis and lung diseases.- 2004. -V.8 (8). - P.924-937.
99. Balic, D. Identification of a new genotype of bovine leukemia virus / D. Balic, I. Lojkic, M. Periskic, T. Bedekovic, et al. // Arch Virol. - 2012. -V.157. –P.1281-1290.
100. Bartlett, P. Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle / P. Bartlett, L. Sordillo, T. Byrem, B. Norby, D. Grooms, C. Swenson, J. Zalucha, R. Erskine // (2014) JAVMA. - 2014. - V.244 (8). - P.914-922.



101. Bech-Nielsen, S. Natural mode of transmission of the bovine leukemia virus: role of bloodsucking insects / S. Bech-Nielsen, C.E. Piper, J.F. Ferrer // *Am J Vet Res.* - 1978. - V.39. - P.1089-1092.
102. Bertrand, C. Dot Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for More Reliable Staging of Patients with Human African Trypanosomiasis / C. Bertrand, B. Sylvie, M. Pascal, N. Edgard, G. Murielle, N. Auguste, J. Theophile et al. // *J Clin.Microb.* - 2005. - Vol. 43, No. 9. - P. 4789- 4795.
103. Beyer, J. Cattle infected with bovine leukaemia virus may not only develop persistent B-cell lymphocytosis but also persistent B- cell lymphopenia / J. Beyer, B. Kollner, J.P. Teifke, E.S tarick, D. Beier, I. Reimann, U. Grunwald, M. Ziller // *J. Vet. Med. [B].* - 2002. -V.49.-P. 270-277.
104. Bicka, L. Expression of bovine leukemia virus p24 in *Escherichia coli* and its use in immunoblotting assay / L. Bicka, J. Kuzmak, B. Kozaczynska, A. Plucianniczak, A. Skorupsa // *Acta. Biochemical Polonica.* - 2001. - V.48. - P.227-232.
105. Biet, F. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) / F. Biet, M.L. Boschioli, M.F. Thorel. L.A. Guilloteau // *Veterinary Research.* - 2005. - vol. 36, no. 3. - P. 411-436.
106. Buehring, G.C. Evidence for bovine leukemia virus in the mammary epithelial cells of infected cows / G.C. Buehring, P.M. Kramme, R.D. Schultz // *Lab Invest.* - . - 1994. -V.71. -P. 359-365.
107. Buxton, B.A. Role of insects in the transmission of Bovine leukemia virus: potential for transmission by stable flies, horn flies and tabanids / B.A. Buxton, N.C. Hinkle, R.D. Schultz // *Am. J. Vet. Res.*, 1985. - V.46 (1). - P.123-126.
108. Chander, S. Comparison between serological and hematological diagnosis of bovine leucosis / S. Chander // *Vet.Microbiol.* - 1976. - V.192. - P.1005-1007.
109. Cleaveland, S. Tuberculosis in Tanzanian Wildlife / S. Cleaveland, T. Mpengeya, R.R. Kazwala, A. Michel, M.T. Kaare, S.L. Jones, E. Eblate, G.M.Shirima, C.Packer // *Widl Dis.* - 2005. - V.41 (2). - P. 446-453.

110. Cynthia, J. Circulating Immune Complexes (CIC) As Marker For Disease Progress In Oral Cancer / J. Cynthia, A.V. Nerurkar, F.R. Karjodkar // Indian J. Clini. Biochem. - 2007. - V. 22. - P.114-117.
111. Debadatta, P. Evaluation of Immuno-Dot-Blot Assay for Detection of Cholera-Related Enterotoxin Antigen in Salmonella typhimurium / P. Debadatta, B. Marlyn, H. Harihar, A.F. Richard // J. clinical Microbiology. - 1986. -V.25, no.4. - P. 702-705.
112. De La Rua-Domenech. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques / De La Rua-Domenech, A.T. Goodchild, H.M. Vordermeier, R.G. Hewinson, K.H. Christiansen, R.S. Cliftonhadley // Research in Veterinary Science. - 2006. - vol. 81, no. 2. - P. 190-210.
113. Delaune, D. Update on Mycobacterium bovis infections in France: 4 cases reports. / D. Delaune, F. Janvier, C. Rapp, P. Gerome, F. Mechai, M. Fabre, C. Soler, A. Merens // Ann. Biol. Clin. (Paris). - 2012. - Vol. 70(2). - P.231- 236.
114. De Kantor, I.N. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries / I.N. De Kantor, V. Ritacco // Veterinary Microbiology. - 2006. - vol. 112, no. 2-4. - P. 111-118.
115. Di Marco, V. Epidemiological Significance of the Domestic Black Pig (Sus scrofa) in Maintenance of Bovine Tuberculosis in Sicily/V. Di Marco, P. Mazzone, M.T. Capucchio, M.B. Boniotti, V. Aronica, M. Russo, M. Fiasconaro, N. Cifani et al // J. Clin.Microbiol. - 2012. - Vol. 50(4). - P. 1209-1218.
116. Dube, S. The complete genomic sequence of an in vivo low replicating BLV strain / S. Dube, L. Abbott, D.K. Dube, G. Dolcini, S. Gutierrez, C. Ceriani, M. Juliarena, J. Ferrer, R. Perzova, B.J. Poiesz // Virol. J. - 2009. - V. 6. - P. 120-120. 207.

117. EFSA, AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare). Scientific opinion on enzootic bovine leucosis / EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare) // *EFSA Journal*. - 2015. – V.13 (7). – P.4188.
118. Erskine, R.J. Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds / R.J. Erskine, P.C. Bartlett, T.M. Byrem, C.L. Render, C. Febvay, J.T. Houseman // *Journal of Dairy Science*. - 2012. - V.95. - P.727-734.
119. Faye, S. Determination of decisional cut-off values for the optimal diagnosis of bovine tuberculosis with a modified IFN gamma assay (Bovigam) in a low prevalence area in France / S. Faye, J.L. Moyen, H. Gares, J.J. Benet, B. Garinbastuji, M.L. Boschioli // *Veterinary Microbiology*.- 2011. - vol. 151, no. 1-2. - P.60-67.
120. Fechner, H. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle/ H. Fechner, P. Blankenstein, A.C. Looman et.al. // *Virology*. - 1997 -V. 237. - №2. - P. 261-269.
121. Felmer, R. Prevalence and space distribution of brucellosis, bovine leukaemia, bovine viral diarrhoea and infectious bovine rhinotracheitis by using bulk milk ELISA test in dairy herds of the IX Region, Chile / R. Felmer, J. Zúñiga, A. López H. Miranda // *Archivos de Medicina Veterinaria*. - 2009. - V.41. - P.17-26.
122. Fernando, S.A. Evaluation of an immunodot blot technique for the detection of antibodies against *Taenia solium* larval antigens / S.A. Fernando, T. Aleyda, L. Johan // *Parasitol Res.*, 2012. - 110.-P.2187–2191.
123. Ferrer, S.F. Milk of dairy cows frequently contains a leukemogenic virus / S.F. Ferrer, S.S. Kenyon, P. Gupta // *Science*. -1981. - V.41. - P. 4906-4909.
124. Flensburg, J.C. The control of bovine leucosis in Denmark / J.C. Flensburg, B. Streyffert // *Epidemiologic and diagnostic aspects/ Nord. Veterinarmed*. - 1977.- V.29. - P. 49-67.

125. Frie, M. Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle / M. Frie, P. Coussens // *Vet. Immunol. Immunopathol.* - 2015. - V.163 (3-4). - P. 103-114.
126. Florins, A. Emphasis on cell turnover in two hosts infected by bovine leukemia virus: a rationale for host susceptibility to disease / A. Florins, M. Boxus, F.Vandermeers, O.Verlaeten, A.B. Bouzar, J. Defoiche et al. // *Vet. Immunol. Immunopathol.* - 2008. - V.125. - P. 1-7.
127. Florins, A. Even attenuated bovine leukemia proviruses can be pathogenic in sheep/A. Florins, N. Gillet, M. Boxus, P. Kerkhofs, R. Kettmann, L. Willems // *J Virol.* - 2007. - 81(18). - P.10195-10200.
128. Gathogo, S.M. Prevalence of bovine tuberculosis in slaughter cattle in Kenya: a postmortem, microbiological and DNA molecular study / S.M. Gathogo, J.K. Kuria, J.N. Ombui // *Tropical Animal Health Production.* - 2012. - V.44. -P.1739-1744.
129. Gillet, N. Mechanism of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in humans /N.Gillet, A.Florins, M.Boxus, C.Burteau et al // *Retrovirology.* - 2007. - V.4. - P.18-49.
130. Goodchild, A.V. Geographical association between the genotype of bovine tuberculosis in found dead badgers and in cattle herds / A.V. Goodchild, G.H. Watkins, A.R. Sayers, J.R. Jones , R.S. Clifton-Hadley // *Vet. Rec.* - 2012. - Vol. 170(10). - P.259.
131. Grange, J. M. Mycobacterium bovis infection in human beings. / J.M. Grange // *Tuberculosis (Edinb).* - 2001. - V.81. - P.71-77.
132. Gutierrez, G. Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle/ G. Gutierrez, I. Alvarez, R. Politzki, M. Lomonaco M, M.J.Dus Santos, F. Rondelli, N. Fondevila, K.Trono // *Veterinary Microbiology*, 2011.- V151.- P.255-263.

133. Hajj, H.E. Animal models on HTLV-1 and related viruses: what did we learn? / H.E. Hajj, R.Nasr, Y.Kfoury, Z. Dassouki, R. Nasser, G. Kchour, et al. // *Front Microbiol.* - 2012. - V.3. - P. 333.
134. Hasselschwert, D.L. Relative susceptibility of beef and dairy calves to infection by bovine leukemia virus via tabanid (Diptera: Tabanidae) feeding / D.L. Hasselschwert, D.D. French, L.J. Hribar, D.G. Luther, D.J. Leprince, M.J. Van der Maaten, C.A. Whetstone, L.D. Foil // *Journal of Medical Entomology.* - 1993. - V30. - P. 472-473.
135. Hemmatzadeh, F. Dot-blot enzyme immunoassay for the detection of bovine viral diarrhea virus antibodies / F. Hemmatzadeh, F. Amino // *Vet.arhiv.* - 2009. -V.79. - P.343-350.
136. ICTV (2014). *ICTV Virus Taxonomy 2014.*
137. Jacobs, R.M. Inhibition of lymphocytes blastogenesis by sera from cows with lymphoma / R.M. Jacobs // *Am. J. Vet. Res.* - 1980. - V.41. - P. 372-376.
138. Jimba, M. BLV-CoCoMo-qPCR: quantification of Bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm / M. Jimba, S.N. Takeshima, K. Matoba, D.Endoh. Y. Aida // *Retrovirology.* - 2010. - V.7. - P.91.
139. Johnston, E.R. Envelope proteins containing single amino acid substitutions support a structural model of the receptor-binding domain of bovine leukemia virus surface protein / E.R. Johnston, L.M. Albritton, K. Radke / *J. Virol.* - 2002. -V.76. - P. 10861-10872.
140. Kawther S.Z. Bovine leukemia virus infection in dairy cows in Egypt / S.Z. Kawther, M.A. Wahid // *Academic Journal of Cancer Research.* - 2015. V.7 (2). -P. 126-130.
141. Kelley, M.C. Tumor associated antigen TA-90 immune complex assay predicts subclinical metastasis and survival for patients with early stage melanoma / M.C. Kelley // *Cancer.* - 1998. - V.83. - P.1355-1361.

142. Kettmann, R. Experimental infection of sheep and goat with bovine leukemia virus: localization of proviral information on the target cells / R. Kettmann, M. Mammerickx, D. Portetelle, D. Grégoire, A. Burny // *Leuk Res.* - 1984. - №8. - P. 937-944.
143. Kobayashi, S. Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan / S. Kobayashi, T. Tsutsui, T. Yamamoto, Y. Hayama, K. Kameyama K, M. Konishi, K. Murakami // *BMC Vet. Res.* - 2010. - V.6.-P.1.
144. Kobayashi, S. Analysis of risk factors associated with bovine leukemia virus seropositivity within dairy and beef breeding farms in Japan: A nationwide survey/ S. Kobayashi, A. Hidano, T. Tsutsui, T. Yamamoto, Y. Hayama et al. // *Research in Veterinary Science.* - 2014. - V. 96. - P. 47-53.
145. Kunakov, A.A. Bovine leukosis virus infection in cattle and sheep in Stavropol Territory, Russia // A.A. Kunakov, S.S. Abakin // *Veterinariya.* - 1993. - V.3. -P. 25-26.
146. Kurdi, A. Serologic and virologic investigations of the presence of BLV infection in dairy herd in Syria / A. Kurdi, P. Blankenstein, O. Marquardt, D. Ebner // *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* - 1999. V.112 (1). - P. 18-23.
147. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub> // U.K. Laemmli // *Nature.* - London, 1970. - V.227. - P.680-685.
148. Lee, L.C. Bovine leukemia virus infection in a juvenile alpaca with multicentric lymphoma / L.C. Lee, W.K. Scarratt, G.C. Buehring, G.K. Saunders // *Canadian Veterinary Journal.* - 2012. -V.53. - P.283-186.
149. Lekolool, I.L. Epidemiological investigation of bovine tuberculosis in the wild-life-livestock interphase in the Masai Mara and Amboseli ecosystems of Kenya: A Thesis in Master of Veterinary Epidemiology and Economics, Department of public Health Pharmacology and Toxicology / Lekolool I.L. - University of Nairobi, 2011.

150. Levkut, M. Bovine leukemia virus-induced clinical signs and morphological changes of encephalitozoonosis in rabbits / M. Levkut, F. Lesník, P. Bálent, V. Zajac, P. Korim et al. // *Folia Parasitol (Praha)*. - 1997. - V.44. - P. 249-254.
151. Licursi, M. Genetic heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts / M. Licursi, Y. Inoshima, T. Yokoyama, E.T. Gonzalez, H. Sentsui // *Virus Res*, 2002. - P. 101 - 110.
152. Lobue, P. Public Health Significance of *M. bovis*. In *Mycobacterium bovis infection in animals and humans*. 2nd edition. Edited by Thoen C.O., Steele J.H., Gilsdorf M.J. Ames, Iowa 50014, USA: Blackwell Publishing, 2006. - P.6-12.
153. Lucio, V.C. Dot Blot Assay for Detection of Antidiacyltrehalose Antibodies in Tuberculous Patients/ V.C. Lucio, R. Adrian, D.R. Manuel, H. Vera, L. Adalbert // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* - 1999. - Vol. 6, No. 5. - P. 686-689.
154. Lundberg, P. AT-Lymphocyte Cytotoxicity against Envelope- Expressing Target Cells Is Unique to the A lymphocytic State of Bovine Leukemia Virus Infection in the Natural Host / P. Lundberg, G. Splitter // *Journal of Virology*. -2000. - Vol. 74, - No. 18. - P. 8299- 8306.
155. Ma, J.G. First report of bovine leukemia virus infection in yaks (*Bos mutus*) in China /J.G. Ma, W.B. Zheng, D.H. Zhou, S.Y. Qin, M.Y. Yin, X.Q. Zhu, G.X. Hu // *BioMed Research International*, 2016. - 9170167. - P.4.
156. Mamoun, R. Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and to the structure and antigenicity of the glycoproteins / R. Mamoun, M. Morisson, N.Rebeyrotte // *J. Virol.* - 1990. - 64, №9. - P. 4180-4188.
157. Manet, G. Natural mode of horizontal transmission of bovine leukemia virus (BLV): the potential role of tabanids (*Tabanus* spp.) /G. Manet, X. Guilbert, A. Roux, A.Vuillaume, A.L. Parodi // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. - 1989. - V22. - P. 255-263.
158. Marais, B.J. Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum / B.J. Marais, W. Brittle, K. Painczyk, A.C. Hesselning, N.

- Beyers, E. Wasserman, D. Van, R.M. Warren // *Clinical Infectious Diseases*. -2008. - vol. 47, no. 2. - P.203-207.
159. Mary, L.R. Serial circulating immune complex levels and nitrogen responses during progressive tumor growth in WF rats/ L.R. Mary, S. Glenn, S.R. Donald et al. // *J. Natl. Cancer Inst.*, 1983. - V.70. - P.1113-1118.
160. Matsumura, M.H. Molecular epidemiology of Bovine leukemia virus associated with enzootic bovine leucosis in Japan / M.H. Matsumura, E. Inoue, Y. Osawa, K. Okazaki // *Virus Res.* - 2011. - V.155 (1). - P. 343-348.
161. McNair, J. Characterization of the early antibody response in bovine tuberculosis: MPB83 is an early target with diagnostic potential / J. McNair, D.M. Corbett, R.M. Girvin, D.P. Mackie, J.M. Pollock // *Scandinavian Journal of Immunology*. - 2001. - vol. 53, no. 4. - P.365-371.
162. Mehrdad, R. Evaluation of a new dot blot assay for confirmation of human immunodeficiency virus type 1 and 2 infections using recombinant p24, gp41, gp120 and gp36 antigens / R. Mehrdad, S. Farzaneh, M. Fereidoun, K. Anoshirvan // *Saudi Med J.* - 2006. - Vol. 27 (1). - P.31-36.
163. Mekata, H. Horizontal transmission and phylogenetic analysis of bovine leukemia virus in two districts of Miyazaki / H. Mekata, S. Sekiguchi, S. Konnai, Y. Kirino, Y. Horii, J. Norimine // *J Vet Med Sci.* - 2015. - V.77 (9). -P.1115-1120.
164. Mekata, H. Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukaemia virus. *Veterinary Record* / H. Mekata, S. Sekiguchi, S. Konnai, Y. Kirino, K. Honkawa, N. Nonaka, Y. Horii, J. Norimine // *Vet. Rec.* - 2014. -176(10). - P. 254.
165. Meas S. Evidence for bovine immunodeficiency virus infection in cattle in Zambia / S. Meas, M. Nakayama, T. Usui, Y. Nakazato, J. Yasuda, K. Ohashi, M. Onuma // *Jpn J Vet Res.* - 2004. - V.52 (1). - P.3-8.
166. Michel, A.L. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: a problem, or not? / A.L. Michel, B. Müller, P.D. van Helden // *Vet. Microbiol.* - 2010. - Vol. 140 (3-4). - P.371- 381.



167. Miller, J.M. Virus-like particles in phyto- hemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with referent to bovine lymphosarcoma /J.M. Miller, L.D.Miller, C.Olson, K.G. Gillette // J. Natl. Cancer Inst`.- 1969. - № 43. – P.1297-1305.
168. Miller, J.M. Precipitating antibody to an internal antigen of the C-type virus associated with bovine lymphosarcoma / J.M. Miller, C. Olson / S.Nat.Cancer Inst. - 1972. - V. 49. - P. 1459-1462.
169. Mirsky, M. L. The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection / M.L. Mirsky, C.A. Olmstead, Y. Da, H.A. Lewin // J. Virol. - 1996. -V.70. - P. 2178-2183.
170. Monaghan, M.L. The tuberculin test / M.L. Monaghan, M.L. Doherty, J.D. Collins, J.F. Kazda, P.J. Quinn // Veterinary Microbiology. - 1994. - vol. 40, no.1-2. - P. 111-124.
171. Monti, G.E. Transmission of bovine leukemia virus within dairy herds by simulation modelling / G.E. Monti, K. Frankena, M.C. De Jong // Epidemiol. Infect. - 2007. - V135. - P.722-732.
172. Monti, G.E. Survival analysis on aggregate data to assess time to sero-conversion after experimental infection with Bovine Leukemia Virus / G.E. Monti, R. Frankena // Prev. Vet. Med. - 2005. - V.68 (2-4). - P. 241-262.
173. Molteni, E. Molecular characterization of a variant of proviral bovine leukemia virus (BLV) / E. Molteni , A. Agresti, A. Meneveri, A. Marozzi, M. Malcovati, L. Bonizzi, G. Poli, E. Ginelli. // J. Vet. Med. B. - 1996. -V. 43. - P. 201-211.
174. Moratorio , G. Phylogenetic analysis of Bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes / G. Moratorio, G. Obal, A. Dubra, A. Correa, S. Bianchi, A. Buschiazzo, J. Cristina, O. Pritsch // Arch. Virol.- 2010. - V.155 (4). - P. 481-489.
175. Morovati, H. Seroprevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection in dairy cattle in Isfahan Province / H. Morovati, E. Shirvani, V. Noaman, M. Lotfi , M. Kamalzadeh, A. Hatami , M. Bahreyari, Z. Shahramyar, M.H. Morovati , M.

- Azimi, D. Sakhaei // Iran. Tropical Animal Health and Production. - 2012. - V.44. - P. 1127-1129.
176. Muasya, D.W. Estimating the prevalence of bovine tuberculosis (BTB) using indirect ELISA test in selected counties of Kenya: Masters Degree thesis / Muasya D.W. - 2015. – P. 70.
177. Müller, B. Zoonotic Mycobacterium bovis–induced Tuberculosis in Humans / B.Müller, S.Dürr, S.Alonso, J.Hattendorf, C.J.M.Laisse, S.D.C. Parsons, P.D.van Helden, J.Zinsstag // Emerg Infect Dis. - 2013. - V.19. - P.899-908.
178. Murakami, K. Nationwide survey of bovine leukemia virus infection among dairy and beef breeding cattle in Japan from 2009-2011 / K. Murakami, S. Kobayashi, M. Konishi, K. Kameyama, T. Tsutsui // The Journal of Veterinary Medical Science. - 2013. - V.75. - P.1123 -1126.
179. Mussgay, M. The bovine leucosis virus / M.Mussgay, B.Dietrshold, B.Frenzel // Med.Microbiol.and Immunol. - 1987. -V.№1-3. - P.131-138.
180. Nagy, D.W. Decreased Periparturient Transmission of Bovine Leukosis Virus in Colostrum-Fed Calves / D.W. Nagy, J.W. Tyler, S.B. Kleiboeker // Journal of Veterinary Internal Medicine. - 2007. - 21. - P. 1104–1107.
181. Nekoei, S. Molecular detection of bovine leukemia virus in peripheral blood of Iranian cattle, camel and sheep / S. Nekoei, T.T. Hafshejani, A. Doosti, F. Khamesipour // Polish Journal of Veterinary Sciences, 2015. -V.18. -P.703-707.
182. Nguyen, V.K. Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of antibodies to Bovine Leukemia Virus in serum and milk / V.K. Nguyen, R.F. Maes // J.Clin. Microbiol. - 1993. - Vol. 31(4). - P. 979-981.
183. Office International Des Epizooties. Enzootic Bovine Leukosis. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2012 (Terrestrial Manual), volume 2, chapter 2.4.11, [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.04.11\\_EBL.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.11_EBL.pdf).

184. OIE, (2012): Procedure for Registration of Diagnostic Kits Abstract sheet IDEXX M. bovis Antibody Test Kit, IDEXX Laboratories, [www.oie.int](http://www.oie.int). Accessed August /11/2012.
185. Ohno, A. Risk factors associated with increased bovine leukemia virus proviral load in infected cattle in Japan from 2012 to 2014 / A. Ohno, S.T. Takeshima, Y. Matsumoto, Y. Aida // *Virus Res.* - 2015. - V.210. - P.283-290.
186. Ortega, D.O. Seroprevalence and risk factors associated with bovine leukemia virus in Colombia / D.O. Ortega, A. Sanchez, J. Tobon et al // *J Vet.Med.Anim.Health*, 2016. -V.8 (5). - P.35-43.
187. Oshima, K. Evidence on Horizontal Transmission of Bovine Leukemia Virus due to Bloodsucking Tabanid flies / K.Oshima et al. // *Jan. Vet.Sci.* - 1981. -V. 43. -P.70-80.
188. Ouchterlony, O. Diffusion in gel methods of immunological analysis / O. Ouchterlony // *I.Progr.Allergy* - 1958. - V.5. - P.1-78.
189. Panei, C.J. Estimation of Bovine leukemia virus (BLV) proviral load harbored by lymphocyte subpopulations in BLV-infected cattle at the subclinical stage of enzootic bovine leucosis using BLV-CoCoMo-qPCR / C.J.Panei, S.N.Takeshima, T. Omori, T. Nunoya, W.C. Davis, H. Ishizaki, K. Matoba, Y. Aida // *BMC. Vet. Res.* - 2013. - V.9. - P. 95.
190. Piper, C.E. Prenatal and postnatal transmission of the bovine leukemia virus under natural condition / C.E. Piper, J.F. Ferrer, D.A. Abt // *J.Nat.Cancer.Inst.* 1979. - P. 165-168.
191. Raphael, F. A Dot Immunoblotting Assay (Dot Blot ELISA) for Early Detection of Newcastle Disease Antibodies in Chickens/ F. Raphael, D. A. Halvorson and V. Sivanandan // *Avian Diseases.* - 1998. - V.42 (1). - P. 14-19.
192. Rola-Luszczak, M. The molecular characterization of bovine leukaemia virus isolates from Eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny / M. Rola-

- Luszczak, A. Pluta, M. Olech, I. Donnik, M. Petropavlovskiy et al. // PLoS One 2013, 8: e58705.
193. Rodríguez, S.M. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses* /S.M.Rodríguez, A.Florins, N.Gillet, A. de Brogniez, M.T.Sánchez-Alcaraz, et al. // *Viruses*. - 2011. - V.3. - P. 1210-1248.
194. Rodriguez, S.M. Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades /S.M. Rodriguez, M.D. Golemba, R.H. Campos, K. Trono, L.R. Jones // *J. Gen. Virol.* - 2009. - V.90 (11). - P 2788-2797.
195. Rodwell, T.C. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities of United States / T.C. Rodwell, M. Moore, K.S. Moser, S.K. Brodine, S.A. Strathdee // *Emerging Infectious Diseases*. - 2008. – V.14. – P.909-916.
196. Rojko, J.L. Formation, Clearance, Deposition, Pathogenicity, and Identification of Biopharmaceutical-related Immune Complexes / J.L. Rojko, M.G. Evans, S.A. Price, B. Han, G. Waive, M. DeWitte et al // *Toxicologic Pathology*.- 2014. - V. 42 (4). - P. 725.
197. Sagata, N.T. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: Its evolutionary relationship to other retroviruses/ N.T. Sagata, J.Yasugana, Tsuzuku-Kawamura, K.Ohishi, Y.Ogawa // *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*. - 1985b. – V.82. – P. 677-681.
198. Schwartz, I. Pathobiology of bovine leukemia virus / I. Schwartz, D. Levy // *Vet. Res.* - 1994. - V.25. - P. 521-536.
199. Şevik, M. An 8-year longitudinal seroepidemiological study of bovine leukaemia virus (BLV) infection in dairy cattle in Turkey and analysis of risk factors associated with BLV seropositivity / M.Sevik, O.Avci, O.Ince // *Trop. Anim. Health Prod.* - 2015. - V.47. - P. 715-720.
200. Schiller, B. Bovine Tuberculosis: A Review of Current and Emerging Diagnostic Techniques in View of their Relevance for Disease Control and Eradication/ B.OSchiller, B, H. M. Vordermeier, M. V. Palmer, B. N. Harris, K. A. Orloski, B. M.

- Buddle, T. C. Thacker, K. P. Lyashchenko and W. R. Waters // *Transboundary and Emerging Diseases*. E-publication. - 2010a. - V8 (57). - P. 205–220.
201. Schoepf, K.C. Serological evidence of the occurrence of enzootic bovine leukosis (EBL) virus infection in cattle in Tanzania / K.C. Schoepf, A.M. Kapaga, H.M. Msami, J.M. Hyera // *Trop Anim Health Prod.* - 1997. - V29 (1). - P.15-19.
202. Schultz, R.D. Development of the fetal bovine immune responses: a review/ R.D. Schultz // *Cornell Vet.Med.* - 1973. - V.633.-P.507 -535.
203. Scott, H.M. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, *Neospora caninum*, Bovine leukemia virus, and Bovine viral diarrhea virus infection among dairy cattle and herds in Alberta and agroecological risk factors associated with seropositivity / H.M. Scott, O. Sorensen, J.T. Wu, E.Y. Chow, K. Manninen, J.A. VanLeeuwen // *Canadian Veterinary Journal* . - 2006. - V.47. - P.981-991.
204. Shampur , N.M. Rapid diagnosis of rabies in humans and animals by a dot blot enzyme immunoassay / N.M. Shampur, P.V. Joel, K.A. Venugopal, S.S. Moriyath // *J.Clin.Microbiol.* - 2002. - V.40. - P. 3515-3517.
205. Shmagel & cheresshnev. Molecular bases of immune complex pathology. *Biochem (Moscow)*. - 2009. - V.74. – P. 469-479.
206. Simard, C. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency / C. Simard, S. Richardson, P. Dixon, C. Bélanger, P. Maxwell // *Can. J. Vet. Res.* - 2000. - V.64. - P.101-106.
207. Stear, V.J. BoLA antigens are associated with increased frequency of persistent lymphocytosis in bovine leukemia virus infected cattle and with increased incidence of antibodies to bovine leukemia virus / V.J. Stear, C.K. Dimmock // *Animal Genetics*. - 1988. -V. 19. - P. 151 - 158.

208. Stott, M.L. Integrated bovine leukosis proviral DNA in T helper and T cytotoxic/suppressor lymphocytes / M.L. Stott, M.C. Thurmond, S.J. Dunn, B.I. Osburn, J.L. Stott // *J. Gen. Virol.*- 1991. - V.72 (Pt 2). - P. 307-315.
209. Sun, W.W. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and bovine leukemia virus seroprevalence and associated risk factors in commercial dairy and beef cattle in Northern and Northeastern China / W.W. Sun , W.F. Lv, W. C, Q.F. Meng, C.F. Wang, X.F. Shan, A.D. Qian // *BioMed Research International.* - 2015. - P. 315 - 317.
210. Terukazu, O. Circulating Immune Complexes Levels in Cows with Enzootic Bovine Leukemia / O.Terukazu, O.Misao, Y.Hiroyasu et.al // *Jpn. J. Vet.Sci.*- 1987. - V.49. - P. 657-661.
211. Thiry, L. Bovine leukemia virus related antigens in lymphocyte cultures infected with AIDS associated viruses / L. Thiry, S. Sprecher Goldberger, P. Jacquemin et al. // *Science*, 1985. - Vol. 227. - P. 1482-1483.
212. Towbin, H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application/ H. Towbin, T. Staechelin, J.Gordon // *Proc. Natl. Sci. USA.* - 1979. - V.76. - P. 4350-4354.
213. Trono, K.G. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods / K.G. Trono, D.M. Perez-Filgueira , S. Duffy, M.V. Borca, C. Carrillo // *Veterinary Microbiology* 2001. - V.83. - P.235-248.
214. Ungar-Waron, H. Circulating immune complexes in bovine leukemia virus (BLV)-infected cattle/ H. Ungar-Waron, J. Brenner, R. Paz, Z. Trainin// *Vet.Immunol.Immunopathol.* - 1992. - 34 (1-2).- P. 173-179.
215. Van der Maatan, M.J. Susceptibility of cattle to bovine leukemia virus infection by various routes of exposure. In: *Advances in Comparative leukemia*/ M.J. Van der Maatan, M.J. Miller // *Research.* Amsterdam: Elsevier North-Holland Biochemical Press, 1978. - P.29-32.

216. Van Leeuwen, J.A. Seroprevalences of antibodies against Bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Neospora caninum in beef and dairy cattle in Manitoba / J.A. VanLeeuwen, A. Tiwari, J.C. Plaizier, T.L. Whithing // *Can. Vet. J.* - 2006. - V.47 (8). - P. 783-786.
217. Vordermeier, H.M. The scientific case for the gamma interferon “BOVIGAM™” assay / H.M. Vordermeier, A. Whelan, G. Hewinson // *Government Veterinary Journal.* - 2008. - vol. 19. - P38-43.
218. Wandera, J.G. Bovine lymphosarcoma in Kenya / J.G.Wandera, J.A.Kamau, T.A.Ngatia et al // *The Kenya Veterinarian.* - 2000. - V.20. - P. 67-69.
219. Wang, C.T. Bovine leukemia viral infection in Taiwan: epidemiological study / C.T. Wang // *J. Vet. Med. Sci.* - 1991. - V.53. - P. 395-398.
220. Wedlock, D.N. Control of Mycobacterium bovis infections and the risk to human populations /D.N. Wedlock, M.A. Skinner, G.W. de Liste, B.M . Buddle // *Microbes Infect.* - 2002. - V.4. - P.471- 480.
221. Welsh, M.D. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis / M.D.Welsh, R.T. Cunningham, D.M. Corbett, R.M. Girvin, J. McNair, R.A. Skuce, D.G. Bryson J.M. Pollock J.M // *Immunology.* - 2005. - vol. 114, no. 1. - P.101-111.
222. WHO. (2006): The Control of Neglected Zoonotic Diseases. A route to poverty alleviation. Geneva, World Health Organization. [http://www.who.int/zoonoses/ Report\\_Sept06 .pdf](http://www.who.int/zoonoses/Report_Sept06.pdf).
223. Williams, D. L. Molecular studies of T-lymphocytes from cattle infected with bovine leukemia virus / D.L. Williams, O. Barta, G.F. Amborski // *Vet.Immunol. Immunopathol.* 1988. - V.19. - P.307 - 323.
224. Wu, D. B-1a, B-1b and conventional B cell lymphoma from enzootic bovine leucosis / D. Wu, K. Takahashi, K. Murakami, K. Tani, A. Koguchi, M. Asahina et al. // *Vet.Immunol.Immunopathol.* - 1996. - V.55. - P. 63-72.

225. Yang, Y. Bovine leukemia virus infection in cattle of China: association with reduced milk production and increased somatic cell score / Y.Yang, W.Fan, Y. Mao, Z.Yang, G. Lu, R. Zhang, H. Zhang, C. Szeto, C. Wang // *Journal of Dairy Science*. - 2016. -V.99. - P.3688-3697.
226. Yang, D. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus – infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis / D. Yang et al. // *Agricultural Science*. - 1993. - V.90. - P. 6538 - 6541.
227. Zaghawa, A. An outbreak of enzootic bovine leukosis in Upper Egypt: clinical, laboratory and molecular- epidemiological studies/ A. Zaghawa, D. Beier, I.H. Abd El-Rahim, I. Karim, S. El- ballal, F.J. Conraths, O. Marquardt // *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. - 2002. - V49 (3). - P. 123-129.



## **7 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ВЛКРС - Вирус лейкоза крупного рогатого скота;

ИФА - Иммуноферментный анализ;

РИД - Реакция иммунодиффузии в геле;

ЦИК - Циркулирующие иммунные комплексы;

ПЭГ - Полиэтиленгликоль;

ПЦР - Полимеразная цепная реакция;

ПААГ - Полиакриламидная гель;

ДМСО-антигены - Диметилсульфоксид-антигены;

НЦМ - Нитроцеллюлозная мембрана;

КРС - Крупный рогатый скоть;

ОП – Оптическая плотность.

**ПРИЛОЖЕНИЯ**

## РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2564007

**СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИГЕНА ВИРУСА ЛЕЙКОЗА  
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

Патентообладатель(ли): *федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана" (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2014127410

Приоритет изобретения 04 июля 2014 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 31 августа 2015 г.

Срок действия патента истекает 04 июля 2034 г.

Заместитель руководителя Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Л.Л. Кирий



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



Автор(ы): **Якупов Талгат Равилович (RU), Хаертдинов Камил Саубанович (RU), Козлов Александр Сергеевич (RU), Джакаит Джулиет Акамуран (RU)**

№ 2264007

СЛУЖБА ПО ЗАЩИТЕ ИНТЕРЕСОВ АВТОРОВ ПОЛИГРАФИЧЕСКОГО ПОЛНОМОЧИЯ

Получено в депозитную службу 01 июля 2014 г. в количестве 1 экз. (всего экземпляров 1 экз.)

Принят в депозитную службу 04 июля 2014 г. в количестве 1 экз. (всего экземпляров 1 экз.)

Срок хранения авторского экземпляра 10 лет

№ 1. 1. 1.





РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ ЕСТЕСТВОЗНАНИЯ

# СЕРТИФИКАТ

научная работа

**Джакаит Д.А., Якупов Т.Р.**

**СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИГЕНА ВЛКРС ИЗ КРОВИ БОЛЬНЫХ  
ЛЕЙКОЗОМ КОРОВ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В  
ИММУНОХИМИИ**

обсуждена на международной научной конференции

**ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ ПРОБЛЕМЫ  
МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ, ОАЭ (ДУБАЙ) 16-23  
октября 2015 г.**

Ученый секретарь РАЕ  
Н.Ю.Стукова







# СЕРТИФИКАТ

ВРУЧАЕТСЯ

*Джакамт*

*Джулет Акмухам*

участнику Международной научно-практической конференции  
 «Инновационные решения в ветеринарной медицине,  
 зоотехнии и биотехнологии в интересах развития  
 агропромышленного комплекса»

Ректор, ФГБОУ ВО КГАВМ,  
 профессор

Р.Х. Рашилов



25 Мая 2017  
 Казань



научно-издательский центр  
"Академический"

# ДИПЛОМ

За активное участие в работе  
XII Международной научно-  
практической конференции  
"Наука в современном  
информационном обществе"

19-20.06.17 г


North Charleston, USA

награждается

**Джакаит**  
**Джулиет Акамуран**

20 июня 2017 г.



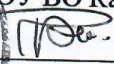
  
Председатель ООИП  
н.-и.ц. "Академический"  
к.ф.н., доц. Моисеев Е.В.

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
 РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
 ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной  
 медицины им. Н.Э.Баумана»



УТВЕРЖДАЮ:

Ректор ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ

профессор  Р.Х.Равилов

«20» октября 2017 года

Методические рекомендации  
 по выявлению антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота методом ИФА  
 и дот-блот иммуноанализа с использованием антигена из местных штаммов  
 возбудителя.

Казань.2017



*Копии выданы  
 директору центра  
 ВО Казанская ГАВМ*

*Нурмаев Р.И.  
 23.03.18.*



Якупов Т.Р., Джакаит Д.А. Методическое рекомендации по выявлению антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота методом ИФА и дот-блот иммуноанализа с использованием антигена из местных штаммов возбудителя.

Рассмотрены и одобрены на НТС ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ. Протокол №8 от 18 октября 2017 года.

Рецензенты: заведующий лабораторией биохимии и молекулярно - генетического анализа, доктор ветеринарных наук, профессор биохимии Фаизов Т.Х.  
заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, доктор ветеринарных наук, профессор Галиуллин А.К.

Методические рекомендации предназначены для лабораторных работников и зооветеринарных специалистов.



*Ирина Вадимовна Сафарова*  
*доцент*  
*Ирина Вадимовна Сафарова*  
*23.03.18.*