

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.И. ВАВИЛОВА

На правах рукописи

КАЗИЕВА ГУЛЯ ХАЙЛЯДИНОВНА

**Ветеринарно-санитарная оценка молока и молочных продуктов при
ретровирусных инфекциях крупного рогатого скота**

06.02.05 - Ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и ветеринарно-
санитарная экспертиза

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
кандидат биологических наук,
доцент Красникова Екатерина
Сергеевна

Саратов 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

		стр.
1	ВВЕДЕНИЕ.....	3
2	ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	9
2.1	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
2.1.1	Этиопатогенез ретровирусных инфекций крупного рогатого скота	9
2.1.2	Распространение ретровирусных инфекций крупного рогатого скота в мире и в Российской Федерации.....	15
2.1.3	Ветеринарно-санитарная оценка продукции, полученной от инфицированного ретровирусами крупного рогатого скота....	18
2.1.4	Индикация возбудителей ретровирусных инфекций крупного рогатого скота в объектах ветеринарного надзора	23
2.2	СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
2.2.1	Материал и методы исследований.....	35
2.2.2	Результаты исследований.....	45
2.2.2.1	Распространение ретровирусных инфекций крупного рогатого скота в Саратовской области	45
2.2.2.2	Влияние ретровирусных инфекций крупного рогатого скота на качество и безопасность коровьего молока.....	51
2.2.2.3	Влияние ретровирусных инфекций крупного рогатого скота на технологические свойства коровьего молока.....	64
2.2.2.4	Разработка методов детекции ретровирусов крупного рогатого скота.....	81
3	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	88
4	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.	91
5	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	92
6	СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	117
7	ПРИЛОЖЕНИЯ.....	120

1 ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Молоко здоровых коров является важнейшим продуктом питания и сырьем, широко применяемым в пищевой промышленности. Молоко должно подвергаться тщательному контролю по всем основным показателям: органолептическим, физико-химическим, микробиологическим и другим, не только для определения его биологической полноценности и безопасности, но и для выяснения его сырьевой ценности.

Ретровирусные инфекции крупного рогатого скота - энзоотический лейкоз и иммунодефицит, относят к заболеваниям, не поддающимся терапии и специфической профилактике. Возбудители этих заболеваний, РНК-содержащие вирусы семейства *Retroviridae*, паразитируют в клетках иммунной системы. В эндемичных регионах степень инфицирования ретровирусами крупного рогатого скота достигает 67 – 83,9 % (Красникова, 2014; McConnel et al., 2015).

Представители семейства *Retroviridae* имеют уникальную биологическую особенность: однажды инфицировав клетку, вирус становится неотъемлемой частью организма и может долгие годы не проявлять свой патогенный потенциал, делая носителя скрытым источником инфекции, что снижает эффективность серологической диагностики данных заболеваний и способствует их экспансии (Супотницкий, 2009; Климов, 2012).

Ретровирусные инфекции крупного рогатого скота наносят значительный экономический ущерб животноводству, обусловленный снижением племенной ценности и выбраковкой животных, недополучением молодняка и продукции. В частности, удои молочных коров, инфицированных вирусом энзоотического лейкоза, снижаются на 13,3 – 15,5 %, а в ряде случаев на 24,6 %, на фоне ухудшения качества получаемого молока (Семенова, 1975; Yang et al, 2016).

Решение вопроса эпизоотической безопасности в отношении ретровирусных инфекций крупного рогатого скота направленно, в первую очередь, на защиту животных от заражения путем своевременного выявления и удаления инфицированного скота (Гулюкин и Иванова, 2017; Красникова и др, 2013). В большинстве случаев ретровирусная инфекция у крупного рогатого скота протекает в форме коинфекции. Вирусный иммунодефицит сочетано с энзоотическим лейкозом усугубляет тяжесть течения инфекции, затрудняет диагностику заболевания и приводит к увеличению экономических потерь в животноводстве. При этом диагностика лейкоза регламентированными в РФ методами не всегда позволяет выявить всех носителей, а исследованиям на иммунодефицит не уделяется должного внимания (Криворучко и др, 2012; Донник и др, 2015).

Степень разработанности темы. Проблема пищевой ценности и биологической безопасности молока коров при энзоотическом лейкозе не теряет своей актуальности уже много десятилетий. Известно, что количество соматических клеток в молоке инфицированных вирусом лейкоза коров составляет $4,9 - 5,2 \times 10^5 / 1 \text{ см}^3$ (Norby et al, 2016), а бактериальная обсемененность такого молока, доходит до $2 \times 10^7 \pm 4 \times 10^2$ КОЕ/мл (Красникова и др, 2015). Это связывают со снижением, как общей сопротивляемости у животных, так и резистентности на уровне молочной железы коров (Della Libera et al, 2015). При этом происходит уменьшение количества общего белка в молоке на 16,8 % (Снежков и др, 1991) и количества аминокислот, в том числе незаменимых (Думбур, 1990; Закрепина, 2001).

Согласно ветеринарному законодательству, молоко больных лейкозом коров не допускается в пищу человеку, так как оно содержит обладающие канцерогенными свойствами метаболиты триптофана и других циклических аминокислот. Для питания детей нельзя использовать и молоко, полученное от коров - носителей инфекции. В отношении молока инфицированных вирусом иммунодефицита коров не разработано санитарных норм и правил.

В мировой литературе нет сведений о качестве и безопасности молока, полученного от коров с ретровирусной коинфекцией.

Высокая степень распространения ретровирусных инфекций крупного рогатого скота и сложности, возникающие при диагностике этих заболеваний, способствуют тому, что молоко инфицированных коров может попасть на производство. Это обуславливает необходимость изучения санитарно-гигиенических показателей такого молока и его технологических свойств, в том числе при смешивании с молоком интактных животных. А также необходимость совершенствования методов выявления данных патогенов, как у животных, так и в получаемой от них продукции.

Цель и задачи исследования. В связи с выше указанным, **целью** нашей работы явилась оценка ветеринарно-санитарных показателей и технологических свойств молока инфицированных ретровирусами коров.

В соответствии с целью, нами были определены следующие **задачи**:

1. Дать оценку ветеринарно - санитарным показателям молока инфицированных ретровирусами коров и определить эффективность его пастеризации.

2. Осуществить сравнительный анализ белковой ценности молока инфицированных ретровирусами коров и его аминокислотного состава.

3. Оценить технологические свойства молока инфицированных ретровирусами коров и ветеринарно - санитарные показатели выработанных из него кисломолочных продуктов.

4. Разработать методы индикации возбудителей ретровирусных инфекций крупного рогатого скота в объектах ветеринарного надзора.

Научная новизна. Впервые дана ветеринарно-санитарная оценка и охарактеризованы белковая и аминокислотная ценности молока, полученного от инфицированных ретровирусами коров, исследована эффективность различных способов его пастеризации. Впервые описаны основные свойства молока инфицированных ретровирусами коров при выработке и хранении

полученных из него кисломолочных продуктов, изучено влияние различного количества примеси инфицированного молока на технологические свойства сборного. Разработаны, запатентованы и внедрены в практику два новых способа эффективного выявления, инфицированного ретровирусами крупного рогатого скота, а также получаемой от него продукции.

Теоретическая и практическая значимость работы. Настоящая работа относится к области фундаментальных и прикладных исследований.

Сведения, полученные при сравнительном анализе органолептических, физико-химических и микробиологических показателей, белкового и аминокислотного состава, а также технологических свойств молока, инфицированных ретровирусами коров, восполняют недостающие сведения и формируют теоретическую базу для совершенствования ветеринарно-санитарной экспертизы молока и кисломолочных продуктов.

Результаты, полученные при определении ветеринарно-санитарных показателей, а также пищевых и технологических свойств молока, инфицированных ретровирусами коров, имеют большое практическое значение для определения сырьевой ценности такого молока для молокоперерабатывающих предприятий и определения путей его переработки. Использование разработанных и запатентованных способов эффективного выявления, инфицированного ретровирусами крупного рогатого скота и получаемой от него продукции будет способствовать недопущению попадания на молокоперерабатывающие предприятия и в торговую сеть коровьего молока низкого качества.

Методология и методы исследований. Для решения поставленных задач был использован комплекс как общенаучных, так и частнонаучных методов исследования. Методологическая база основывалась на применении совокупности общетеоретических и эмпирических методов исследования, таких как системный подход, статистическая обработка данных, анализ, эксперимент, измерение, сравнение, моделирование, в том числе

компьютерное и т.д. Решение поставленных задач реализовывалось по средствам использования эпизоотологических, органолептических, физико-химических, микробиологических, хроматографических, молекулярно-генетических и других методов исследования, выполненных на высокотехнологичном оборудовании научных подразделений ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ и ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов).

Положения, выносимые на защиту:

1. Молоко инфицированных ретровирусами коров имеет неудовлетворительные микробиологические характеристики, измененный белково-аминокислотный состав и не соответствующие стандартам технологические свойства.

2. Внедрение разработанных способов ранней диагностики ретровирусных инфекций крупного рогатого скота способствует повышению эффективности производства и улучшению качества продукции молокоперерабатывающих предприятий.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов обусловлена значительным объемом экспериментального материала, полученного с использованием высокоинформативных методов исследования с подтверждением данных математической статистикой.

Основные материалы диссертационной работы представлены, обсуждены и одобрены на межвузовских, международных, межрегиональных, всероссийских научно-практических конференциях (Саратов 2013-2016 г.г.; Ульяновск 2014 г.; Уральск, 2015 г.; Ставрополь 2015 г.; Москва, 2016 г., Кемерово 2016 г.).

Личный вклад соискателя. Все эпизоотологические, молекулярные, генетические, хроматографические, органолептические, физико-химические, санитарно-микробиологические исследования, а также статистическая обработка полученных результатов проведены непосредственно автором.

Публикации. Материалы диссертации опубликованы в 16 научных статьях, в том числе в 6 изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ. По результатам исследований получены 2 патента РФ на изобретение.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 121 страницах стандартного компьютерного текста и включает в себя введение, основную часть, заключение и приложения. Работа иллюстрирована 16 таблицами и 18 рисунками. Список использованной литературы включает в себя 218 источников, в том числе 141 иностранный.

2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

2.1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1.1 Этиопатогенез ретровирусных инфекций крупного рогатого скота

В Семейство *Retroviridae* входят возбудители неизлечимых инфекций, как теплокровных, так и хладнокровных животных, как правило, заканчивающихся летальным исходом: Т-лимфотропные вирусы человека, вирус энзоотического лейкоза крупного рогатого скота, возбудитель саркомы Рауса, вирус опухоли молочной железы, другие онкогенные вирусы, возбудители иммунодефицита человека и обезьян, инфекционной анемии лошадей, Висна-Маеди овец и коз и др (Супотницкий, 2009).

Ретровирусы характеризуются высоким уровнем генетической изменчивости. Что затрудняет разработку эффективных мер специфической борьбы и профилактики, а также способствует их широкому распространению и адаптации к новым организмам. Ретровирусы способны преодолевать межвидовой барьер и уже не однократно мигрировали с животных на человека: вирусы иммунодефицита человека ВИЧ 1 и ВИЧ 2 ранее вызывали заболевания только у обезьян, а вирус лейкоза крупного рогатого скота был обнаружен в клетках крови людей (Buehring et al, 2003; Супотницкий, 2009).

Вирусы с из этого семейства, такие как возбудители лейкемии и иммунодефицита, могут долгие годы не проявляться в инфицированном организме, делая его источником инфекции (Burny et al, 1988; Kettmann & Burny, 1994). Данные вирусы передаются различными путями: при контакте, с пищей, при случке, ятрогенно, трансмессивно, от матери к плоду (Chang-Fung-Martel et al, 2013).

Вирусы лейкемии и иммунодефицита вызывают трансформацию зараженных клеток и разрушают иммунитет, приводят к злокачественным новообразованиям инфекциям (Maddon et al, 1986; Vucy et al, 2011). Больные и зараженные животные страдают от разносторонних специфических и

сопутствующих поражений в организме, что со временем приводит к снижению продуктивных качеств и племенной ценности (Snider et al, 1996).

В настоящее время семейство ретровирусов не отнесено ни к одному из 7 известных порядков и является самостоятельным таксоном царства *Vira* (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>). По последним данным Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) систематическое положение возбудителей вирусного иммунодефицита и лейкоза крупного рогатого скота таково:

Семейство: *Retroviridae*

Подсемейство: *Orthoretrovirinae*

Род: *Deltaretrovirus*

Вид: *Bovine leukemia virus*

Род: *Lentivirus*

Вид: *Bovine immunodeficiency virus*

Bovine immunodeficiency virus (BIV) был впервые выделен в 1969 году в штате Луизиана, США, от 8-и летней Голштинской коровы с клиническими признаками лимфоцитоза, генерализованной гиперплазией лимфатических узлов, поражением центральной нервной системы, слабостью и кахексией (Van Der Maaten et al, 1972). При гистологическом исследовании в животных тканях обнаружили генерализованную фолликулярную гиперплазию лимфатических узлов и периваскулярный отек мозга. Изолированный вирус сопутствовал формированию сентенция в клеточных культурах и был структурно близок к *MWV* (висна-маэди вирус), и, соответственно, был отнесен к роду *Lentivirus* и обозначен как «бычий вирус висна-маэди». Этот вирус не был отнесен к возбудителю лейкоза и лимфосаркомы, его биология мало изучалась почти полтора десятилетия, пока в 1983 году не был обнаружен ВИЧ (Barre-Sinoussi et al, 1983). Штамм R29, полученный от коров лентивирус, был сходен по своему строению с вирусом иммунодефицита человека (Gonda et al, 1987). *BIV* назвали в результате его морфологической, серологической и генетической гомологии с ВИЧ «Вирус

иммунодефицита крупного рогатого скота». Вскоре из штамма R29 были получены инфекционные ДНК-клоны - BIV106 и BIV127 (Braun et al, 1988). Затем новые полевые штаммы FL491 и FL112 были изолированы во Флориде и связаны с развитием лейкоцитоза у скота. Новые штаммы отличались от оригинала R29 по репликации и способности образовывать синцитий в культуре эмбриональных клеток легкого КРС. Оба штамма идентифицировали методами иммунофлюоресценции, иммуноблоттинга и ПЦР, и они имели 92,6 - 93,6 % гомологии с нуклеотидной последовательностью клона R29 - BIV127 (Suarez et al, 1995). Однако большинство патологических, серологических и молекулярно-биологических исследований было получено на оригинальном R29 изоляте *BIV*.

BIV способен размножаться в эмбриональных клетках легких, селезенки, тимуса и почек крупного рогатого скота и образует синцитий (Gonda et al, 1987). Кроме того, *BIV* может инфицировать диплоидные и анеуплоидные клетки собаки, хорька и овцы (Bouillant et al, 1989).

BIV, как и другие лентивирусы, проявляет антигенную вариабельность, чтобы уклоняться от иммунной системы инфицированного организма, таким образом, чтобы произвести как можно большее количество своих потомков. Геномное разнообразие *BIV* обусловлено мутациями, рекомбинациями и селективным давлением организма, которые действуют на вирусы в процессе репликации. Персистенция в клетках организма-хозяина также является одним из механизмов приспособления вируса, чтобы выжить в течение длительного периода времени (Boyer et al, 1992; Mansky, 1998; Truyen et al, 1995).

Carpenter с соавторами (2000) основываясь на сравнении нуклеотидных последовательностей *rt* региона гена *pol* дифференцировали тринадцать изолятов *BIV*, которые имели 10 и 11 % дивергенции нуклеотидной и аминокислотной гомологии, соответственно. Консервативные регионы в *rt* домене гена *pol* *BIV* сохранили отличие от *HIV-1*. Доля замены составляла

около 85 %, что имеет решающее значение в эволюционном развитии *BIV* (Suarez et al, 1995).

Белковые оболочки на поверхности еще более склонны к генетической изменчивости и любое изменение этого белка может изменять клеточный тропизм вируса (Coffin, 1992; Pezo & Wain-Hobson, 1997). Изменчивость размеров SU белков *BIV* - это распространенное явление, основанное на рекомбинации (Suarez & Whetstone, 1995). Рекомбинантные вирусы имеют преимущества благодаря антигенной множественности (Li & Carpenter, 2001). При сравнении SU последовательностей гена env изолята R29 и его производных, самой консервативной областью SU региона был признан участок, где заменам подвергалось меньше 10 % последовательностей. В гипервариабельных регионах – более чем 30 % (Mordow et al, 1987; Starcich et al, 1986). Однако, из-за сложности выделения, в настоящее время известны лишь несколько вариантов *BIV*: FL491, FL112, R29 и его клоны - BIV106 и BIV127.

Первый случай лейкоза крупного рогатого скота был выявлен и описан в Германии. В настоящее время лейкозы диагностированы как у теплокровных, так и холоднокровных животных. В разное время эту болезнь называли белокровием, лейкемией, раком крови, лейкозом и др. Другое названия лейкоза - гемобластоз, что наиболее полно отражает патогенетическую сущность болезни (Sabrina et al, 2011). Еще в 19-м веке в первые выпущены доклады с описанием возникновением клинических признаков, которые связаны с энзоотическим лейкозом крупного рогатого скота. Первоначально наблюдали образование желтоватых саловидных узелков в лимфоидных органах и большое увеличение селезенки у коровы с лейкоцитозом, о чем сообщалось в немецкой литературе еще в 1871 году (Leisering, 1871; Olson & Miller, 1987). Через три года лейкоз крупного рогатого скота был охарактеризован в качестве отдельного заболевания с четко выявленной клинической картиной (Bollinger, 1874), а в 1876

наблюдались первые случаи злокачественных лимфом у крупного рогатого скота (Siedamgrotzky & Hofmeister, 1876).

Широкое распространение заболевания произошло за счет введения европейских пород крупного рогатого скота в страны, свободных от заболевания. Инфекционный характер энзоотического лейкоза крупного рогатого скота (ЭЛ КРС) был обнаружен спустя многие десятилетия на основе эпидемиологических данных (Bendixen, 1965). Наконец, возбудитель этого злокачественного заболевания был выделен в культуре в 1969 году (Miller et al, 1969) и, в 1976 году был классифицирован как *Bovine type C oncovirus* рода *Oncovirus* семейства *Retroviridae*. В 1990 году, на основании высокой степени гомологии с Т-лимфотропным вирусом лейкемии человека, данные возбудители были выделены в отдельную группу *HTLV-BLV group* в семействе *Retroviridae*, которую в 1995 году переименовали в *BLV-HTLV group*, а сам вирус был обозначен как *Bovine leukaemia virus (BLV)*. В 1999 году вместо *BLV-HTLV group* появился род *Deltaretrovirus*, который в 2002 году был отнесен к подсемейству *Orthoretrovirinae* (ICTV).

Вирус лейкоза КРС является δ -ретровирусом, который филогенетически тесно связан человеческим Т-лимфотропным вирусом типа 1 (*HTLV-1*). *HTLV-1* заражено около 15 миллионов человек во всем мире, он индуцирует широкий спектр заболеваний, например, *HTLV*-ассоциированные миелопатии, тропический спастический парапарез и лейкоз, а также лимфома Т-клеточного типа (Gutiérrez et al, 2014). *BLV* - онкогенный В-лимфотропный ретровирус, который патогенен для крупного рогатого скота и вызывает хроническую инфекцию с различным исходом. Подавляющее большинство *BLV*-инфицированных животных (около 70 %) являются бессимптомными носителями вируса. У этих животных, ни клинических симптомов, ни изменения общего числа лимфоцитов не наблюдается. Таким образом, они могут быть идентифицированы только наличием анти-*BLV* антител и / или провирусной ДНК (Burny et al, 1988; Kettmann & Burny, 1994). Приблизительно, у трети *BLV*-инфицированных коров наблюдают

поликлональную пролиферацию В-клеток, называемую стойкими лимфоцитоз (Донник и Петропавловский, 2015). Это клиническое состояние характеризуется не только увеличением абсолютного числа циркулирующих лимфоцитов периферической крови, но и инверсией соотношения В/Т лимфоцитов (Willems & Thomas, 1988; Kenyon & Piper, 1977). Несмотря на гематологические изменения, у животных не развивается никаких других видимых клинических признаков, и они, обычно, остаются клинически стабильными в течение нескольких лет, но инфекция может прогрессировать вплоть до фазы опухоли (Ferrer et al, 1981; Burny et al, 1988;).

Визуально заметными проявлениями *BLV* инфекции является развитие лимфоидных опухолей. Фатальная лимфома или лимфосаркома (LS) наблюдается менее чем у 5-10 % инфицированных животных, преимущественно взрослого крупного рогатого скота старше 4-5 лет. В отличие от персистентного лимфоцитоза, экспансия (увеличение) В-клеток является моно- или олигоклонального происхождения (Burny et al, 1988; Jacobs et al, 1992). Местная пролиферация В-клеток, называемая лимфосаркомой происходит в пределах различных органов и тканей и приводит к многим патологиям, которые в итоге заканчиваются смертью животного. Кроме того, трансформированные В-клетки могут также вызвать увеличение лимфатических узлов и лимфому (Ferrer et al, 1981; Burny et al, 1988). Кроме влияния на продолжительность жизни, *BLV* инфекция также ухудшает иммунную систему и ведет к развитию оппортунистических инфекций (Thurmond, 1987; Pelzer, 1997; Trainin & Brenner, 2005).

Ген *env BLV* кодирует один из основных иммуногенных поверхностных гликопротеинов - gp51, который участвует во взаимодействии вирус-клетка (Johnston & Radke, 2000). Область gp51 широко используются для генотипирования *BLV* и последние филогенетические исследования этого региона различных вирусных штаммов, выделенных в мире, показывают, что *BLV* можно классифицировать на девять генотипов (Смирнов и Батенёва, 2013; Polat et al, 2016). На территории Российской Федерации преобладают 4,

7, 8 генотипы вируса (Вафин и др, 2014), а также 1 и 6 (Смирнов и др, 2014) и реже другие (Донник и др, 21014).

2.1.2 Распространение ретровирусных инфекций крупного рогатого скота в мире и в Российской Федерации

Вирус иммунодефицита крупного рогатого скота в разной степени распространен в мире. На территории Российской Федерации подобные исследования носят периодический характер. По неполным данным, зараженность крупного рогатого скота вирусным иммунодефицитом в Московской области составляет от 11 до 67 % не зависимо от клинических признаков болезни, а в Ставропольском крае 11-33 %. Причем в большинстве случаев (30-60 %) наблюдается сочетанное инфицирование *BIV* и *BLV* (Колотвин и др, 2006; Бурба и др, 2009; Криворучко и др, 2012).

Результаты серологических исследований доказывают, что в Индии поражения скота *BIV* относительно стабильно и находиться на уровне 19 %, 22 % и 24 % в разных штатах (Bhatia et al, 2006, 2008, 2010). В Канаде регистрируют от 13,8 % до 23,4 % инфицированного скота (Mc Nab et al, 1994). В Германии и Японии ситуация по вирусному иммунодефициту скота менее напряженная - 6.6 % и 7,5 %, соответственно (Muluneh, 1994; Hirari et al, 1996). В Италии и Австралии инфицированность скота *BIV* колеблется в 2-4 раза в зависимости от стада: 2,5-5,8 % и 3,8-15,9 %, соответственно (Cavirani et al, 1998; Burkala et al, 1999). В Корее 33 % скота является серопозитивным по *BIV* (Cho et al, 1999), в Пакистане – 10,3 % и 15,8 % (Meas et al, 2000), в Бразилии и Замбии – чуть меньше 12 % (Meas et al, 2002). Примерно на том же уровне *BIV* выявлен в Японии – 7,5-11 % (Hirari et al, 1996) и Турции - 12,3 % (Meas et al, 2000). Установлено, что серопозитивные животные в США и Франции составляют около 4 % (Whetstone et al, 1990; Polack et al, 1996), а в Нидерландах – самый низкий уровень распространения вируса - 1,4 % (Horzinek et al, 1991). Данные серологических исследований животных в Миссисипи (США) выявили 38 % случаев *BIV*-инфекции в

районе Прибрежной равнины и 58 % случаев в центральных штатах континента, в среднем около 50 % (StCyr Coats et al, 1994). В штате Онтарио (США) обнаружено 5,5 % серопозитивных по *BIV* животных (McNab et al, 1994). Также *BIV* зарегистрирован в Швеции, в Коста-Рике, в Венесуэле, в Новой Зеландии (Horner, 1991), в Индонезии (Meas et al, 2002). В Пакистане были выявлены 10,3 % водяных буйволов и 15,8 % крупного рогатого скота *BIV* -позитивные по результатам вестерн-блоттинга, при этом менее 1 % животных были положительными по *BLV*, согласно результатам реакции иммунодиффузии (Meas et al, 2000).

Однако в большинстве случаев серо-эпизоотологические данные показывают, что энзоотический лейкоз более распространен в мире среди крупного рогатого скота, чем вирусный иммунодефицит. Причем, довольно часто выявляется ретровирусная микст-инфекция. Так в Англии у коров в стадах *BIV* был диагностирован у 21-30 % животных, при этом в 43 % случаев иммунодефицит был ассоциирован с лейкозом крупного рогатого скота, в чистом же виде *BLV* был выявлен у 52 % обследованных животных (Cockerell et al, 1992). В Японии среди 11 % *BIV*-позитивных и 3,3 % *BLV*-положительных коров около 1 % животных были *BIV-BLV*-положительными. Исследователями была выявлена корреляция: при увеличении серопозитивности до 25 %, количество микст-инфицированных животных возрастало до 4,5 % (Usui et al, 2003). Данные зарубежных исследователей доказывают, что *BLV* инфекция наблюдается на всех континентах, в меньшей степени в Европе. В Батон-Руж (Луизиана) *BLV* был выявлен у 50 % скота (Black, 1990), в то время как в Финляндии он регистрируется не более, чем у 0,03 – 5,0 % поголовья (Nuotio et al, 2003). В Литве с 1985 года серопозитивных животных выбраковывали из стад, а телят кормили пастеризованным молоком. В итоге, в 1990 году распространение вируса не превышало 7,29 % на территории страны, и неуклонно снижалась до 0,32 % к 2006 году (Asaite et al, 2007). Европейское экономическое сообщество (ЕЭС) объявил большую часть своих членов официально свободными от ЭЛ КРС. В

противоположность этому, ситуация отличается в Восточной Европе, где эта болезнь все еще присутствует в ряде стран (Болгария, Хорватия, Эстония, Латвия, Польша, Румыния, Украина) (OIE World Animal Health InformationDatabase (WAHID Interface)). Подобные попытки искоренить *BLV* инфекции в молочных стадах Австралии и Новой Зеландии началось в середине 1990-х годов. Более 98 % животных из этих стад были отрицательными в 2005 году (NAHIS-АНА Enzootic Bovine Leukosis). За исключением Европейского Союза, распространенность *BLV* во всем мире колеблется от 30 % до 90 % (European Food Safety Authority Response to scientific and technical information provided by an NGO on *Xylella fastidiosa*. EFSA J. 2015). Точная информация по распространению *BLV* в США была собрана с помощью системы национального мониторинга здоровья животных (NAHMS). Исследования показали, что в 2007 году в США 83,9 % молочных стад были *BLV*-положительны (NAHMS-USDA Bovine Leukosis Virus on U.S. Dairy Operations. 2007). Эпизоотологическая ситуация в нескольких провинциях Канады свидетельствует о высоком уровне распространенности *BLV*: до 89 % в фермерских хозяйствах и 20,8-37,4 % у животных индивидуальной собственности (Jacobs et al, 1995; Van Leeuwen et al, 2001, 2005, 2006; Scott et al, 2006). В Южной Америке (Колумбии, Венесуэле, Чили и Уругвае) показатели инфицирования ЭЛ КРС колеблются между 34 и 50 % (Islas et al, 1990; Alfonso et al, 1998; Rama et al, 2011). В Аргентине, в частной собственности и на уровне фермерских хозяйств уровень пораженности *BLV* доходил до 32,8 % и 84 %, соответственно (Trono et al, 2001). В Бразилии, распространенность *BLV*-инфекции значительно варьирует между регионами и в ряде случаев достигает более 50 % (D'Angelino et al, 1998; Melo et al, 1997; Molnár et al, 1999; Cerqueira-Leite R, et al, 2001; Del Fava & Pituco, 2004). OIE признает, что *BLV* присутствует в Индонезии, Тайбэй (Китай) и Монголии (OIE World Animal Health InformationDatabase (WAHID Interface)). Небольшое количество *BLV*-инфицированных животных, около 5 %, зарегистрировано в Камбодже и на

Тайване (Wang, 1991; Meas et al, 2000). В Японии он значительно выше: 28,6 % и 68,1 % в частном владении и на фермах, соответственно (Murakami et al, 2011). В Корее заражены до 86,8 % коров молочных стад, а в частном владении - чуть более 50 % (Suh et al, 2005). Что касается стран Ближнего Востока, исследования показывают, что распространенность инфекции *BLV* несколько ниже, чем в других регионах мира - около 20 % (Trainin & Brenner, 2005; Meas et al, 2000; Pourjafar et al, 2004).

Лейкоз КРС распространен во многих субъектах Российской Федерации. По официальным данным в России на начало 2017 года имелось 138 неблагополучных по лейкозу пунктов. Уровень инфицированности в среднем в Саратовской области составляет 9,5 %, а в отдельных регионах достигает 20 - 40 % и выше (Донник, 2014, 2015; Смирнов, 2014-2016).

2.1.3 Ветеринарно-санитарная оценка продукции, полученной от инфицированного ретровирусами крупного рогатого скота

По данным Института питания РАМН, ежегодный дефицит пищевого белка в России превышает 1,6 млн. т. Общий дефицит белка на планете оценивается в 10-25 млн. т в год (Овсянникова & Ксёنز, 2012). На каждого жителя Земли в настоящее время приходится около 60 г белка в сутки. Тогда как исследования азотистого баланса организма человека доказали, что средне –статистическая диетическая норма потребления белка для здорового взрослого человека составляет 0,8 г белка на 1 кг массы тела в день. Однако этот показатель меняться в зависимости от физической и умственной нагрузки, физиологического состояния, пола и возраста. Например, для здорового молодого мужчины с минимальной физической нагрузкой нормальной белковой диетой является 88 г белка в сутки (Teunissen-Beekman et al, 2016).

Не только количество, но и качество белка, в частности сбалансированный аминокислотный состав, определяют его питательную ценность для организма человека. Белки животного происхождения, по

сравнению с растительными белками, богаты необходимыми аминокислотами, кроме того в их наличии есть витамины, а также цинк и железо которое усваивается лучше, чем железо из растительных продуктов. Крупы и орехи не являются полноценными источниками белка. Даже соевый белок, наиболее оптимальный по аминокислотному составу, не содержит незаменимую аминокислоту метионин (Wu, 2016).

Важнейшим источников белка для человека является молоко, полезный и полезный продукт питания. Молоко содержит все питательные вещества, необходимые для жизнедеятельности организма. Молоко коров, есть в рационе всех возрастных категорий, его аминокислотный состав полноценный и сбалансированный. Белок коровьего молока усваивается организмом человека на 96-98 %. Установлено, что молочные белки стабилизируют кровяное давление при гипертонии. Основным белком молока является казеин (около 80 % молочных белков), его содержание в коровьем молоке колеблется от 2,1 до 2,9 % (McGregor & Poppitt, 2013).

Ферментация молочных белков начинается еще в процессе хранения сырого молока. Распад белков в сыром молоке осуществляют фермент плазмин, протеолитические ферменты микрофлоры молока и внесенные закваски (Saubade et al, 2016; Savilahti, 2011).

Важными продуктами ферментативного процесса молока являются пептиды, а фракция свободных аминокислот, как правило, относительно невелика. Пептиды молочных белков положительно влияют на усвоение некоторых эссенциальных микронутриентов, в частности ионов кальция, стимулируют секрецию инсулина и гормона роста (Ricci-Cabello et al, 2012).

Низкомолекулярные пептиды распространяются по мышцам, вызывая сильный инсулинотропный эффект, восполняют энергетические запасы организма, обогащают мышцы аминокислотами и усиливают синтез мышечного белка. Между аминокислотами как, валин, лейцин, глутамин эта разница очень существенная. Низкомолекулярные микрофракции сывороточных белков – гликомакропептиды, уменьшают возможность

возникновения вирусных инфекций, улучшают пищеварение, усвоение белка и кальция, способствуют развитию нормальной микрофлоры кишечника (Caldow et al, 2015).

Неравномерный распад белков под действием протеаз посторонних микроорганизмов, в том числе и гнилостных в сыром молоке, является причиной образования разных субстанций с характерным запахом и вкусом. Свободные аминокислоты участвуют в ферментации, результатом которой являются реакции их дезаминирования, переаминирования, декарбоксилирования и др. с образованием кетокислот, оксикислот, карбоновых кислот и альдегидов (Nagi et al, 2013).

Глубокий распад белков молока, вызываемый посторонней микрофлорой, приводит к образованию свободных аминокислот, которые также могут влиять на органолептические свойства молока. Например, глицин, аланин, серин, пролин имеют сладкий вкус; аргинин, гистидин, лейцин и триптофан – горький; валин, треонин, фенилаланин – сладко-горький; глутаминовая и аспарагиновая кислоты – кислый; цистин и метионин – сернистый (Горбатова и Гунькова, 2012).

Кроме того, аминокислоты в свободной форме соперничают между собой за аминокислотные каналы, а большие дозы свободных аминокислот вызывают расстройства желудочно-кишечного тракта (Hall et al, 2003).

На качество коровьего молока, на его питательную и биологическую ценность, влияют не только порода, условия кормления и содержания животных. Известно, что у молочных коров, инфицированных вирусом энзоотического лейкоза крупного рогатого скот, в большинстве случаев, удои снижаются на 13,3-15,5 %, а количество соматических клеток в молоке составляет $4,9-5,2 \times 10^5$ на 1 см^3 (Yang et al, 2016; Norby et al, 2016). По данным Закрепиной Е.Н. (2001), у инфицированных лейкозом коров удои молока снижаются 2-7,0 %, а у больных – на 5,4-10,2 % (Кузин и Закрепина, 1999). Некоторые исследователи даже сообщают о более значительном снижении удоев молока у больных коров - на 24,6 % (Семенова, 1975).

Содержания железа и ферритина в молоке *BLV*-инфицированных коров снижается, а уровень сывороточного ферритина, напротив, возрастает, что является провокатором злокачественных и воспалительных заболеваний (Кузин и Закрепина 1996, 1997; Schnell et al, 2015).

BLV-инфекция снижает общее состояние организма животного, но и угнетает иммунитет, на уровне молочной железы. Это выражается в снижении эффективности фагоцитоза, следствием чего является высокая бактериальная обсемененность такого молока, до $2 \times 10^7 \pm 4 \times 10^2$ КОЕ/мл (Красникова и др, 2015). Так, экспрессия нейтрофилами CD44 и доля апоптических В-клеток значительно ниже в молоке *BLV*-инфицированных молочных коров, особенно у животных с персистирующим лимфоцитозом (Della Libera et al, 2015).

Анализ молока инфицированных ВЭЛ КРС коров показывает снижение, как общего белка до 3,14 % (Семенова, 1975; Думбур, 1985), так и количества аминокислот, в том числе пяти незаменимых (изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана) (Думбур, 1990). Согласно данным К.Ф. Думбур (1990) и Кузана (1995), количественные показатели аминокислот в молоке коров в развернутой и конечной стадиях лейкоза понижаются по сравнению с начальным периодом болезни, а количество аминокислот в сыворотке молока колеблется в зависимости от характера развития инфекционного процесса. Некоторые исследователи указывают на снижение содержания белка в молоке больных лейкозом коров на 16,8 % по сравнению со здоровыми животными (Снежков и др, 1991). Жирность молока у инфицированных лейкозом коров увеличивается в среднем на 0,24-1,8 % (Закрепина, 2001) и на 4,2% (Семенова, 1975) по сравнению со здоровыми.

По мнению Закрепиной Е.Н. (2001), при биохимическом исследовании молока инфицированных и больных лейкозом коров установлено снижение показателей общего белка и суммы аминокислот, в их числе пяти незаменимых (изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, триптофан). В

сыворотке крови указанных животных также выявлено достоверное уменьшение уровня общего белка, трех незаменимых аминокислот (лейцин, метионин, фенилаланин) и восьми заменимых. При этом в сыворотки больных коров показатели четырех других аминокислот (лейцин, метионин, пролин, тирозин) увеличивались по сравнению со здоровыми животными. Также Закрепиной Е.Н. (2001) была выявлена прямая корреляционная связь сыворотки крови и молока, инфицированных лейкозом коров, по следующим аминокислотам: валину, триптофану (средняя степень), лейцину, лизину, треонину, аргинину (слабая степень), а обратная корреляционная связь была отмечена по содержанию пролина (средняя степень), фенилаланина, аспарагиновой кислоты, глицина, гистидина, глутаминовой кислоты, серина. В то время как у больных лейкозом коров наблюдается прямая корреляционная связь между показателями сыворотки крови и молока по глицину, тирозину (средняя степень), метионину, фенилаланину, треонину, аланину, аспарагиновой кислоте, гистидину (слабая степень) и обратная корреляционная - по содержанию валина, пролина (средняя степень), изолейцина, глутаминовой кислоты (слабая степень).

Однако есть и другое мнение о том, что отличий в процентном содержании жира в молоке больных и здоровых коров нет (Снежков и др, 1990, 1991).

Что касается исследований по качеству мяса и молока, полученных от инфицированных вирусом иммунодефицита коров и от животных с ретровирусной коинфекцией, также, как и влияния инфекции на технологические свойства молока, таковые в центральной печати отсутствуют.

2.1.4 Индикация возбудителей ретровирусных инфекций крупного рогатого скота в объектах ветеринарного надзора

Вирусы иммунодефицита и лейкемии разрушают клетки крови, а именно - центральное звено иммунной системы, лимфоциты. Вирус иммунодефицита превращает лимфоциты в фабрики по клонированию вирусных частиц, а вирус лейкоза изменяет эти клетки в атипичные опухолевые (English et al, 1993; Roelke et al, 2006; Major et al, 2010). В результате поражается иммунитет: снижается фагоцитоз на тканевом уровне и не образуются антитела для гуморальной защиты организма. Вследствие чего снижаются адаптивные возможности организма, специфическая и неспецифическая резистентность, что неизбежно приводит к развитию патологического процесса (Perin et al, 2007; Смирнов и Гарматарова, 2014; Трофимов и др, 2016).

Клинические и гематологические методы

Сведения о влиянии *BIV* на общее состояние здоровья животных весьма отрывочны и разрознены. *BIV* связывают с некоторыми изменениями в организме животных, такими как лимфаденопатия, лимфоцитоз, поражения центральной нервной системы и развитие прогрессирующей слабости (Carpenter et al, 1992; Van Der Maaten et al, 1972), снижением лимфоцитарного ответа (Martin et al, 1991), а также с уменьшением удоев у коров (McNab et al, 1994). Функциональные нарушения лимфоцитов могут наблюдаться на ранних стадиях инфекции, и до появления явной клинической картины заболевания (Zhang et al, 2014). Есть сообщения о развитии паралитического синдрома крупного рогатого скота при *BIV* инфекции, проявляющееся лейкоцитозом, лимфоцитопенией и моноцитопенией. Основными клиническими признаками паралитического синдрома КРС являются трудности в локомоции, влияющие на задние конечности, гипоалгезия задних ног, происходит паралич задних конечностей и смерть в течение от 72 до 96 часов после развития адинамии.

От 12 до 66 % случаев *BIV*-инфекции КРС сопровождается паралитическим синдромом (Walder et al, 1995). Исследования показывают, *BIV* ведет к изменению в иммунной системе у животных, что способствует возникновению вторичной инфекции (Carpenter et al, 1992; Абакин и Криворучко, 2013).

Свидетельством того, что *BIV* инфекция - причина развития иммунодефицитного состояния у крупного рогатого скота, получены при длительном исследовании (более 7 лет) в университете штата Луизиана на молочном стаде, в котором *BIV* имел высокую распространенность. В стаде большое количество коров страдало энцефалитом, что было причиной развития депрессии и ступора, а также изменением иммунной системы, приводящим к вторичным бактериальным инфекциям и хроническим воспалительным поражениям (Snider et al, 1996).

В ряде исследований, экспериментальная *BIV*-инфекция телят сопровождалась временным лимфоцитозом и лимфаденопатией без каких-либо явных клинических признаков (Carpenter et al, 1992; Onuma et al, 1992; Suarez et al, 1995). Данные по иммунной дисфункции экспериментально зараженных штаммом R29 *BIV* животных, свидетельствуют, что *BIV*-инфекция КРС снижает ответную реакцию различных важных функций моноцитов без изменения CD4/CD8 соотношения (Onuma et al, 1992). В другом важном исследовании Zhang и соавторы (1997) наблюдали уменьшение CD4/CD8 соотношения и возросшую пролиферацию лимфоцитов через 2-6 недель после заражения телят *BIV*, что свидетельствует о дисфункции иммунной системы у этих телят. Также было отмечено снижение иммунного ответа при вакцинации *BIV*-инфицированных телят вакцинами против вируса бычьего герпеса и вирусной диареи, по сравнению с неинфицированными телятами (Zhang et al, 1997).

По данным S Carpenter et al. (1992) у телят, искусственно зараженных *BIV* R 29 штаммом и *BIV* 106 изолятом, через 5-15 дней в крови обнаруживалась нейтропения, которая усугублялась через 4 недели после

заражения. R. Walder et al. (2001) в своих исследованиях показали иммунологические дисфункции Т-и В-клеток при заражении кроликов *BLV*.

Бычий лейкоз делится на два типа: спорадический лейкоз КРС: SBL, характеризуемый Т - клеточным лейкозом (Freick et al, 2016) и энзоотический лейкоз КРС: EBL, характеризующийся В-клеточным лейкозом (Ishiguro et al, 1994; Kettmann & Burny, 1994). Показано, что EBL гораздо чаще регистрируется среди КРС, чем SBL (Onuma et al, 1990). Лейкозы характеризуются длительным латентным периодом, во время которого в крови выявляют ВЛ КРС и антитела к нему. При экспериментальном заражении этот период длится 60 -750 дней, а при спонтанном от 2 до 6 лет (Симонян, 1995). По некоторым данным, средний инкубационный период при *BLV*-инфекции составляет 7 лет, при этом клинические признаки заболевания развиваются только у 1,2-1,6 % инфицированных животных (Tsutsui et al, 2016). *BLV*-инфекция часто протекает бессимптомно и во многих случаях, зараженные животные остаются носителями вируса на всю жизнь без проявления признаков инфекции (Gillet et al, 2007; Burny et al, 1988; Рожков и др, 2016). У 30 % больного крупного рогатого скота развивается лимфоцитоз, который характеризуется постоянным и относительно стабильным увеличением числа В - лимфоцитов в периферической крови, в то время как в лимфомы развиваются менее чем у 5 % инфицированных коров (Schwartz et al, 2013; Трофимов, 2013). *BLV* инфекция животных сопровождается снижением производства молока, в большинстве случаев (Norby et al, 2016; Schnell et al 2015).

Клинические признаки *BLV* –инфекции зависят от пораженного органа: анорексия, депрессия, снижение продуктивности, увеличение поверхностных лимфатических узлов и лимфоцитоз являются наиболее характерными проявлениями EBL (Angelo's & Thurmond, 2015; Garry, 2008; Sakamoto et al, 2009). Окончательный диагноз *BLV* подтверждают при обнаружении злокачественных образований в увеличенных поверхностных лимфоузлах или при наличии неопластических лимфоцитов в периферической крови

животных с лимфоцитозом (Garry, 2008; Смирнов, 2017). Патологические лимфоциты (лимфобласты) выявляют в среднем в 10 % клинических случаев лейкоза КРС (Burton et al, 2010). Часто бывает трудно диагностировать начало *BLV* (Tagawa et al, 2008). Выявлены случаи, когда у *BLV*-положительных коров не наблюдалось изменений в лимфоузлах, наблюдали лихорадку, кашель, одышку, затрудненное дыхание, увеличение количества белых кровяных телец (12900 - 13400/ мкл) и небольшой лимфоцитоз (6579 - 9916 / мкл), хотя атипичные лимфоциты в мазке крови не были идентифицированы (Miura et al, 2015).

При изучении гемобластозов установлено, что у крупного рогатого скота наиболее часто встречаются две группы - лимфоидные лейкозы и лимфосаркомы. Лимфоидные лейкозы у КРС подразделяют на две основные группы - острые и хронические. В основе этого подразделения лежит строение опухолевых клеток. К острым инфекциям отнесены лейкозы, клеточный субстрат которых представлен бластами, а к хроническим - те лейкозы, где основная масса опухолевых клеток дифференцирована и состоит в основном из зрелых элементов. Продолжительность заболевания не влияет на определение формы как острой или хронической. Лимфоидный лейкоз у крупного рогатого скота проходит хронически, а реже всего – сопровождается эозинофильными реакциями (Sinha, 2016; Бурба и др, 1988; Симонян, 1995, 2011). Гематологического метод диагностики лейкоза КРС позволяет различать лейкемическую, сублейкемическую и алейкемическую формы лейкоза (Крикун, 1999).

Следует иметь в виду, что при лимфосаркомах и лимфогранулематозе исследования крови имеют меньшую ценность, так как опухолевый процесс может развиваться алейкемически и с лейкемизацией на последней стадии развития патологического процесса.

Серологические методы диагностики BIV - BLV-инфекций

Серологические тесты, направленные на обнаружение антител в сыворотке крови животного, характеризуются эффективностью, как правило, намного ниже 100 %, что особенно важно для регионов с низкой распространенностью заболевания. Любой положительный результат на территориях с низкой распространенностью вируса должен быть подтвержден, например, Вестерн-блоттингом или полимеразной цепной реакцией (ПЦР), позволяющими выявлять вирусные антигены (Jarrett et al, 1992; Шкуратова и др, 2014).

У латентно инфицированных животных в течение нескольких недель и даже месяцев, могут быть получены ложные отрицательные результаты серологических исследований. Кроме того, ложноотрицательные результаты могут быть получены также в терминальной стадии заболевания и могут быть связаны с иммунодефицитом или высокой вирусной нагрузкой, так как может произойти секвестрация антител (Kipar et al, 2004).

Телята от больных матерей могут быть серопозитивными в результате пассивно приобретенных материнских антител. В таких случаях они должны быть повторно исследованы в 16-недельном возрасте, когда уровень колостральных антител снизится до порогового. Однако в редких случаях антитела могут сохраняться до 6-месячного возраста (Levy et al, 2003).

Для серологических исследований на вирусный иммунодефицит КРС, до 1999 г в качестве модели для получения антител к антигенам *BIV*, наиболее широко использовался *BIV* P-29 изолят (Ambroski et al, 1989; Black, 1990; Cockerell et al, 1992; Horner, 1991; Horzinek et al, 1991; Whetstone et al, 1990). Затем было высказано предположение, что использование антигенов исключительно *BIV* R-29 для серологического скрининга, может быть не эффективно для животных, инфицированных серологически различными вариантами *BIV* (Battles et al, 1992; Garvey et al, 1990). Использование рекомбинантных вирусных белков вместо нативных вирусных белков облегчило задачу по изучению серологического статуса при *BIV* инфекции

(Betemps et al, 1999; Zheng et al, 2000). Для серологической диагностики *BIV* был использован непрямой ИФА на основе рекомбинантного белка капсида *BIV* (Abed et al, 1999; Zheng et al, 2000) и бакуловирус-экспрессированного трансмембранного протеина (Abed et al, 2000) для выполнения Вестерн-блот анализа и непрямого ИФА с целью выявления сывороточных антител к *BIV* (Zheng et al, 2000). В Индии непрямой ИФА на основе рекомбинантного капсидного белка (p26) использовали для тестирования сыворотки КРС и буйволов для проведения серологического надзора за *BIV* инфекцией (Bhatia et al, 2006). Имеются сообщения о получении моноклональных антител и рекомбинантных антител к капсидному белку (Bhatia et al, 2008; Bhatia et al, 2010). Моноклональные антитела к *BIV* p26 антигену и рекомбинантный капсидный белок использовали для постановки Вестерн-блота и при выявлении репликации *BIV* в культуре клеток (Wannmuehler et al, 1993).

Поскольку у многих зараженных вирусом лейкоза коров развиваются специфические антитела (Lucas et al, 1992), многие из диагностических тестов для выявления *BLV*-инфекции основаны на выявлении антител в молоке или в сыворотке крови от животных старше 6 месяцев (Шкуратова и др, 2014; Донник и др, 2014, 2015, Смирнов, 2015). Специфические антитела появляются в крови крупного рогатого скота через 2 месяца после заражения вирусом лейкоза и сохраняются пожизненно. Антитела в сыворотке крови больных животных обнаруживаются значительно раньше, чем появляются гематологические изменения болезни. В настоящее время выявление больных ВЛ КРС животных осуществляется на основании результатов серологических тестов, таких как реакция иммунодиффузии в геле агара (РИД) и реакция связывания комплемента (РСК) (Абакин и Криворучко, 2012; Донник и др, 2014), реакция иммунофлуоресценции (РИФ) и радиоиммунный анализ (РИА) (Mammerickx et al, 1987), иммуноферментный анализ (ИФА) (Beier & Siakkou, 1994). Все перечисленные методы направлены на выявление антител одного из двух структурных белков ВЛ КРС - p24 и q51. Наиболее часто используемые серологические тесты – это

РИД (Miller & Van der Maaten, 1977; Смирнов, 2007) и ИФА (Klintevall et al, 1991; Rosskopf et al, 1994; Смирнов, 2015).

Серологические реакции на лейкоз часто дают недостоверный результат и в положительных пробах наличие вируса и провируса не подтверждается. Так, было установлено, что при исследовании сыворотки крови РИД выдает 26,4 %, а ИФА – 2,7-4,9 % ложноположительных результатов (Monti et al, 2005). Ложноположительная серодиагностика лейкоза КРС была зафиксирована и при исследовании молозива коров: в 28,6 % случаев наличие противолейкозных антител было показано в молозиве здоровых коров (Choudhury et al, 2015). Ложноотрицательные результаты часто получают при серологической диагностике лейкоза КРС с применением ИФА, РПГА (реакции пассивной гемагглютинации) или иммунодиффузии в агарозном геле (РИД) (Jimba et al, 2012).

Молекулярно-генетическая диагностика ретровирусных инфекций крупного рогатого скота

Диагностика *BIV* с помощью ПЦР считается надежным методом для обнаружения больного КРС (Смирнов, 2007; Красникова, 2011). Высоко чувствительные способы диагностики методом ПЦР были разработаны для выявления ДНК провируса *BIV* в моноклеарных клетках крови (Nadin-Davis et al, 1993; Suarez et al, 1995; Zhang et al, 1997). Популярна гнездная ПЦР для определения консервативных областей в генах *pol* и *gag BIV*, и было показано, что она обладает большей чувствительностью по сравнению с серологическими и вирусологическими методами (Suarez et al, 1995; Brujeni et al, 2010). Исследователи установили, что нет золотого стандарта для тестирования *BIV* в настоящее время (Suarez et al, 1997). Разные праймеры устанавливают различную чувствительность и специфичность, что связывают с высокой изменчивостью *BIV* (Gradil et al, 1999). В Индии, праймеры, специфичные для области *gag BIV* генома, были использованы для обнаружения *BIV* не только в крови, но и в пробах молока (Patil et al, 2003).

Успешно применяют классическую ПЦР для изучения эпизоотологии биологии *BIV* и в России (Колотвин, 2007, 2009; Красникова и др, 2015, 2016).

Классическую ПЦР довольно часто используют для постановки диагноза на лейкоз КРС (Mohammadabadi et al, 2011; Красникова, 2012). Для сомнительно реагирующих в ИФА животных использовали гнездную ПЦР для подтверждения диагноза на лейкоз КРС, а ПЦР в реальном времени показала чувствительность на 7,8 % выше, чем классическая ПЦР (Rola-Łuszczak et al, 2013) Количественную ПЦР в реальном времени использовали для выявления вирусной нагрузки при *BLV*-инфекции скота, что позволяет судить о прогрессировании заболевания (Jimba et al, 2012). С помощью ПЦР есть возможность выявить фрагменты генома *BLV* в образцах крови уже через 1-2 недели после заражения (Гинзбург, 1999; Прохвятилова и др, 2001; Комарова, 2005). Для диагностики лейкоза КРС был сформирован метод опосредованной изотермической амплификации (LAMP). Его чувствительность составила 2 копии провирусной ДНК в образце (2 мкл), что эквивалентно чувствительности классической ПЦР. При этом результат достигался менее чем за 1 ч инкубации пробирки на водяной бане. Анализ методом LAMP позволял обнаруживать лейкоз у КРС на ранней стадии инфекции, когда серологические тесты были не эффективны (Komiyama et al, 2009).

Вирусологические методы исследования

В качестве лабораторных животных для воспроизведения *BIV*-инфекции использовали кроликов. Доказано, что патоморфологические изменения у *BIV*-инфицированных кроликов характеризуются спленомегалией и поражением легких, гистологические изменения проявляются во всех органах и тканях есть дистрофические изменения и пролиферацией лимфоидных элементов. Однако инфекция не всегда является

смертельной для кроликов, а характерные изменения в органах выявляют у 33-66 % зараженных животных (Бурба, 2009).

Поэтому для культивирования вируса иммунодефицита КРС применяют культуры клеток. *BIV* реплицируется в клетках селезенки плода крупного рогатого скота, легких, тимуса, тестикул, почки (Gonda et al, 1987). *BIV* может заражать диплоидные и анеуплоидные клетки собаки, хорька и овцы (Bou-illant et al, 1989; Florins et al, 2012), селезенки кролика (St-Louis et al, 2005) и при этом образует синцитий (Onuma et al, 1990). *BIV* культивируют в диплоидных и анеуплоидных клетках крупного рогатого скота, собак, хорьков и овец. За исключением бычьей диплоидной и собачьей анеуплоидной (Cf2Th) клеточных линии, все остальные линии могут оказаться вирус-непродуктивными либо малопродуктивными. *BIV*-продуктивная инфекция с титром $1 \times 10^6/0,1$ мл наблюдалась в стационарной культуре и с титром $1 \times 10^{10}/0,1$ мл - в суспензионной культуре Cf2Th. Поэтому Cf2Th используют для производства *BIV* антигенов (Bouillant et al, 1989).

BLV-можно выращивать в клеточных клонах естественно восприимчивых клеток, таких как CD8+ Т- моноциты, лимфоциты, гранулоциты (Schwartz et al, 1994; Domenech et al, 2000). Кроме того, *BLV* способен заражать широкий диапазон разнообразных клеток, таких как фетальные клетки почки ягненка (FLK), кошачьи фибробласты (CC81), клетки бычьей почки (MDBK), почки хомячка (ВНК), и человеческие эпителиальные клетки рака шейки матки (HeLa) (Graves & Ferrer, 1976; Ferrer et al, 1981; Altaner et al, 1989; Inabe et al, 1998). Таким образом, специфичность рецепторов *BLV* не ограничивается конкретной популяцией клеток.

В естественных условиях в организме *BLV* выявляют не только в клетках крови, но также в лимфоцитах тимуса, в эпителиальных клетках печени и почек (Duncan et al, 2005) и в эпителиальных клетках молочной железы, где есть явные признаки экспрессии вирусных антигенов (Buehring,

2003). Это подтверждает то, что *BLV* имеет широкий клеточный тропизм, чем было установлено ранее.

Хотя КРС является естественным резервуаром для *BLV*, экспериментальное заражение многих видов животных показало положительный результат. В частности, козы (Opuma et al, 1990), крысы (Boris-Lawrie et al, 1997), куры (Altanerova et al, 1989), свиньи (Mammerickx et al, 1981) и кролики (Olson et al, 1981) оказались восприимчивыми к *BLV*. При инфицировании, как самим вирусом, так и *BLV*-зараженным лимфоцитом, у кроликов проявляется синдром, сходный с иммунодефицитом, и они умирают через год после инфицирования (<http://meduniver.com/Medical/Microbiology/1032.html>). Экспериментальная инфекция свиней, шимпанзе, кроликов и кошек характеризуется не только появлением специфических противолейкозных антител, но развитием патологических изменений специфичных для лейкоза (Ressang et al, 1976; Brandon et al, 1991; Kabeya et al, 2001).

Для обнаружения вирусов, лимфоциты периферической крови, после специальной подготовки, выращивают в питательной среде (среда 199) в сыворотки крови крупного рогатого скота (10 %). В сыворотке содержатся ростовые факторы, которые вызывают пролиферацию лимфоцитов (Коромыслов и др, 1993). Репродукция вируса выражается на фоне пролиферации. Культивируют вирусосодержащий материал на клеточных культурах в течение 2-3 недель. Обнаруживают вирусные антигены методом иммуноблота, ПЦР, а также сканирующей или электронной зондовой микроскопии (Thomas et al, 1993).

Патоморфологическая диагностика

В литературе небольшое количество информации патоморфологических изменениях при *BIV*-инфекции. У экспериментально больных вирусом бычьего иммунодефицита телят были изучены ранние патогенные эффекты *BIV*. Все животные были инокулированы клетками,

инфицированными штаммом *BIV* R29. Период сероконверсии при этом составлял 2-6 недель после инокуляции. Уровень репликации *BIV* в естественных условиях оказался низким. Тестирования лимфоцитов крови телят методом показали, что в пиковые периоды репликации вируса *in vivo*, менее 0,03 % мононуклеарных клеток периферической крови содержали детектируемые уровни вирусной РНК. Тем не менее, у *BIV*-зараженных телят значительно увеличилось число циркулирующих лимфоцитов, а в гемалимфоузлах, лимфатических узлах, и селезенке была зафиксирована фолликулярная гиперплазия. Гистопатологические проявления, наблюдаемые у *BIV*-инфицированных телят, были аналогичны изменениям, обнаруживаемых в ранние сроки после заражения другими иммуносупрессирующими лентивирусами, в том числе *HIV* 1-го типа. (Carpenter et al, 1992).

При лейкозе КРС, патологоанатомические и гистологические изменения при этой болезни достаточно изучены и описаны, так как патоморфологические признаки играют главную роль в постановке диагноза на лейкоз. В ранний период развития болезни не наблюдают макроскопических изменений в лимфоузлах, висцеральных органах и костном мозге. Исключение составляют нижнечелюстные, заглоточные и поверхностные шейные лимфоузлы, в них при осмотре можно выявить беловато-сероватые образования не правильной формы. При этом рисунок лимфоузлов на срезе слегка стерт (Федоров, 1969; Кудрявцева, 1974, 1980; Таджибаев, 1984). У некоторых животных в печени обнаруживают лимфоидные и лимфоидно-гистиоцитарные инфильтраты. Изменения в других органах и тканях обычно отсутствуют (Watanabe et al, 1999; Шипицын и Схабун, 2005).

Стадия выраженных клинико-анатомических изменений проявляется увеличением селезенки и некоторых поверхностных и внутренних лимфоузлов. Некоторые из них приобретают тестоватую консистенцию. Капсула селезенки напряжена, красная пульпа мажущейся консистенции,

наблюдают увеличение фолликулов серо-белого цвета (Меньшикова и др, 2004; Сноз, 1987, 1994). Выявляют саловидные разрастания во внутренних органах (печень, сердце, кишечник, почки, преджелудки, и др.). Гистологические исследования лимфоузлов обнаруживают сглаживание рисунка и расширение фолликулов (Кудрявцева, 1986; Лазарев, 1990).

В стадии прогрессирования опухолевых поражений в процесс вовлечены все внутренние органы, нарушается гистологическая структура лимфоузлов. Они образуют скопления в средостении, брюшной и паховой областях. В крайне тяжелых случаях увеличивается не только селезенка, но и печень и почки, а в сердце есть разрастания серо-белого цвета. При гистологическом исследовании в лимфоузлах корковое и мозговое вещество не различимы, лимфоциты, заполняющие синусы, инфильтрируют капсулу и трабекулы (Смирнова, 1993; Винокурова, 2000). Кроме того, регистрируют выраженные дистрофические проявления в костной ткани, паренхиматозных органах. Костный мозг инфильтрирован лимфоцитами (Wittmann et al, 1969; Mammerickx et al, 1980; Straub al, 1984).

При лимфосаркоме болезнь проявляется хронически, без клинических признаков в течение нескольких лет и выражается очаговым поражением органов и тканей с переходом в генерализованный процесс (Marbaix et al, 1982; Кудалева, 1991). Лимфосаркома, как правило, проявляется отсутствием макроскопических изменений в селезенке и в большинстве лимфатических узлов. При прогрессировании заболевания опухолевые разрастания есть в молочной железе, сердце, легких, кишечнике, вокруг сетки и почек, в сычуге, скелетной мускулатуре (Van der Maaten & Miller, 1978). В полостях тела под плеврой и брюшиной отмечают диффузные новообразования желто-белого или бело-серого цвета. При гистологическом исследовании наблюдали исчезновения фолликулов селезенки и лимфоузлов (Бурба и Кунаков, 1983; Салимов, 1986).

2.2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.2.1 Материалы и методы исследований

Работа выполнена на базе структурных подразделений ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ, а также в рамках договора о НТС со ФКУЗ РосНИИПЧИ «Микроб» (Саратов).

Научно-исследовательская работа включала в себя несколько этапов:

1. Первым этапом явилось обоснование актуальности выбранного направления исследований и подбор объектов исследований, основанные на изучении эпизоотической ситуации по ретровирусным инфекциям крупного рогатого скота в Саратовской области согласно анализа официальных статистических данных и на основании результатов собственных исследований. Исследования проводили на базе НИЛ «Геном» ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ.

Материалом для витальных исследований крупного рогатого скота явились: 271 проба крови от коров из неблагополучного по лейкозу хозяйства «Ягоднополянское» Татищевского района Саратовской области; 40 проб крови от крупного рогатого скота, завезенного на территорию Саратовской области из Казахстана в подсобное хозяйство Саратовского ГАУ «Краснокутский ветеринарный техникум»; 299 проб крови от клинически здорового скота, находящегося в личной собственности граждан Саратовской области; 72 пробы цельной крови от крупного рогатого скота, завезенного из США, 15 из стран Европейского Союза (Словакия и Эстония) и 17 - от аборигенных коров, содержащихся в хозяйстве «Трудовое» Марковского района Саратовской области; 27 проб из ООО «Заря» и 32 пробы крови от крупного рогатого скота ООО «Озерное» Аткарского района Саратовской области.

Основными материалами для анализа эпизоотической обстановки по лейкозу и иммунодефициту служили сведения, предоставлены ветслужбой

хозяйств, статистические ежегодные отчётные данные Управления ветеринарии Правительства Саратовской области и результаты собственных исследований.

Наличие ДНК провирсов *BLV* и *BIV* осуществляли метом ПЦР с применением набора «Лейкоз» (ИнтерЛабСервис, Россия), по оригинальной методике (Колотвин В.В., 2007) с использованием набора ПЦР-Микс и буфера для нанесения (НПФ «Литех», Россия) и с добавлением праймеров к гену *gag BIV* (синтез ЗАО «Синтол», Россия) на оборудовании BioRad (USA) на базе НИЛ «Геном» ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. Олигонуклеотидные последовательности были синтезированы на основании исследований Колотвина В.В. Праймеры:

<i>gag</i>	1	(5'-
GTCTTCCCACATCCGTAACATCTCCT-3')	<i>gag</i>	2
		(5'-
CCCCAGGTCCCATCAACATTCATCAG-3')	<i>pol</i>	1
		(5'-
CCAGGAATTAAGGAATGTGAACACTTAACT-3')	и <i>pol</i>	2
		(5'-
CATCCTTGTGGTAGAACATTCCTACTG-3').		

Условия амплификации были адаптированы для амплификатора BioRad T 100: начальная инкубация 95 °C 2 мин.; денитурация 95 °C 20 сек., отжиг 58 °C 20 сек, элонгация 72 °C 40 сек. – 35 циклов; терминальная инкубация 72 °C 2 мин.

Для выделения и очистки нуклеиновых кислот применяли набор «ДНК Сорб В», для обратной транскрипции использовали набор «РЕВЕРТА-L», детекцию продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в 2 % агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/л этидия бромида при стандартных условиях с фоторегистрацией полученных результатов с применением набора «ЭФ» (ИнтерЛабСервис, Россия).

2. Вторым этапом исследований было определение ветеринарно-санитарных показателей и белковой ценности молока, полученного от инфицированных ретровирусами коров. Исследования проводили на кафедре «Микробиология, биотехнология и химия», а также на базе учебно-научно-испытательной «Лаборатории по определению качества пищевой и с.-х. продукции» и с применением анализатора молока Клевер-2М (Россия)

кафедры Технология производства и переработки продукции животноводства ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ.

Материалом для определения пищевой ценности и биологической безопасности молока, получаемого от *BLV* и *BIV* инфицированных коров, явились пробы цельного молока ($n=54$), полученного от молочных коров (3-7 лет), инфицированных вирусом бычьего иммунодефицита, лейкоза КРС, коров с *BLV-BIV* коинфекцией и не инфицированных ретровирусами коров.

Требования к качеству молока определяли согласно техническому регламенту Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции» ТР ТС 033/2013. Исследования выполнялись согласно ГОСТ Р 54669-2011 Молоко и продукты переработки молока. Методы определения кислотности, ГОСТ Р 52054-2003 Молоко натуральное коровье - сырье. Технические условия и ГОСТ 32901-2014 Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа.

Белковый состав коровьего молока исследовали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с предварительной пробоподготовкой на 1-й, 3-й и 6-й день хранения при +4 °С. Исследования выполнялись на системе жидкостной хроматографии «Стайер-Аквилон» с УФ детектором, снабженным колонкой Phenomenex BioSep-SEC-S2000 с размером пор 145 Å, 300x7,80 мм. Детектирование проводили при длине волны 214 нм, в качестве подвижной фазы использовали раствор, содержащий 0,025 % азида натрия и 0,1 М фосфатно-солевого буфера со скоростью потока 2 мл/мин. Исследования проводили на базе центра коллективного пользования лаборатории «Молекулярно-биологических исследований» ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. Цельное молоко в объеме 10 мл центрифугировали на 10 тыс. об/мин., при температуре +5 °С 30 мин. Отделяли верхнюю фракцию липидов и осадок. Затем в обезжиренное молоко при 37°С по каплям, при постоянном помешивании, вносили соляную кислоту до достижения рН 4,5, далее продолжали перемешивание на протяжении 30 минут. Полученный раствор центрифугировали на 5 тыс.

об/мин при температуре +25 °С на протяжении 10 минут, отделяли надосадочную фракцию и 1 М раствором натрия рН осадка доводили до 6,5.

Анализ аминокислотного состава белковых фракций молока коров выполнялся с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель 105М» на базе «НИЛ Физико-химических свойств и текстуры продуктов» ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. Методика М-04-38-2009 с изменениями №1 от 01.02.2010. Метод капиллярного электрофореза, для определения массовой доли аминокислот, основан на миграции анионных форм ФТК-производных аминокислот под действием электрического поля в кварцевом капилляре в фосфатном или боратном электролите и регистрации электрофореграммы при длине волны 254 нм. Методика предусматривает проведение анализа из трех навесок пробы, различающихся процедурой пробоподготовки, условиями электрофоретического определения и перечнем определяемых аминокислот. Все аминокислоты определяют после разложения проб кислотным или щелочным гидролизом с переводом аминокислот в свободные формы, получение фенил изотиокарбамильных производных (ФТК- производных), дальнейшем их разделении и количественном определении методом капиллярного электрофореза.

В лабораторных условиях воспроизводили три режима пастеризации: длительная (62-65 °С - 30 минут), кратковременная (80-84 °С – 40 секунд) и мгновенная (94-97 °С - мгновенно).

3. Третьим этапом наших исследований явился анализ ветеринарно-санитарных показателей кисломолочных продуктов, выработанных из проб молока инфицированных ретровирусами коров, и оценка его технологических свойств.

Кисломолочный продукт «Снежок» получали с использованием закваски на основе живых микроорганизмов по стандартной методике согласно ГОСТ 31981-2013 Йогурты. Общие технические условия. Время приготовления йогуртного напитка без компонентов с применением *Streptococcus salivarius sp. thermophiles* и *Lactobacillus deibrueskii sp.*

bulgaricus закваска «Genesis» (Genesis Laboratories, Болгария) составляет не более 6 - 8 часов при температуре 40 – 45 °С.

Творог вырабатывали согласно ГОСТ 31453-2013. Творог. Технические условия. С использованием закваски мезофильной БК-Углич-МСТ (Россия) на основе *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lac. lactis subsp. cremoris*, *Lac. lactis subsp. diacetylactis* и *Streptococcus thermophilus* методом кислотной коагуляции белков с последующим подогревом до температуры 65°С в течение 30-40 минут и удалением сыворотки.

Кефир вырабатывали согласно ГОСТ 31454-2012. Кефир. Технические условия. Для производства кефира использовали кефирную сухую закваску «Genesis» (Genesis Laboratories, Болгария). Состав: *Lactococcus lactis sp. lactis*, *Lactococcus lactis sp. cremoris*, *Lactococcus lactis sp. lactis biovar. diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides sp. cremoris*, *Streptococcus salivarius sp. thermophilus*, *Lactobacillus kefir*, *Candida kefir*, *Sacchromyces unisporus* из кефирных грибков. Концентрация микроорганизмов минимум 1×10^9 КОЕ/г.

Требования к качеству молока – сырья и выработанных из него кисломолочных продуктов определяли согласно техническому регламенту Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции» ТР ТС 033/2013. Молоко и готовые кисломолочные продукты охлаждали до +4 °С и определяли их органолептические, физико-химические и санитарно-микробиологические свойства согласно:

- ГОСТ 31981-2013 Йогурты. Общие технические условия;
- ГОСТ 31453-2013. Творог. Технические условия;
- ГОСТ 31454-2012. Кефир. Технические условия;
- ГОСТ Р 54669-2011 Молоко и продукты переработки молока. Методы определения кислотности;
- ГОСТ Р 52054-2003 Молоко натуральное коровье - сырье. Технические условия;
- ГОСТ 32901-2014 Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа;

- ГОСТ 30347-97 Молоко и молочные продукты. Методы определения *Staphylococcus aureus*;

- ГОСТ 31659-2012 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*;

- ГОСТ 10444.11-89 Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов;

- ГОСТ 33566-2015 Молоко и молочная продукция. Определение дрожжей и плесневых грибов;

- ГОСТ Р 55331-2012 Молоко и молочные продукты. Титриметрический метод определения содержания кальция.

Титруемую кислотность определяли методом титрования 1Н NaOH с применением индикатора фенолфталеина. В колбу вместимостью 100 до 250 отмеривали 10 мл анализируемого продукта, добавляли 20 мл дистиллированной воды и три капли фенолфталеина. Титровали при постоянном перемешивании раствором 1Н щелочи до появления слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин. Кислотность, в градусах Тернера (°Т), находили умножением объема, раствора гидроокиси натрия на коэффициент 10.

Для определения количества молочнокислых микроорганизмов в готовом продукте, из кисломолочных продуктов готовили десятикратные разведения на стерильном физиологическом растворе. По 1 мл из каждого разведения высевали на среду «Лактобакагар» (ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск, Россия). Культивировали при 37 °С, рост просматривали через 24 и 48 часов. Подсчитывали количество характерных колоний, готовили из них мазки, окрашенные методом Грама.

При определении показателя БГКП, по три пробирки с 10 мл жидкой обогатительной среды Кеслера инокулировали 0,1 мл каждой из исследуемых проб и по три пробирки с 10 мл жидкой обогатительной среды Кеслера инокулировали 0,1 мл разведения 1:10 каждой из проб. Посевы в пробирках со средой Кеслера инкубировали при 37 °С, учет осуществляли через 24 и 48

часов. О присутствии БГКП в пробирке судили по наличию газообразования и помутнения. Для этого пробирку встряхивали и просматривали на свету.

Для определения сальмонелл, 25 мл каждой из проб кисломолочных продуктов вносили во флакон с 225 мл селенитового бульона. Содержимое перемешивали встряхиванием и термостатировали при 37°C 24 часа. Затем из каждого флакона со средой обогащения делали высев петлей на среду Эндо и термостатировали при 37 °С 24 ч. На среде Эндо бактерии из рода сальмонелл образуют бесцветные или с розовым оттенком колонии, в мазках обнаруживают грамотрицательные палочки. Изолированные колонии (не менее 5), характерные для бактерий из рода сальмонелл, пересеивали на трехсахарный агар Олькеницкого штрихом по скошенной поверхности и уколом в столбик и инкубировали при 37 °С в течение 12 - 16 часов. При росте сальмонелл цвет скошенной поверхности среды Олькеницкого розовый, столбик желто-бурый. Газообразование устанавливают по наличию трещин и разрыву столбика агара, при образовании сероводорода отмечают потемнение столбика.

Для определения золотистого стафилококка по 1 мл каждой пробы готового кисломолочного продукта вносили в 10 мл на 10 мл среды обогащения - соляного бульона. Содержимое перемешивали встряхиванием и термостатировали при 37 °С 24 часа. Затем из каждой пробирки со средой обогащения делали высев петлей на дифференциально-диагностическую среду – желточно-солевой агар. Чашки с посевами выдерживали в термостате при температуре 37 °С в течение 24-48 часов. На желточно-солевом агаре колонии *Staphylococcus aureus* имеют форму плоских дисков диаметром 2-4 мм белого, желтого, кремового, лимонного, золотистого цвета с ровными краями; вокруг колоний образуется радужное кольцо и зона помутнения среды. С каждой чашки Петри отбирали по пять характерных колоний и пересеивали на поверхность скошенного МПА. Посевы выдерживали в термостате при температуре 37 °С в течение 24 часов. У выросших культур определяли отношение к окраске по Граму и коагулированию плазмы

кролика. Коагулазоположительные грамположительные кокки, расположенные в мазке в виде гроздей винограда, относили к роду *Staphylococcus aureus*.

Для определения дрожжей и плесневых грибов, по 1 мл разведений 1×10^3 и 1×10^4 каждой пробы готового кисломолочного продукта высевали газоном на среду Сабуро с антибиотиком. Чашки с посевами инкубировали при 24 °С 5 суток. на плотных питательных средах дрожжи образуют гладкие выпуклые блестящие серо-белые или желтого (красного) оттенков колонии сметанообразной консистенции с ровным краем. Плесневые гриба на среде Сабуро образуют разноцветные колонии с пушистым воздушным мицелием. Расчет количества микроскопических грибов КОЕ/мл (N) проводят по формуле:

$$N=c/Vd, \text{ где}$$

c – количество колоний на чашке;

V – объем посевного материала;

d – коэффициент разведения материала.

Для определения содержания кальция в твороге, 20 г анализируемого продукта растворяли в трихлоруксусной кислоте, затем из фильтрата высаливали кальций щавелевокислый и растворяли его в серной кислоте. Полученный раствор титровали раствором калия марганцовокислого до появления розового окрашивания. Объем раствора марганцовокислого калия, пошедшего на титрование, учитывали с точностью до 0,01 см. Расчет относительной концентрации кальция в 100 г продукта осуществляли с учетом жирности исследуемого образца по формуле:

$$X = \frac{0,004(V - V_0)f}{m} 100, \text{ где}$$

V - объем раствора калия марганцовокислого, пошедшего на титрование анализируемой пробы продукта,

V_0 - объем раствора калия марганцовокислого, пошедшего на титрование контрольной пробы,

f - поправочный коэффициент,

m - масса анализируемой пробы продукта, г.

4. Четвертым этапом наших исследований стала разработка способов молекулярно-генетической детекции возбудителей иммунодефицита и лейкоза крупного рогатого скота. Исследования проводили в НИЛ «Геном» ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ и в Центре индикации и диагностики возбудителей опасных инфекционных болезней РосНИПЧИ «Микроб».

Материалом для исследований послужили пробы периферической крови инфицированных ретровирусами коров.

Анализ вирусных геномов *BLV* и *BIV* осуществляли методами компьютерного моделирования с помощью программы BLAST 2 sequences и BLAST Conserved Domains.

Праймеры подбирали с применением компьютерной программы GENERUNNR Version 3.00 (Hasting Software, Inc) и на основании литературных источников. Проверку качества и термодинамический анализ выбранных праймеров выполняли с помощью программы OLIGO DNA/RNA primer analysis software, v.5.0 и BLAST (USA).

Отработку условий амплификации осуществляли на амплификаторах BioRad T 100 (США) и Rotor-Gene™ 6000 (Австралия).

Все показатели, полученные в результате проведения научно-исследовательской деятельности, вычислялись, как среднестатистические в повторных экспериментах. Статистическую значимость различий оценивали на основе U-критерия Манна-Уитни, за значимые принимали различия на уровне значимости 95 % ($p < 0,05$).

Научно исследовательская работа выполнялась в соответствии с нижеприведенной схемой:

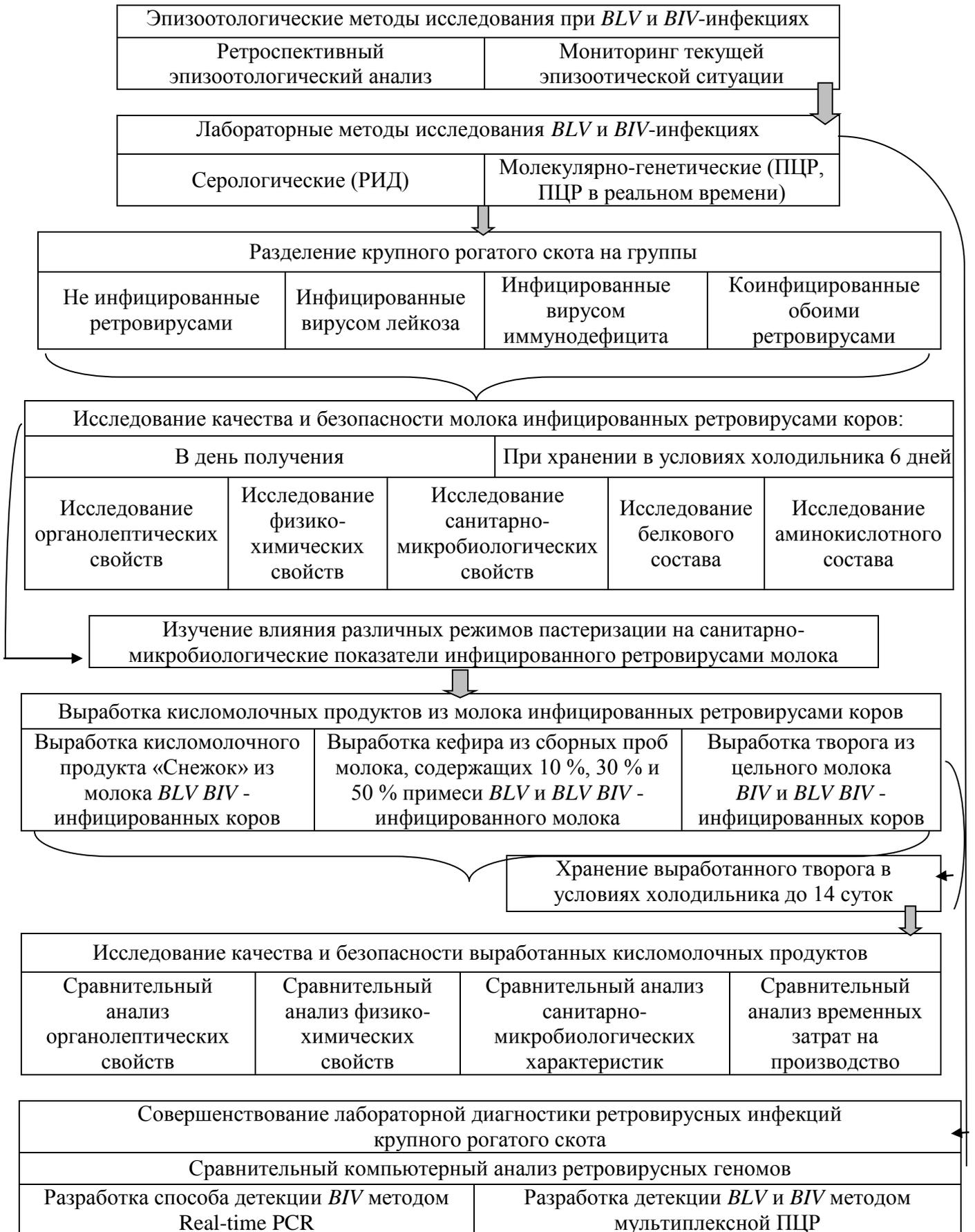


Рисунок 1 - Схема проведения исследований.

2.2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.2.1 Распространение ретровирусных инфекций крупного рогатого скота в Саратовской области

Ретроспективный анализ официальных данных Департамента ветеринарии Министерства сельского хозяйства Российской Федерации за последние 7 лет показал, что несмотря на тенденцию снижения общего количества больных и зараженных вирусом энзоотического лейкоза крупного рогатого скота (ЭЛ КРС) животных, отмечается рост неблагополучных по этому заболеванию пунктов. При этом 35 % неблагополучных пунктов расположены на территории Приволжского, Центрального и Северо - Кавказского Федеральных округов. Саратовская область, являющаяся частью Приволжского Федерального округа, также относится к неблагополучным по лейкозу КРС территориям.

Лейкоз крупного рогатого скота включен в перечень болезней, подлежащих обязательному эпизоотическому контролю. Основу диагностики лейкоза крупного рогатого скота в Саратовской области в настоящий момент составляет серологический метод исследования – РИД, позволяющий выявить животных, зараженных вирусом лейкоза КРС, по наличию в крови специфических антител. После двухкратных скрининговых серологических исследований на лейкоз в течение года, из положительно реагирующих в РИД животных с помощью гематологического метода выявляют больных лейкозом.

На территории Саратовской области с 2011 по 2015 гг. действовала 5-и летняя программа по борьбе с лейкозом КРС. За этот период времени удалось добиться положительной тенденции по снижению, как инфицированности, так и заболеваемости среди животных. Данные ретроспективного анализа эпизоотической ситуации на территории Саратовской области представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Результаты диагностических исследований на лейкоз КРС в хозяйствах Саратовской области в 2011-2015 г.г.

Год	Серологические исследования			Гематологические исследования		
	Исследовано в РИД всего	Выделено РИД+	% РИД+	Исследовано всего	Выделено больных	% больных
2011	470447	8312	1,77	7610	57	0,75
2012	463324	4780	1,03	7902	34	0,43
2013	478537	5102	1,06	7987	33	0,41
2014	479273	4262	0,89	8167	31	0,38
2015	481537	4483	0,90	8206	30	0,40

Как следует из данных таблицы 1, эпизоотическая ситуация по лейкозу в Саратовской области несколько улучшилась, хотя полного благополучия по заболеваемости добиться не удалось. По сведениям, полученным из Управления ветеринарии Правительства Саратовской области, на территории области в 2015 году ЭЛ КРС был зарегистрирован в 34 районах из 38. При этом уровень инфицированности составлял от 0,01 до 4 %, а заболеваемости - от 1,4 до 4 %. Таким образом, существующая система противоэпизоотических мероприятий не может обеспечить полного эпизоотического благополучия по ЭЛ КРС.

На рисунке 2 представлена результативность противолейкозных мероприятий, проведенных в 2015 году по отношению к 2016 году.



Рисунок 2 - Количество неблагополучных по лейкозу КРС пунктов на территории Саратовской области в 2015 - 2016 г.г.

Как показано на рисунке 2, на территории Саратовской области в 2016 году, при выполнении комплекса оздоровительных мероприятий, в 6 районах области было оздоровлено 9 пунктов. В 2017 году на территории области оставались действующими 9 очагов энзоотического лейкоза КРС. Средней уровень инфицированности скота сохраняется в пределах 0,9 %, а заболеваемости 0,4 %.

Вирусный иммунодефицит крупного рогатого скота не включен в перечень болезней, подлежащих обязательному эпизоотическому контролю. Эпизоотический мониторинг на зараженность животных вирусным иммунодефицитом КРС в Саратовской области проводился нами в сравнительном аспекте с распространением энзоотического лейкоза среди обследуемого поголовья.

В таблицах 2-4 отражены основные эпизоотические характеристики ретровирусных инфекций КРС при исследовании животных методом ПЦР, как с использованием собственных разработок, так и с применением коммерческих наборов. В общей сложности было исследовано 774 голов КРС черно - пёстрой, голштинской, симментальской, казахской белоголовой пород, а также помесного скота ряда районов Саратовской области.

Таблица 2 – *BLV*-носительство у КРС Саратовской области

Принадлежность	Возрастная группа животных			
	3-6 мес. <i>BLV</i> +, гол./%	7-18 мес. <i>BLV</i> +, гол./%	1.5-5 лет <i>BLV</i> +, гол./%	> 5 лет <i>BLV</i> +, гол./%
«Ягоднополянское»	13/32.5	40/50.0	38/44.7	50/75.8
«Краснокутский ветеринарный технокум»	-	-	13/65.0	15/75.0
«Озерное»	-	-	8/66.7	14/70.0
«Трудовое»:				
Местный скот	-	-	-	2/11.8
Скот из Европы	-	-	-	5/33.3
Скот из Америки	-	-	5/25.0	14/26.9
«Заря»	-	4/33.3	6/40.0	-
Частная собственность	4/10.3	8/17.0	27/26.5	42/37.8
Итого	17/21.5	52/37.4	97/38.2	142/47.2

Примечание: «-» – исследования не проводились

Как следует из таблицы 2, даже в благополучном по ВЛ КРС хозяйстве, методом ПЦР выявляются вирусоносители, не показавшие наличие в крови антител при исследовании методом РИД. В данном случае их количество составляет 11,8 % от числа исследованных животных. Среди завезенного из Европы и Америки скота, лишь 0,2 % от поголовья положительно реагировали в РИД, при проведении исследований в период карантина. Однако поданным ПЦР-исследований, инфицированность завезенного из Америки и Европы (Словакия и Эстония) скота составляла 25,0-26,9 % и 33,3 %, соответственно. Коровы, завезенные из неблагополучной по лейкозу территории Казахстана, являлись носителями вируса лейкоза КРС в 65-75 % случаев. При этом в РИД наличие антител к вирусу лейкоза было выявлено менее чем у 50 % этих животных. Результаты наших исследований свидетельствуют, что уровень инфицирования КРС лейкозом по данным ПЦР-исследований выше, чем, по сведениям, основанным на РИД-исследованиях.

Таблица 3 - *BIV*-носительство у КРС Саратовской области

Принадлежность	Возрастная группа			
	3-6 мес.	7-18 мес.	1.5-5 лет	> 5 лет
	<i>BIV</i> +, гол./%	<i>BIV</i> +, гол./%	<i>BIV</i> +, No/%	<i>BIV</i> +, гол./%
«Ягоднополянское»	5/12.5	18/22.5	8/9.4	38/57.6
«Краснокутский ветеринарный технокум»	-	-	5/25.0	13/65.0
«Озерное»	-	-	2/16.7	12/60.0
«Трудовое»:				
Местный скот	-	-	-	6/35.3
Скот из Европы	-	-	-	8/53.3
Скот из Америки	-	-	14/70.0	38/73.1
«Заря»	-	-	-	-
Частная собственность	3/7.7	6/12.8	12/11.8	48/43.2
Итого	8/10.1	24/17.3	39/15.4	163/54.1

Примечание: «-» – исследования не проводились

Как следует данных, представленных в таблице 3, у животных в индивидуальном владении вирус иммунодефицита крупного рогатого скота был обнаружен в 7,7-43,2 % случаев, завезенный из Америки и Европы скот

был инфицирована несколько выше – 35,3-73,1 %. Высокий уровень *BIV* – инфекции был зарегистрирован у КРС неблагополучных по лейкозу хозяйств – 57,6 / 60,0 / 65,0 %. Это может быть связано с более тесным контактом фермерского скота между собой, возможностью ятрогенного распространения инфекции при проведении лечебно-профилактических и диагностических мероприятиях, предрасположенностью высокопродуктивных животных к заболеванию и рядом других факторов, обусловленных особенностями приобретения, кормления и содержания животных.

Таблица 4 – *BLV-BIV*-носительство у КРС Саратовской области

Принадлежность	Группа животных			
	3-6 мес.	7-18 мес.	1.5-5 лет	> 5 лет
	<i>BLV+BIV+</i> , гол./%	<i>BLV+BIV+</i> , гол./%	<i>BLV+BIV+</i> , гол./%	<i>BLV+BIV+</i> , гол./%
	4/10.0	17/21.3	8/9.4	38/57.6
«Ягоднополянское»	-	-	4/20.0	13/65.0
«Краснокутский ветеринарный технокум»	-	-	2/16.6	10/50.0
«Трудовое»:				
Местный скот	-	-	-	2/11.8
Скот из Европы	-	-	-	4/26.7
Скот из Америки	-	-	4/20.0	13/25.0
«Заря»	-	-	-	-
Частная собственность	2/5.1	5/10.6	11/10.8	42/37.8
Итого	6/7.6	22/15.8	28/11.4	122/40.5

Примечание: «-» – исследования не проводились

Сравнительный анализ результатов исследования КРС методом ПЦР на наличие *BIV* и *BLV* – инфекции (таблица 4), свидетельствует, что микст-инфекция (обоими ретровирусами) была диагностирована у 25,2 % поголовья завозного скота. Наиболее высокий уровень коинфекции был у животных из неблагополучных по лейкозу хозяйств – 57,6 и 65 %. У молодняка микст-инфекция регистрировалась реже, чем у взрослого скота, в пределах 10-20 %.

Таким образом, ретровирусная инфекция у КРС встречается в форме микст-инфекции намного чаще, чем в форме моноинфекции, особенно в

неблагополучных по лейкозу хозяйствах. При этом даже в благополучном по лейкозу хозяйстве, методом ПЦР могут выявляться вирусоносители.

Полученные нами данные, подтверждаются результатами других исследователей, свидетельствующих о широком распространении лейкоза КРС: в США - 83,9 % (McConnel et al, 2015), в Южной Америке - от 34 до 50 % (Alfonso et al, 1998; Rama et al, 2011), в Бразилии - более 50 % (Junior et al, 2001; Del Fava & Pituco, 2004), в Турции - 48,3 % (Burgu et al., 2005).

Результаты наших исследований свидетельствуют, что от 12,7 % до 68,7 % КРС в Саратовской области инфицированы вирусом иммунодефицита КРС. Данные отечественных и зарубежных исследователей показали, что *BIV* распространён и на других территориях: в Ставропольском крае – в среднем 20 % (Криворучко, 2012), в Московском регионе – до 67 % (Колотвин, 2007), в Индии - до 24 % (Bhatia et al, 2010), в Канаде - 23,4 % (Mc Nab et al, 1994), а Корею – 33 % (Cho et al, 1999), в Турции - 12,3 % (Meas et al, 2000), в США – до 58 % (StCyr Coats et al, 1994), в Англии – 52 % (Cockerell et al, 1992).

Наши данные сопоставимы с результатами, как отечественных, так и зарубежных исследователей, которые показали, что в Ставропольском крае микст-инфекцию регистрируют у 33,1 % инфицированного ретровирусами КРС (Криворучко, 2012), а в Англии у коров в 43 % случаев иммунодефицит был ассоциирован с лейкозом КРС (Cockerell et al, 1992). Высокий уровень ретровирусной коинфекции, по нашему мнению, может быть связан с тем, что вирус иммунодефицита, возможно полученный животными трансплацентарно, ослабляет иммунную систему и способствует заражению скота вирусом лейкоза. Данный факт свидетельствует о необходимости разработки нового подхода к совершенствованию противоэпизоотических мероприятий при энзоотическом лейкозе крупного рогатого скота, с учетом вирусного иммунодефицита.

2.2.2.2 Влияние ретровирусных инфекций крупного рогатого скота на качество и безопасность коровьего молока

Согласно литературным данным, качественный и количественный состав молочного белка *BLV*-инфицированных и больных лейкозом коров изменяется в худшую сторону, по сравнению с молоком здоровых коров (Закрепина, 2001; Yang et al, 2016; Norby et al, 2016). Изменениям подвергается и молочная микрофлора, что связано с нарушением не только общего иммунитета, но и местного, на уровне молочной железы (Schnell et al, 2015; Della Libera et al, 2015).

Вирус бычьего иммунодефицита, так же, как и вирус лейкоза обладает лимфотропизмом, вызывая при этом стойкие нарушения в иммунной системе организма. В литературе нет сведений о том, как изменяется белково-аминокислотный состав молока коров при *BIV* инфекции и при *BLV-BIV*-коинфекции. В соответствии с этим изучение органолептических, физико-химических, микробиологических свойств и молекулярного состава молока *BIV* и *BLV-BIV*-инфицированных коров являет собой не только теоретический, но и практический интерес, в плане оценки биологической и сырьевой ценности такого молока.

Органолептические, физико-химические и микробиологические показатели молока коров при ретровирусной инфекции

Согласно стандартам ГОСТ Р 52054-2003 и требованиям ТР ТС 033/2013, молоко коровье питьевое должно иметь вид белой или светло-кремовой непрозрачной жидкости однородной не тягучей консистенции, без осадка и хлопьев.

Результаты сравнительного анализа органолептических показателей молока *BIV*, *BLV* и *BIV-BLV*-инфицированных и интактных коров, в день получения от них молока, представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Органолептические показатели молока инфицированных ретровирусами и интактных коров

Показатели молока	Статус животных			
	Интактные коровы (n=3)	<i>BIV</i> -инфицированные коровы (n=3)	<i>BLV</i> -инфицированные коровы (n=3)	<i>BLV-BIV</i> -инфицированные коровы (n=3)
Цвет	Белый	Белый	Светло кремовая	Светло кремовая
Запах	Ароматный, приятный	Чистый, молочный	Слабо выраженный	Слабо выраженный
Консистенция	Жидкая, однородная	Жидкая однородная	Жидкая, расслаивается при хранении	Жидкая, расслаивается при хранении
Примеси	Отсутствуют	Отсутствуют	Крошковатые	Крошковатые

Как показано в таблице 5, молоко инфицированных ретровирусами и интактных коров почти не отличалось по органолептическим свойствам в день получения. Это являет собой опасность при приемке молока на молокозаводах. Но при хранении его, происходили заметные изменения. Так, молоко *BLV* и *BLV-BIV* инфицированных коров при хранении в течение 4-5 дней в условиях холодильника или после замораживания и оттаивания расслаивалось с образованием крошковатой мягкой субстанции, сыворотки и пластинок жира. Гомогенизировать его не удавалось, даже при нагревании, так как оно сворачивалось.

Согласно стандартам ГОСТ Р 52054-2003 и требованиям ТР ТС 033/2013, молоко коровье питьевое должно иметь следующие физико-химические и микробиологические показатели идентификации: жирность не менее 2,8 %; белок не менее 2,8 %; кислотность 16- 21 °Т; СОМО не менее 8,2 %; плотность не менее 1027 кг/м³ (при температуре 20 °С); КМАФАнМ не более 5х10⁵ КОЕ /см³; содержание соматических клеток не более 7,5х10⁵ в 1 см³; БГКП (колиформы) должны отсутствовать; сальмонеллы не должны присутствовать в 25 мл молока.

Результаты изучения физико-химических и микробиологических показателей молока *BIV* и *BLV*- инфицированных коров в день получения и в динамике представлены в таблицах 6 - 7 ($M \pm \sigma$; $p < 0,05$) и на рисунках 3 - 4.

Таблица 6 - Физико-химические показатели молока инфицированных ретровирусами и интактных коров

Показатели молока	Статус животных			
	Интактные коровы (n=3)	<i>BIV</i> -инфицированные коровы (n=3)	<i>BLV</i> -инфицированные коровы (n=3)	<i>BLV-BIV</i> -инфицированные коровы (n=3)
Кислотность, °Т	17,0±1,0	19,0±1,0*	20,0±1,0*	20,0±2,0*
СОМО, %	8,7±0,2	8,2±0,3*	7,7±0,3*	7,2±0,2*
Плотность, г/см ³	1,033±0,001	1,032±0,001	1,028±0,001	1,027±0,001
Общее содержания белка, %	3,25±0,15	3,15±0,12*	3,04±0,11*	2,81±0,09*
Жирность, %	3,8±0,5	4,0±0,4*	4,3±0,6*	5,1±0,9*
Соматические клетки, г/см ³	$3,1 \times 10^4 \pm 5,4 \times 10^2$	$6,4 \times 10^5 \pm 8,2 \times 10^3$ *	$11,7 \times 10^5 \pm 2,1 \times 10^3$ *	$12,5 \times 10^5 \pm 2,5 \times 10^3$ *

Примечание: *- достоверные отличия опытных групп от контроля (p<0,05)

По нашим данным (таблица 6) отмечается заметное повышение жирности молока у инфицированных вирусом лейкоза коров, на фоне снижения его плотности, СОМО и количества общего белка. Кроме того, молоко *BLV* и *BLV-BIV*-инфицированных животных по содержанию соматических клеток не соответствует требованиям ТР ТС 033/2013.

Таблица 7 - Микробиологические показатели молока инфицированных ретровирусами и интактных коров

Показатели молока	Статус животных			
	Интактные коровы (n=3)	<i>BIV</i> -инфицированные коровы (n=3)	<i>BLV</i> -инфицированные коровы (n=3)	<i>BLV-BIV</i> -инфицированные коровы (n=3)
БГКП в 0,1 мл	отсутствует	присутствует	присутствует	присутствует
КМАФАнМ, КОЕ/мл	$4 \times 10^4 \pm 8 \times 10^2$	$1,5 \times 10^6 \pm 2 \times 10^4$ *	$1 \times 10^7 \pm 2 \times 10^5$ *	$2 \times 10^7 \pm 3 \times 10^5$ *

Примечание: *- достоверные отличия опытных групп от контроля (p<0,05)

Как следует из таблицы 7, молоко *BIV*-инфицированных коров по показателю КМАФАнМ соответствует 2-му сорту, молоко *BLV* и *BIV-BLV*-инфицированных коров можно классифицировать как несортное. Однако в целом, по микробиологическим показателям, молоко, полученное от

инфицированных коров, не соответствует требованиям ГОСТ 31449-2013 «Молоко коровье сырое. Технические условия», так как содержит БГКП, что недопустимо данным стандартом.

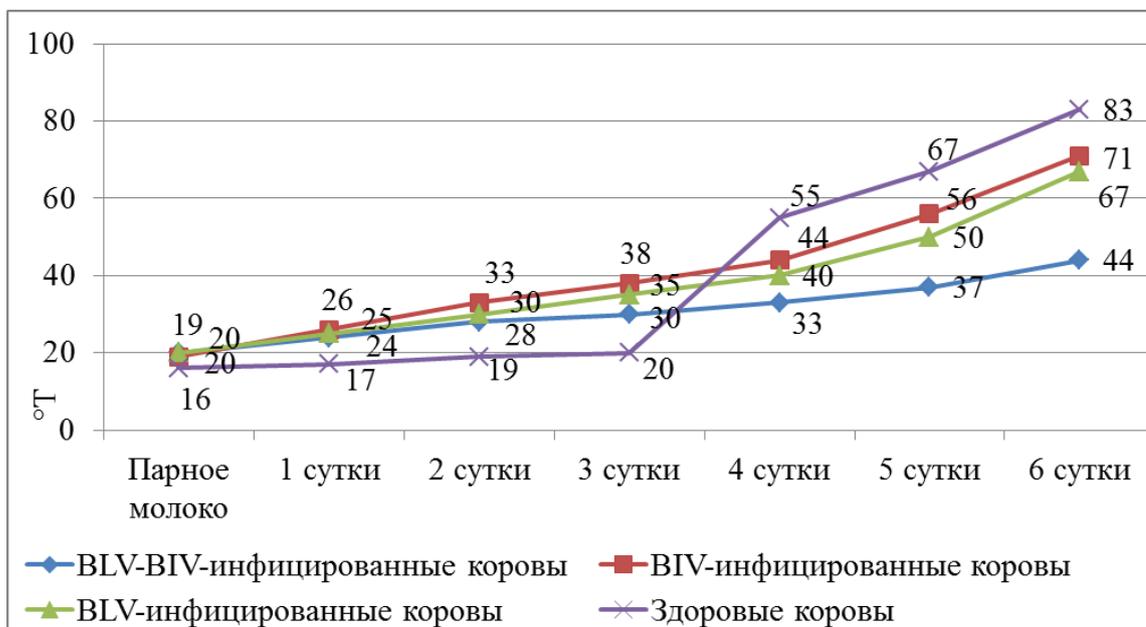


Рисунок 3 - Определение кислотности сырого молока при хранении 4°C.

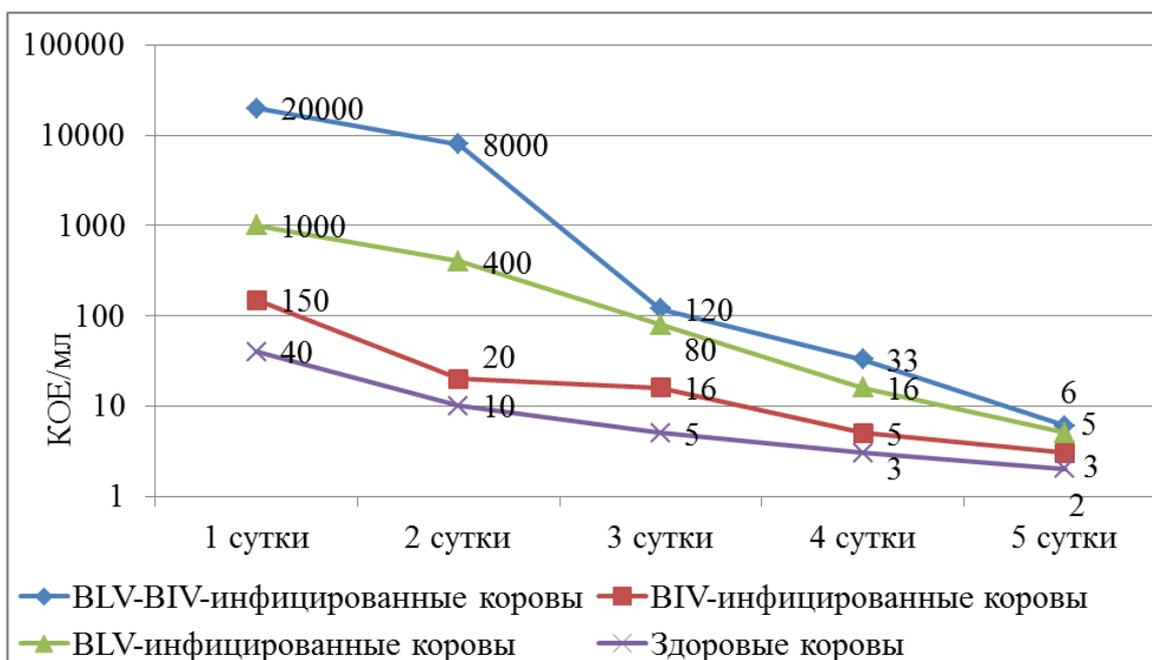


Рисунок 4 - Определение КМАФАнМ в сыром молоке ($\lg 1 \times 10^4$).

Как показано на рисунках 3 и 4, молоко от микст-инфицированных коров скисало медленнее, при этом в нем обнаруживалось большое количество секундарной микрофлоры, значительно превышающее предельно допустимые нормы для сырого коровьего молока. То есть, конкурентное действие секундарной микрофлоры приводило не к скисанию молока, а к развитию в нем гнилостных процессов. У молока *BIV*- и *BLV*-инфицированных коров значительно снижалось время бактерицидной фазы молока, и оно начинало скисать уже на первые сутки хранения в холодильнике, тогда как молоко здоровых коров в течение 3 суток сохраняло кислотность в пределах нормы, а затем быстро превращалось в простоквашу.

Изучение влияния различных режимов пастеризации на микробиологические показатели молока BLV-BIV-инфицированных коров

По данным последних исследований, вирус лейкоза КРС может адаптироваться и в организме человека (Buehring, 2003; Sinha, 2016). Патогенность вируса бычьего иммунодефицита для человека еще не изучена. Поэтому молоко от *BIV* и *BLV*-инфицированных коров необходимо подвергать температурной обработке. Кроме того, при поступлении на молочные комбинаты, молоко пастеризуют для дальнейшей фасовки или приготовления из него кисломолочных продуктов.

Наиболее неудовлетворительные микробиологические показатели были зафиксированы нами в молоке микст-инфицированных ретровирусами коров. В связи с этим, нами были воспроизведены три режима пастеризации: длительная (62-65 °С - 30 минут), кратковременная (80-84 °С – 40 секунд) и мгновенная (94-97 °С - мгновенно), с целью сравнительной оценки их эффективности для молока *BLV-BIV*-инфицированных и здоровых коров. микробиологические показатели молока здоровых и микст-инфицированных ретровирусами коров до и после пастеризации представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Микробиологические показатели молока до и после пастеризации

Показатели	Молоко интактных коров (n=3)	Молоко <i>BLV-BIV</i> -инфицированных коров(n=3)
БГКП	отсутствует	присутствует
КМАФАнМ, КОЕ/мл	$4 \times 10^4 \pm 5 \times 10^2$	$2 \times 10^7 \pm 3 \times 10^5$ *
КМАФАнМ, КОЕ/мл длительная пастеризация	$0,8 \times 10^2 \pm 0,2 \times 10^1$	$5,8 \times 10^5 \pm 5 \times 10^3$ *
КМАФАнМ, КОЕ/мл кратковременная пастеризация	$1 \times 10^1 \pm 0,1 \times 10^1$	$2,5 \times 10^4 \pm 2 \times 10^2$ *
КМАФАнМ, КОЕ/мл мгновенная пастеризация	$0,5 \times 10^1 \pm 0,2 \times 10^1$	$1,7 \times 10^2 \pm 1,5 \times 10^1$ *

Примечание: *- достоверные отличия опытных групп от контроля ($p < 0,05$)

Как следует из данных таблицы 8, эффективность пастеризации для инфицированного молока возростала прямо пропорционально температуре пастеризации. Однако из-за высокой первоначальной обсемененности секундарной микрофлорой, пастеризация не обеспечивала достаточной микробной чистоты молока. Согласно ТР ТС 033/2013, показатель КМАФАнМ в молоке питьевом пастеризованном не должен превышать 1×10^5 КОЕ/мл. Это может негативно отразиться на сроках хранения молока и эффективности, внесенной в него закваски при производстве кисломолочных продуктов.

Изучение белкового и аминокислотного состава молока *BIV* и *BIV-BLV*-инфицированных коров

По нашим данным, молоко инфицированных ретровирусами коров, согласно физико-химическим исследованиям, отличается от молока здоровых коров по содержанию общего белка в сторону снижения этого показателя в молоке инфицированных животных. Вполне закономерно, что изменение качества белка не всегда будет сопровождаться значительным изменением его количества. Поэтому важной задачей является выяснение качественного белкового состава молока инфицированных ретровирусами коров. По нашему мнению, исследование белкового состава молока в динамике при

хранении в холодильнике будет наиболее показательно. В качестве анализируемого сырья мы взяли молоко *BIV* и *BIV-BLV*-инфицированных коров. Так как в литературе нет сведений о белковом составе такого молока, и молоко коинфицированных коров наиболее отличается по органолептическим и физико-химическим показателям от молока здоровых коров. Данные исследований белкового состава молока представлены на рисунках 5 и 6.

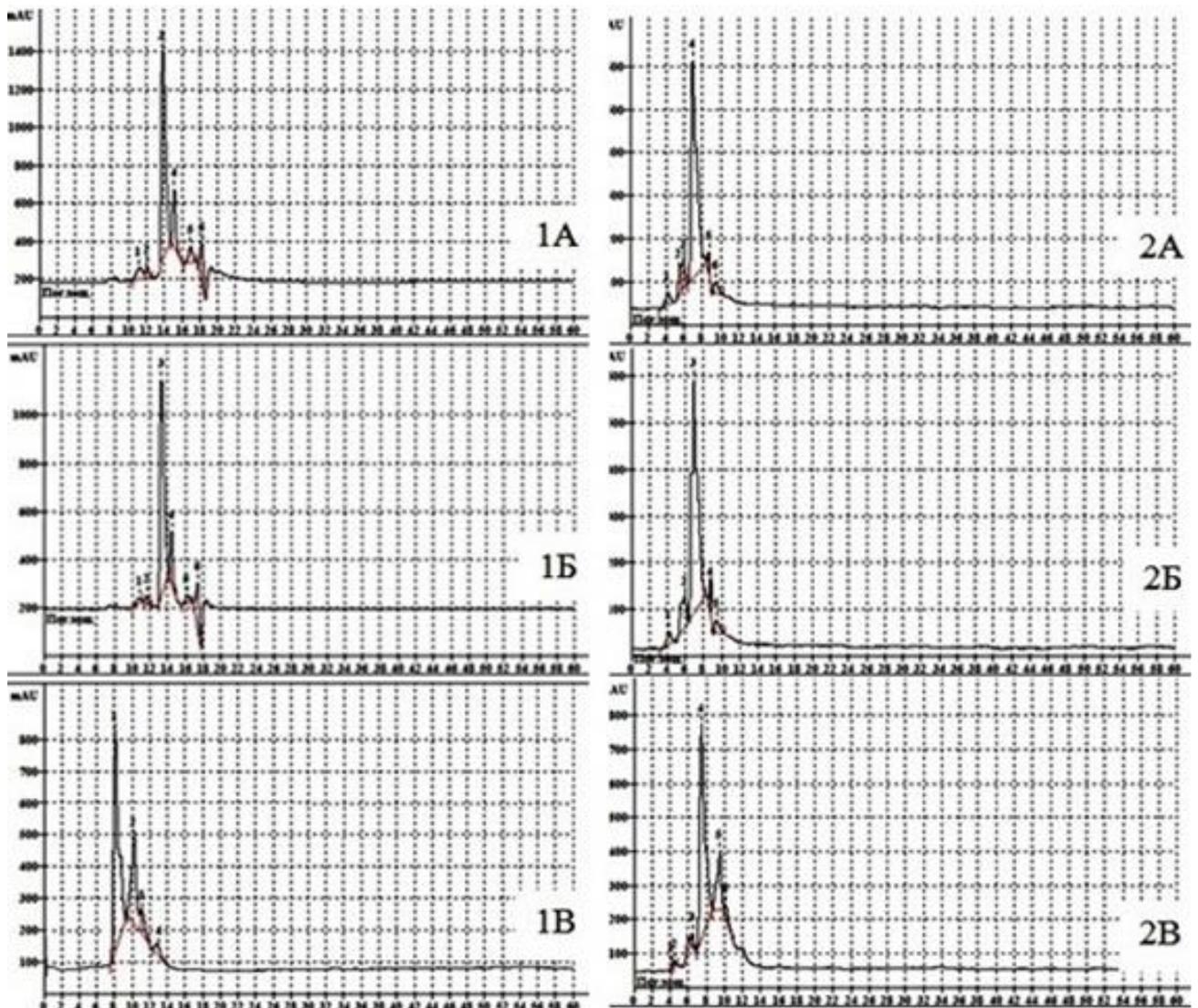


Рисунок 5 - Хроматограмма белков молока *BIV*-инфицированной (1) и *BIV-BLV*-инфицированной (2) коров на 1-ый (А), 3-тий (Б) и 6-ой (В) дни хранения +4°C.

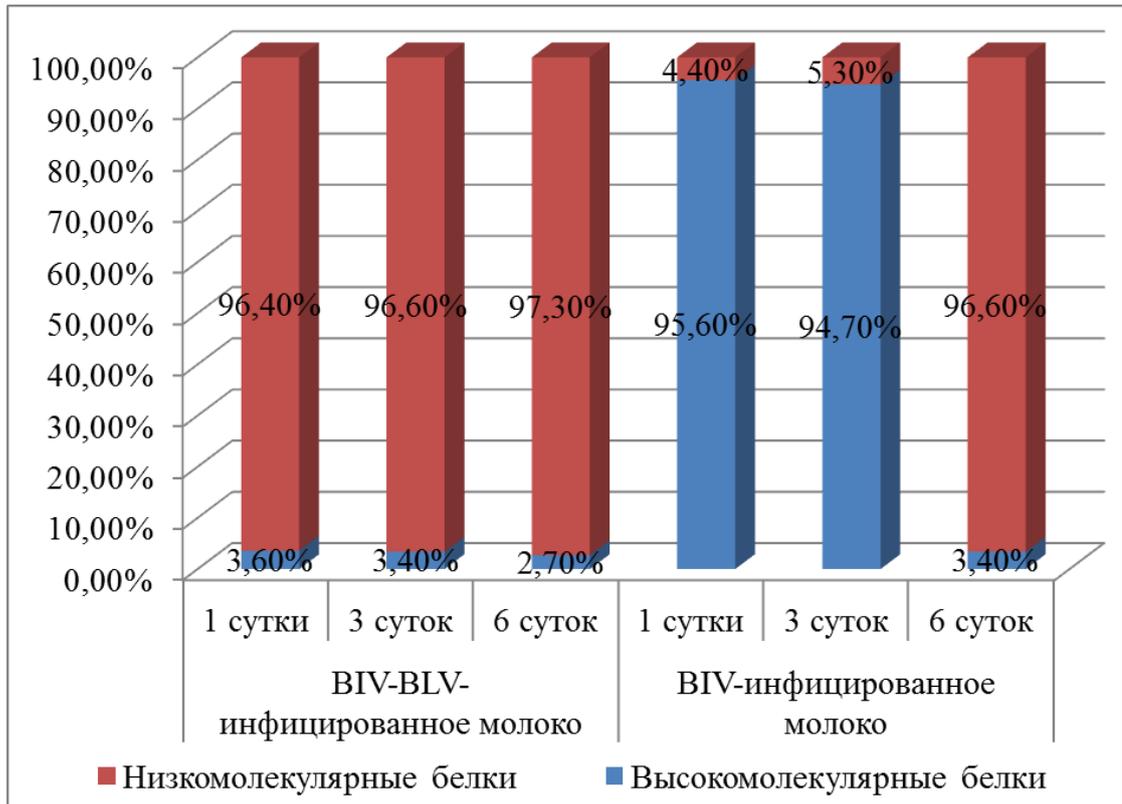


Рисунок 6 - Соотношение высоко- и низкомолекулярных белков в молоке инфицированных коров

Как показано на рисунках 8 и 9, в молоке инфицированных вирусом иммунодефицита коров на 3 день еще обнаруживались высокомолекулярные белки (иммуноглобулины, казеин) в достаточно большом количестве - до 94,7 %, к 6 дню в нем уже преобладали низкомолекулярные белки, вероятнее всего продукты микробной ферментации молока (96,6 %). В молоке коров коинфицированных вирусами иммунодефицита и лейкоза уже на первый день количество низкомолекулярных белков было высоким (до 96,4 %), а полноценные молочные белки в нем практически отсутствовали. И со временем картина усугублялась. Известно, что микробы ферментируют не только белки, но отдельные аминокислоты молока, что приводит к образованию токсичных для человека веществ (H_2S , NH_3 , фенолы). Соответственно, выявленные признаки деградации молочных белков свидетельствуют, что питательная ценность молока инфицированных ретровирусами коров снижается, и при этом существует вероятность накопления в таком молоке токсичных для человека веществ.

Доказательной базой подобных метаморфоз является изучение аминокислотного состава молока. Сравнение аминокислотного состава молока инфицированных и здоровых животных покажет являются ли низкомолекулярные белки исследуемого молока молочными пептидами. Микроорганизмы, присутствующие в молоке коров с дефектной иммунной системой, могут трансформировать молочные белки и пептиды в микробные белки, изменять относительную концентрацию, как свободных, так и связанных аминокислот, значительно снижая биологическую ценность молочного белка. Изучение аминокислотного состава молока *BIV* и *BLV-BIV* инфицированных коров в динамике позволит дать обоснование биохимическим преобразованиям в этом продукте и определить биологическую ценность такого молока для организма человека. Молоко исследовали в динамике, хранение в холодильнике при +4 °С. Полученные данные по относительной концентрации аминокислот молока коров, инфицированных вирусами лейкоза и иммунодефицита, приведены в таблицах 9 и 10 ($M \pm \sigma$, $P > 0,05$) и на рисунках 10 и 11.

Таблица 9 - Относительная концентрация аминокислот в молоке коров с *BIV*-инфекцией при хранении, %

№ п/п	Аминокислота	Срок хранения		
		1 сутки	3 сутки	6 сутки
1	Аргинин	0.360±0.151	0.300±0.155*	-
2	Лизин	0.478±0.023	0.325±0.009*	0.555±0.047*
3	Тирозин	0.178±0.033	0.343±0.019*	0.189±0.038
4	Фенилаланин	0.212±0.018	0.279±0.019*	0.291±0.021*
5	Гистидин	0.115±0.015	0.104±0.011*	-
6	Лейцин+Изолейцин	0.443±0.036	0.516±0.063*	0.570±0.031*
7	Метионин	0.125±0.177	0.038±0.006*	
8	Валин	0.311±0.011	0.314±0.024	0.554±0.151*
9	Пролин	0.816±0.020	0.781±0.009	0.729±0.040*
10	Треонин	0.260±0.009	0.204±0.028*	0.246±0.002
11	Серин	0.210±0.024	0.200±0.032	0.281±0.053*
12	Аланин	0.145±0.047	0.154±0.004	0.233±0.019*
13	Глицин	0.116±0.027	0.085±0.006*	0.116±0.061
14	Глутамин	0.144±0.004	0.090±0.009*	0.126±0.025*
15	Аспарагин	0.430±0.014	0.353±0.014*	0.383±0.048*

Примечание: * - достоверные отличия по отношению к 1 суткам; $p < 0,05$

Графики, отображенные на рисунках 7 и 8, построены согласно данным, приведенным в таблицах 6 и 7 (1-15 – порядковый номер аминокислоты).

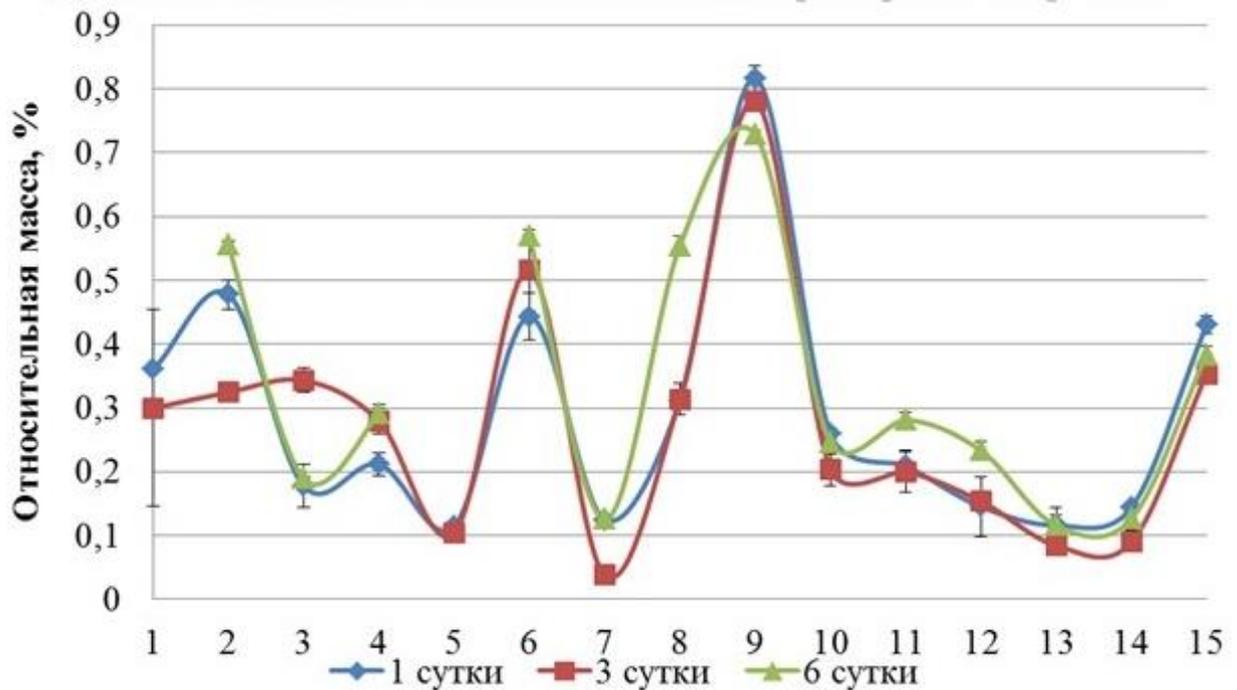


Рисунок 7 - Изучение стабильности аминокислот молока *BIV*-инфицированных коров (1-15 порядковый номер аминокислоты).

Таблица 10 - Относительная концентрация аминокислот в молоке коров с *BLV-BIV*-инфекцией при хранении, %

№ п/п	Аминокислота	Срок хранения		
		1 сутки	3 сутки	6 сутки
1	Аргинин	0.366±0.111	0.270±0.096*	-
2	Лизин	0.495±0.007	0.540±0.015*	0.536±0.006*
3	Тирозин	0.210±0.043	0.227±0.052*	0.183±0.002*
4	Фенилаланин	0.244±0.052	0.229±0.008	0.250±0.015
5	Гистидин	0.079±0.009	0.066±0.005*	-
6	Лейцин+Изолейцин	0.511±0.018	0.542±0.035	0.561±0.002*
7	Метионин	0.242±0.042	0.053±0.022*	-
8	Валин	0.272±0.035	0.425±0.012*	0.433±0.015*
9	Пролин	0.874±0.007	0.674±0.006*	0.754±0.007*
10	Треонин	0.266±0.005	0.216±0.013*	0.226±0.019
11	Серин	0.205±0.034	0.180±0.058*	0.282±0.012*
12	Аланин	0.202±0.018	0.148±0.037*	0.166±0.014*
13	Глицин	0.084±0.007	0.078±0.011	0.134±0.015*
14	Глутамин	0.082±0.003	0.111±0.004*	0.135±0.018*
15	Аспарагин	0.393±0.007	0.437±0.034*	0.414±0.014

Примечание: * - достоверные отличия по отношению к 1 суткам; $p < 0,05$

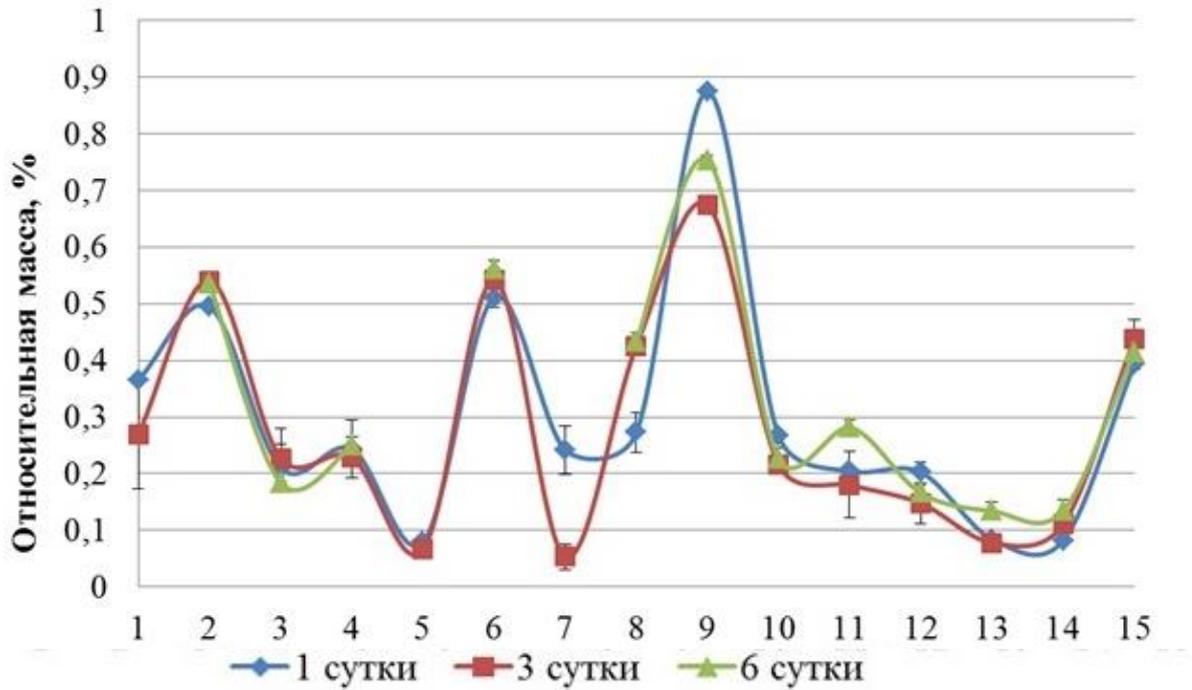


Рисунок 8 - Изучение стабильности аминокислот молока *BLV-BIV*-инфицированных коров (1-15 порядковый номер аминокислоты).

Изучение стабильности аминокислотного состава молока инфицированных коров в динамике (таблицы 9 и 10, рисунки 7 и 8) показало достаточно высокую вариабельность относительной концентрации аминокислот. Это свидетельствует об активных биохимических метаморфозах в молоке. Как следует из данных таблиц 9 и 10, графически отраженных на рисунках 7 и 8, наиболее динамичными оказались показатели относительной концентрации аргинина, гистидина и метионина в молоке коров, так как к 6-му дню хранения молока в холодильнике их концентрация была ниже предела детекции данным методом исследования. Содержание остальных аминокислот либо было относительно стабильным (серин, треонин, глицин, глутамин, аспарагин, аланин), либо колебалось в более широких пределах (валин, лизин, глутамин, тирозин, пролин, фенилаланин, лейцин-изолейцин). Причем очевидно, что изменения относительных концентраций многих аминокислот носили случайный характер. Их количество либо возрастало на 3-й (тирозин) или 6-ой (фенилаланин, лейцин-изолейцин, валин, серин, глицин) день хранения молока, либо со временем снижалось (пролин, треонин).

Рисунки 9 и 10 иллюстрируют динамику содержания аминокислот в молоке *BLV* и *BIV* инфицированных коров по сравнению с относительной концентрацией таковых в молоке здоровых коров, по Молочникову В.В. (Надточий, 2015).

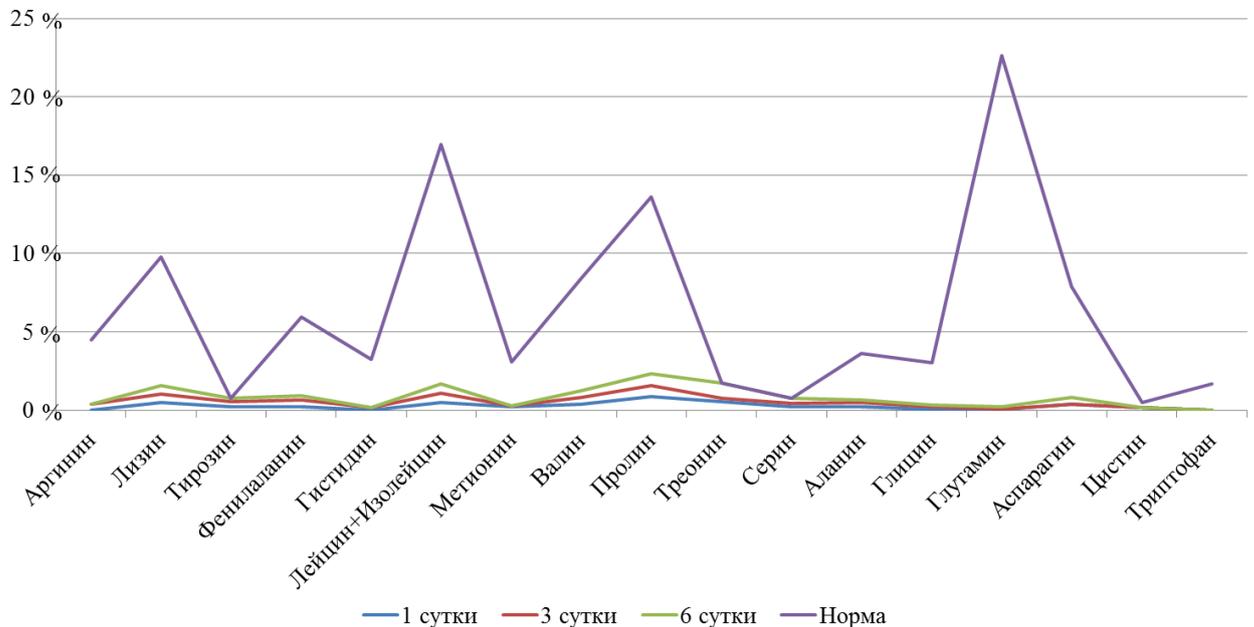


Рисунок 9 - Массовая доля (%) аминокислот в коровьем молоке при *BIV*-инфекции и норме (по казеину).

Как показано на рисунке 9, в коровьем молоке при *BIV*-инфекции, содержание аминокислот в среднем было в 5-20 раз меньше, чем в молоке здоровых коров. А большинство незаменимых аминокислот, таких как метионин, триптофан, аргинин, гистидин, глицин фактически отсутствовало. Значительно изменен был и аминокислотный баланс молока. Так, содержание глутамина, лейцина, лизина, пролина в молоке больных коров в десятки раз ниже, чем в молоке здоровых, в то время как содержание треонина, серина и тирозина близко к норме.

Известно, что суточная норма потребления аминокислот для человека исчисляется в зависимости от индивидуальных потребностей организма, а также диетических особенностей питания. Лимитирующим при определении баланса аминокислот для человека является уровень 11 незаменимых аминокислот (метионина, лизина, триптофана, аргинина, валина, гистидина, лейцина, изолейцина, треонина, фенилаланина и глицина). Еще 10

аминокислот считают заменимыми (аланин, аспарагин, аспартат, глицин, глутамат, глутамин, пролин, серин, тирозин и цистеин). Однако такое разделение является условным (Long, 2015). В данном случае аргинин и гистидин, которые частично производятся организмом человека, тем не менее, находились в значительном дефиците. А тирозин, казалось бы, содержащийся в достаточном количестве, переходил в разряд лимитирующих, так как наблюдался недостаток фенилаланина.

У некоторых людей может возникать потребность в повышении суточной нормы аминокислот. Однако и избыток аминокислот тоже нежелателен, так как требует для утилизации в организме дополнительной энергии (Wu, 2014). В данном случае наблюдался избыток относительной концентрации треонина и серина. Избыточная аминокислота может занимать в обмене веществ место недостающей, следствием чего являются токсикоз, увеличение отложения жира в организме, костные патологии.

Подобная тенденция отмечалась и для молока коров с *BLV-BIV* коинфекцией (рисунок 10).

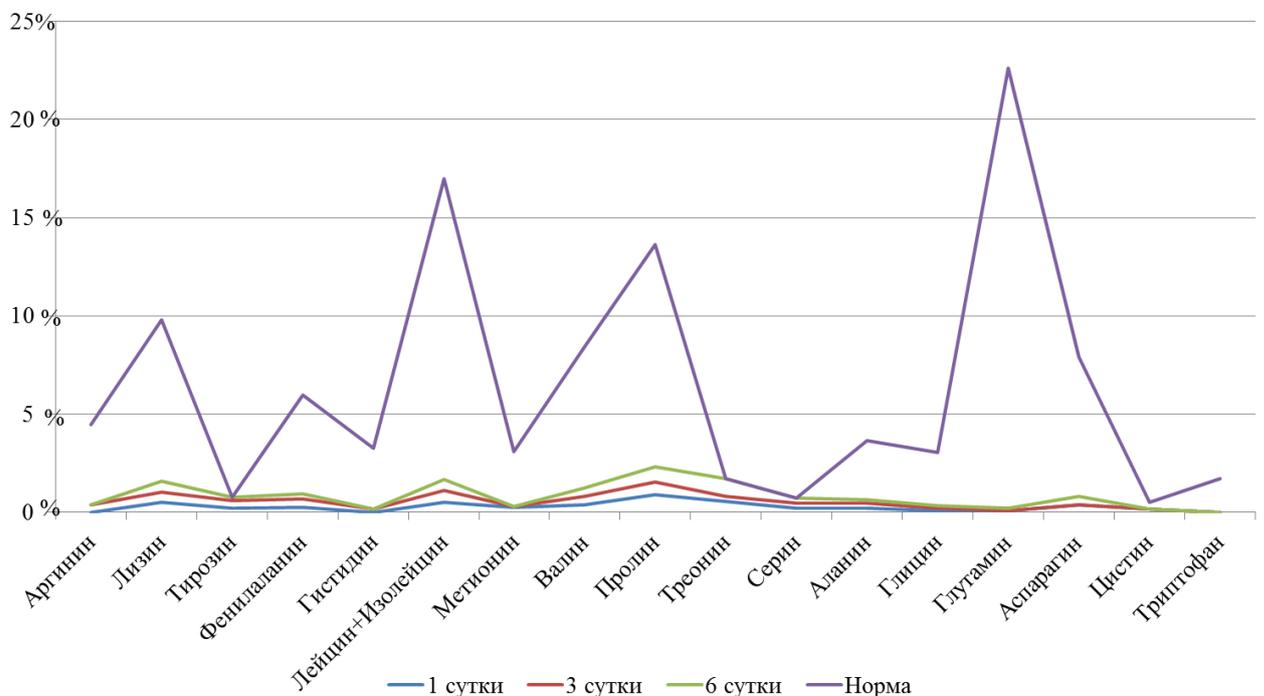


Рисунок 10 - Массовая доля (%) аминокислот в коровьем молоке при *BLV - BIV*-коинфекции и норме (по казеину).

Чтобы избежать сбоев в обмене веществ, необходимо соблюдать индекс аминокислотной сбалансированности, то есть соотношение содержания аминокислот в пище. Связано это с тем, что при метаболизме между аминокислотами, сходными по структуре, наблюдается антагонизм. Например, между аргинином и лизином, треонином и триптофаном, лейцином и изолейцином (Wu, 2010). В данном случае наблюдался явный конфликт баланса между лейцином-изолейцином и валином, так как их относительная концентрация в молоке здоровых и инфицированных коров была обратно пропорциональна, и это усугублялось со временем хранения молока.

Лейкоз и вирусный иммунодефицит относят к числу труднодиагностируемых инфекций скота, что повышает вероятность носительства возбудителей данных заболеваний у животных. Для диагностики *BIV* нет законодательно утвержденных норм. Поэтому в хозяйствах в товарное молоко от здоровых коров может попадать молоко инфицированных животных. Проведенные нами исследования свидетельствуют о том, что молоко, полученное от инфицированного скота, будет снижать качество сборного молока. Именно поэтому так важно совершенствовать систему контроля за здоровьем скота и своевременно выводить из стада инфицированных животных.

2.2.2.3. Влияние ретровирусных инфекций крупного рогатого скота на технологические свойства коровьего молока

Очевидно, что сопутствующая микрофлора молока инфицированных коров конкурирует за лактозу и другие вещества молока с молочнокислыми микроорганизмами, что приводит к развитию гнилостных процессов в молоке, даже при хранении его в холодильнике. В этой связи большой научно – практический интерес представляет исследование таких свойств молока инфицированных коров и молочных продуктов, полученных из него,

как сквашиваемость, органолептические свойства, сохранность, биобезопасность и др.

Влияние ретровирусной инфекции коров на технологию кисломолочного продукта «Снежок»

Среди кисломолочных продуктов большой популярностью обладают йогуртные напитки в силу предпочтительных органолептических характеристик, диетических свойств и благоприятного воздействия на пищеварение. «Снежок» относят к напиткам йогуртным без компонентов, вырабатываемых из молока с добавлением сахара. С целью выяснения как будет проходить процесс сквашивания и, каково будет качество полученного кисломолочного продукта, нами был приготовлен напиток «Снежок» из молока здоровых коров и коров коинфицированных ретровирусами.

Согласно стандартам ГОСТ 31981-2013 и требованиям ТР ТС 033/2013 йогуртный напиток без компонентов должен быть белого цвета с чистым кисломолочным запахом и однородной, с ненарушенным, при термостатном способе приготовления, сгустком, в меру вязкой консистенцией.

При оценке органолептических показателей, полученный из молока инфицированных коров «Снежок» имел неудовлетворительные свойства: он был жидкой консистенции, содержал небольшие сгустки и при хранении в холодильнике уже на вторые сутки расслаивался на две фракции: сыворотка и осадок в виде хлопьевидных сгустков.

Согласно стандартам ГОСТ 31981-2013 и требованиям ТР ТС 033/2013 время приготовления йогуртного напитка без компонентов с применением *Streptococcus salivarius sp. thermophiles* и *Lactobacillus deibrueskii sp. bulgaricus* составляет не более 6 - 8 часов при температуре 40 – 45 °С. При этом он должен соответствовать следующим требованиям:

- кислотность 75-140 °Т,
- СОМО не менее 9,5 %,
- не содержать БГКП в 0,01 мл,

- не содержать сальмонелл в 25 мл,
- не содержать золотистого стафилококка в 1 мл,
- не содержать дрожжей и плесневых грибов,
- количество молочнокислых микроорганизмов не менее 1×10^7 КОЕ/мл

В таблице 11 приведены основные свойства полученного продукта.

Таблица 11 - Характеристики выработанного напитка «Снежок»

Показатели	Из молока интактных коров (n=3)	Из молока BLV-BIV-инфицированных коров(n=3)
Кислотность, °Т	85,0±2,0	65,0±2,0*
СОМО, %	10,0±0,3	7,5±0,2*
БГКП в 0,01 мл	отсутствует	присутствует*
<i>Salmonella spp.</i> в 25 мл	отсутствует	отсутствует
<i>S. aureus</i> в 1 мл	отсутствует	отсутствует
Дрожжи (Д), Плесени (П), КОЕ/мл	отсутствуют	10,0±2,0*
Общее количество кисломолочных бактерий, КОЕ/мл	$4 \times 10^7 \pm 8 \times 10^5$	$1 \times 10^5 \pm 2 \times 10^3$ *
Время сквашивания, час.	4,0±0,1	6,0±0,1*

Примечание: * - статистически значимые различия контрольной и опытной групп

Полученные результаты (таблица 11) свидетельствуют, что молоко коинфицированных ретровирусами коров не пригодно для производства йогуртного кисломолочного продукта «Снежок». Так как даже при максимальных дозах закваски и сроках сквашивания, после пастеризации в производственном режиме (30 минут - 60°С), получается неудовлетворительный по органолептическим и микробиологическим показателям продукт, что является следствием конкурентного действия секундарной микрофлоры. Кислотность готового продукта, выработанного из молока коинфицированных коров, была ниже требований ГОСТ 31981-2013, что привело к развитию в нем микроскопических грибов и бактерий группы кишечной палочки. Снижение кислотности было обусловлено низким содержанием молочнокислых микроорганизмов - более, чем на два порядка ниже, чем в продукте из молока интактных коров. При этом время

термостатирования йогуртного кисломолочного продукта «Снежок», вырабатываемого из молока микст-инфицированных ретровирусами коров, на 33,33 % превышало время термостатирования продукта из молока не инфицированных ретровирусами коров. Показатель СОМО готового продукта, выработанного из молока коинфицированных ретровирусами коров, также не соответствовал требованиям стандартов и был на 25 % ниже, чем в продукте из молока интактных коров, что снижает его пищевую ценность.

Влияние ретровирусной инфекции коров на технологию выработки и сроки хранения творога из цельного молока

Весьма ценным и широко распространенным продуктом, получаемым из молока, является творог. Преимущество творога по сравнению с другими молочными и молочнокислыми продуктами заключается в высоком содержании белков. В процессе молочнокислого брожения происходит свертывание белка казеина, что существенно повышает его усвояемость.

В экспериментальных целях нами был получен творог из сборного молока от неинфицированных ретровирусами коров, сборного молока *BIV*-инфицированных коров и сборного молока *BIV-BLV* инфицированных коров.

После низкотемпературной пастеризации всех проб молока, творог из них был выработан с использованием закваски мезофильной БК-Углич-МСТ на основе *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lac. lactis subsp. cremoris*, *Lac. lactis subsp. diacetylactis* и *Streptococcus thermophilus* методом кислотной коагуляции белков с последующим подогревом до температуры 65°C в течение 30-40 минут и удалением сыворотки.

Согласно требований ГОСТ 31453-2013 и стандартам ТР ТС 033/2013, творог должен быть мягкой мажущейся или рассыпчатой консистенции с наличием ощутимых частиц молочного белка или без них, чистым кисломолочным запахом, равномерно белого или с кремовым оттенком цвета. Творог без компонентов со сроком годности не более 72 часов должен

содержать молочнокислых микроорганизмов не менее 1×10^6 КОЕ/г, при этом в нем не должны присутствовать сальмонеллы в 25 г, золотистый стафилококк в 0,1 г, БГКП в 0,01 г, должны отсутствовать дрожжи и плесени. Такие показатели, как массовая доля белка и влаги, кислотность готового творога коррелируют с его жирностью.

Все пробы творога оценили по основным органолептическим, физико-химическим и микробиологическим показателям. Свойства готового творога представлены в таблице 12.

Таблица 12 - Свойства полученного творога

Показатели	Творог из молока интактных коров (n=3)	Творог из молока <i>BIV</i> -инфицированных коров (n=3)	Творог из молока <i>BIV-BLV</i> инфицированных коров (n=3)
Время сквашивания, час.	7,0±0,5	8,5±0,5*	10,5±0,5*
Запах	чистый, приятный, слегка кисловатый	недостаточно выраженный кисловатый	слабо выраженный
Цвет	белый	с кремовым оттенком	светло-кремовый
Примеси	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют
Зерно	крупное в норме	среднее	не выражено
Выход продукта, %	18,0±2,0	13,0±1,0*	10,0±1,0*
Жир, %	18,0±0,5	23,0±0,5*	29,0±0,5*
Белок, %	15,0±0,5	13,0±0,5*	10,0±0,5*
Влажность, %	65,0±1,0	62,0±1,0*	59,0±1,0*
Кислотность, °Т	160,0±5,0	140,0±5,0*	120,0±5,0*
Количество молочнокислых микроорганизмов, КОЕ/г	$4 \times 10^6 \pm 3 \times 10^4$	$5 \times 10^4 \pm 2 \times 10^2$ *	$6 \times 10^3 \pm 8 \times 10^1$ *
КМАФАнМ, КОЕ/г	отсутствует	$1 \times 10^2 \pm 1 \times 10^1$ *	$8 \times 10^3 \pm 9 \times 10^1$ *
БГКП в 0,001 г	отсутствует	отсутствует	присутствует
<i>Salmonella spp.</i> в 25 г	отсутствует	отсутствует	отсутствует
<i>S. aureus</i> в 1 г	отсутствует	отсутствует	отсутствует
Дрожжи (Д), Плесени (П), КОЕ/мл	отсутствуют	5,0±1,0*	10,0±2,0*
Са, мг/100 г	150±3	130±3*	100±3*

Примечание: * - статистически значимые различия контрольной и опытной групп

Полученные нами данные (таблица 12) свидетельствуют, что производство творога из молока *BIV* и *BIV-BLV* инфицированных коров экономически не обоснованно, так как временные затраты на выработку продукта увеличиваются на 21,6 и 35,1%, а выход продукции при этом снижается на 27,8 и 44,4%, соответственно.

Творог, выработанный из молока *BIV* и *BIV-BLV* инфицированных коров, имел неудовлетворительные органолептические и микробиологические показатели. В частности, имел жирную мажущуюся консистенцию, недостаточно оформленное зерно, запах такого творога был невыраженный. Творог, выработанный из молока *BIV* и *BIV-BLV* инфицированных коров, содержал в своем составе постороннюю микрофлору, в том числе бактерии группы кишечной палочки (при отсутствии сальмонелл и золотистого стафилококка). Количество молочнокислых микроорганизмов в твороге, выработанном из молока инфицированных ретровирусами коров, было на 2 - 3 порядка ниже требований ГОСТ 31453-2013. Кислотность готового продукта при этом была на 20-40 °Т ниже, чем у творога, выработанного из молока интактных коров, что было обусловлено, как снижением количества молочнокислых бактерий в результате конкурентного действия секундарной микрофлоры, так и более высокой жирностью такого творога.

Известно, что в 100 г молока содержится 121 мг кальция, в том же количестве нежирного творога - 176 мг, а с увеличением жирности творога количество кальция снижается, вплоть до 80 мг/100 г в твороге повышенной жирности. Закономерно, что творог, выработанный из молока *BIV* и *BIV-BLV* инфицированных коров, помимо пониженного содержания белка, содержит меньше кальция на 13,3 % и 30,0 %, соответственно.

Полученные нами данные свидетельствуют, что качество кисломолочной продукции при ретровирусной инфекции коров снижается. Не исключено, что это будет отражаться и на сроках хранения таких продуктов.

С целью изучения влияния ретровирусной инфекции КРС на сроки хранения, вырабатываемой из коровьего молока продукции, мы определяли такие свойства выработанного нами творога, как кислотность и микробиологическая чистота, в динамике хранения при +4 °С. Полученные нами данные отражены на рисунках 11 – 14.

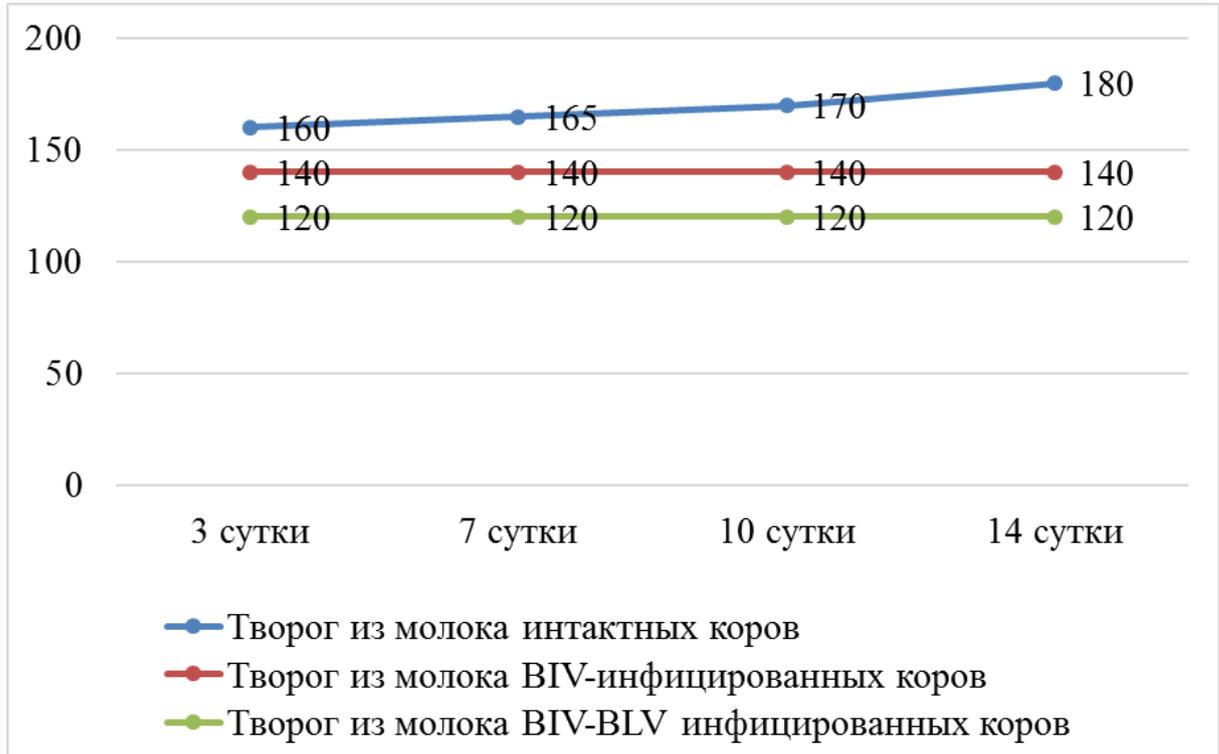


Рисунок 11 - Динамика кислотности выработанного творога (°T).

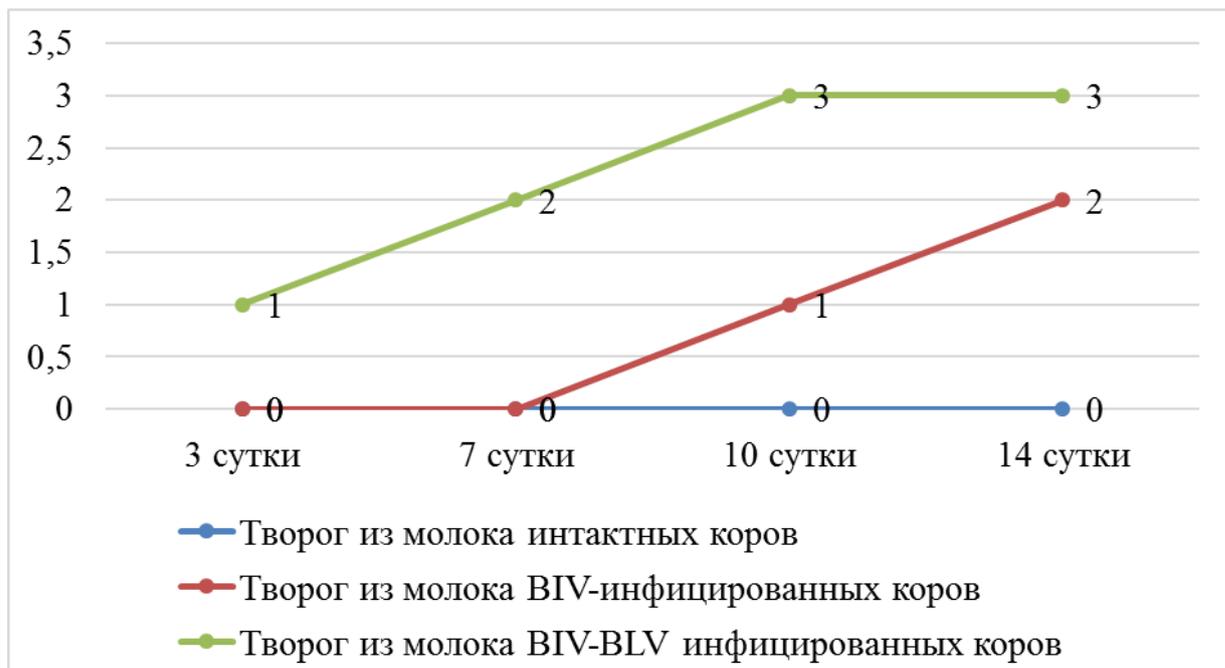


Рисунок 12 – Динамика БГКП в выработанном твороге (1×10^2 КОЕ/г).

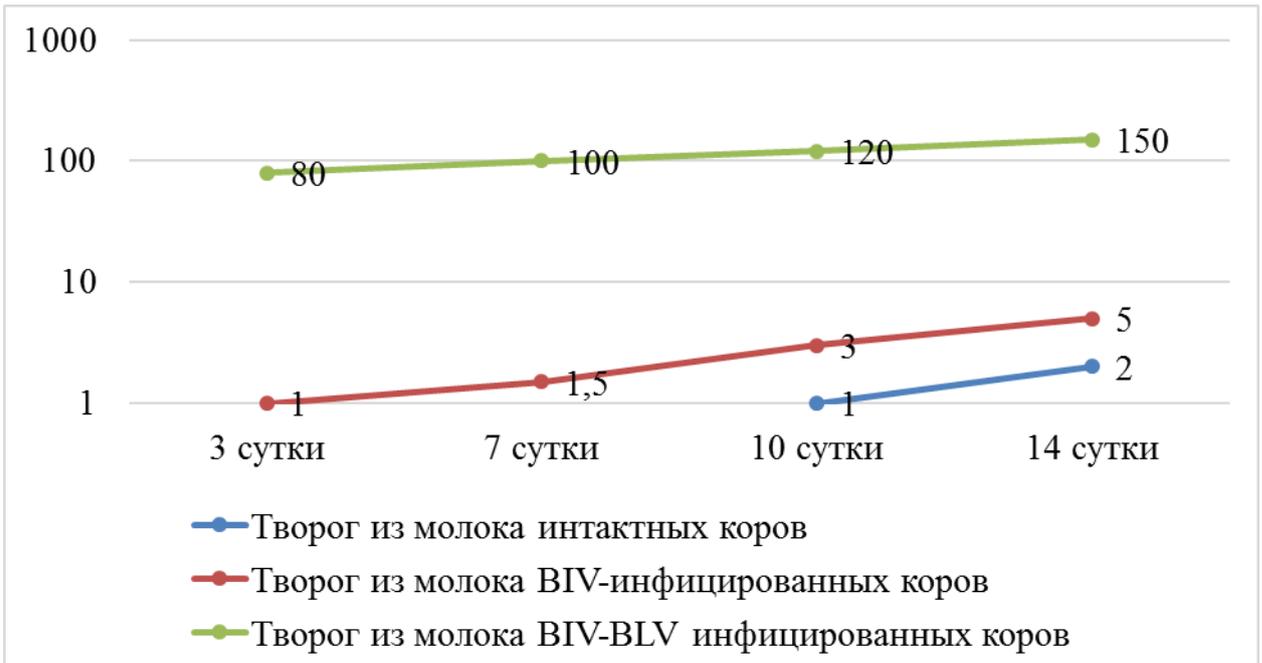


Рисунок 13 – Динамика КМАФАнМ выработанного творога ($Lg 1 \times 10^2$ КОЕ/мл)

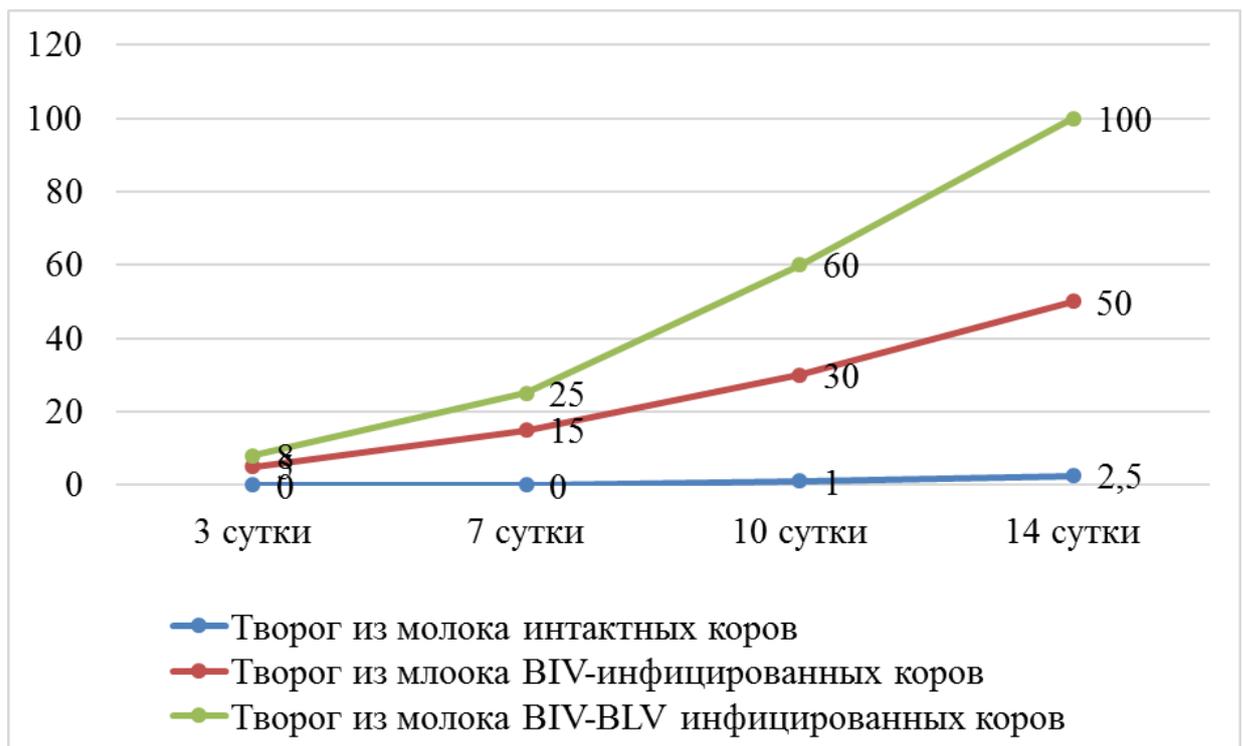


Рисунок 14 – Динамика количества микроскопических грибов в выработанном твороге ($\times 10$ КОЕ/г).

Как отражено на рисунках 11 – 14, кислотность творога, выработанного из молока здоровых коров, со временем хранения в холодильнике несколько повышалась, при этом микрофлора его практически

не изменялась и лишь к концу срока хранения в нем появились незначительные примеси посторонней микрофлоры, в том числе дрожжей. В твороге, выработанном из молока инфицированных ретровирусами коров, при хранении в холодильнике, кислотность не изменялась. При этом в нем увеличивалось количество посторонней микрофлоры, в том числе БГКП и микроскопических грибов, в частности высевались плесени. По органолептическим свойствам творог из молока инфицированных коров также был не удовлетворительным: в течение нескольких дней он приобрел мажущую консистенцию и неприятный запах, его поверхность покрылась слизистой субстанцией.

Таким образом, молоко *BIV*- и *BLV-BIV* – инфицированных коров не пригодно для выработки творога, так как из него получается неудовлетворительный по органолептическим и санитарно-микробиологическим характеристикам продукт. Кроме того, при хранении такого творога в условиях холодильника, уже через несколько дней в нем появляются явные признаки порчи.

Влияние примеси молока инфицированных ретровирусами коров на технологию кефира

Результаты наших исследований показали, что из молока инфицированных ретровирусами коров не удастся выработать качественные кисломолочные продукты, соответствующие стандартам ГОСТов и требованиям ТР ТС 033/2013, которые сохраняются в холодильнике без порчи в течение установленных сроков. Однако молоко инфицированных ретровирусами коров, учитывая степень распространения инфекций, вероятнее всего, может находиться в составе сборного молока, чем в чистом виде. Поэтому следующей нашей задачей стало выяснение количества примеси молока инфицированных ретровирусами коров в составе сборного, которое будет снижать технологические свойства молочной смеси.

Сначала мы приготовили сборные пробы молока, содержащие в своем составе молоко инфицированных вирусом лейкоза или микст-инфицированных вирусами иммунодефицита и лейкоза коров, в количестве 10 %, 30 % и 50 % по отношению к общему объему пробы – 500 мл.

Все приготовленные пробы сборного молока имели удовлетворительные органолептические характеристики: приятный молочный запах, однородную консистенцию и белый цвет. При поступлении молока подобного качества на молокоперерабатывающие предприятия или в торговую сеть на ранке частников, по органолептическим характеристикам идентифицировать его не удастся. Вероятно, выявить примесь некачественного молока можно с помощью более глубокого анализа с применением физико-химических и санитарно-микробиологических методов. Кроме того, это поможет прогнозировать сырьевые свойства молока. Поэтому нами была осуществлена оценка основных физико-химических и санитарно-микробиологических показателей этих проб молока, которые оказывают наибольшее влияние на технологические свойства молока, как сырья (таблица 13).

Таблица 13 - Основные физико-химические и микробиологические показатели молочных смесей

Показатель	Молоко здоровых коров (n=3)	10% BLV-инфицированного молока (n=3)	30% BLV-инфицированного молока (n=3)	50% BLV-инфицированного молока (n=3)	10% BLV-BIV-инфицированного молока (n=3)	30% BLV-BIV-инфицированного молока (n=3)	50% BLV-BIV-инфицированного молока (n=3)
Кислотность, °Т	17,0±0,5	17,0±0,5	18,0±0,5*	19,0±0,5*	17,0±0,5	18,0±0,5*	20,0±0,5*
Белок, %	3,85±0,11	3,80±0,10	3,55±0,09*	3,15±0,08*	3,65±0,09	3,25±0,08*	2,90±0,07*
Жирность, %	3,2±0,1	3,2±0,1	3,5±0,1*	3,8±0,1*	3,2±0,1	3,7±0,1*	4,1±0,1*
БГКП в 0,1 мл	отсутствует	отсутствует	отсутствует	присутствует	отсутствует	отсутствует	присутствует
КМАФАнМ, КОЕ/мл	$3 \times 10^4 \pm 9 \times 10^2$	$4 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^3$ *	$1 \times 10^5 \pm 3 \times 10^3$ *	$3 \times 10^6 \pm 9 \times 10^4$ *	$7 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^3$ *	$6 \times 10^5 \pm 1,8 \times 10^4$ *	$1 \times 10^7 \pm 3 \times 10^5$ *

Примечание: *- достоверные отличия опытных групп от контроля (p<0,05)

Как следует из данных таблицы 13, с увеличением количества молока инфицированных ретровирусами коров в составе сборного, качественные показатели его снижались. В частности, возрастала кислотность проб молока и показатель КМАФАнМ, в то время как количество общего белка в молоке снижалось на фоне увеличения жирности молока. При этом в пробе, содержащей 50 % молока инфицированных ретровирусами коров, были обнаружены бактерии группы кишечной палочки в 0,1 мл. Это оказался единственный неудовлетворительный показатель, остальные характеристики находились в допустимых пределах.

Затем из каждой пробы сборного молока был выработан кефир с применением закваски «Genesis» (Болгария) согласно прилагаемой инструкции. После этого нами была осуществлена оценка органолептических, физико - химических и микробиологических характеристик выработанного кефира.

Все полученные экспериментальные пробы кефира были подвергнуты анализу по органолептическим, физико-химическим и микробиологическим показателям (таблицы 14, 15, 16).

Таблица 14 - Время приготовления и кислотность готового продукта

Показатель	Из молока интактных коров (n=3)	10% молока <i>BLV</i> -инфицированных коров(n=3)	30% молока <i>BLV</i> -инфицированных коров(n=3)	50% молока <i>BLV</i> -инфицированных коров(n=3)	10% молока <i>BLV-BIV</i> -инфицированных коров(n=3)	30% молока <i>BLV-BIV</i> -инфицированных коров(n=3)	50% молока <i>BLV-BIV</i> -инфицированных коров(n=3)
Кислотность, °Т	86±1	85±1	82±1*	80±1*	84±1	81±1*	76±1*
Время сквашивания, час.	12,0±0,0	12,0±0,5	14,0±1,0*	15,0±1,0*	12,5±0,5	16,0±0,5*	18,0±0,5*

Примечание: *- достоверные отличия опытных групп от контроля (p<0,05)

Как следует из данных таблицы 14, при увеличении в сборной пробе содержания молока инфицированных ретровирусами коров, выработанный кефир имел более низкую кислотность, даже при увеличении сроков сквашивания. Качественный кефир должен обладать кислотностью не менее

85 °Т. Кефир выработанный из смеси молока, имеющей в своем составе молоко инфицированных ретровирусами коров, в большинстве случаев имел несколько сниженную кислотность. А при добавлении 50 % молока микст-инфицированных ретровирусами коров, кислотность готового продукта едва доходила до 76 °Т. Это негативно влияет как на вкусовые, так и на лечебные свойства продукта и снижает сроки его хранения.

Согласно ГОСТ 31454-2012 и ТР ТС 033/2013, по органолептическим характеристикам кефир должен иметь чистый кисломолочный без посторонних примесей запах, равномерный молочно-белый цвет, однородную с нарушенным или ненарушенным сгустком консистенцию и кислотность 85 до 130 °Т. По микробиологическим характеристикам готовый продукт должен содержать молочнокислых микроорганизмов не менее 1×10^7 КОЕ/мл, при этом в нем не должны выявляться БГКП в 0,1 мл, сальмонеллы – в 25 мл и золотистый стафилококк в 1 мл, а количество дрожжей и плесеней не должно быть выше 50 КОЕ/мл (каждый из показателей).

Таблица 15 - Органолептические показатели выработанного кефира

Показатель	Из молока интактных коров (n=3)	10% молока <i>BLV</i> -инфицированных коров(n=3)	30% молока <i>BLV</i> -инфицированных коров(n=3)	50% молока <i>BLV</i> -инфицированных коров(n=3)	10% молока <i>BLV-BIV</i> -инфицированных коров(n=3)	30% молока <i>BLV-BIV</i> -инфицированных коров(n=3)	50% молока <i>BLV-BIV</i> -инфицированных коров(n=3)
Запах	Чистый, кисломолочный	Чистый, кисломолочный	Чистый, кисломолочный	Чистый, кисломолочный	Чистый, кисломолочный	Чистый, кисломолочный	Чистый, кисломолочный
Цвет	Молочно-белый, равномерный	Молочно-белый, равномерный	Молочно-белый, равномерный	Молочно-белый, равномерный	Молочно-белый, равномерный	Молочно-белый, равномерный	Молочно-белый, равномерный
Консистенция и внешний вид	Однородная с ненарушенным сгустком	Однородная с ненарушенным сгустком	Не однородная с нарушенным сгустком, хлопьями	Не однородная с нарушенным сгустком, хлопьями	Однородная с ненарушенным сгустком	Не однородная с нарушенным сгустком, хлопьями	Не однородная с нарушенным сгустком, хлопьями

Как следует из данных таблицы 15, при добавлении в молоко здоровых коров 30 % и более молока инфицированных ретровирусами коров,

выработанный кефир имел неудовлетворительные органолептические характеристики. В частности, продукт имел неоднородную консистенцию, хлопьевидный сгусток жирноватой мажущейся консистенции.

Рисунки 15 и 16 наглядно иллюстрируют сложившиеся тенденции.

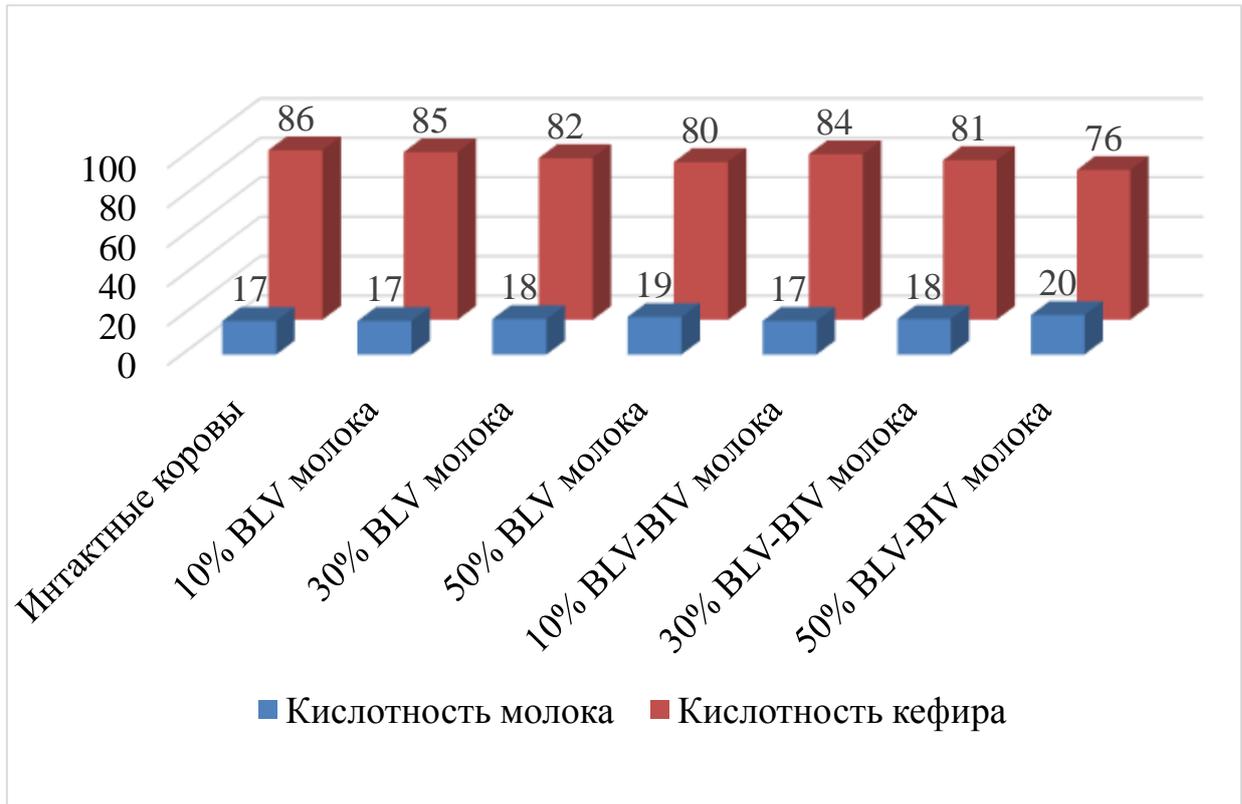


Рисунок 15 – Взаимосвязь кислотности готового продукта и исходного сырья.

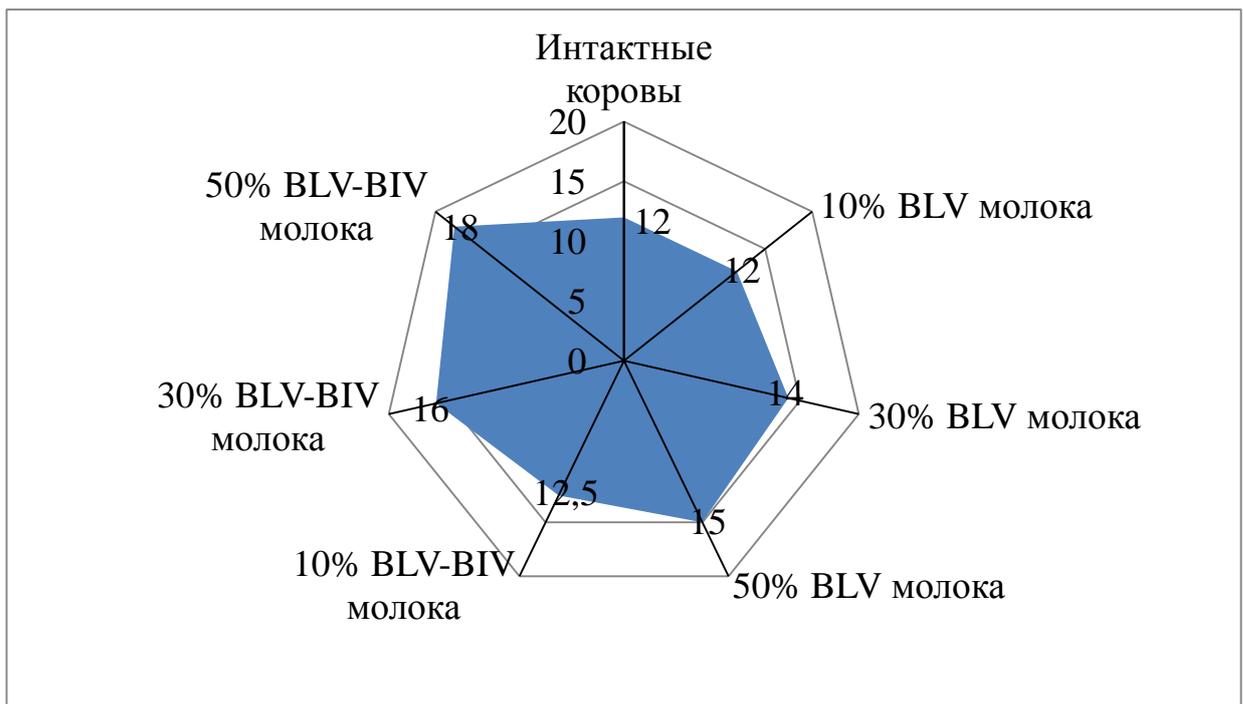


Рисунок 16 – Время приготовления кефира из разных проб молока.

Как показано на рисунке 15, несмотря на то, что сборные пробы, содежащие молоко инфицированных ретровирусами коров в количестве 30 % и 50 %, изначально имели более высокую кислотность, чем молоко здоровых коров и пробы, содежащие 10 % инфицированного ретровирусами молока, кислотность готового продукта в пробах, содежащих молоко зараженных коров, напротив, была ниже.

При этом, как иллюстрирует рисунок 16, время приготовления продукта увеличивалось. Уже при добавлении в сборное молоко 10 % молока коинфицированных коров, время приготовления кефира увеличивалось на 4 % относительно времени переработки молока здоровых коров. При повышении содержания молока *BLV* и *BLV-BIV*-инфицированных коров в составе сборного до 30%, время ферментации увеличивалось на 16 % и 33 %, соответственно. Когда же количество молока *BLV* и *BLV-BIV*-инфицированных коров в составе сборного возрастало до 50 %, время приготовления кефира увеличивалось на 25 % и 50 %, соответственно.

Следовательно, попадание примеси молока инфицированных ретровирусами коров, даже в небольшом количестве, снижает технологические свойства молока, как сырья. А увеличение содержания некачественного молока в составе сборного способствует значительному повышению временных затрат на производство готового продукта и, соответственно, может приводить к снижению рентабельности производства кисломолочных продуктов на молокоперерабатывающих предприятиях.

Немаловажными являются и микробиологические характеристики выработанного продукта, так как они коррелируют не только с лечебными свойствами и сроками хранения кефира, но и с биологической безопасностью кисломолочного продукта. Результаты микробиологических исследований выработанного кефира отражены в таблице 16.

Таблица 16 - Микробиологические исследования выработанного кефира

Показатель	Из молока интактных коров (n=3)	10% молока <i>BLV</i> -инфицированных коров(n=3)	30% молока <i>BLV</i> -инфицированных коров(n=3)	50% молока <i>BLV</i> -инфицированных коров(n=3)	10% молока <i>BLV-BIV</i> -инфицированных коров(n=3)	30% молока <i>BLV-BIV</i> -инфицированных коров(n=3)	50% молока <i>BLV-BIV</i> -инфицированных коров(n=3)
Молочно-кислых микроорганизмов КОЕ/мл	$6 \times 10^7 \pm 1,2 \times 10^6$	$1 \times 10^7 \pm 2 \times 10^5^*$	$6,5 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^4^*$	$1 \times 10^5 \pm 3 \times 10^3^*$	$1 \times 10^6 \pm 3 \times 10^4^*$	$1 \times 10^5 \pm 2 \times 10^3^*$	$1 \times 10^4 \pm 3 \times 10^2^*$
БГКП: В 0,1 мл В 0,01 мл	- -	- -	- -	- +	- -	- +	+ +
<i>Salmonella</i> spp. в 25 мл	-	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i> в 1 мл	-	-	-	-	-	-	-
<i>L.monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-
Плесени, КОЕ/г	-	-	$30 \pm 5^*$	$50 \pm 5^*$	-	$50 \pm 5^*$	$50 \pm 5^*$

Примечание: *- достоверные отличия опытных групп от контроля ($p < 0,05$)

Как следует из данных таблицы 16, уже при добавлении 10 % молока микст-инфицированных ретровирусами коров, количество молочнокислых микроорганизмов в готовом продукте было на один порядок ниже, чем того требуют стандарты, принятые ТР ТС 033/2013. При увеличении количества молока инфицированных коров в составе сборного на 30 % и 50 %, содержание молочнокислых микроорганизмов снижалось уже на 2 и даже 3 порядка. Известно, что ингибирование гнилостных процессов при употреблении кисломолочных продуктов происходит благодаря продуктам жизнедеятельности кисломолочных микроорганизмов. Следовательно, снижение их количества может повлечь другие несоответствия санитарно-микробиологических показателей. На рисунке 17 отражена корреляционная тенденция между показателем КМАФАнМ в исходном сырье и количеством молочнокислых микроорганизмов в готовом продукте.

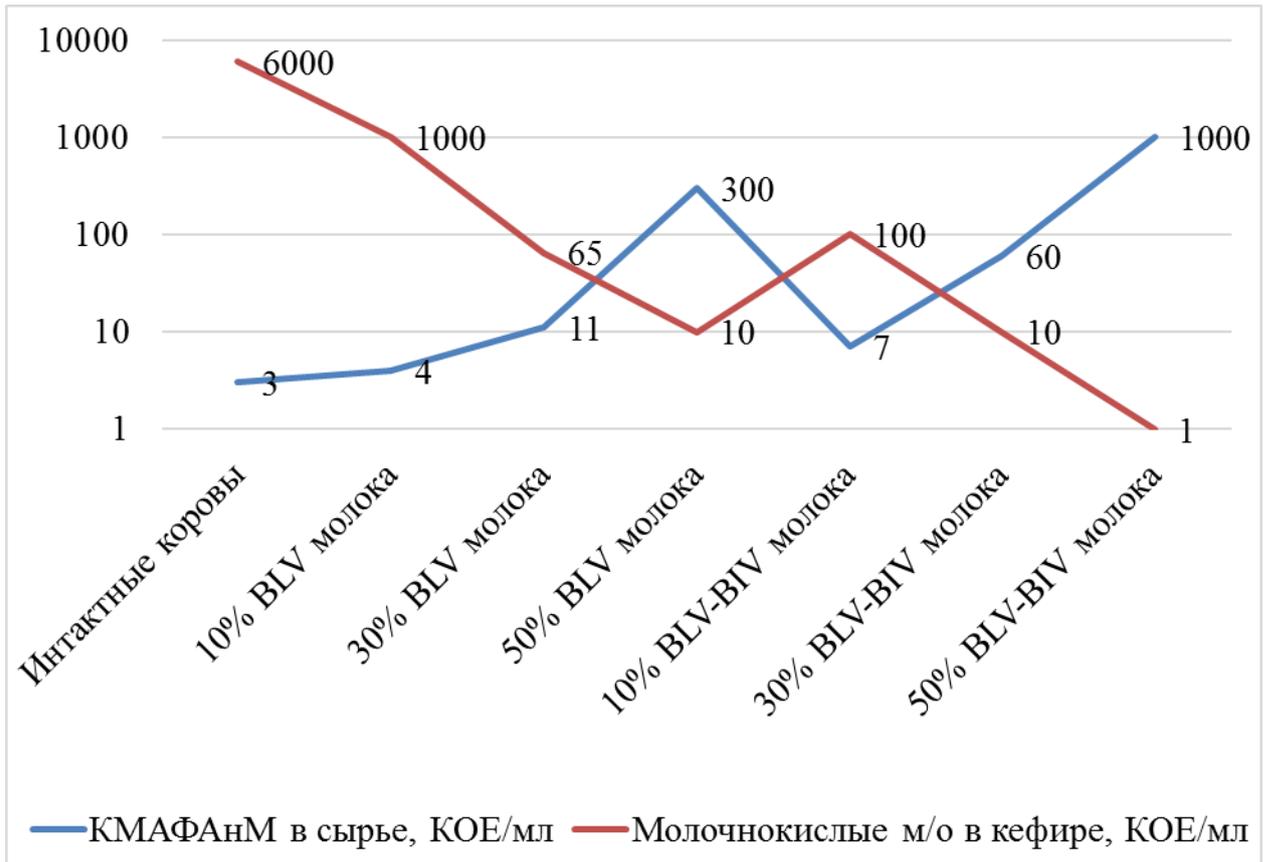


Рисунок 17 – Корреляция между бактериальной обсемененностью молока и количеством молочнокислых бактерий в кефире ($Lg 1 \times 10^4$).

Как показано на рисунке 17, между показателем КМАФАнМ в исходном сырье и количеством молочнокислых микроорганизмов в готовом продукте существует обратная корреляция. То есть при увеличении количества секундарной микрофлоры в молоке, содержание молочнокислых микроорганизмов в готовом продукте снижется. Это связано с тем, что секундарная микрофлора конкурирует с молочнокислыми микроорганизмами за питательные вещества молока, в том числе за лактозу. При этом прослеживается тенденция: снижение количества молочнокислых бактерий на 1 порядок, сопровождается снижением кислотности готового продукта на 5 пунктов по шкале Тернера, а на 2 порядка, соответственно – на 10 пунктов.

В выработанном кефире не было обнаружено сальмонелл, золотистого стафилококка и листерий. Однако в нем обнаруживались плесневые грибы, при содержании в исходном сырье 30 % и 50 % молока инфицированных

ретровирусами коров. Данный факт является следствием недостаточного количества молочнокислых бактерий и низкой кислотности выработанного продукта.

Таким образом, молоко инфицированных ретровирусами коров имеет сниженную питательную ценность за счет качественного изменения белкового состава и молочной микрофлоры. В качестве сырья для производства кисломолочных продуктов оно также не пригодно. Это выражается в снижении количества получаемого готового продукта при увеличении времени сквашивания молока. При этом полученный продукт имеет неудовлетворительные органолептические свойства и не соответствует по микробиологическим показателям требованиям ТР ТС 033/2013. Примесь молока *BIV* и *BIV-BLV* инфицированных коров будет снижать качество сборного товарного молока. Следовательно, усиление контроля за предотвращением попадания молока от инфицированных ретровирусами животных в торговую сеть и усиление контроля за распространением *BIV* и *BLV* среди КРС является важной задачей, стоящей в настоящее время перед ветеринарной службой.

2.2.2.4. Разработка методов детекции ретровирусов крупного рогатого скота

Согласно анализа литературных данных, ряд исследователей отмечают несоответствие результатов ПЦР и РИД исследований. Так, ПЦР-позитивных особей выявляют среди РИД-отрицательных животных. По литературным данным, у большинства отелившихся инфицированных коров снижается титр сывороточных антител, более чем у 20 % животных антитела в РИД не обнаруживаются, тогда, как в молозиве этих животных выявляется высокий уровень противовирусных антител. Восстановление «выпавшей» РИД происходит в основном через 14 - 30 суток, однако у 10 % из этих животных сероконверсия антител может отсутствовать до 3 месяцев. Таким образом, среди половозрелых инфицированных животных постоянно имеются особи,

сыворотка крови которых отрицательно реагирует в РИД. Они являются источником распространения инфекции в стаде.

Бывают и случаи выявления ПЦР-негативных животных среди РИД-положительных. Это может быть следствием неспецифической серологической реакции, например, в связи с изменением иммунологической реактивности у стельных и высокопродуктивных коров. Повышенное содержание липидов в сыворотке крови коров с высокой жирностью молока так же может послужить причиной неадекватного результата при серологическом обследовании. Как правило, КРС находится на интенсивном концентратном типе кормления для поддержания молочной и мясной продуктивности. В сыворотке крови таких животных содержится большое количество различных белковых фракций, что также может отразиться на результатах серологических реакций.

По результатам наших исследований, в среднем, 20 % РИД-положительных коров, не показывали наличия в крови провируса *BLV*. В то время как около 50 % носителей вируса, диагностированных в ПЦР, не выявляются методом РИД. Метод ПЦР направлен на обнаружение ДНК возбудителя в исследуемом материале, что позволяет выявлять и исключать из эпизоотической цепи не только больных животных, но и латентных носителей вируса.

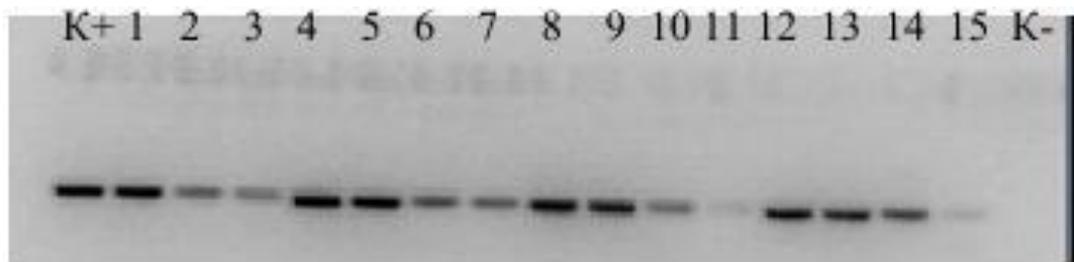
Использование ПЦР для выявления молока инфицированных ретровирусами коров

Анализ литературных данных свидетельствует, что имеется тенденция расширения тропизма вируса лейкоза крупного рогатого скота в зараженном организме. Вирус выявляют в эпителии молочной железы, печени и почек. *BLV* активно реплицируется в эпителиальных клетках молочной железы, накапливаясь в больших количествах в молоке.

Есть данные об успешном применении полимеразной цепной реакции для определения инфекционных агентов в продуктах питания, в том числе в

молоке. Наш опыт использования ПЦР для исследования молока на наличие *BLV*-инфекции показал, что классическая ПЦР не всегда даёт положительный результат при исследовании молока инфицированных лейкозом коров. В частности, при исследовании 6 проб молока от *BLV*-инфицированных коров, принадлежащих подсобному хозяйству Краснокутского зооветеринарного техникума, только в 1 пробе ПЦР в классическом ее исполнении показала положительный результат. При том, что все коровы были признаны больными по результатам гематологических исследований. Возможно, это было связано с тем, что в молоке содержалось недостаточное количество инфицированных лимфоцитов. В связи с этим возникает необходимость совершенствовать контроль над продукцией животного происхождения, адаптируя для этого существующие передовые технологии.

В результате исследования 43 проб цельного молока от серопозитивных в реакции иммунодиффузии коров, показавших наличие провирусной ДНК в крови при исследовании методом ПЦР, принадлежащих ООО «Ягоднополянское Татищевского района», с проведением обратной транскрипции (ОТ) перед постановкой ПЦР, во всех случаях были получены положительные результаты (рисунок 18).



Примечание:

К+ - положительный контроль

К- - отрицательный контроль

1-15 – пробы молока

Рисунок 18 - Исследование проб молока методом ОТ-ПЦР на наличие *BLV*.

Как показано на рисунке 18, все исследованные пробы молока дали положительный результат в ПЦР, то есть содержали *Bovine leukemia virus*. Это видно по наличию полос на уровне положительного контроля в треках всех проб, при отсутствии такой полосы в отрицательном контроле. Что

свидетельствует о возможности применения ПЦР для определения наличия возбудителя ЭЛ КРС в молоке коров.

По нашему мнению, применение ОТ значительно повышает чувствительность ПЦР при исследовании свежего молока. В молоке содержится не так много лимфоцитов, как в крови, а эпителий молочных желез, содержащий РНК вируса, позволяет обогатить исследуемый материал кДНК, полученной в результате реакции обратной транскрипции. Очевидно, что это закономерно только для свежего молока, так как при длительном хранении и бактериальные рестриктазы повредят вирус. Поэтому, для исследования методом ПЦР, молоко от коров, подозрительных на заражение *BLV*, мы рекомендуем охлаждать и исследовать в первые часы после получения, пока длится бактерицидная фаза. При отсутствии такой возможности, молоко нужно замораживать.

Возможность проведения подобных анализов особенно актуальна в весенний период, когда массовая диагностика на лейкоз КРС (методом РИД) совпадает с проведением профилактической вакцинации скота от сибирской язвы. При этой обработке кровь от животных брать запрещено, а молоко является доступным материалом и может подтвердить или опровергнуть результаты РИД.

Сравнительный компьютерный анализ генома ретровирусов крупного рогатого скота

Метод ПЦР обладает высокой чувствительностью и специфичностью, подходит для рутинной диагностики благодаря возможности автоматизации. Универсальность постановки реакции позволяет осуществлять многопараметрический анализ одного и того же объекта, например, выявлять одновременно вирус лейкоза и иммунодефицита в лимфоцитах периферической крови животных (мультиплексная ПЦР). Специфичность метода ПЦР определяют праймеры – олигонуклеотиды, комплементарные части уникального и наиболее консервативного фрагмента вирусного генома.

Поэтому конструирование или подбор праймеров является ключевым моментом в разработке способа.

Сравнительный анализ молекулярно-генетической структуры геномов возбудителей вирусного иммунодефицита и лейкоза КРС позволил нам определить области, наиболее подходящие для конструирования праймеров. Анализ полногеномных последовательностей *BIV* и *BLV*, полученных с ресурса NCBI, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/9626225?report=graph>) показанл, что геномы *BIV* и *BLV* имеют сходную и структуру, и фактически одинаковый размер. Однако в результате сравнения между собой нуклеотидных последовательностей *BIV* и *BLV* с помощью программы Blast 2 sequences (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_Query_237855), не смотря на высокую степень генетической гомологии возбудителей (48%), в геномах *BIV* и *BLV* было выявлено лишь 2% участков со степенью гомологии, приближающейся к абсолютной (93-100%). Эти участки локализованы в основном в областях генов *env*, *tax* и *gex* *BLV*, а также экзонов *biv* gr 3, *biv* gr 4 и гена *env* *BIV*. Еще два участка высокой гомологии были обнаружены в области LTR вирусных геномов и в центральной части гена *pol*. Локусы с высокой и абсолютной степенью гомологии геномов *BIV* и *BLV* имеют длину 12-16 п.н., что является оптимальным размером для праймеров. Расположены они достаточно близко друг к другу, в основном в диапазоне 5-8 тыс п.н., за редким исключением. В случае полного или частичного перекрытия этих областей, ПЦР будет давать ложноположительный результат. Вследствие этого *BIV*-инфекция может быть интерпретирована как *BLV* и наоборот. Учитывая, что данные патогены часто встречаются в виде коинфекции, но могут обнаруживаться и виде моноинфекций, а это не допустимо. Следовательно, данные участки не пригодны для дизайна праймеров. Как показал компьютерный анализ, мультидомены генома *BIV* прослеживаются уже начиная с 1600 п.н и фактически до конца генома (7600п.н.), а наиболее консервативным определен локус гена *gag*.

Разработка способа детекции *BIV* методом ПЦР в реальном времени

Следующий этап наших исследований заключался в конструировании специфических олигонуклеотидных праймеров и TaqMan-зонда, комплементарных консервативной области генома *BIV*, и разработке способа их применения в Real-time PCR. Это было необходимо для обеспечения максимальной чувствительности, специфичности и скорости проведения ПЦР, минимизации возможности контаминации образцов, реактивов, помещения и оборудования лаборатории образующимися ампликонами, а также для полной объективности и возможности количественного анализа полученных данных.

Конструирование пары синтетических олигонуклеотидных праймеров и зонда, применяемых для выделения ДНК провируса иммунодефицита КРС и разработку способа диагностики ВИ КРС с их использованием осуществлялись в семь этапов:

1. Анализ структуры генома *BIV*.
2. Конструирование праймеров и зонда.
3. Подбор оптимальной пары праймеров и зонда.
4. Моделирование состава реакционной смеси способа диагностики ВИ КРС с использованием разработанной пары праймеров и зонда.
5. Отработка условий способа диагностики ВИ КРС с использованием разработанной пары праймеров и зонда.
6. Определение чувствительности способа диагностики ВИ КРС с использованием разработанной пары праймеров и зонда.
7. Определение специфичности способа диагностики ВИ КРС с использованием разработанной пары праймеров и зонда.

ПЦР проводили в объеме реакционной смеси 25 мкл при следующем температурно-временном режиме для Rotor-Gene 6000 (Австралия): 95 °С 5 мин. – циклирование 1 [95 °С 20 сек. – 55 °С 20 сек. – 72 °С 20 сек.] 10 повторов - циклирование 2 с детекцией [95 °С 20 сек. – 55 °С 20 сек. – 72 °С 20 сек.] 25 (30) повторов. Флуоресценцию измеряли по каналу Orange при

температуре 55 °С на втором циклировании. При учете результата threshold (порог) устанавливали вручную на уровне 30 % от максимального уровня флуоресценции в последнем цикле амплификации.

На разработанный способ получен Патент РФ № 2595973 «Набор для выявления ДНК провируса иммунодефицита крупного рогатого скота, содержащий пару специфичных праймеров и зонд, предназначенные и способ диагностики вирусного иммунодефицита крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени» (Приложение 1). Разработанный способ диагностики позволяют количественно выявлять на ранних стадиях высоко консервативную область гена gag ВИ КРС. Применение олигонуклеотидного зонда позволяет повысить чувствительность и специфичность ПЦР, исключить субъективность при оценке результатов. Использование предлагаемой модификации ПЦР позволяет значительно снизить возможность контаминации образцов, помещения, оборудования и реактивов, а также сократить сроки проведения анализа, что важно, как для владельцев животных, так и для ветеринарных специалистов.

Разработка способа детекции BIV и BLV методом мультиплексной ПЦР

Мультиплексная ПЦР является удачным решением в тех случаях, когда диагностику предпочтительно осуществлять сразу на обе инфекции, что позволяет экономить время и реактивы. В случае мультиплексной ПЦР, к структуре праймеров предъявляют следующие требования:

- комплементарность выбранному фрагменту;
- отсутствие взаимо- и самокомплементарности;
- GC-состав ~ 40-60%;
- близкие температуры плавления праймеров;
- близкие температуры отжига праймеров;
- формирование ампликонов, отличающихся по размеру для каждой пары праймеров.

Поставленная перед нами на данном этапе исследований задача заключалась в разработке быстрого, высокоспецифичного и чувствительного, относительно дешёвого способа одновременного обнаружения ДНК провирусов *BIV* и *BLV* методом мультиплексной ПЦР.

Разработка способа диагностики вирусного иммунодефицита и лейкоза КРС осуществлялись в три этапа:

1. Подбор оптимально сочетающихся между собой двух пар праймеров.
2. Моделирование состава реакционной смеси для разрабатываемой диагностической системы.
3. Подбор условий температурно-временного режима проведения мультиплексной ПЦР.

На основании проведенного литературного поиска и компьютерного анализа были отобраны две пары праймеров: pBLVf и pBLVr (Panei, C.J. et al., 2013); pBIVf и pBIVr (Колотвин, В.В., 2007):

PrmBIVf GTCTTCCCACATCCGTAACATCTCCT,

PrmBIVr CCCCAGGTCCCATCAACATTCATCAG – фрагмент 382 п.н.;

PrmBLVf TATTCCACCCTCGCAAGGC,

PrmBLVr GGGCAGTTGATCCAGAGTCGT – фрагмент 609 п.н.

ПЦР проводили в объеме реакционной смеси – 25 мкл при следующем температурно-временном режиме для T100 (BioRad): 95 °С 3 мин. – цикл [95 °С 20 сек. – 58 °С 20 сек. – 72 °С 40 сек.] 35 повторов – 72 °С 5 мин. Учет осуществляли методом горизонтального гельэлектрофореза.

На разработанный способ получен патент РФ № 2615465 «Диагностическая система для выявления ДНК провирусов лейкоза и иммунодефицита крупного рогатого скота методом мультиплексной полимеразной цепной реакции и способ их применения» (Приложение 2). Разработанный способ позволяет единовременно детектировать высококонсервативные области *BIV* и *BLV* в исследуемом материале. Это в 2 раза сокращает материальные и временные затраты на осуществление диагностики вирусного иммунодефицита и лейкоза крупного рогатого скота.

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно литературным данным и результатам собственных исследований, ретровирусы широко распространены среди крупного рогатого скота (Suh et al, 2005; Красникова и др, 2012, 2016). В последние годы на территории Российской Федерации в структуре инфекционной патологии крупного рогатого скота лейкоз занимает одно из ведущих мест. Заболевание наносит значительный экономический ущерб. Животные, инфицированные вирусом лейкоза, представляют собой опасность и для определенных категорий людей, так как *BLV* потенциально опасен для человека (Buehring et al, 2003; Климов, 2012), а молоко больных и инфицированных животных обладает пониженной питательной ценностью и содержит опасные для организма человека метаболиты (Гулюкин и Снежова, 1991; Закрепина 2010). Вирусный иммунодефицит крупного рогатого скота является малоизученной инфекцией. В литературе нет сведений о влиянии *BIV* инфекции на качество и безопасность коровьего молока. Однако вероятность попадания такого молока в товарное не исключена.

В ходе исследования мы провели оценку органолептических, физико-химических, микробиологических, питательных и технологических свойств молока, полученного от инфицированных ретровирусами коров. Были изучены свойства кисломолочных продуктов, выработанных из такого молока и из сборного молока с различным количеством примеси инфицированного, в том числе способность этих продуктов противостоять порче в условиях холодильника. Дано обоснование нецелесообразности использования молока инфицированных ретровирусами коров и сборного молока, в составе которого оно содержится, в качестве сырья для производства кисломолочных продуктов.

Таким образом, полученные данные позволяют глубже понять сущность изменений и механизм нарушений, влияющих на качество и технологические свойства молока, получаемого от инфицированных ретровирусами коров. Эпизоотический мониторинг выявил тенденции,

играющие ключевую роль для совершенствования диагностики ретровирусных инфекций крупного рогатого скота, с целью недопущения попадания молока инфицированных ретровирусами коров в товарное. Проведенные исследования позволили сделать следующие выводы и представить рекомендации по их практическому использованию.

Выводы:

1. Жирность молока *BIV*-, *BLV*- и *BIV-BLV*- инфицированных коров повышается в среднем на 5,3 %, 13,1 % и 34,2 %, при снижении количества общего белка на 3,1 %, 3,5 % и 11,8 %, а также СОМО на 5,7 %, 11,5 % и 17,2 %, соответственно; в молоке *BLV* и *BLV-BIV*-инфицированных животных превышены нормы содержания соматических клеток.

2. Эффективность пастеризации находится в прямой корреляции с температурой обработки молока, мгновенная пастеризация наиболее эффективна для молока инфицированных ретровирусами коров.

3. В молоке микст-инфицированных ретровирусами коров в первый день хранения высокомолекулярные белки составляют всего 3,4 %, при этом молоко инфицированных ретровирусами коров имеет измененный аминокислотный состав и балланс в сравнении с молоком здоровых коров.

4. Кисломолочный продукт «Снежок», выработанный из молока *BLV-BIV*-инфицированных коров, имеет неоднородную консистенцию и нарушенный сгусток, расслаивается при хранении в холодильнике, содержит 1×10^5 КОЕ/мл молочнокислых бактерий, его кислотность составляет 65 °Т, показатель СОМО снижен на 25 %, а временные затраты при его производстве повышаются на 33,33 %.

5. Творог, выработанный из молока *BIV* и *BIV-BLV* инфицированных коров, имеет жирную мажущуюся консистенцию, недостаточно оформленное зерно при невыраженном запахе; содержит в своем составе постороннюю микрофлору, в том числе БГКП и микроскопические грибы; количество молочнокислых микроорганизмов в нем составляет 5×10^4 и 6×10^3 КОЕ/мл, при снижении кислотности на 20 и 40 °Т и содержания кальция на 13,3 % и

30,0 %, соответственно; временные затраты на выработку продукта увеличиваются на 21,6 и 35,1%, а выход продукции при этом снижается на 27,8 и 44,4%, соответственно.

6. При хранении в холодильнике творога, выработанного из молока *BIV*- и *BIV-BLV*-инфицированных коров, его кислотность изменяется не значительно, однако в нем увеличивается количество посторонней микрофлоры, в течение нескольких дней он приобретает мажущую консистенцию и неприятный запах.

7. При содержании в сборной пробе молока инфицированных ретровирусами коров, вырабатываемый кефир имеет неоднородную консистенцию с жирноватыми мажущимися хлопьями; отмечена тенденция снижения кислотности готового продукта и содержания в нем молочнокислых бактерий на фоне присутствия плесневых грибов; при этом время приготовления продукта увеличивается на 4 % - 50 % в зависимости от количества молока инфицированных ретровирусами коров в составе сборного.

Практические предложения

1. Разработанные способы ПЦР-детекции ретровирусов крупного рогатого скота: патенты РФ на изобретение № 2595973 и № 252615465 рекомендуются специалистам ветеринарных лабораторий для скрининговых исследований животных и получаемой от них продукции с целью повышения качества сырья, поступающего на молокоперерабатывающие предприятия.

2. При закупках на молокоперерабатывающих предприятиях, руководителям и специалистам необходимо владеть информацией об эпизоотической ситуации хозяйств и регионов, из которых осуществляются поставки молока с целью недопущения некачественного сырья в переработку.

3. Руководителям и специалистам предприятий нельзя допускать в переработку молоко инфицированных ретровирусами коров, так как это приводит к снижению качества вырабатываемой продукции.

4. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

КРС – крупный рогатый скот

СПИД - синдром приобретенного иммунодефицита

ЭЛ КРС – энзоотический лейкоз крупного рогатого скота

ВИЧ - вирус иммунодефицита человека

ВЛ КРС – вирус лейкоза крупного рогатого скота

ВИ КРС – вирус иммунодефицита крупного рогатого скота

BIV - Bovine immunodeficiency virus

BLV - Bovine leukemia virus

HIV - human immunodeficiency virus

PL – поликлональная пролиферация

SBL - спорадический лейкоз КРС

EVL - энзоотический лейкоз КРС

ПС КРС - паралитический синдром крупного рогатого скота

БГКП – бактерии группы кишечной палочки

КМАФАнМ – количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов

КОЕ – колонии образующие единицы

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

НК – нуклеиновые кислоты

РИД – реакция иммунодиффузии

ИФА - иммуноферментный анализ

ПЦР - полимеразная цепная реакция

RT-PCR – ПЦР в реальном времени

ОТ – обратная транскрипция

5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

6. Абакин, С.С. Новые подходы в диагностике и оздоровлении стад от вирусов лейкоза и иммунодефицита крупного рогатого скота / С.С. Абакин, С.В. Криворучко//Ветеринарная патология. - 2013. - № 1 (43). - С. 36-39.
7. Бурба, В.Г. Применение ПЦР для выявления вируса иммунодефицита КРС у животных в крови и пробах мяса / В.Г. Бурба, Д.С. Меграбян, В.В. Колотвин и др. // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2009. - №2. – С. 29 – 30.
8. Бурба, Л.Г. Диагностика лейкозов сельскохозяйственных животных/ Л.Г. Бурба, А.А. Кунаков // М.: Колос, 1983. С. 191.
9. Бурба, Л.Г. Лейкозы и злокачественные опухоли животных / Л.Г. Бурба, А.Ф. Валихов, В.А. Горбатов и др. // 2-е изд., перераб. и доп. М.: Агропромиздат, 1988, 400 с.
10. Влияние концентрата фульвово́й кислоты на морфобиохимические показатели крови крупного рогатого скота, инфицированного BLV / О.А. Рожков, В.И. Боровой, П.Н. Смирнов и др. // Инновации и продовольственная безопасность. 2016. № 2 (12). С. 5-10.
11. Влияние ретровирусной инфекции коров на технологию и сроки хранения творога / Е.С. Красникова, В.А. Агольцов, А.В. Красников, Г.Х. Утанова // Вестник КрасГАУ. 2017. - №12 (135). – С. 50-59.
12. Генотипическая идентификация вируса бычьего лейкоза/ Р.Р. Вафин, Н.З. Хазипов, А.Ю. Шаева и др.// Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 2014. - № 4. С. - 34-40.
13. Горбатова, К.К. Химия и физика молока и молочных продуктов / К.К. Горбатова, П.И. Гунькова. – СПб.: ГИОРД, 2012. – 336 с.
14. Гулюкин, М.И. Распространение и меры борьбы с лейкозом крупного рогатого скота в Российской Федерации / М.И. Гулюкин, Л.А. Иванова //В сборнике: Единый мир - единое здоровье Материалы конгресса. - 2017. - С. 80-85.

15. Диагностическая система для выявления ДНК провирусов лейкоза и иммунодефицита крупного рогатого скота методом мультиплексной полимеразной цепной реакции / Е.С. Красникова, О.С. Ларионова, А.В. Красников, Г.Х. Утанова, А.С. Белякова // Патент №2615465. – Опубликовано 04.04.2017. – Бюллетень № 10.
16. Донник, И.М. Изучение молекулярно-генетической структуры вируса лейкоза крупного рогатого скота в регионе УРФО / И.М. Донник, М.В. Петропавловский // В сборнике: Современные молекулярно-генетические и иммуно-физиологические подходы к ликвидации гемобластозов животных ФГБНУ Уральский научно-исследовательский ветеринарный институт, ФГБОУ ВПО Уральский государственный аграрный университет. Екатеринбург, 2014. С. 131-138.
17. Донник, И.М. Качественная характеристика молозива здорового и инфицированного вирусом лейкоза поголовья коров / И.М. Донник, М.В. Петропавловский // Ветеринария Кубани. – 2015. - № 4. – С. 15-16.
18. Донник, И.М. Синцитиальный метод при ранней идентификации вируса лейкоза крупного рогатого скота / И.М. Донник, М.В. Петропавловский // Ветеринария Кубани. - 2015. - № 4. - С. 8-10.
19. Донник, И.М. Характеристика различных генотипических вариаций вируса лейкоза крупного рогатого скота, в популяции животных разных регионов России/ И.М. Донник, А.Т. Татарчук, М.В. Петропавловский // В сборнике: Современные молекулярно-генетические и иммуно-физиологические подходы к ликвидации гемобластозов животных ФГБНУ Уральский научно-исследовательский ветеринарный институт, ФГБОУ ВПО Уральский государственный аграрный университет. Екатеринбург, 2014. - С. 112-117.
20. Думбур, К.Ф. Содержание аминокислот в сыворотке молока у здоровых и больных лимфолейкозом коров / К.Ф. Думбур // Эпизоотология, диагностика и меры борьбы при лейкозе крупного рогатого скота: Межвузовский сб. научн. трудов. - Персиановка, 1990. - С. 63-70.

21. Закрепина, Е.Н. Лейкоз крупного рогатого скота и его влияние на количественные и качественные показатели молочной продуктивности коров: автореф. дис... канд. вет. наук. / Е. Н. Закрепина. – Вологда-Молочное, 2001. – 24 с.
22. Значение лейкомоидных реакций в диагностике неинфекционной патологии у животных / Смирнов П.Н., Тростянский И.В., Гарматарова Т.В. и др. // В сборнике: Актуальные проблемы сельского хозяйства горных территорий материалы VI-й Международной научно-практической конференции. Горно-Алтайск, 2017. С. 269-274.
23. Изучение селективных подходов к созданию резистентного к вирусу лейкоза крупного рогатого скота стада/ И.М. Донник, А.Т. Татарчук, М.В. Петропавловский и др // В сборнике: Современные молекулярно-генетические и иммуно-физиологические подходы к ликвидации гемобластозов животных ФГБНУ Уральский научно-исследовательский ветеринарный институт, ФГБОУ ВПО Уральский государственный аграрный университет. Екатеринбург, 2014. - С. 138-142.
24. Климов, Е.А. К вопросу о возможности заражения человека вирусом лейкоза крупного рогатого скота /Е.А. Климов, Г.Ю. Косовский // Ветеринарная медицина. – 2012. - №2. – С. 9-11.
25. Колотвин, В.В. Вирус иммунодефицита крупного рогатого скота: индикация инфекции и распространенность в хозяйствах Российской Федерации: автореф. дисс... канд. биол. наук. / В.В. Колотвин. – Москва: ГНУ ВНИИ ЭВ, 2007. – 24с.
26. Колотвин, В.В. Выявление вируса иммунодефицита КРС в Московской области / В.В. Колотвин, А.В. Капитонов, Н.Ф. Гриненко и др. // Рос. Вет. журн. С.-х. животные. – 2006. - № 2. – С. 18-20.
27. Коромыслов, Г.Ф. Основы профилактики и ликвидации лейкоза крупного рогатого скота / Г.Ф. Коромыслов, Л.Г. Бурба, В.М. Нахмансон //Ветеринария. - №4.- 1993. - С.7-11.

28. Красников, А.В. Анализ инфицированности крупного рогатого скота ретровирусными инфекциями в Саратовской области./ А.В. Красников, О.С. Ларионова, Г.Х. Утанова // Аграрный научный журнал. – № 2 . – 2015. – С. 15 – 18.
29. Красникова, Е.С. Анализ аминокислотного состава молока коров, инфицированных ретровирусами/ Г.Х. Утанова, Е.С. Красникова, А.В. Банникова, А.В. Евтеев// Материалы II международной студенческой научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной хирургии, онкологии и терапии». – Саратов: ИЦ «Наука» - 2016. – С. 87 - 92.
30. Красникова, Е.С. Оценка качества молока, полученного от инфицированных ретровирусами коров, и определение способов его переработки/ Г.Х. Утанова, Н.А. Федосов, А.А. Щербаков// Научное обозрение. - №17. – 2015. - С.10 – 15.
31. Красникова, Е.С. Применения полимеразной цепной реакции для детекции возбудителя энзоотического лейкоза в молоке коров/Е.С. Красникова, Г.Х. Утанова//Вестник ветеринарии. - №70(3). – 2014. - С. 27 - 29.
32. Красникова, Е.С. Диагностическая ценность молекулярно-генетического метода (ПЦР) в диагностике вирусных инфекций животных / Е.С. Красникова // Ветеринарная медицина XXI века. Инновации, обмен опытом и перспективы развития: материалы Международной научно-практической конференции. - Саратов, 2012. - С. 189 - 191.
33. Красникова, Е.С. Ретроспективный анализ заболеваемости вирусом иммунодефицита крупного рогатого скота / Е.С. Красникова // Мат. Науч.-практических конференций 2 специализированной агропромышленной выставки САРАТОВ – АГРО. – Саратов, 2011. – С 34-36.
34. Красникова, Е.С. Скрининговые исследования на лейкоз крупного рогатого скота / Е.С. Красникова, О.Е. Семенова, В.А. Агольцов, П.С. Мелкина // Аграрная наука в XXI веке: проблемы и перспективы: сб. ст. VII всерос. науч.-практич. конф. – Саратов, 2013. – С. 193-195.

35. Красникова, Е.С. Сравнительный анализ эффективности ПЦР и ИХА при диагностике вирусных иммунодефицитов и лейкозов животных / Е.С. Красникова, В.А. Агольцов, А.А. Щербаков, О.Е. Семенова // Вестник Ветеринарии – 2012. – вып. 63, № 4. – С.-60-62.
36. Красникова, Е.С. Усовершенствование методов диагностики лейкоза крупного рогатого скота в районных ветеринарных лабораториях / Е.С. Красникова, С.В. Ларионов, В.А. Агольцов // Восьмой саратовский салон изобретений, инноваций и инвестиций. – Саратов: Буква, 2013. – С. 117-118.
37. Красникова, Е.С. Эпизоотическая ситуация по ретровирусным инфекциям животных в Саратовской области и оптимизация лабораторной диагностики / Е.С. Красникова, В.А. Агольцов, О.Е. Семенова // Современные технологии в ветеринарии зоотехнии. Творческое наследие В.К. Бирха: мат. Междунар. науч.-практич. конф. – Пермь, 2013. – С. 100-106.
38. Криворучко, С.В. Вирус иммунодефицита крупного рогатого скота в хозяйствах Ставропольского края/ С.В. Криворучко, С.С. Абакин, Г.А. Дубравная // Ветеринарная патология. - 2012. - № 2 (40). - С. 35-38.
39. Крикун, В.А. Лейкоз крупного рогатого скота: автореф. дис... докт. вет. наук. – М., 1999. – 50 с.
40. Кудрявцева, Т.П. Лейкоз животных. / Т.П. Кудрявцева //М.: Россельхозиздат, 1980. - С. 158.
41. Кузин, А.И. Влияние лейкоза на продуктивность коров и качество молока / А.И. Кузин, Е.Н. Закрепина // Ветеринария. – 1997. - №2. – С. 19-21.
42. Кузин, А.И. О влиянии инфекционного процесса на качественные показатели молока у коров / А.И. Кузин, Е.Н. Закрепина // Бюл. ВИЭВ. – 1996. – Вып. 77. – С, 69-70.
43. Кузин, А.И. Показатели аминокислотного состава молока и сыворотки крови при лейкозе крупного рогатого скота / А.И. Кузин, Е.Н. Закрепина // Профилактика и ликвидация болезней сельскохозяйственных животных: мат. конф. – Вологда – Молочное, 1995. – С.6-9.

44. Кузин, А.И. Продуктивность и качество молока у коров при лейкозе / А.И. Кузин, Е.Н. Закрепина // Тр. ВИЭВ. – 1999. – Т. 72. – С. 215-217.
45. Лейкоз крупного рогатого скота в курганской области, анализ ситуации и причины распространения/ И.М. Донник, А.Т. Татарчук, Л.В. Халтурина и др. //Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2015. - № 2. - С. 39-42.
46. Медицинская микробиология. URL: <http://meduniver.com/Medical/Microbiology/1032.html> MedUniver.
47. Метод изучения нуклеотидных последовательностей BLV/ П.Н. Смирнов, Н.В. Батенёва, С.П. Князев и др//Международный научно-исследовательский журнал. - 2015. - № 7-2 (38). - С. 95-98.
48. Москалик, Р.С. Роль профессиональной этики в решении проблемы лейкоза крупного рогатого скота / Р.С. Москалик//Труды ВИЭВ, том 72. Ретровирусные и прионные инфекции животных. – М.: ВИЭВ, 1999. С. 75-85.
49. Набор для выявления ДНК провируса иммунодефицита крупного рогатого скота, содержащий пару специфичных праймеров и зонд, предназначенные и способ диагностики вирусного иммунодефицита крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / Е.С. Красникова, О.С. Ларионова, А.В. Красников, Г.Х. Утанова // Патент №2595973. – Опубликовано 27.08.2016. – Бюллетень № 24.
50. Нахмансон, В.М. Влияние генетических факторов на возникновение и развитие лейкозов /В.М. Нахмансон //Лейкозы и злокачественные опухоли животных. Под редакцией В.П.Шишкова и Л.Г.Бурбы. М.: Агропромиздат, 1988. С 59-71.
51. Неповинных, Н.В. Использование в производстве кисломолочных продуктов пищевых волокон «Цитри – Фай»/ Н.В. Неповинных, Г.Х. Утанова// Технология и продукты здорового питания: материалы Международной научно- практической конференции / Под ред. Ф.Я.Рудика – Саратов: Буква, 2013.- С. 132 - 134.

52. Неповинных, Н.В. Производство творога традиционным способом/ Н.В. Неповинных, Г.Х. Утанова// Специалисты АПК нового поколения: Материалы Всероссийской научно- практической конференции / Под ред. И.Л. Воротникова. -Саратов: Буква, 2013. - С. 125- 127.
53. Неповинных, Н.В. Современное состояние рынка сладких замороженных продуктов/ Н.В. Неповинных, Г.Х. Утанова//Специалисты АПК нового поколения: материалы Всероссийской научно- практической конференции / Под ред. И.Л. Воротникова. - Саратов: Буква, 2014.- С. 253 – 255.
54. Овсянникова, О.В. Обоснование возможности получения пищевых белковых продуктов из семян подсолнечника/ О.В Овсянникова, М.В. Ксёنز //Науч.-практ. журнал «Сфера услуг: инновации и качество», 2012, 7: 30-43.
55. Разработка эффективного и высокочувствительного способа детекции вируса иммунодефицита крупного рогатого скота/ Е.С. Красникова, А.В. Красников, О.С. Ларионова, Г.Х Утанова // Аграрный научный журнал. - № 4 2017. – С. 15 - 19.
56. Роль молока и крови в распространении вируса лейкоза крупного рогатого скота / М.И. Гулюкин, Н.И. Снежков, В.Н. Снежкова, А.В. Васин // Бюл. ВИЭВ. - Т.70. - 1991. - С. 14-16.
57. Семенова, Л.К. Ветеринарно-санитарная оценка молока коров, больных лейкозом в субклинической стадии /Л.К. Семенова // Дис. на соиск. степени кандидата вет. наук, Минск: 1975.
58. Симонян, Г. А. Полувековая деятельность в лейкозологии / Г.А. Симонян // Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчел: мат. Междунар. науч.-практич. конф. – М.: ВНИИ ЭВ, 2011. – С 24-26.
59. Симонян, Г.А. Ветеринарная гематология / Г.А. Симонян, Ф.Ф. Хисамутдинов. – М.: Колос,1995. – 256 с.
60. Смирнов, П.Н. Анализ структурного разнообразия провируса BLV на основании температурных кривых Real Time Sybrgreen/ П.Н. Смирнов, Н.В.

Батенёва // Международный научно-исследовательский журнал. - 2013. - № 9-1 (16). - С. 52-56.

61. Смирнов, П.Н. Зависимость развития лейкозного процесса от генотипа BLV у крупного рогатого скота/ П.Н. Смирнов, Н.В. Батенёва, Т.В. Гарматарова // Сборник научных трудов Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства. - 2014. - Т. 3. № 7. - С. 472-476.

62. Смирнов, П.Н. Идеальная модель развития лейкозного процесса у крупного рогатого скота: по материалам собственных исследований / П.Н. Смирнов // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2015. - № 2. - С. 80-82.

63. Смирнов, П.Н. Показатели естественной резистентности у инфицированных BLV и интактных к вирусу телок случного возраста/ П.Н. Смирнов, Т.В. Гарматарова // Вестник Новосибирского государственного аграрного университета. - 2014. - № 4 (33). - С. 146-149.

64. Смирнов, П.Н. Хронобиологические исследования патологического процесса при лейкозе жвачных / П.Н. Смирнов // Инновации и продовольственная безопасность. 2016. № 4 (14). С. 7-14.

65. Смирнов, П.Н. Хронобиологические исследования патологического процесса при лейкозе жвачных/ П.Н. Смирнов // Инновации и продовольственная безопасность. - 2016. - № 4 (14). - С. 7-14.

66. Сравнительная эффективность современных диагностических тест-систем в выявлении инфицированных ВЛКРС животных / И.А. Шкуратова, И.М. Донник, А.Т. Татарчук и др // В сборнике: Современные молекулярно-генетические и иммуно-физиологические подходы к ликвидации гемобластозов животных ФГБНУ Уральский научно-исследовательский ветеринарный институт, ФГБОУ ВПО Уральский государственный аграрный университет. Екатеринбург, 2014. - С. 161-166.

67. Сравнительные показатели содержания Т- и В-лимфоцитов, иммуноглобулинов основных классов и циркулирующих иммунных

комплексов (цик) у инфицированных blv и условно-патогенной микрофлорой коров / Павлова А.И., Смирнов П.Н., Корякина Л.П. и др. // Инновации и продовольственная безопасность. 2017. № 1 (15). С. 17-21.

68. Супотницкий, М.В. Эволюционная патология. К вопросу о месте ВИЧ-инфекции и ВИЧ/СПИД-пандемии среди других инфекционных, эпидемических и пандемических процессов / М.В. Супотницкий. –М., 2009. – 400 с.

69. Трофимов, О.В, Поиск маркеров лейкоза крупного рогатого скота на основе цитогенетических исследований / О.В. Трофимов, И.В. Пак, И.М. Донник // Ветеринария Кубани. - 2016. - № 1. - С. 11-13.

70. Трофимов, О.В. Цитологические, генетические и протеомные изменения в крови крупного рогатого скота, инфицированного вирусом лейкоза: автореф. дис. Канд. биол. наук / О.В. Трофимов. – Новосибирск: Тюменский гос. Ун-т., 2013. – 18 с.

71. Утанова, Г.Х. Bovine leukemia virus: социальная значимость и стратегии борьбы/ Г.Х Утанова, Т.А. Плютина// Материалы IV Международной научно-практической конференции «Молодежь и наука XXI века». Том I. - Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина, 2014. С. 143 – 146.

72. Утанова, Г.Х. Ветеринарно-санитарная оценка молока коров при BIV-инфекции/ Г.Х Утанова, Н.А. Федосов// Материалы международной научно – практической конференции молодых ученых и специалистов «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки». – Троицк: ЮУрГАУ, 2015. - С. 237 – 240.

73. Утанова, Г.Х. Влияние генетических детерминант на распространение вируса энзоотического лейкоза крупного рогатого скота/ Г.Х Утанова, Т.А. Плютина, А.П. Силаев// Вестник АПК Ставрополя. - № 1. - 2015.-С. 62 – 66.

74. Утанова, Г.Х. Диагностика бычьего иммунодефицита методом Real-Time PCR/ Г.Х Утанова// Современные тенденции сельскохозяйственного производства в мировой экономике: Материалы XV Международной научно-

практической конференции. – Кемерово: Кемеровский ГСХИ, 2016. – С. 315-320.

75. Утанова, Г.Х. Молекулярно-генетическая диагностика вируса бычьего иммунодефицита/ Г.Х. Утанова, А.П. Силаев// Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА 2017» / Под редакцией академика РАН В.И. Покровского. - ТОМ II. – МОСКВА, 2017. - С. 407 – 408.

76. Утанова, Г.Х. Оценка качества творога из молока BIV и BLV инфицированных коров/ Г.Х. Утанова// Материалы международной конференции к 120-летию создания кафедры микробиологии и к 150-летию профессора Н.Н.Худякова «Современные аспекты сельскохозяйственной микробиологии». Москва: РГАУ МСХ имени К.А. Тиммерязева, 2016. - С. 73 – 74.

77. Утанова, Г.Х. Применения современных молекулярно - генетических технологий с целью выяснения биологической безопасности для человека коровьего молока/ Г.Х. Утанова, Т.А. Плютина// Новые материалы и технологии: состояния вопроса и перспективы развития: сборник материалов Всероссийской молодежной научной конференции. -Саратов: ООО «ИЦ Наука», 2014. - С. 195 - 198.

78. A door-to-door prevalence study of feline immunodeficiency virus in an Australian suburb / J. Chang-Fung-Martel, B. Gummow, G. Burgess et al. // J Feline Med Surg. – 2013, Dec. – Vol. 15(12). – P. 1070-8

79. A serological survey of bovine syncytial virus in Ontario: associations with bovine leukemia and immunodeficiency-like viruses, production records, and management practices. / RM Jacobs, FL Pollari, WB McNab, B Jefferson//Can J Vet Res. - 1995;59:271–278.

80. Abed, Y. A viral transmembrane recombinant protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine immunodeficiency virus infection/ Y. Abed, D. Archambault// J Virol Methods. - 2000;85:109–116.

81. Alfonso, R. Serological prevalence and evaluation of the risk factors of bovine enzootic leukosis in the Bogota savannah and the Ubate and Chiquinquira Valleys/ R Alfonso, JE Almansa, JC Barrera //Colombia. Rev Sci Tech. - 1998;17:723–732.
82. Ambroski, G.F. Serological detection of multiple retroviral infection in cattle bovine leukemia virus bovine syncytial virus and bovine visna virus / G.F. Ambroski, J.L. Lo, C.L Seger // Vet Microbiol. – 1989. – Vol. 20. – P. 247–253.
83. Beier, D. A comparison of serological tests for the diagnosis of enzootic bovine leukosis and eradication of infection from a large herd/ D. Beier, H. Siakkou // Tieraerztl Umsch. – 1994. – Vol. 49. – P. 356–360.
84. Black, J.W. Bluetongue and bovine retrovirus committee report. In: Proceedings of the 93rd Annual Meeting of the US / J.W. Black, Carter Printing Co., V.A. Richmond // Animal Health Association. – 1990. – P. 150–152.
85. BLV-CoCoMo-qPCR: a useful tool for evaluating bovine leukemia virus infection status / M. Jimba, S.N. Takeshima, H. Murakami et al. // BMC Vet Res. – 2012. – Sep, 21. – Vol. 8. – P. 167.
86. Bouillant, AM Replication of the bovine immunodeficiency-like virus in diploid and aneuploid cells: permanent, latent and virus-productive infections in vitro / A.M. Bouillant, G.M. Ruckerbauer, K.H. Nielsen // Res Virol. – 1989, Nov-Dec. - №140(6). P. -:511-512.
87. Bovine immunodeficiency virus: incidence of infection in Mississippi dairy cattle / K StCyr Coats, SB Pruett, JW Nash, CR Cooper. /Vet Microbiol. - 1994 Nov;42(2-3):181–189.
88. Bovine leukemia virus infection in cattle of China: Association with reduced milk production and increased somatic cell score / Y. Yang, W. Fan, Y. Mao et al. // J Dairy Sci. – 2016, May. – Vol. 99(5). – P. 3688-97.
89. Bovine lymphoma / J. A. Angelo's, M. C. Thurmond, Mosby Elsevier, Burlington // In: Large Animal Internal Medicine 5th ed. (Smith, B. P. Ed.). – 2015. – P. 1070–1073.

90. Buehring, G.C. Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus / G.C. Buehring, S.M. Philpott, K.Y. Choi // *AIDS Res Hum Retroviruses*. – 2003, Dec. – Vol. 19(12). – P. 1105-13.
91. Bull, RW. Joint report of the Third International Bovine Lymphocyte Antigen (BoLA) / RW Bull, HA Lewin, MC Wu et al. // *Anim Genet*. - 1986;20:109–132
92. Burny, A. Bovine leukaemia: Facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer / A Burny, Y Cleuter, R Kettmann et al. // *Vet Microbiol*. - 1988;17:197–218.
93. Caldow, M.K. Short communication: Bovine-derived proteins activate STAT3 in human skeletal muscle in vitro / M.K. Caldow, M.R. Digby, D. Cameron-Smith D // *J Dairy Sci*. - 2015, May. – Vol. 98(5). – P. 3016-9.
94. Carpenter, S. Antigenic and genetic stability of bovine immunodeficiency virus during long-term persistence in cattle experimentally infected with the BIVR29 isolate / S. Carpenter, E.M. Vaughn, J. Yang et al. // *J Gen Virol*. – 2000. – Vol. 81. – P. 1463–1472.
95. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite / W.L Hall., D.J. Millward, S.J. Long, L.M. Morgan // *Br J Nutr*. – 2003. – Vol. 89 (2). – P. 239 – 248.
96. Cell dynamics and immune response to BLV infection: A unifying model / A. Florins, N. Gillet, B. Asquith et al. // *Front. Biosci*. – 2007. – Vol. 12. – P. 1520–1531.
97. Cellular segregation of feline leukemia provirus and viral rna in leukocyte subsets of long-term experimentally infected cats / A.C. Pepin, R. Tandon, V. Cattori et al. // *Virus Res*. – 2007. - № 127. – P. 9–16.
98. Cerqueira-Leite, R. Leucose Enzoótica Bovina / R. Cerqueira-Leite, Z.I. Portela Lobato, M. Fernandes Camargos // *Revista CFMFVZ*. – 2001. – Vol. 24. – P. 20–28.
99. Characterization and molecular cloning of a bovine lentivirus related to human immunodeficiency virus / M.A. Gonda, M.J. Braun, S.G. Carter et al. // *Nature*. - 1987. –Vol. 330. – P. 388–391.

100. Characterization of early pathogenic effects after experimental infection of calves with bovine immunodeficiency-like virus / S. Carpenter, L.D Miller, S. Alexandersen et al. // *J Virol.* - 1992. – Vol. 66. – P. 1074–1083.
101. Cho, KO. Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus in dairy and beef cattle in Korea/ KO Cho, S Meas, NY Park et al. // *J Vet Med Sci.* - 1999;61(5):549–551. doi: 10.1292/jvms.61.549.
102. Cloning of the bovine immunodeficiency virus gag gene and development at a recombinant protein based Enzyme-linked immunosorbent assay / L. Zheng, M. Swanson, J. Liao et al. // *Clin and Diagn Lab Immunol.* –2000. – Vol. 7. – P. 557–562.
103. Coffin, JM. Seroprevalence of bovine immunodeficiency-like virus and bovine leukemia virus in a dairy cattle herd /JM Coffin// *Vet Microbiol.* - 1992;31(2-3):109–116.
104. D’Angelino, JL. Epidemiological study of enzootic bovine leukosis in Brazil / JL D’Angelino, M Garcia, EH Birgel // *Trop Anim Health Prod.* - 1998;30:13–15.
105. Del Fava, C. Infecção pelo vírus da leucemia bovina (BLV) no Brasil. / C Del Fava, EM Pituco // *Biológico.* - 2004;66:1–8.
106. Detection of antibodies against bovine immunodeficiency like virus in dairy cattle in Hokkaido / N. Hirari, K. Ohashi Kabeya, C. Sugimoto, M. Onuma // *J Vet Med Sci.* – 1996. – Vol. 58(5). – P. 455–457.
107. Detection of bovine immunodeficiency virus DNA in the blood and semen of experimentally infected bulls / C.M. Gradil, R.E. Watson, R.W. Renshaw et al. // *Vet Microbiol.* – 1999. – Vol. 70(1–2). – P. 21–31.
108. Detection of Bovine Leukaemia Virus Antibodies and Proviral DNA in Colostrum Replacers / B. Choudhury, C. Finnegan, A. Phillips et al. // *Transbound Emerg Dis.* – 2015, Oct. – Vol. 62(5). – e60-1.
109. Detection of monoclonal integration of bovine leukemia virus proviral DNA as a malignant marker in two enzootic bovine leukosis cases with difficult clinical diagnosis / S. Miura, N. Horiuchi, K. Matsumoto, et al. // *J Vet Med Sci.* – 2015, Jul. – Vol. 77(7). – P. 883–887.

110. Detection of multiple retroviral infections in cattle and cross-reactivity of bovine immunodeficiency-like virus and human immunodeficiency virus type 1 proteins using bovine and human sera in a western blot assay / R.M. Jacobs, H.E. Smith, B. Gregory, V.E. Valli et al. // *Can J Vet Res.* – 1992, Oct. – Vol. 56(4). – P. 353–359.
111. Detection of neuropathophysiology using diffusion-weighted magnetic resonance imaging in asymptomatic cats with feline immunodeficiency viral infection / D.S. Bucy, M.S. Brown, H. Bielefeldt-Ohmann et al. // *J Neurovirol.* – 2011, Vol. 17(4). – P. 341-52.
112. Detection of proviral DNA of bovine immunodeficiency virus in bovine tissues by polymerase chain reaction (PCR) and PCR in situ hybridization / S. Zhang, D.L. Troyer, S. Kapil et al. // *Virology.* – 1997. – Vol. 236. – P. 249–257.
113. Detection of proviral genomic sequence of bovine immunodeficiency virus in Indian cattle / S.S. Patil, B. Pattanaik, N. Mishra, et al. // *Curr Sci.* – 2003. - № 84. – P. 563–566.
114. Development of a capsid based competitive inhibition enzyme linked immunosorbent assay for detection of bovine immunodeficiency virus antibodies in cattle and buffalo serum / S. Bhatia, R. Sood, A.K. Bhatia et al. // *J Virol Methods.* – 2008. – Vol. 148. – P. 218–225.
115. Development of a real time PCR assay using SYBR Green chemistry for bovine leukemia virus detection / G. Rama, G. Moratorio, G. Greif et al. // *Retrovirology.* – 2011. – Vol. 8. – A17.
116. Development of a Western blot assay for detection of bovine immunodeficiency-like virus using capsid and transmembrane envelope proteins expressed from recombinant baculovirus / Y. Abed, G. St-Laurent, H. Zhang, R.M. Jacobs et al. // *Clin Diagn Lab Immunol.* – 1999. – Vol. 6. – P. 168–172.
117. Development of loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis of bovine leukemia virus infection / C Komiyama, K Suzuki, Y Miura, H Sentsui // *J Virol Methods.* - 2009;157(2):175-9.

118. Domenech, A. In vitro infection of cells of the monocytic/macrophage lineage with bovine leukaemia virus / A Domenech, J Goyache, L Llames et al. // *J. Gen. Virol.* - 2000;81: 109-118.
119. Duncan, R.B.Jr. Detection of bovine leukemia virus by in situ polymerase chain reaction in tissues from a heifer diagnosed with sporadic thymic lymphosarcoma / R.B.Jr. Duncan, W.K. Scarratt, G.C. Buehring // *J Vet Diagn Invest.* – 2005, Mar. - №17(2). P. – 190-194.
120. Early detection of bovine leukosis virus DNA in infected sheep using the polymerase chain reaction / R. B. Brandon, H. Naif, R.C. Daniel and M.F. Lavin // *Res. Vet.* – 1991. – *Sci.* 50. – P. 89-94.
121. Effect of infection with bovine leukemia virus on milk production in Michigan dairy cows / B. Norby, P.C. Bartlett, T.M. Byrem, R.J. Erskine // *J Dairy Sci.* – 2016, Mar. – Vol. 99(3). – P. 2043-52.
122. Effects of bovine leukemia virus infection on milk neutrophil function and the milk lymphocyte profile / A.M Della Libera, F.N. de Souza, C.F. Batista et al. // *Vet Res.* – 2015. – Vol. 46. – P. 2.
123. Encephalitis, lymphoid tissue depletion and secondary diseases associated with bovine immunodeficiency virus in a dairy herd / T.G. Snider, D.G. Luther, B.F. Jenny et al. // *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* – 1996. - № 19(2). – P. 117–131.
124. Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland / L. Nuotio, H. Rusanen, L. Sihvonen, E. Neuvonen // *Prev Vet Med.* – 2003. –Vol. 9. –P. 43–49.
125. Establishment a bovine leukemia virus-free dairy herd in Korea / G.H. Suh, J.C. Lee, C.Y. Lee et al. // *J Vet Sci.* – 2005. – Vol. 6. – P. 227–230.
126. Evaluation of a new antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine leukemia virus infection in dairy cattle / G.E. Monti, K. Frankena, B. Engel et al. // *J Vet Diagn Invest.* – 2005, Sep. – Vol. 17(5). –P.451-7.

127. Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum / K. Klintevall, K. Naslund, G. Svedlund et al. // *J Virol Methods*. – 1991. – Vol. 33. – P. 319–333.
128. Exposure of cats to low doses of felv: Seroconversion as the sole parameter of infection / A. Major, V. Cattori, E. Boenzli et al. // *Vet Res*. – 2010. – Vol. 41. – P. 17.
129. Ferrer, JF. Role of colostrum and milk in the natural transmission of the bovine leukemia virus / JF Ferrer, CE Piper // *Cancer Res*. - 1981;41:4906–4909.
130. Florins, A. Viral expression directs the fate of B cells in bovine leukemia virus-infected sheep / A Florins, A de Brogniez, M Elemans et al. // *J Virol*. – 2012; 86: 621–624.
131. Fraction of bovine leukemia virus-infected dairy cattle developing enzootic bovine leucosis / T. Tsutsui, S. Kobayashi, Y. Hayama, T. Yamamoto / *Prev Vet Med*. – 2016, Feb 1. - № 124. – P. 96-101.
132. Garry, F. Bovine leukemia virus infection (Leukosis) (Bovine lymph sarcoma) / F. Garry, T. J. Divers and Peek, S. F. Eds. // In: *Rabun's Diseases of Dairy Cattle*, 2nd 163 ed. – 2008. – Saunders Elsevier, St. Louis – P. 624–633.
133. Hagi, T Adhesive properties of predominant bacteria in raw cow's milk to bovine mammary gland epithelial cells / T. Hagi, K. Sasaki, H. Aso, M. Nomura // *Folia Microbiol*. – 2013, Nov. – Vol. 58(6). – P. 515-22.
134. Horner, G.W. Serologic evidence of bovine immunodeficiency-like virus and bovine syncytial virus in New Zealand / G.W. Horner // *Surveillance*. – 1991. – Vol. 18(2). – P. 9.
135. Identification of hypervariable and conserved regions in the surface envelope gene in the bovine lentivirus / D.L. Suarez, C.A. Whetstone // *Virology*. – 1995. - № 212. – P. 728–733.
136. Immunological characterization of the gag gene products of bovine immunodeficiency virus / J.K. Battles, M.Y. Hu, L. Et al. // *J Virol*. – 1992. – Vol. 66. – P. 6868–6877.

137. In vitro detection of bovine immunodeficiency like virus using monoclonal antibodies generated to a recombinant gag fusion protein / Y. Wannmuehler, J. Issacson, M. Wannmuehler et al. // *J Virol Methods*. – 1993. - № 44. – P. 117–128.
138. In vivo study of genetically simplified bovine leukemia virus derivatives that lack tax and rex / K. Boris-Lawrie, V. Altanerova, C. Altaner et al. // *J. Virol.* - 1997. Vol. 71. – P. 1514–1520.
139. Infection and dysfunction of monocytes induced by experimental inoculation of calves with bovine immunodeficiency like virus / M. Onuma, E. Koomto, H. Furuyama et al. // *J Acquir Immune Defic Syndr.* – 1992. – Vol. 5. – P.1009–1015
140. Iron and Ferritin Levels in the Serum and Milk of Bovine Leukemia Virus-Infected Dairy Cows / S.A. Schnell, H. Ohtsuka, S. Kakinuma et al. // *Front Vet Sci.* – 2015, May 26. – Vol. 2. – P. 12.
141. Ishiguro, N. Differentiation analysis of bovine T-lymphosarcoma. / N Ishiguro, T Matsui, M Shinagawa//*Vet Immunol Immunopathol.* – 1994;41:1–17.
142. Islas, LA. Prevalencia de leucosis enzoótica bovina (LEB) en lecherías de las comunas de San Fernando, Chimbarongo y Placilla / LA Islas, SC Inchaurtieta, PG Muñoz //*Monograf Med Vet.* - 1990;12:64–70.
143. Jarrett, O. Pathogenicity of feline leukemia virus is commonly associated with variant viruses / O. Jarrett // *Leukemia.* – 1992. – Vol. 6. – Suppl 3. – P. 153–154.
144. Johnston, E.R. The SU and TM envelope protein subunits of bovine leukemia virus are linked by disulfide bonds, both in cells and in virions / E.R. Johnston, K. Radke // *J Virol.* – 2000. - №74. – P. 2930–2935.
145. Kettmann, R. Bovine Leukemia Virus / R. Kettmann, A. Burny // In: Levy JA, editor. – *The Retroviridae.* – Vol.3. - Plenum Press. – New York, NY, USA, 1994. – P. 39–81.
146. Lactic acid fermentation as a tool for increasing the folate content of foods / F. Saubade, Y.M. Hemery, J.P. Guyot, C. Humblot // *Critical reviews in food science and nutrition.* - 2016(0), June 28. – P. 1040-8398.

147. Leuzzi Junior, LÁ. Leucose enzoótica bovina e vírus da leucemia bovina / LÁ L Junior, A Fernandes Alfieri, AA Alfieri // *Semina*. - 2001;22:211–221.
148. Mansky, L.M. Retrovirus mutation rates and their role in genetic variation / L.M. Mansky // *J Gen Virol*. – 1998. - №79. – P.1337–1345.
149. Martin, S.J. Eiseman Lymphocyte transformation abnormalities in bovine immunodeficiency-like virus infected calves / S.J. Martin, P.O. Neill, J.A. Billello // *Immunol Lett*. – 1991. – Vol. 27. – P. 81–84.
150. McGregor, R.A. Milk protein for improved metabolic health: a review of the evidence / R.A. McGregor, and S.D. Poppitt // *Nutr Metab* – 2013. – Vol. 10 – P. 46.
151. McNab, WB. A serological survey for bovine immunodeficiency like virus in Ontario dairy cattle and association between test results production records and management practices/ WB McNab, RM Jacobs, HE Smith // *Can J Vet Res*. - 1994;58:36–41.
152. Meas S. Infection of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in water buffalow and cattle populations in Pakistan/ S Meas, J Seto, C Sugimoto et al // *J Vet Med Sci*. - 2000;62(3):329–331.
153. Meripet, P. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis / P. Meripet, T. Shin-nosuke, H. Kazuyoshi et al. // *Retrovirology*. - 2016; 13: 4.
154. Molecular analysis of a 444 bp fragment of the bovine leukaemia virus gp51 env gene reveals a high frequency of non-silent point mutations and suggests the presence of two subgroups of BLV in Chile / R. Felmer, G. Munoz, J Zuniga, M. Recabal // *Vet Microbiol*. – 2005. – Vol. 108. – P. 39–47.
155. Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of bovine leukemia virus / M.F. Camargos, A. Pereda, D. Stancek et al. // *Virus Genes*. – 2007. – Vol. 34. – P. 343–350.

156. Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison with other isolates // J. Coulston, H. Naif, R Brandon et al. // *J Gen Virol.* – 1990. – Vol. 71. – P. 1737–1746.
157. Molnár, E. Ocorrência da Leucose Enzoótica dos Bovinos no Estado do Pará, Brasil / E Molnár, L Molnár, H Tavares Dias et al, // *Pesq Vet Bras.* - 1999;19:7–11.
158. Muluneh, A. Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus (BIV) antibodies ion cattle population in Germany / A. Muluneh // *Zentralbl Veterinarmed B.* -1994. – Vol. 41(10). – P. 679–684.
159. Murakami, K. The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. / K Murakami, S Kobayashi, M Konishi et al // *Vet Microbiol.* - 2011;148:84–88.
160. NAHMS-USDA Bovine Leukosis Virus on U.S. Dairy Operations. 2007. Available online: http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_is_BLV.pdf.
161. OIE World Animal Health Information Database (WAHID Interface) Version 1.4. Available online: http://web.oie.int/wahis/public.php?page=disease_status_detail
162. Over expression and purification of an immunologically reactive His BIV capsid fusion protein / D. Betemps, F. Mallet, V. Cheynet, T. Baron // *Protein Expr Purif.* – 1999. – Vol.15, № 3. – P. 258–264.
163. Partial sequencing of env gene of bovine leukaemia virus from Brazilian samples and phylogenetic analysis / M.F. Camargos, D. Stancek, M.A. Rocha et al. / *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* – 2002. – Vol. 49. – P. 325 – 331.
164. Pezo, V. HIV genetic variation: life at the edge / V. Pezo, S. J. Wain-Hobson // *Infect.* – 1997. - № 34. – P. 201–203.
165. Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes / G. Moratorio, G. Obal, A. Dubra et al. // *Arch Virol.* – 2010. – Vol. 155. – P. 481–489.

166. Possible role of bovine immunodeficiency-like virus in bovine paraplegic syndrome: evidence from immunochemical, virological and seroprevalence studies / R. Walder, Z. Kalvatchev, G.J. Tobin et al. // *Res Virol.* – 1995. - № 146(5). – P. 313–323.
167. Preliminary studies on enzootic bovine leukosis in Saudi dairy farms / SM Hafez, M Sharif, A Al-Sukayran, D Dela-Cruz. // *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* - 1990;97:61–63.
168. Prokaryotic expression of a 750-bp capsid region of Bovine Immunodeficiency Virus gag gene and development of a recombinant capsid (p26) protein based immunoassay for seroprevalence studies / S. Bhatia, S.S. Patil, R. Sood et al. // *Indian J Biotechnol.* – 2008. – Vol.7, №1. – P. 50–55.
169. Protection of colostral antibodies against bovine leukemia virus infection in calves on a California dairy / ML Lassauzet, WO Johnson, MC Thurmond, F Stevens // *Can J Vet Res.* - 1989;53:424–430.
170. Reduced constitutive cytokine transcription in isolated monocytes of clinically healthy cats, infected with an FIV strain of low pathogenicity / A. Kipar, F.S. Boretti, M.M. Meli et al. // *Vet Immunol Immunopathol.* – 2004, Apr. – Vol. 98(3-4). – P. 215 – 21.
171. Report of the American Association of Feline Practitioners and Academy of Feline Medicine Advisory Panel on feline retrovirus testing and management / J. Levy, J. Richards, D. Edwards et al. // *J Feline Med Surg.* – 2003, Feb. – Vol. 5(1). – P. 3 – 10.
172. Ricci-Cabello, I. Possible role of milk-derived bioactive peptides in the treatment and prevention of metabolic syndrome / I Cabello., M.O. Herrera, R Artacho // *Nutr Rev* 2012.- 70 (4):241 – 255.
173. Rodriguez, S.M. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus:/ S.M. Rodriguez, A. Florins N. Gillet et al // *Lessons for HTLV. Viruses.* - 2011;3:1210–1248.
174. Rola-Łuszczak, M. Development of an improved real time PCR for the detection of bovine leukaemia provirus nucleic acid and its use in the clarification

of inconclusive serological test results/ M.Rola-Łuszczak, C Finnegan, M Olech et al. // *J Virol Methods*. - 2013 May;189(2):258-64.

175. Role of cullin-elonginB-elonginC E3 complex in bovine immunodeficiency virus and maedi-visna virus Vif-mediated degradation of host A3Z2-Z3 proteins / J. Zhang, J. Wu, W. Wang, et al. // *Retrovirology*. – 2014, Sep. - №12;11:77.

176. Roskopf, M. Comparison of two ELISA systems for detection of antibodies against IBR/IPV and against bovine leukosis virus / M. Roskopf, E. Staub, M. Ackermann // *Schweiz Arch Tierheilkd*. – 1994. - № 136. – P.58–67.

177. Savilahti, E. Probiotics in the treatment and prevention of allergies in children / E. Savilahti // *Biosci Microflora*. – 2011. - №30(4). P. – 119-128.

178. Schnell, S.A. Iron and Ferritin Levels in the Serum and Milk of Bovine Leukemia Virus-Infected Dairy Cows/ S.A. Schnell, H. Ohtsuka, S.Kakinuma et al.// *Front Vet Sci*. - 2015 May 26;2:12.

179. Scott, HM. 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 / HM Scott, O Sorensen, JT Wu et al // *Can Vet J*. - 2006;47:981–991.

180. Serologic evidence for bovine immunodeficiency virus infection in France / B. Polack, I. Schwartz, M. Berthelemy et al. // *Vet Microbiol*. – 1996. - № 48(1–2). – P. 165–173.

181. Serological evidence of an Australian bovine lentivirus / E.J. Burkala, T.M. Ellis, V. Voigt, G.E. Wilcox // *Vet Microbiol*. – 1999. –Vol. 68(1–2). –P. 171–177.

182. Serological evidence of bovine immunodeficiency virus infection in cattle and buffalo through use of recombinant capsid (P26) protein based immunoassay / S. Bhatia, A.K. Bhatia et al. // *J Immunol Immunopathol*. - 2006. – Vol. 8, №2. – P.128 –129.

183. Seroprevalence and molecular evidence for the presence of bovine immunodeficiency virus in Brazilian cattle / S. Meas, J. Ryas, N.A. Faria et al. // *J Vet Res*. – 2002. – Vol. 50(2–3). – P. 145.

184. Seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in dairy cattle in Saskatchewan / J.A. Van Leeuwen, L. Forsythe, A. Tiwari, R. Chartier // *Can Vet J.* – 2005. - № 46. – P. 56–58.
185. Seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *partuberculosis*, and *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in Manitoba / J.A. Van Leeuwen, A. Tiwari, J.C. Plaizier, T.L. Whiting // *Can Vet J.* – 2006. - № 47. – P. 783–786.
186. Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in draught animals in Cambodia / S. Meas, K. Ohashi, S. Tum et al. // *J Vet Med Sci.* – 2000. – Vol.62. – P. 779–781.
187. Seroprevalence of bovine immunodeficiency-like virus and bovine leukemia virus in a dairy cattle herd / G.L. Cockerell, W.A. Jensen, J. Rovnak et al. // *Vet Microbiol.* – 1992, Jun 1. – Vol. 31(2-3). – P. 109–116.
188. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: Comparison of sensitivity and specificity of different detection methods / K.G. Trono, Perez-Filgueira, S. Duffy et al. // *Vet Microbiol.* – 2001. - № 83. – P. 235–248.
189. Seroprevalence of infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, bovine leukemia virus, and bovine viral diarrhea virus in maritime Canada dairy cattle / J.A. Van Leeuwen, G.P. Keefe, R. Tremblay et al. // *Can Vet J.* – 2001. - № 42. – P. 193–198.
190. 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 et al. // *Can Vet J.* – 2006. - № 47. – P. 981–991.
191. Seroprevalence to bovine immunodeficiency virus and lack of association with leukocyte counts in Italian dairy cattle / S. Cavarani, G. Donofrio, D. Chiocco et al. // *Prev Vet Med.* – 1998. – Vol. 37. – P. 147–157.

192. Serum thymidine kinase activity as a useful marker for bovine leucosis / L. Sakamoto, T. Ohbayashi, K. Matsumoto et al. // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2009. - № 21. –P. 871–874.
193. Signalment and clinical complaints initiating hospital admission, methods of diagnosis, and pathological findings associated with bovine lymphosarcoma (112 cases) / A. J. Burton, D. V. Nydam, E. D. Long, T. J. Divers // *J. Vet. Intern. Med.* – 2010. - Vol. 24, P. 960–964.
194. Single chain fragment variable antibody against the capsid protein of bovine immunodeficiency virus and its use in ELISA / S. Bhatia, R. Gangil, D.S. Gupta et al. / *J Virol Methods.* – 2010. – Vol.167. – P. 68–73.
195. Sinha, G. Bovine Leukemia Virus Possibly Linked to Breast Cancer / G. Sinha // *J Natl Cancer Inst.* – 2016, Feb 9. - № 108(2). – pii: djw020.
196. Sporadic cutaneous lymphosarcoma of T-cell origin with involvement of lymph nodes and internal organs in a Holstein cow/Freick M, Lapko L, Neubert M et al. // *Grosstiere Nutztiere.* - 2016 Feb 16;44(1):39-45.
197. St-Louis, M.C. The bovine immunodeficiency virus: cloning of a tat/rev cDNA encoding a novel Tat protein with enhanced transactivation activity / M.C. St-Louis, Y. Abed, D. Archambault // *Arch Virol.* – 2005, Aug. - № 150(8). –P. 1529-47. – Epub 2005, Apr 13.
198. Suarez, D L. Improved early and long-term detection of bovine lentivirus by a nested polymerase chain reaction test in experimentally infected calves / D L Suarez, M J Van Der Maaten, C A Whetstone // *Am J Vet Res.* - 1995;56:579–586.
199. Suh, GH. Establishment o a bovine leukemia virus-free dairy herd in Korea / GH Suh, JC Lee, CY Lee et al // *J Vet Sci.* - 2005;6:227–230.
200. Suppression of immunological responses in rabbits experimentally infected with bovine leukemia virus / M. Onuma, M. Wada, Y. Yasutomi et al. // *Vet. Microbiol.* – 1990. - № 25. – P. 131-141.
201. Teunissen-Beekman, K.F. Effect of increased protein intake on renal acid load and renal hemodynamic responses / K.F. Teunissen-Beekman, J. Dopheide, J.M.Geleijnse et al // *Physiol Rep.* - 2016 Mar;4(5). pii: e12687.

202. The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania / J. Acaite, V. Tamosiunas, K. Lukauskas // *Prev Vet Med.* –2007. –Vol. 82. –P. 83–89
203. The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle / K. Murakami, S. Kobayashi, M. Konishi et al. // *Vet Microbiol.* – 2011. – Vol. 148. – P. 84–88
204. There is nothing permanent except change. The emergence of new virus diseases / U. Truyen, C.R. Parrish, T.C. Harder, O.R. Kaaden // *Vet Microbiol.* – 1995. - № 43. – P. 103–122.
205. Thomas, E. Delayed cytopathicity of a feline leukemia virus variant is due to four mutations in the transmembrane protein gene / E. Thomas, J. Overbaugh // *J Virol.* – 1993, Oct. - № 67(10). – P. 5724–5732.
206. Three cases of atypical bovine leukosis in Holstein cows / M. Tagawa, T. Shimoda, Y. Togashi et al. // *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* -2008. - № 61. –P. 936–940.
207. T-lymphocyte profiles in FIV-infected wild lions and pumas reveal CD4 depletion / M.E. Roelke, J. Pecon-Slattey, S. Taylor et al. // *J. Wildl. Dis.* – 2006. - № 42. – P. 234–248.
208. Trainin, Z. The direct and indirect economic impacts of bovine leukemia virus infection on dairy cattle / Z. Trainin, J. Brenner // *Isr J Vet Med.* – 2005. - № 60. – P. 90–105.
209. Trono, KG. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: Comparison of sensitivity and specificity of different detection methods / KG Trono, DM Perez-Filgueira, S Duffy et al. // *Vet Microbiol.* - 2001;83:235–248.
210. Tumor necrosis factor alpha and its receptors in experimentally bovine leukemia virus-infected sheep / H. Kabeya, A. Fukuda, K. Ohashi et al / *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2001. – Vol. 81. – P. 129-139.
211. Using PCR for early diagnosis of bovine leukemia virus infection in some native cattle / M.R. Mohammadabadi, M. Soflaei, H. Mostafavi, M. Honarmand // *Genet Mol Res.* – 2011, Oct 27. – Vol. 10(4) – P. 2658-63.

212. Usui, T. Protective effects of vaccination with bovine leukemia virus (BLV) tax DNA against blv infection in sheep / T. Usui, S. Konnai, S.Tajima et al. //J. Vet. Med. Sci. - 2003;65:1201–1205.
213. Van Der Maaten, M. J. Isolation of a virus from cattle with persistent lymphocytosis / M. J. Van Der Maaten, A. D. Boothe, C. L. Seger // J Natl Cancer Inst. – 1972. - № 49. – P. 1649–1657.
214. Van Leeuwen, JA Seroprevalence of infection with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, bovine leukemia virus, and bovine viral diarrhoea virus in maritime Canada dairy cattle / JA Van Leeuwen, GP Keefe, R Tremblay et al // Can Vet J. - 2001;42:193–198.
215. Wang, C.T. Bovine leukemia virus infection in Taiwan: Epidemiological study / C.T. Wang // J Vet Med Sci. – 1991. - № 53. – P. 395–398.
216. Whetstone, C A. Humoral immune response to the bovine immunodeficiency-like virus in experimentally and naturally infected cattle / C A Whetstone, M J Van Der Maaten, J W Black //J Virol. - 1990;64:3557–3561.
217. Wu, G. Dietary protein intake and human health / G. Wu // Food Funct. – 2016, Jan 22. – PMID. 26797090.
218. 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.J. Mao et al. //Dairy Sci. - 2016 May;99(5):3688-97.

6. СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

	Стр.
Рисунок 1	Схема проведения исследований..... 44
Рисунок 2	Количество неблагополучных по лейкозу КРС пунктов на территории Саратовской области в 2015 - 2016 г.г..... 46
Рисунок 3	Определение кислотности сырого молока при хранении 4°С..... 54
Рисунок 4	Определение КМАФАнМ в сыром молоке ($\lg 1 \times 10^4$)..... 54
Рисунок 5	Хроматограмма белков молока <i>BIV</i> -инфицированной (1) и <i>BIV-BLV</i> -инфицированной (2) коров на 1-ый (А), 3-тий (Б) и 6-ой (В) дни хранения +4°С..... 57
Рисунок 6	Соотношение высоко- и низкомолекулярных белков в молоке инфицированных коров..... 58
Рисунок 7	Изучение стабильности аминокислот молока <i>BIV</i> -инфицированных коров (1-15 порядковый номер аминокислоты)..... 60
Рисунок 8	Изучение стабильности аминокислот молока <i>BLV-BIV</i> -инфицированных коров (1-15 порядковый номер аминокислоты)..... 61
Рисунок 9	Массовая доля (%) аминокислот в коровьем молоке при <i>BIV</i> -инфекции и норме (по казеину)..... 62
Рисунок 10	Массовая доля (%) аминокислот в коровьем молоке при <i>BLV - BIV</i> -коинфекции и норме (по казеину)..... 63
Рисунок 11	Динамика кислотности выработанного творога (°Т)..... 70
Рисунок 12	Динамика БГКП в выработанном твороге (1×10^2 КОЕ/г).... 70
Рисунок 13	Динамика КМАФАнМ выработанного творога ($Lg 1 \times 10^2$ КОЕ/мл)..... 71
Рисунок 14	Динамика количества микроскопических грибов в выработанном твороге ($\times 10$ КОЕ/г)..... 71

Рисунок 15	Взаимосвязь кислотности готового продукта и исходного сырья.....	76
Рисунок 16	Время приготовления кефира из разных проб молока.....	76
Рисунок 17	Корреляция между бактериальной обсемененностью молока и количеством молочнокислых бактерий в кефире ($Lg 1 \times 10^4$).....	79
Рисунок 18	Исследование проб молока методом ОТ-ПЦР на наличие <i>BLV</i>	82
Таблица 1	Результаты диагностических исследований на лейкоз КРС в хозяйствах Саратовской области в 2011-2015 г.г.....	46
Таблица 2	<i>BLV</i> -носительство у КРС Саратовской области.....	47
Таблица 3	<i>BIV</i> -носительство у КРС Саратовской области.....	48
Таблица 4	<i>BLV-BIV</i> -носительство у КРС Саратовской области.....	49
Таблица 5	Органолептические показатели молока инфицированных ретровирусами и интактных коров.....	52
Таблица 6	Физико-химические показатели молока инфицированных ретровирусами и интактных коров.....	53
Таблица 7	Микробиологические показатели молока инфицированных ретровирусами и интактных коров.....	53
Таблица 8	Микробиологические показатели молока до и после пастеризации.....	56
Таблица 9	Относительная концентрация аминокислот в молоке коров с <i>BIV</i> -инфекцией при хранении, %.....	59
Таблица 10	Относительная концентрация аминокислот в молоке коров с <i>BLV-BIV</i> -инфекцией при хранении, %.....	60
Таблица 11	Характеристики выработанного напитка «Снежок».....	66
Таблица 12	Свойства полученного творога.....	68
Таблица 13	Основные физико-химические и микробиологические показатели молочных смесей.....	73

Таблица 14	Время приготовления и кислотность готового продукта...	74
Таблица 15	Органолептические показатели выработанного кефира.....	75
Таблица 16	Микробиологические исследования выработанного кефира.....	78

7. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2595373

**НАБОР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ПРОВИРУСА
ИММУНОДЕФИЦИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА,
СОДЕРЖАЩИЙ ПАРУ СПЕЦИФИЧНЫХ ПРАЙМЕРОВ И
ЗОНД, И СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОГО
ИММУНОДЕФИЦИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В
РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

Патентообладатель(ли): *Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
"Саратовский государственный аграрный университет имени
Н.И. Вавилова" (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2015124620

Приоритет изобретения **23 июня 2015 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре
изобретений Российской Федерации **03 августа 2016 г.**

Срок действия патента истекает **23 июня 2035 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Г.П. Ивлиев



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2615465

**ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
ДНК ПРОВИРУСОВ ЛЕЙКОЗА И ИММУНОДЕФИЦИТА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ
МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова" (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2015132112

Приоритет изобретения 31 июля 2015 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 04 апреля 2017 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 31 июля 2035 г.

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Г.П. Ивлиев

