

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ имени Я.Р. КОВАЛЕНКО

На правах рукописи

ВАНГЕЛИ СЕРГЕЙ ВАЛЕРЬЕВИЧ

**«СРАВНИТЕЛЬНАЯ УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУР КЛЕТОК, ХРОНИЧЕСКИ
ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА»**

06.02.02 - Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Научные руководители:
доктор ветеринарных наук, профессор,
Заслуженный деятель науки РФ,
академик Российской академии наук
М.И. Гулюкин
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник,
Лауреат Премии Советов Министров СССР,
Заслуженный ветеринарный врач РФ
Г.А. Надточей

МОСКВА – 2015

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЛ КРС	– вирус лейкоза крупного рогатого скота
BLV	- bovine leukemia virus
FLK-BLV	– линия клеток почки эмбриона овцы, хронически инфицированная ВЛ КРС
ЛЭК-ВИЭВ-90	– линия клеток легкого эмбриона коровы, хронически инфицированная ВЛ КРС
ТЭК-МВА, 76	- линия клеток тимуса эмбриона коровы, хронически инфицированная ВЛ КРС
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	– рибонуклеиновая кислота
HTLV	- вирус Т-клеточной лейкемии человека
РИД	– реакция иммунодиффузии
ИФА	– иммуноферментный анализ
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
мл	- миллилитр
мкл	- микролитр
нм	-нанометр
н.	- нуклеотид
а.о.	- аминокислотный остаток

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
1. ВВЕДЕНИЕ	5
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
2.1. Общая характеристика лейкоза крупного рогатого скота	11
2.2. Таксономия семейства ретровирусов	15
2.3. Вирус лейкоза крупного рогатого скота	17
2.3.1. Морфология ВЛ КРС	17
2.3.2. Структура генома ВЛ КРС	18
2.3.3. Репликация вируса	21
2.4. Взаимодействие вирус-клетка	22
2.5. Культивирование вируса лейкоза крупного рогатого скота	23
2.6. Диагностика лейкоза крупного рогатого скота	26
2.6.1. Клинические, патоморфологические и гематологические методы исследования лейкоза КРС	26
2.6.2. Серологические реакции	27
2.6.3. Методы молекулярной диагностики	32
3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
3.1. Материалы и методы исследований	34
3.1.1. Культуры клеток	34
3.1.2. Культивирование перевиваемых линий клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV	34
3.1.3. Определение индекса пролиферации и жизнеспособности клеток	35
3.1.4. Метод цитогенетического анализа	35
3.1.5. Метод оценки продукции антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота клетками изучаемых культур	36
3.1.6. Электронная микроскопия	37
3.1.7. Методики постановки ПЦР для выявления геномов вирусов лейкоза и диареи КРС	39
3.2. Результаты исследований	41

3.2.1. Культурально-морфологические свойства культуры клеток ЛЭК-ВИЭВ-90	41
3.2.2. Культурально-морфологические свойства культуры клеток FLK-BLV	47
3.2.3. Цитогенетические исследования перевиваемых культур клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV	53
3.2.4. Определение наличия антигена и генома в изучаемых культурах клеток ЛЭК-ВИЭВ и FLK-BLV	55
3.2.5. Электронно-микроскопическая характеристика перевиваемых культур клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV	57
3.2.6. Морфология и пути морфогенеза вируса лейкоза крупного рогатого скота в культурах ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV	62
3.2.7. Определение наличия генома вируса диареи КРС методом ПЦР в культурах клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV	68
3.3. Обсуждение полученных результатов	70
4. ВЫВОДЫ	75
5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	77
6. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	78

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Лейкоз крупного рогатого скота – хроническая лимфопролиферативная болезнь, протекающая бессимптомно или проявляющаяся лимфоцитозом и злокачественными новообразованиями в кроветворных и других органах и тканях. Среди болезней сельскохозяйственных животных гемобластозы занимают ведущее место по частоте и тяжести заболевания, которыми определяются прямые экономические потери скотоводческой отрасли разных стран: от снижения продуктивности животных, их гибели, затрат на диагностические исследования, организации мероприятий по борьбе с инфекцией и ее ликвидацией, потерь от ограничений на торговлю племенными животными, семенем и яйцеклетками племенных животных [194, 198, 211, 227, 232, 242]. Инфицированность скота лейкозом в Российской Федерации долгие годы колеблется на уровне 10%. В структуре инфекционной патологии с 1997 года лейкоз КРС занимает одно из первых мест и в настоящее время составляет более 60% [1].

Причиной возникновения и развития болезни является РНК-содержащий вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС), относящийся к семейству Retroviridae, подсемейству Oncoviridae, роду Deltaretrovirus. Этот экзогенный вирус в естественных условиях поражает только крупный рогатый скот. Вирус может размножаться в культурах клеток крупного рогатого скота, овцы, человека, обезьян, собаки, козы и лошади. В экспериментальных условиях чувствительными к инфекции оказались буйвол, овца, коза, свинья, лошадь, обезьяна, кролик [82, 83, 101]. Вопрос о способности вируса передаваться человеку остается открытым [32, 111].

В нашей стране с помощью электронной микроскопии впервые был обнаружен и описан вирус лейкоза крупного рогатого скота сотрудниками Всесоюзного научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко Г.А. Надточеем и А.Ф. Валиховым в 1974 г. [10]. Ими были изучены морфология и пути морфогенеза вируса лейкоза. Большой вклад в изучение морфологии лимфоидных клеток при гемобластозах крупного рогатого скота

внесла З.Н. Меньшикова (1984, 1987, 1999) [52, 53, 54].

Многочисленные исследования были направлены на изучение биологических особенностей лейкозной клетки, факторов лейкозогенеза, иммунологических и биохимических аспектов лейкозного процесса, а также на выяснение роли ретровирусов в механизме возникновения лейкозов сельскохозяйственных животных.

Большим достижением в лейкозологии является выявление этиологического фактора при Т-клеточном лейкозе (лимфоме) человека - ретровируса типа С, имеющего большое сходство с ВЛ КРС. В этой связи изучение этиологии и патогенеза лейкозов крупного рогатого скота имеет общебиологическое значение в свете решения вопросов о потенциальном использовании лейкозов крупного рогатого скота, как модели для изучения лейкемогенеза и вирусного канцерогенеза у человека [54, 189].

Применение современных молекулярно-биологических методов исследования позволило получить новые данные о лейкозогенезе, установить вирусную природу лейкоза крупного рогатого скота, описать этиологический агент - вирус лейкоза крупного рогатого скота, ВЛ КРС (в зарубежной литературе BLV — bovine leukemia virus), изучить его строение, антигенный состав, разработать чувствительные методы диагностики [10, 13, 15, 19, 29, 52, 53, 58, 62, 76, 113, 179, 222, 243].

Методы и средства специфической профилактики лейкоза не разработаны, поэтому все программы по профилактике и ликвидации инфекции основаны на серологической диагностике ее и ликвидации или изолировании инфицированных животных.

В состав иммунологических диагностических тест-систем входит антиген ВЛ КРС. Наибольшее распространение для накопления антигена и изучения структуры и биосинтеза компонентов BLV получила перевиваемая клеточная линия FLK-BLV, полученная в США M.J. Van der Maaten et J.M. Miller (1974, 1976) [239, 240]. Эта линия клеток отличается стабильностью и высоким уровнем продукции как вирионов, так и растворимого наружного гликопротеида gp51 и

широко используется во всем мире для его производства [143]. Использование в диагностических наборах гликопротеида gp51 обусловлено рядом факторов. В процессе развития инфекции в организме животного антитела к этому антигену появляются раньше, чем к другим антигенам вируса, этот антиген проходит процесс гликозилирования и рефолдинга в клетках восприимчивого животного и несет наиболее полные иммунодоминантные эпитопы возбудителя.

Несмотря на значительные успехи методов генной инженерии в получении антигена gp51 вируса лейкоза крупного рогатого скота в бактериальной системе [201], системе дрожжей [95], системе рекомбинантного вируса коровьей оспы [148] и системе бакуловируса [147] широкого практического применения такие антигены пока не нашли [24].

Работы по получению и изучению новых перевиваемых клеточных линий, активно продуцирующих антигены вируса лейкоза остаются актуальными. Так, бельгийскими исследователями в 2004 г. получена перевиваемая линия клеток P0714, которая хронически инфицирована вирусом лейкоза крупного рогатого скота [141]. В нашей стране были получены две перевиваемые культуры клеток, хронически инфицированные ВЛ КРС - клетки тимуса эмбриона коровы ТЭК МВА-76 [38] и клетки легкого эмбриона коровы ЛЭК-ВИЭВ-90 [81]. Эти линии клеток также продуцируют ВЛ КРС, однако они еще недостаточно изучены.

Изучение ультраструктуры и морфологии вирус-продуцирующих культур клеток является необходимым не только в теоретическом плане, но и для практических целей в диагностике сложных случаев заболевания, изучения особенностей морфогенеза вируса лейкоза, упорядочения классификации и дифференциальной диагностики гемобластозов крупного рогатого скота.

Цель работы - получить новые данные о культурально-морфофункциональных, цитогенетических и ультраструктурных особенностях клеток перевиваемых линий FLK-BLV и ЛЭК-ВИЭВ-90, хронически инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота.

Для достижения намеченной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить культурально-морфофункциональные свойства клеток линий ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK -BLV.
2. Изучить цитогенетические особенности клеток линии ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK - BLV.
3. Изучить ультраструктуру клеток линий ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK - BLV.
4. Изучить особенности морфогенеза вируса лейкоза крупного рогатого скота в клетках естественно восприимчивого (ЛЭК-ВИЭВ-90) и гетерологичного (FLK-BLV) видов животных.
5. Определить антигенпродуцирующую активность gp51 клеточной линии ЛЭК-ВИЭВ-90 в сравнении с клеточной линией FLK-BLV.

Научная новизна. Впервые методом электронной микроскопии изучена субмикроскопическая морфология клеток линии ЛЭК-ВИЭВ-90; показана продукция этой культурой антигена gp51 вируса лейкоза крупного рогатого скота. Методом электронной микроскопии в культурах ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV выявлен вирус диареи крупного рогатого скота, что подтверждено методом ПЦР в результате обнаружения в этих культурах генома вируса диареи крупного рогатого скота. Установлено также, что вирусы лейкоза и диареи крупного рогатого скота могут вызывать смешанную инфекцию одних и тех же клеток и формировать при этом морфологически полные вирионы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Перевиваемая клеточная культура ЛЭК-ВИЭВ-90 может быть использована для получения антигена gp51 генотипа вируса лейкоза, циркулирующего в популяции крупного рогатого скота Российской Федерации.

Учитывая контаминацию клеточных культур ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV вирусом диареи крупного рогатого скота, а также широкое распространение вирусов лейкоза и диареи в популяции крупного рогатого скота, использование живых вакцин против вирусной диареи на территории Российской Федерации,

крайне важным является использование в диагностических наборах на лейкоз моноспецифических преципитирующих сывороток к вирусу лейкоза.

Перевиваемая культура ЛЭК-ВИЭВ-90 может служить модельной системой для изучения взаимодействия РНК-содержащих вирусов различных таксономических семейств в условиях смешанной инфекции.

Материалы работы могут быть использованы при подготовке студентов и аспирантов.

Личный вклад соискателя. Формирование целей и задач выполнено совместно с научными руководителями. Лично диссертантом подобраны методы исследования, проведены все исследования и анализ результатов, изложенных в диссертации. Соавторами осуществлялась консультативно-методическая помощь при проведении исследований. Диссертация написана лично автором с использованием собственных результатов.

Апробация работы. Результаты работы доложены на научной сессии Дальневосточного отделения РАСХН, посвященной 70-летию Дальневосточного зонального научно-исследовательского ветеринарного института (г. Благовещенск, 2005), Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных» ФГБНУ ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко Россельхозакадемии (г. Москва, 2006 г.), доложены на ученом совете ФГБНУ ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко в 2005г., 2014 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 4 научные работы, в том числе 2 в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 114 страницах и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, собственные исследования (материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований), выводы, список использованной

литературы (который включает 261 источник, в том числе 177 зарубежных авторов). Диссертация содержит 4 таблицы, иллюстрирована 35 рисунками.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Цитологическая характеристика клеток перевиваемой линии ЛЭК-ВИЭВ-90.
- Цитогенетическая характеристика клеток линий ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV.
- Морфогенез вируса лейкоза крупного рогатого скота в культурах клеток естественно восприимчивого и гетерологичного вида животных.
- Антиген продуцирующая активность клеточной линии ЛЭК-ВИЭВ-90 в сравнении с клеточной линией FLK-BLV.

Автор выражает искреннюю благодарность научным руководителям М.И. Гулюкину и Г.А. Надточему, а также к.б.н. Т.В. Гальнбек, к.б.н. Л.А. Ивановой, к.б.н. А.С. Малоголовкину за ценные консультации, контроль, сопровождение данной диссертационной работы и моральную поддержку.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Общая характеристика лейкоза крупного рогатого скота

Лейкоз крупного рогатого скота является тяжелым хроническим заболеванием. Экономический ущерб животноводству выражается в снижении молочной продуктивности и качества молока, нарушении воспроизводительной функции больных коров, снижении веса и вынужденного убоя инфицированных животных [16, 21, 87, 150].

Различают две формы лейкоза: спорадическую и энзоотическую. Спорадическая форма встречается редко, и в основном, поражает молодых животных (до 3-х летнего возраста). Она проявляется увеличением лимфатических узлов, инфильтрацией костного мозга (ювинальный лейкоз), увеличением тимуса (тимусный лейкоз) и узелковой лейкемической инфильтрацией кожи [145, 185]. Этиологический агент при спорадическом лейкозе не выявлен [185]. Энзоотический лейкоз характеризуется длительным латентным периодом, во время которого в крови одновременно выявляют вирус лейкоза и антитела к нему. Болезнь сопровождается пролиферацией неопластических клеток и формированием опухолей [146].

С момента инфицирования до развития симптомов, характерных для лейкоза, проходят многие годы. Инфекция носит хронический характер, и развитие болезни проходит в несколько стадий.

Стадийность развития лейкоза в интерпретации разных авторов не имеет принципиальных различий.

Одни авторы выделяют пять стадий заболевания – инкубационную, предлейкозную, начальную, развернутую и терминальную [41, 70].

Другие авторы выделяют следующие стадии заболевания: стадия бессимптомного вирусонительства, сопровождающаяся появлением антител в высокой концентрации, сменяется стадией персистентного лимфоцитоза, когда количество лимфоцитов в 1 мкл крови достигает 20-30 тыс. Персистентный лимфоцитоз может сохраняться до 8 лет с временными колебаниями и иногда с появлением в крови лимфобластов, что свидетельствует о развитии третьей

стадии - опухолевой. Иногда опухолевая стадия развивается, минуя стадию персистентного лимфоцитоза [5].

Л.Г. Бурба (1986) [6] процесс развития лейкоза разделяет на инфекционную, клиническую (гематологическую) и терминальную (опухолевую) стадии.

Инкубационная или латентная стадия продолжается с момента заражения ВЛ КРС до развития первых признаков прижизненного проявления болезни (лейкоцитоз, лимфоцитоз). Продолжительность инкубационного периода при экспериментальном заражении по данным разных авторов зависит от метода введения, дозы и характера введенного инфекционного материала и варьирует от 15 дней до нескольких лет [61, 174].

Инфицирование крупного рогатого скота вирусом лейкоза (ВЛ КРС) приводит к постоянной выработке антител к антигенам вируса, начиная с первых недель после заражения. Установлено, что ВЛ КРС и антитела к нему персистируют в крови одновременно и пожизненно [84].

Особенностью вызываемого ВЛ КРС инфекционного процесса является репрессия продукции вируса в организме инфицированного животного, вследствие которой свободные вирионы или антигены вируса в нативной крови не находят или находят крайне редко [110, 119]. Образование вируса, а также продукция антигенов ВЛ КРС р24 и gp51 в лейкоцитах больных лейкозом животных происходит только после их культивирования *in vitro*. Подавление экспрессии ВЛ КРС в организме животного позволяет ему уклоняться от иммунного ответа. Продукция ВЛ КРС находится под контролем антител к антигенам ВЛ КРС. Антитела к гликопротеидному антигену ВЛ КРС подавляют репликацию вируса, а антитела к антигену р24 не влияют на нее [129].

Предлейкозная стадия характеризуется незначительными и нестойкими клеточными и субклеточными изменениями, свойственными лейкозу. Некоторые исследователи считают, что предлейкоз не всегда переходит в лейкоз [69, 259].

Тем не менее, тождество персистентного лимфоцитоза и предлейкозного состояния раньше подвергалось сомнению [172].

Ежегодно у 3-5% инфицированных животных отмечается развитие

относительного или незначительного абсолютного лимфоцитоза [71, 72].

Начальная стадия (доклиническая, гематологическая), как и предлейкозное состояние, характеризуется отсутствием клинических симптомов болезни, но более постоянными изменениями качественного и количественного состава периферической крови в виде абсолютного лимфоцитоза и наличием единичных малодифференцированных клеток.

Развернутая (клинико-гематологическая) стадия, в которую при прогрессировании или обострении лейкозного процесса переходит заболевание, характеризуется следующими (одним или несколькими) признаками: лейкомическая картина крови (более 40 тыс. лейкоцитов в 1 мкл), наличие в лейкоцитарной формуле свыше 5% молодых, недифференцированных или атипичных опухолевых клеток, независимо от количества лейкоцитов, умеренная или сильная лимфоидная метаплазия костного мозга, увеличение содержания недифференцированных или опухолевых клеток до 10-20% и более в миелограмме, спленограмме, аденограмме или гепатограмме, появление неспецифических или первых специфических клинических симптомов лейкоза [70]. Общее состояние животного - упитанность, воспроизводительная функция и продуктивность не вызывают подозрения на лейкоз. Вследствие медленного течения и короткого срока эксплуатации коров, большая часть инфицированных и гематологически больных животных выбраковывается и сдается на мясо.

Однако, у части больных происходит прогрессирование процесса и переход его в клиническую (опухолевую или термальную) стадию болезни [40, 261]. Конечная или терминальная стадия (клинико-патанатомическая) характеризуется увеличением поверхностных или доступных ректальному исследованию внутренних лимфоузлов и селезенки, наличием опухолей или экзофтальма. Опухолевая форма лейкоза возникает у животных в возрасте 3-х лет и старше и составляет от 1 до 10% от числа инфицированных животных [173, 185]. У животных отмечают прогрессирующее увеличение лимфатических узлов (подчелюстных, поверхностных шейных, надвымянных, коленной складки). Иногда в области шеи или голодных ямок могут быть увеличены подкожные

лимфатические узлы. При ректальном исследовании самок на стельность обнаруживают увеличение тазовых лимфатических узлов, утолщение стенок матки [71, 78].

Конечная стадия лейкоза характеризуется гематологическими и глубокими цитоморфологическими изменениями. Животные могут иметь алейкемический или в пределах нормы (30,2 %), сублейкемический (39,5%) и лейкемический (27,9%) состав крови [7, 68].

Для этой стадии характерно исхудание животного, анемия, снижение молочной продуктивности. Заболевание неизменно заканчивается смертью животного через несколько недель или месяцев после обнаружения первых клинических симптомов [185]. У павших или вынужденно убитых больных лейкозом животных при вскрытии в большинстве случаев отмечают увеличение селезенки. Капсула напряжена, фолликулы часто гиперплазированы. Лимфатические узлы в той или иной степени увеличены (симметрично или асимметрично). На разрезе поверхность саловидная, серо-белого цвета, часто с очагами кровоизлияния и некроза. В остальных органах и тканях, которые вовлекаются в опухолевый процесс, на поздних стадиях развития заболевания отмечают диффузные или очаговые серо-белые разрастания различной степени [71, 174].

Таким образом, заболевание характеризуется пролиферацией неопластических элементов, в результате чего образуются отдельные опухолевые массы и (или) диффузная инфильтрация различных тканей и органов. Среди форм лейкоза, вызываемого ВЛ КРС, преобладает лимфоидный лейкоз. Его диагностируют чаще у коров в возрасте 5-6 лет с широким спектром поражения органов [7, 8, 72, 153].

Другие формы лейкоза встречаются реже. Так, по результатам исследований, проведённых в Ленинградской области в период 1973-1996 гг., ретикулез, ретикулосаркому, гемоцитобластоз и миелолейкоз диагностировали всего в 10 % случаев заболевания лейкозом [42].

2.2. Таксономия семейства ретровирусов

Вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС) является РНК содержащим вирусом и входит в семейство Retroviridae, подсемейству Oncoviridae, роду Deltaretrovirus, многие представители которого обладают онкогенным потенциалом [60, 75, 244].

Ретровирусы - большая группа РНК-содержащих вирусов, поражающих позвоночных. Семейство ретровирусов в целом обладает рядом уникальных свойств. Геном ретровирусов представлен одноцепочечной РНК. Репликация вирусов в клетке происходит с помощью фермента РНК-зависимой ДНК-полимеразы (синонимы - ревертаза, обратная транскриптаза), осуществляющего синтез ДНК на матрице вирионной РНК. Открытие этого фермента позволило понять механизм репликации РНК-содержащих вирусов в клетке, проходящей через стадию ДНК-провируса, интегрированного в геном клетки-хозяина [93, 229]. Название фермента послужило основой и для названия всего семейства - Retroviridae (от лат. Retro - обратный).

В соответствии с классификацией Международного Комитета Таксономии Вирусов (ICTV) ВЛ КРС занимает следующие положение в таксономической структуре семейства Retroviridae [244, 171, 200].

В соответствие с ней в семейство Retroviridae входят:

Род Alpharetrovirus.

Вирусы лейкоза птиц, саркомы Рауса, миелобластоза и миелоцитоматоза птиц, саркомы птиц СТ10, сарком фуджинами, UR2, Y73, карциномы птиц 2.

Род Betaretrovirus.

Вирусы опухали молочных желёз (Murine mammary tumor virus leukemia virus (MMTV), лангуров, Мезон-Пфайзера обезьян, аденокарциномы легких овец, ретровирус беличьих обезьян, ретровирусы человека, способствующие развитию рака молочной железы.

Род Gammaretrovirus.

Вирусы лейкемии мышей, кошек, гиббонов, онковирусы типа С свиней и морских свинок, вирусы саркомы мышей (Harvey, Kirsten, Moloney, Finkel-Biskis-

Jenkins), кошек (Snyder-Theilen, Hardy-Zuckerman, Gardner-Arnstein), шерстистых паукообразных обезьян, ретровирусов гадюк, вирусы ретикулоэндотелиоза птиц, некроза селезенки уток, синцитиальный вирус цыплят.

Род Deltaretrovirus.

Вирус лейкоза крупного рогатого скота, Т – лимфотропные вирусы приматов 1,2,4 (человека и обезьян), 3 (обезьян).

Род Epsilonretrovirus.

Вирусы дермальной саркомы и эпидермальной гиперплазии окуневых рыб 1 и 2. Возможные члены рода: вирус гиперплазии окуней, ретровирус змееголовых рыб.

Род Lentivirus.

Вирусы иммунодефицита человека 1 и 2, обезьян, крупного рогатого скота, кошек, вирусы инфекционной анемии лошадей, висны-мэди, артрита-энцефалита коз, лентивирус пумы.

Род Spumavirus.

«Пенящие» вирусы шимпанзе, крупного рогатого скота, кошек, обезьян 1 и 3.

Вирус лейкоза крупного рогатого скота является типичным представителем рода Deltaretrovirus. К дельтаретровирусам также относятся вирусы Т – клеточной лейкемии человека типов 1,2,3,4 (HTLV – 1,2,3,4), Т – клеточной лейкемии обезьян (STLV), которые инфицируют позвоночных животных и служат причиной лейкемии и лимфомы [208]. Все представители рода по морфологии и морфогенезу представляют собой вирусные частицы типа С и в этом отношении подобны гаммаретровирусам, незрелый капсид которых собирается на плазматической мембране, как «вирусы типа С» [244].

Большинство представителей ретровирусов обладают выраженным сродством к клеткам лимфоретикулярной и гемопоэтической ткани [260]. По механизму индуцируемой злокачественной трансформации ретровирусы можно разделить на 3 группы:

- 1) трансформирующие ретровирусы, активирующие клеточные онкогены;
- 2) трансформирующие ретровирусы, являющиеся носителями вирусного

онкогена;

3) вирусы человека, тропные к Т-клеткам лимфатической системы и вирус лейкоза крупного рогатого скота, содержащий tat-ген.

Высокий уровень родства выявлен между ВЛ КРС и человеческими Т-лимфотропными ретровирусами (HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3) [102, 103, 188, 189, 233]. Вместе с тем, определенный уровень родства установлен между вирусом иммунодефицита человека и лентивирусами лошадей и овец [168, 215].

2.3. Вирус лейкоза крупного рогатого скота

2.3.1. Морфология ВЛ КРС

Впервые морфология ВЛ КРС была достоверно описана J. Miller et al. в 1969 г. [243]. Впоследствии морфология и морфогенез вируса были подробно изучены А.Ф. Валиховым и Г.А. Надточеем (1974-1976 гг.) [10, 58], З.Н. Меньшиковой (1979 г.) [51], J. Calafat et al. (1974 г.) [113].

Вирионы дельтаретровирусов по морфологии и морфогенезу подобны гаммаретровирусам, типичным представителем которых является вирус лейкоза мышей, и представляют собой вирионы типа С.

Зрелые вирионы ВЛ КРС содержат центрально расположенный электронно-плотный нуклеокапсид, диаметр которого в зависимости от методов фиксации и обработки препарата варьирует от 40 до 90 нм [54, 58, 113, 130, 162, 224, 243,]. Внешняя вирусная оболочка отделена от центральной части нуклеокапсида промежуточным слоем. Нуклеоид имеет гексагональное очертание, что предполагает возможную экосаэдрическую структуру [58, 113, 181, 183]. Внешняя вирусная оболочка представлена липопротеидной мембраной. В мембране находится гидрофобный белок р15, который соединен с белком gp51 с помощью ковалентных (дисульфидных) или нековалентных связей [104]. Вирусная РНК совместно с внутренними структурными белками образует нуклеокапсид, на поверхности которого расположен белок gp30. На поверхности внешней оболочки выявляют пепломеры шипики с пуговкообразным утолщением на конце длиной 8-11 нм, состоящих из повторяющихся субъединиц, образованных вирусными

гликопротеинами gp51 и gp30 [10, 11, 12, 13, 50, 51, 58, 185, 204, 224, 236, 251]. В нуклеокапсиде РНК находится в виде спирализованного рибонуклеопротеина, который содержит гистоподобный белок p10, фосфорилированный белок p12 и обратную транскриптазу. Химический состав вирионов: белки – 60 % (из них 3,5-7 % гликопротеинов), липиды – 35% (в основном фосфолипиды), нуклеиновые кислоты - 2,2 % и углеводы - 0,5 % [176, 219, 251].

Вирионы имеют плавающую плотность в растворе сахарозы и хлористого цезия, равную 1,15-1,18 г/мл и 1,17-1,33 г/мл соответственно [172, 178, 251]. Вирион, константа седиментации которого составляет 600-800 S, имеет молекулярную массу 4×10^8 Da и содержит в среднем 5×10^{16} г белков и 2×10^{17} г РНК. Из общего количества РНК примерно половину составляет геномная с константой седиментации 60-70 S. Остальная часть РНК имеет клеточное происхождение и состоит из 5-7 S РНК и набора тРНК, причем одна из тРНК функционирует как затравка при обратной транскрипции геномной РНК вириона. Геном ВЛКРС представлен одноцепочечной РНК, состоящей из двух равных молекул (с константой седиментации около 35 S), которые связаны нековалентными связями в 5'-концах мономеров [185, 193].

2.3.2. Структура генома ВЛ КРС

Геном вируса может существовать в двух формах: геномной одноцепочечной РНК или в виде провирусной ДНК, синтезированной на геномной РНК как на матрице [109]. Геномная РНК содержится только в зрелых вирионах. В жизненном цикле вируса геномная РНК функционирует только один раз, когда служит матрицей для фермента - обратной транскриптазы при биосинтезе комплементарной ДНК. Биохимические процессы, необходимые для полной репликации вируса, выполняются с участием ДНК-провируса [193, 214, 231].

Длина полной последовательности интегрированной ДНК провируса лейкоза КРС составляет 8714 п.н. [217]. Как и у всех ретровирусов, концы интегрированного провируса лейкоза КРС представляют собой последовательности, называемые длинными концевыми повторами (LTR - long

terminal repeat). Каждый LTR состоит из 530 п.н. с обратным повтором в 6 п.н. на 5'- и 3'-концах, фланкированных прямыми повторами в 6 п.н. из ДНК клетки хозяина. LTR вируса лейкоза КРС способен функционировать в качестве усилителя транскрипции и увеличивает экспрессию гена, направляемую с концевым гетерогенным промотором. Каждый LTR состоит из трех последовательных областей, называемых U3, R и U5. Область U3 включает транскрипционные регуляторные последовательности. В первом основании R области иницируется синтез мРНК. 3'-конец U3 области включает сигналы полиаденилирования, а 3'-конец R области соответствует сайту полиаденилирования [88, 219].

Идентифицированы 7 альтернативно сплайсированных РНК, а также 8 открытых рамок считывания (ОРС), обозначенных как gag, prt, pol, env, tax, rex, RIII, GIV [88, 219].

ОРС гена gag размером в 1179 н. (628 н. - 1806 н.) кодирует белок предшественник со структурой NH₂-p15-p24-p12-COOH, соответствующий ранее описанному белку, обозначенному Pr45 (gag) [193, 214, 217]. Белки, кодируемые геном gag, принимают участие в формировании вирусного капсида. N-концевой белок p15 состоит из 109 а.о., главный белок ядра (p24) состоит из 214 а.о. и белок p12, связанный с вирионной РНК, - из 69 а.о. [214, 217].

Белок p15 - является фосфопротеидом, не содержащим остатки метионина. Совокупность молекул белка p15 представлена двумя разновидностями: одни молекулы связаны с липидным слоем двухслойной мембраны, другие - с вирионной РНК [217].

Белок p24 является нейтральным и умеренно гидрофобным; антигенная структура сохраняется после обработки эфиром или после фиксации ацетоном [118, 214, 228].

Белок p12 составляет нуклеокапсид. У него высокое содержание глицина и пролина, что определяет низкий уровень вторичной организации белковой молекулы. В вирионе он тесно связан с вирусной РНК и имеет изоэлектрическую точку 8,0 [214, 118].

Изучение аминокислотного состава р12 двух изолятов ВЛ КРС выявило различие только в одном аминокислотном остатке [219].

Непосредственно на 3'-конце гена gag начинается новая ОРС. Кодированный данной ОРС белок prt обнаруживает высокую гомологию с протеазами вирусов родов Alpharetrovirus и Gammaretrovirus [97, 178, 214, 217]. Белок prt синтезируется в виде предшественника в 65 kDa и представляет собой димер из двух идентичных белковых субъединиц. Протеаза осуществляет расщепление предшественников gag, pol и env [178].

После участка протеазы имеется еще одна ОРС для гена pol, кодирующая 852 а.о. (2317 н. - 4875 н.), которая обнаруживает умеренную гомологию при сравнении с геном pol Alpharetrovirus и Gammaretrovirus. Продукт гена pol (145 kDa) превышает молекулярную массу pol-кодируемой обратной транскриптазы ВЛ КРС (70 kDa) [161, 109, 217]. Этот ген кодирует также интегразу ВЛКРС (32 kDa) [109]. Интеграза действует как эндонуклеаза, т.е. может разрезать двухцепочечную ДНК по определенным последовательностям, а также и как лигаза. Интеграза присоединяется к концам провирусной ДНК и отвечает за интеграцию вирусного генома в ДНК клетки хозяина [109].

Фермент обратная транскриптаза является слабым антигеном.

Антитела к этому антигену выявляют только у небольшого числа коров, естественно инфицированных ВЛ КРС, и независимо от концентрации у них в сыворотке антител против структурных вирусных белков [174, 182, 225, 258].

Следующую ОРС составляет ген env (4821 н. - 6368 н.), кодирующий белок предшественник grg72, который расщепляется на два гликолизированных белка-оболочки, трансмембранный gp30 (214 а.о.) и поверхностный gp51 (268 а.о.) [159]. Гликопротеины gp51 и gp30 обладают умеренно гидрофобными свойствами и входят в состав вирусной оболочки в виде комплекса gp51/gp30 [217].

Моноклональные антитела к gp51 ВЛ КРС взаимодействуют с 8 независимыми эпитопами на молекуле белка, из которых 3 эпитопа (F, G, H) являются биологически активными, определяющими инфекционность вируса и способность вируспродуцирующих клеток формировать синцитий [100, 104, 234]. Удаление

углеводных звеньев gp51 смесью гликолидаз приводит к снижению до минимума реактогенности антигена с антисыворотками, полученными от коров и овец, инфицированных ВЛ КРС [109, 164, 190].

Первичная структура gp30 имеет 36 % идентичных аминокислотных остатков с белком gp21 вируса Т-клеточного лейкоза человека. Меньший уровень гомологии установлен с белком gp15 вируса лейкоза мышей и gp36 вируса саркомы Рауса [217, 253].

Сравнение нуклеотидной последовательности генов env и аминокислотной последовательности кодируемых ими белков-предшественников 7 европейских и японских изолятов ВЛ КРС позволило идентифицировать несколько подгрупп вируса лейкоза: японо-американскую (штаммы BLV-1, VdM и FLK) и европейскую (штаммы T15-2, LB285 и LB59), при этом вариабельность гена env составляла менее 6% [120]. В австралийском изоляте ВЛ КРС (pBLV-A1) выявлены вариации в аминокислотном составе по сравнению с японскими и бельгийскими изолятами, которые составляют примерно 3%, при этом замены были равномерно распределены по гену [63, 177, 217, 245].

Ранее обозначаемая как рХ область, 3'-концевая часть генома ВЛ КРС кодирует 4 белка (Tax, Rex, RII, GIV). Белок Tax (34 kDa) является фосфопротеином, который трансактивирует инициацию синтеза мРНК из U3 области вирусного LTR. Белок Rex (18 kDa) является фосфопротеином, который принимает участие в пост-транскрипционном контроле экспрессии белков ВЛ КРС [123, 178, 182, 254, 257].

Исследование дифференциального сплайсинга мРНК ВЛ КРС выявило существование двух мРНК, кодирующих 2 новых белка, RIII и GIV. Уровень экспрессии GIV коррелирует с развитием персистирующего лимфоцитоза. Однако роль этих белков еще недостаточно выяснена [88, 219].

2.3.3. Репликация вируса

Репликация ВЛ КРС, как и у других вирусов семейства Retroviridae,

происходит в цитоплазме и ядре клетки. Проникновение вируса в клетку осуществляется путем слияния липопротеидной оболочки вириона с плазматической мембраной клетки или в результате эндоцитоза. Гликопротеины gp51 и gp30 обладают умеренно гидрофобными свойствами и входят в состав вирусной оболочки в виде комплекса 1:1, образованного дисульфидными связями [96, 226]. Они играют важную роль в прикреплении, слиянии и проникновении в клетку [245, 246]. В цитоплазме клетки вирионная РНК транскрибируется в двухцепочечную ДНК-копию с помощью обратной транскриптазы. В клеточном ядре вирусная интеграна способствует интеграции ДНК-копии в геном клетки хозяина. Интеграция является необходимым условием для репликации вируса. Из интегрированного провируса транскрибируется полноразмерная молекула РНК. Эта РНК выполняет две главные функции: формирует вирионную РНК и служит мРНК для синтеза продуктов генов gag, pol и env [214, 217, 219]. Каждый из вирусных генов детерминирует синтез белка предшественника, который затем разрезается. Одновременно с процессингом на цитоплазматической мембране происходит сборка вирионов. Оболочка вириона образуется на плазматической мембране клетки во время почкования [58, 77].

2.4. Взаимодействие вирус-клетка

Одним из проявлением действия вируса на клетку являются патологические изменения в ядрах - ядерные "карманы" [10, 51, 58, 98]. Эти авторы относят ядерные карманы к стойким маркерным признакам лейкозных клеток и рассматривают их как дополнительный критерий в диагностике эпизоотического бычьего лейкоза. Другим проявлением патологического действия вируса на клетку является его способность формировать многоядерные синцитии в культурах чувствительных клеток [43, 79, 152, 153, 155, 163, 239, 240]. Впервые это явление наблюдали в культурах клеток, полученных из опухолевых тканей крупного рогатого скота [116, 117, 239].

Некоторые авторы наблюдали образование синцитиев в культуре клеток легкого человека W-38 после культивирования с лимфоцитами периферической

крови лейкозных животных. Обнаружение синцитиев в зараженных лимфоцитами культурах клеток позволило предположить, что наличие синцитиев может быть связано с действием вирусных частиц. Фокусы синцития обычно появляются через 4-8 дней после начало сокультивирования или внесения в индикаторную культуру бесклеточных вирусных материалов [127, 128].

М.Т. Van der Maaten et al. (1974 г.) [239], С.А. Diglio, J.F. Ferrer (1976 г.) [127], D.S. Graves et al. (1976 г.) [163], К. Irgens et al. (1977 г.) [136], Р.А. Кукайн с соавт. (1977, 1979 гг.) [43, 44], В.А. Крикун с соавт. (1979 г.) [28] указали, что образование синцитиев является единственным патологическим изменением в инфицированных ВЛКРС культурах. Способность ВЛ КРС индуцировать образование синцитиев была использована для разработки чувствительного и быстрого диагностического теста на наличие инфекционного вируса [28, 86, 223]. Этот тест, отработанный на культуре клеток селезенки эмбриона коровы, выращенной на среде Игла и ГЛА с добавлением 20% сыворотки эмбриона коров, является более чувствительным и доступным методом, чем метод электронно-микроскопического обнаружения частиц ВЛ КРС в культурах клеток. Каждый очаг синцития, образованный в культуре клеток селезенки эмбриона коровы является результатом инфекции одной биологически активной (инфекционной) вирусной частицы [223].

Наряду с культурами клеток крови ВЛ КРС продуцируют и лейкоцитарные культуры клеток лимфы больных лейкозом животных. По исследованиям З.Н. Меньшиковой с соавт. [50, 52], Э.К. Махмуда [48], ультраструктура вирусных частиц в первичных культурах лимфы не отличается от ультраструктуры вирусных частиц в первичных культурах крови. Наблюдаются зрелые и незрелые вирионы.

2.5. Культивирование вируса лейкоза крупного рогатого скота

Вирионы ВЛ КРС впервые были выявлены в культуральной жидкости краткосрочных культур лимфоцитов больных лейкозом животных [10, 18, 58, 123, 135, 164, 197, 243, 249, 252]. Молекулярно-биологические исследования показали,

что уже через 3-4 часа культивирования краткосрочных культур выявляют вирусспецифические антигены, а максимум продукции приходится на 18-24 час культивирования [49, 61]. Стимулирование лимфоцитов *in vitro* не всегда оказывает положительное действие на репликацию вируса [109, 110].

Для репродукции ВЛ КРС ряд авторов изучали возможность получения продуцирующих перевиваемых линий клеток лимфоидного ряда от животных с лимфосаркомой [25, 26, 121, 151, 170, 191, 205, 239]. Несмотря на относительно простую технологию получения лимфоидных культур от больных лейкозом животных [213], неудобствами применения полученных линий является: невысокая продукция вируса, поиск животных–доноров ткани, использование специальных методов для дезагрегации ткани [80]. Наиболее удачную линию клеток получил R.Z. Matoun (1981 г.) [191], в которую удалось перевести лейкоциты больного животного. Монослойная перевиваемая линия LB-591y продуцировала большие количества вируса, имеющего морфологические, биохимические и биологические свойства, идентичные ВЛ КРС [192].

Кроме того, в краткосрочных и длительно живущих культурах лейкоцитов от лейкозных животных продукция ВЛ КРС сопровождается дегенерацией и отмиранием части клеток [223], значительно засоряя получаемый вирусный препарат клеточным детритом [13, 163]. В связи с этим, во многих лабораториях мира велись попытки получения продуктивной персистенции ВЛ КРС в линиях различного происхождения.

Принципиально новым подходом стало сокультивирование лимфоцитов крови больных лейкозом коров с клетками перевиваемых линий, в результате чего получали перевиваемые хронически инфицированные вирусом лейкоза крупного рогатого скота линии клеток.

M.J. Van Der Maaten, J.M. Miller (1974, 1976 гг.) [239, 240] удалось первыми вызвать персистентную инфекцию ВЛ КРС в клетках линии почки эмбриона овцы – FLK. Полученная линия отличалась высокой продукцией вируса [9, 13, 45, 49, 162, 210] и его растворимого гликопротеида [206, 216] в течение большого количества пассажей. Поэтому большинство экспериментальных работ по

изучению структуры ВЛ КРС и биосинтеза вирусных компонентов, были выполнены с использованием данной культуры [4, 27]. Рестрикционный анализ показал, что в одной клетке этой культуры содержатся 4 копии провируса ВЛ КРС [214]. В результате клонирования каждой из этих копий провируса было установлено, что только одна из них обладает инфекционностью при постановке опытов на трансфекцию. Методом клонирования FLK-BLV получены сублинии, различающиеся по уровню продукции вируса [4, 143, 169, 194].

Для культивирования клеток линии FLK-BLV, как правило, применяют питательную среду Игла MEM [45, 90, 206, 240], либо среду RPMI 1640 [203] с обязательным добавлением 10-20% сыворотки эмбрионов или новорожденных телят. Продукция вируса лейкоза зависит от концентрации эмбриональной сыворотки в ростовой среде и снижение ее концентрации с 10% до 5,0% или 2,5% приводит к снижению продукции вируса на 40% и 80% соответственно [14]. Высокий выход вируса может быть получен при культивировании клеток линии FLK-BLV роллерным способом и на микроносителях типа Цитолар, повышая урожай вируса в 3-4 раза по сравнению с роллерным или стационарным способом. Роллерный режим позволяет значительно снизить расход среды: 10-ти кратное увеличение площади монослоя при 2-х кратном увеличении расхода среды позволяет получить с 1 л культуральной среды до 2 мг gp51 лейкозного вируса [4, 45, 55, 56, 80, 261]. Максимальный урожай вирусного антигена (0,372 мг/мл) получили в культуре FLK-BLV, с использованием сыворотки крови лошади [230]. Митогены (ФГА, Con-A) и липосахарид не оказывали заметного действия на продукцию ВЛ КРС [250].

ВЛ КРС размножается с разной интенсивностью в различных культурах клеток. В краткосрочных культурах вирус накапливается преимущественно во внеклеточных пространствах, но может формировать и внутриклеточные скопления. Почкующиеся формы вирионов можно обнаружить через 3-9 часов культивирования. Почкование вируса сопровождается значительной дистрофией цитоплазмы [4, 27]. Инфицированные клетки ВЛ КРС формируют синцитии, которые являются результатом действия одной биологически активной

инфекционной вирусной частицы и представлены поликариоцитозом, образованным в результате слияния 5-25 клеток. Образование синцития связано с акцепторными функциями клеточной мембраны и вирусных антигенов [44, 185].

В настоящее время существует большое число хронически инфицированных лейкозом линий клеток, имеющих происхождение от различных животных и различных опухолевых тканей: FLK-J5 (фибробласты легкого эмбриона коровы); ПЭК (почки эмбриона коровы); Tbl-Lu (легкого эмбриона летучей мыши); BLV-Simian (легкого макаки-резус); FLS и J-1228 (селезенки овцы); ТЭК-МВА-76 и LmTT (тимуса эмбриона овцы) и др. [38, 110].

В 1990 г. во Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко была получена новая перевиваемая, хронически инфицированная ВЛ КРС линия клеток легкого эмбриона крупного рогатого скота (ЛЭК-ВИЭВ-90), способная долго, не вырождаясь, интенсивно продуцировать вирус лейкоза крупного рогатого скота и его антигены [81].

2.6. Диагностика лейкоза крупного рогатого скота

2.6.1. Клинические, патоморфологические и гематологические методы исследования лейкоза КРС

До применения серологических реакций для выявления антител к ВЛ КРС диагностика лейкоза КРС базировалась на клиническом, патоморфологическом и гематологическом методах исследования [61, 109].

Клинический метод включает обнаружение у животных увеличения поверхностных (надколенных, надвыменных, предлопаточных и др.) и доступных ректальному исследованию внутренних лимфатических узлов, селезенки, опухолевых разрастаний в различных частях тела [184, 186, 241].

Патоморфологические исследования основывались на установлении патологических изменений в организме инфицированного животного. При вскрытии трупов учитывались размер и консистенция селезенки, лимфатических узлов и других внутренних органов [61, 71].

Гематологические исследования позволяют установить повышенное содержание лейкоцитов, в частности лимфоцитов крови. Поэтому раньше во многих странах мира одним из основных диагностических методов был гематологический. Оценка результатов гематологических исследований производилась по т.н. "лейкозному ключу", в основу которого положены абсолютное число и процент лимфоцитов для двух возрастных категорий крупного рогатого скота - до 2 лет и старше 3 лет [66, 71].

Наиболее специфичным для лейкоза является развитие лимфоцитоза за счет увеличения количества лимфоидных и малодифференцированных клеток. При лимфоидной форме лейкоза происходит пролиферация лимфоидных клеток разной степени зрелости. При хроническом течении болезни увеличивается содержание лимфоцитов, а при остром и подостром течениях, обострении хронически протекаемого лейкозного процесса преобладающими клеточными элементами становятся пролимфоциты и лимфобласты [66, 71, 174, 247].

Однако все эти вышеперечисленные методы не относятся к методам ранней диагностики. Проявлению клинических и патоморфологических изменений у животных при лейкозе КРС предшествует длительный инкубационный период, который затем сменяется стадией бессимптомной инфекции. Количественные и качественные изменения морфологической картины крови начинают проявляться при стадии бессимптомной инфекции. В большинстве случаев клинические признаки, патоморфологические и гематологические изменения при лейкозе КРС схожи с другими заболеваниями, поэтому не позволяют достоверно выявить всех инфицированных животных [47, 177].

2.6.2. Серологические реакции

Характерной особенностью ВЛ КРС является пожизненная одновременная персистенция вируса и вирусоспецифических антител. Поэтому серологические методы обнаружения противовирусных антител можно использовать для выявления больных животных. У зараженных животных в крови циркулируют антитела к некоторым из структурных белков вируса. Однако диагностическое

значение имеют антитела против gp51 и p24 [80, 108, 144, 238]. Количественное соотношение антител против p24 и gp51 связано со стадией инфекционного процесса [166]. Многочисленные исследования показывают, что антитела к gp51 появляются раньше и в более высоком титре, чем антитела к p24 и, следовательно, серологические реакции, направленные на выявление антител против gp51, по своей чувствительности будут превосходить реакции, в которых используется в качестве антигена белок p24 [91, 99, 124].

Для обнаружения специфических антител в лабораториях широко применяют реакцию иммунодиффузии (РИД) и иммуноферментный анализ (ИФА), для постановки которых разработаны и выпускаются соответствующие коммерческие диагностические наборы. Диагностические наборы содержат оболочечный гликопротеин ВЛКРС, стандартизованный по референтной сыворотке Е1; референтная сыворотка Е4, разведенная с отрицательной сывороткой в соотношении 1:10, которая должна быть выявлена как положительная без повторной постановки реакции или предварительной концентрации. Референтные сыворотки Е1 и Е4 предназначены для стандартизации всех диагностических наборов при проведении РИД и ИФА [138, 212, 253].

Реакция иммунодиффузии. РИД является одним из широко применяемых методов серологического исследования животных в государственных программах по борьбе с ВЛКРС во многих странах [2, 3, 30, 138].

Сущность метода заключается в том, что антиген и антитело, реагируя в плоском слое агара, образуют преципитат, который проявляется в виде четкой линии преципитации. Реакция иммунодиффузии проходит в 0,8-1,0% геле агара, который готовят на трис-НСl или боратном буферах в диапазоне рН 7,2-8,6, содержащем 8,0-8,5% NaCl [77, 80]. Методика постановки реакции одинакова для всех диагностикумов и предусматривает заполнение лунок антигеном, антисывороткой и испытуемыми сыворотками по схеме 1:2:4 или 1:3:3. Число проявляющихся линий преципитации соответствует числу пар антиген-антитело в исследуемой системе [125].

Первоначально для выявления животных, инфицированных ВЛ КРС, была

разработана РИД, основанная на обнаружении в сыворотке крови антител к внутреннему белку вируса - р24 [63, 74, 196, 243]. Реакция имела низкую чувствительность, хотя и позволяла выявить некоторых инфицированных животных [212]. В 1975 г. впервые появилось сообщение об использовании РИД для выявления антител против гликопротеидного антигена gp51 ВЛ КРС [110, 185]. Первые исследования показали, что большинство сывороток, положительно реагирующих в РИД с gp51, были отрицательными в РИД на р24. Это позволило сделать вывод, что чувствительность РИД с гликопротеидным антигеном gp51 значительно выше, чем при использовании в РИД антигена р24 [89, 137, 175].

Реакция иммунодиффузии в геле агара, направленная на выявление анти-gp51 антител, используется в качестве основного диагностического теста, регламентирующего международную и внутреннюю торговлю племенными животными, спермой и эмбрионами. При первичном обследовании сывороток крови, результаты РИД считают достаточными для объявления стада благополучным и свободным от ВЛ КРС [30].

Этот метод по простоте постановки и относительной низкой стоимости не имеет себе равных среди других серологических реакций и широко применяется для поголовного обследования [122].

Однако на результат РИД влияют многие факторы: качество антигена и контрольных сывороток, количественные соотношения антигена и антител, качество агара, рН и ионная сила буфера, температура, диаметр лунок и расстояние между ними [152, 207].

Недостатком этого метода является то, что реакция не может выявить всех инфицированных животных, так как не у всех заболевших животных уровень антител в крови достигает того значения, которое может быть определено в РИД [64, 134, 184]. Кроме того, этот метод предназначен для выявления антител в индивидуальных пробах сыворотки крови. Для обнаружения антител в низких титрах, например, в индивидуальных или в сборных пробах молока или сыворотки крови рядом авторов рекомендуется ИФА [131, 157, 179, 221].

Иммуноферментный анализ (ИФА). Разработанный в 1971 г. шведскими

учёными Engvall и Perlmann, ИФА в настоящее время стал одним из самых распространенных методов исследования [212]. В первую очередь, достоинствами ИФА являются высокая чувствительность, специфичность, воспроизводимость результатов, а также оперативность постановки анализа, небольшие объёмы исследуемых образцов (1-30 мкл), возможность автоматизации всех стадий выполнения реакции и учёта результатов. Так, чувствительность ИФА в 10-100 раз выше, чем чувствительность РИД [63, 219, 185], а использование в качестве твёрдого носителя для иммобилизации антител или антигенов 96- или 192-луночных полистироловых планшетов позволяет исследовать большое количество образцов. В настоящее время ИФА является наиболее перспективным методом при исследовании сывороток крови животных и молока при проведении массовых эпизоотологических обследований по лейкозу КРС [76, 167].

ИФА позволяет выявить как специфические антитела, так и антиген ВЛ [158, 187, 222]. В первом случае в качестве иммуноспецифического компонента ИФА используют антиген, представляющий собой продукты генов env или gag, очищенный от культуральной суспензии клеток FLK [63, 185, 222]. Для индикации вирусного белка в ИФА используют специфические поликлональные антитела, а также моноклональные антитела к белкам gp51 и p24 ВЛКРС [175, 222, 250].

В лунки с адсорбированным на их поверхности иммуноспецифическим компонентом вносят испытуемые сыворотки или пробы молока. Для обнаружения образовавшегося иммунного комплекса в качестве конъюгатов применяют поликлональные, а чаще моноклональные антивидовые бычьи IgG. В качестве ферментативной метки преимущественно используют пероксидазу хрена или щелочную фосфатазу [156, 157, 175].

Коммерческие наборы ИФА стандартизируют по референтной сыворотке E4 [138, 222]. Процедура стандартизации предусматривает три возможных варианта исследования: индивидуальных проб сыворотки крови, индивидуальных проб молока, пула проб сыворотки крови или молока. В молоке инфицированных животных концентрация противовирусных антител в среднем в 25 раз ниже, чем в

крови [132, 209, 218]. Поэтому референтная сыворотка Е4 должна быть выявлена в ИФА как положительная после дополнительного ее разведения в 25 раз сборным молоком коров из благополучного по лейкозу хозяйства. Если же для исследования берут пул проб сыворотки крови или молока, то чувствительность ИФА должна быть такой, чтобы выявлять референтную сыворотку Е4, разведенную уже в 100 и 250 раз, соответственно [156, 157].

В настоящее время с применением ИФА и РИД проводят эпизоотический контроль лейкоза КРС. Некоторые авторы считают хозяйство благополучным после выбраковки положительных в серологических реакциях животных [20, 39, 150, 219]. В противоположность этому, другие авторы утверждают, что серологические реакции недостаточно чувствительны для обнаружения всех инфицированных животных [64, 85, 112, 160]. Животные, содержащиеся в крови антитела к ВЛ КРС в низких титрах, вполне могут являться "ядром" инфекции. Так, продолжительные исследования инфицированных животных показали, что в крови некоторых из них антитела, которые бы улавливались в РИД и ИФА, не вырабатываются спустя месяцы и годы после заражения [85, 112]. Другими авторами было показано и то, что в этих серологических реакциях, также как и в других, могут возникать ложноположительные результаты [63, 219]. Поэтому серологические методы исследования могут и должны применяться совместно с прямыми методами индикации вирусного антигена. Таким образом, лишь методы прямой диагностики лейкоза КРС в состоянии окончательно подтвердить, является ли животное инфицированным или нет [23, 47, 66, 73, 248].

Среди первых методов прямой индикации ВЛКРС использовали метод культивирования лимфоцитов периферической крови в присутствии митогенов, например, фитогемагглютинаина или конканавалина А, что приводит к продукции вируса в течение 3 ч. Процедура выделения включает сокультивирование с индикаторными клетками и формирование синцития [193]. Затем вирус лейкоза может быть обнаружен либо с помощью электронной микроскопии, либо методами ИФА или РИД, как вирусный антиген [235, 237]. Однако попытки обнаружения или выделения вируса часто бывали безуспешными, вследствие

того, что при ретровирусных инфекциях инфицировано только небольшое количество клеток [180, 255, 256].

Поэтому вопрос прямой индикации ВЛКРС оставался нерешенным вплоть до появления молекулярно-биологических методов диагностики.

2.6.3. Методы молекулярной диагностики

В настоящее время молекулярно-биологические методы (метод гибридизации, метод ПЦР) отличаются высокой точностью и результативностью. С развитием методов молекулярной биологии стало возможным обнаружение возбудителей различных инфекций, включая и лейкоз КРС [23, 34, 36, 46, 63, 92, 142, 219].

В последние годы для выявления, идентификации и дифференциации различных патогенов, в том числе и лейкоза КРС, во многих диагностических лабораториях мира используют полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Метод ПЦР может использоваться для диагностики лейкоза крупного рогатого скота наряду с серологическими методами, а также в качестве подтверждающего теста. [17, 22, 34, 92, 94, 179].

Отмечено, что провирусная ДНК лейкоза КРС обнаруживается в крови большинства животных, серопозитивных по вирусу лейкоза КРС [33, 149].

Достоинством метода ПЦР является возможность амплифицировать желаемый участок ДНК или РНК, даже если анализируемый препарат содержит сложную смесь молекул, вплоть до суммарной клеточной ДНК. Метод ПЦР можно использовать для анализа патологического материала без предварительного пассирования на культурах клеток. При проведении реакции можно включать в структуру амплифицированной ДНК различные метки (радиоактивные, флуоресцентные и др.), вводя их предварительно в состав праймеров [94, 105, 199].

Для обнаружения провирусной ДНК или РНК ВЛКРС использовались праймеры из различных областей генома - env, gag, pol, tax и rex [34, 64, 107, 139, 140, 202, 256].

Однако метод ПЦР имеет и свои недостатки, знание которых позволяет их

избежать. Наиболее серьезной проблемой является исключительно высокой чувствительности метода ПЦР - возможность получения ложноположительных результатов анализа [34, 65, 92, 94].

Для выявления генома вируса лейкоза крупного рогатого скота разработаны различные варианты ПЦР-диагностики: в Австралии [107, 132, 133, 199], в США [92, 221], в Швеции [105], в Германии [149], в России [34, 47, 64] и в других странах. В настоящее время в РФ в ветеринарных лабораториях применяются коммерческие ПЦР тест-системы, которые упрощают процедуру анализа [22].

Все большее распространение получает усовершенствованный метод ПЦР с детекцией в режиме реального времени (Real-time PCR). Сущность метода заключается в исследовании накопления продуктов амплификации с помощью специального прибора без последующего электрофореза. Real-time PCR позволяет расширить возможности молекулярной диагностики и решает несколько проблем генодиагностики: устраняет контаминацию, делает простым и доступным для обычных лабораторий количественный анализ, дает возможность определения в одной пробирке нескольких видов возбудителя [35, 57, 115, 142].

Таким образом, ПЦР может быть подтверждающим тестом при диагностике лейкоза КРС. Для более точной идентификации можно провести секвенирование или гибридизацию продуктов ПЦР, однако для многих лабораторий этот способ остается дорогостоящим и трудоемким [94].

3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Материалы и методы исследований

3.1.1. Культуры клеток

В работе использовали две линии перевиваемых клеток, хронически инфицированных ВЛКРС.

FLK-BLV - линия клеток почки эмбриона овцы (fetal lamb kidney), получена в США Van der Maaten M.J. и Miller J.M. (1976) при инфицировании культуры клеток почки эмбриона овцы 15-го пассажа вирусом лейкоза крупного рогатого скота сокультивированием лейкоцитов больного лейкозом животного. Культура была получена в ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко от Van der Maaten и на протяжении большого количества пассажей сохраняла вирус-продуцирующую способность.

ЛЭК-ВИЭВ-90 - линия клеток легкого эмбриона коровы, получена в СССР (М.И. Гулюкин и соавт., 1992) [81] при сокультивировании первично трипсинизированной культуры клеток легкого эмбриона коровы 2-го пассажа с лимфоцитами крови больной лимфолейкозом коровы. Культура получена из криобанка ВИЭВ после длительного хранения (более 14 лет) при температуре -196°C (в жидком азоте). Клетки имели эпителиоподобную и фибробластоподобную форму и на момент криоконсервирования продуцировали антигены ВЛ КРС.

3.1.2. Культивирование перевиваемых линий клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV

Пересев культур проводили один раз в неделю с коэффициентом 1:4-1:5 для линии ЛЭК-ВИЭВ-90 и 1:3-1:4 для линии FLK-BLV с помощью смеси растворов Версена (0,02%) и трипсина (0,25%) в соотношении 9:1.

7-суточные культуры снимали с поверхности стекла с помощью смеси растворов Версена (0,0025) и трипсина (0,25%) в соотношении 9:1, предварительно подогретых до комнатной температуры, из расчета 10 мл раствора на 250 мл матрас. Матрасы с раствором Версена ставили в термостат на 10-15 мин., затем встряхивали. Конгломераты клеток в суспензии разбивали

пипетированием и отбирали 1 мл суспензии для подсчета клеток.

Отделенные от стекла и суспендированные клетки подсчитывали в камере Горяева по общепринятой методике.

Для культивирования использовали среды Игла MEM или Игла DMEM с добавлением 10% сыворотки эмбриона коровы, пеницилина-100 ед/мл, стрептомицина-100 мкг/мл. Клетки культивировали 7- суток в термостате при температуре 37⁰С, ежедневно наблюдая за ростом под микроскопом с увеличением 7x10. На 7 сутки сливали культуральную жидкость для получения антигена и проводили следующий пассаж по выше описанной методике.

3.1.3. Определение индекса пролиферации и жизнеспособности клеток

Индекс пролиферации – отношение выросших клеток к числу засеянных.

$$\text{ИП} = x : y,$$

где x – общее количество выросших клеток

y - общее количество засеянных клеток

Светооптическое изучение культур проводили на нативных препаратах и специально выращенных на покровных стеклах фиксированных и окрашенных гематоксилин-эозином клетках.

3.1.4. Метод цитогенетического анализа

Приготовление препаратов хромосом проводили по методу Мурхеда (1960), который предусматривает накопление в культуре клеток с помощью колхицина метафазных пластинок, обработку клеток гипотоническим раствором, фиксацию препаратов и их окрашивание.

За 4-6 часов до окончания культивирования в культуральный флакон вносили колхицин в дозе от 0,3 до 1 мкг/мл в зависимости от типа культуры. Через указанное время питательную среду сливали, а на монослой клеток наслаивали теплый раствор (38⁰С), состоящий из 0,25%-ного трипсина и 0,2%-ного раствора Версена в соотношении 9:1. Через 5-10 минут, когда клетки начинали отслаиваться от стекла, раствор Версена с трипсином удаляли, а клетки

ресуспендировали в 6-8 мл гипотонического раствора.

В качестве гипотонического раствора использовали раствор Хенкса с дистиллированной водой (1:4, 1:5). Гипотонизация в зависимости от культуры и применяемого раствора длилась от 10 до 25 мин. Суспензию клеток в гипотоническом растворе переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 800-900 об/мин. в течение 5 мин. Надосадочную жидкость сливали, а на осадок осторожно по стенке пробирки, чтобы не разбить осадок, добавляли фиксатор, состоящий из одной части ледяной уксусной кислоты и трех частей метилового спирта. Первая фиксация длилась 20-30 мин при 4⁰С, после чего клетки ресуспендировали пипетированием пастеровской пипеткой и центрифугировали в течение 5 мин при 900 об/мин. Повторная фиксация длилась 15-20 мин. Количество фиксирующей жидкости в зависимости от объёма осадка колебалось от 2 до 5 мл. По окончании фиксации клетки ресуспендировали в небольшом количестве фиксатора; одну-две капли суспензии клеток наносили на охлажденное предметное стекло, подсушивали над пламенем и изучали под световым микроскопом, подсчитывая количество хромосом.

3.1.5. Метод оценки продукции антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота клетками изучаемых культур

Оценку продуцирования антигена ВЛ КРС клеточными культурами FLK-BLV и ЛЭК-ВИЭВ-90 проводили реакцией иммунодиффузии в агаровом геле.

Выделение антигена из культуральной жидкости проводили методом преципитации его полиэтиленгликолем (м.м.6000).

Культуры выращивали до 7 суток, брали по 100 мл культуральной среды каждой культуры, осветляли центрифугированием при 5000 об/мин., в течении 15 минут. К осветлённому надосадку добавляли 10г сухого ПЭГ-6000, перемешивали до полного растворения полиэтиленгликоля на магнитной мешалке и добавляли сухой NaCl в количестве 5,8г. После растворения соли, материалы помещали в холодильник при 4⁰С на ночь для формирования осадка. Преципитат собирали центрифугированием при 10000 об/мин. в течение 20 минут и ресуспендировали в

2 мл забуферёного фосфатами физраствора. В итоге из 100 мл среды клеток FLK-BLV и 100 мл клеток среды ЛЭК-ВИЭВ-90 получили по 2 мл исходного антигена для относительного сравнительного анализа их количеств титрованием в РИД.

Для постановки РИД использовали реагенты стандартного диагностического набора для серологической диагностики на лейкоз производства Курской биофабрики: гель, преципитирующий антиген, разбавители к ним и контрольную преципитирующую сыворотку.

Для титрования антигена готовили последовательные двукратные разведения выделенного антигена, и равные объемы каждого разведения вносили в лунки, расположенные по периферии, кроме двух вертикальных диаметрально противоположных лунок, куда вносили контрольный антиген, заведомо образующий стандартную полосу преципитации с контрольной сывороткой. Последнюю вносили в центральную лунку. В качестве тест-системы использовали гликопротеидный антиген ВЛ КРС и содержащую к нему антитела сыворотку, производимые на Курской биофабрике.

Учет РИД проводили через 48 часов инкубации чашек Петри во влажной камере термостата при 25-27⁰С. Для этого направляли сфокусированный луч света осветителя на дно чашки под углом 30-45° и оценивали результаты иммунодиффузии, учитывая: а) расстояние, отделяющее линию преципитации от центральной и периферической лунок, б) последнее разведение антигена, которое ещё дает видимый преципитат, в) интенсивность и ширину полос преципитации. Титром антигена считали последнее разведение антигена, дающее преципитат.

3.1.6. Электронная микроскопия

Фиксация. Клетки, выращенные на стекле, снимали механически стеклянным шпателем с резиновым наконечником, центрифугировали (1000 об/мин. 10 мин.) в свежей порции питательной среды без сыворотки и фиксировали в 2,5 % растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере по Миллонику (1961), рН = 7,2-7,4 в течение 1 часа при 4⁰С.

Фосфатный буфер по Миллонигу:

А. 2,26% NaH_2PO_4

Б. 2,52% NaOH

В. 5,4% р-р глюкозы

Г. 41,5 мл А + 8,5 мл Б

Буферный раствор: 45 мл Г + 5 мл В

Далее клетки отмывали тем же буфером (три раза по 10 минут) и проводили дофиксацию 1%-ым раствором четырехокси осмия на фосфатном буфере по Миллонигу 1 час при 4⁰С.

Обезвоживание. После удаления осмиевого фиксатора клеточный материал проводили через батарею этилового спирта возрастающей концентрации: 30°, 50° - три смены по 10 минут, 70° с 3% уранилацетата - в течение 1 часа или ночи (в качестве предварительного контрастирования объектов), 96°, 100° - две смены по 15 минут в каждом. Далее материалы пропитывали окисью пропилена - три смены по 10 минут.

Заливка. В качестве заливочной среды во всех опытах использовали эпоксидную среду следующего состава:

Эпон – 812 - 5 мл

Аралдит М - 3 мл

Додецилиантарный ангидрит (DDSA) – 11 мл

Дибутилфталат – 0,2 мл

2,4,6- диметиламинметилфенол (DMP-30) - 0,3 мл

После окиси пропилена материалы последовательно пропитывали в среде, состоящей из окиси пропилена и эпоксидной смолы, по схеме:

1 часть смолы и 3 части окиси пропилена - 1 час

2 части смолы и 2 части окиси пропилена - 1 час

3 части смолы и 1 часть окиси пропилена - 1 час

Заливочная смола- 2 часа.

Далее материалы извлекали из смолы, помещали в полиэтиленовые капсулы и заливали новой порцией смолы. Полимеризацию проводили в термостате при

температуре 37⁰С и 65⁰С по 24 последовательно в каждом температурном режиме.

Ультратонкие срезы производили с блоков исследуемого материала на ультратоме III (ЛКВ, Швеция) с помощью стеклянных ножей, изготовленных на Knifemaker (ЛКВ, Швеция). Срезы собирали в ванночки ножей, заполненные дистиллированной водой, вылавливали их на электролитические сетки-объектодержатели с круглыми или квадратными отверстиями. Все объектодержатели для ультратонких срезов предварительно покрывали опорной пленкой, приготовленной из 0,2% раствора формвара на дихлорэтаноле.

Контрастирование срезов проводили 3% раствором уранилацетата на 30⁰ этиловом спирте в течение 15-20 минут, тщательно промывали объектодержатели со срезами в дистиллированной воде и дополнительно контрастировали 0,04% раствором лимоннокислого свинца.

Препараты исследовали и фотографировали на электронных микроскопах марок JEM-100 В и JEM-100 С (JEOL, Япония) при инструментальном увеличении от 3000 до 100 000.

3.1.7. Методики постановки ПЦР для выявления геномов вирусов лейкоза и диареи крупного рогатого скота

ПЦР-исследования проводили тест-системами «ЛЕЙКОЗ» для выявления вируса лейкоза крупного рогатого скота и «ВД» для выявления возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва.

Тест-системой «ЛЕЙКОЗ» мы выявляли ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота (bovine leukosis virus) в культуральной жидкости клеток линий ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV с 1-го по 5-й дни пассажа с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле. Сущность метода заключается в амплификации специфического участка ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота за счет многократного повторения циклов денатурации ДНК в исследуемой пробе, отжига специфических олигонуклеотидных затравок (праймеров) и синтеза комплементарных цепей ДНК с помощью фермента Taq-

полимеразы. Для контроля качества проведения анализа вместе с последовательностью ДНК провируса (в одной пробирке) проводится амплификация эндогенного внутреннего контроля – гена α -актина КРС. Для амплификации ДНК провируса лейкоза КРС использовали амплификатор с активным регулированием «Терцик» («ДНК-технология»), для детекции продуктов ПЦР-амплификации использовали камеру «SE-2» («Хеликон», Россия), источник питания «Эльф-4» («ДНК-Технология») и трансиллюминатор для просмотра гелей. Изображение гелей получали на компьютере с помощью видеосистемы.

Тест-систему «ВД» мы использовали для выявления РНК вируса диареи крупного рогатого скота (bovine viral diarrhea virus) в культуральной жидкости клеточных линий ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». В основе метода лежит получение кДНК специфического участка вируса диареи КРС методом обратной транскрипции РНК и ее амплификация за счет многократного повторения циклов денатурации кДНК в исследуемой пробе, отжига специфических праймеров и зондов, меченных флуоресцентными красителями, и синтеза комплементарных цепей ДНК с помощью фермента Taq-полимеразы. Исходным материалом для реакции обратной транскрипции ПЦР в данной тест-системе служит РНК вируса, полученная из исследуемого материала. Реакционная система включает две независимые системы, каждая из которых содержит праймеры и меченый флуоресцентными красителями зонд. С помощью первой системы идентифицируется последовательность кДНК вируса диареи КРС. Вторая представляет собой систему внутреннего неконкурентного контроля (ВК). Реакцию ОТ-ПЦР и детекцию продуктов амплификации вируса диареи КРС проводили с помощью прибора «Rotor-Gene» 6000 («Corbett Research», Австралия).

Все этапы постановки полимеразной цепной реакции проводили согласно инструкций, рекомендованных к тест-системам организации-производителя.

3.2. Результаты собственных исследований

3.2.1. Культурально-морфологические свойства культуры клеток

ЛЭК-ВИЭВ 90

После 14-летнего хранения была восстановлена культура клеток ЛЭК-ВИЭВ-90. Жизнеспособность на 0 пассаже составляла 81%. На первом пассаже после восстановления, монослой был сформирован на 4 сутки культивирования. Первый пересев был проведен с коэффициентом посева 1:2, второй с коэффициентом 1:3. Через 3-4 пассажа культура клеток стабильно пересеивалась с индексом пролиферации 4,2-4,8. Рост культуры начинался с прикрепления клеток и их распластывания через 4-5 часов после посева в виде отдельных островков. На вторые сутки культивирования зарост культуры достигал 40-60%. При этом клетки имели округлую или многоугольную форму (Рис. 1, 2). В течение первых 1-2 суток культивирования клетки росли в виде отдельных, равномерно распределенных по всей площади матраса островков, имевших очертания неправильной формы.

Монослой формировался на 70-80% на 3 сутки культивирования при посевной концентрации 80-100 тыс.кл./мл. К концу третьих, началу четвертых суток культивирования клетки сливались, образуя ровный плотный монослой (Рис. 3, 4), к концу 4-х суток достигал полного 100%-ного зароста (Табл. 1).

Далее к 120- часам культивирования в монослое отмечали отдельные плотные клетки, свидетельствующие о начале дегенеративных изменений в монослое.

Цитологический анализ культуры клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 проводили на разных пассажах и сутках культивирования. Для этого суспензию клеток в концентрации 80-100 тыс.кл./мл вносили в пенициллиновые флаконы со стеклом. Клетки на стеклах с выросшим монослоем фиксировали через 24, 48, 72, 96, 120 часов, а затем окрашивали гематоксилин-эозином.

Культура клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 на разных пассажах имела одинаковую морфологию и состояла из эпителиоподобных клеток и небольшого количества фибробластоподобных клеток. На цитологических препаратах клетки эпителиоподобного типа имели, в основном, полигональную форму, росли

обычно в один слой без напластывания. Границы клеток были хорошо выражены и формировали сплошной монослой. В равномерном монослое ядра клеток были округлой, реже овальной формы с четко ограниченной оболочкой ядра. Структура ядра имела мелкосетчатую гранулярную структуру.

Ядра эпителиоподобных клеток более плотно окрашивались, чем у фибробластоподобных. Они были крупными, имели овальную, реже округлую форму и содержали от 1 до 4 ядрышек (Рис. 2). Некоторые ядра клеток имели одно крупное ядрышко, округлой, угловатой или неопределенной формы, которое, как правило, лежало в центре ядра. Число таких ядер (содержащих одно ядрышко) достигало 30-40%, примерно 20-30% имело по 2 ядрышка, а в остальных - от 3 до 4. Расположение ядрышек в этих случаях либо эксцентричное, либо неопределенное.

Очень редко (0,02-0,05 %) встречались гигантские клетки с одним или несколькими ядрами, в которых было множество ядрышек (Рис. 5).

В некоторых клетках наблюдали обильную вакуолизацию цитоплазмы, приводящую в дальнейшем к гибели клетки (Рис.6). Встречались и симпласты – клетки, содержащие более 2-4-х ядер, их число не превышало 0,04 %, также встречались клетки с бобовидной формой ядра (Рис. 7).

Линия клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 сохраняла устойчивые культуральные свойства на уровне 100-150 пассажей (период наблюдений).

Таблица 1

Сроки формирования монослоя культуры клеток ЛЭК-ВИЭВ-90

Культура клеток	Сроки формирования монослоя (1×10^5 кл./мл с добавлением 10% сыворотки эмбрионов коров)			
	24 ч.	48 ч.	72 ч.	96 ч.
ЛЭК-ВИЭВ-90	Островки клеток, почти все клетки распластаны	Зарост 40-60%	Зарост 70-80%	Зарост 100%

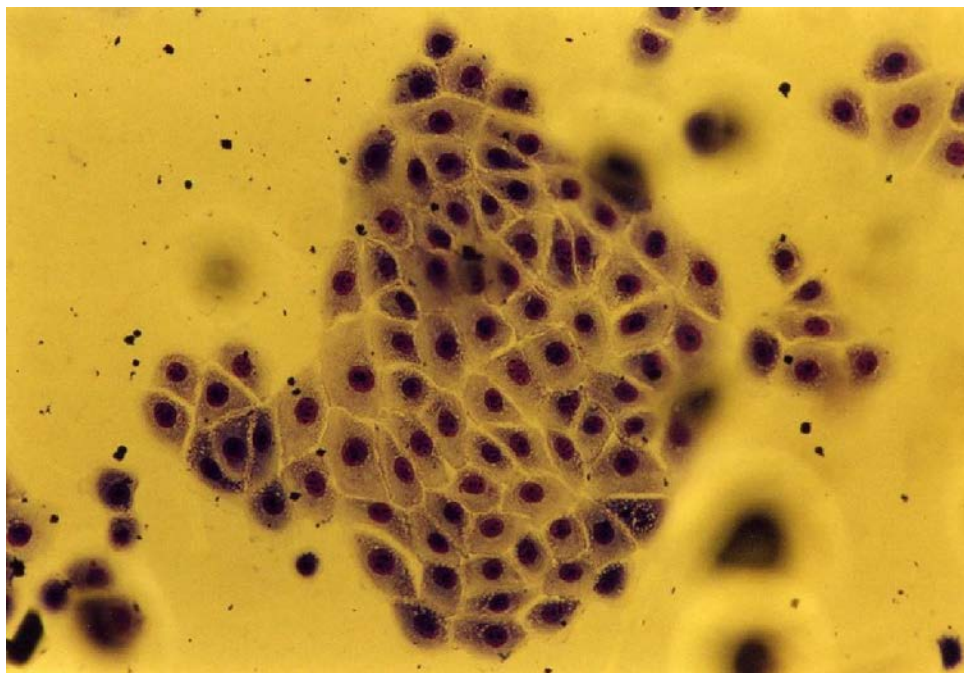


Рис. 1 Клетки линии ЛЭК-ВИЭВ-90: 24 часа культивирования, окраска гематоксилин-эозином, ув.: х 400

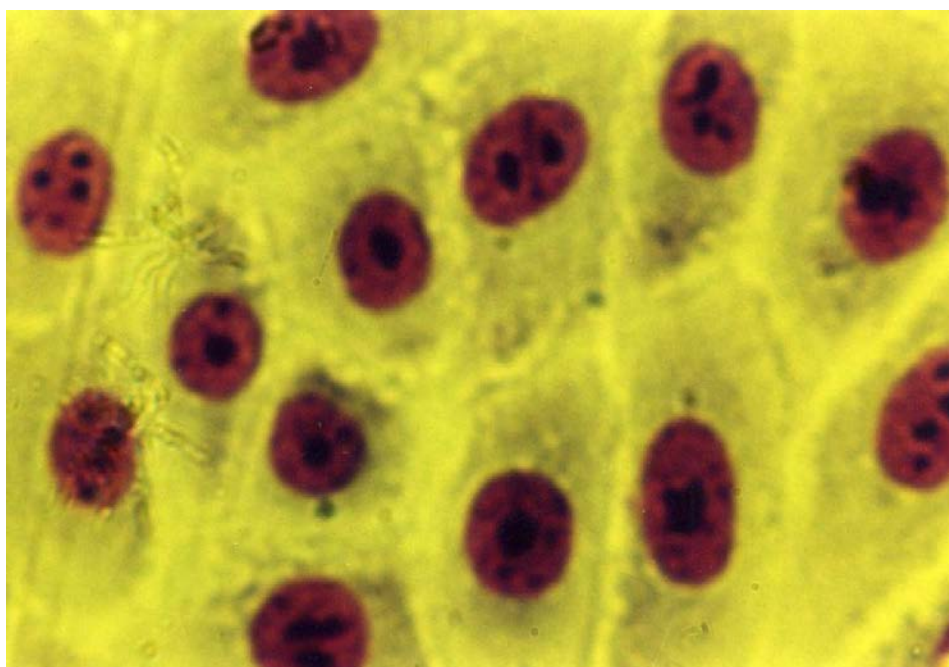


Рис. 2 Клетки линии ЛЭК-ВИЭВ-90: 24 часа культивирования, окраска гематоксилин-эозином, ув.: х 1000

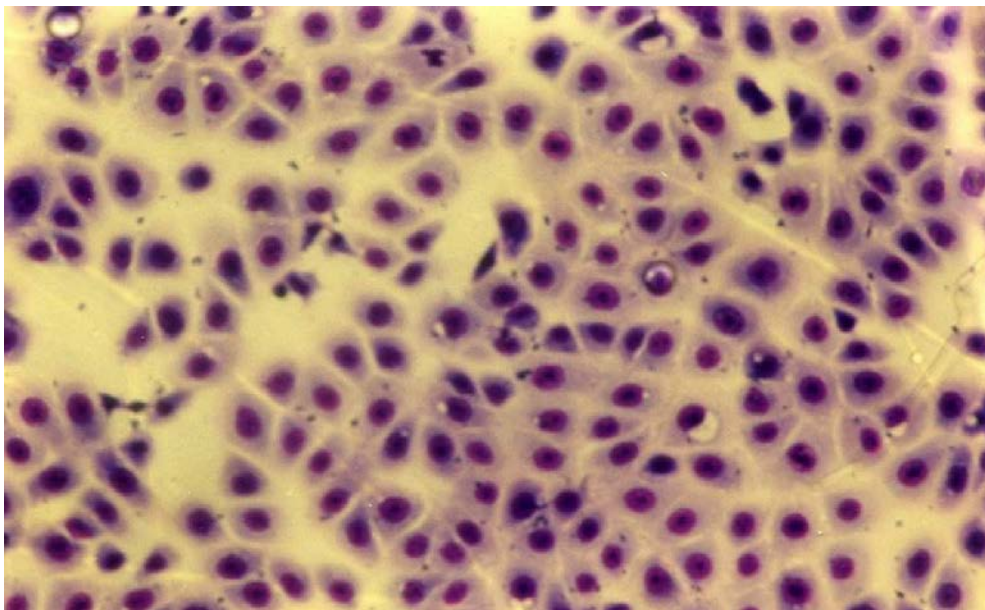


Рис. 3 Клетки линии ЛЭК-ВИЭВ-90: 72 часа культивирования, окраска гематоксилин-эозином, ув.: x 400

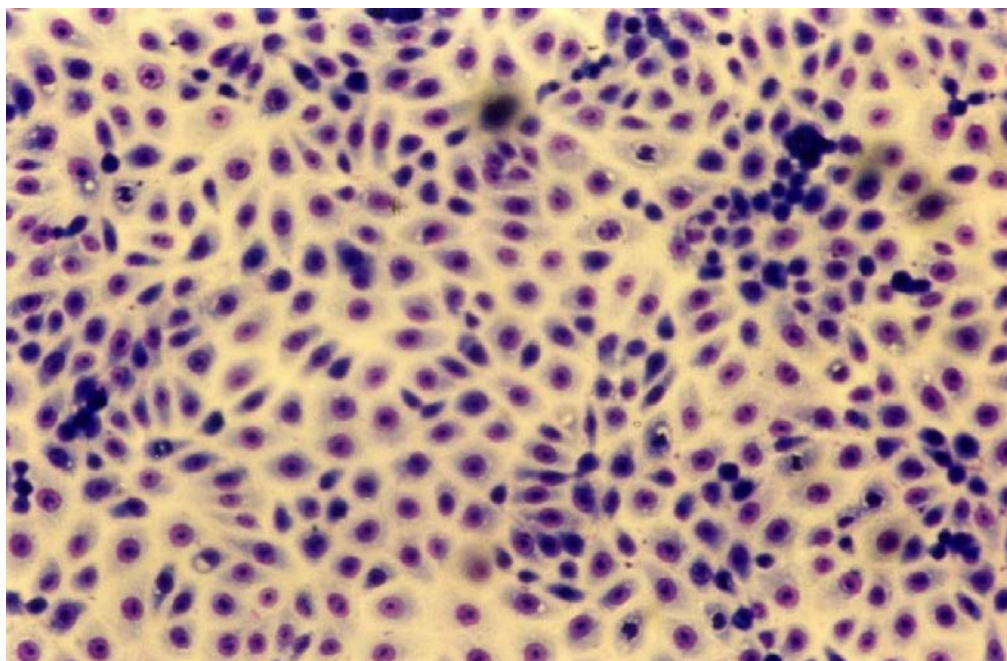


Рис. 4 Клетки линии ЛЭК-ВИЭВ-90: 96 часов культивирования, окраска гематоксилин-эозином, ув.: x 200

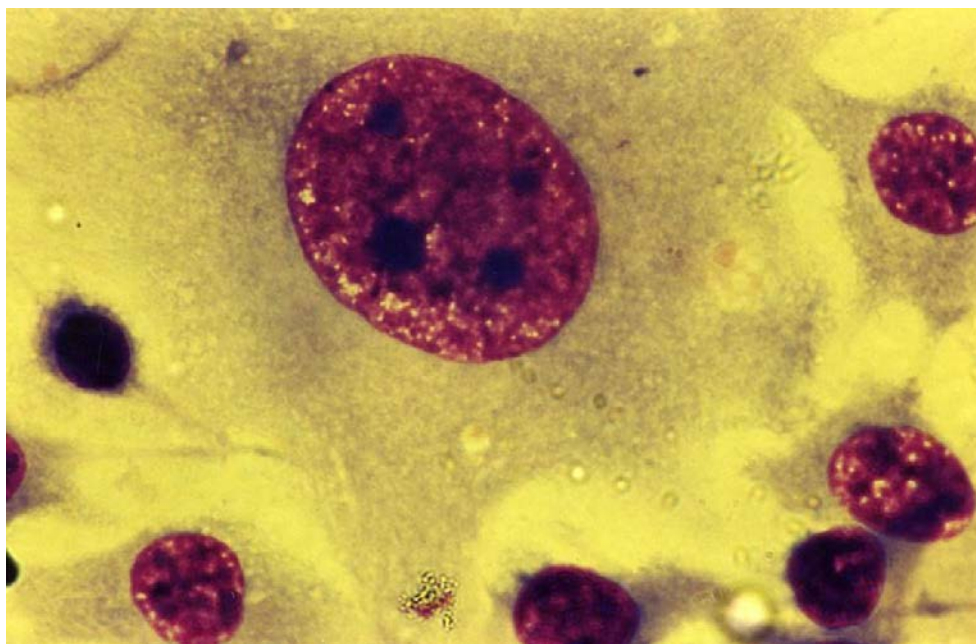


Рис. 5 Клетки линии ЛЭК-ВИЭВ-90: 48 часов культивирования, окраска гематоксилин-эозином, ув.: x 1000

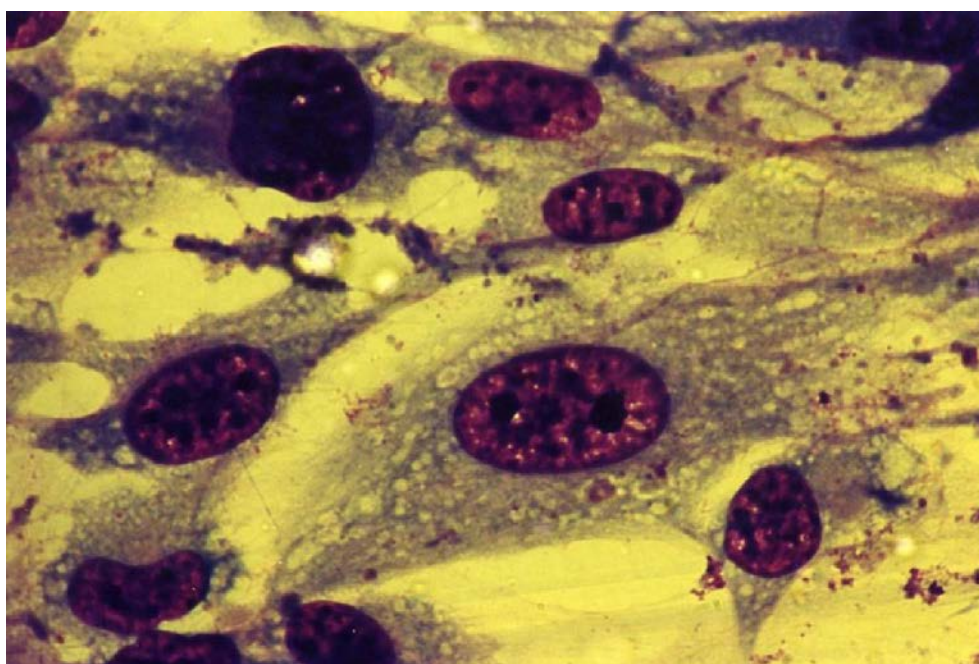


Рис. 6 Клетки линии ЛЭК-ВИЭВ-90: 168 часов культивирования, окраска гематоксилин-эозином, ув.: x 900

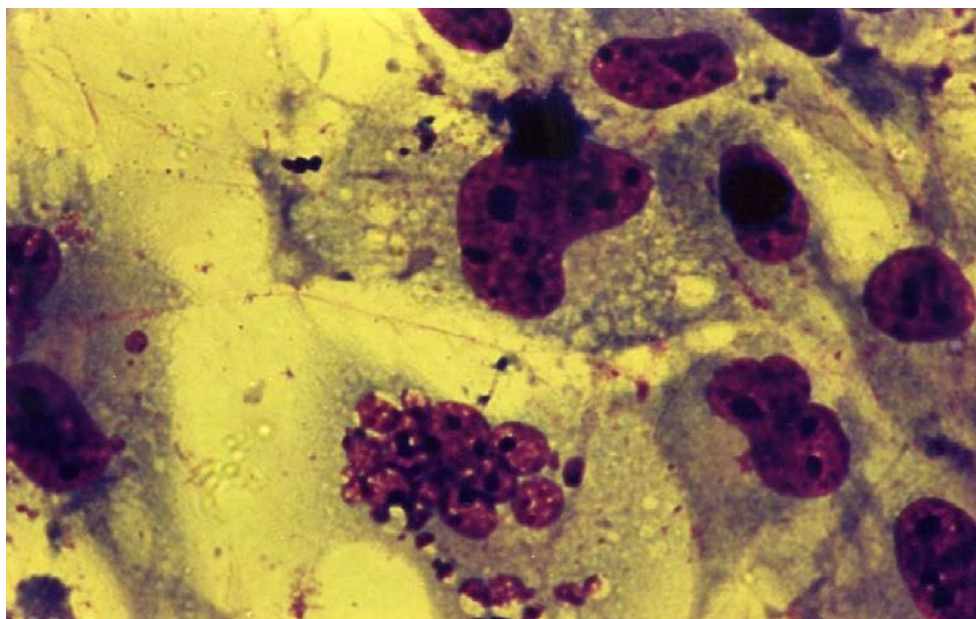


Рис. 7 Клетки линии ЛЭК-ВИЭВ-90: 168 часов культивирования, окраска гематоксилин-эозином, ув.: x 900

Митотическую активность изучали в динамике по суткам культивирования.

Для изучения митотической активности культуру клеток высевали в концентрации 80-100 тыс.кл./мл в пенициллиновые флаконы с покровными стеклами. Через 1, 2, 3, 4 сутки культивирования извлекали стекла с культурой, фиксировали и окрашивали гематоксилин-эозином. Подсчитывали число митозов на 1000 клеток (промилле - ‰). Результаты определения митотического индекса отражены в таблице 2. Из таблицы видно, что высокая митотическая активность отмечалась через 48 часов культивирования и составляла 28-32‰. В дальнейшем, при формировании монослоя через 96 часов культивирования наблюдали снижение митотической активности до 4-6‰.

**Митотическая активность культуры клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 на 10 пассаже
после размораживания**

Время (час)	Митотический индекс в ‰ (промилле)
24	6- 12
48	28 - 32
72	18 - 22
96	4 - 6

**3.2.2. Культурально-морфологические свойства культуры клеток FLK-
BLV**

После хранения в жидком азоте культуры клеток FLK-BLV жизнеспособность на 0 пассаже составляла 90%. На первом пассаже монослой был сформирован на 4 сутки культивирования. Первый пересев был проведен с коэффициентом посева 1:2, второй с коэффициентом 1:3. Через 3-4 пассажа культура клеток стабильно пересевалась с индексом пролиферации 2,8-3,9.

Рост культуры FLK-BLV начинался с прикрепления клеток и их распластывания по поверхности матраса. При этом отмечалось большое разнообразие в форме клеток, направлении и количестве цитоплазматических отростков (Рис. 8, 9).

Через 5-6 часов после посева зарост составлял 15-25% в виде отдельных островков и клеток. На вторые сутки культивирования зарост культуры достигал 40-50%, на 3 сутки составлял 70-80%. С течением срока культивирования в культуре все более преобладали вытянутые клетки. К 4 суткам культивирования культура представляла собой очень плотный клеточный монослой (Рис. 10, Табл. 3).

Далее на 5-6 сутки культивирования культуры в монослое выявлялись плотные клетки с трудно различимым ядром, что свидетельствовало о начале дегенерации

клеток (Рис. 11).

Цитологический анализ культуры клеток FLK-BLV проводили на разных пассажах и сутках культивирования. Для этого суспензию клеток в концентрации 80-100 тыс.кл./мл вносили в пенициллиновые флаконы со стеклом. Стекла с выросшим монослоем фиксировали через 24, 48, 72, 96, 120 часов, а затем окрашивали гематоксилин-эозином.

На цитологических препаратах культура клеток представлена клетками фибробластоподобного типа и небольшого количества клеток эпителиоподобного типа. Эпителиоподобные клетки были полигональной формы с округлым плотным ядром. Фибробластоподобные клетки имели вытянутую веретеновидную форму, реже округлую, либо вытянутую с неравномерными выступами (Рис. 10). Ядерный матрикс у фибробластов в монослое при окраске гематоксилином равномерный, мелкозернистый. Большинство клеток содержали центрально расположенное ядро овальной формы, в котором различали от 1 до 4 ядрышек (Рис. 12).

Ядрышки обычно были некрупными, округлыми или неопределенной формы и неупорядоченно распределены по ядерному матриксу. В многослойных напластованиях ядра были относительно мелкими, их матрикс был интенсивно окрашен и ядрышки были трудно различимы. Цитоплазма клеток окрашивалась равномерно, была слабо эозинофильна, имела зернистую структуру.

Границы клеток плохо различимы, клетки в монослое взаимно переплетались цитоплазматическими отростками. Среди клеток культуры встречались гигантские клетки с одним большим ядром и вакуолизированной цитоплазмой (Рис. 13). Их количество составляло 0,3-0,5%. Встречались и симпласты – клетки, содержащие более 2-4-х ядер, их число не превышало 0,07 %.

Таблица 3

Сроки формирования монослоя культуры клеток FLK-BLV

Культура клеток	Сроки формирования монослоя (1×10^5 кл./мл с добавлением 10% сыворотки эмбрионов коров)			
	24 ч.	48 ч.	72 ч.	96 ч.
FLK-BLV	Зарост 15-20%	Зарост 30-50%	Зарост 70-80%	Зарост 100 %

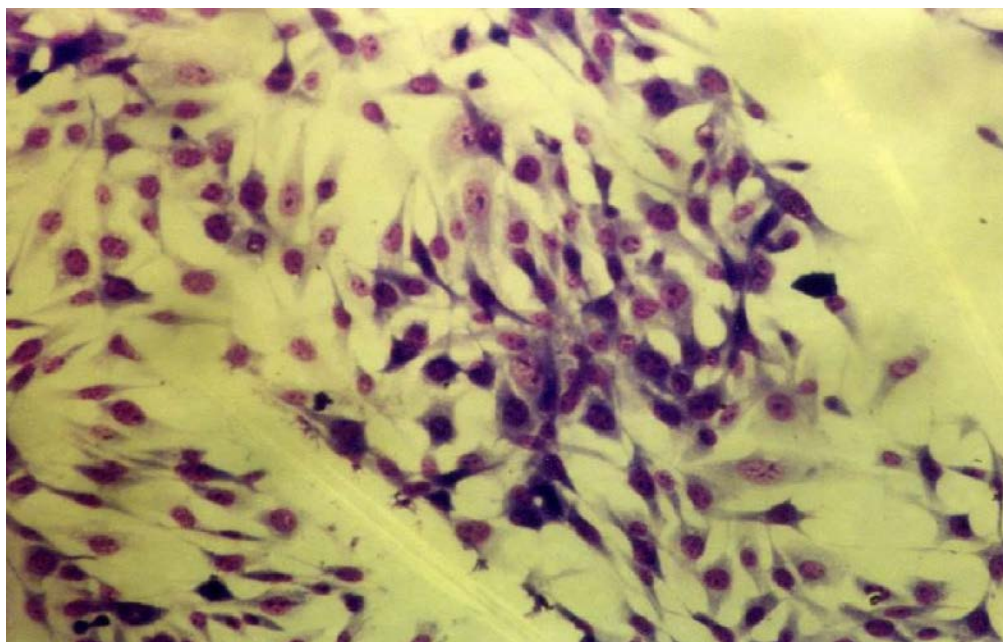


Рис. 8 Клетки линии FLK-BLV: 48 часов культивирования, окраска гематоксилин-эозином, ув.: x 400

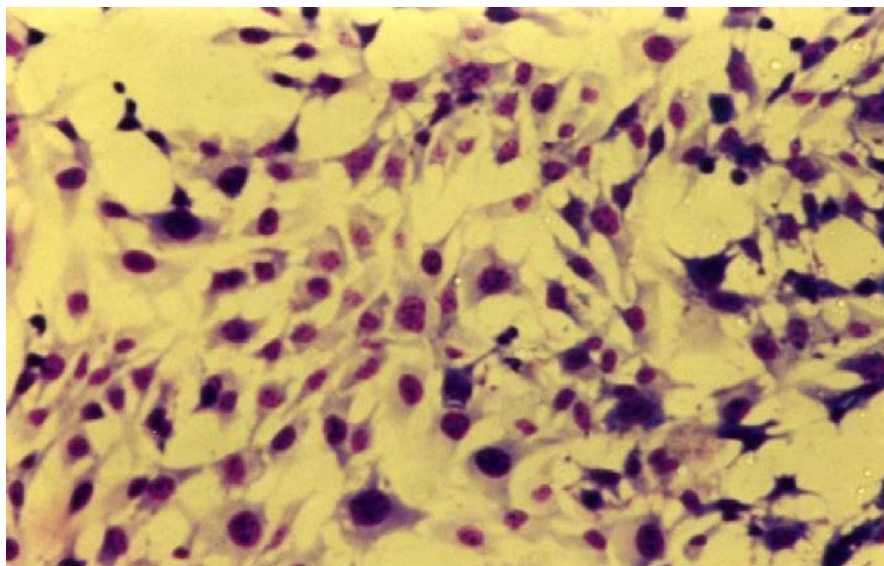


Рис. 9 Клетки линии FLK-BLV: 48 часов культивирования, окраска гематоксилин-эозином, ув.: x 400

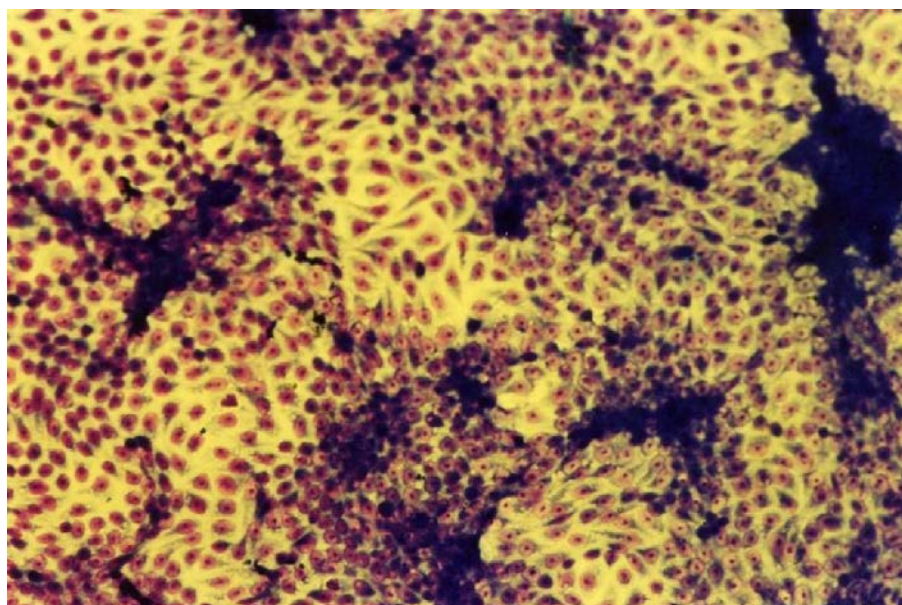


Рис. 10 Клетки линии FLK-BLV: 96 часов культивирования, окраска гематоксилин-эозином, ув.: x 200

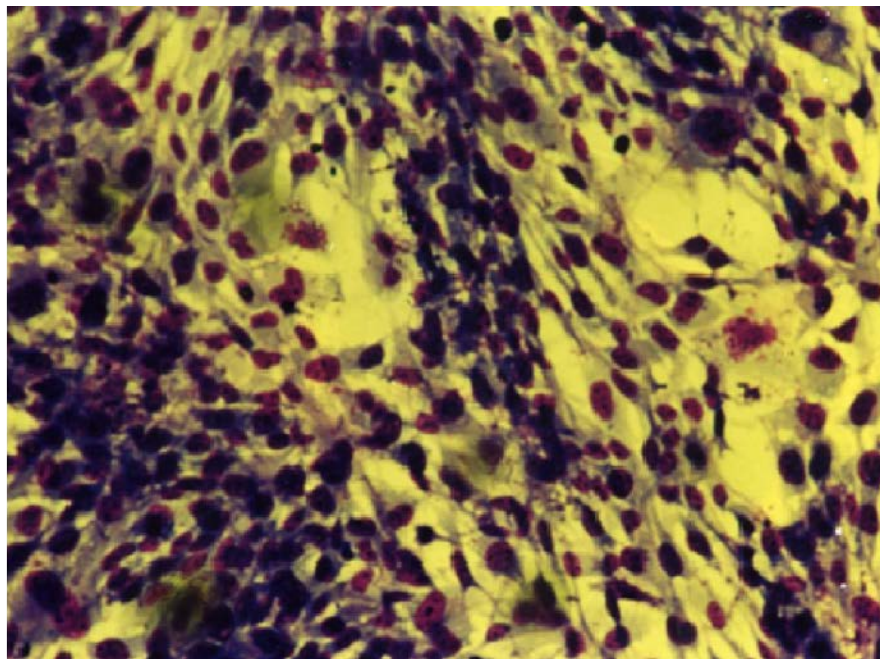


Рис. 11 Клетки линии FLK-BLV: 120 часов культивирования, окраска гематоксилин-эозином, ув.: x 400

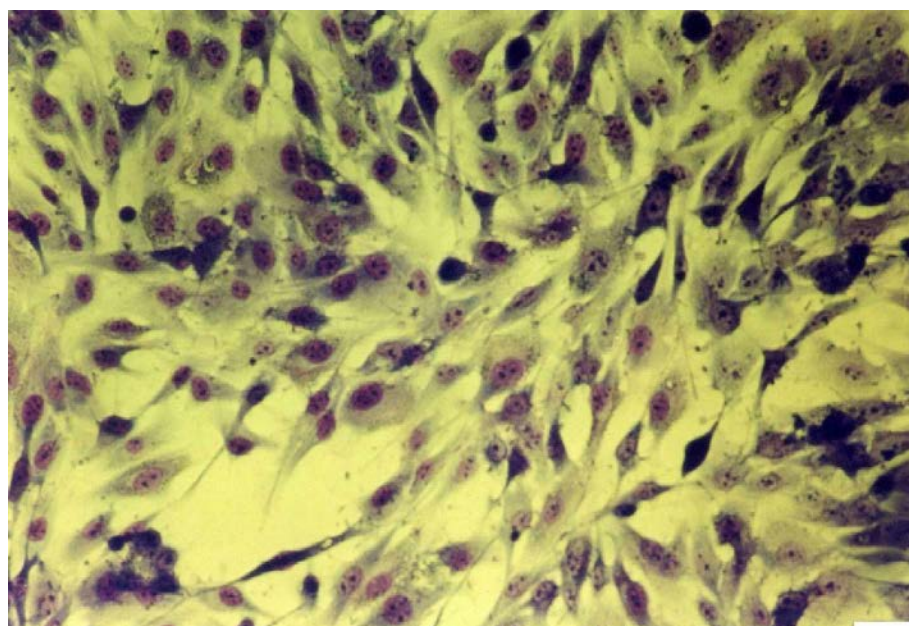


Рис. 12 Клетки линии FLK-BLV: 72 часа культивирования, окраска гематоксилин-эозином, ув.: x 400

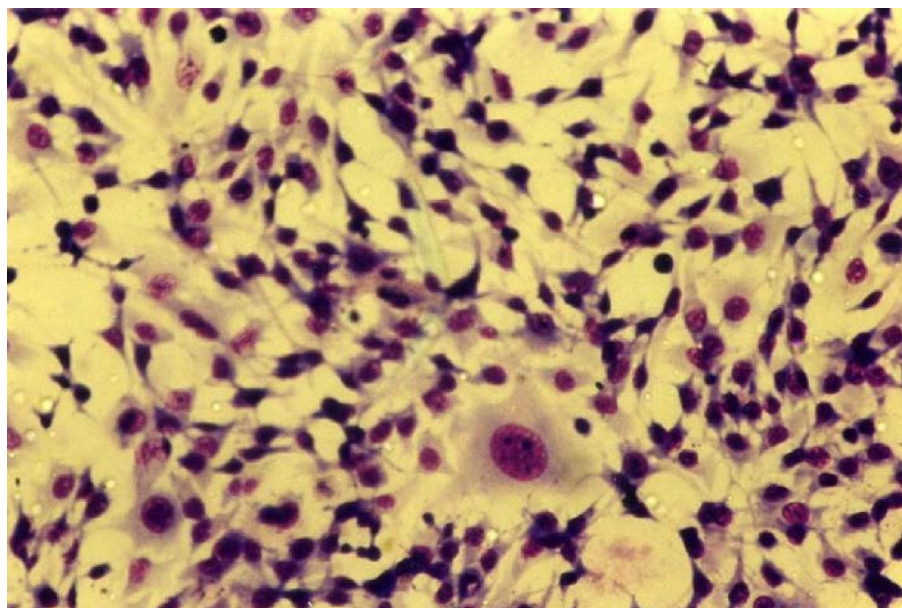


Рис. 13 Клетки линии FLK-BLV: 72 часа культивирования, окраска гематоксилин-эозином, ув.: x 400

Митотическую активность изучали в динамике по суткам культивирования.

Для изучения митотической активности культуру клеток высевали в концентрации 80-100 тыс.кл./мл в пенициллиновые флаконы с покровными стеклами. Через 1, 2, 3, 4 сутки культивирования извлекали стекла с культурой, фиксировали и окрашивали гематоксилин-эозином. Подсчитывали число митозов на 1000 клеток (промилле - ‰). Результаты определения митотического индекса отражены в таблице 4. Из таблицы видно, что высокая митотическая активность отмечалась через 48 часов культивирования и составляла 22-31‰. В дальнейшем, при формировании монослоя наблюдали снижение митотической активности до 3-6‰ через 96 часов культивирования.

Таблица 4

Митотическая активность культуры клеток FLK-BLV на десятом пассаже

Время (час)	Митотический индекс в ‰ (промилле)
24	8 - 12
48	22 - 31
72	18 - 21
96	3 - 6

3.2.3. Цитогенетические исследования перевиваемых культур клеток

ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV

При кариологическом анализе определяли модальное число и интервал изменчивости хромосом в клетках культур.

Проведенные цитогенетические исследования позволили определить модальный класс хромосом культуры ЛЭК-ВИЭВ-90, в котором он представлен 52 хромосомами, что составляет 55% от количества хромосомных пластинок с 18 – 0,1%, 23 – 0,1%, 36 – 8%, 40 – 9%, 46 – 10%, 56 – 10%, 62 – 4%, 65 – 3%. Интервал изменчивости хромосом от 18 до 65 (Рис.14, 15). Диплоидный набор хромосом для крупного рогатого скота $2n = 60$.

В наших исследованиях после длительного культивирования клеток линии FLK-BLV, как видно из диаграммы 1, количество хромосомных пластинок с 30 хромосомами составило 2%, 40 – 7,5%, 44 – 18,5%, 46 – 20%, 48 – 16%, 50 – 37%. Таким образом, модальное число хромосом для ЛЭК-ВИЭВ-90 представлено 50 хромосомами, интервал изменчивости находится в пределах от 30 до 50 (Рис.16, 17). Диплоидный набор хромосом для овцы $2n = 54$.

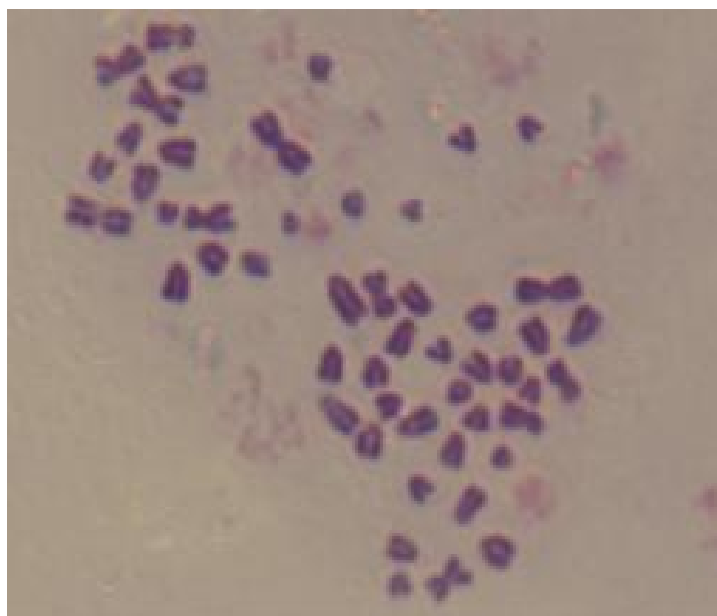


Рис. 14 Хромосомы культуры клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 в метафазе, окрашено по Романовскому – Гимза, ув.: x 1000

Интервал изменчивости числа хромосом в культуре клеток ЛЭК-ВИЭВ-90

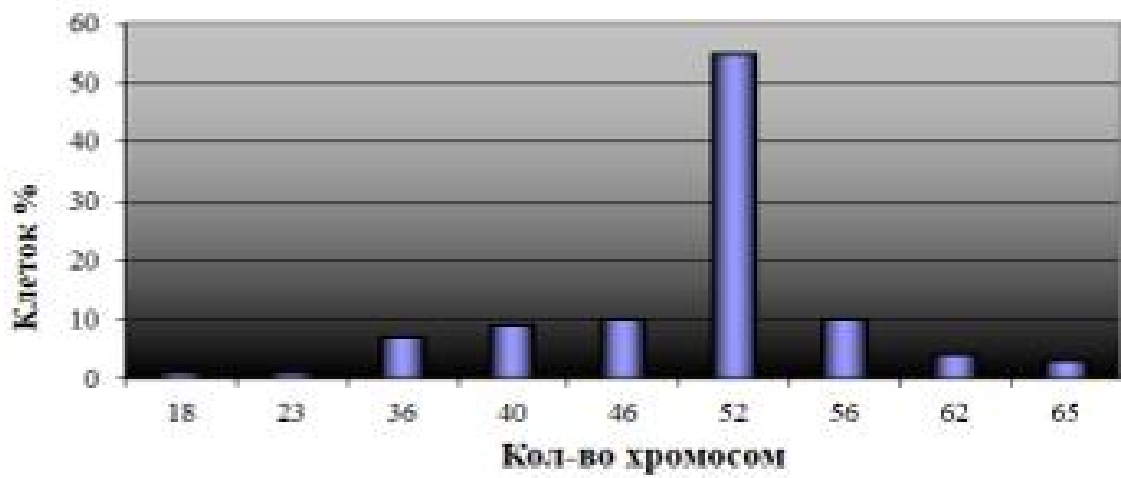


Рис. 15 Распределения хромосом в культуре клеток ЛЭК-ВИЭВ-90

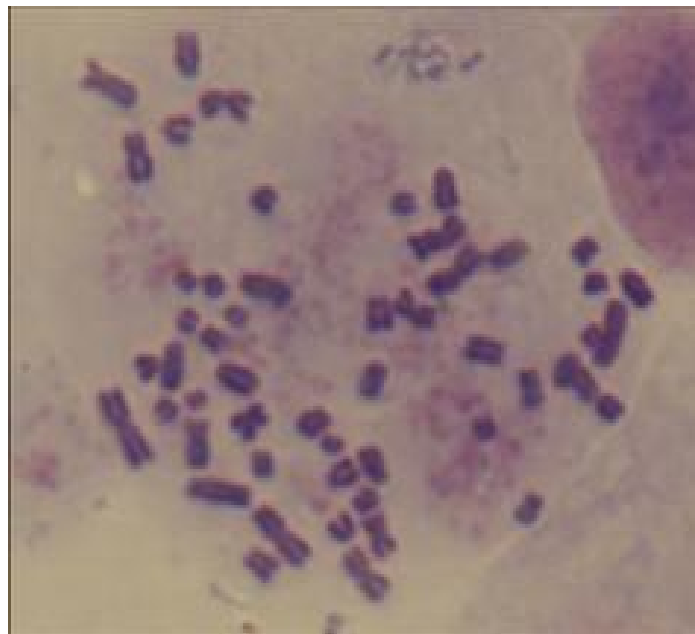


Рис. 16 Хромосомы культуры клеток FLK-BLV в метафазе, окрашено по Романовскому – Гимза, ув.: x 1000

Интервал изменчивости числа хромосом в культуре клеток FLK-BLV

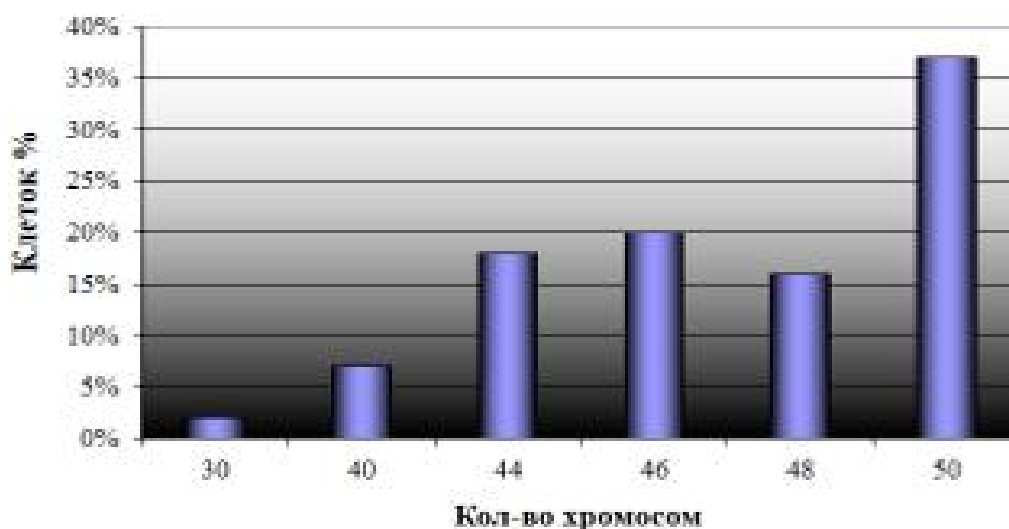


Рис. 17 Распределение хромосом в культуре клеток FLK-BLV

3.2.4. Определение наличия антигена и генома ВЛ КРС в культурах клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV

При исследовании продукции гликопротеидного антигена вируса лейкоза культурами ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV реакцией иммунодиффузии в геле были выявлены положительные результаты.

Титры антигена gp51 составляли в среднем для культур FLK-BLV и ЛЭК-ВИЭВ-90 $3,5 \log_2$ и $2,5 \log_2$, соответственно. За период наблюдений выход антигена gp51 для культуры FLK-BLV был выше, по сравнению с культурой ЛЭК-ВИЭВ-90, в среднем в 2 раза. Продукция культурами антигена p24 значительно (не менее, чем в 16 раз) превосходила продукцию антигена gp51.

При исследовании методом ПЦР монослоя культуры клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV на 1, 2, 3, 4 и 5 дни пассажа достоверность результатов учитывали по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических светящихся полос в контрольных образцах этапа выделения и этапа амплификации ПЦР (Рис.18): в отрицательных контрольных образцах этапа выделения (ОКО) и этапа

амплификации ДНК (К-), в положительном контрольном образце этапа амплификации ДНК (К+) и в контроле ДНК α -актина КРС (ВКО). При учете полимеразной цепной реакции были получены достоверные результаты. Так, в дорожке, соответствующей положительному контролю амплификации ДНК провируса лейкоза КРС (Рис. 18 А, В, трек 1, К+), была получена яркая специфическая светящаяся полоса на уровне 294 п.н., а в дорожке, соответствующей контролю этапа выделения ДНК провируса лейкоза КРС с контролем ДНК α -актина КРС (Рис. 18 А, В, трек 3, ПКО), были получены яркие специфические светящиеся полосы на уровне 294 п.н. и 582 п.н., соответственно. В дорожке отрицательного контроля этапа амплификации ДНК (Рис. 18 А, В, трек 2, К-) полосы размером 294 п.н. и 582 п.н. отсутствовали, а в дорожке отрицательного контроля этапа выделения (Рис. 18 А, В, трек 4, ОКО) отсутствовала специфическая полоса 294 п.н. и присутствовала светящаяся полоса на уровне 582 п.н. (ВКО).

При учете результатов во всех исследованных пробах культур клеток на 1, 2, 3, 4 и 5 дни пассажа (Рис. 18 А, В, трек 5-9, 1-5 дни пассажей) были получены положительные результаты, которые учитывались по наличию в них специфических светящихся полос на уровнях 294 п.н. и 582 п.н.

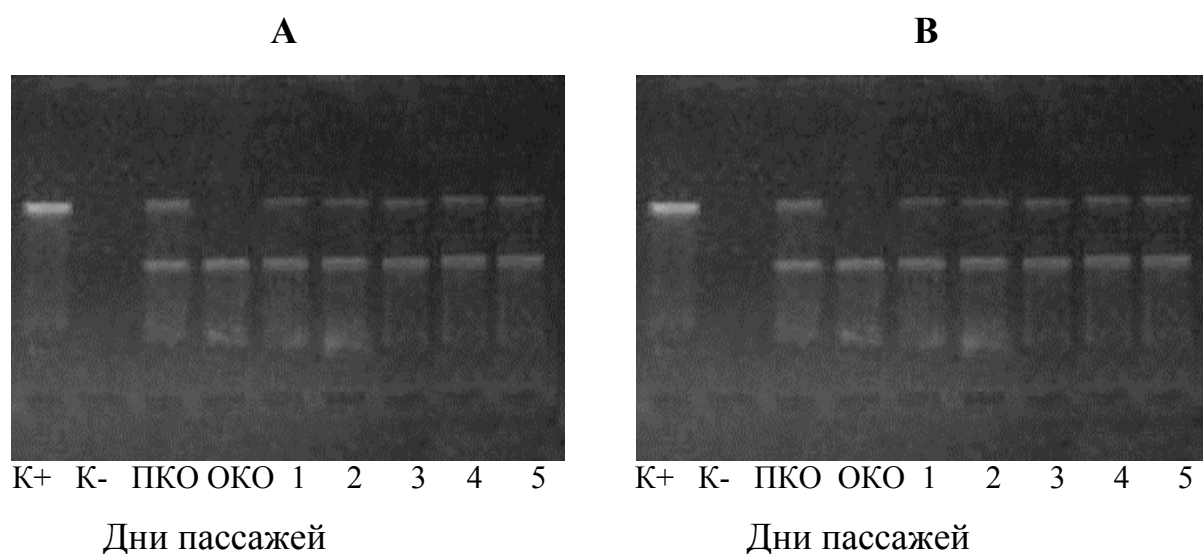


Рис. 18 Результаты исследования методом ПЦР культуры клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 (А) и FLK-BLV (В) на 1,2,3,4 и 5 дни пассажа

3.2.5. Электронно-микроскопическая характеристика перевиваемых культур клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV

При ультраструктурном исследовании клеток линий FLK-BLV и ЛЭК-ВИЭВ-90 были отмечены основные морфологические признаки каждой культуры, что были выявлены и на световом уровне. Дополнительно были получены следующие характеристики.

Ядра клеток линии ЛЭК-ВИЭВ-90 имели неровные границы, образующие иногда ядерные «карманы» (Рис.19 А, Б).

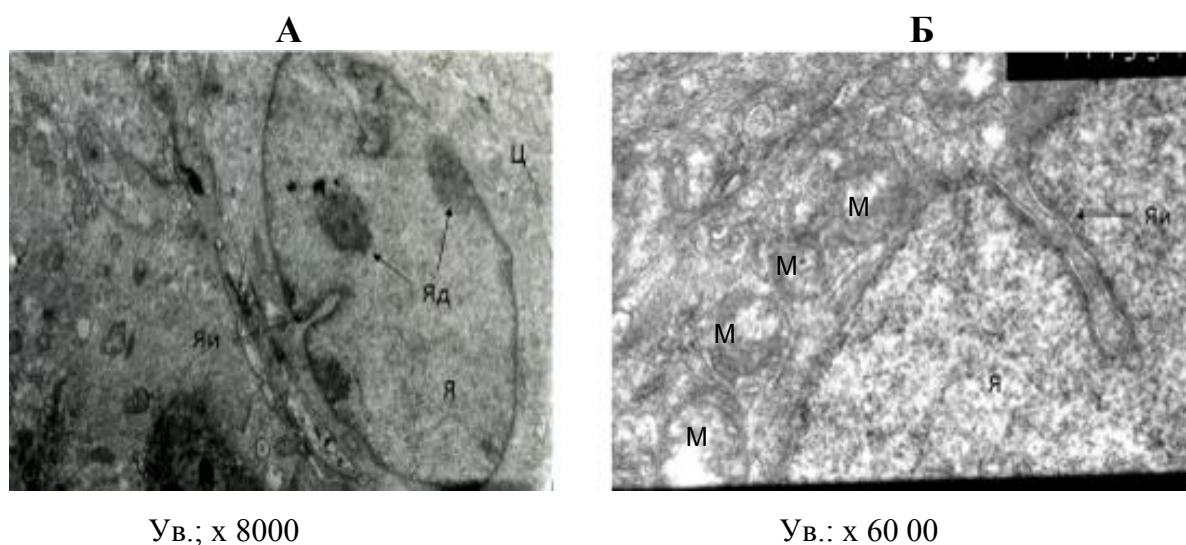
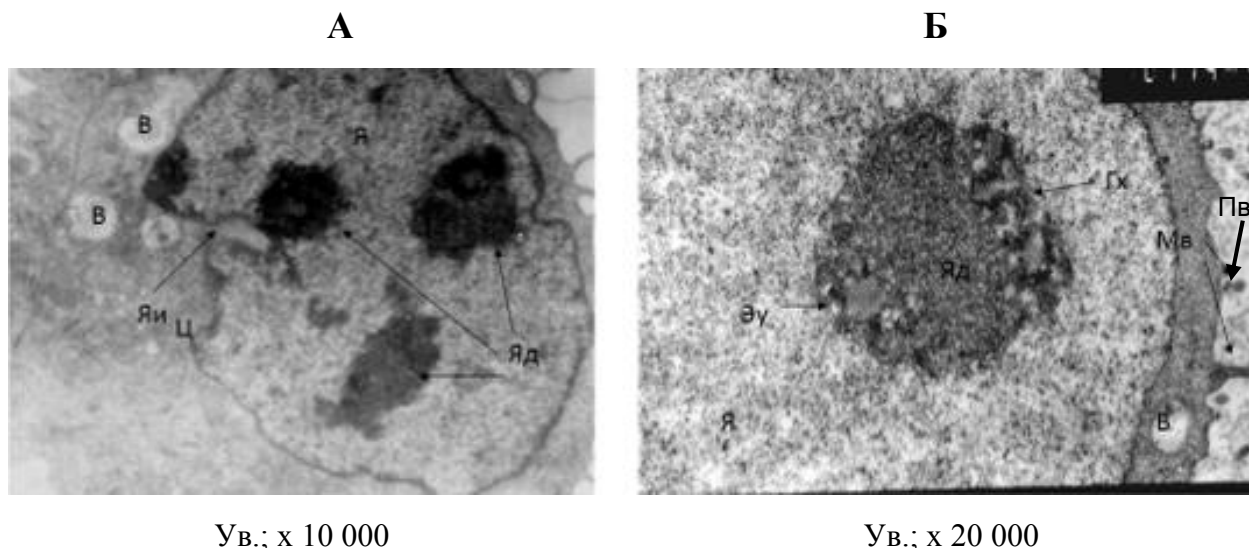


Рис. 19 (А, Б) Ультратонкий срез клеток линии ЛЭК-ВИЭВ-90

Я-ядро, Яд – ядрышко, М – митохондрия, Ц – цитоплазма, Яи-ядерный инвагинат (карман), В –цитоплазматическая вакуоль

Внутри ядра располагались ядрышки разного количества от 1 до 4. В ядрышках был хорошо различим эу- и гетерохроматин. В цитоплазме отмечали обильное развитие шероховатого эндоплазматического ретикулума (Рис. 20 А, Б). Митохондрии клеток отличались значительной вариабельностью и плотностью, небольшими размерами и сильно увеличенным матриксом, количество крист также значительно варьировало. Они были окружена двумя митохондриальными мембранами наружной и внутренней. Внутренняя мембрана митохондрий образовывала многочисленные гребневидные складки крист (Рис. 21А.Б).

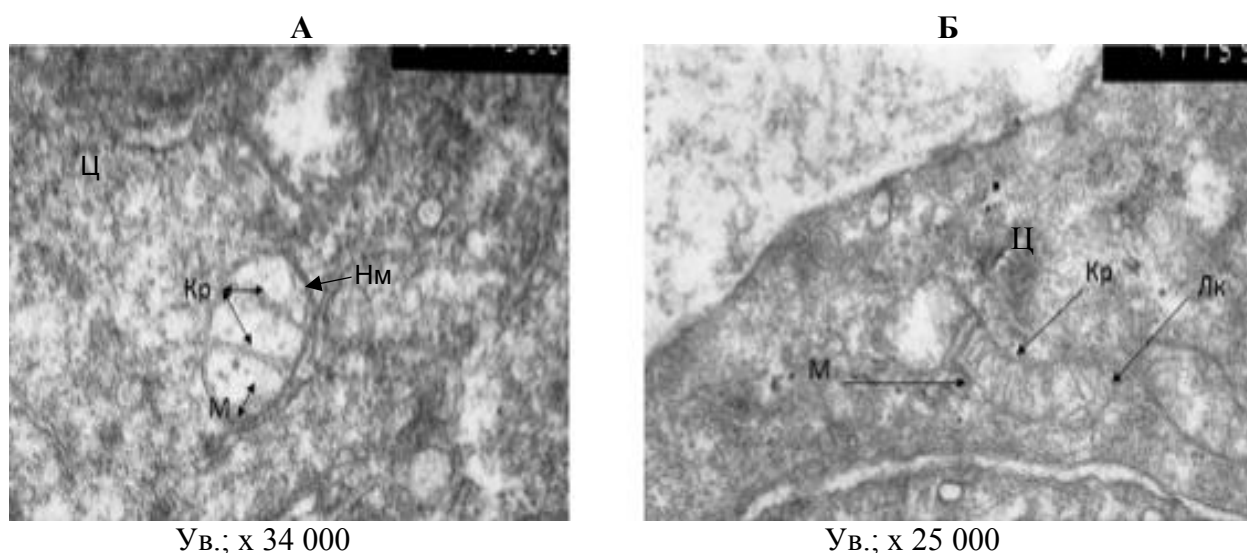


Ув.; x 10 000

Ув.; x 20 000

Рис. 20 (А, Б) Ультратонкий срез клеток линии ЛЭК-ВИЭВ-90

Я-ядро, Яд – ядрышко, Ц – цитоплазма, Яи - ядерный инвагинат (карман), В – цитоплазматическая вакуоль, Мв - микроворсинки, Эу, Гх - Эу и Гетерохроматин, Пв – почкование вириона



Ув.; x 34 000

Ув.; x 25 000

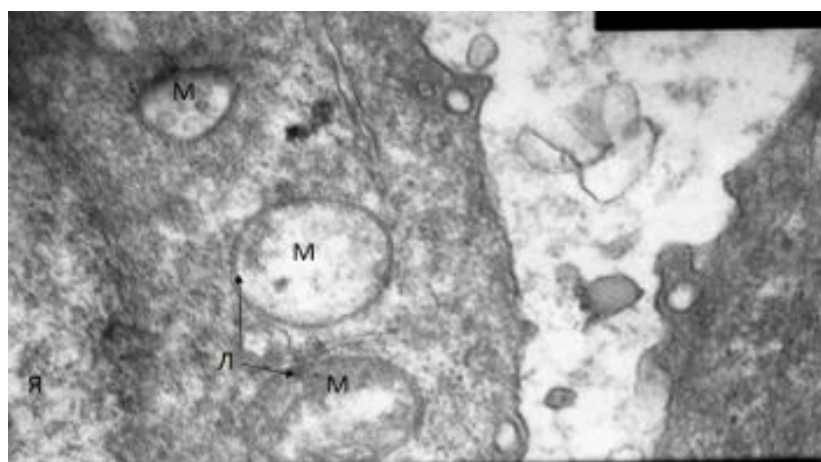
Рис. 21 (А, Б) Ультратонкий срез клеток линии ЛЭК-ВИЭВ-90

М - митохондрия, Ц – цитоплазма, Нм – наружная мембрана митохондрии, Кр - кристы митохондрий, Лк – лизис крист

Во многих клетках выявлялись значительные изменения митохондрий, которые характеризовались разрушением и лизисом матрикса и крист. Отдельные митохондрии представляли собой вакуоли с электроннопрозрачным содержимым, оболочка их при этом сохранялась (Рис. 21 Б, 22). В цитоплазме клеток выявлялось много везикулярных структур, разветвленная система субмикроскопических канальцев, трубочек и цистерн, ограниченных мембранами,

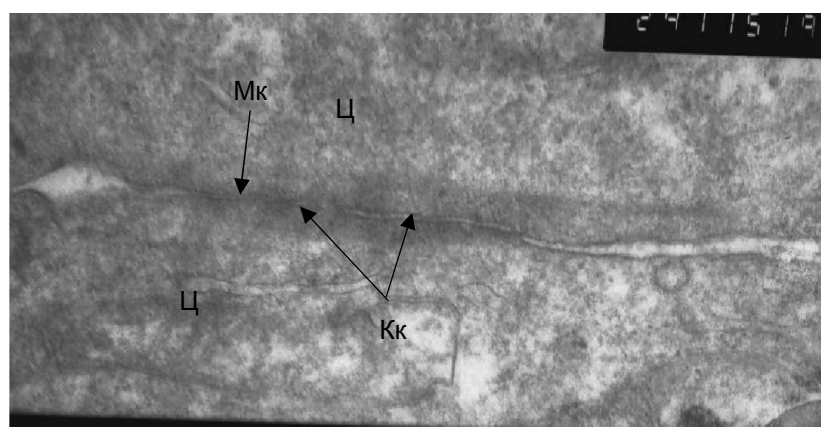
а также электронноплотные тела. Комплекс Гольджи представлен классическими ламинарными структурами, часто заканчивающимися визикулярными структурами и различного размера вакуолями. Межклеточные контакты представляли собой тесный контакт цитоплазматических оболочек (Рис. 23) или переплетение микроотростков в виде замков.

Клеточный центр в обеих культурах выявляли редко; он представлял собой зону, состоящую из продольных и поперечных срезов микрофибрилл центриолей, от которых отходят микротрубочки (Рис. 34).



Ув.: x 43 000

Рис. 22 Ультратонкий срез клетки линии ЛЭК-ВИЭВ-90
М- митохондрия, Л - лизис крист и формирование вакуолей

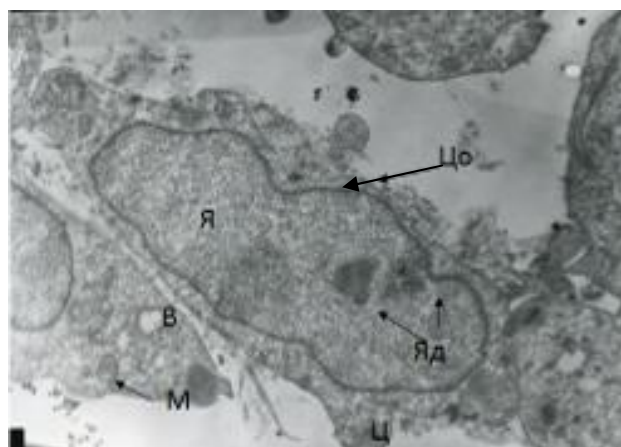


Ув.: x 60 000

Рис. 23 Ультратонкий срез клетки линии ЛЭК-ВИЭВ-90
Ц – цитоплазма, Мк – межклеточный контакт, Кк – клеточный контакт

В клетках линии FLK-BLV часть фибробластоподобных клеток была бедна цитоплазматическими органеллами (Рис. 24). Ядра имели, в основном, вытянутую форму с неровными границами, содержали небольшое количество пристеночно расположенного эу- и гетерохроматина, внутри ядра располагались от 1 до 4 ядрышек. В отличие от клеток линии ЛЭК-ВИЭВ-90 в матрице цитоплазмы диффузно располагались обильные скопления тонких фибрилл, группировавшихся пучками, и рибосомо-пластинчатые комплексы, которые имели различную форму (Рис. 25).

В обеих культурах в цитоплазме вируспродуцирующих клеток встречались вакуоли, несущие вирионы типа С различной степени зрелости (Рис. 25, 31).



Ув.; x 8000



Ув.: x 8000

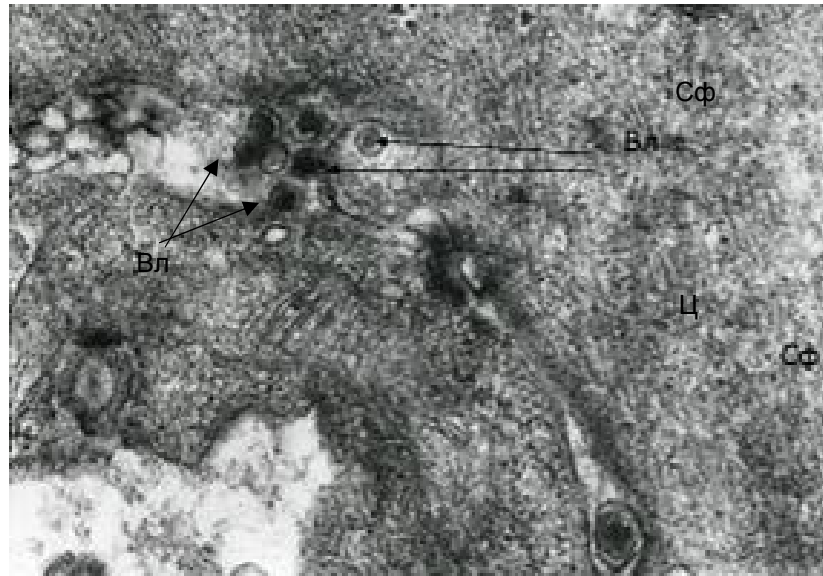
Рис. 24 Ультратонкий срез клеток линии FLK-BLV

Цо – цитоплазматическая оболочка, Я – ядро, Яд – ядрышко, Ц – цитоплазма, Цо – цитоплазматическая оболочка, М – митохондрии, В – цитоплазматическая вакуоль

На клеточной мембране встречались почкующиеся формы вируса, а рядом во внеклеточном пространстве скопления зрелых вирионов типа С (Рис. 28 Б). Они имели, в основном, эллипсоидную форму, содержали электронноплотный нуклеоид, окруженный оболочкой. Между оболочкой и нуклеоидом выделялась электроннопрозрачная зона.

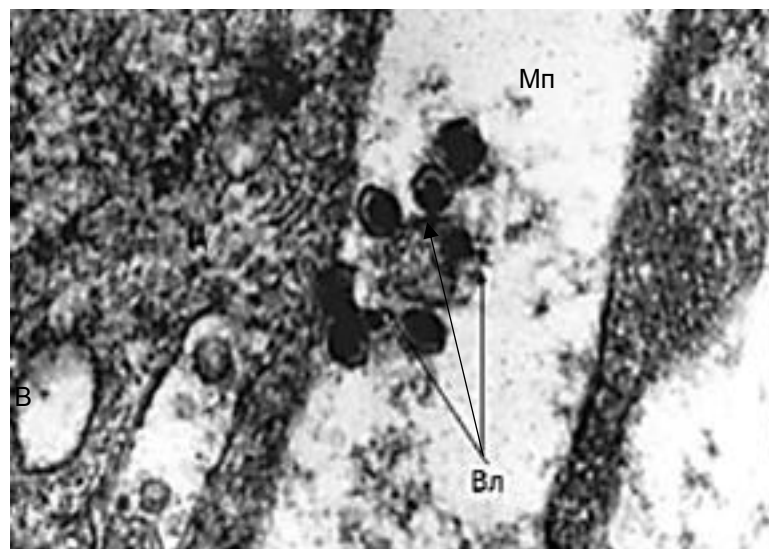
Вируспродуцирующие клетки отличались большим количеством митохондрий, часто гипертрофированных, увеличением профилей гранулярного эндоплазматического ретикулума и появлением разнообразных рибосомо-

пластинчатых комплексов. Некрозу подвергались некоторые вируспродуцирующие клетки, в вакуолях которых встречались электронноплотные нуклеоидоподобные частицы и цельные вирионы типа С. В этих клетках наблюдали обильную вакуолизацию, разрушение органелл и цитоплазмы (Рис. 27).



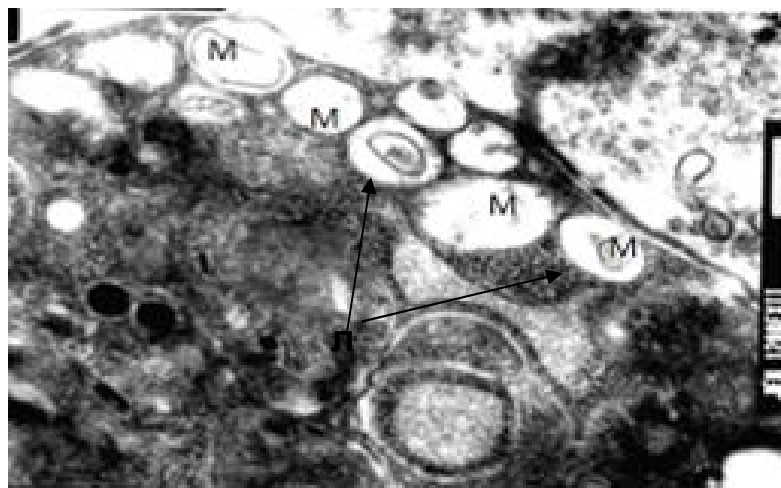
Ув.; x 75 000

Рис. 25 Ультратонкий срез клетки линии FLK-BLV
Вл-вирус лейкоза, Мп – межклеточное пространство, Ц – цитоплазма,
Сф – скопление фибрилл



Ув.; x 60 000

Рис. 26 Ультратонкий срез клетки линии ЛЭК-ВИЭВ-90
Вл – вирус лейкоза, В - цитоплазматическая вакуоль, Мп – межклеточное
пространство, Ц – цитоплазма



Ув.: x 53 000

Рис. 27 Ультратонкий срез клеток линии FLK-BLV
 М – митохондрии, Л - лизис крист и
 формирование вакуолей

3.2.6. Морфология и пути морфогенеза вируса лейкоза крупного рогатого скота в культурах FLK-BLV и ЛЭК- ВИЭВ-90

В обеих исследованных культурах клеток вирионы располагались, в основном, в цитоплазматических вакуолях и во внеклеточном пространстве непосредственно рядом с плазмалеммой и были с характерной для лейковирусов сходной морфологией типа С.

Вирионы были различных размеров и имели эллипсовидную, сферическую, вытянутую и иногда гантелевидную форму. Они содержали центрально расположенный электронно-плотный нуклеоид диаметром 50-90 нм, окруженный оболочкой. Между оболочкой и нуклеоидом выделялась электронно-прозрачная зона варьирующего размера. Её размер составлял в среднем 8-16 нм, а полный диаметр вирионов варьировал от 80 до 120 нм.

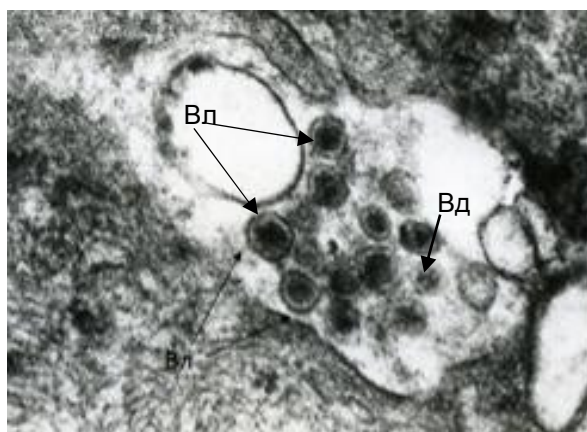
Выраженная гетерогенность вирионов по форме и размерам была особенно характерна для внутриклеточного вируса, расположенного в цитоплазматических вакуолях (Рис.25, 28А).

Встречались вакуоли с множеством нуклеоидоподобных частиц, а в других

можно было наблюдать вирионы различной степени зрелости (Рис.29,31). Такие скопления располагались в цитоплазме и были окружены общей мембраной. Во внутриклеточных вакуолях кроме вирусных частиц располагались небольшие сферические образования, мембранные структуры, аморфные скопления с различной электронной плотностью.

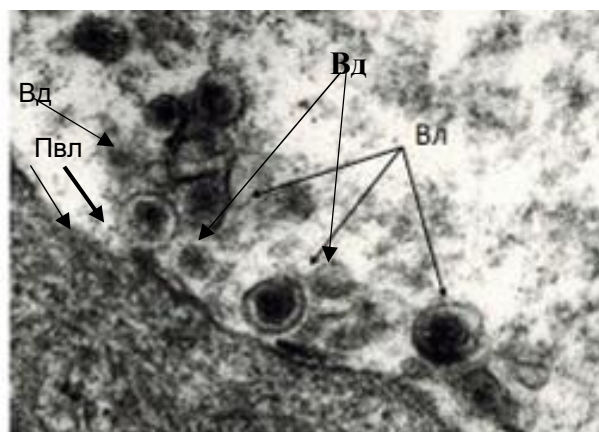
Во внеклеточном пространстве встречались только зрелые вирионы, которые располагались чаще группами среди мембранных и других клеточных структур, их форма была более стабильна (Рис.26, 28Б).

А. FLK-BLV



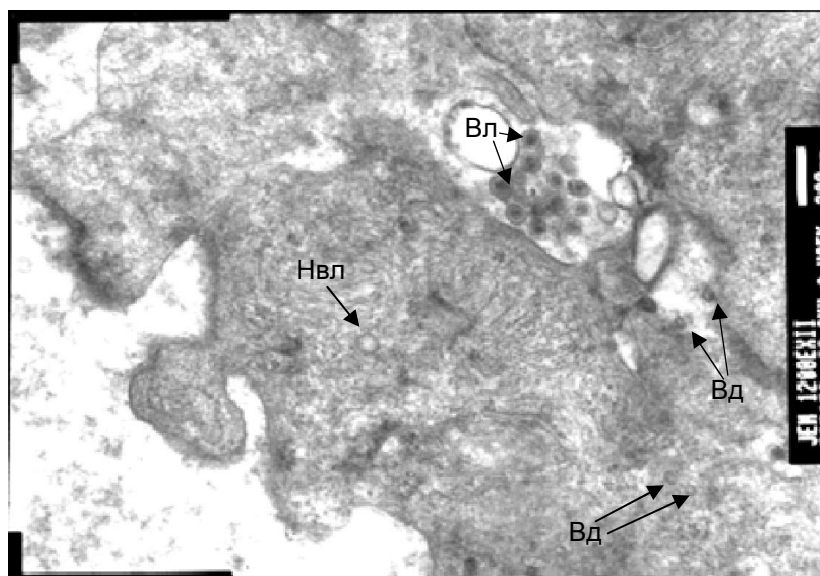
Ув.: x 60 000

Б. ЛЭК-ВИЭВ-90



Ув.: x 65 000

Рис. 28 (А,Б) Ультратонкие срезы клеток линий FLK – BLV и ЛЭК-ВИЭВ-90
 Вл – вирус лейкоза крупного рогатого скота, Пвл – почкование вируса лейкоза, Вд – вирус диареи крупного рогатого скота

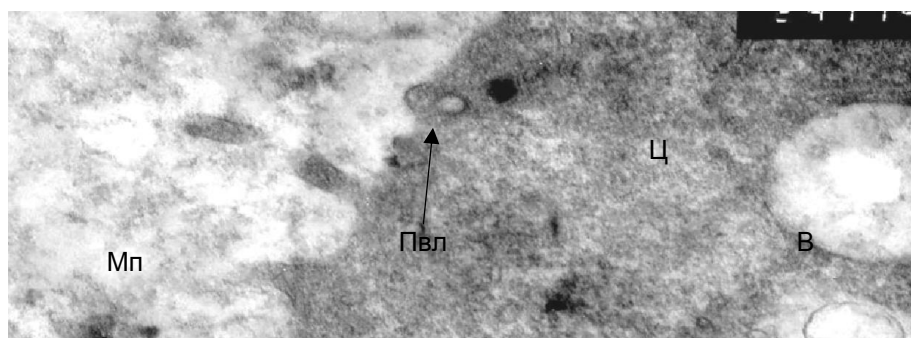


Ув.: x 31 000

Рис. 29 Ультратонкие срезы клеток линий FLK – BLV
 Вл – вирус лейкоза крупного рогатого скота,
 Нвл – нуклеоид вируса лейкоза, Вд – вирус диареи КРС

По всей толще цитоплазмы располагались вируснесущие вакуоли и в местах их соприкосновения с плазмалеммой клеток наблюдались ее разрывы, через которые зрелые вирионы выходили из клетки. Внеклеточно располагались только зрелые вирионы, которые имели все характерные признаки ретровирусных частиц типа С.

Почкующиеся формы вирионов ВЛ КРС в исследуемых культурах обнаруживали редко, процесс почкования проходил традиционным путем. Процесс образования почки начинался конденсацией электронно-плотного материала под клеточной оболочкой (Рис.30). Происходило выпячивание конденсата с закруглением его концевых участков до полного их соединения. Покрывающая его цитоплазматическая мембрана также претерпевала значительные изменения, превращаясь в оболочку вириона. Она постепенно закруглялась, и на поздних стадиях формирования почки образующийся вирион был связан с клеткой лишь тонким цитоплазматическим мостиком (Рис. 28Б). Почкующиеся формы вируса отличались стабильностью размера и формы вирионов.

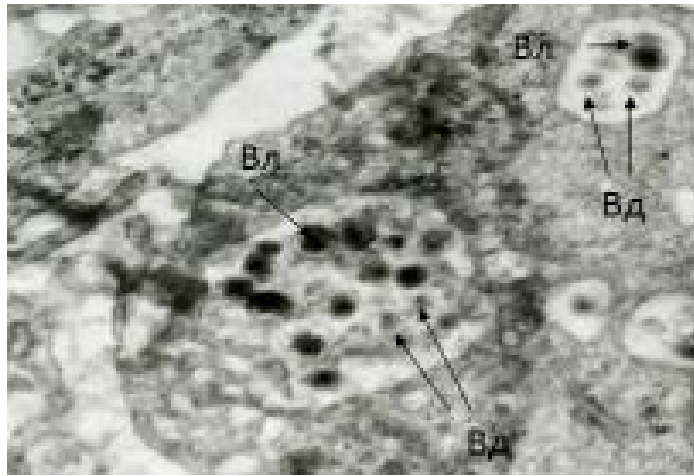


Ув.: x 43 000

Рис. 30 Ультратонкий срез клетки линии ЛЭК-ВИЭВ-90
 Пвл – почкование вирус лейкоза, В - цитоплазматическая вакуоль,
 Мп – межклеточное пространство, Ц – цитоплазма

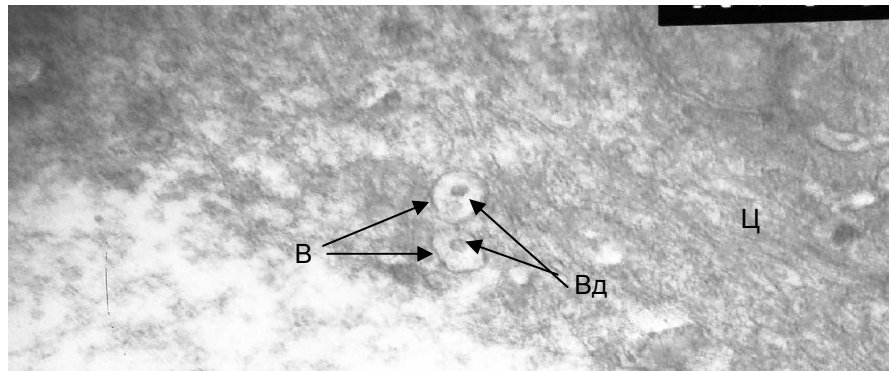
В обеих изученных клетках культур, хронически инфицированных вирусом лейкоза, имеющих различное видовое происхождение, наблюдали вирус различной степени зрелости. Морфология продуцируемого ими онкорнавируса была идентична. Она также была идентична морфологии вируса, описываемого в литературе как вирус лейкоза крупного рогатого скота. В культуре клеток FLK-BLV количество зрелых вирионов было выше, чем в клетках культуры ЛЭК-ВИЭВ-90. Формирование вируса лейкоза крупного рогатого скота происходило в процессе почкования традиционным путем, вирионы выявлялись в основном сформированными в цитоплазматических вакуолях и во внеклеточном пространстве.

В ультратонких срезах обеих клетках культур помимо вируса лейкоза наблюдали частицы, отличающиеся размером и структурой от ВЛ КРС. Их размер колебался от 40 до 60 нм, частицы не имели выраженного электронноплотного ядра и чаще были с аморфным содержимым. Они располагались как внутри клеток, так и в межклеточном пространстве, по морфологии были похожи на вирус диареи КРС (Рис. 28 (А, Б), 29, 30, 32, 33).



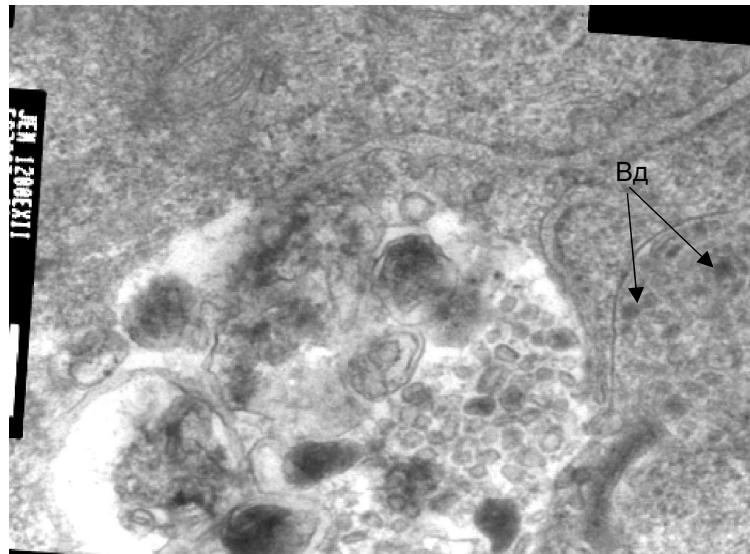
Ув.: x 40 000

Рис. 31 Ультратонкие срезы клеток линий ЛЭК-ВИЭВ-90
Вл – вирус лейкоза КРС, Вд – вирус диареи КРС



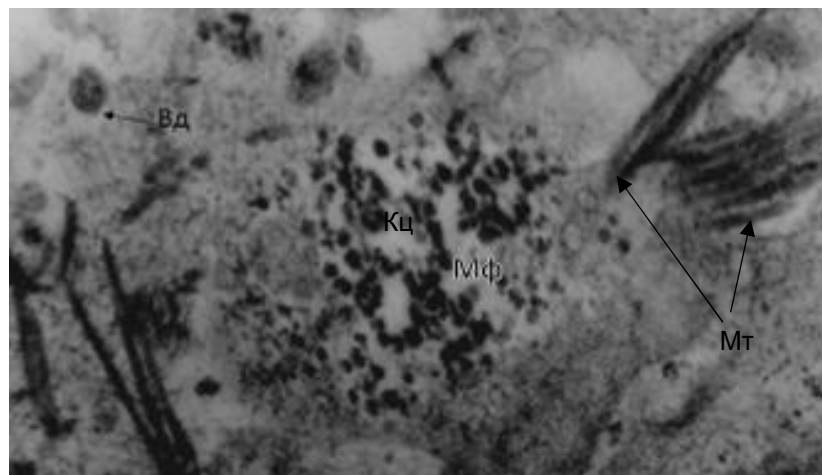
Ув.: x 48 000

Рис. 32 Ультратонкие срезы клетки линий ЛЭК-ВИЭВ-90
Ц – цитоплазма, Вд – вирус диареи КРС,
В – цитоплазматическая вакуоль



Ув.: x 50 000

Рис. 33 Ультратонкий срез клетки линии FLK-BLV
Вд – вирус диареи КРС (скопление вируса в цитоплазме клетки)



Ув.: x 100 000

Рис. 34 Ультратонкий срез клетки линии FLK-BLV
Кц – клеточный центр, Мф – микрофибриллы центриолей,
Мт – микротрубочки, Вд – вирус диареи

3.2.7. Определение наличия генома вируса диареи КРС методом ПЦР в культурах клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV

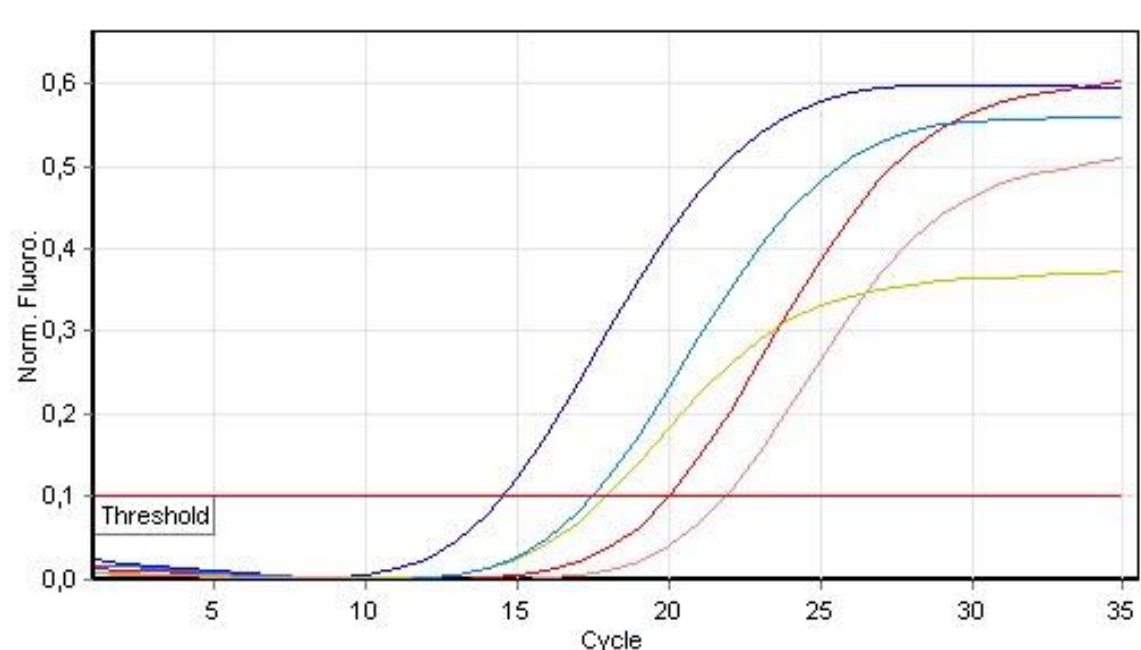
Так как при проведении электронной микроскопии культур клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV помимо вируса лейкоза были обнаружены вирионы, по морфологии схожие с вирусом диареи крупного рогатого, мы провели дополнительные исследования данных культур методом «Real-time PCR» на наличие генома вируса диареи КРС.

На рисунке 35 представлены результаты исследования культур клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Полученные в ходе эксперимента данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала – анализировали с помощью программного обеспечения «RotorGene 6.0». Результаты реакции интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (Threshold) в виде графика зависимости интенсивности флуоресценции от количества циклов, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «Ct» в таблице результатов.

Анализ кинетических кривых по каналу детекции FAM показал, что значение Ct определено для положительного контроля амплификации (21,85), положительного контроля этапа выделения (17,47), для пробы №1 с культурой клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 (19,99) и для пробы № 2 с культурой клеток FLK-BLV (17,92), что свидетельствует о положительных результатах этих проб, т.е. о выделении генома вируса диареи крупного рогатого скота (Рис. 35).

Рис. 35 – Результаты исследования культур клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» (Real-Time PCR) на геном вируса диареи КРС



No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	Rep. Ct
1	■	1	Unknown	19,99			19,99
2	■	2	Unknown	17,92			17,92
3	■	3	Unknown	14,53			14,53
4	■	4	Unknown	NEG (R.Eff)			
5	■	к- выделение РНК	Unknown	NEG (R.Eff)			
6	■	к+ выделение РНК	Unknown	17,47			17,47
7	■	к-ПЦР	Unknown	NEG (R.Eff)			
8	■	к+ПЦР	Unknown	21,85			21,85

Проба №1 - культура клеток ЛЭК-ВИЭВ-90, проба №2 - культура клеток FLK-BLV, проба №5 - отрицательный контроль этапа выделения РНК, проба №6 - положительный контроль этапа выделения РНК, проба №7 - отрицательный контроль этапа амплификации, проба №8 - положительный контроль этапа амплификации.

3.3. Обсуждение полученных результатов

По данным Всемирной Организации Здоровья Животных (World Organization for animal Health) основными методами диагностики лейкоза крупного рогатого скота на практике являются методы выявления специфических противовирусных антител в сыворотках инфицированных животных: реакция иммунодиффузии в агаровом геле (РИД) и иммуноферментный анализ (Manual of Diagnostic tests and vaccines for Terrestrial animals, Seventh Edition, 2012) [138]. Эти методы базируются на использовании вирусных белков gp51 и p24 и специфических поликлональных или моноклональных антисывороток, с использованием которых разработаны различные варианты тест-систем [24, 108, 222]. В нашей стране в массовом масштабе используется реакция иммунодиффузии в агаровом геле [30].

Источником получения антигенов gp51 и p24 в промышленном масштабе, как в нашей стране, так и за рубежом, является перевиваемая клеточная линия FLK-BLV, хронически инфицированная вирусом лейкоза КРС [10, 54, 56, 240]. Культура FLK-BLV получена на территории США и продуцирует вирус лейкоза американского генотипа. Описано также значительное количество других клеточных линий, хронически инфицированных вирусом лейкоза: LB-59 Iy, FLK-J5, ПЭК, Tbl –Zu, BLV- Simian, FLS и J-1228 и LmTT [110]. В нашей стране были получены две аналогичные линии ТЭК-МВА-76 и ЛЭК-ВИЭВ-90 [38, 81]. Однако эти культуры изучены не достаточно, многие из них, в числе и линии ТЭК-МВА-76, недоступны или утрачены и не используются в производстве антигенов вируса лейкоза для диагностических целей.

Клеточная линия ЛЭК-ВИЭВ-90 по данным авторов, получивших её, способна долго, не вырождаясь, интенсивно продуцировать вирус лейкоза КРС и его антигены [81]. Её дальнейшее изучение представляет существенный интерес, так как она продуцирует вирус лейкоза, циркулирующий в популяции КРС нашей страны и может служить альтернативным источником получения антигенов gp51 и p24 в промышленных масштабах. Её изучение в сравнительном аспекте с изучением культуры FLK-BLV представляет также предметный научный интерес и с точки зрения уточнения некоторых вопросов морфогенеза вируса лейкоза.

Анализ доступной специальной литературы показал, что работы, посвященные изучению морфогенеза вируса лейкоза КРС, малочисленны. Морфология вируса исследована, в основном, в краткосрочных культурах лимфоцитов больных лейкозом коров [9, 10, 18, 50, 58, 158, 222, 239, 240]. Однако, такие культуры практически трудно масштабировать в производстве, и они продуцируют вирусные антигены в ограниченном количестве [167, 166]. Изучению морфологических аспектов формирования вируса лейкоза в перевиваемых клеточных культурах посвящены лишь единичные работы [54, 56, 80].

Практически все авторы при анализе морфогенеза вируса лейкоза в краткосрочных культурах лимфоцитов больного скота отмечают, что вирионы, как правило, находятся во внеклеточном пространстве и в вакуолях цитоплазмы. Процесс почкования выявляется крайне редко, что не коррелирует с количеством внеклеточного вируса. Аналогичная картина описывается всеми авторами, исследовавшими морфогенез вируса лейкоза в хронически инфицированных клеточных линиях FLK-BLV и ТЭК-МВА-76 [54, 56]. В наших исследованиях клеток линий FLK-BLV и ЛЭК-ВИЭВ-90 получены аналогичные результаты. Полные вирионы лейкоза, как правило, также располагались в виде внеклеточных скоплений или в цитоплазматических вакуолях. В цитоплазме вирус выявлялся в виде отдельных вирионов или в стадии формирования единичных мембран. Почкование отмечали в единичных случаях. По мнению некоторых авторов [82, 151] количество почкующихся вирионов резко возрастает с использованием в среде роста эмбриональной сыворотки, в наших экспериментах этого не наблюдали. Хотя в процессе опытов использовали сыворотку эмбрионов коров.

Изучение культуральных, морфофункциональных и цитогенетических свойств культур FLK-BLV и ЛЭК-ВИЭВ-90 на стадии разных пассажей показало стабильность их активности роста, морфологии и кариологических характеристик. По культуральным и морфологическим характеристикам на световом и ультраструктурном уровнях клетки линии FLK-BLV не отличались от данных, полученных аналогичными методами другими авторами [54, 56, 205, 239, 240]. Клетки имели, в основном, морфологию фибробластов, хороший индекс

пролиферации в присутствии в среде эмбриональной сыворотки, удовлетворительно сохраняли монослой до 7 суток. Монослой характеризовался хорошей плотностью клеток с их четкими границами. Цитогенетический анализ подтверждает принадлежность культуры к тканям овцы. Клетки культуры ЛЭК-ВИЭВ-90 по культуральным и морфологическим свойствам, полученными методами световой микроскопии, соответствовали данным, полученным авторами культуры [81]. Культура была стабильной на протяжении всех опытов, цитогенетический анализ показал принадлежность ее к тканям крупного рогатого скота.

При электронно-микроскопическом исследовании в клетках обеих клеточных линий выявили все типичные органеллы, имеющиеся в фибробластоподобных и эпителиоподобных клетках и описанные другими авторами [10, 54, 56, 239,240]. Ядра клеток культуры ЛЭК-ВИЭВ-90 имели неровные границы с частыми инвагинатами цитоплазмы, которые на ультратонких срезах часто представляли собой ядерные «карманы», что ранее описано различными авторами [10, 54, 58, 56]. В ядрышках хорошо выявлялся эу- и гетерохроматин, что реже отмечалось в культуре FLK-BLV. Митохондрии в клетках обеих культур часто имели лизис матрикса и крист, что отмечалось и другими авторами [54, 56]. Цитоплазма клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 имела более плотный вид за счет более развитой эндоплазматической сети, чем в клетках FLK-BLV, что не коррелирует с количеством синтеза антигенов вируса, который связан с деятельностью рибосомального аппарата клеток. Хотя, это может быть связано с более активным синтезом компонентов другого вируса, что подтверждается более высоким уровнем генома вируса диареи в данной культуре, что видно из графика (проба №1 на Графике №1).

В значительной части клеток обеих культур выявлялись признаки их инфицирования вирусами. В них выявлялись вирионы вируса лейкоза на разной стадии формирования. Морфология вирионов, развивающихся в обеих культурах, была аналогичной и соответствовала морфологии вируса лейкоза, описанной другими авторами [9, 10, 54, 56, 58, 239, 240]. Полные вирионы были типичным

вирусом типа С: их размер по диаметру колебался от 80-90 до 120 нм, они содержали округлый или угловатый электронноплотный нуклеоид диаметром 50-90 нм, между нуклеоидом и оболочкой проявлялась электроннопрозрачная зона шириной 8-16 нм. Гетерогенность популяции по размерам и форме зависела от места прохождения ультратонкого среза по вириону.

Полученные нами данные совпадают с результатами, описанными ранее [54, 56, 240]. Формирование вирионов и их выделение почкованием соответствует также картине, описанной другими авторами [10, 54, 56, 58, 240].

Для определения наличия антигена вируса лейкоза в культурах клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV мы использовали реакцию иммунодиффузии - для обнаружения антигена, и полимеразную цепную реакцию - для обнаружения генома вируса лейкоза КРС. За период наблюдений выход антигена gp51 для культуры FLK-BLV был выше, по сравнению с культурой ЛЭК-ВИЭВ-90, в среднем в 2 раза. При исследовании методом ПЦР монослоя культур клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV на 1, 2, 3, 4 и 5 дни пассажа на наличие генома вируса лейкоза крупного рогатого скота были получены положительные результаты во всех случаях.

В обеих исследованных нами культурах (ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV) в цитоплазме выявлялись вирионы, отличающиеся размерами и структурой от вируса лейкоза КРС. Их размер в ультратонких срезах колебался от 40 до 50 нм, они имели тонкую оболочку из капсомеров, ядро их часто не имело выраженной электронноплотной плотности и было аморфно. Такие частицы (вирионы) одни авторы интерпретируют, как небольшие (40-50 нм) частицы, сходные с сердцевинной вирионов типа Д [9], другие оставляют без интерпретации (Е.А. Михалева, 1987; рис. 8, 10, 13, 14) [56], хотя они хорошо ими выявлены. Для проверки данного предположения было проверено наличие генома вируса диареи КРС в данных культурах методом ПЦР. Результаты (Рис. 35) показали, что в обеих исследованных нами культурах присутствует геном вируса диареи КРС. Тот факт, что обе культуры длительное время перевиваются со стабильным

сохранением культуральных и антигенпродуцирующих свойств свидетельствует о том, что это не цитопатогенный вариант вируса диареи [31, 67, 114].

Выявленное в наших опытах наличие смешанной хронической инфекции вирусами лейкоза и диареи перевиваемых клеточных линий ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV, вероятнее всего, связано с использованием контаминированной вирусом диареи фетальной сыворотки. Документальный ретроспективный анализ показал, что использованные в начале наших опытов (2003 г.) сыворотки не проверялись на наличие генома вируса диареи и антител к данному вирусу. Использование таких культур для производства антигенов gp51 и p24 требует тщательного контроля контрольных положительных сывороток, входящих в диагностические наборы, на отсутствие в них антител к вирусу диареи КРС.

4. ВЫВОДЫ

1. Культура клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 представлена клетками эпителиоподобного типа полигональной формы с небольшим количеством фибробластоподобных клеток, а FLK-BLV полигональными клетками с преобладанием фибробластоподобных. Ядра в обеих культурах одинаковой формы и с количеством ядрышек от одного до четырех. По кариологической характеристике культура ЛЭК-ВИЭВ-90 имеет 52 хромосомы с интервалом изменчивости от 18 до 65 хромосом, культура клеток FLK-BLV имеет 50 хромосом, с интервалом изменчивости от 30 до 50 хромосом. По ультраструктурной характеристике клетки обеих культур аналогичны, и они обладают всеми типичными органеллами.

2. В цитоплазме клеток культур ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV выявляются вирионы типа С, на срезе они представляют собой округлые структуры диаметром от 80 до 120 нм, имеют двухслойную наружную оболочку, центрально расположенный плотный нуклеоид диаметром от 50 до 90 нм и электроннопрозрачную зону между ними. Аналогичные вирионы выявляются также в межклеточном пространстве. По морфологии вирус является типичным вирусом лейкоза КРС.

3. Формирование вируса лейкоза КРС происходит почкованием от цитоплазматической оболочки, однако морфологические доказательства этого процесса выявляются в ультратонких срезах крайне редко. Вирионы выявляются в основном сформированными в цитоплазматических вакуолях и во внеклеточном пространстве. В клетках культуры ЛЭК-ВИЭВ-90 вирионы выявляются существенно реже, чем в клетках FLK-BLV.

4. Сравнительный анализ количества антигена gp51, продуцируемого этими культурами клеток методом иммунодиффузии в агаровом геле, показал, что культура FLK-BLV продуцирует антигена в 2,5 раза больше, чем культура ЛЭК-ВИЭВ-90. Это коррелирует с данными электронной микроскопии.

5. Цитоплазма клеток культур ЛЭК-ВИЭВ-90 и FLK-BLV содержит также вирионы, отличные от вируса лейкоза КРС. Они имеют округлую форму около 60

ном, внутреннее содержимое их выявляется в виде аморфной структуры. Морфогенез данного вируса связан со структурными компонентами цитоплазматического ретикулула; по морфологическим свойствам выявленный вирус аналогичен вирусу диареи крупного рогатого скота. Эти данные подтверждаются результатами, полученными методом ПЦР, который показал наличие генома вируса диареи КРС в обеих культурах.

6. Сравнительный анализ показал, что перевиваемая клеточная культура ЛЭК-ВИЭВ-90 может использоваться для производства антигена gp51 вируса лейкоза генотипа, циркулирующего в поголовье крупного рогатого скота на территории Российской Федерации, как альтернатива американскому генотипу вируса, продуцирующегося в культуре FLK-BLV.

5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Перевиваемая клеточная культура ЛЭК-ВИЭВ-90 рекомендуется для производства в промышленном масштабе антигена gp51 вируса лейкоза, циркулирующего в поголовье крупного рогатого скота на территории Российской Федерации, как альтернатива американскому генотипу вируса, продуцирующегося в культуре FLK-BLV.

В связи с контаминацией вирусом диареи клеточных культур FLK-BLV и ЛЭК-ВИЭВ-90 при использовании их для производства антигенов gp51 и p24 для диагностических наборов, положительную контрольную сыворотку к вирусу лейкоза обязательно контролировать на отсутствие в ней антител к вирусу диареи.

Клеточные линии FLK-BLV и ЛЭК-ВИЭВ-90 рекомендуются в качестве лабораторной модели для изучения взаимодействия неродственных РНК геномных вирусов в условиях смешанной инфекции.

6. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аналитический обзор эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в Российской Федерации (1996-2010) / М.И. Гулюкин, Г.А. Симонян, И.И. Барабанов [и др.] // Рос. акад. с.-х. наук, Всерос. научно-исслед. инст-т эксперим. ветеринарии им. Я.Р. Коваленко (ВИЭВ). – Москва: [б.и.]. – 2011. – 46 с.: табл. на рус. яз. – Российская Федерация.
2. Авилов В.М. Проблема оздоровления крупного рогатого скота от лейкоза / В.М. Авилов, В.М. Нахмасон // Ветеринария. - 1995. - №11. - С. 3-6.
3. Апалькин В.А. Лейкоз крупного рогатого скота / В.А. Апалькин, М.И. Гулюкин, Н.И. Петров // Диагностика и оздоровительные мероприятия. – СПб.: Петролазер, 2005. – 87 с.
4. Безгин В.М. Технологическая реализация промышленной технологии изготовления диагностикума лейкоза крупного рогатого скота / В.М. Безгин, А.А. Сорокина, И.И. Рыбникова // 100 лет Курской биофабрике и агробиол. пром-ти России: Тез. докл. науч.-произв. конф. 27-30 августа 1996 г. - Курск, 1996. - С. 45-46.
5. Берни А. Вирус бычьего лейкоза: новая концепция лейкомогенеза для старой болезни / А. Берни // Ж. Всес. Хим. об-ва, 1986. – Вып. 31. - № 3. – С. 299-302.
6. Бурба Л.Г. Профилактика и борьба с лейкозом крупного рогатого скота / Л.Г. Бурба // Вест. с.-х. науки. - 1986. - №. 10. - С. 109-113.
7. Бурба Л.Г. Серологическое и гематологическое проявление гемобластозов крупного рогатого скота / Л.Г. Бурба, В.С. Кузьмичев // Этиология,

патогенез и вопр. эпизоотологии лейкоза крупного рогатого скота. – Новосибирск, 1986. - С. 19-24.

8. Бусол В.А. Этиология гемобластозов крупного рогатого скота: Автореф. дисс. ... доктора вет. наук/ В.А.Бусол. – Москва, 1983.- 44 с.
9. Быковский А.Ф. Ультраструктурная характеристика вируса бычьего лейкоза и его ассоциантов в культуре ткани / А.Ф. Быковский, Г.Г. Миллер, М.Ф. Гриненко // В кн.: Вирусы рака и лейкоза. - М., 1979. - С. 115-117.
- 10.Валихов А.Ф. Вирус типа С в культуре лимфоцитов крови коров, больных лейкозом / А.Ф. Валихов, Г.А. Надточей, Н.В. Ваганова // Ветеринария. - 1974. - №4. – С. 43-45.
- 11.Валихов А.Ф. Современное состояние изученности онкорнавируса крупного рогатого скота / А. Ф. Валихов. // Бюлл. ВИЭВ. - 1977. - В.30. - С. 16-18.
- 12.Валихов А.Ф. Морфология, антигенные свойства вируса и серологическая диагностика онкорнавирусной инфекции крупного рогатого скота: дис. ... канд. биол. наук. - М., 1978. – 162 с.
- 13.Валихов А.Ф. Изучение онкорнавируса, выделенного при лейкозе крупного рогатого скота / А.Ф. Валихов // В кн.: Проблемы экспериментальной онкологии и лейкозов человека и животных: под ред. Л.М. Шабада, В.П. Шишкова. - М.: Колос, 1979. - С.205-213.
- 14.Валихов А.Ф. Биологические свойства вируса лейкоза крупного рогатого скота. Диагностика и профилактика инфекции: Дисс. ... доктора биол. наук/ А.Ф.Валихов; ВИЭВ. – Москва, 1992. – 400 с.

15. Верховский О.А. Лабораторная диагностика инфекционных болезней крупного рогатого скота с использованием иммуноферментного анализа (лейкоз, ящур, бруцеллез) // Ветеринария Кубани. – 2007. - № 2. – С. 11-12.
16. Вирус лейкоза крупного рогатого скота / Р.А. Кукайн, Л.И. Нагаева, В.П. Ложа [и др.] // Рига, «Зинатне». – 1982. – 175 с.
17. Возможности и ограничения использования полимеразной цепной реакции в диагностике лейкоза крупного рогатого скота / С.В. Чичина, В. В. Храмцов, П.Н. Смирнов, Е.А. Дурыманова, В.А. Белявская // Вестник РАСХН. - 2006. - № 6. - С. 71-73.
18. Выявление онкорнавируса типа С у крупного рогатого скота со спонтанным и экспериментально воспроизведенным лимфолейкозом / Р.А. Кукайн [и др.] // Вопросы онкологии. – 1973. – Т.19. - № 7. – С. 44-49.
19. Выявление провируса лейкоза крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции с последующей нерадиоактивной блот-гибридизацией / А.Н. Попов, В.А. Адаричев, С.М. Калачиков, Е.С. Мишина, Г.М. Дымшиц // Вопр. вирусологии, 1993. - Т.38. - №3. - С.113-116.
20. Гулюкин М.И. Результаты серологических и морфофункциональных исследований крови телят от инфицированных вирусом лейкоза и больных лимфолейкозом матерей / М.И. Гулюкин, Л.Г. Бурба, Л.А. Иванова // Ветеринария. – 1985. - № 11. – С. 32-38.
21. Гулюкин М.И. Серологический метод диагностики в системе противолейкозных мероприятий // М.И. Гулюкин, В.М. Нахмансон, Е.А. Дун // Ветеринария. – 1997. - № 7. – С. 12-14.

22. Двоглазов Н.Г. Сравнительный анализ разных коммерческих тест-систем и методов в диагностике ВЛКРС / Н.Г. Двоглазов, Ю.В. Туманов // Актуальные вопросы ветеринарии: мат. Сиб. междунар. науч.-практ. конф. - Новосибирск, 2004. - С. 304-308.
23. Джапаралиев Н.Т. Молекулярно-биологические методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота: дисс. ... канд. биол. наук. – Владимир, 2002. – 110 с.
24. Диагностические свойства синтезированного в *Escherichia coli* рекомбинантного гена gp51 вируса лейкоза крупного рогатого скота / К.Н. Мукантаев, А.В. Шустов, Ы. Сыдыкнаби, Ш. Байдосова, К.К. Муканов // Биотехнология. Теория и практика. – 2013. - № 2. – С. 47-52.
25. Жданов В.М. Исследование возможности культивирования вируса, выделенного из первичных культур органов больных лейкозом коров в перевиваемых клеточных линиях коровьего происхождения / В.М. Жданов, М.И. Парфанович // Вируса рака и лейкоза. – М, 1974. – С. 41-45.
26. Залевский Д.И. Получение вируспродуцирующих культур клеток и антигена онкорнавируса крупного рогатого скота / Залевский Д.И. // Бюлл. ВИЭВ. – 1979. – Т. 36. – С. 25-27.
27. Залевский Д.И. Применение сыворотки крови молодняка крупного рогатого скота для культивирования культур клеток *in vitro* и получения антигена бычьего лейкозного вируса / Д.И. Залевский // Новое в инфекционной патологии с.-х. ж-ных: Труды ВИЭВ. - 1983. - Т. 58. - С. 54-58.
28. Иммунологические и клинико-гематологические исследования овец и телят с экспериментальной инфекцией бычьего лейкозного вируса (БЛВ) / В.А.

- Крикун, Х.С. Салимов, Г.С. Петровский, В.П. Шишков, Б.З. Иткин // Теорет. и практ. вопросы лейкозов и злокачественных опухолей с.-х. животных. – Москва, 1979. – 107. – С. 24-28.
29. Иммуноферментный анализ в диагностике лейкоза крупного рогатого скота / О.А. Верховский, В.В. Цибезов, М.В. Баландина, И.В. Непоклонова // Ветеринария. – 2002. - № 12. – С. 8-10.
30. Инструкция по профилактике и борьбе с лейкозом крупного рогатого скота. Приказ Минсельхоза РФ № 359 от 11.05.1999 г. – 63 с.
31. Идентификация лимфотропного гаммагерпесвируса крупного рогатого скота в носовых секретах больных телят / К.П. Юров, С.В. Алексеенкова, А.В. Пчельников // Теория и практика актуальных исследований Исследование экспрессии генома BLV в лимфоцитах инфицированного: Сборник материалов Международной научно-практической конференции. – Краснодар, 2013. – С. 198-200.
32. 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.9-10.
33. Козырева Н.Г. Совершенствование диагностики ВЛКРС инфекции у телят / Н.Г. Козырева, Л.А. Иванова, М.И. Гулюкин // Ветеринария и Кормление. – 2013. - № 1. – С. 16-17.
34. Козырева Н.Г. Анализ генетического разнообразия вируса лейкоза крупного рогатого скота: Автореф. дис. ... канд биол. наук / Н.Г. Козырева; ВИЭВ. - Москва, 2013. – 26 с.

35. Количественная ПЦР на основе отечественной аппаратуры и тест-систем / А.А. Ёлов, Н.А. Федоров, Е.Б. Жибурт, И.В. Кофиади, Д.Ю. Трофимов // Здравоохранение и медицинская техника. - 2005. - № 2. – С.10.
36. Колотвин В.В. Вирус иммунодефицита крупного рогатого скота: индикация инфекции и распространенность в хозяйствах Российской Федерации: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Москва, 2007. – 22 с.
37. Крикун В.А. Эффективность реакции иммунодиффузии с двойным антигеном онкорнавируса типа С при оценке эпизоотологического состояния хозяйств по лейкозу крупного рогатого скота / В.А. Крикун, В.Т. Кумков, Л.И. Нагаева // Этиология и иммунодиагностика лейкоза крупного рогатого скотаю – Рига, «Зинатне». – 1977. – С. 131-135.
38. Крикун В.А. Продукция бычьего лейкозного вируса (BLV) и вирусных антигенов в хронически инфицированной перевиваемой культуре клеток тимуса эмбриона коров МВА-76 / В.А. Крикун, В.П. Шишков, Б.З. Иткин // В сб.: Вирус рака и лейкоза. – М., 1979. – С. 152-154.
39. Крикун В.А. Слизистые носа - наиболее вероятный путь заражения животных вирусом лейкоза крупного рогатого скота / В.А. Крикун // Лейкозы крупного рогатого скота. - 1985. - С. 5-6.
40. Кудрявцева Т.П. Патоморфологические и клинико-анатомические показатели при лейкозах и ретикулезах крупного рогатого скота: Автореф. дис. ... д-ра вет. наук. Москва, 1969. – 24 с.
41. Кудрявцева Т.П. Лейкоз животных / Т.П. Кудрявцева // М., Россельхозиздат. – 1980. – 158 с.

42. Кудряшов А.А. Патологоанатомические изменения при лимфоидном лейкозе у крупного рогатого скота / А.А. Кудряшов, Н.И. Петров // Ветеринария. – 1999. - № 10. - С. 14-15.
43. Кукайн Р.А. Морфологические, физико-химические, иммунологические и лейкозогенные свойства онкорнавируса типа С, выделенного от больного лимфолейкозом крупного рогатого скота / Р.А. Кукайн, Л.И. Нагаева, С.В. Чапенко // Материалы 6-й Всес. конф. по патол. анатомии животных. – Тарту, 1977. – Т. 1. – С. 320-323.
44. Кукайн Р.А. Вирус лейкоза крупного рогатого скота / Р.А. Кукайн, Л.И. Нагаева, В.П. Ложа // Рига, «Зинатне». – 1982. – 175 с.
45. Лагановский С.Я. Влияние некоторых факторов на продуцирование вируса лейкоза крупного рогатого скота вируспродуцирующей культурой клеток / С.Я. Лагановский, Я.А. Мелдрайс, В.П. Осе // В кн.: «Интеграционные вирусы». – Рига, «Зинатне». – 1985. – С. 44-49.
46. Лиманский А.П. Молекулярно-генетические методы - основа программ по искоренению лейкоза крупного рогатого скота / А.П. Лиманский, О.Ю. Лиманская // Биотехнология. - 2001. - № 3. - С. 40-50.
47. Ломакин А.И. Диагностика лейкоза крупного рогатого скота с помощью полимеразной цепной реакции / А.И. Ломакин, Л.Б. Прохватилова, С.С. Рыбаков // Труды ВИЭВ. - 1999. - Т. 72. - С. 192 -201.
48. Махмуд А.З. Электронно-микроскопическая характеристика морфогенеза бычьего лейкозного вируса и лейкоцитарных культур крови и лимфы при

лейкозе крупного рогатого скота: автореф. дисс. ... канд. вет. наук. – М., 1980. – 16 с.

49. Меддрайс Я.А. Характеристика вируса бычьего лейкоза, его ревертазы и вирусспецифических нуклеиновых кислот: автореф. дис. ... канд. биол. наук. - Рига, 1985. - 23 с.
50. Меньшикова З.Н. Изучение морфологии культивируемых *in vitro* лейкоцитов крови крупного рогатого скота, больного лейкозом / З.Н. Меньшикова, В.А. Крикун // Сб. науч. тр. МВА. - Москва, 1978. - Т. 100. - С. 99-101.
51. Меньшикова З.Н. Электронно-микроскопическая характеристика вариантов морфогенеза бычьего лейкозного вируса / З.Н. Меньшикова, А.З. Махмуд // Сб. науч. тр. МВА «Теорет. и практич. вопросы лейкозов и злокач. опухолей с.-х. животных». - Москва, 1979. - Т. 107. - С. 13-19.
52. Меньшикова З.Н. Ультраструктура лимфоцитов крови крупного рогатого скота, спонтанно и экспериментально инфицированного онковирусом типа С / З.Н. Меньшикова, Л.В. Фельдман // Актуальные вопр. этиологии, патогенеза и диагностики неоплазий с.-х. животных. - 1984. - С. 40-45.
53. Меньшикова З.Н. Сравнительная ультраструктурная цитопатология лимфоцитов крови и лимфы крупного рогатого скота при хроническом лимфолейкозе и злокачественных лимфомах / З.Н. Меньшикова, Л.В. Фельдман // Пробл. патоморфол. диагностики болезней в пром. животноводстве. - 1987. - С. 315-318.
54. Меньшикова З.Н. Морфология лимфоидных клеток при спонтанном и экспериментальном гемобластозах крупного рогатого скота (электронно-

микроскопические исследования): Дис. в виде науч. докл. ... д-ра вет. наук / Моск. гос. акад. вет. медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина. - Москва, 1999. - 58 с.

55. Михалева Е.А. Оптимизация условий продукции антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота в перевиваемой культуре клеток / Е.А. Михалева, М.А. Завальный // Докл. ВАСХНИЛ. – 1986. – Т. 8. – С. 29-31.
56. Михалева Е.А. Сравнительная характеристика различных лабораторных систем культивирования вируса лейкоза крупного рогатого скота: Дис. ... канд. вет. наук / Е.А. Михалева; ВИЭВ. – Москва, 1987. – 183с.
57. Морз С.А. Быстрый молекулярный анализ для диагностики инфекционных заболеваний / С.А. Морз // Молекулярная медицина. – 2005. - № 3. – С. 51.
58. Морфологическая характеристика и иммунологические свойства онкорнавируса типа С крупного рогатого скота / Г.А. Надточей, А.Ф. Валихова, Л.Г. Бурба, В.А. Горбатов // Доклады ВАСХНИЛ. – 1976. – Т. 5. – С. 31-33.
59. Некоторые закономерности распространения онкорнавирусной инфекции в стаде симментальского скота / В.А. Крикун, В.А. Бусол, Б.З. Иткин, С.Г. Гридина // Сб. науч. трудов МВА. – 1980. – Т. 116. – С. 29-32.
60. Орлянкин Б.Г. Классификация и номенклатура РНК-содержащих вирусов позвоночных (обзор) / Б.Г. Орлянкин // Сельскохозяйственная биология. – 1996. - №2. - С. 3-24.
61. Парфанович М.И. О результатах вирусологических исследований овец, экспериментально зараженных ретровирусом лейкоза крупного рогатого

скота, на ранних стадиях развития ретровирусной инфекции (предварительное сообщение) / М.И. Парфанович, В.М. Лемеш, А.Г. Коломыец // Теорет. и практ. вопр. вет.: Матер. Республ. науч.-техн. конф. по воспроизводству КРС. - Тарту, 1979. - С. 53-59.

62. Промышленный метод изготовления антигена вируса лейкоза КРС для выявления в реакции иммунодиффузии антител к вирусным белкам р24 и гр51 / А.Ф. Валихов, А.А. Сорокина, Н.С. Шевырев, В.М. Безгин, В.Е. Козлов, Н.В. Киселев, Л.И. Рыбникова // Науч. основы технологии пром. пр-ва вет. биол. препаратов. - Щелково, 1996. - С. 46.
63. Прохватилова Л.Б. Разработка методов диагностики лейкоза крупного рогатого скота с использованием синтетических пептидов и олигонуклеотидов: Дис. канд. биол. наук. - Владимир, 1998. - 150 с.
64. Прохватилова Л.Б. Разработка метода выявления вируса лейкоза КРС с помощью полимеразной цепной реакции / Л.Б. Прохватилова, С.Н. Колосов, А.И. Ломакин // Акт. пробл. биотехнол. в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии: Мат. науч. конф.- М., 1996. - С. 66-67.
65. Прохватилова Л.Б. Подготовка проб для выявления вируса лейкоза КРС методом ПЦР / Л.Б. Прохватилова, С.Н. Колосов, А.И. Ломакин // Акт. пробл. биотехнол. в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии: Мат. науч. конф. - М., 1996. - С. 67.
66. Прохватилова Л.Б. Применение метода "гнездовой" ПЦР для диагностики лейкоза КРС / Л.Б. Прохватилова, Т.Б. Манин, С.Н. Колосов // Проб. инфек. патол. с.-х. ж-ных: Тез. докл. конф., посвящ. 100-летию открытия вируса ящура. - Владимир. - 1997. - С. 83-84.

67. Применение методов молекулярной диагностики для выявления и идентификации лимфотропного гаммагерпесвируса крупного рогатого скота – кофактора энзоотического лейкоза / А.В. Пчельников, С.В. Алексеенкова, М.И. Гулюкин, Т.В. Степанова, К.П. Юров // Молекулярная диагностика 2014: материалы 8-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – 2014. – Т. 2. – С. 497-498.
68. Салимов Х.С. Патоморфологические изменения при экспериментальном лейкозе овец, зараженных пассированным вирусом лейкоза / Х.С. Салимов // Труды УзНИВИ. - Ташкент, 1985. - Т. 38. - С. 58-63.
69. Симонян Г.А. Цитоморфология крови и кроветворных органов в норме и патологии / Г.А. Симонян // Проблемы патоморфологической диагностики болезней в промышленном животноводстве. – 1987. – С. 309-311.
70. Симонян Г.А. Клинико-гематологическая и цитоморфологическая характеристика различных форм лейкозов и их диагностика // В кн.: Лейкозы и злокачественные опухоли животных: под ред. В.П. Шишкова, Л.Г. Бурбы. - М.: Агропромиздат, 1988. - С. 154-173.
71. Симонян Г.А. Ветеринарная гематология / Г.А. Симонян, Ф.Ф. Хисамутдинов // М. – Колос. – 1995. – 254 с.
72. Симонян Г.А. Степень заболеваемости лейкозом и инфицированности ВЛ КРС поголовья скота в неблагополучных хозяйствах // Актуальные вопросы диагностики, профилактики и борьбы с лейкозами с.-х. ж-ных: Матер. Всерос. конф. - Екатеринбург, 2000. - С. 36-44.

- 73.Смирнов Ю.П. Эффективность различных методов оздоровления крупного рогатого скота от лейкоза / Вестн. РАСХН, 1999. - № 2. - С. 69-71.
- 74.Совершенствование ПЦР диагностики инфекции, индуцируемой вирусом лейкоза крупного рогатого скота / Н.Г. Козырева, М.И. Гулюкин, Л.А. Иванова, А.И. Клименко // Научное обеспечение инновационного развития отечественного животноводства: Мат. Всерос. научно-практ. конф. – Новочеркасск, 2011. – С. 3-11.
- 75.Сравнение нескольких методов выявления антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота / Н.Ф. Гриненко, Л.А. Тарасишин, А.Ф. Валихов [и др.] // Вопр. вирусол. - 1980. - №3. - С. 281-284.
- 76.Таксономия ретровирусов и характеристика вируса лейкоза крупного рогатого скота / Б.Г. Орлянкин, М.И. Гулюкин, Н.В. Замараева, К.Ю. Кунаков // Труды ВИЭВ. - 1999. - Т.72. - С. 16-21.
- 77.Шишков В.П. Иммуноферментный метод определения антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота / В.П. Шишков, Л.Г. Бурба, Л.А. Иванова // Бюл. ВИЭВ. - 1985.- Т.58.- С. 23-25.
- 78.Шишков В.П. Этиология лейкозов: вирус лейкоза крупного рогатого скота как этиологический агент лейкоза / В.П. Шишков, Л.Г. Бурба, А.Ф. Валихов //В кн.: Лейкозы и злокачественные опухоли ж-ных. - М., 1988. - С. 37-53.
- 79.Шишков В.П. Иммунология лейкозов / В.П. Шишков, А.Ф. Валихов // Лейкозы и злокачественные опухоли животных. - М., 1988. - С. 78-95.
- 80.Шишков В.П. Серологические методы выявления животных, инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота / В.П. Шишков,

А.Ф. Валихов // Лейкозы и злокачественные опухоли животных. - М., 1988. - С. 173-194.

81. Шишков В.П. Использование микроносителей для получения антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота / В.П. Шишков, Е.А. Михалева, М.А. Завальный // Вестн. с.-х. науки. - 1986. - № 1. - С. 118-121.
82. Штамм перевиваемых клеток легкого эмбриона крупного рогатого скота – продуцент вируса лейкоза крупного рогатого скота / М.И. Гулюкин, Н.В. Замараева, Л.П. Дьяконов, Л.В. Лобунцова, А.В. Васин, Л.А. Иванова, В.П. Шишков, Л.Г. Бурба // Патент № 1778185. – 1992.
83. Экспериментальное воспроизведение лимфолейкоза на телятах / М.И. Гулюкин, Л.Г. Бурба, Л.А. Иванова, А.В. Васин, Е.В. Кузнецова // Ветеринария. – 1987. - № 2. – С. 22-28.
84. Экспериментальное заражение кроликов вирусом лейкоза крупного рогатого скота / М.И. Гулюкин, Л.А. Иванова, Е.А. Шишкина [и др.] // Ветеринария. – 2008. – № 11. – С. 23-27.
85. Экспериментальные исследования по выявлению онкорнавируса в сперме быков-производителей / В.П. Шишков, Л.Г. Бурба, А.Ф. Валихов, М.И. Гулюкин, П.Е. Кожин, Е.Ф. Бражин, А.А. Манько. // Сб. Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии. - Казань, 1980. - С. 5.
86. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle / P.M. Eaves, J.B. Molloy, C.K. Demmock, L.E. Eaves // Vet. Microbiol. - 1994. - V. 39. - P. 313-321.

87. A simple rapid syncytial-inhibition test for antibodies to bovine leukemia virus / A.S. Greig, S. Chander, B. Samagh, A.M.P. Bouillant // *Can. J. Comp. Med.* – 1978. – Vol. 42(4). – P. 446-451.
88. Agresti A. Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth / A. Agresti, W. Ponti, M. Rocchi // *Am. J. Vet. Res.* - 1993. - V.54, № 3. - P.373-378.
89. Alexandersen S. Identification of alternatively spliced mRNAs encoding potential new regulatory proteins in cattle infected with bovine leukemia virus / S. Alexandersen, S. Carpenter, J. Christensen // *J. Virol.* - 1993. - V.67. - P.39-52.
90. Altaner C. A simple and inexpensive method for detection of BLV infected cattle based on a modified ELISA principle / C. Altaner, V. Zajac, J. Ban // *Zbl. Vet. Med. B.* - 1982. - Bd. 29, №8. - P. 583-590.
91. Altaner C. Isolation and characterization of cell clones producing various amounts of bovine leukosis virus / C. Altaner, J. Ban, V. Zajac // *Folia Biol.* – 1985. - V. 31, № 2. - P. 107-114.
92. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine leukaemia virus p24 antibody in cattle / J.B. Molloy, P.J. Walker, F.C. Baldock, B.J. Rodwell, J.A. Cowley // *Journal of Virology Methods.* – 1990. – Vol. 28. – P. 47-57.
93. Ballagi-Pordany A. Direct detection of bovine leukemia virus infection: practical applicability of a double polymerase chain reaction / A. Ballagi-Pordany, K. Klintevall, M. Merza // *J. Vet. Med. B.* - 1992. - V.39. - P. 69-77.
94. Baltimore D. RNA-dependent DNA-polymerase in virions of RNA-tumour viruses/ D. Baltimore // *Nature.* - 1970. - Vol.226. - P. 1209-1211.

95. Belak S. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology / S. Belak, A. Ballagi-Pordany // *Vet. Res. Comm.* - 1993. - V. 17. - P. 55-72.
96. Biochemical and immunological characterization of the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein (gp51) produced in *Saccharomyces cerevisiae* / Legrain M., Portetelle D., Dumont J., Burny A., Hilger F. // *Gene.* - 1989. - №79. - P.227-237.
97. Biochemical studies on enzootic and sporadic types of bovine leucosis / A. Burny, F. Bex, C. Bruck, Y. Cleuter, D. Dekegel, J. Ghysdael // In: *Antiviral mechanisms in the control of neoplasia* (P. Chandre, ed.). - 1978. - P. 83-99.
98. Blankenstein P. A nucleotide deletion causing a translational stop in the protease reading frame of bovine leukaemia virus (BLV) results in modified protein expression and loss of infectivity / P. Blankenstein, A. Bondzio, H. Fechner // *J. Vet. Med. B.* - 2000. - V. 47, № 5. - P. 361-371.
99. Bloch B. The possible utilization of nuclear pockets of lymphocytes in the diagnosis of enzootic bovine leucosis / B. Bloch, H.J. Bendixen, E. Lund // *Acta Pathol Microbiol Scand A.* - 1975. - № 83(5). - P. 511.
100. Bouillant A.M.P. Le virus de l'immunodeficiency bovine: breve revue / A.M.P. Bouillant, D. Archambault // *Ann. Rech. Vet.* - 1990. - N 21. - P. 239-250.
101. Bovine leukaemia proviral DNA detection in cattle using the polymerase chain reaction / H.M. Naif, R.B. Brandon, R.C.W. Daniel, M.F. Lavin // *Vet. Microbiol.* - 1990. -V. 25. - P. 117-129.
102. Bovine leukemia virus-induced clinical signs and morphological changes of encephalitozoonosis in rabbits / M. Levkut, F. Lesník, P. Bálent, V. Zajac, P. Korim, K. Sláviková // *Folia Parasitol. (Praha).* - 1997. - № 44(4). - P. 249-254.

103. Bovine leukemia virus-related antigens in lymphocyte cultures infected with AIDS-associated viruses / L. Thiry, S. Sprecher-Goldberger, P. Jacquemin, J. Cogniaux, A. Burny, C. Bruck, D. Portetelle, S. Cran, N. Clumeck // *Science*. - 1985. - Vol.227. - P. 1482-1483.
104. Bovine leukemia virus, a versatile agent with various pathogenic effects in various animal species / A. Burny, C. Bruck, Y. Cleuter, D. Couez, J. Deschamps, J. Ghysdael, D. Gmgoire, R. Kettmann, M. Mammerickx, G. Marbaix // *Cancer Res*. - 1985. - Vol.45, 9 Suppl. - P. 4578-4582.
105. Bovine leukemia virus matrix-associated protein MA(p15): further processing and formation of a specific complex with the dimer of the 5'-terminal genomic RNA fragment / I. Katoh, H. Kyushiki, Y. Sakamoto, Y. Ikawa, Y. Yoshinaka // *J. Virol*. - 1991. - Vol. 65. - P. 6845-6855.
106. Bovine leukaemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves / K. Klintevall, A. Ballagi-Pordany, K. Naslund, S. Belak // *Vet. Microbiol*. - 1994. - V. 42. - P.191-204.
107. «Bovine Viral Diarrhoea». In: *Manual of Diagnostic tests and vaccines for Terrestrial animals, Seventh Edition*. – 2012. – P. 690-703.
108. Brandon R.B. Observation on blood leucocytes and lymphocyte subsets in sheep infected with bovine leukaemia virus: a progressive study / R.B. Brandon, M.N. Gatei, H.M. Naif // *Vet. Immunol. Immunopathol*. - 1989. - V.23. - P.15-27.
109. Bruck C. Biologically active epitopes of bovine leukemia virus glycoprotein gp51: Their dependence on protein glycosylation and genetic variability / C. Bruck, N. Renonnet, D. Portetelle // *Virology*. - 1984. - V. 136. - P. 20-31.

110. Burny A. Bovine leukemia virus: Molecular biology and epidemiology / A. Burny, C. Bruck, H. Chantrenne // New-York: Raven press. - 1980. – P. 187-193.
111. Burny A. Bovine leukaemia: Facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer / A. Burny, G. Cleuter, R. Kettman // Vet. Microbiol. -1988. - V. 17. - P. 197-218.
112. BurrIDGE M.J. The zoonotic potential of bovine leukemia virus. / M.J. BurrIDGE // Vet. Res. Commun. – 1981. – V. 5. – P. 117-126.
113. BurrIDGE M.J. An overview of modes of transmission of bovine leukemia virus / M.J. BurrIDGE, M.C. Thurmond // Proc. 85th Ann. Meet. US. Anim. Hlth. Ass. - 1981. - P. 165-169.
114. Calafat J. Structure of C-type virus particles in lymphocyte cultures of bovine origin / J. Calafat, P.O. Hageman, A.A. Rensang // J. Natl. Cancer Inst. – 1974. – V. 52. – P. 1251-1257.
115. Clarke M.C. Isolation of cytopathic and non- cytopathic bovine viral diarrhoea virus from tissues of infected animals / M.C. Clarke, J. Brownlie, C.J. Howard // In: Pestivirus infection of Ruminants (J.W. Harkness, ed). Commission of the European Communities, Brussels, Belgium, EU 10238. – 1987. – P. 3-10.
116. Comparison of the copy numbers of bovine leukemia virus in the lymph nodes of cattle with enzootic bovine leukosis and cattle with latent infection / Y. Somura, E. Sugiyama, H. Fujikawa, K. Murakami // Arch. Virol. – 2014. - №159(10). – P. 2693-2697.
117. Cornefert-Jensen F. Studies on bovine lymphosarcoma: formation of syncytia and detection of virus particles in mixed-cell culture / F. Cornefert-Jensen, W.C.D. Hare, N.D. Stock // Int. J. Cancer. – 1969. – Vol. 4. – P. 507-519.

118. Cornefert-Jensen F. Detection of a bovine virus associated with syncytial formation in mixed cell cultures / F. Cornefert-Jensen, N.D. Stock, R.R. Marshak // *Bibl. Haematol.* – 1969. – Vol. 36. – P. 453-464.
119. Coulston J. Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison with other isolates / J. Coulston, H. Naif, R. Brandon // *J. Gen. Virol.* - 1990. - V. 71, № 8. - P. 1737-1746.
120. Cowley J.A. Infectivity of bovine leukaemia virus infected cattle: An ELISA for detecting antigens expressed in vitro cultured lymphocytes / J.A. Cowley, J.B. Molloy, C.N. Dimmock // *Vet. Microbiol.* - 1992. - V. 30. - P. 137-150.
121. Demirhan I. Characterization of the RNA dependent DNA polymerase of bovine leukemia virus / I. Demirhan, V. Altanerova, A. Chandra // *Anticancer. Res.* - 1996. - V. 16. - P. 2501-2505.
122. Demonstration of C-type virus and nuclear projections in lymphocyte cultures of bovine leukemia / C. Olson, J.M. Miller, L.D. Miller, K.G. Gillette // *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* – 1970. - № 77(13). – P. 297-299.
123. Depelchin A. Bovine leukemia virus (BLV)-infected B-cells express a marker similar to the CDS T-cell marker / A. Depelchin, J.J. Letesson, N. Lostric Trussart // *Immunol. Lett.* - 1989. - V. 20. - P. 69-76.
124. Derse D. Bovine leukemia virus transcription is controlled by a virus encoded trans-acting response elements / D. Derse // *J. Virol.* - 1987. - V. 61. - P. 2462-2471.

125. Derse D. Construction of a recombinant bovine leukemia virus vector for analysis of virus infectivity / D. Derse, L. Martarano // *J. Virol.* - 1990. - V. 64. - P. 401-405.
126. Detection by immunodiffusion- and radioimmunoassay-test of antibodies to bovine leukemia virus antigens in sera of experimentally infected sheep and cattle / M. Mammerickx, D. Portetelle, A. Burny, J. Leunen // *Zbl. Vet. Med. B.* - 1980. - Bd. 27. - P. 291-303.
127. Detection of pseudorabies virus DNA sequences by the polymerase chain reaction / S. Belak, A. Ballagi-Pordany, J. Flensburg, A. Virtanen // *Arch. Virol.* - 1989. - V. 108. - P. 279-286.
128. Diglio C.A. Induction of syncytia by the bovine C-type leukemia virus / C.A. Diglio, J.F. Ferrer // *Cancer Res.* - 1976. - V. 36. - P. 1056-1067.
129. Diglio C.A. An improved syncytia infectivity assay for the bovine leukemia virus / C.A. Diglio, C.E. Piper, J.F. Ferrer // *In Vitro.* - 1978. - V. 14. - P. 502-505.
130. Driscoll D.M. Inhibition of bovine leukemia virus release by antiviral antibodies / D.M. Driscoll, M. Onuma, C. Olson // *Arch. Virol.* - 1977. - V. 55. - P. 139-144.
131. Dutcher R.M. Virus-like particles in cows milk from a herd with a high incidence of lymphosarcoma / R.M. Dutcher, E.P. Larkin, R.R. Marshak // *J. Natl. Cancer Inst.* - 1964. - Vol. 33. - P. 1055-1064.
132. Dynamics of perinatal bovine leukemia virus infection / G. Gutiérrez, I. Alvarez, R. Merlini, F. Rondelli, K. Trono // *Vet. Res.* - 2014. - Apr. 4. - №10. - P. 82.

133. Early detection of bovine leukemia virus by using an enzyme-linked assay for polymerase chain reaction - amplified proviral DNA in experimentally infected cattle / H.M. Naif, R.C.W. Daniel, W.G. Cogle, M.F. Lavin // *J. Clin. Microbiol.* - 1992. - V. 30. - P. 675-679.
134. Early detection of bovine leukosis virus DNA in infected sheep using the polymerase chain reaction / R.B. Brandon, N. Naif, R.C.W. Daniel, M.F. Lavin // *Res. Vet. Sci.* - 1991. - V. 50. - P. 89-94.
135. Early diagnosis of virus induced bovine leukosis in milk by a simple modified ELISA test / J. Ban, V. Zajac, C. Altaner, L. Cerny // *Zbl. Vet. Med. B.* - 1982. - V. 29, №8. - P. 591-595.
136. Early polykaryocytosis inhibition: a simple quantitative in vitro assay for the detection of bovine leukemia virus infection in cattle / B. Guillemain, R. Mamoun, D. Levy, J. Astier, K. Irgens, A.L. Parodi // *Europ. J. Cancer.* – 1978. - № 14. – P. 811-827.
137. Early syncytia formation induced by bovine leukemia virus producing cell in mixed cultures / K. Irgens, C. Pinelli, B. Guillemain, D. Levy, A.L. Parody // In: *Bovine Leucosis: Various Methods of Molecular Virology* (A. Burny ed.). – 1977. – P. 311-322.
138. Envelope glycoprotein gp51 of bovine leukaemia virus is differently glycosylated in cells of various species and organ origin / C. Altaner, M. Merza, V. Altanerova, B. Morein // *Immunol. Immunopatol.* - 1993. - V. 36. - P. 163-177.
139. «Enzootic bovine leukosis». In: *Manual of Diagnostic tests and vaccines for Terrestrial animals, Seventh Edition.* – 2012. – P. 721-731.

140. Episodic occurrence of antibodies against the bovine leukemia virus rex protein during the course of infection in sheep / M.A. Powers, D. Grossman, L.C. Kidd, K. Radke // *J. Virol.* - 1991. - V. 65. - P. 4959-4965.
141. Equine herpesvirus type 1: detection of viral DNA sequences in aborted fetuses with the polymerase chain reaction / A. Ballagi-Pordany, B. Klindeborn, J. Flensburg, S. Belak // *Vet. Microbiol.* - 1990. - V. 22. - P. 373-381.
142. Establishment of a new bovine leukosis virus producing cell line / D. Beier, R. Riebe, P. Blankenstein, E. Starick, A. Bondzio, O. Marquardt // *J. Virol. Methods.* – 2004. – Nov. 121(2). – P. 239-46.
143. Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukaemia virus / H. Mekata, S. Sekiguchi, S. Konnai, Y. Kirino, K. Honkawa, N. Nonaka, Y. Horii, J. Norimine // *Vet. Rec.* – 2014. URL: <http://veterinaryrecord.bmj.com/content/early/2014/12/15/vr.102464.long>
144. Evaluation of virus excretion by cells persistently infected with the bovine leukaemia virus (BLV) using monoclonal antibodies / L. Llames, J. Goyache, A. Domenech, A. Arjona, G. Suarez, E. Gomez-Lucia // *J. Clin. Virol.* – 2001. - № 22(1). - P. 31-39.
145. Evidence for bovine leukaemia virus infection of peripheral blood monocytes and limited antigen expression in bovine lymphoid tissue / J.L. Heeney, P.J. Vally, P.M. Jacobs, V.E. Vally // *Lab. Invest.* - 1992. – V. 66. - P. 608-617.
146. Experimental infection of calves with bovine leukemia virus (BLV): an applicable model of a retroviral infection / H. Ungar-Waron, R. Paz, J. Brenner, B. Yakobson // *Vet. Immunol. Immunopathol.* - 1999 - V. 67, № 2 - P. 195-201.

147. Experimental infection of sheep with bovine leukemia virus: Infectivity of blood, nasal and saliva secretions / M.N. Gatei, M.W. McLennan, M.F. Lavin, R.C.W. Daniel // *J. Vet. Med. B.* - 1989. - V. 36. - P. 652-660.
148. Expression of bovine leukemia virus Env glycoprotein in insect cells by recombinant baculovirus / S. Russo, L. Montermini, R. Berkovitz-Siman-Tov, W. Ponti, G. Poli // *FEBS Lett.* – 1998. – №436. – P. 11–16.
149. Expression of bovine leukemia virus envelope gene by recombinant vaccinia virus / S. Kumar, M.E. Andrew, D.B. Boyle, R.B. Brandon, M.F. Lavin, R.C. W. Daniel // *Virus Res.* – 1990. – №17. – P. 131–142.
150. Fechner H. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle / H. Fechner, A. Kurg, L. Geue // *Zbl. Vet. Med. B.* - 1996 - Bd. 43, №10. - P. 621-630.
151. Fechner H. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle / H. Fechner, P. Blankenstein, A. Looman // *Virology.* - 1997. - V. 237, № 2. - P. 261-269.
152. Ferrer J.P. Detection of replicating type C virus in continuous cell cultures established from cows with leukemia: effect of the culture medium / J.P. Ferrer, N.D. Stock, P.S. Zin // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1971. - V. 47. - P. 613-621.
153. Ferrer J.F. Development of new methods for the diagnosis of BLV infection / J.F. Ferrer, V. Baliga, C. Diglio // *Vet. Microbiol.* - 1976. - № 1. - P. 9-18.
154. Ferrer J.F. Bovine lymphosarcoma / J.F. Ferrer // *Adv. Vet. Sci. and Comp. Med.* – 1980. - № 24. – P. 1-68.

155. Ferrer J.F. Bovine leukemia: a model for viral carcinogenesis / J.F. Ferrer, C. Cabradilla, P. Gupta // Cold. Spring. Harbor. Symp. – 1980. – P. 887-889.
156. Ferrer J.F. Use of a feline cell line in the syncytia infectivity assay for the detection of bovine leukemia virus infection / J.F. Ferrer, C. Cabradilla, P. Gupta // Amer. J. Vet. Res. – 1981. – Vol. 42(1). – P. 9-14.
157. Florent G. Detection of antibodies to bovine leukemia virus in bovine milk samples with an ELISA involving two monoclonal antibodies / G. Florent, J.C. Delgoffe, N. Zygraich // Vet. Microbiol. - 1988. - V. 18, № 1. - P. 89-93.
158. Fossum C. Detection of B- and T-cells, with lectins or antibodies, in healthy and bovine leukemia virus-infected cattle / C. Fossum, A. Burny, D. Portetelle // Vet. Immunol. Immunopathol. - 1988. - V. 18. - P. 269-278.
159. Gatei M.H. Serum immunoglobulin concentrations in cattle naturally infected with bovine leukemia virus / M.H. Gatei, M.F. Lavin, R.C.W. Daniel // J. Vet. Med. B. - 1990. - V. 37. - P. 575-586.
160. Garvey K. Nucleotide sequence and genome organization of biologically active proviruses of the bovine immunodeficiency-like virus / K. Garvey, M.S. Oberste, J.E. Elser // Virology. - 1990. - V. 175. - P. 391-409.
161. Gaudi S. Detection of bovine leukaemia virus (BLV) infection by DNA probe technology / S. Gaudi, W. Ponti, A. Agresti // Moll, and Cell. Probes.- 1990.- V.4, № 3.-P. 163-174.
162. Gilden R. Characteristics of the major internal protein and RNA-dependent DNA polymerase of bovine leukemia virus / R. Gilden, C. Long, M. Hanson // J. Gen. Virol. - 1975. - V. 29, № 3. - P. 305-314.

163. Granzow H. Electron microscopic investigation on the fine structure of the virus of enzootic bovine leucosis (BLV) / H. Granzow, P. Solisch, W. Wittmann // Arch. Geschwulstforsch. – 1985. - Bd. 55, № 3. - P. 153-159.
164. Graves D.C. In vitro transmission and propagation of the bovine leukemia virus in monolayer cell cultures / D.C. Graves, J.F. Ferrer // Cancer. Res. – 1976. - № 36. – P. 4152-4159.
165. Guillemain B. Large scale production and concentration of bovine C-type virus / B. Guillemain, J. Levy, T. Lasneret // Vet. Microbiol. - 1976. - V. 1, № 2/3. - P. 185-192.
166. Haas L. Bovine leukaemia virus gene expression in vivo / L. Haas, T. Diverse, J.W. Casey // J. Virol. - 1992. - V. 66. - P. 6223-6225.
167. Heeney J.L. Alterations in humoral immune response to bovine leukaemia virus antigens in cattle with lymphoma / J.L. Heeney, V.E. Vally, J. Montesanti // J. Gen. Virol. - 1988. - V. 69. - P. 659-666.
168. Heeney J.L. Transformed phenotype of enzootic bovine lymphoma reflects differentiation linked leukemogenesis / J.L. Heeney, V.E. Vally // Lab. Invest. - 1990. - V. 62. - P. 339-346.
169. Houwers D.J. LAV/HTLV-111 gag gene product p24 shares antigenic determinant with ELAV, but not with visna virus or CAEV / D.J. Houwers, J. Goudsmit, I.M. Nauta // J. Cell Biochem. – 1986. – Suppl.10. – P. 189.
170. In vitro infection of cells of the monocytic macrophage lineage with bovine leukaemia virus / A. Domenech, J. Goyache, L. Llames, M. Jesus Paya, G. Suarez, E. Gomez-Lucia // Journal of General Virology. – 2000. – V. 81. – P. 109–118.

171. Induction of transformed phenotypes in sheep fibroblasts by culture fluids from cells persistently infected with bovine leukemia virus / M. Onuma, S. Watarai, M. Suneya, T. Mikami, H. Izawa // *Microbiol. Immunol.* – 1981. – Vol. 25(5). – P. 445-454.
172. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [Electronic resource]. - Committee of the Virology Division of the International Union of Microbiology Societies (IUMS), 2005 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>
173. Jensen W.A. In vitro expression of bovine leukaemia virus in isolated B-lymphocytes of cattle and sheep / W.A. Jensen, S.E. Sheehy, M.H. Fox // *Vet. Immunol. Immunopathol.* - 1990. - V. 26. - P. 333-342.
174. Johnson R. Bovine leukemia virus. Zoonotic potential molecular epidemiology, and an animal model / R. Johnson, J.B. Kaneene // Continuing education article No 8. *The Compendium, North American Edition. Food animal.* - 1991. - V. 13, № 10. - P. 1631-1639.
175. Johnson R. Bovine leukemia virus. Descriptive epidemiology, clinical manifestation, and diagnostic tests / R. Johnson, J.B. Kaneene // Continuing education article No 12. *The Compendium, North American Edition. Food animal.* - 1991. - V. 13, № 2. - P. 315-327.
176. 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. - V.74, №6. - P. 2930-2935.
177. Kaaden O.R. Isolation of a p15 polypeptide from bovine leukemia virus and detection of specific antibodies in leukemic cattle/ O.R. Kaaden, B. Frenzel, B. Dietzchold // *J.Virol.* - 1977. - Vol.77. - P.501-509.

178. Kabeya H. Characterization of immune responses caused by bovine leukemia virus envelope peptides in sheep / H. Kabeya, K. Ohashi, C. Sugimoto // *J. Vet. Med. Sci.* - 1999. - V. 61, №5. - P. 475-480.
179. Katoh I. Retroviruses protease characterized as a dimeric aspartic proteinase / I. Katoh, Y. Yoshinaka, Y. Ikawa // *J. Virol.* - 1989. - V. 63. - P. 2226-2232.
180. Kelly E.J. Early detection of bovine leukemia virus in cattle by use of the polymerase chain reaction / E.J. Kelly, M.K. Jackson, Y. Marsolais // *Am. J. of Vet. Res.* - 1993. - V.54, № 2. - P. 205-209.
181. Kerkhofs P. Long-term protection against bovine leukaemia virus replication in cattle and sheep / P. Kerkhofs, J.S. Gatot, K. Knapen // *J. Gen. Virol.* - 2000. -V.81.-P.957-963.
182. Kettmann R. Bovine leukemia virus: An exogenous RNA oncogenic virus / R. Kettmann, D.Portetelle, M. Mammerickx // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1976. - V. 73. - P. 1014-1018.
183. Kettman R. Integration of bovine leukemia virus DNA in the bovine genome / R. Kettman, M. Meunier-Rotival, J. Cortadas // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1979. -V. 76, № 10. - P. 4827-4826.
184. Kettmann R. Chromosome integration domain for bovine leukemia provirus in tumors / R. Kettmann, J. Deschamps, J. Clautriaux // *J. Virology.* - 1983. - V. 47. - P. 146-150.
185. Kittelberger R. Detection of antibodies against the core protein p24 of the bovine leukaemia virus in cattle for confirmatory serological testing / R. Kittelberger, M.P. Reichel, R.M. Meynell // *J. Virol. Methods.* - 1999. - V.77, №1. - P. 109-114.

186. Klintevall K. Bovine leukaemia Virus: Course of infection and means of detection: Dissertation. - Uppsala, 1995.-P.57
187. Klintevall K. Differentiation between enzootic and sporadic bovine leucosis by use of serological and virological methods / K. Klintevall, A. Berg, G. Svedlund // *Vet. Rec.* - 1993. - V. 133. - P. 272.
188. Klintevall K. Evaluation an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukemia virus in milk and serum / K. Klintevall, K. Naslund, G. Svedlund // *J. Virol. Methods.* - 1991. - V. 33. - P. 319-333.
189. La leucémie bovine: système modèle de leucémogénisation par un retrovirus / A. Burny, Y. Cleuter, C. Dandoy, R. Kettmann, M. Mammerickx, G. Marbaix, D. Portetelle, A. Van Den Broeke, L. Willems // *Ann. Med. Vet.* - 1986. - Vol. 130. - P.287-294.
190. Lairmore M.D. Animal models of bovine leukemia virus and human T-lymphotrophic virus type-1: insights in transmission and pathogenesis / M.D. Lairmore // *Annu. Rev. Anim. Biosci.* – 2014. – № 2. – P. 189-208.
191. Letesson J.J. FACS analysis of bovine leukemia virus (BLV)-infected cell lines with monoclonal antibodies (mAbs) to B cells and to monocytes/macrophages / J.J. Letesson, A. Van der Broecke, Y. Morbaix-Cleuter // *Vet. Immunol. and Immunopathol.* - 1991. -V. 27. - P. 207-213.
192. Mamoun R.Z. Establishment and propagation of a bovine leukemia virus-producing cell-line derived from the leukocytes of a leukemic cow / R.Z. Mamoun, T. Astier, B. Guillemain // *J. Gen. Virol.* – 1981. - V. 54. - P. 357-365.

193. Mamoun R.Z. Bovine lymphosarcoma: processing of bovine leukemia virus-coded proteins / R.Z. Mamoun, T. Astier, B. Guillemain // *J. Gen. Virol.* – 1983. - V. 64, № 12. - P. 2791-2795.
194. Mamoun R.Z. Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins / R.Z. Mamoun, M. Morisson, N. Rebeyratte // *J. Virol.* - 1990. - V. 64. - P. 4180-4188.
195. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis / Y. Da, R. D. Shanks, J. A. Stewart, H. A. Lewin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1993. - Vol. 90. - P. 6538-6541.
196. Miller J.M. Infectivity tests of secretion and excretions from cattle infected with bovine leukemia virus / J.M. Miller, M.J. Van der Maaten // *J. Natl. Cancer Inst.* - 1979. - Vol.62. - P. 425-428.
197. Miller J.M. Comparison of four serologic tests for the detection of antibodies to bovine leukemia virus / J.M. Miller, J.F. Schmerr, M.J. Van der Maaten // *Am. J. of Vet. Res.* - 1981. - V. 42, №1. - P. 5-8.
198. Miller L.D. Blood from bovine leukemia virus-infected cattle: antigen production correlated with infectivity / L.D. Miller, J.M. Miller, M.J. Van der Maaten // *Am. J. Vet. Res.* – 1985. - V. 46, № 4. - P. 808-810.
199. Motton D.D. Bovine leukemia virus alters growth properties and casein synthesis in mammary epithelial cells / D.D. Motton, G.C. Buehring // *J. Dairy Sci.* - 2003. - Vol.86. - P. 2826-2838.
200. Murtaugh M.P. Detection of bovine leukemia virus in cattle by the polymerase chain reaction / M.P. Murtaugh, G.F. Lin, D.L. Haggard // *J. Virol. Meth.*-1991. - V.33, №1,2.-P. 73-85.

201. National Center for Biotechnology Information (NCBI). - Банк данных биомедицинской и генетической информации. - U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894, 1998.- URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
202. New ELISA test for detection of bovine leukemia virus infections in cattle, using bacterially synthesized p24 / H. Siakkou, D. Kube, H. Peters, A. Otto, R. Ulrich, S. Rosenthal // Arch. Exp. Veterinarmed. – 1990. – №44. – P. 925-930.
203. Nimer S.D. Activation of the GM-CSF promoter by HTLV-I and -II tax proteins / S.D. Nimer, J.C. Gasson, K. Hu // Oncogene.-1989.-V.4.-P.671-676.
204. Nouqayrede Ph. Enzootic bovine leukosis: preparation of an antigen for the agar gel immunodiffusion test and statistical comparison with other antigens / Ph. Nouqayrede, J. Pellen, C. Quentel // Vet. Microbiol. – 1981. - V. 6. - P. 247-257.
205. Olson C. Role of C-type virus in bovine lymphosarcoma / C. Olson, J.M. Miller, L.D. Miller // Bibl. Haematol. - 1973. - Vol. 39. - P. 198-205.
206. Onuma M. Bovine leukemia virus antigen in bovine lymphosarcoma cell cultures / M. Onuma, C. Olson // In: Bovine Leukosis: Various methods of Molecular Virology (Ed. A.Burny), Luxembourg: Commission of the European Communities. – 1977. - P. 95-118.
207. Phillips M. Isolation of a precipitation glycoprotein antigen from cell cultures persistently infected with bovine leukemia virus / M. Phillips, J.M. Miller, M.J. Van der Maaten // J. Natl. Cancer Inst. – 1978. - V. 60, № 1. - P. 213-217.
208. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus / A. Xu, M.J. van Eijk, C. Park, H.A. Lewin // J. Immunol. - 1993. - V. 151. - P. 6977-6985.

209. Pomier C. Early and transient reverse transcription during primary deltaretroviral infection of sheep / C. Pomier, M.T. Alcaraz, C. Debacq, A. Lantpon, P. Kerkhofs, L. Willems, E. Wattel, F. Mortreux // *J. Retrovirol.* - 2008. - Vol. 5. - 12 p.
210. Portetelle D. Bovine leucosis - recent development with use of monoclonal antibodies and ELISA tests / D. Portetelle // *Res. Adv. in Virus Diag.* - Boston, 1984. - P. 157-170.
211. Prachar J. Glycoprotein and protein composition of bovine leukemia virus (BLV) / J. Prachar, K. Hlubinova // *Neoplasma.* - 1980. - V. 27, № 6. - P. 669-674.
212. Preventive and Therapeutic Strategies for Bovine Leukemia Virus: Lessons for HTLV / S. M. Rodriguez, A. Florins, N. Gillet, A. Brogniez, M. T. Sanchez-Alcaraz, M. Boxus, F. Boulanger, G. Gutierrez, K. Trono, I. Alvarez, L. Vagnoni, L. Willems // *Viruses.* - 2011. - Vol.3 - P. 1210-1248.
213. Rapid detection of bovine leukaemia virus infection in a large cattle population with an ELISA performed on pooled sera grouped by herd / M. Mammerickx, D. Portetelle, J. Nys, A. Burny // *Zbl. Vet. Med. B.* - 1985. - Bd. 32. - P. 601-608.
214. Ressang A.A. Studies on bovine leukemia. I. Establishment of type C virus producing cell lines / A.A. Ressang, N. Mastenbrock, J. Quak // *Zbl. Vet. Med. B.* - 1974. - V. 21. - P. 602-617.
215. Rice N.R. The nucleotide sequence of the env gene and post-env region of bovine leukemia virus / N.R. Rice, R.M. Stephens, D. Cower // *Virology.* - 1984. - V. 138. - P. 82-93.

216. Robert-Guroff M. HTLV: the familie of human T lymphotropic retroviruses and their role in leukemia and AIDS / M. Robert-Guroff, R.C. Gallo // *Biochem. And Mol. Epidemiol. Cancer: Proc. Abbot Lab. – UCLA Symp. N.Y.* - 1986. – P. 293-301.
217. Rossler H. Influence of different culture conditions on BLV expression in permanently infected PLK cell lines / H. Rossler, H. Burkhardt, S. Rosental - *Folia biol. (CSSR)*. – 1985. - V. 31, № 4. - P. 273-283.
218. Sagata N. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukaemia virus: Its evolutionary relationship to other retroviruses / N. Sagata, T. Yasunaga, J. Tsuzuky-Kawamura // *Proc. Natl. Acad. Sci .* - 1985 - V. 82. - P. 677-681.
219. Scholz O. Preparation von BLV Antigenen und ihre Bewertung Sowie Eignung in einem Anti-BLV-Enzymimmunassay / O. Scholz, A. Konshake, L. Niemann // *Mh. Vet. Med.* - 1988. - Bd. 43, № 19/20. - P. 695-699.
220. Schwartz I. In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle / I. Schwartz, A. Bensaid, B. Polack // *J. Virol.* - 1994. - V. 68. - P. 4589-4596.
221. Seroprevalence and molecular evidence for the presence of bovine immunodeficiency virus in Brazilian cattle / S. Meas, F.J. Ruas, T. Usui, Y. Teraoka, A. Mulenga, K.S. Chang, A. Masuda, C.R. Madruga, K. Ohashi, M. Onuma // *Japanese Journal of Veterinary Research.* - 2002 - Vol. 50. - №1. - P. 9-16.
222. Sherman M.P. Amplification and analysis of specific DNA and RNA sequences of bovine leukemia virus from infected cows by polymerase chain reaction / M.P. Sherman, G.D. Ehrlich, J.F. Ferrer // *J. Clin. Microbiol.* - 1992. - V.30, № 1. - P. 185-191.

223. Simard C. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian food inspection agency / C. Simard, S. Richardson, P. Dixon // *Can. J. Vet. Res.* - 2000. - V. 64, № 2. - P. 101-106.
224. Specificity and mechanisms of early and late polykaryocytosis induced by different isolates of the bovine leukemia virus / B. Guillemain, R. Mamoun, T. Astier, J.F. Duplan // 5th Int. Symp. On bovine leukosis, Tubingen (O.C. Straub ed.). - 1984. - P. 117-139.
225. Stock N.D. Replicating C-type virus in phytohemagglutinin-treated buffy-coat cultures of bovine origine / N.D. Stock, J.F. Ferrer // *J. Natl. Cancer Inst.* - 1972. - V. 48. - P. 985-996.
226. Stott M.L. Integrated bovine leucosis proviral DNA in T helper and T cytotoxic/suppressor lymphocytes / M.L. Stott, M.C. Thurmond, S.J. Dunn // *J. Gen. Virol.* - 1991. - V. 72. - P. 307-315.
227. Structural components of bovine leukemia virus: further biochemical and immunological characterization of major structural proteins and glycoproteins / W. Uckert, I. Hertling, R. Kraft, H. Bossmann, H. Rossler, U. Meyer // *Virus Res.* - 1986. - № 4 (4). - P. 343-356.
228. Study on the presence of BLV infection in a dairy herd in Syria by using serological and virological tests / A. Kurdi, P. Blankenstein, O. Marquardt, D. Ebner // *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift.* - 1999. - Vol. 112. - P. 18-23.
229. T-cell proliferative response to bovine leukaemia virus (BLV): identification of T cell epitopes on the major core protein (p24) in BLV-infected cattle with normal haematological values / A. Mager, R. Masengo, M.

- Mammerickx, J. Letesson // *Journal of General Virology*. – 1994. - № 75. – P. 2223 - 2231.
230. Temin H.M. RNA-dependent DNA-polymerase in virions of Rous sarcoma virus/ H.M. Temin, S. Mizutani // *Nature*. - 1970. - Vol. 226. - P. 1211-1213.
231. Testing of the yield of BLV antigens under different conditions / F. Lesnik, O.J. Vrtiak, M. Danihel, M. Bovakova // *Folia veter. Kosice*. – 1989. – V. 33(1). – P. 47-53.
232. The gag and pol genes of bovine leukemia virus: Nucleotide sequence and analysis / N.R. Rise, R.M. Stephens, A. Burny, R.V. Gilden // *Virology*. - 1985. - V. 142. - P. 357-377.
233. The implication of BLV infection in the productivity, reproductive capacity and survival rate of a dairy cow / J. Brenner, M. Van Hamm, D. Savir, Z. Trainin // *Vet. Immunol. Immunopathol.* - 1989. - Vol.22. -P.299-305.
234. The role of ITCH protein in human T-cell leukemia virus type 1 release / B. Doribal, D. Derse, P. Lloyd, F. Soheilian, K. Nagashima, G. Heidecker // *J. Biol. Chem.* – 2011. - № 286(36). – P. 31092-104.
235. Topographical analysis of BLV gp 51 epitopes involved in viral functions / C. Bruck, D. Portetelle, A. Burny, J. Zavada // *Virology*. - 1982. - V. 122. - P. 353-362.
236. Use of monoclonal antibody in an ELISA test for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus / D. Portetelle, C. Bruck, M. Mammerickx, A. Burny // *J. Virol. Meth.* - 1983. - V. 6. - P. 19-29.

237. Valichov A.F. Studies on the morphology and on some immunological properties of bovine leukemia virus / A.F. Valichov // In: The serological diagnosis of enzootic bovine leucosis. - 1978. - P. 172-187.
238. Valikhov A.F. Virological exemenation of semen, milk and blood in BLV infected cattle / A.F. Valikhov, L.G. Burba, V.P. Shishkov // 5th Int. Symp. on. BLV. - Tubingen, 1984. – P. 178-187.
239. Van den Broeke A. Even transcriptionally competent proviruses are silent in bovine leukemia virus-induced sheep tumor cells / A. Van den Broeke, Y. Cleuter, G. Chen // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. - 1988. - V.85. - P. 9263-9267.
240. Van Der Maaten M.J. Replicating type-C virus particles in monolayer cell cultures of tissues from cattle with lymphosarcoma / M.J. Van Der Maaten, J.M. Miller, A.D. Boothe // J. Natl. Cancer Inst. – 1974. – V. 52. – P. 491-497.
241. Van Der Maaten M.J. Replication of bovine leukemia virus in monolayer cultures / M.J. Van Der Maaten, J.M. Miller // Bibl. Haematol. - 1976. – Vol. 43. – P. 255-259.
242. Van Eijk M.J. Development of persistent lymphocytosis in cattle is closely associated with BRB2 / M.J. Van Eijk, J.A. Stewart, J. Beaver // Immunogenetics. - 1992. - V. 37. - P. 64-68.
243. Virus de Leucosis Bovina: Epidemiologica en Argentina / K. Trono, D. Përer- Filgueira, S. Duffy, M. Costelli, I. Lager, S. Duffy, M. V. Borca, C. Carrillo // VI Congresso Argentino de Virologica. - 1999.- P. 235-248.
244. Virus-like particles in phytohanagglutinin, stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma / J.M. Miller, L.D. Miller, C. Olson, K.G. Gillette // J. Natl. Cancer. Inst. - 1969. - V. 43. - P. 1297-1305.

245. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of viruses. Family Retroviridae / C.M. Faquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L.A. Ball // Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Acad Press. - 2005. - P.421-440.
246. Voneche V. The 19-21 amino acid fragment of gp51 adopts an amphiphilic structure and plays a key role in the fusion events induced by bovine leukemia virus / V. Voneche, I. Callebaut, R. Kettmann // J. Biol. Chem. - 1992. - V. 267. - P. 15193-15197.
247. Voneche V. Fusogenetic segments of bovine leukemia virus and simian immunodeficiency virus are interchangeable and mediate fusion by means of oblique insertion in the lipid bilayer of their target cells / V. Voneche, D. Portetelle, R. Kettmann // Proc. Natl. Acad Sci. USA. -1992. - V. 89. - P. 3810-3814.
248. Walrand F. Incidence of bovine leukemia virus in West African cattle / F. Walrand, F. Fumoux, G. Roelants // Int. J. Cancer. - 1986. - V. 37. - P. 619-621.
249. Wang C.T. Bovine leukemia virus infection in Taiwan: evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay and agar gel immunodiffusion test / C.T. Wang // Jpn. J. Vet. Res. - 1991. - V. 39, № 2-4. - P. 107-115.
250. Weiland F. C-type particle in cultured lymphocytes from highly leukemic cattle / F. Weiland, S. Ueberschaer, O. Straub // Intervirology. - 1974. - V. 4, № 2. - P. 140-149.
251. Weiland F. Differences in the in vitro response of lymphocytes from leukotic and normal cattle to Concanavalin A / F. Weiland, O.C. Straub // Res. Vet. Sci. - 1976. - V. 20. - P. 340-341.

252. Weiland F. Ultrastructure comparison of bovine leukemia virus (BLV) with C-type particle of other species / F. Weiland, S. Ueberschaer // Arch. Virol. - 1976. - V. 52, № 1/2. - P. 187-190.
253. Werner O. EnifllLb verschiedener Kultivierungsbedingungen auf die Freisetzung des bovines Leukosvirus aus peripheren Leukozyten des Rindes / O. Werner, H. Rossler, W. Wittmann // Arch. exp. Veterinarmed. - 1982. - Bd. 36, № 3. - P. 465-475.
254. White K.N. Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins / K.N. White, N.M. Williamson, E. Harlow // Cell. -1989. - V. 56. - P. 67-75.
255. White K.N. The nucleolar localisation signal of the HTLV-I protein p27-rax is important for of IL-2 receptor / K.N. White, T. Nosaka, H. Kanamori // Biochem. Biophys. - 1991. - V. 175. - P. 98-103.
256. Willems L. Cooperation between bovine leukaemia virus transactivator protein and Ha-ras oncogene product in cellular transformation / L. Willems, H. Heremans, G. Chen // EMBO J. - 1990. - V. 9. - P. 1577-1581.
257. Willems L. Mutation in the bovine leukemia virus tax protein can abrogate the LTR directed transactivating activity without concomitant loss of transforming potential / L. Willems, C. Grimonport, H. Heremans // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1992. - V. 89. - P. 3957-3961.
258. Willems L. A cyclic AMP-responsive DNA-binding protein (CREB2) is a cellular transactivator of the bovine leukemia virus long terminal repeat / L. Willems, R. Kettmann, G. Chen // J. Virol. - 1992. - V. 66. - P. 766-772.

259. Willems L. Bovine leukemia virus, an animal model for the study of intrastrain variability / L. Willems, E. Thienpont, P. Kerkhofs // J. Virol. - 1993. - V. 67, № 2. - P. 1086-1089.
260. Wittmann W. Untersuchungen zur atologie der Rinderleukose mith blut leukosekranker rinder auf schaflamar / W. Wittmann, D. Urbaneck // Arch. Kip. Vet. Med. - 1969. - Vol.23. - P.709-713.
261. Wittmann W. Neue Er-kentnisse bel der Bekämpfung der enzootischen Rinderleukose / W. Wittmann, H. Liebermann, G. Gareiss // Tagungsber. Acad. Landwirtschaftswiss. DDR. – 1984. – V. 228.
262. Yamamoto H. Histopathological study on six cases of calf leucosis / H. Yamamoto, T. Yoshino // Natl. Inst. Anim. Health (Tokyo). – 1975. – V. 15(3). – P. 139-150.