

## Инфекционный лейкоз крупного рогатого скота и его диагностика

Н. Ф. Стародуб, В. Н. Стародуб

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины  
Ул. Леонтовича, 9, Киев, 01030, Украина

---

*В обзоре приведены данные о распространении вирусного лейкоза крупного рогатого скота и характеристика его возбудителя. Кратко рассмотрены сведения о молекулярно-генетических и иммунологических свойствах вируса. Особое внимание уделено биохимической диагностике инфекционного лейкоза с использованием традиционных серологических методов и метода полимеразной цепной реакции. Описаны также современные инструментальные серологические методы диагностики лейкоза, разрабатываемые на основе принципов биосенсорики. Проведен сравнительный анализ существующих и вновь разрабатываемых методов биохимической диагностики данного заболевания.*

---

**Введение.** Инфекционный лейкоз крупного рогатого скота (КРС) носит энзоотический характер и зарегистрирован на всех континентах в десятках стран мира. Это, прежде всего, заболевание гемолимфопоэтической системы с опасным разрастанием кроветворных тканей, нарушением процесса созревания клеток и усиленным образованием молодых форм. В данном случае развивается лейкоцитоз с последующим появлением лимфосаркомы. Особенностью заболевания является его длительное протекание без особо заметных нарушений состояния здоровья. Важно иметь в виду, что этому заболеванию подвержены птицы, рыбы, все виды млекопитающих и особенно КРС. Оно наносит значительный экономический ущерб, поскольку больные животные резко снижают продуктивность и далее возникает необходимость их ликвидации [1]. Несмотря на существующие сведения [2, 3] об увеличении продукции молока у лейкозных коров, на большой выборке животных (444—547 голов) доказано обратное [4]. Больные животные снижают ежедневные удои молока в среднем на 11 %, а их репродуктивная способность заметно падает в расчете на среднее количество годовых отелов. Биохимической и ветеринарно-санитарной экспертизой установлено [5], что мясо и молоко больных животных по многим показателям являются мало-

ценными. Снижаются и технологические качества молока, оно содержит большое количество свободного триптофана, метаболиты которого не разлагаются в течение 20 мин кипячения и обладают канцерогенными свойствами.

Недавно [6] сообщалось о специфическом проявлении этого заболевания. В частности, в Канаде проводили длительное оздоровление стада антибиотиками от заболевания, диагностированного сначала как пиелонефрит. Но оказалось, что в данном случае имело место развитие лимфосаркомы. Кроме чисто экономического ущерба, данное заболевание наносит и большой социальный вред. Под эгидой Национального ракового института (США) проведен эпидемиологический мониторинг по выявлению связи между лейкемией человека, популяцией КРС и лимфосаркомой коров в штате Айова [7]. Оказалось, что большую часть случаев лейкемии у человека составляют лимфоидные формы. Острая лимфоидная лейкемия (ОЛЛ) чаще всего встречается в возрасте до 20 и после 60 лет среди мужчин сельской местности, особенно в местах разведения молочного скота, причем существует положительная корреляция между количеством заболевания ОЛЛ людей и наличием стад животных с лимфосаркомами. Отличий по половому признаку в распространенности хронических форм не обнаружено, однако имеется некоторое отличие между городскими и сельскими жителями.

В ряде стран количество случаев появления лейкоза КРС катастрофически возрастает. Так, в Аргентине за последние 15 лет число ферм с инфицированными данным вирусом животными резко увеличилось, что, предположительно, связано с низким уровнем серодиагностики [8].

Профилактика и ликвидация лейкоза усложнены из-за его чрезвычайного распространения. Основная причина неблагополучия хозяйств относительно лейкоза состоит в том, что в стадо здоровых животных вводятся непроверенные особи. Поскольку лечение больных животных неэффективно, то главным направлением в борьбе с лейкозом следует считать разработку новых и усовершенствование существующих методов диагностики, которые бы позволяли выявить заболевание на самых ранних стадиях его развития. В настоящее время разработано около 20 различных методов лабораторной диагностики лейкоза, включая гематологические, гистологические и иммунологические. Однако проблема специфической, высокочувствительной, быстрой, простой, доступной и дешевой диагностики лейкоза в настоящий момент полностью не решена. Для успеха на этом пути в рамках современных требований практики необходимо привлечение принципиально новых подходов, наметившихся в последнее время при создании инструментальных аналитических средств. Чтобы перейти к их направленной разработке для диагностики лейкоза остро встает вопрос об анализе достижений в изучении данного заболевания, а особенно сведений об используемых методах лабораторной диагностики, их эффективности, достоинствах и недостатках, а также характеристике тех молекулярно-биохимических показателей, на которых они основываются. Освещение этого круга вопросов и составляет основную задачу данного обзора.

Некоторые молекулярно-генетическая и иммунологическая характеристики лейкоза КРС. Установлено [9], что лейкоз КРС вызывается вирусом. Это доказано серологическими, клеточными, биохимическими и молекулярно-биологическими исследованиями, с помощью которых в этом вирусе обнаружена обратная транскриптаза и показан его экзогенный характер [10]. Геномная и патогенная части вируса, а также его антигенные и биологические свойства имеют сходство с Т-клеточным вирусом лейкомии человека (I типа) и другими вирусами, вызывающими инфекционную анемию лошадей и представителей кошачьих [11, 12]. Вирус лейкоза принадлежит к типу С семейства ретровирусов рода онковирусов. Он ассоциирован с В-лимфоцитами [13], при этом появляется их популяция, экспрессирующая CD11b<sup>+</sup>, CD5- и CD8-мар-

керы [14, 15]. Большинство инфицированных В-лимфоцитов спонтанно вступают в G<sub>2</sub>/M клеточный цикл [16]. Вирусные белки экспрессируются лишь в 3 % спонтанно пролиферирующих клеток. Активация пролиферации CD4-лимфоцитов является поликлональной и не связана с антиген-специфическим воздействием [17]. На поверхности В-лимфоцитов инфицированных животных резко снижается уровень экспрессии L-селектина [18]. В крови таких животных формируется популяция цитотоксических Т-лимфоцитов типа γδ<sup>+</sup>, способных специфически лизировать аутологические фибробласты, инфицированные вирусом (rVV), содержащим *env* гены [19].

Вирус клонирован и его последовательность расшифрована [20]. Он имеет четыре гена: *gag*, *pol*, *env* и *gag*, а также фланкирующие длинные терминальные последовательности. Ген *gag* кодирует два полипептида: 66 и 44 кДа, являющихся предшественниками внутренних структурных белков. Полипептид 66<sup>gag-pro</sup> — предшественник матриксного белка p15, капсидного белка p24, нуклеокапсидного белка p12 и протеазы p14. Полипептид 44<sup>gag</sup> похож на полипептид 66<sup>gag-pro</sup>, но лишен аминокислотных последовательностей, присущих протеазе. Белок p24 — наибольший коровый белок, он устойчив к эфиру и был выделен с помощью различных методических приемов. Ген *env* кодирует предшественник, получивший название Pr72<sup>env</sup>. После гликозилирования и распада он дает начало поверхностному и трансмембранному гликопротеидам SU и TM соответственно. Оба они остаются нековалентно связанными и имеют дисульфидные мостики. Молекулярные массы этих белков варьируют в зависимости от методов их выделения, и разными авторами они указываются неоднозначно. Все же их обозначили как gp51SU и gp30TM. Белок gp51SU имеет девять сайтов гликозилирования и столько же цистеиновых остатков. Гликозилирование белка gp51SU различается для отдельных линий и видовых особенностей клеток.

Между *env* и фланкирующими длинными терминальными последовательностями существует район (X), расположенный на 3'-конце генома и содержащий ряд открытых рамок считывания, которые кодируют регуляторные белки вирусной экспрессии (Tax, Rex, R3 и G4). Два белка Tax и Rex экспрессируются в инфицированных клетках, но не присутствуют в частицах вируса. Сначала было продемонстрировано, что делеция генов R3 и G4 не изменяет инфекционного потенциала вируса, но значительно снижает провирусную нагрузку на организм в условиях *in vivo* [21, 22]. Кроме того, было показано, что в присутствии диких и мутиро-

ванных форм *R3* и *G4* апоптоз клеток проявляется в одинаковой мере [23]. В дальнейшем все же установлено [24], что *G4* гены требуются для размножения и проявления патогенности вируса. Этот факт и использован затем для приготовления препаратов аттенюированного вируса путем делеции указанных генов.

Белок Tax (34—38 кДа) является транскрипционным активатором всех вирусных белков. Трансактивация гена *tax* требует 21 пару оснований на 5'-терминальном конце. Белок Tax прямо не связывает ДНК, но, взаимодействуя с некоторыми клеточными белками, увеличивает их аффинность к 21-членной «усиливающей» последовательности. Ген *tax* абсолютно необходим для инфекционности вируса в условиях *in vivo*. Причем в этом случае возможны лишь некоторые вариации его последовательности. Коэкспрессия генов *tax* и онкогенного *Ha-ras* приводит к полному превращению эмбриональных фибробластов в опухолевые клетки. Фосфорилирование серинов белка Tax в положении 106 и 293 сохраняет инфекционность вируса в условиях *in vivo* [14]. Недавно продемонстрировано [25], что даже точечные замены аминокислот в районе последовательности 245—265 белка Tax весьма существенны для его трансактивационной роли. И это характерно не только для вируса лейкоза КРС, но и для других видов ретровирусов, в частности, для Т-клеточного вируса лейкомии человека (HTLV-1), вируса рака молочной железы мышей и, в какой-то мере, для вирусов иммунодефицита человека (HIV-1) и Молони (лейкемия грызунов). Показано также [26], что протеаза имеет важное значение для инфекционности вируса лейкоза КРС и замена одного нуклеотида в соответствующем гене ведет к модификации его экспрессии и потери активности. Оказалось [27], что мутация, приводящая к замене аргинина на лизин в положении 150 белка p24gag, является драматической для инфекционности вируса. Вместе с тем замена фенилаланина на тирозин в положении 147 не имеет такого значения.

К поверхностным белкам gp51 и gp30, а также ко внутреннему (коровому) белку p24 вырабатываются антитела [28]. Их появление в крови может быть обнаружено через 15 дней после инфицирования животных, но реально их выявляют через 3—4 недели и это зависит от применяемого метода тестирования [29]. У экспериментально инфицированных животных анти-gp51 антитела появляются раньше и уровень их титра выше по сравнению с антителами к белку p24. При культивировании инфицированных лимфоцитов в условиях *in vitro* превалирует образование белка p24 [30].

Недавно [31] выполнено специальное исследование, посвященное анализу набора моноклональных антител, образующихся в ответ на различные формы антигена, приготовленного на основе вируса лейкоза КРС. Мышей линии BALB/c последовательно иммунизировали живыми клетками, препаратом клеток после озвучивания ультразвуком с последующим центрифугированием, клеточным лизатом, частично выделенным вирусом и клетками, обработанными формалином, но предварительно инфицированными вирусом. Наибольшее количество гибридом получено в ответ на препарат клеток после озвучивания ультразвуком с последующим центрифугированием. Все же около 90 % гибридом образуется на клеточные белки. Даже среди небольшого количества гибридом, индуцированных частично выделенным вирусом, небольшая часть была специфична к этому вирусу. Полученные методом «блотинга» моноклональные антитела классифицированы следующим образом: анти-gp51SU (39 клонов), анти-gp30TM (6 клонов), анти-Pg72<sup>eny</sup> (9 клонов), антиPg66<sup>gag-pro</sup> (1 клон) и анти-Pg<sup>gag</sup> (4 клона). Большой процент клонов, образующихся в ответ на gp51, свидетельствует о его высокой иммуногенности. Вместе с тем ранее установлено [32], что в сыворотке крови и в молоке появляются преимущественно антитела к p24 и в несколько меньшей мере — к белку gp51. Эти, на первый взгляд, противоречия, скорее всего, обусловлены особенностями иммунореактивности организма, контролируемой набором I<sub>h</sub>-генов [33]. Все же более типичной реакцией организма, по-видимому, является преимущественное образование антител к поверхностному белку gp51.

Белок p24 имеет два иммунодоминантных В-клеточных эпитопа. Кроме того, выявлены два Т-клеточных эпитопа, соответствующих от 31 до 55 и от 141 до 165 аминокислотным остаткам [34]. На белке gp51 идентифицированы в общем 12 эпитопов для антител. Линейные эпитопы А, В-ВВ, D и E локализованы на COOH-конце и они не отвечают за иммунную нейтрализацию вируса. Конформационные эпитопы F, G и H расположены на NH<sub>2</sub>-конце и соответствуют аминокислотным остаткам 64—73, 38—57 и 98—117. Они являются наиболее доступными и преимущественно ассоциированы с инфекционностью вируса и его нейтрализацией. Другие конформационные эпитопы С, С1 и С2 тоже не участвуют в иммунной нейтрализации вируса.

кДНК, кодирующая возможный рецептор вируса BLVRcp1, получена и охарактеризована. Показано, что сыворотка инфицированных животных блокирует связывание gp51 с рекомбинантным

BLVRCp1. Напротив, моноклональные антитела к эпитопам F, G и H не мешают этому связыванию и, более того, после связывания BLVRCp1 они остаются доступными для антител [35].

Количество лимфоцитов, содержащих на поверхности IgM, значительно выше в группе с выраженным продолжительным лимфоцитозом, чем в группах с его отсутствием или в сомнительных случаях. Безусловно, что в таких группах и больше клеток с IgG [36].

Анализируя пути распространения инфекционного лейкоза КРС, авторы [5, 37] пришли к выводу о том, что его распространение через мясо, молозиво или молоко, а также от матери к плоду незначительно. Основным способом передачи лейкоза является смешивание крови, повреждение кожи и другие нарушения на уровне влияния на целостность организма. Передача заболевания от плода к матери четко установлена [38]. Генетической стойкости к заражению лейкозом не выявлено [39].

Традиционные серологические методы выявления лейкоза КРС. Учитывая приведенные выше данные об индукции вирусом выработки специфических антител, было предложено осуществлять биохимическую диагностику лейкоза, оценивая их наличие в крови животных. Для этого, прежде всего, использован метод иммунодиффузии в агаре [40]. Как правило, в данной тест-системе используется смесь белков, среди которых преобладают gp51 и p24, однако с ее помощью преимущественно выявляются антитела к gp51 [41]. Данный метод достаточно простой, позволяет получить надежные результаты и поэтому широко введен в ветеринарную практику. Основными его недостатками являются невысокая чувствительность и длительность анализа. Как известно, время анализа этим методом, получившим в свое время в ветеринарной практике название метода Оухтерлони [33], или РИД, занимает 2—3 сут, а результат регистрируется визуально по наличию полосы преципитации.

Более чувствительной является диагностика на основе радиоиммунного [42] и иммуноферментного (ИФА) анализов, а именно — твердофазного иммуноферментного метода ELISA [43]. Предложенный коммерческий вариант ELISA-метода преимущественно тестирует наличие антител к полипептиду gp51.

Сравнение результатов, полученных РИД- и ELISA-методами, подтверждает большую чувствительность последнего при массовых обследованиях и, более того, указывает на то, что РИД-методом выявляются в основном антитела к белкам gp51 и gp30, в то время как ELISA — к белку p24 [44]. Недавно [45] проведено обследование 1200 сыворо-

ток крови КРС ELISA-методом с применением коммерческих наборов, выпускаемых для США и Европы, а также РИД-методом, официально утвержденным Канадским агентством инспекции продуктов питания.

В трех наборах (1—3) для ELISA в качестве антигена использовали белок gp51, а в одном (4) — белок p24. Оказалось, что результаты, полученные с помощью наборов 1—3 для ELISA-метода, коррелировали с данными РИД-метода на уровне 0,998; 0,984 и 0,986 соответственно. Четвертый набор для ELISA-метода обеспечивал меньшую чувствительность анализа и давал 5,13 % ложноотрицательных результатов. В то время как РИД-метод позволял разведение тестируемой сыворотки лишь в 100 раз, наборы 1—3 для ELISA-метода могут быть использованы даже при анализе сывороток, разведенных в 5000, 20800 и 4000 раз соответственно. Высокий уровень корреляции результатов анализа РИД- и ELISA-методов при обследовании РИД-положительных проб выявлен и другими авторами [46], однако в случае РИД-отрицательных проб этого не наблюдается из-за большей чувствительности ELISA-метода.

Ввиду высокой чувствительности ELISA-метода его применяют для обнаружения антител к вирусу лейкоза в молоке и моче [47, 48]. При обследовании 375 образцов сыворотки крови и 150 проб молока выявили высокий уровень корреляции результатов. При анализе проб мочи у 154 голов КРС, из которых половина была серопозитивными, отмечен статистически более высокий уровень специфических антител у серопозитивных по сравнению с серонегативными животными.

Несколько иной вариант постановки ИФА предлагается в виде «дот»-метода с использованием нитроцеллюлозы (НЦ) в качестве поддерживающей твердой фазы [49]. Данный метод весьма эффективен и для тестирования моноклональных антител к антигенам вируса. Обращает на себя внимание тот факт, что результаты анализа хорошо воспроизводились при использовании НЦ мембран, сохраняющихся до 5 месяцев.

ELISA-метод эффективно использовали и для выявления больных животных, когда для анализа брали молоко от нескольких коров [50], т. е. при обследовании стада так называемым «групповым» методом.

Для анализа ELISA-методом антител, специфичных к белку p24 в сыворотке крови и молоке, предлагается предварительно покрывать поверхность плашек моноклональными антителами к этому белку, а затем сорбировать на них тотальные белки вируса [51, 52]. При этом показано, что

ELISA-метод и метод блотинга в данном случае обеспечивают анализ образцов крови, собранных от 50 коров, или же образцов молока от 400 коров, правда, после 10-кратного его концентрирования. Проанализированы 167 сывороток от вирус-негативных и 144 — от вирус-инфицированных животных и выявлено 99,4 % позитивных и 96,7 % негативных случаев.

Естественно возникает вопрос, почему нужно разрабатывать диагностикумы для определения антител к белку р24? Оказалось, что некоторые особи КРС вырабатывают антитела исключительно к нему, и инфицирование таких животных вирусом невозможно выявить с помощью обычного теста, основанного на определении антител к белку gp51 [53].

Сообщается [54] также о получении моноклональных антител к белку gp51 для усовершенствования ELISA-метода, когда появляется возможность проведения высокоспецифичного анализа при использовании тотального вирусного антигена.

Выход нативных белков вируса в клеточной культуре очень небольшой, к тому же они перекрестно реагируют с негативными контрольными сыворотками. Ввиду этого предложено [55] для ELISA-анализа использовать рекомбинантный Gag-белок. Для этого gag-кодирующие последовательности клонированы в экспрессирующий вектор pQE32, позволяющий получать рекомбинантный белок в *Escherichia coli* в больших количествах. Эффективность диагностикумов на основе данного белка оказалась довольно высокой при анализе ELISA-методом и методом блотинга.

Как результат специальных исследований разработан ELISA-метод, в котором активность пероксидазной метки определяют по реакции усиленной хемилюминесценции [56]. Установлены оптимальные концентрации реагентов, а также определены условия проведения анализа, обеспечивающие чувствительность, в 2—3 раза большую по сравнению с достигаемой при обычном выявлении активности фермента-метки.

Внедрение ELISA-метода в Германии обеспечило дополнительную прибыль в среднем 69 DM на одну корову [57].

Помимо широко распространенных РИД- и ELISA-методов применяются и другие серологические методы: реакция диффузной преципитации, агглютинации с латексными частицами [58]. В России и в Украине основным методом диагностики является РИД-метод, с помощью которого разработан комплекс эпидемиологических мероприятий по оздоровлению стад животных и искоренению инфекционного лейкоза [58—61].

**Вакцинация и серодиагностика.** Исходя из принципиальной возможности выделения тотального набора вирусных белков и их отдельных видов предприняты попытки приготовления вакцин для иммунизации животных. Так, стельные коровы 3 раза иммунизировали препаратом, включающим  $Al(OH)_3$  с сорбированным на нем нативным белком gp51, а затем животных инфицировали введением лимфоцитов с вирусом. Только небольшая часть животных подверглась заболеванию [62].

Для синтетической вакцины готовили липосомы, содержащие 20-членный пептид (98—117 аминокислотный остаток) белка gp51. Эту вакцину испытывали на мышах. Лимфоциты иммунизированных мышей интенсивно пролиферировали, а в клетках селезенки вырабатывалось большое количество  $\gamma$ -интерферона и интерлейкина-2, но не продуцировались ни интерлейкин-4, ни интерлейкин-10. При наличии в липосомах пептидов с аминокислотными остатками 121—140 и 142—161 белка gp51 также стимулировались пролиферация лимфоцитов и образование  $\gamma$ -интерферона [63].

Для приготовления вакцин разработан способ усиления наработки белка gp51 клеточными культурами. Была создана конструкция, включающая ген *tax* и экспрессирующий вектор, которую затем интегрировали с геномом клеток ФЛК, инфицированных вирусом лейкоза. Интенсивность синтеза белка gp51 в таких клетках повышалась в 1,5—2 раза [64]. При наращивании вируса в культуре максимальный уровень его содержания достигался между 6-м и 8-м днем после пассажа [65].

В СССР была предложена вакцина на основе белка р24 [66]. В дальнейшем ее многократно испытывали и усовершенствовали [67, 68]. Установлено, что при трехкратном введении этой вакцины животным с интервалом в две недели в крови появляются антитела, титр которых достигает 1:32 в реакции Оухтерлони. После искусственного заражения большой выборки вакцинированных животных установлен защитный эффект на уровне 83 %. Этот результат подтвержден и при биопробах на овцах.

Таким образом, для приготовления вакцин используют два наиболее представленных вирусных белка р24 и gp51. В зависимости от типа вакцины для дифференциального серологического тестирования больных и вакцинированных животных в качестве исходного антигена применяют соответствующие чистые белки, а именно — gp51 или р24 [52, 53]. Правда, выделение их в чистом виде в большом количестве является весьма непростой задачей. Как указывалось выше, чтобы обойти эти затруднения, вначале получают моноклональные

антитела к белку р24, которыми покрывают поверхность полистироловых плашек, а затем их обрабатывают тотальным препаратом белков вируса [51—53].

Помимо чистых белков в качестве вакцины испытаны также препараты, приготовленные на основе инфицированных клеток, нативных вирусных частиц, а также вирусов, аттенюированных делецией G4 гена [69, 70]. Последний тип вакцины, хотя и не защищает полностью организм от инфицирования, но задерживает развитие болезни. При этом у вакцинированных животных развивается клеточный и гуморальный (исходя из появления антител, специфичных к белку gp51) иммунный ответ. Весьма интересным является и тот факт, что у овец (но не у КРС) удается вызвать гуморальный иммунный ответ на внутримышечное введение плазмидной ДНК, содержащей гены оболочки вируса, находящиеся под промотором цитомегаловируса (*рСМVenv*). Такая ДНК-вакцина задерживает репликацию вируса, но не обеспечивает защиты организма от него. Следует отметить, что полинуклеотидные иммунизации или создание ДНК-вакцин составляют третью революционизирующую волну в вакцинологии вообще [71]. Не исключено, что такие вакцины принесут успех и в борьбе с инфекционным лейкозом КРС.

Полимеразная цепная реакция в диагностике лейкоза. Чтобы обеспечить альтернативный путь диагностики вирусной инфекции, предложен вариант использования полимеразной цепной реакции (ПЦР), суть которой заключается в выделении из лимфоцитов ДНК, копировании некоторых ее последовательностей, отвечающих праймеру gp51, амплификации этих последовательностей и выявлении продуктов ПЦР с помощью гибридизации с биотинилированной олигонуклеотидной пробой [72]. Данный подход позволяет непосредственно определить интегрирование вирусных последовательностей в геном лимфоцитов хозяина, и его эффективность была многократно проверена в различных ситуациях [73—74]. Установлено [75], что с помощью ПЦР удается обнаружить инфицирование животных уже через 7 дней, в то время как с помощью ELISA-метода самое раннее такое событие выявляется лишь через 26 дней. Кроме того, ПЦР-метод дает возможность обследовать телят (особенно родившихся от больных коров) для тестирования у них инфекции с учетом заболевания матери, чего нельзя сделать с помощью РИД- и ELISA-методов. В специальном исследовании [76] обнаружено, что животных с низким, скоротечным титром антител или вообще без их выработки трудно идентифицировать как вирус-инфицирован-

ных, несмотря на то, что они могут быть источником инфекции. Так, при длительном обследовании стада коров серологическими методами, включая ELISA-метод, оно было классифицировано как благополучное в отношении вирусного лейкоза и вдруг через некоторое время в стаде были обнаружены больные животные. Причем ПЦР-методом они были выявлены на 8 недель раньше, чем ELISA-методом. В другом случае обследовано стадо коров (64 особи), классифицированное РИД-методом как сомнительное относительно заболевания лейкозом. Однако с помощью ELISA- и ПЦР-методов в нем были обнаружены инфицированные животные (51 и 55 особей соответственно). Дополнительные исследования длины рестриктных фрагментов ДНК показали, что четверо из 55 животных были инфицированы прсвирусом того же вируса. В другой работе [77] сообщается, что ПЦР-методом удалось обнаружить на 10 и 17,7 % больше положительных результатов, чем ELISA- и РИД-методами соответственно. При карантинном обследовании 18 животных четыре из них выявлены ПЦР-методом как инфицированные провирусом. В то время как серологическими тестами среди этих особей идентифицировано лишь одно животное как вирус-позитивное. Подчеркивается значительно большая чувствительность ПЦР-метода при использовании праймера к *env*-гену, чем к *tax*-гену. Указывается также на возможность получения отрицательных результатов ПЦР-методом по сравнению с серологическими методами, что может быть обусловлено интенсивным образованием антител, секретируемых с молозивом.

Обращает на себя внимание тот факт, что не только очищенная ДНК может быть предметом анализа для ПЦР-метода, но и содержимое клеток крови, полученное в результате их осмотического шока. При практической проверке эффективности обоих подходов на большой группе животных получены одинаковые результаты [78].

Сообщается [79], что при анализе ДНК, экстрагированной из клеток моноцитов крови животных, ПЦР-методом с использованием праймеров для *env*- и *pol*-генов удается выявить больше положительных случаев, чем при использовании праймера для *tax*-гена. В ряду чувствительности известные методы располагаются в следующей последовательности: ПЦР, ELISA и РИД. Вместе с тем в другой работе [80] указывается, что праймеры к *env*- и *gag*-генам обеспечивают большую специфичность анализа, чем праймеры к *pol*-гену. Обследованы 119 голов КРС, среди которых 52 были РИД-позитивными и 67 — РИД-негативными. ПЦР-методом с праймером к *env*-гену обнаружены

вирусные последовательности в геноме четырех из 15 РИД-положительных и двух из пяти РИД-негативных особей. Причем результаты обследования полностью совпадали для обоих видов праймеров.

Несмотря на явные достоинства ПЦР для диагностики лейкоза КРС, считается все же, что из-за дороговизны он может служить лишь в качестве дополнительного верификационного метода к широко применяемым серологическим методам [81—84].

Биосенсорный серологический контроль лейкоза КРС. Все рассмотренные выше серологические методы, а особенно ELISA-метод, так же как и ПЦР, являются довольно сложными, требуют большого количества времени, специальной профессиональной подготовки персонала для проведения анализа, к тому же они пригодны лишь для лабораторных исследований и не могут быть осуществлены в полевых условиях. Чтобы сохранить такие качества анализа, как высокоспецифичность, достаточная чувствительность, но вместе с тем сделать его быстрым, обеспечив по возможности проведение исследований в режиме реального времени, а также простым, дешевым и доступным для обследований непосредственно на ферме, предпринята попытка использовать достижения биосенсорной технологии для разработки инструментальных аналитических средств экспрессной диагностики инфекционного лейкоза КРС. Прежде всего, разработан иммунный сенсор на основе поверхностного плазменного резонанса (ППР) [85, 86].

Многочисленными экспериментами продемонстрировано, что иммуносенсорный метод является более чувствительным по сравнению с РИД-методом. Оказалось, что препарат антигена, выпускаемый серийно и используемый для широких скрининговых исследований с помощью РИД-метода, требует дополнительной очистки вирусного антигена для применения в иммуносенсорном методе. Модификация поверхности преобразователя с использованием лектинов позволяет избирательно иммобилизовать гликозилированный gp51 из тотального препарата белков вируса. Это обеспечивает селективное определение антител к gp51 белку, содержание которых преобладает в сыворотках больных животных по сравнению с таковыми, иммунизированными вакцинами на основе белка р24. Кроме того, обработка поверхности лектинами увеличивает чувствительность иммунного сенсора. Это достигается благодаря тому, что лектины, связываясь с углеводными группами, расположенными во втором константном домене IgG, обеспечивают направленное экспонирование их Fab-фрагментов в раствор.

Разработанный иммунный сенсор позволяет осуществлять серологический анализ не только проб сыворотки крови, но и молока. Весь анализ занимает 10—12 мин. Учитывая, что биосенсор базируется на определении специфических антител, то ему присущи те же недостатки, что и традиционным серологическим методам по сравнению с ПЦР. Однако иммуносенсорный метод более быстрый, намного проще и может выполняться непосредственно на ферме. К тому же он и более чувствительный, чем РИД-метод.

Следовательно, серологическая диагностика имеет огромное практическое значение для осуществления широкого первичного скрининга лейкозов. ПЦР является необходимой для верификации анализа и более раннего выявления инфицированных животных. Прогресс развития серологических методов и ПЦР тесно связана с разработкой иммунных и ДНК-биосенсоров, позволят сделать анализ таким, как этого требует практика, а именно: чувствительным, специфичным, простым, дешевым, осуществляемым в режиме реального времени и в полевых условиях, непосредственно на ферме, а также с использованием легкодоступных естественных биологических жидкостей, чтобы не беспокоить и не травмировать лишним раз животных взятием крови.

*N. F. Starodub, V. M. Starodub*

Infectious bovine leucosis and its diagnostics

Summary

*The data on distribution of infectious bovine leucosis and some characteristics of its agent are given in the review. Molecular-genetic and immunological features of the virus are shortly discussed. The main attention is paid to biochemical diagnostics of this disease by traditional serological methods and the method of polymerase chain reaction. The information about modern instrumental serological methods of the leucosis diagnostics developed on the basis of biosensor is given. The existed and newly developed methods are compared.*

*М. Ф. Стародуб, В. М. Стародуб*

Інфекційний лейкоз великої рогатої худоби та його діагностика

Резюме

*В огляді наведено дані щодо розповсюдження вірусного лейкозу великої рогатої худоби та характеристика його збудника. Коротко розглянуто відомості про молекулярно-генетичні та імунологічні властивості вірусу. Особливу увагу приділено біохімічній діагностиці інфекційного лейкозу з використанням традиційних серологічних методів та методу полімеразної ланцюгової реакції. Описано також сучасні інструментальні серологічні методи діагностики лейкозу, розроблені на основі принципів біосенсоріки. Зроблено порівняльний аналіз існуючих та наново створюваних методів біохімічної діагностики даного захворювання.*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Wu M. C., Shanks R. D., Lewin H. A. Milk and fat production in dairy cattle influenced by advanced subclinical bovine leukemia virus infection // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1989.—86.—P. 993—996.
2. McNab W. B., Jacobs R. M., Smith H. E. A serological survey for bovine immunodeficiency-like virus in Ontario dairy cattle and association between test results, production records and management practices // Can. J. Vet. Res.—1994.—58.—P. 36—41.
3. Huber N. L., DiGiacomo B. F., Evermann J. F., Studer E. Bovine leukemia virus infection in a large Holstein herd. I. Cohort analysis of the prevalence of antibody-positive cows. II. Prospective comparison of production and reproductive performance in antibody-negative and antibody-positive cows // Amer. J. Vet. Res.—1981.—42.—P. 1474—1481.
4. D'angelino J. L., Garcia M., Birgel E. H. Productive and reproductive performance in cattle infected with bovine leukosis virus // J. Dairy Res.—1998.—65.—P. 693—695.
5. Бусол В. О. Ветеринарно-санітарні проблеми молока і м'яса лейкозних корів // Вет. мед. України.—2002.—С. 4—5.
6. Sparling A. M. An unusual presentation of enzootic bovine leukosis // Can. Vet. J.—2000.—41.—P. 315—316.
7. Donham K. J., Berg J. W., Sawin R. S. Epidemiologic relationships of the bovine population and human leukemia in Iowa // Amer. J. Epidemiol.—1980.—112.—P. 80—92.
8. Trono K. G., Perez-Filgueira D. M., Duffy S., Borca M. V., Carrillo C. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods // Vet. Microbiol.—2001.—83.—P. 235—248.
9. Van der Maaten M. J., Miller J. M., Boothe A. D. Replicating type-C virus particles in monolayer cell cultures of tissues from cattle and experimentally infected sheep // J. Nat. Cancer Inst.—1974.—52.—P. 491—494.
10. Belak S., Ballagi-Pordany A. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology // Vet. Res. Commun.—1993.—17.—P. 55—72.
11. Radke K. Bovine leukemia virus // Encyclopesia of virology / Eds R. G. Webster, A. Granoff.—New York: Acad. press, 1994.—P. 166—174.
12. Snider T. G., Hoyt P. G., Jenny B. F., Coats K. S., Luther D. G., Storts R. W., Battles J. K., Gonda M. A. Natural and experimental bovine immunodeficiency virus infection in cattle // Vet. Clin. N. Amer. Food Anim. Pract.—1997.—13.—P. 151—176.
13. Everman J. F. Comparative features of retroviral infections of livestock // Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.—1990.—13.—P. 127—136.
14. Chevallier N., Berthelemy M., Le Rhun D., Laine V., Levy D., Schwartz-Cornil I. Bovine leukemia virus-induced lymphocytosis and increased cell survival mainly involve the CD11b<sup>+</sup> B-lymphocyte subset in sheep // J. Virol.—1998.—72.—P. 4413—4420.
15. Twizere J.-C., Kerkhofs P., Burny A., Portetelle D., Kettman R., Willems L. Discordance between bovine leukemia virus *tax* immortalization *in vitro* and oncogenicity *in vivo* // J. Virol.—2000.—74.—P. 9895—9902.
16. Stone D. M., Norton L. K., Davis W. C. Spontaneously proliferating lymphocytes from bovine leukemia virus-infected, lymphocytotic cattle are not the virus-expressing lymphocytes, as these cells are delayed in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> of the cycle and are spared from apoptosis // J. Gen. Virol.—2000.—81.—P. 971—981.
17. Stone D. M., Norton L. K., Chambers J. C., Meek W. J. CD4 T lymphocyte activation in BLV-induced persistent B lymphocytosis in cattle // Clin. Immunol.—2000.—96.—P. 280—288.
18. Dusinsky R., Bardotti M., Ponti W. Decreased expression of L-selectin (CD62L) on lymphocytes in enzootic bovine leukaemia // J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Publ. Health.—2000.—47.—P. 127—132.
19. Lundberg P., Splitter G. A. T-lymphocyte cytotoxicity against envelope-expressing target cells is unique to the alymphocytic state of bovine leukemia virus infection in the natural host // J. Virol.—2000.—74.—P. 8299—8306.
20. Garvey K. J., Oberste M. S., Elser J. E., Braun M. J., Gonda M. A. Nucleotide sequence and genome organization of biologically active proviruses of the immunodeficiency-like virus // Virology.—1990.—175.—P. 391—409.
21. Altaner C., Merza M., Altaneriva V., Morein B. Envelope glycoprotein gp51 of bovine leukemia virus is differently glycosylated in cells of various species and organ origin // Vet. Immunol. and Immunopathol.—1993.—36.—P. 163—177.
22. Johnson R., Kaneene J. B. Bovine leukemia virus and enzootic bovine leukosis // Vet. Bull.—1992.—4.—P. 287—311.
23. Dequiedt F., Hanon E., Kerkhofs P., Pastoret P. P., Portetelle D., Burny A., Kettmann R., Willems L. Both wild-type and strongly attenuated bovine leukemia viruses protect peripheral blood mononuclear cells from apoptosis // J. Virol.—1997.—71.—P. 630—639.
24. Kerkhofs P., Heremans H., Burny A., Kettmann R., Willems L. *In vitro* and *in vivo* oncogenic potential of bovine leukemia virus G4 protein // J. Virol.—1998.—72.—P. 2554—2559.
25. Tajima S., Aida Y. The region between amino acids 245 and 265 of the bovine leukemia virus (BLV) Tax protein restricts transactivation not only via the BLV enhancer but also via other retrovirus enhancers // J. Virol.—2000.—74.—P. 10939—10949.
26. Blankenstein P., Bondzio A., Fechner H., Beier D., Marquardt O., Looman A. C., Ebner D. 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 // J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Publ. Health.—2000.—47.—P. 361—371.
27. Willems L., Kerkhofs P., Attenelle L., Burny A., Portetelle D., Kettmann R. The major homology region of bovine leukaemia virus p24gag is required for virus infectivity *in vivo* // J. Gen. Virol.—1997.—78.—P. 637—640.
28. Portetelle D., Bruck C., Mammericks M., Burny A. Use of monoclonal antibody in an ELISA test for the detection of antibodies to bovine leukemia virus // J. Virol. Meth.—1983.—6.—P. 19—29.
29. Gatei M., Naif H., Kumar S., Boyle D., Daniel R., Good M., Lavin M. Protection of sheep against bovine leukemia virus (BLV) infection by vaccination with recombinant vaccinia viruses, expressing NLV envelope glycoproteins: correlation of protection with CD4 T-cell response to gp51 peptides 51—70 // J. Virol.—1993.—67.—P. 1803—1810.
30. Cowley J. A., Molloy J. B., Dimmock C. K., Walker P. J., Bruyeres A. G., Ward W. H. Infectivity of bovine leukaemia virus infected cattle: An ELISA for detecting antigens expressed in *in vitro* cultured lymphocytes // Vet. Microbiol.—1992.—30.—P. 137—150.
31. Llamas L., Gomez-Lucia E., Domenech A., De Avila A., Suarez G., Goyache J. Production and characterization of monoclonal antibodies against bovine leukemia virus using various crude antigen preparations: a comparative study // J. Vet. Med.—2000.—B47.—P. 387—397.
32. Lienau A., Stober M., Kehrli M. E., Tammen I., Schawenger B., Kuczka A., Pohlenz J. Bovine Leukozyten-Adhäsions-

- Defizienz: Klinisches Bild und Differential-Diagnostik // Dtsch. Tierarztl. Wschr.—1994.—101.—P. 381—420.
33. *Иммунология* / Под ред. У. Пола.—М.: Мир, 1987.—Т. 1—3.
  34. Mager A., Masengo R., Mammerickx M., Letesson J. J. 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 // J. Gen. Virol.—1994.—75.—P. 2223—2231.
  35. Orlik O., Ban J., Hlavaty J., Altaner C., Kettmann R., Portetelle D., Splitter G. A. Polyclonal bovine sera but not virus-neutralizing monoclonal antibodies block bovine leukemia virus (BLV) gp51 binding to recombinant BLV receptor BLVRcp1 // J. Virol.—1997.—71.—P. 3263—3267.
  36. Levkut M., Pontii W., Soligo D., Quirici N., Rocchi M., Lambertenghi D. G. Expression and quantification of IgG and IgM molecules on the surface of lymphocytes of cattle infected with bovine leukaemia virus // Res. Vet. Sci.—1995.—59.—P. 45—49.
  37. Hopkins S. G., DiGiacomo R. F. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle // Vet. Clin. N. Amer. Food. Anim. Pract.—1997.—13.—P. 107—128.
  38. Fukai K., Sato M., Kawara M., Hoshi Z., Ueno S., Chyou N., Akashi H. A case of an embryo transfer calf infected with bovine leukemia virus from the recipient cow // Zentralbl. Veterinarmed.—1999.—46B.—P. 511—515.
  39. Мандигра М. Генетичні аспекти лейкозу великої рогатої худоби // Вет. мед. України.—2000.—С. 18—19.
  40. Miller J. M., Van Der Maaten M. J. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies // Eur. J. Cancer.—1977.—13.—P. 1369—1375.
  41. Miller J. M., Schmerr M. J. F., Van Der Maaten M. J. Comparison of four serological tests for the detection of antibodies to bovine leukemia virus // Amer. J. Vet. Res.—1981.—42.—P. 5—8.
  42. Franz J., Hampl J., Hofirek B., Skrobak F., Svoboda I., Granatova M. Radioimmunologicky prukaz protilatek proti viru leukozy skotu // Vet. Med.—1986.—31.—P. 459—468.
  43. Hoff-Jorgensen R. An international comparison of different laboratory tests for the diagnosis of bovine leukosis: suggestion for international standardization // Vet. Immunol. and Immunopathol.—1989.—22.—P. 293—297.
  44. Dolz G., Moreno E. Comparison of agar gel immunodiffusion test, enzyme-linked immunosorbent assay and western blotting for the detection of BLV antibodies // Zentralbl. Veterinarmed.—1999.—46B.—P. 551—558.
  45. Simard C., Richardson S., Dixon P., Belanger C., Maxwell P. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency // Can. J. Vet. Res.—2000.—64.—P. 101—106.
  46. Domenech A., Llamas L., Goyache J., Suarez G., Gomez-Lucia E. Comparison of four tests to evaluate the reactivity of rabbit sera against envelope or Gag-related proteins of bovine leukemia virus (BLV) // Vet. Microbiol.—1998.—60.—P. 13—25.
  47. Nguyen V. K., Maes R. F. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine leukemia virus in serum and milk // Clin. Microbiol.—1993.—31.—P. 979—981.
  48. Carli K. T., Sen A., Batmaz H., Kennerman E. Detection of IgG antibody to bovine leukaemia virus in urine and serum by two enzyme immunoassays // Lett. Appl. Microbiol.—1999.—28.—P. 416—418.
  49. Llamas L., Goyache J., Domenech A., de Avila A., Suarez G., Gomez-Lucia E. Rapid detection of specific polyclonal and monoclonal antibodies against bovine leukemia virus // J. Virol. Meth.—1999.—82.—P. 129—136.
  50. Sargeant J. M., Kelton D. F., Martin S. W., Mann E. D. Evaluation of a bulk-milk ELISA test for the classification of herd-level bovine leukemia virus status // Prev. Vet. Med.—1997.—31.—P. 223—230.
  51. Rodak L., Granatova M., Vesely T., Nevorankova Z. Monoclonal antibody for the demonstration by ELISA of antibodies to protein p24 of enzootic bovine leukosis virus in individual and pooled blood serum and milk samples // Zentralbl. Veterinarmed.—1997.—44B.—P. 425—436.
  52. Kittelberger R., Reichel M. P., Meynell R. M., Tham K. M., Molloy J. B. Detection of antibodies against the core protein p24 of the bovine leukaemia virus in cattle for confirmatory serological testing // J. Virol. Meth.—1999.—77.—P. 109—114.
  53. Merza M., Sandquist B., Sober J., Morein B. Immunoaffinity purification of two major proteins of bovine leukemia virus (gp51 and gp24) and their use for discrimination between vaccinated and infected animals // J. Virol. Meth.—1991.—33.—P. 345—353.
  54. Микалаускане Г. Ю., Вайчюнене В. В., Пешкус Ю. К., Тамошионас В. И. Получение моноклональных антител к gp51 антигену и их применение для ранней диагностики лейкоза крупного рогатого скота // Укр. биохим. журн.—1996.—68.—P. 89—94.
  55. Zheng L., Swanson M., Liao J., Wood Ch., Kapil S., Snider R., Loughin Th. A., Minocha H. C. Cloning of the bovine immunodeficiency virus gag gene and development of a recombinant-protein-based enzyme-linked immunosorbent assay // Clin. Diagn. Lab. Immunol.—2000.—7.—P. 557—562.
  56. Vidziunaite R., Dikiniene N., Miliukiene V., Mikulskis P., Kulys J. Chemiluminescence ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus antigens // J. Biolumin. and Chemilumin.—1995.—10.—P. 193—181.
  57. Muller M., Wittmann W. Cost-benefit analysis of the control and cure of enzootic bovine leukosis, described in the example of a selected territory // Arch. Exp. Veterinarmed.—1989.—43.—P. 933—942.
  58. Ярчук Б. М., Домбровский О. Б., Турсін Р. В., Корнієнко Л. Є., Довгаль О. В. Лейкоз великої рогатої худоби // Бібліотека вет. мед.—2000.—9, № 12.—С. 62.
  59. Мандигра М., Курток Б., Симонов Р. Науково-практичні основи багаторічного досвіду боротьби з лейкозом великої рогатої худоби у господарствах Львівської області // Вет. мед. України.—1999.—С. 10—11.
  60. Ігнатов М. М., Чванов О. М., Прилепський С. В., Пясок О. Н., Лопата Є. П. Удосконалення проти лейкозних заходів // Вет. мед. України.—2001.—С. 38—39.
  61. Гулюкин М. И., Замараева Н. В., Абрамов В. Н., Барабанов Н. И. Состояние и перспектива борьбы с лейкозом крупного рогатого скота // Ветеринария.—1999.—№ 12.—С. 3—8.
  62. Burkhardt H., Rosenthal S., Wittmann W., Starick E., Scholz D., Rosenthal H. A., Kluge K. H. Immunization of young cattle with gp51 of the bovine leukosis virus and the subsequent experimental infection // Arch. Exp. Veterinarmed.—1989.—43.—P. 923—927.
  63. Ohishi K., Kabeya H., Amanuma H., Onuma M. Peptide-based bovine leukemia virus (BLV) vaccine that induces BLV-Env specific Th-1 type immunity // Leukemia.—1997.—Suppl. 3.—P. 223—226.
  64. Wagner H. J., Blankenstein P., Bondzio A., Ebner D., Risse S. Increase of antigen production in BLV-infected cell lines via additional expression of tax // Zentralbl. Veterinarmed.—1995.—42B.—P. 543—550.

65. Llamas L., Goyache J., Domenech A., Arjona A., Suarez G., Gomez-Lucia E. Evaluation of virus excretion by cells persistently infected with the bovine leukaemia virus (BLV) using monoclonal antibodies // *J. Clin. Virol.*—2001.—22.—P. 31—39.
66. А. с. СРСР № 6795. Спосіб одержання вакцини проти лейкозу ВРХ / Л. І. Нагаєва // Опубл. 16.07.1993.
67. Нагаєва Л. І., Ковалюшко В. С., Прискока В. А., Адаменко О. П., Аранчий С. В., Педора В. Г., Сагло О. С., Ілюха А. П. Результаты исследований вакцины против лейкоза крупного рогатого скота // *Материалы Междунар. науч. конф. «Общая эпизоотология: иммунологические, экологические и методологические проблемы»* (20—22 сентября 1995).—Харьков, 1995.—С. 401—403.
68. Нагаєва Л. І., Цымбал В. І., Аранчий С. В., Педора В. Г., Сагло О. С., Ілюха А. П., Добросол Г. І. Научно-производственное внедрение вакцины против лейкоза крупного рогатого скота в комплексе мероприятий по оздоровлению от лейкоза крупного рогатого скота // *Материалы Междунар. науч. конф. «Общая эпизоотология: иммунологические, экологические и методологические проблемы»* (20—22 сентября 1995).—Харьков, 1995.—С. 404—407.
69. Kerkhofs P., Gatot J.-S., Knäpen K., Mammrickx M., Burny A., Portetelle D., Willems L., Kettmann R. Long-term protection against bovine leukaemia virus replication in cattle and sheep // *J. Gen. Virol.*—2000.—81.—P. 957—963.
70. Reichert M., Cantor G. H., Willems L., Kettmann R. Protective effects of a live attenuated bovine leukaemia virus vaccine with deletion in the R3 and G4 genes // *J. Gen. Virol.*—2000.—81.—P. 965—969.
71. Babuik L. A., Lewis J., Suradhat S., Baca-Estrada M., Foldvari M., Babuik S. Polynucleotide vaccines: potential for inducing immunity in animals // *J. Biotechnol.*—1999.—73.—P. 131—140.
72. Ballagi-Pordany A., Klintevall K., Merza M., Klingeborn B., Belak S. Direct detection of bovine leukemia virus infection: Practical applicability of a double polymerase chain reaction // *J. Vet. Med.*—1992.—39B.—P. 69—77.
73. Jacobs R. M., Song Z., Poon H., Heeney J. L., Taylor J. A., Jefferson B., Vernau W., Vall V. E. O. Proviral detection and serology in bovine leukemia virus-exposed normal cattle and cattle with lymphoma // *Can. J. Vet. Res.*—1992.—56.—P. 339—348.
74. Eaves F. W., Molloy J. B., Dimmock C. K., Eaves L. E. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukemia virus proviral DNA in cattle // *Vet. Microbiol.*—1994.—39.—P. 313—321.
75. Kintevall K. A., Ballagi-Pordany A., Naslund K., Belak S. Bovine leukemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves // *Vet. Microbiol.*—1994.—42.—P. 191—201.
76. Beier D., Blankenstein P., Fechner H. Möglichkeiten und Grenzen der Anwendung der Polymerase Kettenreaction (PCR) bei der Diagnose der Infektion mit dem bovinen Leukosevirus (BLV) des Rindes // *Dtsch. Tierarztl. Wschr.*—1998.—105.—S. 408—412.
77. Fechner H., Kurg A., Geue L., Blankenstein P., Mewes G., Ebner D., Beier D. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle // *J. Vet. Med.*—1996.—43B.—P. 621—630.
78. Fechner H., Kurg A., Blankenstein P., Mewes G., Geue L., Albrecht C., Ebner D. Direct use of cell lysates in PCR-based diagnosis of bovine leukemia virus infection // *Bert. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*—1996.—109.—P. 446—450.
79. Martin D., Arjona A., Soto I., Barquero N., Viana M., Gomez-Lucia E. Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of bovine leukaemia virus // *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Publ. Health.*—2001.—48.—P. 97—106.
80. Облан П. В., Глазко В. И., Созинов А. А. Вирус бычьего лейкоза и диагностика инфицированных животных // *Цитология и генетика.*—1997.—31.—С. 41—43.
81. Blankenstein P., Fechner H., Looman A. C., Beier D., Marquardt O., Ebner D. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of BLV provirus — a practical complement for BLV diagnosis? // *Bert. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*—1998.—111.—P. 180—186.
82. Zhang S., Troyer D. L., Kapil S., Zheng L., Kennedy G., Weiss M., Xue W., Wood C., Minocha H. C. Detection of proviral DNA of bovine immunodeficiency virus in bovine tissues by polymerase chain reaction (PCR) and PCR *in situ* hybridization // *Virology.*—1997.—236.—P. 249—257.
83. Gutierrez S. E., Dolcini G. L., Arroyo G. H., Rodriguez Dubra C., Ferrer J. F., Esteban E. N. Development and evaluation of a highly sensitive and specific blocking enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction assay for diagnosis of bovine leukemia virus infection in cattle // *Amer. J. Vet. Res.*—2001.—62.—P. 1571—1577.
84. Гулюкин М. И., Замораєва Н. В., Іванова Л. А., Грек К. П., Симонов А. В., Баркова Н. В. Методи діагностики лейкоза крупного рогатого скота // *Ветеринар. газета.*—2001.—№ 12.—P. 1—2.
85. Стародуб М. Ф., Артюх В. П., Пирогова Л. В., Нагаєва Л. І., Добросол Г. І., Павленко М. С., Гротевич В. О. Експресна діагностика лейкозу великої рогатої худоби на основі біосенсорного аналізу // *Вет. мед. України.*—2001.—№ 11.—С. 26—27.
86. Starodub N. F., Pirogova L. V., Artyukh V. P., Starodub V. M. Biospecific interactions on the optical transducer surface — the base of infection diagnostics // *Frontiers of multifunctional nanosystems: Proc. of NATO ARW / Eds E. Buzaneva, P. Scharff.*—Dordrecht, Boston, London: Kluwer Acad. press, 2002.—Vol. 2.—P. 369—376.

УДК 541.13:543:577.15.004.14:  
577.112.087:577.150.87:577.352.52  
Надійшла до редакції 20.01.02