Российская академия сельскохозяйственных наук
Государственное научное учреждение
Северо-Кавказский научно-исследовательский институт животнводства

Ковалюк Н.В., Якушева Л.И.

Методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота

Краснодар - 2012

УДК 636.2.08231:575

Учебное пособие разработано доктором биологичесих наук Коовалюк Н.В., Якушевой Л.И.

В настоящем учебном пособии изложены общая характеристика вируса лейкоза, методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота, наследственная предрасположенность животных к этому заболеванию и методы ее выявления.

Допущено Министерством сельского хозяйства Российской Федерации в качестве учебного пособия для системы дополнительного профессионального образования

© Россельхозакадеимя

© ГНУ СКНИИЖ

СОДЕРЖАНИЕ

		стр.
	Введение	4
1.	Общая характеристика вируса лейкоза крупного рогатого скота и заболевания, вызываемого этим вирусом	4
2.	Наследственная предрасположенность к лейкозу у крупного рогатого скота и методы ее выявления	12
3	Методы диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота	17
4	Практический опыт использования методов ДНК диагностики для оздоровлени к этому заболеванию я хозяйств от лейкоза КРС	22
	Список литературы	29

ВВЕДЕНИЕ

Лейкоз крупного рогатого скота - хроническая инфекционная болезнь с длительным латентным периодом, поражающая органы кроветворной системы (А.П. Кузнецова, В.П. Смирнов, 1998; А.Ф. Валихов, 1988). Заболевание характеризуется патологически усиленной пролиферацией лимфоидных клеток в местах их возникновения и за их пределами, выбросе этих клеток в циркулирующую кровь, появлении злокачественных образований в кроветворных и других органах и тканях (Л.Г. Бурба, А.А. Кунаков, 1983; В. А. Крикун, 2002).

В настоящее время лейкоз широко распространён в стадах крупного рогатого скота ряда стран, в том числе и Российской Федерации. Поиск путей эффективной диагностики и экономически грамотных схем ликвидации этого заболевания – одна из важнейших задач современной ветеринарной науки.

1. Общая характеристика вируса лейкоза крупного рогатого скота и заболевания, вызываемого этим вирусом

Название болезни "лейкоз" происходит от греческого слова LEUCOS, что означает белый. Начало учения о лейкозе связано с именем известного немецкого морфолога Рудольфа Вирхова, который в 1845-1953 гг. впервые описал болезнь у человека и выделил ее в самостоятельную нозологическую единицу под названием "лейкемия" или белокровие, поскольку белые элементы крови придают ей более или менее белую окраску. При этом автор выделил две ее формы: селезеночную, проявляющуюся увеличением селезенки и появлением в крови больных лейкоцитарных форм и лимфатическую, характеризующуюся увеличением лимфоузлов и появлением малых клеток – лимфоцитов (информация с сайта www.vetlab.spb.ru.).

Несколько позднее появились сообщения по лейкозу животных. Первый случай лейкемии у лошади описал патологоанатом Дрезденского ветеринарного института г. Лейзеринг в 1858 году. О. Зидамгродский в 1871 г. сделал сообщение о лейкемии у собак и кошек, а в 1878 году он же описал эту болезнь у крупного рогатого скота. В обзоре литературы по лейкозам животных Н. Добберштейн отметил, что лейкозом болеют 29 видов животных и 15 видов домашних и диких птиц. По мнению Визнера, есть все основания считать, что лейкоз диагностируют у всех видов млекопитающих.

В процессе изучения эту болезнь называли по-разному: лейкемия, белокровие, рак крови, гемобластозы, энзоотический лейкоз. В.Эллерман предложил заменить название болезни "лейкемия" термином "лейкоз", который более полно характеризовал патологический процесс, развивающийся в кроветворной ткани, независимо от изменений, наблюдаемых в периферической крови. Несколько позднее Х.Х.Владос, Н.А.Краевский и другие исследователи предложили новое название болезни "гемобластозы", т.е. опухолевые заболевания крови, так как при лейкозе наблюдали гиперплазию клеток кроветворной и лимфоидных тканей с развитием злокачественных опухолей. Несмотря на обоснованность термина "гемобластозы", в нашей стране принято употреблять термин "лейкоз".

Опухолевая природа лейкозов была подтверждена многими исследователями более чем столетие тому назад, в т.ч. нашими соотечественниками К.Славянским и А.Щастным, и в настоящее время является общепризнанной (www.vetlab.spb.ru). По характеру и месту локализации опухолевых клеток к определенным росткам гемопоэза гемобластозы разделены на две группы:

- лейкозы – системные поражения органов кроветворения, включающие лимфоидную, миелоидную, моноцитарную и недифференцированную формы;

- гематосаркомы – сопровождающиеся опухолевым ростом. К ним относятся лимфосаркома, ретикулосаркома, лимфогрануломатоз и миеломная болезнь.

Первая отличается системностью поражения кроветворной и лимфоидной тканей с вовлечением в процесс костного мозга, селезенки и лимфатических узлов. Болезни второй группы характеризуются поражением лимфоидной ткани, т.е. лимфоузлов и селезенки. Опухоли, состоящие из клеточных элементов, природу которых трудно установить, относятся к числу недифференцированных лейкозов. По данным литературы, у крупного рогатого скота наибольшее распространение имеет лимфоидный лейкоз.

Важнейшим путем познания сути болезни являются экспериментальные исследования. Первым шагом на пути эксперимента в онкологии явились перевивка, трансплантация опухолей, впервые осуществленная нашим соотечественником, магистром ветеринарных наук М.А.Новинским в 1876 году на собаках.

Выдающуюся роль в развитии учения об экспериментальном лейкозе сыграла работа Эллермана и Банга (1908). Им удалось воспроизвести заболевание у подопытных кур не только перевивкой лейкозной ткани и крови, но и использовании их фильтраты, впервые доказав инфекционную природу болезни.

В последующие годы для воспроизведения лейкоза крупного рогатого скота стали использовать в качестве экспериментальных биологических объектов телят и овец. Многим исследователям (Гетце, Розенбергер, Олсон, Бендиксен, Филатов, Бусол и др.) удалось доказать возможность их заражения путем инокуляции различных материалов от больного лейкозом крупного рогатого скота, можно утверждать, что лейкоз - это заразная болезнь.

Немецкими исследователями П.Кнут и О. Фолькман выявлены изменения в лейкоцитарной формуле. Ими установлено увеличение общего количества лейкоцитов, лимфоцитов и появление ядерных клеток, являющихся, по их мнению, специфическим признаком для заболевания. Эти же авторы (1916) провели обобщение данных боенской статистики по лейкозу на территории Германии. Разносторонность изучения этиологии привело к многообразию выдвинутых теорий происхождения лейкозов и опухолей. Среди них необходимо выделить следующие: теория хронического раздражения (Вирхов, 1839), эмбриональная (Конгейм, 1877), генетическая (Хартенштейн, 1897), вирусная (Эллерман, Банг, Раус, 1908-1911), физическая (Клунет, 1910), химическая (Гемагива, Ихикава, 1918), гормональная (Лакасагне, 1932), вирусо-генетическая (Зильбер, 1968). Получение положительных научных результатов является основой для объяснения причин возникновения болезни (www.vetlab.spb.ru).

Известно, что патогенез каждого заболевания, прежде всего, обусловлен этиологическим фактором, а затем факторами, способствующими его возникновению и развитию. Вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) является этиологическим фактором лейкоза у коров, телят, реже у других животных (в основном при экспериментальном заражении): овец, коз и кроликов (Г.Ф. Коромыслов, 1995, Н. В. Замараева, М. И. Гулюкин, Н. Н. Снежков, 1996, C.Olson et al., 1981, Л. Б. Прохватилова и др., 2001), имеются данные об экспериментальном заражении обезьян (H. M. McClure, M.E. Kuling, P.Ph. Custer, 1974). ВЛКРС впервые удалось выделить в 1969 году, но в экспериментальных условиях болезнь была воспроизведена ещё в 1916 году путём введения подопытным телятам и взрослым животным крови и суспензии из лимфатических узлов от больной коровы (J. M. Miller, L. D. Miller, C. Olson, K. G. Gillet, 1969, В.В. Макаров, 1999).

Вирус лейкоза крупного рогатого скота относится к семейству ретровирусов (Х.С. Салимов, 1986). Семейство ретровирусов (Retroviride) по данным международного комитета по таксономии вирусов разделено на 7 родов (Б. Г. Орлянкин, 1996; П. Н. Смирнов, В. В. Храмцов, В. В. Смирнова, 2000). Наиболее распространенными среди домашних животных являются представители двух родов: рода Deltaretrovirus, объёдиняющего вирус

лейкоза крупного рогатого скота, Т – лимфотропные вирусы человека 1 и 2 типов, вирус лейкоза обезьян и рода Lentivirus, объединяющего 5 подродов лентивирусов (от латинского lenti – медленный). К ним относят лентивирусы коз и овец, вирус иммунодефицита приматов, лентивирусы лошадей, лентивирусы кошек, лентивирусы крупного рогатого скота. Ретровирусным инфекциям свойственен ряд общих признаков: длительность инкубационного периода, хроническое или латентное течение, прижизненная персистенция вируса и строго ограниченный круг восприимчивых животных (D. Beier, P. Blankenstein, H. Fechner, 1992; P. Lundberg, G. Splitter, 2000; А.П. Лиманский, L. Geue, О.Ю. Лиманская, D. Beier, 2004).

Ретровирусы проникают в клетку путем эндоцитоза, РНК освобождается и транскрибируется в двухцепочечную ДНК - копию, которая встраивается как провирус в ДНК клетки хозяина. Интегрированный в геном вирус, остается не доступным для воздействия специфических антител и персистирует в организме на протяжении всей жизни животного (В. А. Крикун, 2002). В благоприятных условиях с интегрированного провируса транскрибируется как вирусная РНК – копия, так и РНК, которые транслируются в белки. Затем происходит сборка новых вирионов, которые отпочковываются от клеточной мембраны для инфицирования новых клеток.

Зрелые вирионы состоят из центрально расположенного электронно-плотного нуклеотида, диаметр которого варьирует от 50 до 90 нм. Сердцевина вириона (cor) отделена от вирусной оболочки промежуточным слоем. Внешняя оболочка представлена двухконтурной мембраной; на её поверхности имеются шипики длинной 8-11нм. с пуговкообразными утолщениями на концах (В.М. Авилов, В.М. Нахмансон, 1995; А.Д. Белов, Г.В. Рогожина, 1997; А.Д. Альштеин, 2000).

Основным биохимическим признаком семейства Retroviridae является наличие в вирионе обратной транскриптазы (ОТ) (РНК – зависимой ДНК – полимеразы) (Л.Г Бурба, 1988, Н.В. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина, 1991, Б.Г. Орлянкин, 1996, Л.Б. Прохватилова, 1998).

Геном вируса лейкоза и морфологическая структура представлены на рис 1. LTR – длинные концевые повторы (long terminal repeat); gag – ген кодирующий белки сердцевины (определяет группоспецифический антиген (group specific antigen); pol – ген, кодирующий обратную транскриптазу (polymerase); env –ген кодирующий белки оболочки (envelope); XBL – не идентифицированная область (Л.Б. Прохватилова и др, 1998).

Белки ВЛКРС представлены негликолизированными (p10, p12, p15, p24) и гликолизированными (gp30 с молекулярной массой 30-50кД и gp 51 с молекулярной массой 51-70кД).

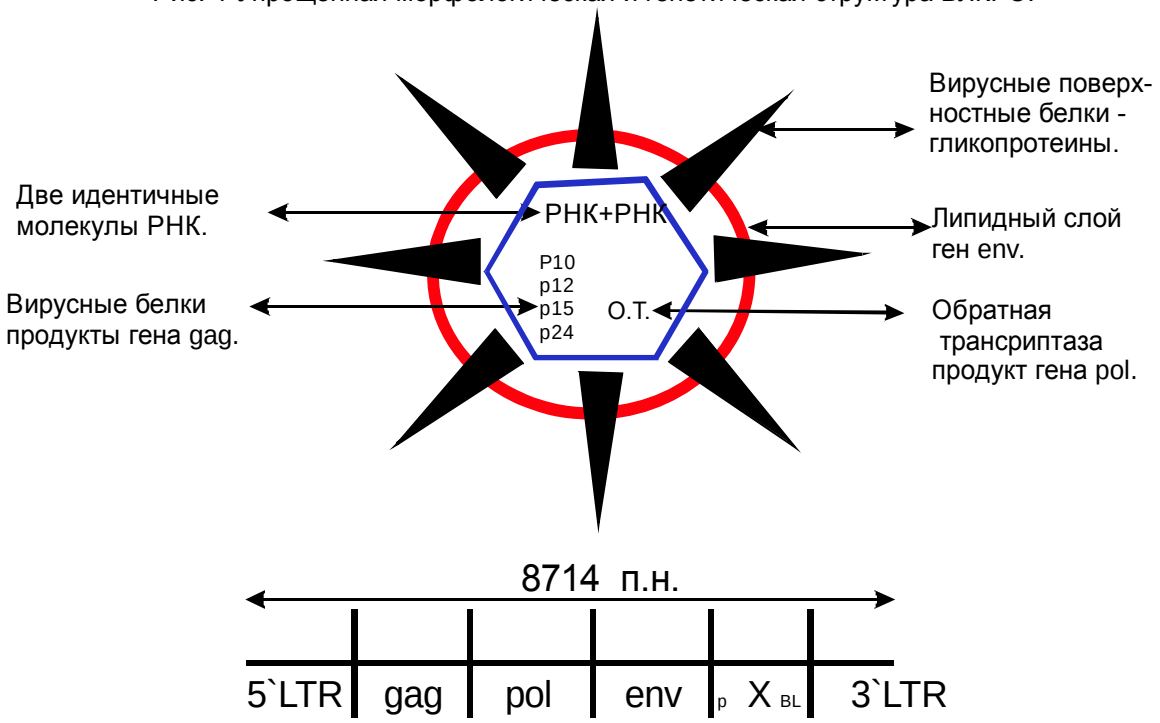
Белки (p10, p12, p15, p24) относятся к структурным внутренним белкам. Первым выделенным белком был p24. Этот белок является нейтральным и умеренно гидрофобным.

Белок p15 – слабый основной белок, не содержащий остатки метионина. Он является главным фосфопротеином вирионов ВЛКРС. Имеет две молекулярные формы и участвует в комплексах с гомологичными молекулами, с p10, липидами и РНК вируса.

Белок p12 обогащен пролином, лизином и аргинином. Его молекула имеет низкий уровень вторичной организации и тесно связанна с вирусной РНК. Данный белок образован 69 аминокислотами.

Белок p10 – сильный основной белок способный связываться с однонитевой ДНК (Y. Da, R.D. Shanks, J.A. Stewart, H.A. Lewin, 1993, Y. Aida et al., 1995, Н.И. Снежков, 1995).

Рис. 1 Упрощенная морфологическая и генетическая структура ВЛКРС.



Обратная траскриптаза или РНК-зависимая ДНК-полимераза – фермент, необходимый для репликации РНК-содержащих онковирусов. РНК-зависимая ДНК-полимеразная активность связанна со всеми четырьмя дезоксирибонуклеозидтрансфосфатами а так же с Mg^{2+}.

Главные гликопротеины вирусной оболочки gp 51 и gp 30. Причем gp 51 трансмембранный белок, содержащий 268 аминокислот и являющийся главным антигеном вируса лейкоза, ответственным за образование нейтрализующих антител. При помощи моноклональных антител было выявлено 8 антигенных детерминант, обозначаемых как A,B,C,D,I,F,G,H. Из которых F,G,H отвечают за выработку нейтрализующих антител.

В отличие от Т – клеточного лейкоза человека ВЛКРС поражает В – лимфоциты, встраиваясь в геном клетки – хозяина в виде ДНК – копии (провируса). Интегрированный в клеточный геном провирус, может долгое время не экспрессироваться, чем и объясняется наличие длительного латентного периода в течение заболевания (Б. Г. Орлянкин, 1996, S.Tajima, Y.Aida, 2005).

Доказано, что единственным местом локализации ВЛКРС являются В – лимфоциты. Поэтому выделение вируса возможно с кровью и любым секретом или экскретом, содержащим лимфоциты: молоком, слюной, слизистыми секретами, фекалиями, мочой и др. (М. И. Гулюкин, Н. В. Замараева, В. А. Седов и др., 1999, С. А. Мурватуллоев, 1999).

Существует два основных пути передачи вируса: вертикальный – от матери – плоду и горизонтальный – от одного животного – другому (В.А. Крикун, 1985; Г.Ф. Коромыслов, В.П. Шишков, 1993; Н.В. Замараева, М.И. Гулюкин, М.Н. Снежков, 1996; O.C. Straub, 1978; K. Oshima et al., 1981). Инфицирование плода происходит трансплацентарным путем через кровь матери. Частота заражения новорожденных телят зависит от стадии инфекционного процесса матери. От коров с гематологическими проявлениями болезни выявляют 18–20 % телят, инфицированных ВЛКРС, от коров с бессимптомной инфекцией – 2–3% (Г.Ф.Коромыслов, М.И. Гулюкин, Г.А. Симонян,

1999).

Передача ВЛКРС восприимчивому крупному рогатому скоту может осуществляться со всеми секретами и экскретами при попадании в них лимфоцитов, зараженных ВЛКРС (Н.И. Петров, 1997; Н.И. Петров, 1998; Н.И. Петров, 2004) . Установлено, что для экспериментального заражения телят достаточно ввести им внутрикожно 2500 лимфоцитов крови от зараженного животного (такое количество лимфоцитов содержится примерно в 0,0005 мл цельной крови). Взаимодействие ВЛКРС с восприимчивым крупным рогатым скотом происходит на уровне генетического аппарата лимфоидной клетки и обуславливает пожизненную персистенцию вируса в макроорганизме (Р.Ф. Галеев, 1999, Ю.П. Смирнов, 1999)

Среди основных факторов, обуславливающих передачу вируса лейкоза, наибольшее значение имеет перенос возбудителя через кровь и препаратов из нее, при ветеринарных и зоотехнических обработках, т.е. ятрогенный способ передачи инфекции (В. М. Авилов, В. М. Нахмансон, 1995).

В сперме инфицированных быков-производителей ВЛКРС не выявлен. Не наблюдается определенного влияния передачи ВЛКРС потомству от серопозитивных быков-производителей при естественном оплодотворении серонегативных коров. Однако у быков с воспалением генитальных органов в сперме могут быть лимфоциты, инфицированные ВЛКРС. Экспериментально установлено, что коров можно инфицировать путем нанесения таких лимфоцитов на слизистую оболочку матки. Изучение возможности передачи вируса лейкоза при эмбриопересадках подтвердили отсутствие передачи ВЛКРС от коров доноров коровам-реципиентам через эмбрионы (Апалькин В.А., Гулюкин М.И., Петров Н.И., 2005). В эксперименте J. Kohara, S. Konnai, M. Onuma (2006) была доказана возможность инфицирования здоровых животных ВЛКРС при ректальном исследовании. У трех животных из четырех после ректального исследования с использованием одной перчатки выявляли провирусную ДНК методом ПЦР через 1-5 недель, а антитела в РИД через 7-10 недель.

Механизм передачи ВЛКРС еще окончательно не изучен. Экспериментально подтверждена возможность заражения животных путем переноса ВЛКРС при ректальной пальпации в случае повреждения слизистой оболочки. Не получено достаточных доказательств о влиянии жалящих и кровососущих насекомых в распространении лейкоза (П.Н. Смирнов, В.В. Храмцов, В.В. Смирнова, 2005, А.М. Смирнов, 2005).

В отношении роли секретов слюнных, слезных желез, мочи и кала в распространении возбудителя большинство исследователей приходит к выводу, что вирус лейкоза в них не обнаруживают, а при контаминации их кровью инфицированного ВЛКРС он не может в них сохраняться длительное время, т.е. эти секреты и экскреты не могут служить существенными факторами передачи ВЛКРС (В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко и др., 1998, Ю.П. Смирнов, 1999, М.И. Гулюкин, Г.А. Симонян, А.К. Мироменко, 2005).

Учитывая все это, надо полагать, что в практических условиях основной способ заражения восприимчивого организма сопряжен с нарушением правил асептики, т.е. с попаданием лимфоцитов в организм восприимчивого животного при инъекциях, нумерации, хирургических операциях, фиксации животных при проведении ветеринарно-зоотехнических манипуляций. Совместное проведение отелов здоровых, инфицированных ВЛКРС и больных животных способствует распространению инфекции (**www.vetlab.spb.ru**) .

Клиническая картина злокачественных заболеваний кроветворной ткани крупного рогатого скота отличается большой вариабельностью признаков в зависимости от стадии болезни, её продолжительности, формы проявления и поражения тех или иных органов (А. Д. Белов, Г. В. Рогожина, 1997). У телят 1,5 – 3 - месячного возраста все виды гемобластозов характеризуются обычно острым течением и заканчиваются гибелью через 1 – 2 недели после появления признаков болезни. У молодняка в возрасте 8 – 9 месяцев или 1 – 2 года болезнь протекает в виде подострых, редко острых случаев. Развитие

заболевания у взрослых животных характеризуется на начальной стадии появлением специфических антител к вирусу ВЛКРС (В.М. Нахмансон, М.И Гулюкин, Е.А. Дун, 1997). На этой стадии сохраняется удовлетворительная упитанность, а так же уровень молочной продуктивности. Такие животные приносят внешне здоровых телят (Т. П. Кудрявцева, 1980). У 30% животных, имеющих высокий титр антител к ВЛКРС, болезнь переходит в следующую стадию – персистентный лимфоцитоз (Ю. П. Смирнов, 1999).

При этом значительно (на 22–30%) снижается молочная продуктивность коров (А.П. Кузнецов, И.Н. Никитин, 1993, А.И. Кузин, Е.Н. Закрепина, 1997, Y. Da, R.D. Shanks, J.A. Stewart, H.A. Lewin, 1993), нарушаются физиологические процессы в клетках (C. Debacq, B. Asquith, M. Reichert, A. Burny, , R. Kettmann, L. Willems, 2003). По действующему законодательству (Приказ № 359 Минсельхозпрода РФ от 11 мая 1999 года) животные с такой стадией болезни изолируются и сдаются на убой. Американскими исследователями установлено, что ежегодные экономические потери, связанные с лейкозом крупного рогатого скота сельскому хозяйству США обходятся в 91 миллион долларов ежегодно (Yang D., 1993). У 3 – 5% вирусоносителей болезнь переходит в опухолевую стадию, которая характеризуется появлением злокачественных образований в органах кроветворной системы и за ее пределами, и заканчивается смертью животного (V. J. Stear, C. K. Dimmock, 1988, Н.С. Мандыгра, 1995; Е.А. Маринин, А.П. Кузнецов, 1997).

Развитие лейкоза у крупного рогатого скота, как правило, сопровождается гипоальбуминемией и диффузной гипергаммаглобулинемией. Снижается содержание в сыворотке крови альбуминов до 1,72% (норма около 4%), что связано со сложным комплексом изменений их метаболизма, с патологическим нарушением паренхимы печени, проницаемости и целостности стенок кровеносных и лимфатических сосудов в различных частях тела, специфическим влиянием злокачественного процесса, а в ряде случаев и с нарушением обменной функции желудочно-кишечного тракта (А.А. Кудряшов, Н.И Петров, 1999).

У больного лейкозом крупного рогатого скота, в связи с гликоальбуминемией, вызывающей комплекс недостаточности важных функций, выполняемых альбуминами как переносчиков метаболитов, гормонов (жирных кислот, билирубина, кальция, тироксина, гидрокортизона, эстрогенов и т.д.) и белков, усугубляется дискоординация физиолого-биохимических процессов в организме, обусловливая комплекс вторичных расстройств у животных. В некоторых случаях повышается уровень альфа-глобулинов, в основном гликопротеидов, принимающих активное участие в ответной реакции организма.

При развитии лейкозного процесса происходит нарушение иммунных реакций (С.И. Джунина, 1994, А.Н. Деринов, Н.П. Овдиенко, А.Х. Найманов, 2006).

Выявлено нарушение метаболизма аминокислот, проявляющееся в изменении состава свободных аминокислот сыворотки крови, органов, а также плазмы и лейкоцитов. На глубокие расстройства нормального обмена аминокислот при лейкозе указывают результаты исследований, выявившие характерные изменения в содержании триптофана и его метаболитов. При этом указывается, что некоторые метаболиты триптофана обладают лейкозогенными свойствами.

Молоко и мясо животных с гематологической и опухолевой стадиями заболевания, как показали проведенные исследования, обладает токсичностью по отношению к культуре клеток перевиваемой почки поросенка, причем эффект токсичности возрастает по мере развития лейкозного процесса (В. Н Смирнова, 2000). Установлено, что продукты, полученные от больных лейкозом животных, содержат вредные метаболиты триптофана и других циклических аминокислот и, следовательно, являются экологически опасными для человека (П.Н. Смирнов, 1998). Потенциальную опасность для здоровья человека представляет наличие вируса или его фрагментов в продуктах питания.). Есть данные о способности некоторых онкогенных вирусов преодолевать межвидовые барьеры (K. Klintevall , 1991; М.И. Гулюкин, Е.А. Дун, Н.В. Баркова, Н.И. Петров, С.М. Пау, 2000).

При производстве молочных продуктов используются различные режимы пастеризации. При производстве сметаны, масла, кисломолочных напитков, йогуртов чаще всего применяют пастеризацию при 85-87 °С с выдержкой 5-7мин или 90-95 °С с выдержкой 2-3мин. Однако при производстве сыров такие температурные режимы пастеризации не приемлемы, так как ухудшают способность молока к сычужному свертыванию. В сыроделии используется режим - 72 °С с выдержкой 15с., что может быть недостаточно для инактивации ВЛКРС (Свириденко Г.М., 2003).

Существует мнение о том, что возможна активация «молчащих» вирусов, встроенных в геном человека и утративших участки генов gag, pol, env при поступлении этих участков с другим не дефектным вирусом (В.Н. Сюрин., Р.В. Белоусова, Н.В. Фолина, 1991, Б.С. Сенченко, А.Н. Трошин, Я.М. Кавунник, 1998).

Опасность присутствия ВЛКРС в продуктах питания подтверждается данными Y. Aida, M. Miyasaka, K. Okada (1989), показавшими, что при экспериментальном заражении овец развитие лимфосаркомы происходит чаще и быстрее, чем при аналогичном заражении крупного рогатого скота. Аналогичные данные приведены в работе F. Dequiedt, G. Cantor, T. Valerie (1999).

Однако на протяжении многих лет сотрудники различных научных учреждений проводили обширные эпидемиологические и эпизоотические исследования, в результате которых взаимосвязи заболеваемости лейкозом животных и естественным инфицированием человека установлено не было, несмотря на то, что по структурному строению и функциональным особенностям ВЛКРС схож с вирусом Т-клеточного лейкоза человека. Длительные наблюдения за людьми, обслуживающими скот в неблагополучных по лейкозу хозяйствах, а также занятых на убое и переработке больного или инфицированного скота, повышенного риска заболеваемости не выявили (В. Мадисон, Л. Мадисон, 2006). В ряде работ иностранных авторов также получены отрицательные результаты при обследовании людей, работающих с больными животными и вирусным материалом. Так, в одном эксперименте при обследовании 400 больных лейкозами и опухолями были получены отрицательные результаты с антигеном вируса лейкоза КРС (Н.И. Петров, 2001). В исследованиях J. Lee, Y. Kim, Kang C.S. (2005) пробы крови от 517 больных различными онкологическими заболеваниями методом ПЦР были проанализированы на наличие ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота. Ни в одном случае положительный результат не получен.

В большинстве стра - членов Евросоюза приняты и выполняются на национальном уровне программы по искоренению наиболее распространенных инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных: инфекционного ринотрахеита, диареи, лейкоза КРС. Так, например, в Швеции программа по искоренению лейкоза была начата в 1990 году. На тот момент ситуация с распространением лейкоза в Швеции была наихудшей среди стран Западной Европы: 10% всех коров, возраст которых составлял более 2 лет были инфицированы ВЛКРС. В результате 10 – летнего выполнения программы по искоренению лейкоза Швеция имеет возможность объявить себя свободной от лейкоза (А. П. Лиманский, О. Ю. Лиманская, 2001).

Во Франции в 1988 г. была разработана и реализована новая программа ликвидации лейкоза. В течение года по результатам массового серологического исследования на лейкоз (85% скота в 79% стад страны) было выявлено и забито 110 тыс. животных. Общая стоимость программы составила 177,7 млн. франков (более 30 млн. долларов).

В последние 5 лет в Соединенных Штатах Америки была принята Национальная программа борьбы с лейкозом, которая субсидируется Федеральным правительством. Поводом данному событию послужили: тенденция роста заболеваемости, требования ужесточения мер борьбы с лейкозом со стороны стран ЕЭС, отказ от импортных закупок США племенного молодняка, спермы и эмбрионов.

Цель этой программы - через систему сертификация благополучия стад по лейкозу создать фермерам максимум благоприятствования при осуществлении импортно-экспортных операций.

Говоря о стратегическом подходе к проблеме лейкоза крупного рогатого скота в США, следует отметить, что в научных центрах соответствующего профиля рассматривались три возможных принципиальных подхода к решению проблемы:

- использование активных средств специфической защиты.
- серологическая диагностика (иммунодиффузия в геле агара (РИД) и иммуноферментный анализ (ИФА)) и удаление или убой инфицированных ВЛКРС животных.
- изменение технологии ведения животноводства, предусматривающее нейтрализацию основных факторов и путей передачи ВЛКРС от инфицированных животных.

Все три варианта отрабатывались на крупном рогатом скоте, содержащемся на экспериментальных базах Луизианского, Мичиганского университетов, Национального центра болезней животных (США), а также в отдельных научных центрах других стран.

По результатам проведенных исследований были сделаны выводы о том, что использование вакцины против лейкоза крупного рогатого скота (экспериментальный вариант) в настоящее время не представляется возможным. Появившиеся в печати сообщения об удачном испытании противолейкозных вакцин, подтверждены не были (А.Д. Альштеин, 2000, W.H. Ward, C.K. Dimmock, F.W. Eaves, 1992; R.C. Daniel, M.H. Gatei, M.F,Good, D.B. Boyle, M.F. Lavin, 1993). Наиболее эффективный (рекомбинантный) тип вакцины, разрабатываемый в Японии, находится сегодня в стадии экспериментальной проверки.

Второй вариант оздоровления был основан на применении серологического метода диагностики. Этот метод (РИД) достаточно хорошо отработан в производственных условиях и нашел широкое применение, прежде всего, в странах ЕЭС.

Третий вариант предполагал своевременное выявление инфицированных животных и выполнение технологических (хозяйственных) и специальных (ветеринарных и др.), мероприятий в строго определенной последовательности, предотвращающей распространение ВЛКРС от источника инфекции к восприимчивым животным.

Следует отметить, что последний вариант сопряжен с минимальными экономическими издержками, однако предполагает более длительные (до 5 лет) сроки оздоровления ферм от лейкоза.

Добровольные программы борьбы с лейкозом крупного рогатого скота разработаны и приняты в свое время в Канаде, Японии и некоторых других странах мира (Р.Ф. Галлиев, А.А. Руденко, Ф.Р. Валиев, 2003).

Основные положения этих программ включают ежегодное 2-3-х кратное исследование животных в РИД, отдельное (но не изолированное) содержание инфицированных животных, выбраковку коров (в том числе и по причине возраста, продуктивности) и интенсивную замену маточного стада неинфицированным молодняком. Такая программа при исключении горизонтальной передачи ВЛКРС, позволила за относительно короткое время вести эффективную оздоровительную работу в этих странах, причем с минимальными экономическими издержками. Однако программа подтвердила свою эффективность только в случае не высокой инфицированности стад ВЛКРС.

В Великобритании были приняты более радикальные меры борьбы с лейкозом крупного рогатого скота, позволившие добиться практически повсеместного оздоровления стад. При этом группа экспертов провела тщательную экономическую оценку стоимости выполненных работ, которая включала: количество инфицированных животных в одном стаде, число коров, павших по причине лейкоза, количество скота с клинико – гематологическими признаками, стоимость скота, выбракованного по причине вирусоносительства, затраты, связанные с выполнением процедур дезинфекции, стоимость последующего контроля благополучия. При оценке двух вариантов оздоровления была установлено, что в случае выявления (в РИД) и выбраковки только инфицированных животных, затраты составили 23,6 млн. фунтов стерлингов (около 40,0 млн. долларов). Ликвидация стад, неблагополучных по инфекции ВЛКРС, обошлась налогоплательщикам в 37,2 млн. фунтов стерлингов (более 60,0 млн. долларов).

Изложенные материалы свидетельствуют о том, что практически во всех экономически развитых странах разработаны и реализуются государственные программы оздоровительно-профилактических мероприятий по лейкозу крупного рогатого скота. В Российской Федерации эти программы разрабатываются лишь в отдельных регионах (М.И. Гулюкин, Г.А. Симонян, А.В. Шишкин, 2004; И.М. Донник, А.Т. Татарчук, Н.А. Корнилов, 2005). По мнению П.Н.Смирнова (2007) в нашей стране оздоровленными от лейкоза КРС можно считать Ленинградскую, Вологодскую, Свердловскую области, республику Саха.

2. Наследственная предрасположенность к лейкозу у крупного рогатого скота и методы её выявления

Инфекционные заболевания домашних животных оказывают существенное влияние на их продуктивность, жизнеспособность и рыночную ценность. Сумма этих эффектов приводит к значительным экономическим потерям, как отдельных производителей скота, так и агропромышленного комплекса в масштабах страны. Вследствие этого, значительные усилия затрачиваются на профилактику и лечение инфекционных заболеваний в животноводстве. Эти усилия с одной стороны являются чрезвычайно затратными за счет стоимости вакцин, антибиотиков, рабочей силы, а с другой имеют и ряд негативных эффектов, например, такие как фармацевтические остатки в пищевых продуктах и растущая резистентность бактерий к антибиотикам. Эти неблагоприятные последствия традиционных профилактических и лечебных мер обусловливают необходимость поиска новых, эффективных и менее дорогих подходов к предупреждению и контролю инфекционной патологии в сельскохозяйственном производстве. Кардинальное решение проблемы может заключаться в выяснении механизмов генетической резистентности к инфекционным заболеваниям у сельскохозяйственных животных и практическом приложении этой информации к их разведению.

Тот факт, что отдельные представители сельскохозяйственных животных, в одинаковой мере подвергавшиеся контакту с возбудителями инфекций, различаются чувствительностью к ним, был известен давно. Эффективное использование информации об естественной резистентности животных к инфекционным заболеваниям в сельскохозяйственной практике зависит от идентификации контролирующих ее геномных локусов. Накопление информации об организации геномов млекопитающих и бурный прогресс в технологиях анализа вариабельности генов создали реальные предпосылки для выявления таких локусов у сельскохозяйственных животных. В настоящее время среди защитных механизмов организма млекопитающих, включающихся при соприкосновении организма с возбудителями инфекционных заболеваний, выделяют: неиммунную неспецифическую резистентность, неспецифический и специфический иммунный ответ. Список генов, участвующих в реализации этих механизмов, уже сейчас достаточно широк и постоянно обновляется в связи с открытием дополнительных эффекторных и регуляторных молекул, ферментов и рецепторов, а также других клеточно-поверхностных и иных белков путей

трансдукции сигналов. Эта информация позволяет проводить исследования по выявлению ассоциаций между наличием у животного определенных аллельных вариантов, конкретных “генов-кандидатов” и его резистентностью (чувствительностью) к инфекционному агенту. Выбор “генов-кандидатов” и определяется списком белков, потенциально участвующих в реализации механизмов защиты организма от инфекций.

Существует мнение, что резистентность и восприимчивость – это две противоположности одного явления. Однако резистентность и восприимчивость – это два дискретных и независимых явления (R.J. Hawken, C.W. Beattie, L.B. Schook, 1998).

Наиболее вероятно, что восприимчивость к болезни наследуется как моногенный признак, то есть допускается вовлечение одного гена, в отличие от резистентности, которая, по всей видимости, наследуется как полигенный признак (H.A. Levin, M.C. Wu, J.A. Steward, 1988). Несмотря на это мнение, есть некоторые примеры того, что резистентность наследуется как моногенный признак (S.N. Rumyantsev, 1992).

Иммунный ответ – это высокоспецифическая реакция организма на чужеродные антигены, в которой участвуют В - и Т- лимфоциты (соответственно гуморальный и клеточный иммунитет) и макрофаги.

Генетическая обусловленность гуморального иммунитета была впервые показана на кроликах, а затем на других видах животных: мышах, курах, КРС, овцах, свиньях (К. В. Жучаев, 1992). Генетический контроль иммунного ответа осуществляется большой группой генов, посредством регулирования выраженности и характера клеточных взаимодействий между макрофагами, Т- и В – лимфоцитами.

Исследования на лабораторных животных выявили возможность эффективной селекции на пик антителогенеза после иммунизации. Классическим примером селекции на иммунный ответ служит опыт на мышах, в котором максимальная разница между пиками титров антител после иммунизации эритроцитами барана у высоко- и низко – реагирующих линий была получена через 16 поколений. Далее межлинейные различия остались неизменными, подтвердив гомозиготность по соответствующим локусам (G. Biozzi et.al., 1982).

Первая попытка связать полиморфные системы с устойчивостью к заболеваниям была сделана после открытия групп крови у людей. Такая связь впервые была найдена между кровью группы А и раком желудка в 1953 году (I. Aird, H. H. Bentall., J. A. Roberts, 1953).

В настоящее время установлено, что антигены, кодируемые главной генетической системой гистосовместимости – МНС (Major Histocompatibility Complex) антигены, имеют огромное значение для иммунологического распознавания и взаимодействия клеток в иммунном ответе. Каждый из генов МНС вносит свой вклад в особенности фенотипического проявления иммунного ответа (A Pue1, P.C. Groot, M.G. Lathrop, P. Demant, D. Mouton, 1995, A. Pue1, J.C. Mevel, Y. Bouthillier, N. Feingold, W.H. Fridman, D. Mouton, 1996; A. Puel, D. Mouton, 1996).

Существуют два класса МНС – антигенов – класс I и класс II. Антигены первого и второго классов представляют собой гликопротеины. Гликопротеины МНС класса I имеются практически на всех содержащих ядро соматических клетках, где они могут составлять до 1% белка плазматической мембраны. Молекулы же МНС класса II располагаются в основном на клетках, имеющих отношение к иммунным ответам. Вероятно, содержащие вирусные частицы клетки, связываются с гликопротеинами МНС класса II на поверхности антиген – представляющих клеток и благодаря этому активируются Т – лимфоциты, уничтожающие комплекс (вирус - содержащая клетка + антиген – представляющая клетка) (Б. Албертс, Д. Брей, Дж. Льюис, 1987, А. Р. Слепченко, 1994, И. Г. Удина, 1994).

На основе длительных наблюдений, проведенных в различных странах на многотысячном поголовье крупного рогатого скота, было выявлено более частое проявление лейкоза в потомстве одних и тех же быков, что подтверждает наследственный характер

заболевания лейкозом. Л.К. Эрнст, В.П.Шишков (1984), В. М. Нахмансон, Е. А. Дун (1986), В. Н. Лемеш и др. (1987), В.П. Шишков, А.В. Валихов (1998) так же считают, что наследственные факторы играют большую роль в возникновении и распространении этого заболевания. Выявление устойчивых к лейкозу линий позволяло вести крупномасштабную селекцию по этому признаку, однако было отмечено, что в одних и тех же линиях быки не равноценны по лейкозоустойчивости дочерей. В наиболее восприимчивых к лейкозу линиях могут быть устойчивые быки и наоборот, то есть не был найден «универсальный маркер» для ведения селекции по этому признаку.

О случаях семейного лейкоза животных (мать – дочь) сообщается в работе А.М. Лактионова (1972). В нашей стране лейкоз встречается чаще среди скота красной датской и черно – пестрой пород. При этом установлено, что больные животные происходят главным образом из семейств коров, пораженных лейкозом. Так же имеются семейства, в которых коровы не болеют лейкозом даже при контакте с больными особями (В. М. Нахмансон, 1986). С. М. Федорова (1989) считает, что наличие в стадах животных с генетически обусловленной устойчивостью или предрасположенностью к заболеванию лейкозом даёт основание для ведения селекционной работы по выведению устойчивых к этой болезни животных. По данным А.И. Кузина и М. В. Печерской (1975) в Вологодской области были получены положительные результаты при оздоровлении хозяйств с учетом генетических факторов.

Ю.П.Смирнов (1999) указывает на то, что в настоящее время значительная роль генетических факторов в происхождении лейкоза крупного рогатого скота не вызывает сомнений. Производители, оцененные по качеству потомства как устойчивые, при спаривании с лейкозными коровами дали меньше больных дочерей по черно-пестрой породе на 27,4%, по бурой латвийской – на 35,9%, чем восприимчивые к лейкозу быки с теми же коровами.

По мнению указанного автора, повышенная заболеваемость лейкозом связывается с формированием и возрастанием численности наследственно отягощенных культурных пород скота, обремененных генетическим грузом.

Необходимо отметить, что попытки вести селекцию на устойчивость к лейкозу, используя только фенотипическое проявление этого признака, не были удачными.

Первоначально предполагалось, что чувствительность к лейкозу каким - то образом связана с полиморфизмом класса I генов гистосовместимости. Комплекс MHC генов класса I был детально изучен на уровне ДНК и на серологическом уровне (P. G. Lindberg, L. Andersson). Однако более поздние исследования показали, что устойчивость к лейкозу в большей степени связана со строением генов MHC класса II.

Интересно, что у других животных и человека устойчивость к различным вирусам, микроорганизмам и паразитам определяется так же структурой генов главного комплекса гистосовместимости. Так, главный комплекс гистосовместимости овец (Ovar- MHC) определяет относительную устойчивость к копытной гнили, болезни Джона, BLV-индуцированному лейкозогенезу, кишечным нематодам (V.S. Dukkipati , Blair H.T, Garrick D.J, Murray A., Blair H.T, Garrick D.J, Murray A., 2006).

Изучением полиморфизма генов главного комплекса гистосовместимости крупного рогатого скота (BoLA) и выявлением ассоциаций аллельных вариантов этих генов с устойчивостью к различным заболеваниям занимаются многие лаборатории мира. По проблеме типирования комплекса BoLA был создан международный комитет, который объединил все базы данных по этой проблеме. Этот комитет периодически проводит международные симпозиумы, на которых рассматривается полиморфизм генов главного комплекса гистосовместимости крупного рогатого скота, присваиваются названия новым аллелям (C.J. Davies , 1994).

M. J. T. Van Eijk, J. A. Stewart-Haynes, J. E. Beever (1992); A. Xu, M. J. T. Van Eijk, Ch. Park (1993), Г. Е. Сулимова, И.Г. Удина, Г.О. Шайхаев, И.А. Захаров (1995); M. Zanotti et al. (1996); И.Г. Удина, Е.Е. Карамышева, Г.Е. Сулимова, С.П. Павленко, С.О. Тур-

кова, А.Р. Орлова, Л.К. Эрнст (1999), С.П. Павленко (2000) отмечают связь между определенными аллелями гена BoLA DRB 3 главного комплекса гистосовместимости и восприимчивостью к лейкозу.

Анализ генотипов, определяющих различную чувствительность к лейкозу в группах больных и здоровых коров (n = 372), показал, что животные, несущие хотя бы один аллель, обуславливающий устойчивость к заболеванию, попадают в группу здоровых, что подтверждает сведения о доминантном типе наследования устойчивости к лейкозу (Л. К. Эрнст и др., 1997).

Предполагается, что вирусоносители, несущие DRB 3 аллели, ассоциированные с устойчивостью к персистентному лимфоцитозу, имеют лимфоциты с антигенами ТН**1** - типа, эффективно связывающие вирусные антигены, успешно представляющие их Т - лимфоцитам и способствующие их уничтожению. Напротив, животные, имеющие аллели, связанные с чувствительностью не способны обеспечить эффективный иммунный ответ (антигены ТН**2** -типа), что приводит к развитию персистентного лимфоцитоза. В работе R. Meirom, J Brenner, Z.Trainin. (1993) показано, что количество лимфоцитов с несвязанными рецепторами значительно выше у гематологически больных животных, чем у животных без проявлений персистентного лимфоцитоза.

В работе M. L. Mirsky, H. A. Lewin (1998) приведены экспериментальные данные, показывающие подавление пролиферации вирус - содержащих клеток в крови коров, несущих в генотипе аллели, обуславливающие устойчивость к лейкозу.

Однако некоторыми авторами ставится под сомнение абсолютный характер связи между генотипом по локусу BoLA DRB 3 и устойчивостью к персистентному лимфоцитозу. Так M. Zanotti at al. (1996) сообщает о случае обнаружения клинических проявлений лейкоза у животного, несущего аллель BoLA DRB 3*28. Теоретически подобные факты могут быть связаны как с возможностью подавления влияния гена BoLA DRB 3 при определенном сочетании у некоторых животных других генов, отвечающих за иммунный ответ, так и со сложностями дифференцировки генотипа, так и с возможными ошибками в диагностике персистентного лимфоцитоза. Учитывая наличие спорных вопросов, следует в настоящее время говорить все же об относительной, а не об абсолютной зависимости от генотипа устойчивости к заболеванию лейкозом.

Частота встречаемости различных вариантов по локусу **BoLA DRB 3** значительно варьирует в зависимости от породы, типа, популяции крупного рогатого скота. Так S. Sharif et al. (2002) сообщают о преобладании у голштинов аллели DRB 3*1201 (BoLA DRB 3*8); S. Takeshima, Y. Nakai, M. Ohta and Y. Aida (2002) - о высокой частоте встречаемости (до 49%) аллелей DRB3*1201, *0301, and *0801 в популяциях японского скота; в популяции бразильского скота наиболее часто встречались аллели DRB 3*3601, DRB 3*2201, DRB 3*2101, соответственно в 18, 14 и 11 % случаев (A. F. Mota . et al., 2002). В группе коров из Индии в 71% случаев встречались BoLA-DRB3.2 *34, *15, *06, *20, *37 и*20 аллели (I.D. Behl et.al., 2007).

Интересен тот факт, что распределение аллелей (чувствительных, устойчивых, нейтральных) в популяциях крупного рогатого скота далеко от расчетного. Так, в большинстве стад голштинского скота отмечается повышенная частота встречаемости чувствительных аллелей. В связи с этим, интересен вопрос о взаимосвязи присутствия чувствительных аллелей в генотипе и повышенной продуктивности животных. Наибольшее давление искусственного отбора популяции испытывают именно в сторону повышения продуктивных качеств, поэтому резонно предположить, что существует сцепленное наследование признаков повышенная продуктивность/наличие Ч-аллелей и наоборот (пониженная продуктивность/наличие У-аллелей). В литературе встречаются подтверждающие это предположение данные. Так в работе S. Sharif, B.A. Mallard, B.N. Wilkie, J.M. Sargeant, H.M. Scott, J.C.M. Dekkers, K.E. Leslie (1999) на значительной выборке (n=835) показана достоверная взаимосвязь наличия BoLA DRB3*8 аллели и повышенного уровня молочной продуктивности. О возможности взаимосвязи присутствия той или иной аллели в геноти-

пе и молочной продуктивности сообщается так же в работе R Rupp et al. (2007). Наличие BoLA DRB3*11 и BoLA DRB3*23, по мнению авторов, ассоциировано с высокой молочной продуктивностью. Интересная взаимосвязь выявлена между наличием в генотипе *3, *9, *11 и *26 и высоким уровнем содержания белка в молоке у норвежского скота (S. Kulberg, B. Heringstad, O.A. Guttersrud, I. Olsaker, 2007).Интересно, что в этой работе прослеживается гипотеза о том, что следует рассматривать взаимосвязь присутствия не отдельно взятых аллелей и продуктивных качеств, а взаимосвязь таковых с генотипами в целом.

Установлено, что ген пролактина находится в непосредственной близости с геном BoLA DRB 3 на 23 - ей хромосоме, в большинстве случаев эти гены наследуются сцеплено (R. Fries, A. Eggen, J.E. Womack, 1993). Об участках, непосредственно маркирующих на 23 – ей хромосоме хозяйственно-ценные качества крупного рогатого скота сообщается так же в работе E. Casas, S. D. Shackelford, J. W. Keele, M. Koohmaraie, T. P. L. Smith and R. T. Stone (2003).

В литературе встречаются данные о существовании связи BoLA DRB 3 генотипа не только с устойчивостью к лейкозу, но и с устойчивостью к некоторым другим заболеваниям (например, маститу и дерматофилезу). Так A. Lunde´n, S. Sigurdardottir, I. Edfors-Lilja, B. Danell, J. Rendel (1990) сообщают о наличии значимых ассоциаций между BoLA DRB 3 аллелями и развитием клинического мастита у шведского скота. A.B. Dietz, N.D.

Conen (1997), S.A. Ledwidge, B.A. Mallard (2001), S. Sharif, B.A. Mallard (2000) отмечают связь присутствия в генотипе аллелей DRB 3*8, DRB 3* 16, DRB 3*22, DRB 3*23, DRB 3*24 с возрастанием риска заболевания маститом.

Не отрицая важности экспрессии гена BoLA DRB3 в развитии иммунного ответа против ряда инфекций, следует отметить, что этот ген является лишь одним из звеньев его определяющих. По мнению H. Kabeya, K. Ohashi, M. Onuma (2001) наличие длительного латентного периода у лейкоза свидетельствует о тесном и многогранном взаимодействии вируса с иммунной системой хозяина. Поэтому актуальным представляется поиск других генов и факторов, влияющих на эффективность обезвреживания попадающих в организм патогенов (M.I. Amadori, L. Archetti, R. Verardi, C. Berneri, 1995).

Имеются данные о связи цитокининовых генов с восприимчивостью/устойчивостью к лейкозу (В. А. Белявская, Е. А. Дурыманова и др., 2003, R. Meirom, S. Moss, J. Brenner, D. Heller, and Z. Trainin, 1997). P. Lundberg and G. A. Splitter (2000) установили, что у инфицированных коров с отсутствием гематологических проявлений лейкоза, количество цитотоксических Т – лимфоцитов значительно превосходит таковое у неинфицированных и у коров с гематологией.

Отмечена связь генетического полиморфизма α-фактора некроза опухолей с частотой развития лимфомы, индуцированной BLV у овец (S. Konnai, T.Usui, M.Ikeda, 2006).

Таким образом, устойчивость является сложным признаком, поэтому основным направлением в современной селекции и генетике КРС является поиск наилучших производителей, сочетающих высокие продуктивные показатели с устойчивостью к инфекциям.

Естественно, что помимо наследственной предрасположенности существует ряд других факторов, видимо, способствующих развитию лейкозного процесса. Э.М.Ныым и др. (1970) отмечают взаимосвязь заболеваемости животных лейкозом с особенностями местности и кислотностью почв.

По мнению Б.Г.Панкова и П.Д.Шатько (1977) на заболеваемость лейкозом определённое влияние оказывает дисбаланс в кормовом рационе, дефицит отдельных питательных и биологически активных веществ, а также нарушение обмена веществ у животных.

С.М.Фёдорова и др.(1985), Т.П.Сторожилова, С.М.Федорова (1986) высказали мнение, что заболевание лейкозом вызывают у животных канцерогенные нитраты кормов в самой низкой концентрации (до 0,14%).

3. Методы диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота

Для диагностики лейкоза применяют клинический, патологоанатомический, гистологический, гематологический, серологический и молекулярно – биологический методы.

Всё разнообразие клинических признаков лейкоза можно подразделить на специфические и неспецифические. Большинство исследователей указывают на первичное появление неспецифических признаков, а затем появляются специфические, по которым можно поставить диагноз (Н. В. Румянцева, Т.М. Шатерникова, 1963, Г.А. Симонян, 1963; Э.М. Ным и др., 1970). По мере развития заболевания у отдельных животных развивается понижение реактивности, вялость. Сравнительно рано у больных лейкозом животных регистрируют нарушение сердечно – сосудистой деятельности (глухие тоны сердца, иногда их раздвоенность), пульс слабого наполнения, возможна аритмия. К числу неспецифических признаков лейкоза относятся нерегулярная жвачка, поносы, запоры. Специфические клинические признаки характеризуются прогрессирующим увеличением поверхностных (околоушных, подчелюстных, предлопаточных, коленной складки, надвыменных),а также внутренних лимфатических узлов, экзофтальмии (В. М. Лемеш и др., 1987). Гематологический метод позволят диагностировать лейкоз на более ранних стадиях развития заболевания. Сущность его заключается в обнаружении в периферической крови повышенного числа лейкоцитов (в основном лимфоидного ряда), слабо дифференцированных клеток, а также полиморфных, атипичных клеток кроветворных органов (Б.Г. Панков, 1980; М. И. Гулюкин и др., 1996).

Для оценки результатов исследований в различных странах предложено несколько вариантов «лейкозных ключей». Все лимфоидные диагностические «ключи» основаны на количественных показателях. В СССР в результате многочисленных исследований в 1977 г. был разработан модифицированный «лейкозный ключ» (Т.П. Кудрявцева, 1980; Л.Г. Бурба, 1988), который приведен в таблице 1.

Таблица 1

Модифицированный лейкозный ключ

Возраст животного, лет	Здоровые животные	Гематологически подозрительные по лейкозу животные	Гематологически положительные по лейкозу животные
	Число лейкоцитов, тыс. в 1мкл крови	Абсолютное число лимфоцитов, тыс. в 1 мкл крови	Абсолютное число лимфоцитов, тыс. в 1 мкл крови
от 2 до 4	до 11	от 8 до 10	свыше 10
от 4 до 6	< 10	от 6,5 до 9	> 9
6 и старше	< 9	от 5,5 до 8	> 8

Данный «лейкозный ключ» был включен в стандарт СЭВ «Методы лабораторной диагностики лейкозов крупного рогатого скота», используемый при импорте и экспорте животных, а также в государственный стандарт СССР «Крупный рогатый скот, методы лабораторной диагностики лейкозов» (ГОСТ 25382 – 82). Этот ГОСТ используется и в настоящее время.

Достаточно чувствительным является метод биопробы. Инфицированных животных можно выявлять путем постановки биопробы на овцах. С этой целью овцам обычно

внутрибрюшинно вводят цельную кровь испытуемого животного. При наличии в пробе крови вируса у овцы развивается инфекция, сопровождающаяся образованием вирусспецифических антител. Антитела у зараженных овец выявляют в РИД через 3-6 недель (Stear V.J., Dimmock C.K. 1988).

Заражение животных ВЛКРС сопровождается выработкой антител к структурным белкам вируса. Антитела и вирус персистируют в организме у зараженных животных на протяжении всей жизни. Это позволяет применять серологические методы для диагностики инфекции, вызываемой этим вирусом.

Разработанная и широко применяемая в ветеринарных лабораториях страны реакция иммунодиффузии в геле агара (РИД) с использованием антигена ВЛ в настоящее время остается основным диагностическим методом, по результатам которого проводят оздоровительные и профилактические мероприятия в неблагополучных по лейкозу хозяйствах (Т.С. Костенко и др., 1989, А.Г. Берзяк, В.С. Ковалючко, В.С. Гротевич, Л.И. Киричук, 1990). В действующих в настоящее время Правилах по профилактике и борьбе с лейкозом КРС приоритет отдается именно серологическим исследованиям сыворотки крови. По их результатам судят об инфицированности животных вирусом лейкоза. В зависимости от этого определяют мероприятия по оздоровлению.

К серологической диагностике лейкоза в стране приступили с 1985 года. При этом ежегодно увеличивается число животных, подвергаемых серологической диагностике. Во многих хозяйствах, даже с высоким уровнем инфицированности, этот метод хорошо себя зарекомендовал, а его использование позволило полностью оздоровить стада (Г.А. Симонян, 2007). Однако РИД – исследованиями проверяется по многим регионам около 50% поголовья. Лишь в Архангельской, Курганской, Ленинградской, Вологодской, Пермской, Удмуртской и Московской областях проверяются все животные. Низкий охват поголовья серологическими исследованиями в других регионах означает, что нет полной ясности об уровне инфицированности стада, а значит, нет четких планов оздоровления (М. И. Гулюкин и др., 1999). Кроме этого, наличие у лейкоза латентной стадии (стадии, когда в крови отсутствуют антитела к вирусу) усложняет диагностику заболевания. Экспериментально установлено, что после заражения скрытый период инфекции (период от момента заражения до появления антител к вирусным антигенам) продолжается от 2 х недель до нескольких месяцев (A. Burny, Bruck C., Cleuter Y., 1985) по этому, постепенно выводя из стада РИД – позитивных животных, теоретически возможно добиться полного оздоровления хозяйства от лейкоза (Е.А. Маринин, А.П. Кузнецов, 1996). Тем не менее, в оздоровленных стадах, не имевших контактов с другими, через несколько месяцев, или даже лет выделяют животных с антителами к ВЛКРС (В. М. Нахмансон, 1986). Это можно объяснить характерным для лейкоза явлением иммунологической толерантности, когда наблюдают вирусоносительство без антителообразования. Иммунологическая толерантность – это частичная или полная утрата способности организма вступать в иммунную реакцию со специфическими антигеном. При лейкозе КРС состояние толерантности может развиваться в случае внутриутробного заражения плода инфицированными лимфоцитами матери в период до проявления иммунной компетенции, то есть в первые 3 месяца развития эмбриона; у отдельных животных, например, у глубоко стельных коров, когда иммуноглобулины накапливаются в секрете молочной железы и т. д. (В. А. Крикун, 2002). Кроме того, описаны случаи серонегативности при наличии сопутствующих инфекций, например, вирусной диареи (В. А. Белявская и др., 2003).

Метод не прямого иммуноферментного анализа (ИФА), основанный на применении антивидового конъюгата с использованием ферментов-маркеров, обладает значительно большей чувствительностью, по сравнению с РИД, позволяет автоматизировать процесс, то есть уйти от субъективной оценки результатов реакции (Л. А. Иванова, 1999; K.T. Carli, A. Sen, H. Batmaz, E. Kennerman 1999). Кроме того, с помощью ИФА можно обнаружить антитела к ВЛКРС в молоке и моче (Н.Т. Джапаралиев, Л.Б. Прохватилова, А.И. Ломакин, П.К.Аянот, 2000, K.T. Carli, et al.1993, K.T.Carli, Sen A., H. Batmaz,

E.Kennerman, 1999). В литературе описаны случаи успешного оздоровления стад с использованием этого метода. Так, с применением набора на базе anti-gp51 моноклональных антител, за 4 года удалось полностью искоренить лейкоз на 3 фермах в Польше (W. Deren, A. Szewczyk-Sadowska, J. Rulka, 2003). В работе G. H. Suh, J.C. Lee, C.Y. Lee (2005) сообщается об успешном оздоровлении с использованием ИФА за три года стада с 30% уровнем инфицированности. Контрольные исследования показали отсутствие рецидивов в течение последующих трех лет.

В связи с изложенным выше, с целью ускорения полного оздоровления популяции КРС от лейкоза, целесообразно на последней стадии оздоровления исследовать все поголовье методами, выявляющими непосредственно вирус или провирус у инфицированных животных. С этой целью можно использовать прямой иммуноферментный анализ (ИФА), позволяющий детектировать непосредственно антигенные детерминанты.

Перспективной на конечном этапе оздоровления является полимеразная цепная реакция (ПЦР) (Мальцева Н.А. и др., 2004). Анализ литературных данных позволяет расположить методы диагностики лейкоза в порядке возрастания чувствительности, точности и специфичности в следующий ряд: РИД < Прямой ИФА < ПЦР.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это метод амплификации in vitro, с помощью которого в течение нескольких часов можно выделить и размножить определенную последовательность ДНК в количестве, превышающем исходное в 10 миллионов раз. Такая высокая степень направленного обогащения значительно упрощает использование имеющегося образца ДНК.

Некоторые области применения ПЦР – высокоэффективное клонирование геномных последовательностей, анализ происхождения групп скота, прямое сиквенирование митохондриальной и геномной ДНК, анализ вариаций нуклеотидных последовательностей и выявление вирусных и бактериальных патогенов (А. А. Приймак, 1995, В. И. Глазко и др., 2000, Р. А. Волкова и др., 2000, Коновалова Е.Н., Сельцов В.И., Зиновьева Н.А., 2006).

Механизм ПЦР, с некоторой долей приближения, воспроизводит процессы на самом деле, происходящие в клетке при репликации ДНК.

Известно, что в присутствии нуклеозидтрифосфатов, ионов магния и одноцепочечной ДНК фермент ДНК – полимераза может синтезировать цепь ДНК, комплементарную исходной.

Так же известно, что для присоединения и начала работы ДНК – полимеразы необходимо наличие спаренного 3'- конца. В клетке ферментом РНК – праймазой синтезируется РНК – затравка (праймер), состоящий примерно из 10 нуклеотидов. Эти РНК – затравки и наращивает ДНК – полимераза (Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюис, 1987, Э. Рис, М. Стенберг, 2002).

При амплификации с помощью ПЦР используют два олигонуклеотидных ДНК - праймера, фланкирующие интересующий нас участок ДНК. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров ДНК – полимеразой (рис.2).

Праймеры ориентированы таким образом, что синтез с помощью полимеразы протекает только между ними, удваивая в каждом цикле количество копий этого участка ДНК.

В результате происходит экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента. Поскольку праймеры физически включаются в концы продуктов застройки, они детерминируют сам продукт реакции – фрагмент ДНК, равный по длине расстоянию между 5′ – концами праймеров на исследуемом участке ДНК.

В последние годы разработаны различные варианты ПЦР – диагностикумов для выявления вируса лейкоза КРС у нас в стране и за рубежом (Е.А. Гладырь, Н.А. Зиновье-

ва, А.А. Ермилов, 2005). Праймеры для амплификации выбираются в различных частях генома: 5´LTR, gag, env, X- области (рис. 3).

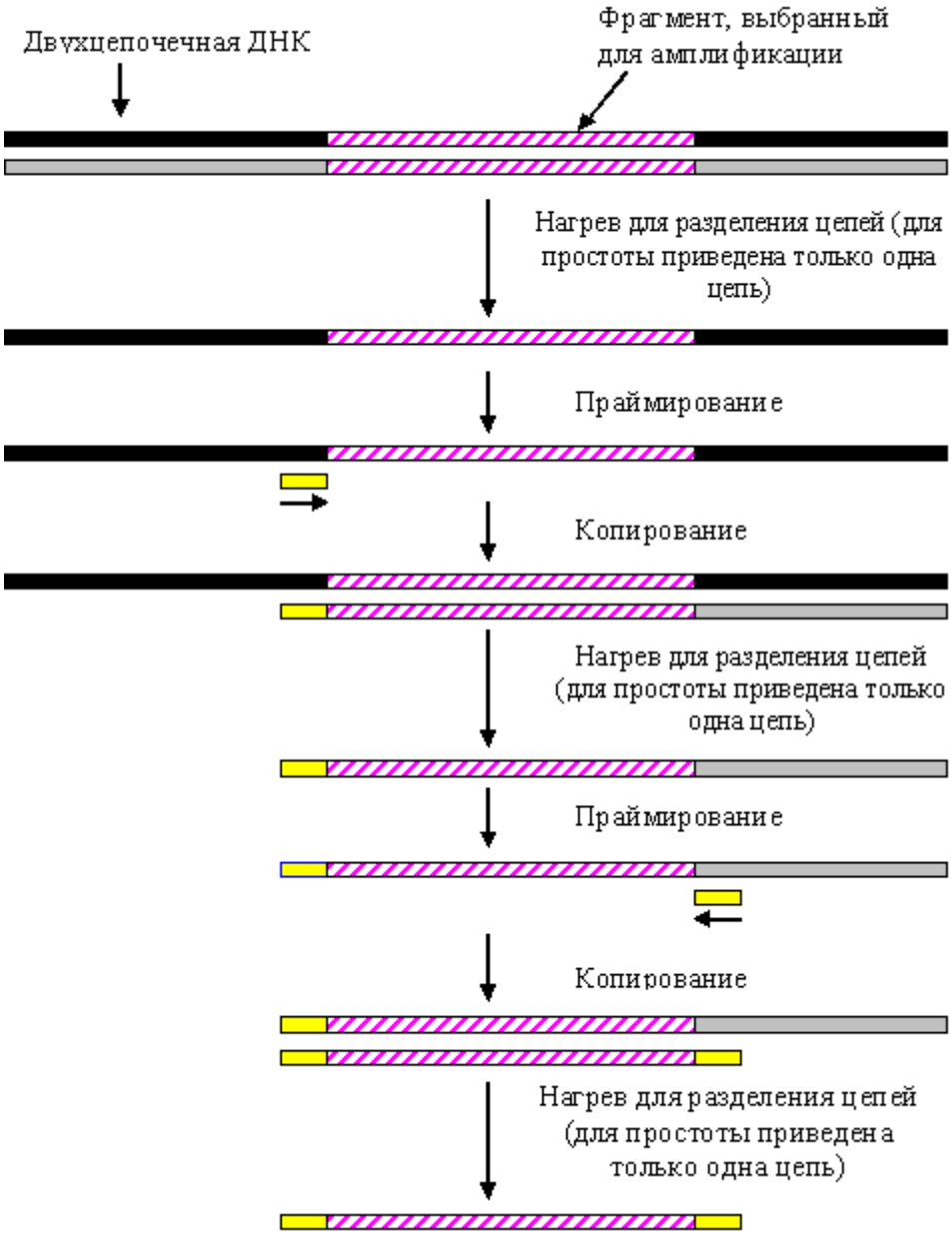


Рис. 2. Диаграмма ПЦР

Длинные фрагменты, синтезируемые на исходной цепи, накапливаются по формуле арифметической прогрессии. В противоположность этому – короткие дискретные фрагменты, ограниченные на концах праймерами, которые появляются только в конце третьего цикла, накапливаются в геометрической прогрессии и очень скоро начинают доминировать среди продуктов амплификации

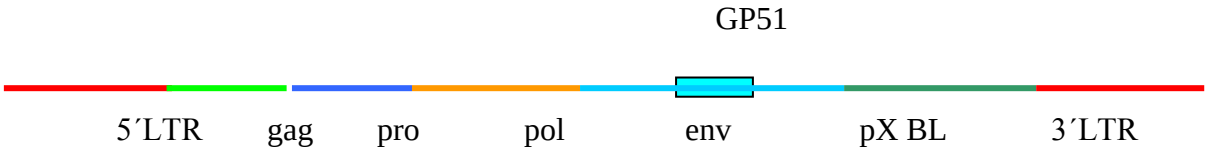


Рис. 3. Схема организации генома ВЛКРС

LTR – длинные концевые повторы (long terminal repeat);

gag – ген, кодирующий белки сердцевины (определяет группоспецифический антиген);

pro – ген, кодирующий протеазу;

pol – ген, кодирующий обратную транскриптазу;

env – ген, кодирующий белки оболочки;

pX BL – область, кодирующая Tax и Rex

Помимо выявления провируса и вируса в крови животных, ПЦР – технологии позволяют проводить генотипирование вируса ЛКРС. Установлено, что существуют особые варианты вируса, при инфицировании которыми животные остаются серонегативными в течение всего периода инфицирования, и даже в случае прогрессии заболевания. Об успешном применении метода ПЦР в диагностике лейкоза сообщается в работах Н. В. Кузнецова и др. (1997), А. И. Ломакина и др. (1999).

Важной областью применения ПЦР является исследование импортированного скота, находящегося в карантине, с целью предотвращения завоза ВЛКРС из одной страны в другую. Существенно ограничивает применение метода ПЦР его высокая стоимость и трудоемкость, поэтому его целесообразно использовать только для исследования высокоценных животных. Кроме указанных выше случаев ПЦР можно рекомендовать для контроля вакцин из цельной крови на специфическую стерильность (М. И. Гулюкин и др., 2002).

Ряд авторов D. Beier, P. Blankenstein,, H. Fechner, 1992, P. Blankenstein, H. Fechner, A. Looman, A. Beier, A. Marguardt, D. Ebner, 1998, сообщает, что довольно часто выявляется несоответствие результатов ПЦР и РИД. ПЦР – позитивные особи выявляются среди РИД – отрицательных животных, а ПЦР – негативные, среди РИД – позитивных. Вполне вероятно, что, несмотря на очень высокую чувствительность ПЦР, в развитии лейкозного процесса бывают такие периоды, когда уровень провирусной ДНК минимален. В таких случаях РИД оказывается более информативной. Поэтому имеет смысл «дочищать» ПЦР РИД - и ИФА – негативных животных, при таком комбинированном использовании диагностических методов гарантировано эффективное оздоровление стада. Обнадеживающие результаты получены В.В. Макаровым, Д.П. Гринишиным (2005), которым удалось доказать, что использование комбинированной РИД/ПЦР диагностики более чем в два раза ускоряет процесс оздоровления стада от лейкоза, чем использование только исследований в РИД. Авторы отмечают, что при жесткой браковке животных, положительно реагирующих в РИД, «шлейф» РИД - позитивных особей продолжал выявляться до 9 – го исследования, а при совместном РИД/ПЦР - исследовании - до 4 – го.

Другие методы ДНК – анализа так же показывают большую чувствительность по сравнению с РИД. Так, N. A Maltseva., A. S. Kaledin, E. I. Oliynik A. A. Zhivotov, V. I. Baranov (2002) показали, что метод Дот- гибридизации (ДНК, выделенная из крови животного метится и гибридизуется с зондом, комплементарным последовательности провируса) позволил выявить большее количество инфицированных животных.

По данным А. Г. Шипицина и др. (1999) в Краснодарском крае первые случаи лейкоза отмечались в 1955 году. В 2006 году было исследовано серологически 467597 голов, выявлено 209904 (42%) инфицированных животных, 18360 (4%) животных признаны гематологически больными. Ежегодно ветеринарными лабораториями края проводится около 450 000 серологических и 180 000 гематологических исследований (А.Г. Шипицын, А.В. Скориков, Т.Н. Чопик и др., 2006). При этом инфицированность молодняка в хозяй-

ствах края с 6 - месячного возраста и до года составляет 30%, с года до 3 лет – 50%, а с 3 лет и старше 60 – 90%. Сравнивая результаты диагностических исследований, полученных ветеринарными лабораториями Краснодарского края, со средними показателями по РФ, следует отметить, что процент инфицированных животных в несколько раз превышает средний уровень по стране.

При подобной степени инфицированности лейкозом даже выбраковка РИД – позитивных животных не представляется возможной, не говоря уже о применении более дорогих и точных методов исследований, следовательно, требуется поиск новых альтернативных подходов.

Необходимо отметить, что в некоторых районах края есть положительный опыт борьбы с лейкозом КРС (например, в Каневском районе), но он основан на формировании «чистых» ферм – санированных ферм со здоровым поголовьем, завезенным, как правило, из-за границы (А. В. Прохоров, 2004).

Проблему легко можно бы было решить путем вакцинации телят. Однако соответствующая практичная и эффективная вакцина до сих пор не создана. Ведутся работы направленные на создание живой рекомбинантной вакцины против ВЛКРС на основе генно – инженерных рекомбинантов вируса осповакцины, экспрессирующих протективные антигены ВЛКРС (А. Д. Альтштеин, 2000).

Так же возможен генно – инженерный вариант решения проблемы. Так кроликам был пересажен антисмысловой ген, комплементарный области LTR R – U5 генома вируса лейкоза крупного рогатого скота, который обеспечивал устойчивость к BLV – инфекции трансгенных кроликов и их потомства, но подобные работы пока еще очень далеки от практического животноводства

(М. Муровска, С. Козырева, В. Томсоне, 2001).

В связи с изложенным выше, представляется актуальным вопрос о возможности ведения селекции на устойчивость к заболеванию лейкозом.

4. Практический опыт использования методов ДНК диагностики для оздоровлеия хозяйств от лейкоза КРС

Изучая опыт работы по оздоровлению от лейкоза некототорых хозяйств Краснодарского края мы сделали ряд общих выводов, а проведённые исследования позволили определиться с общей схемой оздоровления стада от лейкоза.

Одно из главных условий – наличие средств и мотивация обслуживающего персонала на использование одноразового ветеринарно-зоотехнического инструмента, что позволяет предотвратить возможность инфицирования здоровых животных.

Второе обязательное требование – наличие возможности пространственно разделять здоровых и больных животных, производить выпойку телят термически обработанным обратом. Только при выполнении этих условий существует смысл применять и комбинировать различные методы диагностики лейкоза. В большинстве же хозяйств диагностика проводится ради диагностики, год от года возрастает количество инфицированных и больных животных. Приходилось встречаться просто с парадоксальными случаями, когда в хозяйстве аккуратно разделяли животных на группы РИД позитивных и РИД негативных, а когда животные достигали возраста двух лет, группы объёдиняли?!

В лаборатории биотехнологии СКНИИЖ с использованием метода ПЦР исследовано более 3000 образцов крови на наличие провирусной ДНК ВЛКРС.

Анализируя полученные результаты, хотелось бы отметить следующее. Результаты РИД и ПЦР исследований оказываются идентичными в 50-60% случаев. Когда речь идёт о методах диагностики такого не простого заболевания как лейкоз крупного рогатого скота важно понимать, что ни один из существующих методов не лишен недостатков. Лейкоз – хроническое заболевание с волнообразным течением, во время развития которого у одного и того же животного может подниматься и снижаться уровень антител,

количество лимфоцитов, исчезать и появляться вирусная РНК, количественно меняться уровень провирусной ДНК. Соответственно, в определённые периоды развития заболевания тот или иной метод, будь это РИД, ПЦР или гематология, будет давать ложные результаты. Сопутствующие заболевания, стельность могут так же оказывать влияние на результаты исследований.

Исходя из сказанного выше, в том случае если в стаде высок процент инфицированных животных, отсечь их необходимо на самых ранних стадиях жизни животных. Если же заниматься диагностикой у взрослых животных, необходимо комбинировать различные методы, подбирать оптимальный период взятия анализов, то есть работать индивидуально с каждым животным, а это в условиях современного производства достаточно сложно.

Учитывая то, что ПЦР обеспечивает выявление непосредственно провируса, то есть результат анализа не зависит ни от возраста, ни от состояния животного, этот метод можно использовать для разделения телят на инфицированных и здоровых в возрасте до 5 месяцев, то есть тогда, когда использовать РИД нет смысла.

Установлено, что процент инфицированных телят к возрасту 3-4 месяца (по данным ПЦР – исследований) практически соответствует проценту РИД - позитивных животных того же хозяйства, но в более позднем возрасте. Это, позволило предположить, что заражение животных происходит в возрасте до трех месяцев.

С целью установления момента инфицирования и возможного способа инфицирования был проведён следующий эксперимент. В хозяйствах ЗАО «Племзавод им. Чапаева» и АПФ «Нива» выделили по одной группе глубокостельных коров по 27 голов в каждой. За редким исключением все они положительно реагировали в РИД. В момент отёла брались пробы крови у матери и телёнка и исследовались с использованием ПЦР. Процедуру повторяли каждые полтора месяца до достижения телятами возраста 6 месяцев (табл.2).

Таблица 2

Динамика выявления инфицированных провирусом ЛКРС телят в зависимости от возраста

Хозяйство	Инфицировано телят, %				
	При рождении	1,5 мес.	3 мес.	4,5 мес.	6 мес.
ЗАО «Племзавод им. Чапаева»	0	3,7	3,7	3,7	3,7
АПФ «Нива»	0	7,4	7,4	7,4	7,4

Последнее ПЦР исследование совмещали с плановым серологическим исследованием. Телята до двух месяцев содержались в индивидуальных домиках, при всех зооветеринарных манипуляциях применялся только одноразовый инструмент. По результатам первого исследования (при рождении) среди телят не было выявлено ни одного носителя провирусной ДНК. Вирусоносители в каждой из групп появилоись по результатам второго исследования (в 1,5 мес.). Нами были проанализированы пробы молозива, полученного от явных носителей ВЛКРС (что было подтверждено результатами РИД и ПЦР анализов). Несмотря на присутствие в крови коров (n=10) провирусной ДНК, в пробах молозива (n=10) её обнаружено не было. Однако это не является основанием считать молозиво безопасным в плане передачи вируса от инфицированных животных к здоровым. Вполне вероятно, что в молозиве вирус содержится в РНК – форме или в количестве не доступном для эффективного обнаружения провируса методом ПЦР.

Наиболее вероятным считаем путь инфицирования при прохождении родовых путей. Инфицированные телята были оставлены в группе. ПЦР анализы, проведённые в 3 и 4,5 месяца жизни животных подтвердили полученный ранее результат. Новых инфицированных животных выявлено не было. РИД-исследования в 6 месяцев дали

положительный результат именно у ПЦР-положительных телят.

Таким образом, метод ПЦР позволил выявить инфицированных животных в возрасте 1,5 месяцев. Это даёт возможность сделать важный вывод: животных можно разделять на здоровых и вирусоносителей с использованием ПЦР до 2-х месячного возраста. При содержании телят в индивидуальных домиках, анализ необходимо провести до объединения их в группы, это значительно снизит риск распространения инфекции.

Проводимые мероприятия можно представить в следующей последовательности (табл.3):

Важной областью применения ПЦР является исследование импортированного скота, с целью предотвращения завоза ВЛКРС.

Так, среди импортных животных (ОАО «Племзавод «Кубань», n=354, завезены из Венгрии) методом РИД не были выявлены положительно реагирующие, а с помощью ПЦР удалось обнаружить одного носителя провирусной ДНК ЛКРС. Более того, провирусную ДНК выявили и в пробе крови теленка, полученного от ПЦР - позитивного животного. Носители провируса были удалены из стада.

Эффективно применение метода ПЦР на последних этапах оздоровления. Использование ПЦР совместно с другими методами снижает риск пропуска скрытого вирусоносителя, а, следовательно, избавляет от необходимости возвращаться к проблеме через некоторое время.

Таблица 3

Схема реализации оздоровительных мероприятий с использованием ПЦР – диагностики у телят

Этап	Срок и порядок реализации
Формирование группы телочек (возраст 1,5-2 мес.)	При достижении животными 1,5 мес. взятие крови специалистами хозяйства и доставка в лабораторию в шприцах типа «Моновет» с ЭДТА или цитратом в качестве консерванта.
ПЦР – диагностика (диагностика методом полимеразной цепной реакции)	Реализуется в специализированной лаборатории
Формирование группы ПЦР- отрицательных животных. Удаление ПЦР - положительных телочек на откорм или на другую ферму	Производится специалистами хозяйства по результатам анализов
РИД-диагностика в группе ПЦР-отрицательных телочек с целью окончательного разделения групп инфицированных и здоровых животных (возраст 5-6 месяцев).	Реализуется специалистами хозяйства

На примере одного из хозяйств края (ОАО «ПЗ «Дружба») продемонстрируем возможность использования ДНК диагностики для эффективного оздоровления стада от лейкоза КРС. Проведённые мероприятия включали два этапа:

1. Путём соответствующего подбора быков - производителей создание структуры стада с генетически обусловленной устойчивостью к развитию лейкоза
2. ПЦР – диагностика вирусоносительства у телят раннего возраста.

На первом этапе, для подбора быков – производителей, нами были генотипированы по локусу BoLA DRB3 образцы крови от репрезентативной группы коров и тёлок айрширской породы ОАО Племзавод «Дружба» (n=50). Основной принцип отбора этих животных заключался в том, чтобы в группу были включены пропорционально дочери разных быков. При этом анализировалась таблица № 14 «СЕЛЭКС», и если в стаде присутствова-

ло, например, 200 дочерей быка № 1, 400 дочерей – быка № 2 и 100 - № 3, то в группу для анализа (n=50) были отобраны – 14 дочерей быка № 1, 29 - № 2 и 7 - № 3. Необходимо отметить, что для анализа отбирались молодые животные: тёлки предслучного и случного возраста (10-18 месяцев), нетели (3-6 месячной стельности), первотёлки (животные с первой незаконченной лактацией).

В результате генотипирования было установлено, что:

1) в настоящее время генетический профиль животных ОАО Племзавод «Дружба» насыщен аллелями BoLA-DRB 3*7; BoLA-DRB 3*24; BoLA-DRB 3*27 (табл. 4);

2) низкая частота встречаемости устойчивых аллелей (в сумме BoLA-DRB3 *11, 23, 28 аллелей всего 7%) свидетельствует о генетической предрасположенности основной массы животных к лейкозу.

Следует отметить, что анализ частот встречаемости аллелей у всех использованных ранее в хозяйстве (за последние 8 лет) быков-производителей (n=24), дочери которых к моменту исследования присутствовали в стаде, показал сходные результаты (табл. 4).

Таблица 4

Результаты анализа генетического профиля стада ОАО Племзавод «Дружба»

Аллель BoLA-DRB 3	Статус аллеля+	Частота встречаемости аллеля*, %		
		В генотипированной выборке (n=50)	В группе быков – отцов (n=24)	У потомков в результате закрепления (прогноз)
1	Н	5	1	5
2	Н	7	-	3
3	Н	7	6	4
5	Н	3	8	2
7	Н	19	14	9
8	Ч	2	2	15
9	Н	-	2	-
11	У	-	3	15
12	Н	4	5	5
16	Ч	6	11	3
18	Н	6	3	10
21	Н	4	1	2
22	Ч	2	2	8
24	Ч	15	18	8
27	Н	13	15	7
28	У	7	9	4

*Примечание: *значения частот округлены до целых; + У – устойчивый: Ч- чувствительный: Н – нейтральный*

Очевидны аналогичные тенденции преобладания определённых разновидностей аллелей: BoLA-DRB 3*7; BoLA-DRB 3*24; BoLA-DRB 3*27 (профиль рассчитывался с поправкой на количество дочерей каждого из быков).

Для повышения гетерогенности животных (а, следовательно, привнесения генетических задатков гетерозиса) мы использовали быков-производителей, носителей редко встречающихся в данном стаде аллелей. Учитывая результаты анализа крови и генеалогической структуры стада, для осеменения коров мы рекомендовали следующих быков-производителей (табл. 5,6).

Таблица 5

Характеристики предлагаемых к использованию быков-производителей

Кличка, №	Место рождения	Линия	Генотип BoLA-DRB3	
Гейзер 441	Финляндия	С.В. Командор 174233	11 (У)	8 (Ч)
Круиз 45586	Финляндия	Дик 768	18 (Н)	22 (Ч)
Тупси 76849	Финляндия	Дик 768	1 (Н)	12 (Н)

Таблица 6

Молочная продуктивность матерей быков-производителей, предлагаемых к использованию

Кличка, №	Продуктивность матери		
	удой по наивысшей лактации, кг	содержание жира, %	содержание белка, %
Гейзер 441	14308	4,73	3,10
Круиз45586	10875	4,12	3,52
Тупси76849	10991	4,28	3,50

Быки были отобраны из базы данных по быкам-производителям ведущих племенных предприятий России, сформированной в лаборатории. Всего база содержит полную информацию (племенную и генетическую) по 800 быкам-производителям, принадлежащим 7 племенным предприятиям. Перечень айрширских быков, из которых был произведён отбор по всем традиционным критериям, был представлен 110 животными, генотипированными по BoLA-DRB 3.

Закрепление быков было произведено «тройкой», со сменой быка после каждого перегула. Например, если после осеменения быком-производителем Гейзер 441 корова пришла в охоту (по нашим данным, на долю первого быка в «тройке» приходится около 60% плодотворных осеменений), проводили осеменение быком-производителем Круиз 45586 (30-20% осеменений), а в случае следующего перегула – Тупси 76849 (около 10-20 % осеменений). Исходя из этих данных определялась частота встречаемости аллелей в отцовской группе.

В результате такого закрепления увеличилось количество животных с гетерозиготными генотипами, аллельный профиль стада стал более выровненным, возрасло количество животных - носителей аллелей устойчивости (до 19%) (табл. 4, 7).

Таблица 7

Количество гомо- и гетерозиготных животных до- и после закрепления

Количество гомо- и гетерозигот	До закрепления (по результатам анализа ДНК)	После закрепления у потомства (прогноз)
Гомозиготы, %	14	2
Гетерозиготы, %	86	98

При сопоставлении наблюдаемых частот с ожидаемыми после закрепления у потомства выявлена существенная разница ($P<0.05$).

Подбор новых быков – производителей, несущих редкие для данного стада генетические блоки (аллели), способствовал значительному (на 19%) снижению расхода спермы на одно плодотворное осеменение по данным зоотехнического учёта (n=700). По нашему мнению, это, вероятно, объясняется устранением генетической несовместимости отцов и матерей. Необходимо отметить, что в опытный (1-4.2011) и контрольный периоды времени (1-4.2012) в хозяйстве использовались молодые быки финской селекции, принадлежа-

щие российским племенным предприятиям; условия кормления и содержания были идентичными, работали одни и те же техники-осеменаторы. Полученные результаты согласуются с исследованиями, проведенными ранее. Таким образом, в хозяйстве была сформирована новая генетическая структура стада с повышенной устойчивостью к лейкозу КРС, по предварительным оценкам это более чем на 30% позволило сократить количество вирусоносителей среди телят.

На втором этапе оздоровления для выявления вирусоносителей был применён метод ПЦР диагностики у телят до 2 месячного возраста.

До использования ПЦР – диагностики специалистами хозяйства ОАО «Племзавод «Дружба» были учтены следующие требования, обязательные для ликвидации лейкоза:

1. Раздельное содержание РИД позитивных и РИД негативных животных
2. Раздельные отёлы РИД позитивных и РИД негативных коров
3. Выпойка телят молозивом и сквашенным муравьиной кислотой молоком только от РИД негативных коров
4. Раздельное содержание телят в клетках до месячного возраста
5. Использование одноразового инструмента при ветеринарно- зоотехнических манипуляциях.

Перечисленные выше мероприятия способствовали снижению уровня инфицированности взрослого поголовья, однако не позволили ликвидировать заболевание в хозяйстве.

Проведенный нами анализ схем перемещения животных и путей распространения инфекции позволил предположить, что наиболее уязвимым этапом содержания является период с первого по шестой месяцы жизни. В этот период телята от РИД позитивных и РИД негативных коров содержатся совместно группами по 5- 10 голов, а выделить среди них инфицированных метод РИД не позволяет, так как имеет возрастные ограничения для использования (возраст до шести месяцев).

Метод ПЦР, хотя и имеет ряд недостатков, незаменим для использования именно в этот период жизни животных. Всего нами было проанализировано методом ПЦР в период с октября 2011 по март 2012 года 228 проб крови телят айрширской породы, принадлежащих ОАО «Племзавод «Дружба».

На рисунке 4 представлена электрофореграмма продуктов амплификации участка гена gag провируса лейкоза КРС величиной 347 пар нуклеотидов.

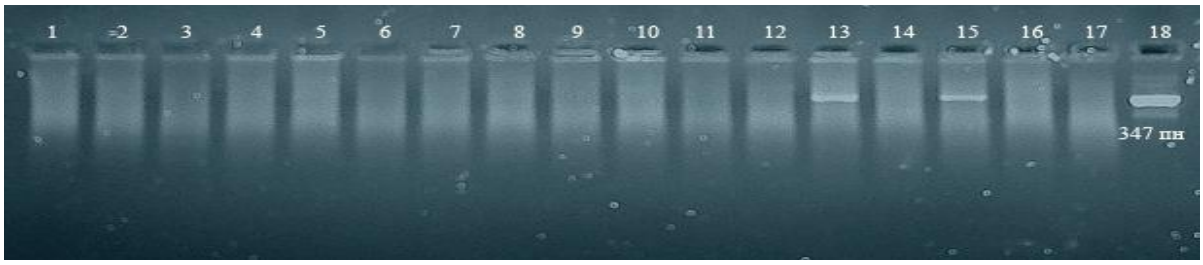


Рис.4.Выявление провирусной ДНК лейкоза крупного рогатого скота методом ПЦР.
№13 и №15 – носители провируса лейкоза КРС
17 – отрицательный контроль
18 - положительный контроль амплификации

Анализ полученных результатов показал, что с использованием ПЦР удалось выявить 12 голов (или 5%) инфицированных телят. По результатам первого исследования (группа 50 голов, возраст 2 месяца и старше) выявили 4 вирусоносителя, причём оказалось, что вирусоносителями в равной мере были телята, полученные и от РИД позитивных и от РИД негативных коров.

Установлено, что эти вирусоносители контактировали с друг с другом. Это ещё раз подтверждает возможность перезаражения телят при совместном содержании. Нами было принято решение проводить ПЦР исследования у телят в возрасте 1 - 2 месяцев, до

объединения в группы.

При использовании этого подхода инфицированные телята от РИД – отрицательных коров больше не выявлялись.

Все ПЦР – положительные телята немедленно изолировались из стада.

РИД исследование группы телят, отрицательно прореагировавших в ПЦР (n=216) и достигших возраста 6 месяцев дало отрицательный результат в 100% случаев.

Таким образом, в ОАО «Племзавод «Дружба» разработана эффективная схема оздоровления молодняка от лейкоза КРС.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авилов В.М., Нахмансон В.М. Проблемы оздоровления крупного рогатого скота от лейкоза // Ветеринария. – 1995. -№ 11. – С. 3-6

2. Альштеин А.Д. Подходы к созданию генно–инженерной вакцины против лейкоза на основе вируса осповакцины// Тез. докл. II международной научн. конф.: Биотехнология в животноводстве и ветеринарии. – М., 2000. – С. 149 – 151

3. Апалькин В.А. Организация и проведение научно-обоснованных мероприятий при оздоровлении от лейкоза КРС // Сборник научных трудов. Барнаул, - 1997. - С.33-34.

4. Апалькин В.А., Гулюкин М.И., Петров Н.И. Лейкоз крупного рогатого скота //Библиотечка «Практик». – Петролазер. – Санкт-Петербург.- 2005. – 106 с.

5. Белов А.Д., Рогожина Г.В. О патогенезе лейкозов крупного рогатого скота // Ветеринария. -1997. - № 12. – С. 16- 19

6. Белявская В.А. и др. Возможности и ограничения использования ПЦР в диагностике и генотипировании вируса лейкоза крупного рогатого скота // Сб.: Актуальные вопросы зоотехнической науки и практики как основа улучшения продуктивных качеств и здоровья сельскохозяйственных животных. – Ставрополь, 2003. – С.275 – 278

7. Берзяк А.Г., Ковалючко В.С., Гротевич В.С., Киричук Л.И. Опыт ускоренного оздоровления племенного хозяйства от лейкоза. Ветеринария -№12. – 1990. – С. 13-15.

8. Бурба Л.Г. Кунаков А.А. Диагностика лейкозов сельскохозяйственных животных.- М., Колос.- 1983. - 191 с.

9. Бурба, Л. Г. Валихов А.Ф., Горбатов В.А. Лейкозы и злокачественные опухоли животных / Л. Г. Бурба, А. Ф. Вахилов, В. А. Горбатов. – М. : Агропромиздат, 1988. – 399 с.

10. Бусол В.А., Лиманская О.Ю., Лиманский А.П. ПЦР–диагностика ВЛКРС // Ветеринарная медицина. – 1998. –В. 74. –С. 35-44

11. Валихов А.Ф. Лейкозы и злокачественные опухоли животных //Под ред. В.П.Шишкова и Л.Г.Бурбы. -М., 1988. -С. 173-194.

12. Галеев Р.Ф. Вирус лейкоза КРС (культуральные, инфекционные и иммунологические свойства). – Уфа: Ветеринарная медицина. – 1999. – 147 с.

13. Галеев Р.Ф. Теоретическое обоснование, экспериментальное подтверждение путей передачи вируса лейкоза крупного рогатого скота, усовершенствование методов диагностики и мер борьбы с ним. - Автореф. дисс. докт. вет. наук. Казань. – 2000

14. Галеев Р.Ф., Руденко А.А., Валиев Ф.Р. Диагностика и профилактика лейкоза КРС // Практик. - № 5-6. – 2003. – С.44 – 48

15. Гладырь Е.А., Зиновьева Н.А., Ермилов А.А. Разработка и экспериментальная апробация высокочувствительной тест-системы диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота // Школа-практикум «Методы исследований в биотехнологии сельскохозяйственных животных». – ВИЖ. -2005.-134с С.18-22

16. Глазко В.И., Доманский Н.Н., Созинов А.А. Современные направления использования ДНК-технологий//Цитология и генетика. – 1998.- Т. 32.- №5.-С.80-93

17. Горбунов А. П. Теоретические основы и практика оздоровления хозяйств от лейкоза крупного рогатого скота. // Сборник научных трудов. Екатеринбург, - 2005. - С.23-28.

18. Гулюкин М. И. Состояние и перспективы борьбы с лейкозом крупного рогатого скота // Ветеринария. – 1999. - № 12. – С. 3 – 8

19. Гулюкин М.И. , Замараева Н.В. Медико – биологические аспекты вируса лейкоза КРС // Сб.: Актуальные вопросы диагностики, профилактики и борьбы с лейкозами сельскохозяйственных животных и птиц. – 2000. –Екатеринбург. –С. 12 – 25

20. Гулюкин М.И. и др. Дифференциальная диагностика гемабластозов крупного рогатого скота // Бюл. ВИЭВ, - М.: 1996. – Вып. 77. – С. 46

21. Гулюкин М.И. и др. Разработка эффективных мероприятий против лейкоза крупного рогатого скота // Ветеринария. – 2002. - № 12. – С. 3 – 8

22. Гулюкин М.И., Дун Е.А., Замараева Н.В., Баркова Н.В., Петров Н.И., Пау С.М. Эпизоотологическая оценка методов прижизненной диагностики лейкоза КРС / М.И. Гулюкин, Е.А. Дун, Н.В. Баркова, Н.И. Петров, С.М. Пау// Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. -2000. -№3. -С. 60-62.

23. Гулюкин М.И., Замараева Н. В., Седов В. А. и др. Основные тенденции в организации и проведении противолейкозных мероприятий // Труды ВИЭВ. – М. – 1999. – Т. 72. – С. 16 – 22

24. Гулюкин М.И., Симонян Г.А., Мироменко А.К. Особенности противолейкозных мероприятий, обеспечивающих высокую молочную продуктивность. //Сборник научных трудов. Екатеринбург, - 2005. - С.28-34.

25. Гулюкин М.И., Симонян Г.А., Шишкин А.В. О распространении лейкоза крупного рогатого скота // Ветеринарный консультант. №18. -2004. - С. 4-5.

26. Джапаралиев Н.Т., Прохватилова Л.Б., Ломакин А.И., Аянот П.К. Применение серологических методов и ПЦР для обнаружения вируса лейкоза крупного рогатого скота в образцах крови, молока и носовых истечений / Н.Т. Джапаралиев, Л.Б. Прохватилова, А.И. Ломакин, П.К. Аянот // Достижения молодых ученых - в ветеринарную практику (Материалы конференции молодых ученых). Владимир: ОКНИИиМС, ВНИИЗЖ. - 2000. С.127-131.

27. Джунина С. И. Контроль эпизоотического процесса. - Новосибирск. 1994. - 162 с.

28. Диагностика лейкоза крупного рогатого скота (Методические указания). - М.,1998.- 29 с.

29. Диагностика лейкоза крупного рогатого скота. Методические указания. –М.: Агропромиздат, 1998. -29 с.

30. Донник И.М., Татарчук А.Т., Корнилов Н.А. Эффективность работы по реализации противолейкозных мероприятий на фоне сложной эпизоотической обстановки по лейкозу. // Сборник научных трудов. Екатеринбург, - 2005. - С.52-59.

31. Замараева Н.В. , Гулюкин М.И., Снежков М.Н. Экспериментальные исследования по выявлению возможности передачи вируса лейкоза крупного рогатого скота через молоко лабораторным животным / Бюлл. ВИЭВ. – 1996. - № 77. – С. 66

32. Иванова Л. А. Опыт применения иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу лейкоза на заключительном этапе оздоровления // Бюл. ВИЭВ. – 1999. - т. 72. С. 202-209

33. Ковалюк Н., Ковалюк А., Чурилова Е., Масленников М. Изучение полиморфизма некоторых генов у быков – производителей// Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2005. - № 1. С.64-65

34. Ковалюк Н.В., Ковалюк А.А., Масленников МГ., Сивогривов Д.Е. Типирование аллелей гена BoLA DRB 3, отвечающего за формирование устойчивости крупного рогатого скота к персистентному лимфоцитозу у быков-производителей // Материалы международной научно – практической конференции: Роль и значение метода искусственного осеменения сельскохозяйственных животных в прогрессе животноводства XX и XXI веков. –Дубровицы, 2004. –С. 240 - 241

35. Коромыслов Г.Ф. Научные исследования по инфекционной патологии животных //Ветеринария. -1995. - № 8. - С.3-7.

36. Коромыслов Г.Ф., Гулюкин М.И. , . Симонян Г.А. Основные итоги и перспективы научных исследований по проблеме лейкозов сельскохозяйственных животных //Тр. ВИЭВ. – т. 72. – М.: 1999. – С.3-11

37. Коромыслов Г.Ф., Шишков В. П. Основы профилактики и ликвидации лейкоза крупного рогатого скота // Ветеринария. – 1993. - № 4. – С. 15-18

38. Костенко Т.С. и др. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. – М.: Агропромиздат. – 1989. – 272 с.

39. Крикун В. А. Лейкоз крупного рогатого скота и иммунологическая толерантность // Ветеринария. – 2002. - № 6. –С. 7–9

40. Крикун В.А. Слизистая носа – наиболее вероятный путь заражения животных вирусом лейкоза КРС // Лейкозы крупного рогатого скота. – М. – 1985. – С. 5 – 6

41. Кудрявцева Т.П. Лейкоз животных. – М.: Россельхозиздат. – 1980. –158 с.

42. Кудряшов А. А., Петров Н.И. Патологоанатомические изменения при лимфоидном лейкозе крупного рогатого скота. // Ветеринария. - 1999. - № 11. - С. 14-15.

43. Кузин А.И., Закрепина Е.Н. Влияние лейкоза на продуктивность коров и качество молока // Ветеринария. -1997. - № 2. – С. 19-21

44. Кузин А.И., Закрешша Е.Н. Влияние лейкоза на продуктивность коров и качество молока // Ветеринария. -1997. - №2.- С. 19-21.

45. Кузин А.И., Печерская М.В. К вопросу оздоровления хозяйств Вологодской области от лейкоза крупного рогатого скота // Тр. ВАСХНИЛ. – 1974. –С. 228

46. Кузнецов А.П., Никитин И.Н. Экономический ущерб, причиняемый лейкозом крупного рогатого скота // Ветеринария. -1993. - №8. - С. 14-16.

47. Кузнецова А.П., Смирнов В.П. Проблемы лейкоза сельскохозяйственных животных. Ветеринария. №3 – 1998 –С.32-33.

48. Кузнецова Н.В. и др. Использование полимеразной цепной реакции для выявления инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота // Ветеринария. – 1997. – С. 12 – 13

49. Кукайн Р.А. и др. Вирус лейкоза крупного рогатого скота. – Рига: Зинатне, 1982. – 174 с.

50.

51. Лактионов А.М. Селекционно – генетические аспекты лейкозов крупного – рогатого скота // Ветеринария. – 1972. - № 6. – С. 66 - 69

52. Лейкозы и злокачественные опухоли животных / Л.Г.Бурба, А.Ф.Валихов, В.А.Горбатов и др.; Под ред. В.П.Шишкова. Агропромиздат. -1988. - 400 с.

53. Лемеш В.М. и др. Лейкоз крупного рогатого скота. – Минск: «Ураджай», 1987. - 220 с.

54. Лиманский А.П., Лиманская О.Ю. Молекулярно – генетические методы – основа программ по искоренению лейкоза крупного рогатого скота // Биотехнология. – 2001. - № 3. – С. 40-50

55. Лиманский, А. П. Типирование вируса лейкоза крупного рогатого скота, циркулирующего в Украине / А. П. Лиманский, L. Geue, О. Ю. Лиманская, D. Beier // Вопр.вирусологии. – 2004. – Т. 49. – № 1. – С. 39–44.

56. Мадисон В., Мадисон Л. Лейкоз: пустые страшилки или общегосударственная проблема? // Животноводство России. – 2006.-№9.С.– 2-8

57. Мазин А.В., Кузнеделов К.Д., Краев А.С. Методы молекулярной генетики и генной инженерии. – Новосибирск: Наука, 1990. –248 с.

58. Макаров В.В. Избранные вопросы общей эпизоотологии и инфектологии. - М., 1999. - 224 с.

59. Макаров В.В., Гринишин Д.П. Эпизоотологические перспективы лейкоза крупного рогатого скота // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2005. –№ 2. – С. 70-73

60. Мальцева Н.А. и др. Развитие и внедрение новых биотехнологий при разработке диагностических и профилактических приемов в сфере решения проблемы лейкоза КРС Материалы II региональной научной конференци «Студенческая наука – экономике России» Северо-Кавказский государственный технический университет. – 2004. С. 20- 22

61. Мандыгра Н.С. Крупномасштабные оздоровительные мероприятия против лейкоза крупного рогатого скота // Тр. Свердловской НИВС. - 1995. - С.9-12.

62. Маринин Е.А., Кузнецов А.П. Прогнозирование сроков оздоровления хозяйств от лейкоза крупного рогатого скота // Ветеринария. -№ 6. – 1996 – С.31-33

63. Маринин Е.А., Кузнецов А.П. Прогнозирование сроков оздоровления хозяйств от лейкоза крупного рогатого скота // Ветеринария. - 1997. - №6 - С. 17-20.

64. Меркурьева Е.К. Биометрия в селекции и генетике сельскохозяйственных животных. – М.: Колос, 1979. – 423 с.

65. Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод ПЦР // Государственный комитет санитарно – эпидемиологического надзора РФ. -1995

66. Методические указания по индикации генома провируса лейкоза крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции. Утв. Департаментом ветеринарии МСХ и ПРФ 21.02.1997г.

67. Мурватуллоев С.А. Носовые истечения больных лейкозом коров, как фактор передачи вируса лейкоза крупного рогатого скота // Тр. ВИЭВ. – 1999. – Т. 72. – С. 128-129

68. Муровска М., Козырева С., Томсоне В. Ингибирование репликации вируса лейкоза крупного рогатого скота у трансгенных кроликов под влиянием антисмысловых РНК // Экспериментальная онкология. – 2001. - № 1. – С. 15 – 20

69. Нахмансон В.М. Лейкоз крупного рогатого скота. – М.: Россельхозиздат. – 1986. – 221с.

70. Нахмансон В.М., Гулюкин М.И., Дун Е.А. Серологический метод диагностики в системе противолейкозньгх мероприятий // Ветеринария. -1997. - №3. - С.7-10.

71. Нахмансон В.М., Дун Е.А. Эпизоотология лейкоза крупного рогатого скота и меры борьбы с ним // Итоги науки и техники. – 1986. – С.146 – 149

72. Новиков А.А., Романенко Н.И. Генетическая экспертиза племенного материала // Зоотехния. – 2001.-№7. – С. 14-17

73. Новицкий С.В., и др. Мониторинг эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в Ставропольском крае // В. сб.: Актуальные вопросы диагностики, профилактики и борьбы с болезнями сельскохозяйственных животных. - Ставрополь. – 1999. – С.108 – 110

74. Ным Э.М. и др. Распространение лейкоза крупного рогатого скота в Эстонской ССР//Труды АН Латвийской ССР.- Рига: Зинатне, 1970. – 145 с.

75. Орлянкин Б.Г. Классификация и номенклатура РНК – содержащих вирусов позвоночных // Сельскохозяйственная биология. – 1996. - № 2. – С. 3-24

76. Петров Н.И. Возвращаясь к теме лейкоза крупного рогатого скота. // Ветеринарная газета, -1998.-№16(147).-С.5.

77. Петров Н.И. Диагностика и меры борьбы с лейкозом крупного рогатого скота // Материалы Всероссийского совещания-семинара. - Брянск, 2004. - С. 104-106.

78. Петров Н.И. Лейкоз КРС – насколько он опасен? // Зооиндустрия. – 2001. - № 3.-С.15-17

79. Петров Н.И. Оздоровление хозяйств от лейкоза крупного рогатого скота. // Ветеринария. -1997.-М9.-С. 10-12.

80. Пономарев А.Б.Эпизоотическая обстановка в России // Ветеринарная газета - 2003, №1 - с-4-6

81. Правила по профилактике и борьбе с лейкозом крупного рогатого скота. Утверждены приказом Минсельхозпрода России от 11 мая 1999, № 359. – М.: Зарегистрировано распоряжением Минюста России, регистрационный знак № 1799 от 04 июня 1999

82. Приймак А.А. и др. ПЦР – быстрый и высоко чувствительный метод определения возбудителя туберкулеза в биологических материалах // Пульмонология. – 1995. - №. 3. – С. 16 –20

83. Проблемы лейкоза животных / Смирнов П.Н., Незавитин А.Г., Смирнова В.В. и др. // Новосибирск, 1992. -476с.

84. Прохватилова Л.Б. и др. Диагностика лейкоза КРС методом ПЦР//Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 1998. - № 5 .–С. 65 – 68

85. Прохватилова Л.Б. и др. Применение ПЦР для раннего обнаружения провируса лейкоза крупного рогатого скота у экспериментально инфицированных животных // Ветеринария. –2001. -№ 8. – С. 17 – 21

86. Прохоров А.В. Опыт работы по ликвидации лейкоза КРС в Каневском районе // Ветеринария Кубани. – 2004. - № 4. – С. 4 - 6

87.

88. Румянцев Н.В., Шатерникова Т.Н. Современные данные по лейкозу крупного рогатого скота//Ветеринария. – 1963. -№ 4. – С. 20 – 26

89. Салимов Х.С. Этиология, диагностика и меры профилактики лейкозов крупного рогатого скота. //Ташкент, 1986. - 86 с.

90. Симонян Г.А. Морфологические изменения крови и пунктата костного мозга у коров при лейкозе //Ветеринария. – 1963. -№ 6. – С. 33 - 38

91. Симонян Г.А. Разработка и совершенствование оздоровительных противолейкозных мероприятий //Ветеринария. – 2007. -№ 7. – С. 3 - 7

92. Симонян Г.А. Степень заболеваемости лейкозом и инфицированности ВЛКРС поголовья скота в неблагополучных хозяйствах // Сб.: Актуальные вопросы диагностики, профилактики и борьбы с лейкозами с. – х. животных и птиц / Екатеринбург. – 2000. – С. 36 -44

93. Симонян Г.А., Хисамугдинов Ф.Ф. Ветеринарная гематология. М.: Колос. - 1995. - 254 с.

94. Смирнов А.М. Борьба с лейкозом крупного рогатого скота - важнейший элемент системы обеспечения ветеринарного благополучия российского животноводства // Сборник научных трудов. Екатеринбург, - 2005. - С.5-9

95. Смирнов П.Н. Лейкоз крупного рогатого скота: проблемы и их решение на уровне субъекта Федерации // Ветеринария Кубани. – 2007. -№4. –С.4-7

96. Смирнов П.Н. Практические аспекты лейкоза крупного рогатого скота // Ветеринарная газета .-№13. –1998. – 4с.

97. Смирнов П.Н., Храмцов В.В., Смирнова В.В. Научные и практические основы оздоровления стад от лейкоза КРС в Сибири // Сб.: Актуальные вопросы диагностики, профилактики и борьбы с лейкозами сельскохозяйственных животных и птиц. – 2000. – Екатеринбург. С. 104 – 114

98. Смирнов П.Н., Храмцов В.В., Смирнова В.В. Практические аспекты лейкоза крупного рогатого скота // Ветеринария. -1998. - №8. - С.6-8.

99. Смирнов Ю.П. Влияние лейкоза на молочную продуктивность коров //Молочное и мясное скотоводство. – 1999. - № 4. – С. 25-28

100. Смирнов Ю.П. Основные пути распространения лейкоза // Ветгазета. - 1999. -№4 - С.3-4.

101. Смирнов Ю.П. Развитие лейкозного процесса у инфицированных ВЛКРС коров в зависимости от их возраста // Ветеринария.– 1999. - № 12.–С. 15 –17

102. Смирнова В.Н. Ветеринарно – санитарная оценка мяса при лейкозе крупного рогатого скота // Сб.: Актуальные вопросы диагностики, профилактики и борьбы с лейкозами сельскохозяйственных животных и птиц. – 2000. – Екатеринбург. – С. 236 - 239

103. Смирнова В.Н. К вопросу о токсичности молока коров, больных лейкозом // Сб.: Актуальные вопросы диагностики, профилактики и борьбы с лейкозами сельскохозяйственных животных и птиц. – 2000. – Екатеринбург. – С. 240 – 242

104. Снежков, Н. И. Молоко лейкозных животных – фактор эпизоотического процесса / Н. И. Снежков // Ученые-аграрники - с.-х. пр-ву. – Кострома. – 1995. – Т. 1. – С. 35.

105. Стегнова Т.В., Перепечина И.О., Пименов М.Г., Сыроквашева Е.Ю. Исследование спермы при идентификации личности методом генотипоскопии. // Методические рекомендации: М., ЭКЦ МВД РФ, 1993. – 24 с.

106. Сулимова Г.Е., Соколова С.С., Семикозова О.П. Анализ полиморфизма ДНК кластерных генов у крупного рогатого скота: гены казеинов и гены главного комплекса гистосовместимости (BoLA)Цитология и генетика. – 1992.- Т. 26.- №5.- С.18-25

107. Сулимова Г.Е., Удина И.Г., Шайхаев Г.О, Захаров И.А. ДНК-полиморфизм гена BoLA-DRB 3 у крупного рогатого скота в связи с устойчивостью и восприимчивостью к лейкозу // Генетика. –1995. -№. 9. – С.1294-1299

108. Сулимова Г.Е., Шайхаев Г.О., Берберов Э.М. Генотипирование локуса каппа – казеина у крупного рогатого скота с помощью полимеразной цепной реакции // Генетика. –1991. –Т. 27. – с. 2053 – 2062

109. Сюрин В. Н. , Белоусова Р.В., Фомина Н. В. Ветеринарная вирусология – М.: Агропромиздат, 1991. – 431с.

110. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я. и др. // Вирусные болезни животных. - М. - 1998 г. -С.383-406.

111. Туркова С.О., Сулимова Г.Е. Метод определения аллельных вариантов гена BoLA-DRB3,ассоциирующихся с устойчивостью или чувствительностью к лейкозу,с помощью аллельспецифичной полимеразной цепной реакции // Молекуляр.-генет.маркерыживотных.-Киев,1996.-С.21-22.

112. Удина И.Г. Гены главного комплекса гистосовместимости человека и животных // Успехи современной генетики. – 1994. - № 19. – С. 133-177

113. Удина И.Г. и др. Использование ДНК–технологий для оценки наследственной устойчивости к заболеванию лейкозом // Тез. докл. II международной научн. конф.: Биотехнология в животноводстве и ветеринарии. – М., 2000. – С. 219-220

114. Удина И.Г., Карамышева Е.Е., Сулимова Г.Е., Павленко С.П., Туркова С.О., Орлова А.Р., Эрнст Л.К. Сравнительный анализ айрширской и черно-пестрой пород крупного рогатого скота по маркерам гистосовместимости // Генетика. 1998. Т.34. № 12. С.1-7.

115. Федорова С.М. Наследственность в этиологии лейкозов крупного рогатого скота. – Рига: Зинатне. – 1989. - 45 с.

116. Херингтон С. и др. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. – М.: Мир, 1999. – 558 с.

117. Чохатариди Г. Нужно ли нам больше коров ? // Молочное и мясное скотоводство. - 1997. - № 6. – С. 24-26

118. Шипицин А. Г. и др. К вопросу изучения лейкоза крупного рогатого скота в Краснодарском крае. – Ставрополь. – 1999. – С. 156 – 158

119. Шипицын А.Г., Скориков А.В., Чопик Т.Н. и др. Лейкоз крупного рогатого скота в краснодарском крае // Методические рекомендации ГНУ КНИВИ. – 2006. – 28 с.

120. Шишков В.П., Валихов А.В. Серологические методы выявления животных, инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота. В кн.: Лейкозы и злокачественные опухоли животных, по ред. Шишкова В.П., Бурбы Л.Г. – М.: Агропромиздат, 1998.- С.173-194

121. Эйдригевич Е.В., Раевская В.В. Интерьер сельскохозяйственных животных М.: Колос, 1978. – 255с.

122. Эрнст Л.К., Сулимова Г.Е., Орлова А.Р. Особенности распространения антигенов BoLA –A и аллелей гена BoLA –DRB3 у черно – пестрого скота в связи с ассоциацией с лейкозом // Генетика. –1997. –Т.33. - № 1. – С. 87-95

123. Эрнст Л.К., Шишков В.П. Новые аспекты селекции крупного рогатого скота на устойчивость к лейкозу. //С.-х. биология.- 1984.- №2. – С.96-104

124. Юхманова Н., Калашникова Л. Влияние каппа - казеина на качество молока и его сыропригодность // Молочное и мясное скотоводство. – 2004. - № 8. – С. 24 - 25

125. Aida et al. Identification of a New Bovine MHC Class II DRB Allele by Nucleotide Sequencing and an Analysis of Phylogenetic Relationships// Biochemical and Biophysical Research Communications. -1995.-vol. 209. -№ 3, P. 981-988.

126. Aida Y. et al., "Phenotype and Ontogeny of Cells Carrying a Tumor-associated Antigen that is Expressed on Bovine Leukemia Virus-induced Lymphosarcoma". -1993.- Cancer Research.-№ 53.- P. 429-437

127. Aida Y., Miyasaka M., Okada K. Further phenotypic characterization of target cells for bovine leukemia virus experimental infection in sheep // Am. J. Vet. Res.. – 1989. № - 50. – P. 1946-1951

128. Aird I., Bentall H.H., Roberts J.A. A relationship between cancer of stomach and the ABO blood groups // British Medical Journal. – 1953. - №1. – P. 799 – 801

129. Amadori M.I. Archetti L., Verardi R., Berneri C. Role of a distinct population of bovine T cells in the immune response to viral agents.// Viral Immunol. – 1995. -№ 8.- P. 81-91

130. **As**hwell M. S., Van Tassell C. P., Sonstegard T. S. A Genome Scan To Identify Quantitative Trait Loci Affecting Economically Important Traits in a US Holstein Population // J Dairy Sci, Desember .-№ 20, 2001.- P. 450 - 457

131. Band M. R. An Ordered Comparative Map of the Cattle and Human Genomes // Genome Research. 2000- Vol. 10.-P. 1359-1368

132. Barroso A., Dunner S. Technical Note: Detection of Bovine Kappa-Casein Variants A, B, C, and E by Means of Polymerase Chain Reaction-Single StrandConformation Polymorphism (PCR-SSCP)// J. Anim. Sci. -1998. - 76:1535–1538

133. Behl I.D. et.al. Characterization of genetic polymorphism of the bovine lymphocyte antigen DRB3.2 locus in Kankrej cattle (Bos indicus) // J Dairy Sci. – 2007. - Jun 90(6). – P.2997-3001.

134. Beier D., Blankenstein P., Fechner H. Possibilities and limitations for use of the polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of bovine leukemia virus (BLV) infection in cattle. / Zentralbl. Veterinarmed. B. -1992. -V. 39 (1). -P. 69-77.

135. Biozzi G. et al. Genetic regulation of immunoresponsiveness in relation to resistance against infectious diseases / Proc. 2 World Congr. Genet.Appl. Liv. Prod. Madrid. – 1982. – P. 150 - 163

136. Blankenstein P., Fechner H., Looman A., Beier A., Marguardt A., Ebner D. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of BLV proviruses a practical complement BLV diagnostics. / Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. -1998.- V. 111. - P. 180-186.

137. Brien P.J, Kalow B.I Porcine malignant hyperthermia susceptibility: halothane – induced increase in cytoplasmic free calcium in lymphocytes //Am. J. Vet. Res. – 1989. - №. 50. – P. 131 – 135

138. Brown J.H, Jardetzry T., Saper M. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules // Nature. – 1988. –332 :845

139. Burke M.G., Stone R.T., Muggli-Cockett N.E. Nucleotide sequence and northern analysis of a bovine major histocompatibility class II DR beta-like cDNA // Anim. Genet. – 1991. - № 22(4). P. 343-352

140. Burny, A., Bruck C., Cleuter Y. Bovine leukemia virus: a new mode of leukemogenesis // Advances in viral oncology. – 1985. P. 35 – 55

141. Camaschella C., Alfarano A., Gottadi E. Prenatal diagnosis of fetal hemoglobin Lefore – Boston disease on maternal peripheral blood // Blood. – 1990. - №. 75. – P. 2102

142. Carli K.T., Batmaz H., Sen A., Minbay A. Comparison of Serum, Milk and Urine as Samples in an Enzyme-Immunoassay for Bovine Leukemia Virus Infection // Res.Vet.Sci.- 1993.- Vol.55.-№ 3.- P.394-395.

143. Carli K.T., Sen A., Batmaz H., Kennerman E. Detection of IgG antibody to bovine leukemia virus in urine and serum by two enzyme immunoassays // Lett. Appl. Microbiol.- 1999.- Vol.28, N.6.- P.416-418.

144. Casas E., Shackelford S. D.,. Keele J. W, Koohmaraie M., Smith T. P. L. Stone R. T. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle // J. Anim. Sci. 2003. -№ 81. – P. 2976-2983

145. Da, Y., Shanks R.D., Stewart J.A., Lewin H.A. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected dairy cattle with persistent lymphocytosis// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1993. - № 94. – P. 6538-6541.

146. Daniel R.C, Gatei M.H., Good M.F., Boyle D.B., Lavin M.F. Recombinant viral vaccines for enzootic bovine leucosis // Immunol Cell Biol. - 1993. - Oct;71.-P:399-404

147. Davies C.J. Polymorphism of bovine MHC class I genes - Joint report of the Fifth International Bovine Lymphocyte Antigen (BoLA) // European Journal of Immunogenetics. – 1994. – № 21. – P. 239–258.

148. Debacq C., Asquith, B., Reichert M., Burny A., Kettmann R., Willems L. Reduced Cell Turnover in Bovine Leukemia Virus-Infected, Persistently Lymphocytotic Cattle // J. Virol. – 2003. -№ 77. P. 13073-13083

149. Dequiedt F., Cantor G., Valerie T. Bovine Leukemia Virus-Induced Persistent Lymphocytosis in Cattle Does Not Correlate with Increased Ex Vivo Survival of B Lymphocytes // Journal of Virology. – 1999. - №2. – V.73. – P. 1127-1137

150. Deren W, Szewczyk-Sadowska A, Rulka J. The eradication of enzootic bovine leucosis in a large farm population // Pol J Vet Sci. - 2003. -№ 6. - P. 12-14.

151. Dietz A.B., Conen N.D. Bovine lymphocyte antigen Class II Alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows // J Dairy Sci. -1997. - № 80. – P. 406 – 412

152. Dukkipati V.S, Blair H.T, Garrick D.J, Murray A. Ovar-Mhc - Ovine major histocompatibility complex : Role in genetic resistance to diseases // N Z Vet J.- 2006.- Aug;54(4).-P: 153-160

153. Fries R., Beckmann I.S., Georgies M. The bovine gene map // Animal Genetics.- 1989.-V.20.-P. 3-29

154. Fries R., Eggen A., Womack J.E. The bovine genome map // Mamm. Genome. - 1993.-№ **4**.-P. 405-428

155. Fujii J., Otsu K., Zorzato F. Identification of a mutation in the porcine gene // J. Anim. Breed. Genetics. - 1991. - №. 116.- P. 263-267.

156. Gelhaus A., Schnittger L., Mehlitz D., Horstmann R.D., Meyer C.G. Sequence and PCR-RFLP analysis of 14 novel BoLA-DRB3 alleles // Anim. Genet. – 1995. - № 26(3). - P. 147-153

157. Groenen M.A.M. et al. The nucleotide sequence of bovine MHC class II DQB and DRB genes // Immunogenetics. – 1990. -№ 31. – P. 37

158. Gupta I. D., Gupta N., Gupta S.C. Genotyping of β-Lactoglobulin gene by PCR-RFLP in Sahiwal and Tharparkar cattle breeds // BMC Genet.- 2006.-№ 7.-P. 31-33

159. Harding C.V. MHC molecules and antigen presentation // Animal. Genetics. – 1997. – V. 27. – P. 91–96.

160. Hawken R. J., Beattie C. W., Schook L. B. Resolving the genetics of resistance to infectious diseases // Revue Scientifique et Technique. – 1998. – № 17. – P. 17–25.

161. Hoj S. et al. Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle // Animal. Genetics. – 1993. –V.24. - №2. – P. 91 – 96

162. Horin P., Matiasovic J. BoLA DYA polymorphism in Czech cattle // Exp. Clin Immunogenet. – 1998. –15 (1). – P. 56 – 60

163. Kabeya H., Ohashi K., Onuma M. Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection // J Vet Med Sci. -2001.- Jul.-№ 63(7).- P. 703-708

164. Klintevall K. Evaluation of an Indirect ELISA for the Detection of Antibodies to Bovine Leukemia-Virus in Milk and Serum // J. Vir.Meth.- 1991.- Vol.33.- №.3.- P.319-333.

165. Kohara J., Konnai S., Onuma M. Experimental transmission of Bovine leukemia virus in cattle via rectal palpation // Jpn. J Vet Res.- 2006.- May.-№ 54(1).P. 25-30

166. Konnai S., Usui T., Ikeda M. Tumor necrosis factor-alpha genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection // Microbes Infect.- 2006.- Jun 2.- P.312-315

167. Kucerova J., Lund M. S., Sorensen P., Sahana G., Guldbrandtsen B., Nielsen V. H., Thomsen B., Bendixen C. Multitrait quantitative trait Loci mapping for milk production traits in danish Holstein cattle // J Dairy Sci.- June 1. – 2006. –P. 2245 - 2256

168. Kulberg S., Heringstad B., Guttersrud O.A, Olsaker I. Study on the association of BoLA-DRB3.2 alleles with clinical mastitis in Norwegian Red cows // J Anim Breed Genet.- 2007. - Aug;124(4). – P.201-207

169. Lagziel A. et al. An Msp I polymorphism at the bovine growth hormone gene is linked to a locus affecting milk protein percentage // Animal. Genetics. – 1999. –V. 30. - № P. 296 – 299

170. Lagziel A., Lipkin A., Soller M. Association between SSCP haplotypes as the bovine growth hormone gene and milk protein percentage // Genetics.-1996.-V.142.-P. 945-951

171. Ledwidge S.A., Mallard B.A. Multi – primer target PCR for rapid identification of bovine DRB 3 alleles // Animal Genetics. – 2001. - № 32. – P. 219 – 221

172. Lee J., Kim Y., C.S. Kang Investigation of the bovine leukemia virus proviral DNA in human leukemias and lung cancers in Korea // J Korean Med Sci.- 2005. - 20(4). – P.603-606

173. Levin H.A., Wu M.C., Steward J.A. Association between BoLA and subclinical in bovine leukemia virus infection in a herd of Holstein – Friesian cows // Immunogenetics. – 1988. –27(5). – P. 338 – 344

174. Lindberg P. G., Andersson L. Close association between DNA polymorphism of bovine histocompatibility complex class I genes and serological BoLA – A specificities // Anim. Genet. – 1988. - № 19. – P. 245 – 255

175. Lundberg P., Splitter G. AT-Lymphocyte Cytotoxicity against Envelope-Expressing Target Cells Is Unique to the Alymphocytic State of Bovine Leukemia Virus Infection in the Natural Host // Journal of Virology, September 2000. - Vol. 74, - No. 18. - P. 8299-8306

176. Lunde´n A., Sigurdardottir S., Edfors-Lilja I., Danell B., Rendel J. The relationship between bovine major histocompatibility complex classII polymorphism and disease studied by use of bull breeding values // Anim Genet. -1990.-№ 21.-P. 221–232

177. Maillard J.C., Renard C., Chardon P., Chantal I., Bensaid A. Characterization of 18 new BoLA-DRB3 alleles // Anim. Genet. – 1999. -№ 30(3). – P.200-203.

178. Maltseva N.A., Kaledin A.S., Oliynik E.I., Zhivotov A.A., Baranov V. I. Use of diagnostic DNA probes for detection of the provirus of bovine leukemia virus in infected cows // Problems of Virology.- 2002. - №6. – P. 25 – 33

179. McClure H.M., Kuling M.E., Custer P.Ph. – Cancer Res. –1974. – V.34 –P.2745-2757.

180. Meirom R, Brenner J, Trainin Z. BLV-infected lymphocytes exhibit two patterns of expression as determined by Ig and CD5 markers // Vet Immunol Immunopathol.- 1993. – № 36 (2). - P.179-86.

181. Meirom R., Moss S., Brenner J., Heller D. and Trainin Z. Levels and role of cytokines in bovine leukemia virus (BLV) infection.// Leukemia. – 1997. – 11 (Suppl. 3). – P. 219-220

182. Mikko S., Andersson L. Extensive MHC class II DRB3 diversity in African and European cattle // Immunogenetics. – 1995. - № 42 (5).- P. 408-413

183. Miller J.M., Miller L.D., Olson C., Gillette K.G. Virus – like particles in phytohemagglutinin – stimulated lymphocyte cultures with referent to bovine lymphosarcoma // J. Natl. Cancer Inst. – 1969. - № 43. – P. 1297 – 1305

184. Miltiadou D., Law A.S., Russell G.C. Establishment of a sequence-based typing system for BoLA-DRB3 exon 2 // Tissue Antigens. -2003.- Jul.- № 62.- P. 55-65.

185. Miretti M.M., Ferro J.A. Restriction fragment length polymorphism (RLFP) in exon 2 of the BoLA DRB 3 gene in South American cattle // Biochem Genet. – 2001. -№ 39. – P. 311- 324

186. Mirsky M.L., Lewin H.A. Reduced bovine leukaemia virus proviral load in genetically resistant cattle // Anim. Genet.. – 1998. – 29. – P. 145 – 252

187. Mota A.F. et al. Distribution of bovine lymphocyte antigen (BoLA DRB 3) alleles in Brasilian dairy Gir catlle (Bos indicus) // Eur. J. Immunogenet.- 2002. -29 (3). – P. 223 - 227

188. Mullis K., Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction // Meth. Enzymol. -1987.-V.155.-P. 335-350

189. Naj S., Franholm M., Larsen N.J. Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle // Animal Genetics.-1993.-V.24.-P. 91-96

190. Olson C. et al. Goat lymphosarcoma from bovina leukemia virus // J. Nuit Gmcer. Inst.,- 1981.- V. 67.- P. 671-675

191. Oshima K., et al. Evidence on Horisontal Transmission of Bovine Leukemia Virus due to Bloodsucking Tabanid flies // Jap.J. Vet.Sci. -1981. -V. 43. –P.70-80

192. Otsu K. et al. Cosegregation of porcine malignant hyperthermia and probable cause mutation in skeletal muscle ryanodine receptor gene in backcross families // Genomics. – 1991. – V. 11. – P. 744 –750

193. Pue1 A., Groot P. C., Lathrop M. G., Demant P., Mouton D. Mapping of genes controlling quantitative antibody production in Biozzi mice // Journal of lmmunology. – 1995. – № 154. – P. – 5799–5805.

194. Pue1 A., Mevel J. C., Bouthillier Y., Feingold N., Fridman W. H., Mouton D. To ward genetic dissection of high and low antibody responsiveness in Biozzi mice // Proceedings of the Nationuf Academy of Sciences of the USA. – 1996. – № 93. – P. 14742–14746.

195. Puel A., Mouton D.Genes responsible for quantitative regulation of antibody production / // Critical Reviews in Immunolog. – 1996. – № 16. – P. 223–250.

196. Rando A. et al. Identification of bovine k–casein genotypes at the DNA level // Anim. Genet. – 1988. – V. 19. – P. 51 - 54

197. Ripoli M.V., Villegas-Castagnasso E.E., Peral-Garcia P., Giovambattista G., New polymorphisms for the BoLA-DRB3 upstream regulatory region //Tissue Antigens. – 2005. - № 66 (2). – P. 136-137

198. Rumyantsev, S. N. Observations on constitutional resistance to infection // Immunology Today. – 1992. – № 13. – P. 184–187.

199. Rupp R. et al. Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins // J Dairy Sci.- 2007. – Feb. - 90(2). –P. 1029-1038.

200. Russell G.C., Smith J.A., Oliver R.A. Structure of the BoLA DRB3 gene and promoter // European Journal of Immunogenetics. -2004. - № 31. – P. 145-151

201. Shanks R.D., Steward J.A., Levin H.A. Milk and fat yields decline in bovine leuemia virus – infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis // Agricultural Sciences. – 1993. –V. 90. -№ 6. – P. 6538 – 6541

202. Sharif S. et al. Characterization of naturally processed and presented peptides associated with bovine major histocompatibility complex (BoLA) class II DR molecules// Eur J Immunogenet. – 2002. –29 (3). – P. 223 – 227

203. Sharif S., Mallard B.A , Wilkie B.N., Sargeant J.M, Scott H.M., Dekkers J.C.M, Leslie K.E. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA DRB3) wish production traits in Canadian dairy cattle // Animal Genetics. – 1999. - № 30. – P. 157-160

204. Sharif S., Mallard B.A. Presence of glutamine at position 74 of pocket 4 in the BoLA – DR antigen binding groove with occurrence of clinical mastitis caused by Staphylococcus species // Immunogenetics.- 2000. - № 51. – P. 733 – 742

205. Sitte K., East I.J., Lavin M.F., Jazwinska E.C. Identification and characterization of new BoLA-DRB3 alleles by heteroduplex analysis and direct sequencing // Anim. Genet.- 1995. -№ 26(6). P. 413-417

206. So, A. Genetics, polymorphism and regulation of expression of HLA region genes // HLA and diseme. – 1994. – № 4. – P. 1–34.

207. Stear V.J., Dimmock C.K. BoLA antigens are associated with increased frequency of persistent lymphocytosis in bovine leukemia virus infected cattle and with increased incidence of antibodies to bovine leukemia virus // Animal Genetics. – 1988. – V. 19. – P. 151 – 158

208. Straub O.C. Horisontal Transmission studies on enzootic bovine leucosis // Ann. Rech. vet..- 1978.- V.9. - № 4- P. 809-813

209. Suh G. H., Lee J.C., Lee C.Y. Establishment of a bovine leukemia virus-free dairy herd in Korea // J Vet Sci.- 2005. - Sep. - № 6(3).- P. 227-230

210. Tajima S., Aida Y. Induction of expression of bovine leukemia virus (BLV) in blood taken from BLV-infected cows without removal of plasma // Microbes Infect.- 2005.- Aug-Sep.- № 7.- P.1211-1216

211. Takeshima S., Nakai Y., Ohta M. characterization of DRB3 alleles in the MHC of Japanese shorthorn cattle by polymerase chain reaction-sequence-based typing // Journal of Dairy Science. -2002. - Vol 85, Issue 6 1630-1632

212. United States Patent № 5,582,987 Methods for testing bovine for resistance or susceptibility to persistent lymphocytosis by detecting polymorphism in BoLA-DR3 exon 2/ Lewin H.A., van Eijk M. J. T.- December 10, 1996

213. United States Patent № 6,090,540 Methods for judging the possibility of the onset of bovine leukemia and the resistance thereto/ Aida Y.- July 18, 2000

214. United States Patent № 6,815,158 Methods for judging resistance to the onset of bovine leukemia/ Aida Y.- November 9, 2004

215. Vaiman M., Chardon P., Rothschild M. F. Porcine major histocompatibility complex // Revue Scientifique et Technique. – 1998. – № 17. – P. 95–107.

216. Van Eijk M.J.T., Stewart-Haynes J.A., Beever J.E. Development of persistent lymphocytosis in cattle is closely associated with DRB2 // Immunogenetics. – 1992. - 37:64

217. Van Eijk M.J.T., Stewart-Haynes J.A., Lewin H.A. Extensive polymorphism of the BoLA DRB3 gene distinguished PCR-RFLP // Anim. Genet. – 1992. V.–23. - P.483 – 496

218. Ward W.H., Dimmock C.K., Eaves F.W. T lymphocyte responses of sheep to bovine leukaemia virus infection // Immunol. Cell Biol. - 1992. -№ 70.- P. 329-336

219. Weikard R., Kuhn C., Goldammer T., Freyer G., Schwerin M. The bovine PPARGC1A gene: molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis // Physiol Genomics. - March 21. - 2005. –P. 1 - 13.

220. Xu A., Van Eijk V.J. T., Park Ch. Polymorphism in BoLA –DRB3 Exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus // J. of Immunology. –1993. –V. 151. -№ 12. – P. 6977 – 6985

221. Yang D. et al. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus – infected Holtein cattle with persistent lymphocytosis // Agricultural Science. – 1993. – V/ 90. – P. 6538 - 6541