



ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

УДК: 619:616-097:578.828.11

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.1.12

ПРИМЕНЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА НА ОСНОВЕ ИММУНОГЕННОГО ЭПИТОПА GP51 ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Усольцев К.В. – канд. ветеринар. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0001-5279-9836); Горбунова М.Е.* – мл. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-0707-2117); Шангараев Р.И. – канд. ветеринар. наук, науч. сотр. (ORCID 0000-0003-3689-1442); Зайнуллин Л.И. – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-3086-4921); Хаертынов К.С. – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0003-4764-560X); Осянин К.А. – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0003-2763-8605); Хаммадов Н.И. – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0001-5669-1486).

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной
и биологической безопасности»

*maria.metax@bk.ru

Ключевые слова: вирус лейкоза, антиген, антитела, gp51, синтетический пептид, иммуноферментный анализ

Keywords: leukemia virus, antigen, epitope, antibodies, gp51, synthetic peptide, enzyme immunoassay

Поступила: 15.12.2023

Принята к публикации: 25.03.2024

Опубликована онлайн: 02.04.2024



РЕФЕРАТ

Диагностика лейкоза остается одной из ключевых проблем при проведении оздоровительных мероприятий в неблагополучных по данному заболеванию хозяйствах. В Российской Федерации для выявления возбудителя лейкоза применяются различные методы, в том числе серологические, одним из которых является иммуноферментный анализ (ИФА). Принцип непрямого варианта ИФА заключается в выявлении комплекса, образованного антигеном, иммобилизованным на поверхности лунок полистиролового планшета и специфическими антителами, содержащимися в пробах сыворотки крови или молоке крупного рогатого скота. Настоящая работа посвящена изучению возможности применения синтетического пептида, представляющего собой аминокислотную последовательность эпитопов белка gp51 вируса лейкоза, в качестве антигена для ИФА при индикации вируса лейкоза крупного рогатого скота. Для разработки способа ИФА нами был сконструирован и синтезирован антиген – синтетический пептид BLV_{per} (NCKYSNQCGDQGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTLTWEIWNC). С целью наилучшей

сенсibilизации данного пептида были отработаны основные параметры постановки ИФА. В частности, определена оптимальная концентрация пептида для сенсibilизации планшета – 1,0 мкг/мл, блокирующего раствора – 3% раствор сухого обезжиренного молока, антивидового пероксидазного конъюгата – 1:40000, подобран реакционный буфер взаимодействия «антиген-антитело» – ФСБ-Т (рН 7,3), установлен минимальный титр антител к возбудителю, выявляемый в сыворотках крови больных лейкозом коров – 1:1600. Представленный в настоящей работе способ ИФА может быть использован как основа при создании тест-системы для выявления возбудителя лейкоза крупного рогатого скота и найти широкое применение в ветеринарной практике для серологической диагностики.

Лейкоз крупного рогатого скота распространен во многих странах мира: США, страны Центральной и Северной Европы, Латинской Америки, Африки Ближнего Востока, Юго-Восточной Азии. Первый случай лейкоза в России зарегистрирован в 1962 г. в Краснодарском крае [1]. С 1997-2022 гг. в нашей стране лейкоз является наиболее распространенным заболеванием среди инфекционных патологий крупного рогатого скота [2, 3]. Так, в 2022 году в Российской Федерации лейкоз был зарегистрирован на территории 64 субъектов и зафиксировано 6668 неблагополучных пунктов по данной инфекции. Эпизоотическая ситуация в Республике Татарстан характеризуется эндемичностью [4].

Эффективность оздоровительных мероприятий в первую очередь зависит от своевременного проведения диагностических исследований с применением высокочувствительных и специфичных лабораторных методов индикации возбудителя [5]. На сегодняшний день для диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС) применяются различные серологические методы такие как реакция иммунодиффузии (РИД), иммуноферментный анализ (ИФА) и молекулярно-генетические – полимеразная цепная реакция (ПЦР). Серологическая диагностика лейкоза в основном основывается на использовании в качестве антигена вирусных белков p24 и gp51. С помощью данных методов выявляют специфические к ВЛ КРС антитела в различных биологических жидкостях. На основе p24 и gp51 антигенов и специфических моноклональных антител разработаны различные варианты тест-систем [6, 7]. Основным ис-

точником антигенов gp51 и p24 является вирус, выращиваемый в культурах клеток почек эмбриона овцы (FLK), хронически инфицированных вирусом. Выделение и очистка вируса из клеток FLK является малоэффективным и трудоемким процессом, с низким выходом конечного продукта [6].

На сегодняшний день для разработки серологических тест-систем начали использоваться синтетические антигены, которые обладают некоторыми преимуществами по сравнению с антигенными компонентами, полученными на культурах клеток, среди которых: высокая специфичность, физико-химическая стабильность, возможность использования большего разнообразия потенциальных мишеней, адаптация материала полимера под конкретные задачи [6, 8].

Синтетические пептиды представляют собой искусственно созданные аминокислотные последовательности участков различных белковых молекул. Так, можно создать синтетический пептид, состоящий из специфичных иммуногенных эпитопов ВЛ КРС и использовать его в качестве антигена при разработке различных серологических диагностикумов. Иммуногенные эпитопы представлены в соответствующих базах данных, Lanlan Bai et al., предлагают библиотеку из 115 перекрывающихся пептидов, охватывающих все белки гена *env* (gp51 и gp30) и *gag* (p15, p24 и p12) [9]. Однако наиболее предпочтительными для разработки являются пептиды, формирующие белок gp51, т.к. он является основной мишенью противовирусного иммунитета, на это указывает быстрое появление нейтрализующих антител после заражения вирусом. К тому

же в отличие от белка gp51, антитела против р24 не обнаруживаются у животных с низкой провирусной нагрузкой в алейкемической стадии инфекционного процесса [10].

Таким образом, можно предположить, что иммуноферментный анализ, где в качестве одной из антигенной составляющей будут применяться синтетические пептиды, позволит проводить более качественную серологическую диагностику энзоотического лейкоза, значительно увеличив специфичность метода.

Целью данной работы являлась разработка способа иммуноферментного анализа для диагностики лейкоза крупного рогатого скота с использованием синтетических пептидов, состоящих из участков аминокислотных последовательностей антигенных эпитопов белка gp51 ВЛ КРС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Объект исследования – аминокислотные последовательности белков ВЛ КРС, сыворотки крови крупного рогатого скота (n=45), для которых ранее было подтверждено наличие/отсутствие антител к возбудителю лейкоза методами РИД и ИФА [11].

Синтетический пептид. Поиск аминокислотных последовательностей белков ВЛ КРС, и биоинформационный анализ эпитопов белков вириона ВЛ КРС осуществляли с помощью ресурса «Immune Epitope Database». На основе аминокислотной последовательности белка gp51 в позиции от 131 до 163 аа. (GenBank: AB-S11217.1) разработан синтетический пептид - BLV_{per} (N-конец NCKYSYNQCGDQGSFYV-NHQLFLHLKQCHGIFLTWEIWNK-конец-C). Специфичность разработанного синтетического пептида подтверждали с использованием онлайн-утилиты BLAST_r интернет-ресурса NCBI. Синтез пептида заказывали в Alpha Diagnostic Intl. Inc. (США), импортёр ООО «Русмедторг» (Россия).

Контрольные образцы. В качестве положительного контрольного образца (ПКО) и отрицательного контрольного

образца (ОКО) использовали сыворотки крови КРС, для которых ранее было подтверждено наличие/отсутствие антител к возбудителю лейкоза методами РИД и ИФА, а также дополнительно было проведено исследование крови от тех же животных на наличие/отсутствие провирусной ДНК методом ПЦР [11, 12].

В качестве конъюгата антивидовых антител был использован коммерческий препарат антивидового иммунопероксидазного конъюгата против IgG крупного рогатого скота (ООО «Имрек», Россия).

Постановка иммуноферментного анализа с использованием синтетических пептидов. В испытании были использованы планшеты ВНИИ Медполимер (Россия).

1. Планшет сенсibilизировали синтетическим пептидом в концентрации 0,5 – 1,5 мкг/мл. Пептид разводили на фосфатно-солевом буфере (ФСБ) (рН 7,3) с добавлением сухого молока (0,5 %) в объеме 200 мкл на лунку и инкубировали при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 16 ч. Содержимое лунок удаляли и отмывали один раз ФСБ (рН-7,3) с добавлением 0,5% Твин-20 (ФСБ-Т).

2. В каждую лунку планшета вносили по 200 мкл блокирующего белка (3% сухое молоко разводили на ФСБ-Т) и инкубировали при температуре 37 °С в течение 2 ч. Содержимое лунок удаляли и отмывали один раз ФСБ-Т.

3. Во все лунки сенсibilизированного планшета вносили по 50 мкл, а в лунки горизонтального ряда А по 100 мкл ФСБ (рН-7,3). Затем в лунки А1 и А8 вносили по 4 мкл отрицательного и положительного контрольного образца (разведение 1:25), соответственно. Аналогично готовили разведения исследуемых сывороток. Далее с ряда «А» по «Н» проводили титрование анализируемых образцов с разведения 1:25 до 1:3200. Планшет закрывали крышкой и инкубировали в течение 45 мин при температуре 37°С. Содержимое лунок удаляли и отмывали три раза ФСБ-Т.

4. Во все лунки планшета вносили по 100 мкл рабочее разведение антивидового

конъюгата. Планшет закрывали крышкой и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Содержимое лунок удаляли и отмывали три раза ФСБ-Т.

5. Во все лунки планшета вносили по 100 мкл субстратной смеси. В качестве субстратной смеси использовали тетраметилбензидин гидрохлорид (ТМБ). Планшет закрывали крышкой и инкубировали в темном месте при комнатной температуре (22±2°C) в течение 10 мин.

6. Реакцию останавливали добавлением в каждую лунку планшета по 50 мкл 1М серной кислоты и проводили учет результатов ИФА.

7. Учет результатов ИФА осуществляли на спектрофотометре Multiskan GO («ThermoFisher», США).

Интерпретация результатов. Анализ считается: положительным, если коэффициент отношения оптической плотности (ОП) исследуемой сыворотки к ОП отрицательного образца больше или равен 2,2; сомнительным, если коэффициент отношения ОП исследуемой сыворотки к ОП отрицательному образцу от 2,0 до 2,2; отрицательным, если коэффициент отношения ОП исследуемой сыворотки к ОП отрицательному образцу меньше 2,0.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Для разработки синтетических пептидов с помощью биоинформационного анализа нами были отобраны наиболее иммуногенные эпитопы вирусных белков gp51, gp30 и p24 ВЛ КРС. В таблице 1 представлено количество иммуногенных эпитопов основных антигенов ВЛ КРС.

По результатам биоинформационного анализа иммуногенных эпитопов ВЛ КРС было установлено, что наиболее активным является белок gp51. Таким образом для дальнейшей работы мы использовали

эпитопы белка gp51 характеризующееся Т-клеточным иммунным ответом, расположенным в позиции от 131 до 163 аа. Для максимального сходства разрабатываемого пептида с нативным антигеном вируса лейкоза использовали цельную аминокислотную последовательность – N-конец DQGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTLTWEIW

конец-С, соответствующую указанной выше иммуногенной области.

Представленная аминокислотная последовательность была проанализирована на пептидном калькуляторе, для определения её физических характеристик. По результатам пептидной калькуляции установлено, что анализируемая последовательность характеризуется нулевой изоэлектрической точкой при pH=6,34, при нейтральной pH заряд белковой молекулы составляет минус 0,8 ед., молекулярная масса составила 3,68 кДа, коэффициент экстинкции равен 12660 М⁻¹см⁻¹. Для улучшения физических свойств пептида, обозначенного нами BLVпер, была произведена его модификация с добавлением гидрофильных и имеющих положительный заряд аминокислот, таких как аспаргин (N), цистеин (C), лизин (K), тирозин (Y), серин (S), глутамин (Q), глицин (G). В результате изменения пептид приобрёл следующую аминокислотную последовательность: N-конец NCKYSNQCGDQGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTLTWEIWNCKконец-С. Со следующими физическими показателями: нулевой изоэлектрической точкой при pH=7,01, при нейтральной pH заряд белковой молекулы составляет 0 ед., молекулярная масса составила 4,89 кДа, коэффициент экстинкции равен 13940 М⁻¹см⁻¹.

Таблица 1 – Иммуногенные эпитопы белков вируса лейкоза крупного рогатого скота

Антиген	Количество иммуногенных эпитопов	Иммунный ответ	
		Т-клеточный	В-клеточный
gp51	71	45	118
gp30	14	15	9
p24	53	5	48

По результатам BLASTp-анализа установлено, что аминокислотная последовательность синтетического пептида BLV_{ppr} является специфичной только для возбудителя лейкоза крупного рогатого скота.

Следующим этапом настоящей работы являлась разработка способа иммуноферментного анализа, которая включала в себя определение концентрации вирусного антигена для сенсibilизации планшета, реакционного буфера взаимодействия «антиген-антитело», определения минимального титра антител к возбудителю, проверку диагностической чувствительности.

Определение концентрации вирусного антигена. Для определения оптимальной концентрации вирусного антигена при сенсibilизации планшета были использованы следующие разведения синтетического пептида BLV_{ppr} – 0,5; 1,0 и 1,5 мкг/мл. В результате анализа установлено, что наиболее оптимальная концентрация сенсibilизируемого вирусного антигена составляет 1,0 мкг/мл. При данной концентрации антигена ОП ПКО составила 1,89, ОКО – 0,513, а коэффициент отношения ОП отрицательного и контрольного образцов был равным 3,68 ед. Сравнивая полученные результаты и данные других авторов, занимавшихся разработкой серологических тестов на основе рекомбинантного gp51 белка вируса лейкоза [13], рекомбинантного p24 антигена [6], можно сделать заключение, что предложенный нами синтетический пептид обладает высокой антигенной активностью и пригоден для дальнейшей разработки способа иммуноферментного анализа. Зависимость средней ОП контрольных образцов от концентрации синтетического пептида представлена на рисунке 1.

Применение блокирующего раствора. Наиболее широко в качестве блокирующего раствора используются инертные белки такие как бычий сывороточный альбумин, желатин, казеин, а также сыворотка любого вида животного, обезжиренное сухое молоко [6]. Используемый белок должен связаться теми участками

поверхности лунки, которые не заняты антигеном, чтоб на них в ходе анализа не сорбировались белки из образца и ферментный конъюгат, поскольку это может привести к появлению неспецифических взаимодействий. К тому же блокирующий раствор добавляют в растворы, которые используют для разведения образца и ферментного конъюгата. В данной работе в качестве блокирующего раствора использовался раствор обезжиренного сухого молока. При использовании 3% раствора сухого молока в качестве блокирующего раствора максимальные показатели ОП ОКО составили 0,549, а ПКО – 1,934. Тогда как ОП ОКО без блокировки достигли 0,937, а ПКО – 3,098. Результаты проведенного эксперимента показали, что наиболее оптимальным вариантом ИФА является вариант с использованием блокирующего раствора.

Подбор буфера взаимодействия «антиген-антитело». При подборе реакционного буфера взаимодействия «антиген-антитело» были испытаны следующие буферные растворы: 0,01М ФСБ с 0,05% твин 20 (pH 7,3) (ФСБ-Т) и 0,01М трис HCl. По результатам двукратных разведений ПКО и ОКО, установили, что наиболее оптимальным является ФСБ-Т (pH 7,3). При использовании данного буфера отмечалось более высокое значение коэффициента отношения значений ОП ПКО к ОКО, чем при использовании 0,01 М трис HCl. Кроме того, при применении 0,01 М трис HCl наблюдаются повышенные фоновые значения, которые находятся в диапазоне от 1,474 до 2,564 в зависимости от разведения сыворотки крови КРС.

Определение минимального титра антител к возбудителю лейкоза. Для определения минимального титра противовирусных антител к ВЛ КРС в исследуемых пробах было проанализировано шесть положительных сывороток крови крупного рогатого скота, в трех повторах. Положительный статус данных образцов был подтвержден ранее методами РИД и ИФА [11].

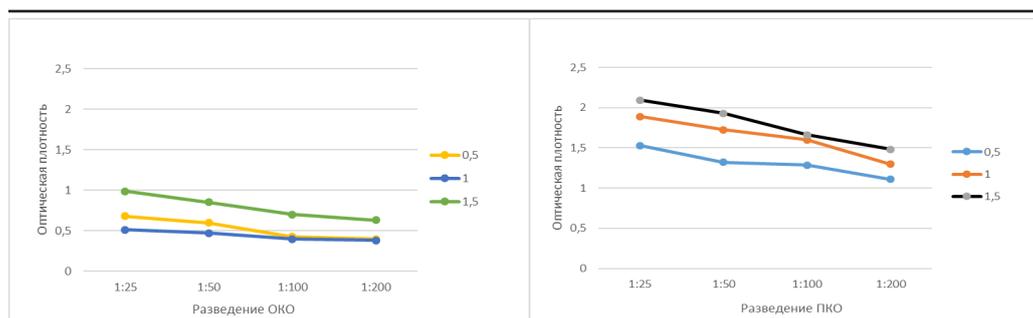


Рисунок 1 – Антигенная активность синтетического пептида в непрямом ИФА с контрольными образцами.

Таблица 2 – Определение минимального титра антител к возбудителю лейкоза крупного рогатого скота при использовании разрабатываемого способа ИФА

Разведение	Сыворотки крови КРС M ± SD	ОКО M ± SD	Коэффициент отношения значения оптической плотности образцов к ОКО
1:25	1,35±0,19	0,182±002	7,4
1:50	1,07±0,14	0,138±002	7,7
1:100	0,9±0,2	0,105±0,01	8,5
1:200	0,68±0,19	0,089±0,04	7,6
1:400	0,53±0,17	0,074±0,04	7,1
1:800	0,41±0,19	0,066±0,01	6,2
1:1600	0,2±0,11	0,058±0,03	3,4
1:3200	0,09±0,05	0,052±0,02	1,7

При определении анализируемого показателя для разрабатываемого способа ИФА, каждый образец был раститрован, начиная с 1:25 и заканчивая разведением 1:3200. Результаты анализа представлены в таблице 2.

В результате эксперимента установлено, что минимальный титр антител к ВЛ КРС, выявляемый в исследуемых сыворотках крови с помощью ИФА, составляет 1:1600. Критерием того, что исследуемый образец считался положительным, являлся коэффициент отношения значений ОП исследуемого образца к ОКО равное или больше 2,2.

Подбор разведения антивидового пероксидазного конъюгата. Для подбора разведения антивидового пероксидазного конъюгата были испытаны следующие концентрации: 1:10000, 1:20000; 1:40000;

1:60000; 1:80000. Наиболее оптимальным разведением конъюгата при постановке ИФА по обнаружению антител к ВЛ КРС является 1:40000. При применении данного титра отмечалось более высокое значение коэффициента отношения значений ОП положительных и отрицательных образцов при всех разведениях сывороток от 1:25 до 1:200.

Проверка диагностической чувствительности. Определение чувствительности складывается из показателей аналитической и диагностической чувствительности. Если на вопрос о аналитической чувствительности ответ вытекает из показателей максимально работоспособного разведения анализируемого образца, тогда как диагностическая – выражающийся в количестве результатов, совпадающих с аналогичным (зарегистрированным) те-

стом. В нашем случае для определения диагностической чувствительности представленного диагностикума исследовали 45 проб сывороток крови КРС (20 – отрицательных, 25 – положительных).

По результатам исследования 45 сывороток крови чувствительность разработанного способа на основе синтетического пептида составила 100%. В качестве теста для сопоставления результатов применяли «Набор для выявления антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота в сыворотке крови и молоке иммуноферментным методом» (ФГУП «Курская биофабрика», Россия).

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

В результате анализа иммуногенных эпитопов gp51 ВЛ КРС выполнен дизайн синтетического пептида (NCKYSNQCGDQGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTLTWEIWNC) для определения антител к возбудителю лейкоза крупного рогатого скота. Разработанный пептид характеризовался оптимальными физико-химическими показателями (растворимость, расчётные значения рН и изоэлектрической точки молекулы). На основе применения созданного синтетического пептида в качестве антигенной составляющей разработан способ непрямого иммуноферментного анализа для обнаружения антител к ВЛ КРС. Для разработанного способа отработаны основные параметры постановки. В частности, определена оптимальная концентрация синтетического пептида для сенсibilизации планшета - 1,0 мкг/мл, антивидового пероксидазного конъюгата – 1:40000, блокирующего раствора – 3,0% обезжиренное сухое молоко, подобран реакционный буфер для взаимодействия «антиген-антитело» - ФСБ-Т (рН 7,3), установлен минимальный титр антител к ВЛ КРС, выявляемый в сыворотках крови - 1:1600. Разрабатываемый способ ИФА с использованием синтетического пептида обладает высокой чувствительностью и может найти широкое применение в ветеринарной практике для диагностики вируса лейкоза.

THE USE OF A SYNTHETIC PEPTIDE BASED ON THE IMMUNOGENIC EPITOPE GP51 FOR SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF BOVINE LEUKEMIA VIRUS

Usoltsev K.V. – Candidate of Veterinary Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0001-5279-9836), **Gorbunova M.E.** * – Junior Researcher (ORCID 0000-0002-0707-2117), **Shangaraev R.I.** – Candidate of Veterinary Sciences, Researcher, (ORCID 0000-0003-3689-1442), **Zainullin L.I.** – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher (ORCID0000-0002-3086-4921), **Khaertynov K.S.** –Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0003-4764-560X), **Osyenin K.A.** – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0003-2763-8605), **Khammadov N.I.** – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher. (ORCID 0000-0001-5669-1486).

FSBSI «Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety»

* maria.metax@bk.ru

ABSTRACT

Diagnosis of leukemia remains one of the key problems in carrying out recreational activities in farms that are disadvantaged by this disease. In the Russian Federation, various methods are used to identify the causative agent of leukemia, including serological methods, one of which is enzyme immunoassay (ELISA). The principle of the indirect variant of ELISA is to identify a complex formed by an antigen immobilized on the surface of the wells of a polystyrene tablet and specific antibodies contained in blood serum samples or cattle milk. The present work is devoted to the study of the possibility of using a synthetic peptide, which is an amino acid sequence of epitopes of the gp51 protein of the leukemia virus, as an antigen for ELISA in the indication of the bovine leukemia virus. To develop the ELISA method, we designed and synthesized the antigen – synthetic peptide BLVPEP (NCKYSNQCGDQGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTLTWEIWNC). In order to best sensitize this peptide, the main parameters of

the ELISA formulation were worked out. In particular, the optimal concentration of the peptide for sensitization of the tablet was determined - 1.0 micrograms/ml, blocking solution - 3% solution of skimmed milk powder, anti-species peroxidase conjugate - 1:40000, the reaction buffer of the interaction "antigen-antibody" - FSB-T (pH 7.3) was selected, the minimum titer of antibodies to the pathogen, detectable in the blood sera of cows with leukemia - 1:1600. The ELISA method presented in this paper can be used as a basis for creating a test system for detecting the causative agent of bovine leukemia and find wide application in veterinary practice for serological diagnostics.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Захарова, Ю. Н. Оценка лабораторных методов диагностики лейкоза КРС и анализ экономического ущерба / Ю. Н. Захарова, О. В. Ланец // Научный диалог: Молодой ученый : Сборник научных трудов по материалам III международной научной конференции, Санкт-Петербург, 22 января 2017 года. - Санкт-Петербург: Центр Научных Конференций Международной Научно-Исследовательской Федерации "Общественная наука", 2017. - С. 50-52. - doi 10.18411/spc-22-01-2017-2-11.
2. Агольцев, В. А. Сравнительная диагностическая оценка серологического и молекулярно-генетического методов лабораторных исследований на лейкоз крупного рогатого скота / В. А. Агольцев, Е. С. Красникова, А. А. Щербаков [и др.] // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. - 2012. - № 4 (90). - С. 56-59.
3. Эпизоотическая ситуация в Российской Федерации 2022 год. ФГБУ ВНИИЗЖ АИЦ Управления ветнадзора г. Владимир. [Электронный ресурс]. - Режим доступа: URL: - https://fsvps.gov.ru/sites/default/files/files/iac/iac_epizooticheskaya_situaciya_v_rf_2022_god.pdf, свободный. - (дата обращения: 2.08.2023).
4. Шангараев, Р. И. Мониторинг эпизоотической ситуации лейкоза крупного рогатого скота в Республике Татарстан с применением молекулярно-генетических и серологических методов диагностики / Р. И. Шангараев, М. Е. Горбунова, Р. Ф. Сафина [и др.] // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. - 2023. - № 1(219). - С. 58-64. - doi 10.53083/1996-4277-2023-219-1-58-64.
5. Донник, И. М. Лейкоз крупного рогатого скота - диагностика, оздоровление, антропоозоонозный потенциал (история вопроса) (обзор) / И. М. Донник, М. И. Гулюкин, В. А. Бусол [и др.] // Сельскохозяйственная биология. - 2021. - Т. 56, № 2. - С. 230-244. - doi 10.15389/agrobiology.2021.2.230rus.
6. Мукантаев, К. Н. Современные аспекты серологической диагностики энзоотического лейкоза крупного рогатого скота / К. Н. Мукантаев, К. К. Муканов, А. В. Шустов [и др.] // Биотехнология. Теория и практика. - 2012. - № 3. - С. 3-15.
7. Meas, S. Seroprevalence and molecular evidence for the presence of bovine immunodeficiency virus in Brazilian cattle / S. Meas, F. J. Ruas, T. Usui [et al.] // Japanese Journal of Veterinary Research. - 2002 - Vol. 50, №1. - P. 9-16
8. Усольцев, К. В. Изучение возможности использования синтетических пептидов для обнаружения присутствия вирионов возбудителя энзоотического лейкоза в организме человека и животных / К. В. Усольцев, Р. Ф. Сафина, М. Е. Горбунова [и др.] // Физико-химическая биология как основа современной медицины : тезисы докладов участников Международной научной конференции, посвященной 75-летию со дня рождения профессора Е. В. Барковского, Минск, 21 мая 2021 года / Министерство здравоохранения Республики Беларусь; Белорусский государственный медицинский университет. - Минск: Белорусский государственный медицинский университет, 2021. - С. 308-309.
9. Bai, L. Antigenicity of subregions of recombinant bovine leukemia virus (BLV) glycoprotein gp51 for antibody detection. / L. Bai, M. Soya, M. Ichikawa // J Virol Methods. 2023. - 311:114644. doi: 10.1016/j.jviromet.2022.114644.

10. Suzuki, A. Phylogenetic Analysis of South African Bovine Leukaemia Virus (BLV) Isolates / A. Suzuki, R. Chapman, N. Douglas [et al.] // *Viruses*. – 2020. – Vol. 8. – P. 898.
11. Gorbunova, M. E. A new approach to the diagnosis of enzootic leukosis by genetic markers of bovine leukemia virus / M. E. Gorbunova, R. F. Safina, K. V. Usoltsev [et al.] // *Biointerface Research in Applied Chemistry*. – 2022. – Vol. 12, No. 4. – P. 4448-4462. doi 10.33263/BRIAC124.44484462.
12. Горбунова, М. Е. Разработка способа экспресс диагностики лейкоза крупного рогатого скота, основанного на обнаружении гена нуклеокапсидного белка p24 методом ПЦР в режиме реального времени / М. Е. Горбунова // *Ветеринарный врач*. 2016. – № 6. – С. 3-7.
13. Giuseppe, A. D. Expression of the Bovine Leukemia Virus Envelope Glycoprotein (gp51) by Recombinant Baculovirus and Its Use in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay / A. D. Giuseppe, F. Feliziani, D. Rutili, G. M. De Mia / *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. – 2004. – V. 11. – №1. – P.147–151.
- REFERENCES**
1. Zakharova, Yu. N., Lanets O.V. Evaluation of laboratory methods for diagnosing cattle leukemia and analysis of economic damage / Yu. N. Zakharova, O. V. Lanets // In the collection: Scientific dialogue: A young scientist. Collection of scientific papers based on the materials of the III International Scientific Conference. 2017:50-52. – doi 10.18411/spc-22-01-2017-2-11 (In Russ.)
2. Agoltsev, V. A. Comparative diagnostic evaluation of serological and molecular genetic methods of laboratory tests for bovine leukemia / V. A. Agoltsov, E. S. Krasnikova, A. A. Shcherbakov [et al.] // *Bulletin of the Altai State Agrarian University*. 2012:4 (90):56-59 (In Russ.)
3. Epizootic situation in the Russian Federation 2022. FSBI VNIIZH AIC of the Veterinary Supervision Department of Vladimir. [electronic resource]. – Access mode: URL: – https://fsvps.gov.ru/sites/default/files/files/iac/iac_epizooticheskaya_situaciya_v_rf_2022_god.pdf free. – (date of application: 2.08.2023).
4. Shangaraev, R. I. Monitoring of the epizootic situation of bovine leukemia in the Republic of Tatarstan using molecular genetics and serological diagnostic methods / R. I. Shangaraev, M. E. Gorbunova, R. F. Safina [et al.] // *Bulletin of the Altai State Agrarian University*. 2023:1(219):58-64. – doi 10.53083/1996-4277-2023-219-1-58-64 (In Russ.)
5. Donnik, I. M. Bovine leukemia - diagnostics, rehabilitation, anthropozoon potential (background) (review) / I. M. Donnik, M. I. Gulyukin, V. A. Busol [et al.] // *Agricultural Biology*. 2021:56(2):230-244. – doi 10.15389/agrobiology.2021.2.230rus (In Russ.)
6. Mukantaev, K. N. Modern aspects of serological diagnostics of enzootic leukemia of cattle / K. N. Mukantaev, K. K. Mukanov, A.V. Shustov [et al.] // *Biotechnology. Theory and practice*. 2012:3:3-15 (In Russ.)
7. Meas, S. Seroprevalence and molecular evidence for the presence of bovine immunodeficiency virus in Brazilian cattle / S. Meas, F. J. Ruas, T. Usui [et al.] // *Japanese Journal of Veterinary Research*. 2002:50 (1):9–16.
8. Usoltsev, K. V. Studying the possibility of using synthetic peptides to detect the presence of virions of the causative agent of enzootic leukemia in humans and animals / K. V. Usoltsev, R. F. Safina, M. E. Gorbunova [et al.] // *Physico-chemical biology as the basis of modern medicine : abstracts of reports of participants of the International Scientific Conference dedicated to the 75th anniversary of the Birthday of Professor E. V. Barkovsky, Minsk, May 21, 2021 / Ministry of Health of the Republic of Belarus; Belarusian State Medical University. – Minsk: Belarusian State Medical University, 2021:308-309.*
9. Bai, L. Antigenicity of subregions of recombinant bovine leukemia virus (BLV) glycoprotein gp51 for antibody detection. / L. Bai, M. Soya, M. Ichikawa [et al.] // *J*

- Virol Methods. 2023:311:114644. – doi: 10.1016/j.jviromet.2022.114644.
10. Suzuki, A. Phylogenetic Analysis of South African Bovine Leukaemia Virus (BLV) Isolates / A. Suzuki, R. Chapman, N. Douglas [et al.] // *Viruses*. 2020:8:898.
11. Gorbunova, M. E. Development of a method for rapid diagnosis of bovine leukemia based on the detection of the p24 nucleocapsid protein gene by real-time PCR / M. E. Gorbunova // *Veterinarian*. 2016:6:3-7 (In Russ.)
12. Gorbunova, M. E. A new approach to the diagnosis of enzootic leukosis by genetic markers of bovine leukemia virus / M. E. Gorbunova, R. F. Safina, K. V. Usoltcev [et al.] // *Biointerface Research in Applied Chemistry*. – 2022:12(4):4448-4462. – doi 10.33263/BRIAC124.44484462.
13. Giuseppe, A. D. Expression of the Bovine Leukemia Virus Envelope Glycoprotein (gp51) by Recombinant Baculovirus and Its Use in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay / A. D. Giuseppe, F. Feliziani, D. Rutili, G. M. De Mia / *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2004:11(1):147–151.