

УДК: 619:616.98:578.828.11:636.22/.28

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ОДНОВРЕМЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЛЕЙКОЗА И ИММУНОДЕФИЦИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Усольцев К.В. - канд. вет. наук, вед. науч. сотр., Горбунова М.Е. – мл. науч. сотр., Сафина Р.Ф. – асп., Шангараев Р.И. - канд. вет. наук, мл. науч. сотр., Сальманова Г.Р. – асп., Осянин К.А. - канд. биол. наук, зав. отд. биохимии и генетического анализа, Фаизов Т.Х. - д-р вет. наук, зав. лаб. молекулярно-генетического анализа, Хаммадов Н.И. - канд. биол. наук, вед. науч. сотр., ФГБНУ «Федеральный центр радиационной, токсикологической и биологической безопасности»

Ключевые слова: возбудитель лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС), возбудитель иммунодефицита крупного рогатого скота (ВИ КРС), полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ), энзоотический лейкоз, дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), геном. **Key words:** bovine leukemia virus (BLV), bovine immunodeficiency virus (BIV), real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), enzootic leukemia, deoxyribonucleic acid (DNA), genome.



РЕФЕРАТ

Статья описывает процесс разработки способа одновременной генетической идентификации нуклеиновых кислот вирусов лейкоза (ВЛ) и иммунодефицита (ВИ) крупного рогатого скота (КРС). При создании данного способа были использованы ранее разработанные праймерные комбинации к провирусным ДНК ВЛ КРС, ВИ КРС и ДНК КРС. Для контроля амплификации были созданы два положительных контрольных образца (ПКО), представляющие собой рекомбинантные генетические конструкции на основе плазмиды pALT2 со встроенными специфичными нуклеотидными последовательностями участков провирусной ДНК ВЛ КРС и ВИ КРС. Подобран оптимальный температурно-временной режим и экспериментально доказана его работоспособность. Методом десятикратных разведений рекомбинантных плазмид, несущих специфичные гены ВЛ КРС и ВИ КРС, определена минимальная чувствительность, которая составила 1 – 3 молекул ДНК в 1 мкл реакционной смеси для генов обоих возбудителей. Также в результате проведения ПЦР с образцами гетерогенной и гомогенной ДНК доказана высокая специфичность разработанного способа. Практическая значимость и работоспособность разработанного способа подтверждены исследованиями образцов крови КРС, полученных от больных и здоровых животных, из животноводческих хозяйств неблагополучных по лейкозу. Предложенный способ позволяет одной реакцией и в одной реакционной смеси обнаруживать и идентифицировать провирусную ДНК ВЛ КРС и ВИ КРС одновременно.

ВВЕДЕНИЕ

В Российской Федерации энзоотический лейкоз является наиболее распространенной инфекцией. Так, по данным Россельхознадзора, в 2019 году энзоотический лейкоз занимал первое место по количеству заболевших животных (20266

особей) [21]. Ущерб, причиняемый лейкозом КРС, обусловлен снижением продуктивности животных [5, 6], преждевременной выбраковкой больного лейкозом скота [2], уменьшением приплода и потерей его племенной ценности (ограничениями в реализации), перево-

дом племенных животных в категорию товарных, затратами на проведение ветеринарно-санитарных и зоотехнических мероприятий.

По существующим правилам борьбы с лейкозом КРС [20], основным методом, по которому определяют факт инфицированности животных возбудителем лейкоза КРС (ВЛ КРС), является реакция иммунодиффузии (РИД). Это достаточно простой и дешёвый метод диагностики лейкоза, однако обладающий некоторыми недостатками, такими как субъективность, длительность постановки анализа (до 48 часов) и недостаточная чувствительность по сравнению с молекулярно-генетическими методами [1].

Согласно новым ветеринарным правилам по профилактике и ликвидации лейкоза [22] к узаконенным методам лабораторной диагностики добавился иммуноферментный анализ. Данный метод является более чувствительным и специфичным по сравнению с РИД, и он успешно адаптируется под различные автоматизированные системы проведения анализа, что значительно сокращает время постановки ИФА и снижает возможность ошибки исследователя. Однако следует понимать, что процесс антителообразования имеет волнообразный характер и зависит от возраста, физиологического состояния организма животного, условий кормления и других факторов [3]. Поэтому, при лабораторной диагностике энзоотического лейкоза важно комбинировать серологические и молекулярно-генетические методы анализа, такие как ПЦР. ПЦР является высокочувствительным методом анализа и позволяет обнаруживать непосредственно провирусную ДНК возбудителя в исследуемой пробе. Данный метод позволяет выявлять возбудителя в организме уже на первых неделях жизни телят в отличие от серологической диагностики (РИД, ИФА), при которой устойчивые результаты анализов получаются к 6-ти месячному возрасту [4]. Кроме того, ПЦР позволяет надежно обнаруживать возбудителя лейкоза КРС в начале инкубационного периода, когда в

крови животного ничтожный уровень специфических антител. Также метод ПЦР можно успешно адаптировать к автоматизированным системам проведения анализа, начиная с момента пробоподготовки и кончая детекцией результатов.

Также следует заметить, что часто энзоотический лейкоз протекает в виде смешанной ретровирусной инфекции [5, 6, 11]. В качестве ко-инфекции при основном заболевании выступает иммунодефицит крупного рогатого скота. Возбудителем этой инфекции является вирус иммунодефицита КРС (BIV), относящийся к семейству Retroviridae и роду Lentivirus [24, 25]. К последнему, помимо BIV и HIV (вирус иммунодефицита человека), относятся вирусы инфекционной анемии лошадей (EIAV), артрита-энцефалита коз (CAEV), иммунодефицита кошек (FIV) и иммунодефицита обезьян (SIV) [15, 24, 25]. Вирус иммунодефицита КРС может вызывать латентную инфекцию, взаимодействуя с такими иммунокомпетентными клетками, как Т-лимфоциты, моноциты и нейтрофилы [15]. Воздействуя на данные клетки, вирус иммунодефицита может привести к нарушению иммунного ответа организма на различные инфекционные агенты [16, 18, 19, 20]. Поражая иммунокомпетентные клетки, вирус иммунодефицита КРС при смешанной инфекции с вирусом лейкоза КРС может усиливать патогенное действие последнего на организм животного [11].

В связи с вышеизложенным, целью данной работы было создание способа одновременной идентификации возбудителей лейкоза и иммунодефицита крупного рогатого скота на основе метода мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали две рекомбинантные плазмиды на основе плазмиды рAL2-T. Одна плазида содержала участок идентичный провирусной ДНК возбудителя лейкоза, другая - провирусную ДНК возбудителя иммунодефицита КРС. Синтез целевых последовательностей

Таблица 1

Праймеры и зонды для амплификации участков генов BLV, BIV и «ВКО»

Целевой ген; ID GenBank	Наименование	Последовательность (5' à 3')	Локализация маркерной последовательности	Отжиг олигонуклеотидов, °С
p24 BLV; K02120	FPp24BLV	ccgttagctggtcatgtgggc	1041 – 1061	62,2°С
	Rp24BLV	ggcaccgggttcg-caagtatg	1159 – 1180	61,0°С
	Zp24BLV	ROX-tgatcgaccgggaa-gcaatatattggca-BHQ2	1126 - 1154	69,2
env BIV; NC_001413	FPenvBIV	caactatggatcaggacctagacggc	5410 - 5435	60,1°С
	RPenvBIV	aaccccaataaaggcataattgaaacatta	5641 - 5670	60,2°С
	ZenvBIV	R6G-aacgcggggaaagg-gaggaggatc-RTQ1	5440 - 5464	69,0°С
ген каппа-казеина КРС; МК455075.1 («ВКО»)	FPVКО	cttggcaggcacag-tattgaca	30 - 56	56,6°С
	RPVКО	attactac-caacagaaccagttgac	144 - 166	56,1°С
	ZVКО	CY5-ttgaagaattggg-caggtgacctaaactg-BHQ3	105 - 133	64,0°С

нуклеотидов (праймеры и зонды) ВЛ КРС и ВИ КРС, вставка данных последовательностей в плазмиды, накопление и выделение рекомбинантных плазмид осуществлялись в ЗАО «Евроген» (г. Москва).

В исследовании также были задействованы образцы крови коров, положительно реагирующих в РИД (содержат антитела к вирусу лейкоза КРС).

Выделение ДНК осуществляли из лейкоцитов крови коров используя набор «ДНК-сорб В» согласно инструкции производителя (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Лейкоциты получали из цельной крови КРС с использованием буфера А pH 7,6 (318 mM сахараза, 1% тритон-Х 100, 5 mM MgCl₂,

2 mM трис-НСI) по следующему протоколу: К 300 мкл цельной крови добавили 1 мл буфера А; осторожно перемешали и поместили в морозильник на -16°С на 10 мин; центрифугировали 5000 об/мин в течение 1 мин, надосадочную жидкость удалили; к осадку лейкоцитов добавили 100 мкл ТЕ буфера, перемешали и центрифугировали 5000 об/мин в течение 1 мин, надосадочную жидкость удалили.

Мультиплексную ПЦР в режиме реального времени проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, включающей 10-кратный ПЦР буфер (ЗАО «Синтол», г. Москва) - 2 мкл; 2,5 mM смесь нуклеозидтрифосфатов (ЗАО «Синтол», г. Москва) - 2 мкл; 25 mM раствор MgCl₂ (ЗАО «Синтол», г. Москва) - 2 мкл; 10 pM

Таблица 2
Нуклеотидные последовательности BLV и BIV, встроенные в плазмиды

Целевой ген	Название	Нуклеотидная последовательность 5' à 3'
p24 BLV	BLV Control	ggcaccgggttcgcaagtatggatacaaacactacgacttgcaatcctg- caggccgacctaccctgctgacctagaacagcttfgccaatatattgcttccccgg tcgacsaaacggccacatgaccagcctaacgg
Env BIV	BIV Control	саactatggatcaggacctagacggcgcggaacgcggggaaagggaggag- gatccgaagaactgcttcaggaggagatcaacgaaggaggctgacagccagag aagctttacaacatggatcaataacgggtgagatccaccctgggtcctggcaggaa tgctgtccatgggagtaggaatgctactaggagtagtattgtcagttaccagacacact gatttggataactaatgtttcaattatgcctttattgggggt

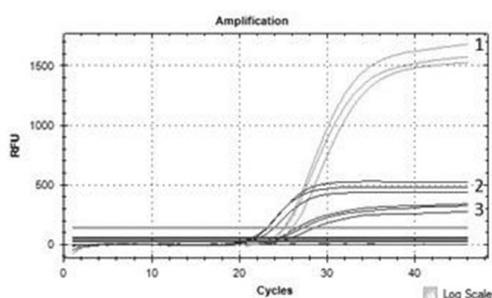


Рис.1 Проверка работоспособности ПЦР тест-системы для индикации провирусной ДНК лейкоза и иммунодефицита (интерфейс программы *Bio-Rad CFX Manager 2.1*). Примечание: 1. графики флуоресценции по каналу ROX (индикация ВЛ КРС); 2. графики флуоресценции по каналу R6G (индикация ВИ КРС); 3. графики флуоресценции по каналу Cy5 (индикация ВКО).

растворы прямых и обратных праймеров, ПЦР-зондов к ВЛ КРС и ВИ КРС, ДНК коровы (внутренний контрольный образец, ВКО) по 0,5 мкл каждого олигонуклеотида; Таq полимераза 0,5 ед/мкл – 0,5 мкл; раствор выделенной ДНК (матрица) – 11 мкл. Температурно-временной режим амплификации на амплификаторе CFX 96 (Био-Рад, США) был: 1-й цикл 95°C - 3 мин; 2-й цикл 95°C - 15 сек; 60°C - 30 сек. 2-й цикл был повторен 42 раза. Флуоресценция детектировалась по каналам R6G, ROX и Cy5 на втором цикле амплификации (при температуре 60°C).

Результаты интерпретировали по факту наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции, которая устанавливается автоматически, в программном обеспечении прибора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Для разрабатываемого способа индикации и идентификации ВЛ КРС и ВИ КРС были использованы ранее разработанные праймерные комбинации для обнаружения провирусной ДНК возбудителя лейкоза КРС [9, 10, 12], возбудителя иммунодефицита КРС и ДНК крупного рогатого скота («внутренний контрольный образец» (ВКО) [14]. Данные праймерные комбинации представлены в таблице 1.

Праймерные комбинации были проанализированы с помощью BLAST-анализа [26] с использованием стандартной нуклеотидной базы «Standard Nucleotide BLAST», исключая из поиска последовательности, связанные с вирусом энзоотического лейкоза «Bovine leukemia virus (taxid:11901)» при анализе праймеров и зондов к гену p24 BLV и с вирусом иммунодефицита КРС «Bovine immunodeficiency virus (taxid:11657)» при анализе олигонуклеотидов к гену env BIV. В результате BLAST-анализа установлено, что анализируемые специфичные олигонуклеотиды (праймеры и зонды) строго комплементарны только к фланкируемым нуклеотидным последовательностям ВЛ КРС и ВИ КРС и не комплементарны к нуклеотидным последовательностям ДНК других организмов.

Также были разработаны два положительных контрольных образца (ПКО),

Таблица 3

Определение чувствительности разработанного способа индикации и идентификации провирусной ДНК ВЛ КРС и ВИ КРС

Разведение ДНК	Рекомбинантная плаزمида со вставкой гена p24 BLV	Рекомбинантная плазмида со вставкой гена env BIV
	Значение Ct по ROX	Значение Ct по R6G
10-3	7,86	8,13
10-4	8,06	9,46
10-5	12,4	13,12
10-6	15,98	15,44
10-7	19,38	20,59
10-8	22,31	23,76
10-9	25,48	26,89
10-10	27,73	35,48
10-11	30,1	39,52
10-12	34,75	не определено
10-13	не определено	не определено

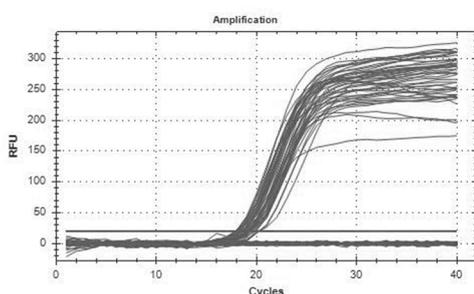


Рис. 2. Результаты ПЦР 73 проб крови КРС. Данные по флуоресценции по каналу Cy 5 (ВКО – ДНК коровы)

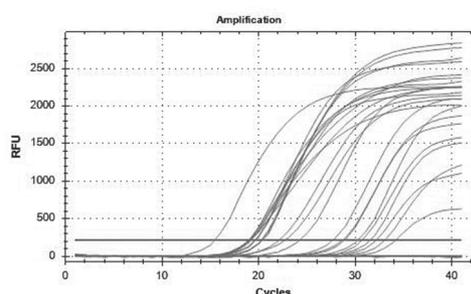


Рис.3. Результаты ПЦР 73 проб крови КРС. Данные флуоресценции по каналу ROX (провирусная ДНК ВЛ КРС).

представляющие собой рекомбинантные генетические конструкции на основе плазмиды pALT2 со встроенными специфичными нуклеотидными последовательностями участков идентичных провирусной ДНК ВЛ КРС и ВИ КРС. Данные нуклеотидные последовательности ПКО представлены в таблице 2. Разработанные контрольные образцы необходимы для проверки прохождения амплификации.

Одним из важных моментов является выбор температурно-временного

режима постановки ПЦР, а именно подбор температуры «отжига» праймеров и зондов. Вначале с помощью программы Vector NTI 9.1 была определена расчётная температура «отжига» разработанных олигонуклеотидов (таблица 1). Затем экспериментально, по каждой праймерной комбинации (праймеры и флуоресцентный олигонуклеотидный зонд) с использованием температурного градиента, была подобрана оптимальная температура «отжига». Для праймерной комбинации

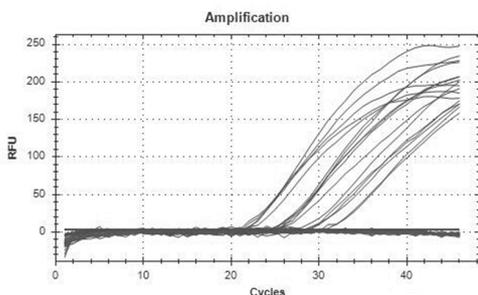


Рис. 4. Результаты ПЦР 73 проб крови КРС. Данные флуоресценции по каналу HEX (R6G) (провирусная ДНК ВИ КРС).

для провируса ВЛ КРС данная температура была определена с помощью температурного градиента от 55°C до 65°C и составила 61°C. Аналогично были определены температуры «отжига» для праймерных комбинаций провируса ВИ КРС и индикации ДНК коровы (ВКО), которые составили 61°C и 60°C, соответственно.

Проанализировав полученные результаты, нами был выбран следующий температурно-временной режим амплификации:

1 цикл. 95°C - 3 мин; 2 цикл. 94°C - 15 сек, 60,5°C - 15 сек (5 повторов); 3 цикл. 94°C - 15 сек, 60,5°C - 30 сек (40 повторов), индикация по каналам ROX, HEX, Cy5.

Этот температурно-временный режим был испытан для индикации провирусной ДНК ВЛ КРС и ВИ КРС (рис.1).

Чувствительность разработанного способа для индикации и идентификации провирусной ДНК ВЛ КРС и ВИ КРС определяли методом 10-кратных разведений рекомбинантных плазмид со вставками участков специфичных генов - p24 для BLV и env для BIV. Расчёты по определению количества молекул нуклеиновых кислот в заданном объеме осуществляли с помощью расчётных онлайн-форм, расположенных на интернет ресурсе MolBiol.ru [23]. Стоконый раствор плазмиды со вставкой гена p24 BLV имел концентрацию 426 нг/мкл, а плазмиды со вставкой гена env BIV - 114 нг/мкл. С

каждым разведением обоих рекомбинантных плазмид была поставлена полимеразная цепная реакция. Результаты по чувствительности указаны в таблице 3.

Согласно таблице 3 для рекомбинантной плазмиды со вставкой гена p24 BLV, разведение (10-12) было последним, где было определено пороговое значение флуоресценции (Ct), равное 34,75 цикла, что составило 1 - 3 молекул ДНК плазмиды в 1 мкл. Для плазмиды с геном env BIV последнее десятикратное разведение было (10-11), пороговое значение Ct составило 39,52 цикла и расчётное количество плазмиды в 1 мкл составило примерно 1 - 3 молекулы.

Проверка специфичности разработанных праймерных комбинаций (p24 BLV, env BIV) была проведена на образцах гетерогенной и гомогенной ДНК, полученных из биологического материала от коровы, лошади, барана, свиньи, козы, крысы, мыши, кролика, бактериальных культур вакцинных штаммов возбудителей бруцеллеза и сибирской язвы, крови козы, зараженной вирусом артрита – энцефалита (по результатам ПЦР), гомогенатов культуры клеток FLK-BLV и свежесыведенных лимфоцитов из крови больных коров.

В результате исследования пороговое значение флуоресценции в образцах гетерогенной ДНК (биологический материал от коровы, лошади, барана, свиньи, козы, крысы, мыши, кролика, бактериальных культур вакцинных штаммов возбудителей бруцеллеза и сибирской язвы, крови козы, зараженной вирусом артрита – энцефалита) не определено, то есть в них не содержатся искомые участки генома возбудителей лейкоза и иммунодефицита КРС. Положительный результат ПЦР был зафиксирован по каналу ROX при исследовании образцов ДНК, полученных из гомогенатов культуры клеток FLK-BLV и свежесыведенных лимфоцитов из крови больных коров, а именно 20,13 и 18,46 цикла, соответственно, что подтверждает наличие провирусной ДНК ВЛ КРС в этих образцах.

После определения основных характеристик (чувствительность, специфичность) разработанный способ индикации провирусной ДНК ВЛ КРС и ВИ КРС был испытан на образцах крови КРС, полученных из неблагополучного по лейкозу хозяйств (рис.2 – 4).

Было исследовано 73 пробы крови КРС. В результате установлено, что по каналу Cy5 (ВКО – ДНК коровы) значения Ct (пороговое значение кривой флуоресценции) по всем исследуемым образцам было в диапазоне 22,59 – 28,96 цикла. Это свидетельствует, что выделение ДНК прошло успешно во всех исследуемых образцах (рис.2). Также установлено, что значение Ct по каналу ROX (провиральная ДНК возбудителя лейкоза) было положительным в 27 исследуемых образцах, т.е. данные образцы содержали провирусную ДНК ВЛ КРС (рис.3). По каналу HEX (R6G) (провиральная ДНК ВИ КРС) положительное значение Ct установлено в 18 исследуемых образцах, т.е. в них обнаружена провирусная ДНК возбудителя иммунодефицита КРС (рис. 4). Следует отметить, что в 13 образцах крови содержались фрагменты ДНК как возбудителя лейкоза, так и вируса иммунодефицита КРС.

ВЫВОДЫ

Разработанный молекулярно-генетический способ для индикации и идентификации провирусной ДНК лейкоза и иммунодефицита КРС основан на использовании специфичных праймерных комбинаций, комплементарных к консервативным участкам геномов возбудителей лейкоза и иммунодефицита КРС. Данный способ позволяет одной реакцией и в одной реакционной смеси одновременно выявлять провирусную ДНК обоих искомым возбудителей. Созданный способ обладает высокой чувствительностью, которая составляет 1 – 3 молекулы провирусной ДНК обоих искомым возбудителей в 1 мкл ПЦР смеси. Также доказана высокая специфичность разработанного способа при исследовании образцов гетерогенной и гомогенной ДНК.

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR SIMULTANEOUS IDENTIFICATION OF CAUSES OF LEUKEMIA AND IMMUNODEFICIENCY OF CATTLE **Usoltsev K.V., Faizov T.Kh., Gorbunova M.E., Safina R.F., Shangaraev R.I., Salmanova G.R., Osyanin K.A., Khammatov N.I. Federal State Budgetary Scientific Institute “Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety”** **ABSTRACT**

The article describes the process of design method one-time indication and identification of pathogens of bovine leukemia virus (BLV) and bovine immunodeficiency virus (BIV) by polymerase chain reaction in real time. For creation this method, early designed primers combination was used to detect provirus DNA BLV and BIV. For the purpose of control amplification two positive control samples (PCS) were created, which are recombinant genetic constructs based on the pALT2 plasmid with embedded specific nucleotide sequences of sections of provirus DNA BLV and BIV. The optimal temperature - time mode has been selected for created test system, and its operability has been proved experimentally. Minimum sensitivity was determined by method ten-fold dilutions of recombinant plasmids which carry specific genes BLV and BIV. The latest was 1-3 DNA molecules in 1 µl reaction mixture for the genes of both pathogens. Designed method was proved high specificity, according to result of PCR with heterogeneous and homogeneous DNA samples. The practical significance and performance of created method are confirmed by studies of blood samples obtained from sick and healthy animals, from farms that are infected by leukemia virus. Designed method allows simultaneously detecting provirus DNA of BLV and BIV one-time in one reaction mixture.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агольцов В.А. Сравнительная диагностическая оценка серологического и молекулярно-генетического методов лабораторных исследований на лейкоз крупного рогатого скота / В.А. Агольцов, Е.С. Красникова, А.А. Щербаков, П.С. Мелкина, Е.А. Горельникова, Н.А. Дружаева //

- Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2012. - № 4 (90). - С. 56-59.
2. Апалькин В.А., Гулюкин М.И., Петров Н.И. Лейкоз крупного рогатого скота. - СПб.: Петролазер, 2005. - 105 с.
3. Байсеитов С.Т., Новикова Н.Н., Власенко В.С., Красников А.П. Сравнительная оценка диагностической эффективности РИД, ИФА и РНИФ при лейкозе крупного рогатого скота. Вестник Омского государственного аграрного университета. 2020. № 1 (37). С. 97-102.
4. Козырева Н.Г., Иванова Л.А., Степанова Т.В., Гулюкин М.И. Лабораторные испытания разработанной мультиплексной ПЦР-РВ при диагностике лейкоза крупного рогатого скота у молодняка. Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии» № 1(29), 2019.
5. Красникова Е.С. Анализ аминокислотного состава молока коров, инфицированных ретровирусами / Е.С. Красникова, А.В. Банникова, А.В. Евтеев, Г.Х. Утанова. // В сборнике: Актуальные проблемы ветеринарной хирургии, онкологии и терапии. - 2016. - С. 87-92.
6. Красникова Е.С. Оценка качества молока, полученного от инфицированных ретровирусами коров, и определение способов его переработки / Е.С. Красникова, Г.Х. Утанова, Н.А. Федосов, А.А. Щербаков // Научное обозрение. 2015. - № 17. - С. 10-15.
7. Красникова, Е.С. Эпизоотическая ситуация по ретровирусным инфекциям животных в Саратовской области и оптимизация лабораторной диагностики / Е.С. Красникова, В.А. Агольцов, О.Е. Семенова // Современные технологии в ветеринарии зоотехнии. Творческое наследие В.К. Бирха: мат. Междунар. науч.-практич. конф. – Пермь. 2013. – С. 100-106.
8. Криворучко, С.В. Вирус иммунодефицита крупного рогатого скота в хозяйствах Ставропольского края / С.В. Криворучко, С.С. Абакин, Г.А. Дубравная // Ветеринарная патология. - 2012. - № 2 (40). - С. 35-38.
9. Никитин А.И., Усольцев К.В., Фаизов Т.Х., Чернов А.Н., Усольцева И.И., Семенова М.Е., Хаммадов Н.И., Алеева З.З., Хусниев Ф.А., Ахмадеев Р.М., Валидов Ш.З., Шуралев Э.А. Способ экспресс-диагностики лейкоза крупного рогатого скота. Патент на изобретение RU 2644233 С2, 08.02.2018. Заявка № 2016109396 от 15.03.2016.
10. Сафина Р.Ф. Повышение чувствительности и специфичности ПЦР с использованием ДНК-маркеров, кодирующих белки р24 и gp51, в ПЦР-РВ для индикации ВЛКРС / Сафина Р.Ф., Лукманова Г.Р., Усольцев К.В., Хаммадов Н.И., Фаизов Т.Х. // Ветеринарный врач. - 2019. - № 2. - С. 8-14.
11. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьёв Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных. – М.: ВНИТИБП, 2001. - 446 с.
12. Усольцев К.В. Способ одновременной экспресс-диагностики лейкоза и вирусного иммунодефицита крупного рогатого скота на основе метода мультиплексной ПЦР / К.В. Усольцев, Н.И. Хаммадов, К.А. Осянин, Т.Х. Фаизов // В книге: Физико-химическая биология как основа современной медицины тезисы докладов участников Республиканской конференции с международным участием, посвященной 110-летию со дня рождения В.А. Бандарина. Белорусский государственный медицинский университет. - 2019. - С. 122-123.
13. Утанова, Г.Х. Молекулярно-генетическая диагностика вируса бычьего иммунодефицита / Г.Х. Утанова, А.П. Силаев // Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА 2017» / Под редакцией академика РАН В.И. Покровского. - ТОМ II. – МОСКВА, 2017. - С. 407 – 408.
14. Хаммадов Н.И. Генетические маркеры вируса ящура крупного рогатого скота, геномный анализ // Проблемы особо опасных инфекций. - 2019. - № 2. - С. 111-116.
15. Bazargani T.T. The first survey on the status of the bovine immunodeficiency virus infection and associated clinical, pathological, haematological and flow cytometric

- findings in holstein cattle in Iran / T.T. Bazargani, M. Tooloei, G.N. Broujeni, M.J. Garagozlo, S. Bokaei, M. Khormali, N. Barjaste // *Journal of Veterinary Research*. – 2010. - №65. – P.1–12.
16. Carpenter S. Characterization of early pathogenic effects after experimental infection of calves with bovine immunodeficiency-like virus. / Carpenter S., Miller L.D., Alexandersen S., Whetstone C.A., Van Der Maaten M.J., Viuff B., Wannemuehler Y., Miller J.M., Roth J.A. // *J. Virol*. 1992; 66:1074–83.
17. Egberink H. Animal immunodeficiency viruses / H. Egberink, M.C Horzinek. // *Veterinary Microbiology*. – 1992. - №33. – P.311-331.
18. González-Fernández V.D. First evidence of bovine immunodeficiency virus infection in Mexican cattle / V.D. González-Fernández, J.L. Tórtora Pérez, M.M. García Flores, J.Á. Aguilar Setién, H. Ramírez Álvarez // *Transboundary and Emerging Diseases*. - 2020.
19. Pablo-Maiso L. Prospects in innate immune responses as potential control strategies against non-primate lentiviruses / L. Pablo-Maiso, A. Doménech, I. Echeverría, C. Gómez-Arrebola, D. de Andrés, S. Rosati, E. Gómez-Lucia, R. Reina // *Viruses*. – 2018. - №10 (8). – P. 435.
20. Snider T.G. Natural and experimental bovine immunodeficiency virus infection in cattle. / Snider T.G., Hoyt P.G., Jenny B.F., Coats K.S., Luther D.G., Storts R.W., Battles J.K., Gonda M.A. // *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1997 Mar; 13(1):151-76. Review.
21. Отчёт по эпизоотической ситуации в Российской Федерации за 2019 г. Официальный сайт Россельхознадзора (<https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/iac/rf/2019/iac2019.pdf>)
22. Ветеринарные правила осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов лейкоза крупного рогатого скота (Зарегистрировано в Министерстве юстиции Российской Федерации 29 апреля 2021 года, регистрационный N 63300). <https://docs.cntd.ru/document/603433105?marker=6540IN>
23. Расчётные онлайн-формы для конверсии массы в моли. Интернет ресурс MolBiol.ru. http://molbiol.ru/scripts/01_07.html
24. Таксономическая классификация NCBI: txid11646. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=11646&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
25. Международный комитет по таксономии вирусов (ICTV). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
26. Онлайн-утилита BLAST интернет-ресурса NCBI https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PRO-GRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
27. ФГБНУ «Федеральный центр радиационной, токсикологической и биологической безопасности» Научный Городок2, Казань, Республика Татарстан, 422701.