

**Федеральное государственное автономное научное учреждение  
«Всероссийский научно-исследовательский институт молочной  
промышленности» (ФГАНУ «ВНИМИ»)**

*На правах рукописи*

**ЛАЗАРЕВА ЕКАТЕРИНА GERMANOVNA**

**РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОВИРУСНОЙ ДНК *BOVINE LEUKEMIA VIRUS*  
В МОЛОКЕ И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ**

Специальность: 4.3.3 – Пищевые системы

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук  
Фоменко Олег Юрьевич

Москва, 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	9
1.1 Молоко различных видов сельскохозяйственных животных.....	9
1.2 Эпизоотическая ситуация в России.....	15
1.3 Лейкоз КРС .....	17
1.4 Исследование выявления ВБЛ с применением молекулярно-генетических методов исследований .....	32
ГЛАВА 2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ .....	47
2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	47
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	54
3.1 Сравнительная эффективность методов выделения ДНК из сырого молока	54
3.2 Сравнительная эффективность методов выделения ДНК из сухого молока	56
3.3 Разработка олигонуклеотидных праймеров .....	65
3.4 Определение эффективности протекания ПЦР-РВ .....	66
3.5 Разработка методики выполнения измерений количественной оценки провирусной ДНК BLV в молочной продукции .....	95
ВЫВОДЫ .....	97
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	99
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	100
Приложение А. Стандарт организации по методике выполнения измерений .	118
Приложение Б. Акты проведения лабораторно-производственных испытаний, опытно-промышленной апробации, внедрения результатов научной работы в учебный процесс.....	119
Приложение В. Дипломы .....	123
Приложение Г. Перечень публикаций в рецензируемых научных журналах и изданиях .....	125

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Пищевые продукты животного происхождения оказывают воздействие на самые разные аспекты здоровья и питания населения [81]. Последствия такого воздействия определяются социальными условиями, этапом жизненного цикла человека и характером животноводческой продукции. Согласно докладу Всемирной организации здравоохранения, здоровое питание связано с употреблением качественных пищевых продуктов [151]. Кроме того, положения «Стратегии повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года» показывают важность разработки новых критериев оценки качества и безопасности пищевых продуктов. Одним из основных мировых источников продуктов питания животного происхождения является скотоводство. В числе вопросов, имеющих отношение к устойчивому производству безопасных пищевых продуктов животного происхождения – новые инфекционные заболевания, запущенные зоонозные болезни, болезни пищевого происхождения, связанная с сельским хозяйством устойчивость к противомикробным препаратам. Поэтому в настоящее время особенно остро стоит вопрос о возможном негативном влиянии на здоровье человека различных инфекционных заболеваний крупного рогатого скота. В этой связи особую озабоченность вызывает проблема вирусного лейкоза крупного рогатого скота, находящегося в тесной филогенетической связи с вирусом Т-клеточного лейкоза человека 1-го типа (HTLV-1). Энзоотический вирусный лейкоз крупного рогатого скота (ВЛКРС) – хроническая инфекционная болезнь, характеризующаяся лимфоцитозом или образованием опухолей в кроветворных и других органах и тканях. Возбудителем заболевания является вирус лейкоза крупного рогатого скота (*Bovine leukemia virus*) из семейства *Retroviridae*, который в естественных условиях передается крупному рогатому скоту, зебу, буйволам и овцам. Вирус интегрируется в геномную ДНК В-лимфоцитов, и способен годами пребывать в латентном состоянии, ожидая ослабления

иммунитета носителя. Данное заболевание регистрируется почти во всех странах мира и наносит значительный экономический ущерб за счёт выбраковки продукции, полученной от больных животных, и их вынужденного убоя. Из-за биологических особенностей вируса заболевание характеризуется продолжительным бессимптомным периодом и в отсутствие проведения специфической диагностики остаётся не выявленным. Данный факт препятствует возможности оперативного выявления вирусоносителей, что приводит к сбору и промышленному использованию молока от инфицированных животных.

Помимо устойчивого роста распространённости вируса лейкоза крупного рогатого скота на территории Российской Федерации, по мере совершенствования аналитических методов в последние десятилетия всё чаще появляются сообщения об обнаружении вируса BLV и антител к нему у людей. При этом точные пути трансмиссии вируса от животных человеку всё ещё остаются невыясненными. Некоторые из гипотез связывают попадание BLV в организм человека с употреблением продукции животноводства, в частности - молока. Поэтому несмотря на отсутствие убедительных доказательств о влиянии BLV на общественное здоровье, присутствие этого онкогенного ретровируса в различных биологических образцах человека потенциально может стать проблемой для системы здравоохранения, что делает актуальной необходимость дальнейшего изучения путей его передачи человеку и выявление вируса и его генома в продуктах питания.

Аспекты биологической безопасности использования молока от инфицированных животных до сих пор до конца не изучены. Отчасти данный пробел может быть связан с тем, что согласно законодательству многих стран, молоко для дальнейшей переработки подвергается предварительной термизации и обязательной пастеризации на производстве при различной температуре и времени выдержки, обеспечивающих разрушение микроорганизмов с сохранением технологических свойств сырья. Однако оценка эффективности

инактивации вируса бычьего лейкоза при термической обработке молочных продуктов и, следовательно, уровня их безопасности, требует проведения дополнительных исследований.

Таким образом, разработка методов качественного и количественного определения провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота в продукции молочной промышленности является актуальной для обеспечения населения безопасными и полноценными продуктами питания.

**Степень разработанности темы.** Исследованиям факторов качества и безопасности сырого молока, эпизоотической ситуации по лейкозу КРС, влиянию вируса лейкоза КРС на показатели молока и способов диагностики посвящены работы ряда отечественных и зарубежных ученых: Валихов А.Ф., Вафин Р.Р., Галстян А.Г., Гильманов Х.Х., Гулюкин М.И., Донник И. М., Красникова Е.С., Свириденко Г.М., Тюлькин С.В., Юрова Е.А., Ahmed M., Wojarójc-Nosowicz B., Buehring G. C., Gutiérrez S. E., Nakanishi R., Olaya-Galán N. и др.

**Целью** работы является разработка методического подхода к количественному определению провирусной ДНК *Bovine leukemia virus* в молоке и молочных продуктах методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Для достижения цели исследования были сформулированы и решены следующие основные **задачи**:

1. Провести анализ научно-технической информации в области безопасности молока, в частности, полученного от коров, зараженных *Bovine leukemia virus*;

2. Исследовать существующие альтернативные методы выделения ДНК из сырого молока и продуктов его переработки;

3. Провести биоинформатический анализ геномных последовательностей-мишеней *Bovine leukemia virus* и разработать дизайн олигонуклеотидных праймеров для проведения количественного анализа

провирусной ДНК, интегрированной в геном коров-вирусоносителей, методом полимеразной цепной реакции в реальном времени;

4. Оценить эффективность сконструированных олигонуклеотидных праймеров по отношению к молоку и молочным продуктам;

5. Создать и исследовать тест-систему для количественного определения содержания провирусной ДНК *Bovine leukemia virus* в молоке и молочных продуктах и определить её аналитические характеристики;

6. Разработать метод количественного определения содержания провирусной ДНК *Bovine leukemia virus* в молоке и молочных продуктах молекулярно-генетическими методами и провести оценку его эффективности.

#### **Научная новизна:**

- предложена пара олигонуклеотидных праймеров, обеспечивающая оптимальный выход специфического ПЦР-продукта при использовании различного стартового материала;

- установлено, что зависимость порогового цикла от исходной концентрации ДНК сохраняет линейность до предела, соответствующего 28 молекулам-мишеням на реакцию;

- показана эффективность амплификации фрагмента провирусной ДНК, интегрированной в геном хозяина, выделенной из молочных продуктов, в диапазоне от 10 нг до 1 пг на реакцию.

#### **Практическая значимость:**

- расширена область оценочных критериев безопасности молока и молочных продуктов за счет внедрения ПЦР-анализа, направленного на выявление и количественное определение провирусной ДНК;

- впервые создана отечественная тест-система, позволяющая производить неинвазивный скрининг животных-вирусоносителей и контроль качества молочной продукции;

- разработан и утверждён СТО 00419785-075-2024 «Молоко и молочная продукция. Методика выполнения измерений по выявлению и количественному определению провирусной ДНК вируса лейкоза КРС».

**Методология и методы исследования.** При выполнении работы использовали стандартизованные и общепринятые в контроле молочных продуктов методы исследований, изложенные в специализированной литературе, а также оригинальные методы, комплексно обеспечивающие выполнение поставленных задач.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Комплект специфических олигонуклеотидов для эффективной амплификации фрагментов провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота, выделенной из различных пищевых матриц.
2. Тест-система для детекции провирусной ДНК BLV, включающий в себя все необходимые для проведения анализа реагенты и стандартные образцы.
3. Метод количественного определения провирусной ДНК ВЛКРС в молочных продуктах.

**Степень достоверности и апробация работы.** Работа выполнена в лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ФГАНУ «ВНИМИ»). Исследования проведены на современном аттестованном аналитическом оборудовании, внесённом в Реестр средств измерений и прошедшем поверку. Достоверность полученных результатов основана на выполнении измерений в адекватном поставленным задачам количестве технических и биологических повторностей. Результаты исследований и научные положения основаны на фактических данных и подтверждены на практике опытно-промышленной апробацией разработанной методики.

**Основные положения и результаты работы** доложены, обсуждены и одобрены на IX и XI Международной научной конференции студентов,

аспирантов и молодых ученых «Пищевые инновации и биотехнологии» (Кемерово, 2021, 2023), VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молодые исследователи агропромышленного и лесного комплексов – регионам» (Вологда, 2022), IV научно-практической конференции с международным участием "Зоотехническая наука в условиях современных вызовов" (Киров, 2022), международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения профессора В.В. Рудакова (Санкт-Петербург, 2023), международной научно-практической конференции «Производство сыра, масла и другой молочной продукции в современных условиях. Проблемы и пути решения» (Углич, 2023), XVI Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Фуд-бум: новые технологии для будущего пищевой отрасли» (Москва, 2023).

**Личный вклад автора.** Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно и включает анализ научно-технической литературы, выбор, постановку целей и задач исследований, обоснование экспериментальных методов исследования, выполнение эксперимента, анализ и обобщение полученных результатов, выводы по работе.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе: 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 1 статья в журнале, индексируемом в международной базе Web of Science, 3 статьи в журналах РИНЦ и 7 публикаций в сборниках трудов конференций.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, аналитического обзора, методической части, результатов собственных исследований и их анализа, а также выводов, списка использованных источников литературы и приложений. Основной текст работы изложен на 127 страницах машинописного текста, содержит 18 таблиц, 36 рисунков, 153 литературных источника.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Молоко различных видов сельскохозяйственных животных

Молоко обладает высокой пищевой и биологической ценностью и играет важную роль в рационе человека благодаря своему универсальному составу. С химической точки зрения молоко является гетерогенной коллоидной системой, включающей воду, молочные белки, липиды, лактозу и различные минеральные вещества, такие как коллоидный фосфат кальция в молочной сыворотке [2]. Биологически молоко — это продукт секреторной деятельности молочных желез млекопитающих, содержащий жизненно важные для новорожденных вещества.

Содержание таких компонентов, как белок, жир, углеводы и минеральные вещества, варьируется в молоке разных видов животных. Эти колебания обусловлены несколькими факторами. Во-первых, содержание белка и минеральных веществ зависит от скорости удвоения массы детеныша. Во-вторых, количество жира в молоке определяется условиями окружающей среды и жировыми резервами новорожденного. В-третьих, содержание углеводов, таких как лактоза, зависит от периода лактации [68].

В России, помимо коровьего молока, также используется молоко других животных, таких как овцы, козы, буйволицы и кобылицы [67]. Важно отметить, что состав молока этих животных существенно различается. Например, молоко овец и буйволиц содержит больше белка и жира по сравнению с молоком коров, тогда как молоко кобылиц отличается высоким содержанием углеводов и низким содержанием жира [73].

Различия в составе молока различных животных влияют на его питательную ценность и могут быть учтены при выборе молока для разных целей. Понимание этих факторов важно для обеспечения разнообразного и сбалансированного питания, а также для разработки продуктов молочной промышленности, отвечающих различным потребностям потребителей. Таблица 1.1 показывает состав молока животных, наиболее часто используемых для получения молока-сырья.

Таблица 1.1 - Химический состав молока некоторых сельскохозяйственных животных России

Компонент молока	Массовая доля компонентов в молоке				
	коровы	козы	овцы	буйволицы	кобылы
Сухое вещество, %	12,5-12,6	10,7-20,1 (12,7)	13,9-24,3 (19,2)	14,7-22,9 (17,7)	8,4-12,3 (10,3)
Белки, %	3,0-3,3	2,8-5,0	4,47-6,83	3-5,88	1,5-2,72
В том числе:		(3,0)	(5,6)	(4,0)	(2,2)
казеин	2,6-2,7	2,3-3,2 (2,5)	4,17-4,3 (4,3)	3-3,7 (3,6)	0,75-1,25 (1,2)
Сывороточные белки	0,5-0,8 (0,6)	0,4-0,7 (0,5)	0,9-1,3 (1,28)	0,3-0,92 (0,4)	0,9-1,1 (1,0)
Жир молочный, %	2,8-5,0 (3,9)	2,47-9,5 (4,2)	3,9-9,8 (7,7)	6,85-10,7 (7,8)	1,5-2,5 (1,9)
Углеводы (лактоза), %	4,3-5,6 (5,0)	4,0-5,1 (4,5)	4,4-5,6 (4,8)	4,11-5,55 (4,9)	5,6-6,8 (5,8)
Минеральные вещества (зола), %	0,7-0,8 (0,8)	0,7-0,8 (0,8)	0,8-2,1 (0,9)	0,7-0,9 (0,8)	0,27-0,5 (0,4)
Аминокислоты, мг/100 г	3350	3079	5575	3963	2279
незаменимые	1668	1295	2441	1736	1023
заменимые	1682	1784	3134	2227	1256
Жирные кислоты, %	3,5	3,92	7,3	7,38	1,8
насыщенные	2,6	2,64	4,6	4,85	0,69
C <sub>4</sub> -C <sub>10</sub>	0,61	0,64	0,91	0,49	0,16
мононенасыщенные	1,04	1,06	2,39	22,16	0,46
полиненасыщенные	0,22	0,21	0,31	0,37	0,65
Минералы	100-140	143	178	174	89
Кальций, мг/100 г					
Фосфор, мг/100 г	90	89	158	109	54
Железо, мкг, 100 г	67	100	92	54	88
Медь, мкг/100 г	12	20	13	20	22

Как видно из таблицы 1.1, количественный и качественный состав молока разных представителей млекопитающих может сильно различаться. Он определяется видом млекопитающего, зависит от скорости роста детёныша, длительности периода вскармливания, климатических условий и других факторов [20].

Понимание особенностей состава молока у разных животных имеет огромное значение для планирования молочного производства и питания, поскольку позволяет выбрать наиболее подходящий источник молока в зависимости от конкретных требований к рациону и питательности.

### ***Объемы производства молока-сырья в России***

На рисунке 1.1 представлены данные по объему производства молока в период с 1992 по 2022 год.

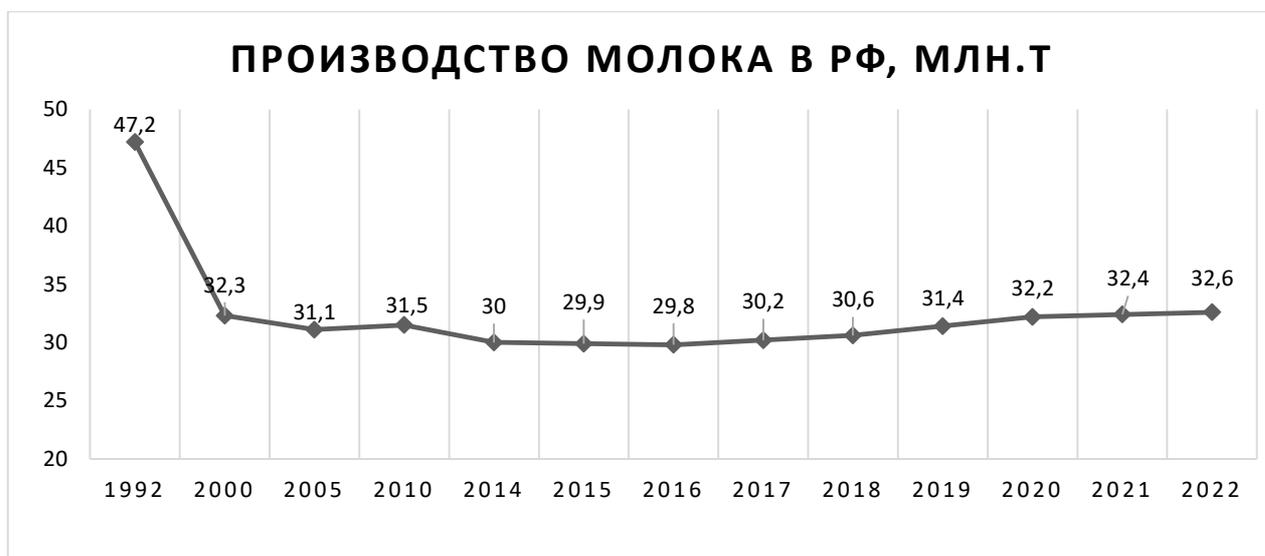


Рисунок 1.1 - Производство молока в РФ в 1992-2022 гг.

В период с 2016 по 2022 год наблюдается положительная динамика объема производства молока-сырья [61,62]. На эффективность производства данной отрасли, а также в целом на развитие сельского хозяйства, оказывают влияние множество факторов: организационно-экономические, социальные, общеэкономические, природные [66].

На данный момент под влиянием вышеупомянутых факторов в России сформировался рейтинг регионов-лидеров в производстве молока, представленный в таблице 1.2.

Таблица 1.2 - Рейтинг ведущих регионов-производителей товарного молока (По данным Росстата за 2022 г.)

<b>№</b>	<b>Субъект РФ</b>	<b>Произведено молока, тыс. тонн</b>	<b>в % к 2021 г.</b>
1	Татарстан	1958,7	100,8
2	Башкортостан	1614,1	96,6
3	Краснодарский край	1526,2	98,2
4	Алтайский край	1152,2	95,2
5	Ростовская обл.	1098,2	100,1
6	Воронежская обл.	1057,2	103,2
7	Респ. Дагестан	935,5	100,4
8	Удмуртская Респ.	925,2	105,5
9	Новосибирская обл.	846,2	102,9
10	Свердловская обл.	805,2	99,7
11	Кировская обл.	773,3	103
12	Саратовская обл.	755	100,4
13	Московская обл.	707,8	100,4
14	Белгородская обл.	697,6	101,6
15	Ленинградская обл.	649,6	98,7
16	Нижегородская обл.	648	101
17	Красноярский край	629	95,5
18	Оренбургская обл.	621,1	97,4
19	Омская обл.	608,2	98,5
20	Вологодская обл.	588,7	100,3

Среди этих факторов важнейшую роль в увеличении объемов производства молока играет эффективность перерабатывающих предприятий. Эти предприятия необходимы для оптимизации процесса переработки молока, обеспечения качества конечной продукции и, в конечном счете, стимулирования роста отрасли. Инвестируя в современные технологии переработки и повышая общую эффективность производства, Российская Федерация может и дальше создавать благоприятные условия для развития молочного производства.

По мере развития молочной отрасли страны постоянная работа по минимизации влияния организационно-экономических, социальных, общеэкономических и природных факторов играет важную роль в сохранении и дальнейшем укреплении положительной динамики, наблюдаемой в производстве сырого молока. Эти усилия будут способствовать не только удовлетворению внутреннего спроса, но и расширению присутствия России на мировом молочном рынке.

#### ***Качество и безопасность молока***

В современных условиях для молочного скотоводства крайне важной является не только задача увеличения объёмов производства молока, но и обеспечение его высокого качества и безопасности [72]. Строгие ветеринарно-санитарные и технологические требования, предъявляемые к молоку, должны полностью соответствовать установленным стандартам, таким как ГОСТ, Технический регламент, СанПиН и Правила ветеринарно-санитарной экспертизы [34]. Эти требования направлены на защиту здоровья потребителей и обеспечение надёжности производственного процесса.

Ключевые нормативные документы, регулирующие показатели безопасности и качества молока, включают Технический регламент Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции» - ТР ТС 033/2013, а также межгосударственный стандарт ГОСТ 31449-2013 «Молоко коровье сырое. Технические условия». В соответствии с этими нормативными актами, молоко должно производиться исключительно от здоровых

сельскохозяйственных животных, находящихся на территориях, благополучных в плане инфекционных и других заболеваний, общих как для человека, так и для животных [21,69]. Таким образом, достижение поставленных целей требует комплексного подхода и строгого соблюдения всех нормативных требований, что является залогом успешного развития отрасли и доверия потребителей к молочной продукции.

Важность соблюдения стандартов обусловлена необходимостью обеспечения безопасности и высокого качества молочной продукции, что напрямую влияет на здоровье потребителей. Технический регламент и ГОСТ содержат строгие требования к физико-химическим, микробиологическим и органолептическим показателям молока, а также к условиям его производства, хранения и транспортировки. Соблюдение этих норм является обязательным для всех производителей молока и молочной продукции, что гарантирует защиту потребителей от возможных рисков, связанных с потреблением некачественного или небезопасного молока.

Для получения качественного молока, отвечающего современным стандартам, необходимо учитывать различные факторы, такие как сезон, порода, возраст, стадия лактации и рацион кормления животных. Эффективная организация процесса производства молока способствует улучшению его технологических характеристик [65]. Однако проблемой в молочном скотоводстве остается наличие соматических клеток, которые снижают качество молока.

Увеличенное содержание соматических клеток в молоке вызывает существенные изменения его свойств. Этот фактор ведет к появлению нежелательного слабого синего или слабого желтого оттенка, а также к изменению текстуры, которая становится водянистой, иногда хлопьевидной, а иногда даже слизисто-творожистой, и в некоторых случаях начинает пениться. Эти изменения приводят к потере биологической ценности молока и ухудшению его технологических свойств при дальнейшей обработке. Кроме того, отмечается

снижение уровня кислотности, потеря жира, казеина и лактозы. Молоко становится менее термоустойчивым, процесс свертывания сычужным ферментом замедляется, и развитие полезных молочнокислых бактерий замедляется [33].

В современных условиях молочная промышленность сталкивается с проблемами в производстве экологически безопасных продуктов из-за высокого уровня загрязнения молока-сырья различными вредными веществами, включая радионуклеотиды. Увеличение концентрации таких веществ в молочных продуктах создает препятствия для поддержания объемов производства традиционных натуральных молочных продуктов [27].

Контроль и обеспечение качества молока имеют важнейшее значение для молочной промышленности [14]. Различные показатели, такие как количество соматических клеток в молоке, играют ключевую роль в определении безопасности и гигиеничности молока [20]. Для производства высококачественного молока необходимо учитывать различные факторы, такие как здоровье сельскохозяйственных животных, технологические факторы, включая сезонность и рацион кормления, а также соблюдать строгие меры по анализу рисков и критических контрольных точек для обеспечения безопасности молока и продуктов его переработки [75].

## **1.2 Эпизоотическая ситуация в России**

Россия является одним из ведущих мировых производителей молочной продукции, поставляя молоко и молочные продукты как на внутренний, так и на внешний рынки. Молочная промышленность играет важнейшую роль в обеспечении продовольственной безопасности и экономической стабильности сельских территорий. Эпизоотическая ситуация в России вызывает серьезную обеспокоенность, особенно если речь идет о состоянии здоровья и жизнедеятельности поголовья молочного скота. В многих скотоводческих фермах, ориентированных на производство молока, фиксируется вспышка

инфекционных заболеваний [46]. Бактерии, кокки, микроскопические грибы, вирусы и микоплазмы, попадая в организм скота различными путями (через поврежденные кожу и слизистые, пищеварительный тракт, дыхательные пути и другие), могут вызывать инфекционные заболевания. [6]. На рисунке 1.2 представлены основные инфекционные заболевания сельскохозяйственных животных.

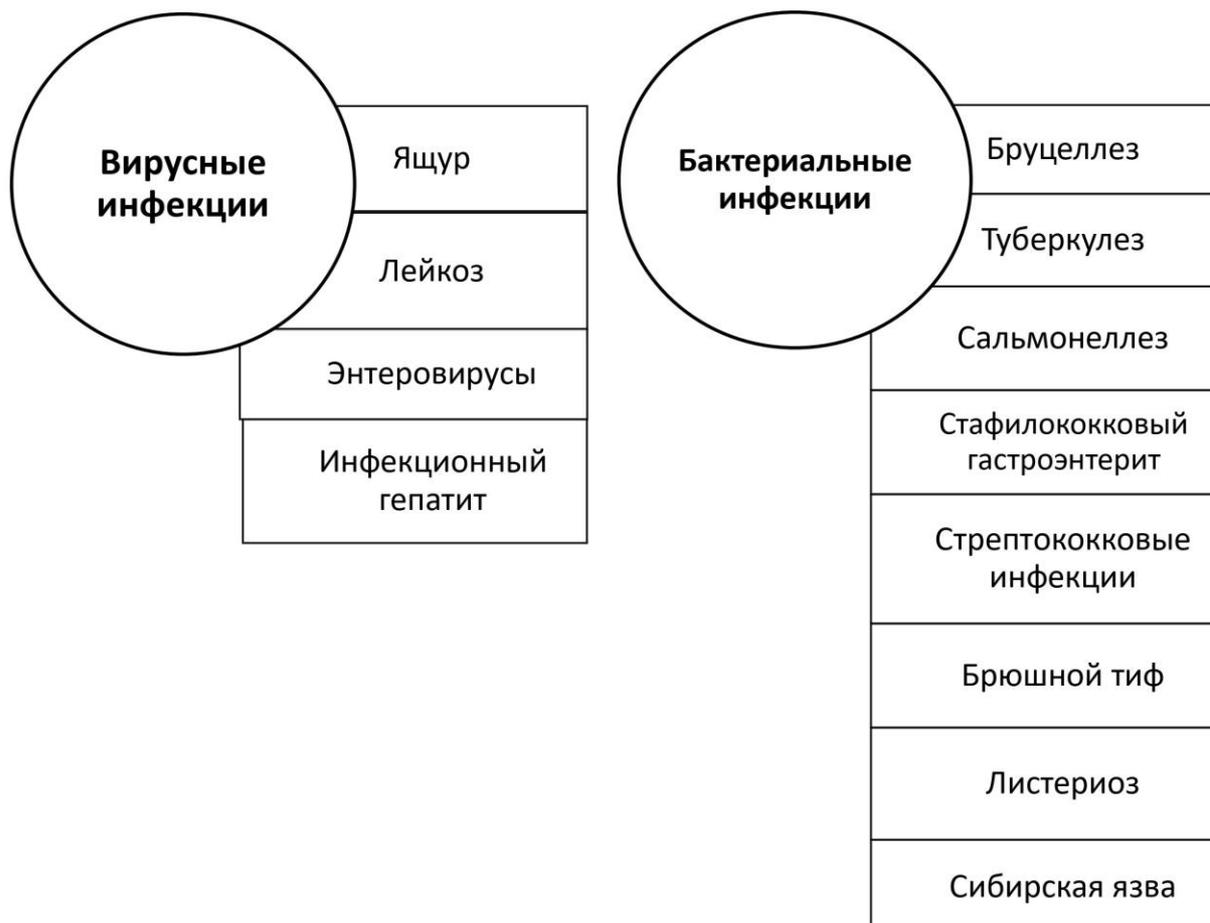


Рисунок 1.2 - Инфекционные заболевания сельскохозяйственных животных

В Российской Федерации действует система Государственной ветеринарной службы, регулируемая статьёй 5 Закона Российской Федерации от 14.05.1993 № 4979-1 «О ветеринарии». В её состав входит ветеринарная служба Федеральной службы исполнения наказаний (ФСИН) согласно статье 7 указанного закона. Анализ отчётов ТО ФСИН России за период с 2015 по 2019 годы свидетельствует о нестабильной эпизоотической обстановке в различных регионах страны. В учреждениях ТО ФСИН России были зарегистрированы

следующие инфекционные заболевания у крупного рогатого скота: в 2016 году - бешенство, дерматомикоз, лейкоз; в 2017 году - бруцеллёз, лейкоз, заразный узелковый дерматит, псевдомоноз, дерматомикоз; в 2018 году - лейкоз, пастереллёз, заразный узелковый дерматит, энтеротоксемия; в 2019 году - лейкоз и дерматомикоз [33, 42-45]. Что касается мелкого рогатого скота, в 2016 году были зафиксированы хламидиоз и бруцеллёз, а в 2018 году - энтеротоксемия овец [33, 45].

Эпизоотическая ситуация в России, особенно касающаяся молочного скота, создаёт как проблемы, так и возможности для совершенствования методов контроля в молочном животноводстве. Такие заболевания, как туберкулёз, бруцеллёз и вирус лейкоза крупного рогатого скота (BLV), представляют серьёзную угрозу для здоровья скота и стабильности молочной промышленности. Однако проводимые исследования и государственные инициативы направлены на разработку эффективных методов контроля и профилактики этих заболеваний, что позволяет надеяться на улучшение эпизоотической ситуации и повышение качества продукции.

### 1.3 Лейкоз КРС

Инфекционные заболевания сельскохозяйственных животных наносят значительный экономический ущерб как отдельным производителям, так и агропромышленному комплексу в целом.

Особенно остро стоит вопрос по такому заболеванию, как лейкоз крупного рогатого скота (КРС), так как оно наносит существенный ущерб отрасли молочного и мясного скотоводства вследствие падежа и вынужденного убоя животных, недополучения продукции и падения ее качества, а также затрат на осуществление противолейкозных мероприятий [64, 93,95].

Лейкоз крупного рогатого скота (КРС) – опухолевое заболевание инфекционной природы, возбудителем которого является вид *Bovine leukemia virus* рода *Deltaretrovirus* семейства *Retroviridae*, согласно международной вирусной таксономии [17].

Заболевание имеет повсеместное распространение практически во всех странах мира, в том числе на территории Российской Федерации.

На рисунке 1.3 представлена статистика выявленных неблагополучных пунктов по ВБЛ в период 2015-2022 годы по данным эпизоотического отчета Россельхознадзора [4].

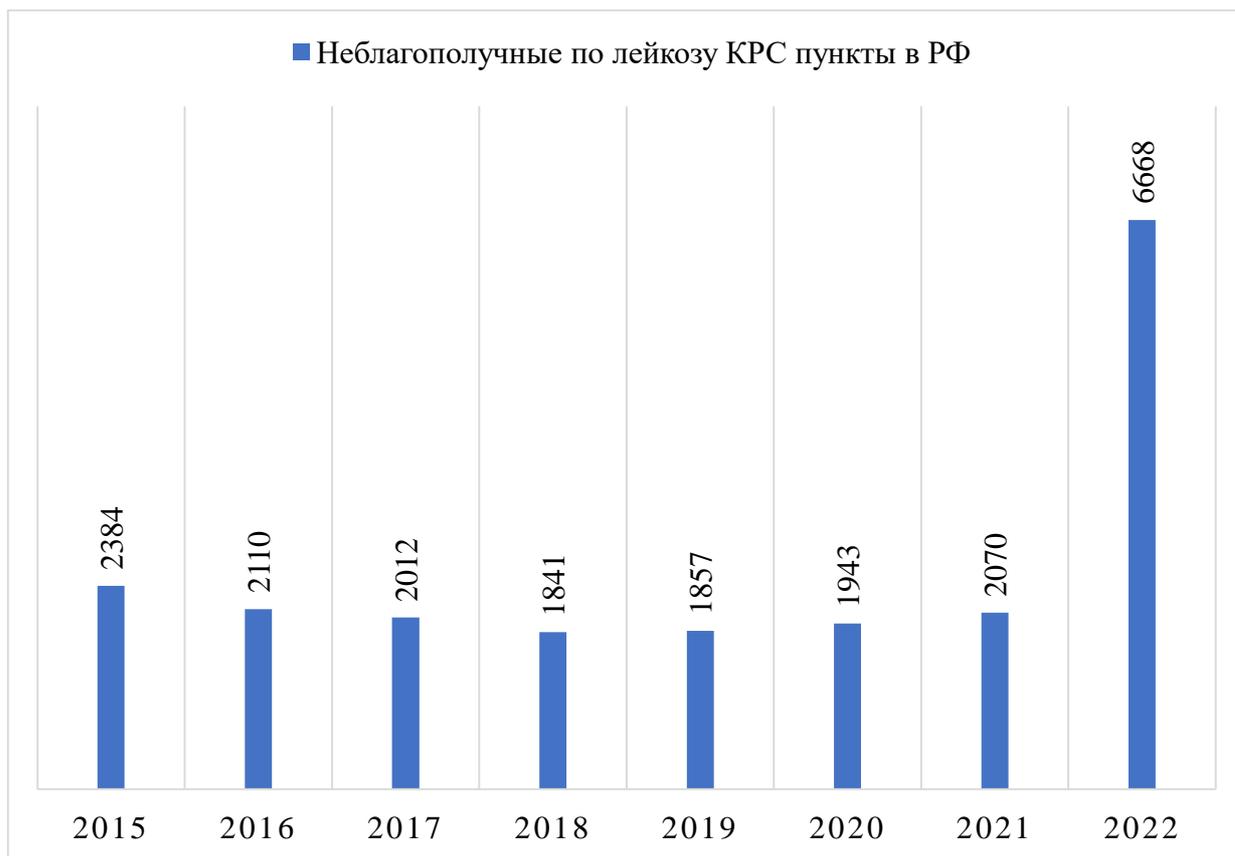


Рисунок 1.3 - Выявленные неблагополучные по лейкозу КРС пункты в 2015-2022 гг.

Кроме того, из-за лейкоза КРС происходит выбраковка в среднем 27 тыс. голов ежегодно. В таблице 1.3 представлены данные по статистике ущерба рынка от недополученного молока за последние 8 лет.

Таблица 1.3 - Статистика ущерба в период 2015-2022 гг.

Год	Поголовье, тыс. голов	Средний надой на корову за год, кг	Недополучено молока, тыс. кг	Цена, руб/л	Ущерб от недополученного молока, руб
2015	8400	5140	184114,8	20,6	3801602390
2016	8300	5370	176055,4	21,8	3840473586
2017	8200	5660	165000,3	24,5	4040362835
2018	7940	5945	147227,9	22,8	3364894225
2019	7960	6286	129665,1	24,8	3225169020
2020	7964	6728	132972,2	25,8	3438793857
2021	7800	6878	107296,8	28,8	3090147840
2022	7960	7 644	101879,2	34,6	3525021427

Преждевременная выбраковка животных, которая по данным статистики составляет от 0,26% до 0,64% от списочного поголовья коров в Российской Федерации. В период с 2000 по 2022 год, сдано на убой 857 236 голов КРС. За данный период недополучено сырого молока 3345138,97 тыс.кг. Ежегодно ущерб от недополученного молока составляет порядка 3,5 млрд. рублей [41].

. Несмотря на исследования, возбудитель спорадической формы до сих пор не полностью идентифицирован.

Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота является заболеванием, характеризующимся длительным латентным периодом и присутствием специфических антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота в крови [104, 111]. Это заболевание сопровождается лимфоцитозом и образованием опухолей, что делает его серьёзной проблемой для животноводства. Заболевание часто остаётся незамеченным до поздних стадий, что существенно затрудняет своевременную диагностику и лечение [7, 112]. На ранних стадиях лейкоза изменения в составе клеток крови проявляются увеличением количества лейкоцитов, повышением процента лимфоцитов и появлением патологических форм клеток различной величины [32].

На более поздних стадиях заболевания наблюдаются изменения в составе крови и разнообразные признаки болезни, согласно [25]. Эти симптомы зависят от формы болезни и места поражения. Общее состояние животного ухудшается, проявляясь в быстрой утомляемости, проблемах с пищеварением, снижении удоев и прогрессирующем истощении. Клинические проявления также включают отеки, хромоту, затруднение мочеиспускания, а также ряд репродуктивных проблем. [8].

Лимфоузлы у крупного рогатого скота при лейкозе КРС могут быть разного размера и консистенции, варьируясь от небольшого узелка до размера детской головы, и могут быть безболезненными, мягкими и эластичными или же плотными. При значительном увеличении лимфоузлы становятся болезненными. Внутренние лимфоузлы поражаются чаще, чем поверхностные. У молодняка также часто наблюдаются опухоли в нижней части шеи, увеличение тимуса и кожные проявления [29].

На поздних стадиях заболевания патологический процесс начинает стремительно прогрессировать, и становятся очевидными выраженные неспецифические признаки. Количество лейкоцитов в периферической крови может уменьшаться, в то время как преобладают патологические формы, что приводит к критическому истощению кроветворных органов, угнетению иммунной системы и, в конечном итоге, гибели животного [81]. Окончательный диагноз лейкоза у крупного рогатого скота подтверждается при обнаружении злокачественных образований в увеличенных поверхностных лимфоузлах или при наличии неопластических лимфоцитов в периферической крови животных с лимфоцитозом [36].

Инфекция может передаваться двумя основными способами: вертикально, от матери к плоду, и горизонтально, от одного животного к другому. Вертикальная передача происходит через кровь матери трансплацентарно [37, 122]. Частота заражения новорожденных телят зависит от стадии инфекционного процесса у матери [149]. Среди потомства, полученного от коров с

гематологическими проявлениями болезни, выявляют 18-20% телят, являющихся носителями вируса лейкоза КРС, при этом доля инфицированных телят, рождённых коровами с бессимптомно протекающей инфекцией, составляет 2-3% [96, 141]. Горизонтальное распространение вируса бычьего лейкоза может происходить через кровь, носовые выделения, слюну, сперму и смегму [90]. Ветеринарные и зоотехнические мероприятия, проводимые с нарушением санитарных правил, также способствуют передаче инфекции.

Учитывая сложную структуру энзоотического лейкоза крупного рогатого скота, животноводам и ветеринарным врачам необходимо проводить строгий мониторинг и контроль, чтобы смягчить его воздействие на стада, предотвратить дальнейшее распространение, обеспечить здоровье и продуктивность молочного скота [137].

#### ***Влияние вируса лейкоза КРС на здоровье человека***

Молоко выступает в качестве ключевого продукта питания, обеспечивающего организм человека всеми необходимыми питательными веществами. Белок коровьего молока усваивается на уровне 96-98% [60]. Однако молочные продукты, полученные от коров, инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота (BLV), могут представлять серьезную угрозу для здоровья из-за присутствия вредных метаболитов. Вирус лейкоза может быть обнаружен не только в молоке, но и в мясе и других продуктах, что создает риск заражения человека [110]. Пастеризация молока способна инактивировать вирус, однако его геном остается неповрежденным, и некоторые молочные продукты, подвергающиеся мягкой тепловой обработке, могут сохранять генетический материал провируса [137, 144]. Стандартные процедуры обработки, такие как пастеризация, не всегда гарантируют полную инактивацию вируса лейкоза крупного рогатого скота [11], что подчеркивает необходимость совершенствования методов контроля качества молочной продукции.

Дискуссии о возможности передачи вируса лейкоза крупного рогатого скота человеку ведутся уже долгое время. С развитием новых методов

диагностики и исследований этот вопрос стал особенно актуальным. Потенциальные риски инфицирования человека через продукты животного происхождения, такие как молоко и мясо, вызывают все большее беспокойство. Следовательно, необходимость в дополнительных исследованиях и разработке более эффективных методов обработки и диагностики становится все более насущной.

Существуют три основные гипотезы относительно возможного проникновения вируса бычьего лейкоза в организм человека. Первая гипотеза предполагает, что инфицирование возможно только при прямом контакте человека с зараженным животным. Согласно ей, к потенциальной группе риска можно отнести людей, чья деятельность связана с фермерской, ветеринарной или зоотехнической сферой. Вторая гипотеза утверждает, что передача вируса может произойти через эмбриональные сыворотки, загрязненные вирусом лейкоза КРС в процессе производства вакцин. Третья гипотеза рассматривает риск заражения при употреблении продуктов мясомолочного производства, полученных от инфицированных животных [59, 86, 97].

На протяжении многих лет проводились обширные эпидемиологические и эпизоотические исследования влияния вируса лейкоза КРС на организм человека. В результате этих исследований не было установлено взаимосвязи между заболеваемостью лейкозом у животных и естественным инфицированием человека. Даже несмотря на структурное сходство с вирусом Т-клеточного лейкоза человека, длительные наблюдения за людьми, работающими с скотом в неблагополучных по лейкозу хозяйствах или занимающимися убоем и переработкой больного или инфицированного скота, не выявили повышенного риска заболевания [38, 58].

В тоже время, на протяжении последних двух десятилетий регулярно появляются научные исследования, анализирующие возможную связь между возникновением рака молочной железы и присутствием в организме женщин вируса лейкоза крупного рогатого скота (BLV) [148]. В 2001 году проведено

исследование наличия антител против BLV у женщин с раком молочной железы, поводом к которому послужили статистические наблюдения, показывающие высокий уровень заболеваемости раком молочной железы в странах со значительным потреблением населением говядины и сопутствующих продуктов [87]. Авторы обнаружили многих участников исследования антитела против BLV, особенно - к гликопротеину оболочки gp51 и белку капсидар24, что позволило им выдвинуть гипотезу о возможности заражения человека вирусом BLV.

В 2003 году американские ученые провели исследование, в ходе которого сыворотки 257 пациентов были протестированы на наличие четырех изотипов антител к капсидному антигену BLV (p24) с использованием иммуноблоттинга. В результате обнаружено, что по крайней мере один изотип антител, реагирующих с BLV, присутствовал в 74% протестированных сывороток человека [148].

В 2010 году проведено исследование наличия антител с использованием непрямого фермент-связанного иммуносорбентного анализа (ELISA) для обнаружения антител против BLV, а также вложенной ПЦР для идентификации последовательностей провируса BLV. Общая распространенность антител против BLV составила 12,50% среди образцов человека и 16,73% среди крупного рогатого скота [145].

В 2013 году Mesa с коллегами провели ретроспективное исследование, в ходе которого с использованием метода ПЦР было проанализировано 106 биоптатов молочных желёз пациентов женского пола. В 43 образцах из них был обнаружен фрагмент генома ВЛКРС, включая 19 проб с тканями, пораженными раком, и 24 пробы без признаков рака молочной железы. В 34 пробах с явлениями рака молочной железы и в 29 пробах без этих явлений ВЛКРС не был обнаружен. Средний возраст женщин составлял 46,4 года у пациентов с раком молочной железы и 52,2 года у тех, у кого отсутствовали признаки рака молочной железы [88].

В 2014 году исследованиям подвергалась не кровь, а непосредственно ткани молочной железы человека, где ДНК BLV была идентифицирована с помощью вложенной ПЦР с жидкофазной гибридизацией и последующего секвенирования. Образцы тканей молочной железы человека были получены из 219 архивных FFPE-блоков. Результаты вложенной IS-PCR показали, что 97 (44%) образцов были положительными по BLV [85].

В работе калифорнийских ученых 2015 года приводились данные, показывающие, что частота встречаемости фрагментов ДНК BLV в клетках эпителия молочной железы у женщин с диагностированным раком молочной железы (59%) была значительно выше, чем у здоровых индивидов в контрольной группе (29%). У женщин с предраковыми изменениями молочной железы частота обнаружения провирусной ДНК BLV занимала промежуточное положение между упомянутыми выше группами женщин (38%). [94]. Таким образом, в этом исследовании присутствие амплифицируемой ДНК вируса BLV в образцах человеческих тканей было преимущественно связано с подтвержденным раком молочных желез у пациентов.

В тоже время, в 2016 году группа китайских исследователей заявила об отсутствии связи между ВБЛ и раком молочной железы у пациенток [114]. Однако достоверность этих результатов была поставлена под сомнение коллективом учёных под руководством Гертруды Бюринг, в 2017 году указавшим на тот факт, что использованные в работе [114] коммерчески доступные наборы для проведения анализов у КРС не предназначены для исследования человеческих биоматериалов [138].

В 2017 году колумбийские ученые представили данные по изучению передачи вируса человеку путем употребления последним сырой говядины либо парного молока [83]. Половина исследованных образцов показала положительные результаты при попытке амплификации фрагмента провирусной ДНК. Это первое исследование, в котором показано наличие гена BLV *gag* в

мясных продуктах, предназначенных для употребления в пищу человеком, и одновременно подтверждается присутствие вирусной ДНК в сыром молоке.

Проведённое в Южной Бразилии исследование 72 образцов тканей здоровых индивидов и 72 образцов онкобольных пациентов по мнению Schwingel *et al.* показало, что ВБЛ следует рассматривать как потенциальный предрасполагающий к новообразованиям фактор. Подобное заявление авторы работы связывают со следующими результатами: сравнение амплифицированного фрагмента ДНК из ткани молочной железы показало 99% гомологию с геном вирусного капсидного белка BLV [84].

В 2019 американскими учеными была опубликована работа по анализу выявления ДНК вируса бычьего лейкоза в человеческой крови. Результаты подтверждают предыдущие исследования по взаимосвязи ВБЛ и злокачественных образований у человека: BLV может инфицировать тромбоциты и лейкоциты, а также CD5+ В-лимфоциты, Т-клетки и клетки эпителия молочной железы [84].

Проведённое в 2020 году исследование ассоциации между развитием рака молочной железы и выявлением ДНК вируса лейкоза КРС в организме человека, выполненное с использованием 52 клинических образцов пациентов из суданской популяции, показало, что фрагменты генома вируса BLV были выявлены только в двух из изученных образцов [124].

Кроме того, проводились исследования возможной взаимосвязи между выявлением вируса бычьего лейкоза и возникновением других онкологических заболеваний у человека, таких как рак лёгких и лейкемия, но данные предположения были опровергнуты [83].

Такими образом, анализ исследований указывает на тот факт, что циркуляция вируса лейкоза КРС в организме человека может являться фактором риска возникновения злокачественных новообразований. Следовательно, для решения такой проблемы, как обеспечение населения безопасными продуктами

питания, необходима разработка чувствительных и специфичных методов выявления BLV в продукции молочной промышленности.

### *Диагностические методы исследования лейкоза КРС*

Для выявления лейкоза у крупного рогатого скота используются различные диагностические подходы, охватывающие серологические, молекулярно-биологические, микробиологические, гематологические, клинические и патоморфологические методы, а также метод биопробы [39]. Данные методы позволяют выявить присутствие вируса, оценить степень его распространения и понять влияние на здоровье животного. В таблице 1.4 представлено краткое описание этих методов исследования лейкоза КРС.

Таблица 1.4 - Описание методов исследования лейкоза КРС

<b>Диагностический метод</b>	<b>Краткое описание метода</b>	<b>Преимущества</b>	<b>Недостатки</b>
Серологический метод	Выявление антител или антигенов в крови	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Неинвазивность и экономическая эффективность.</li> <li>- Может использоваться для широкомасштабного скрининга.</li> <li>- Возможность выявления контакта с вирусом в прошлом.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Может не выявлять ранние инфекции.</li> <li>- Возможны ложные положительные/отрицательные результаты.</li> <li>- Ограничен специфическими антигенами.</li> </ul>
Молекулярно-биологический метод	Амплификация и обнаружение вирусного генетического материала (например, ДНК)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Высокая чувствительность и специфичность.</li> <li>- Возможность выявления ранних инфекций.</li> <li>- Возможность количественной оценки.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Требуется специальное оборудование и подготовка.</li> <li>- Выделение ДНК может занимать много времени.</li> </ul>
Микробиологический метод	Культивирование и выделение вируса в лабораторных условиях.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Можно получить живой вирус для дальнейшего изучения.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Требуется больших затрат времени.</li> <li>- Требуются контролируемые лабораторные условия.</li> </ul>

Клиническое исследование	Оценка клинических признаков и симптомов у инфицированного крупного рогатого скота.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Быстро и может быть выполнена на месте.</li> <li>- Применяется для индивидуальной диагностики.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Субъективны и могут не выявить случай раннего инфицирования.</li> <li>- Невозможно количественно определить вирусную нагрузку.</li> <li>- Зависит от квалификации ветеринарного врача.</li> </ul>
--------------------------	---	--	--

Серологические методы диагностики включают тестирование на наличие антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота. Такие тесты позволяют определить, был ли организм животного ранее подвергнут воздействию вируса, однако не всегда позволяют установить текущее состояние инфекции. Наиболее высокую чувствительность и специфичность демонстрируют молекулярно-биологические методы, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР), которые направлены на детекцию генетического материала вируса. Эти методы позволяют обнаруживать вирус даже в минимальных количествах, что делает их крайне эффективными для раннего выявления инфекции [18].

Микробиологические методы предполагают культивирование вируса из образцов, что помогает в установлении его наличия, но этот процесс требует времени и специальных условий для роста вируса. Гематологические методы включают анализ крови, в ходе которого выявляются характерные для лейкоза изменения в составе крови, такие как увеличение числа лейкоцитов и появление патологических форм клеток.

Клинические методы диагностики базируются на наблюдении за физическими симптомами у животных. На ранних стадиях лейкоза проявляются неспецифические признаки, такие как нарушения сердечно-сосудистой системы, нерегулярная жвачка и расстройства пищеварительного тракта. Животные могут показывать признаки вялости, потерю аппетита и снижение продуктивности. Эти симптомы не являются уникальными для лейкоза и могут быть присущи другим заболеваниям, что усложняет раннюю диагностику.

Патоморфологические методы диагностики включают изучение изменений в тканях и органах под микроскопом, что позволяет выявить характерные патологии, связанные с лейкозом. Метод биопробы предполагает заражение лабораторных животных для изучения их реакции на вирус, что также помогает в установлении диагноза. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и ограничения, и их комбинированное использование обеспечивает более полное и точное представление о состоянии здоровья животных. По мере прогрессирования болезни начинают появляться специфические признаки, которые позволяют точнее установить диагноз. К ним относятся увеличение лимфатических узлов, как поверхностных, так и внутренних, что можно обнаружить при пальпации или с помощью визуальных методов диагностики. Также могут наблюдаться опухолевые разрастания в различных частях тела, увеличение селезенки и печени. Эти признаки являются более характерными для лейкоза и позволяют ветеринарам поставить окончательный диагноз и начать соответствующее лечение [18].

На сегодняшний день существует несколько ключевых методов диагностики лейкоза у крупного рогатого скота. Один из таких методов – гематологический, который используется для раннего обнаружения заболевания. Этот метод предполагает подсчет лейкоцитов и детальную оценку лимфоцитов в крови, что помогает выявить лейкоз на начальных стадиях. Обнаружение незрелых лимфоидных клеток указывает на патологические процессы, характерные для лейкоза, и позволяет различать виды и формы болезни по морфологическим признакам клеток. Гематологический анализ не только выявляет общее количество лейкоцитов, но и проводит дифференциальный подсчет различных типов белых кровяных клеток, что является ключевым для определения состояния иммунной системы животного. Наличие незрелых лимфоидных клеток часто свидетельствует о патологических процессах, присущих лейкозу, и позволяет ветеринарам и исследователям различать формы и виды заболевания. Применение гематологического метода особенно важно,

поскольку он позволяет своевременно выявить заболевание, начать лечение и принять меры по предотвращению его распространения, что улучшает прогноз для животных и поддерживает здоровье стада [23]. Однако этот метод имеет недостаток в виде неспецифичности, так как изменения показателей крови могут быть вызваны различными факторами, не всегда связанными с лейкозом [19, 23].

Метод реакции иммунной диффузии в агаровом геле (РИД, AGID) – еще один важный инструмент диагностики лейкоза у крупного рогатого скота. Он основан на выявлении специфических антител к вирусу бычьего лейкоза и применяется для диагностики животных в возрасте от 4 до 6 месяцев [10]. РИД позволяет обнаружить зараженных животных на всех стадиях инфекционного процесса, за исключением латентной стадии, когда антитела к ВБЛ отсутствуют в крови. Особенность метода заключается в выявлении антител к вирусным антигенам, которые можно обнаружить в крови через две недели до нескольких месяцев после инфицирования [40]. Тем не менее, метод обладает низкой чувствительностью и ограничениями, такими как отсутствие серологического ответа и невозможность исследования молодняка до 6 месяцев [16, 26, 30].

Иммуноферментный анализ (ИФА, ELISA) – это высокочувствительная методика, основанная на использовании антивидового конъюгата с ферментными маркерами. В отличие от РИД, ИФА обладает высокой чувствительностью и возможностью автоматизации процесса, что делает его особенно полезным для массового скрининга [120]. ИФА позволяет обнаруживать антитела к ВБЛ в сыворотке крови и других биологических жидкостях, таких как молоко и моча [74], что облегчает мониторинг состояния животных. Внедрение коммерческих наборов для ИФА значительно расширяет его применение в борьбе с лейкозом [31]. Однако этот метод также имеет свои ограничения: обнаружение антител возможно только через 1,5-2 месяца после заражения, что может задерживать диагностику [102].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) стала ключевым методом диагностики лейкоза у крупного рогатого скота в современной ветеринарной практике [82].

Основой ПЦР является выявление провирусной ДНК ретровируса, что позволяет идентифицировать единичные копии вируса на ранних стадиях инкубационного периода. Благодаря этому методу можно обнаружить гены гликопротеина ВБЛ уже через 1-2 недели после заражения, что делает его применимым для диагностики молодняка старше 15 дней [129]. Интересно, что ПЦР способна выявлять инфицированных животных, которые ранее считались отрицательными по результатам иммунологических исследований [23], подчеркивая значимость и эффективность этого метода.

Метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ, RFLP) представляет собой передовую технику в генетических исследованиях. Он включает разрезание геномной ДНК рестрикционными эндонуклеазами и анализ размеров полученных фрагментов через гель-электрофорез [70]. ПДРФ широко используется для изучения аллельных вариантов генов, связанных с устойчивостью к различным заболеваниям, включая лейкоз [23, 70, 71]. Современные стратегии борьбы с лейкозом внедряют методы генодиагностики, направленные на раннее обнаружение возбудителя и исключение инфицированных животных из стада. Молекулярно-генетические исследования, такие как анализ генетического разнообразия вируса лейкоза, предоставляют уникальные возможности для идентификации возбудителя [16]. Эти исследования включают филогенетический анализ секвенированных нуклеотидных последовательностей ДНК провируса и применение ПЦР-ПДРФ-анализа в соответствии с филогенетической классификацией [150], что позволяет выявлять вирус и анализировать его генетическое разнообразие, важное для разработки эффективных мер борьбы с лейкозом.

### ***Методы исследования молока на наличие вируса лейкоза КРС***

В России отсутствуют утвержденные методы для специфического исследования молока на наличие вируса лейкоза крупного рогатого скота (КРС). Согласно литературным источникам, вирус подвергается инаktivации при пастеризации, обязательной для молочного производства [101]. Однако даже

если инфицированные коровы не проявляют клинических признаков, их молоко может не соответствовать нормам физико-химических и микробиологических показателей [98]. Данный факт создает риск того, что молоко от таких коров попадет в сборное, что негативно скажется на качестве и безопасности продукции.

Исследования показывают, что молоко от BLV-инфицированных коров в день получения практически не отличается от молока здоровых коров. Однако при хранении могут возникать значительные изменения, такие как расслоение и образование крошковатой мягкой субстанции [28]. Это подчеркивает необходимость тщательного контроля органолептических свойств молока.

Физико-химические показатели молока также изменяются при инфицировании BLV. По стандартам ГОСТ Р 52054-2003 и требованиям ТР ТС 033/2013, молоко должно соответствовать следующим характеристикам: жирность не менее 2,8%, содержание белка не менее 2,8%, кислотность в пределах 16-21 °Т, содержание сухого обезжиренного молочного остатка (СОМО) не менее 8,2%, плотность не менее 1027 кг/см<sup>3</sup>. Анализ образцов молока показывает, что у инфицированных коров наблюдается повышение жирности, снижение плотности, СОМО и общего белка [29].

Микробиологические показатели молока от инфицированных коров также требуют внимания. Согласно ГОСТ Р 52054-2003 и требованиям ТР ТС 033/2013, молоко должно соответствовать следующим микробиологическим стандартам: отсутствие бактерий группы кишечных палочек (БГКП) и сальмонелл в 25 мл молока, а также содержание мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) не должно превышать  $5 \cdot 10^5$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Однако молоко от BLV-инфицированных коров может не соответствовать этим требованиям, что подтверждается обнаружением БГКП в образцах [28]. Вышеописанные показатели подтверждают необходимость строгого контроля и регулярного мониторинга микробиологических показателей

молока для обеспечения его безопасности и соответствия установленным стандартам

#### **1.4 Исследование выявления ВБЛ с применением молекулярно-генетических методов исследований**

Как описывалось ранее, социальная опасность вируса лейкоза КРС не доказана, следовательно, методов исследования продуктов молочной промышленности на наличие фрагментов генома, регламентированных нормативными документами, в России нет.

Для производства молочных продуктов используется молоко, прошедшее термическую обработку [77,121]. Данный этап позволяет инактивировать вирус лейкоза КРС, при этом сохраняется целостность генетического материала провируса, что позволяет применять такой молекулярно-генетический метод исследования молочных продуктов, как полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Главным преимуществом ПЦР является возможность обнаружить даже денатурированную нуклеиновую кислоту, присутствующую в следовых количествах.

Вирус лейкоза крупного рогатого скота классифицируется по 10 генотипам с мировым распространением, за исключением нескольких европейских стран, Австралии и Новой Зеландии [143].

Геном BLV, схема которого представлена на рисунке 1.4, состоит из 8 714 нуклеотидов, включая гены *gag*, *pro*, *pol*, *env*, *R3*, *G4*, *tax* и *rex*, которые фланкированы 2 одинаковыми длинными концевыми повторами. *env* кодирует зрелый поверхностный гликопротеин (gp51) и трансмембранный белок (GP30), которые используются в основном для генотипирования BLV [142].

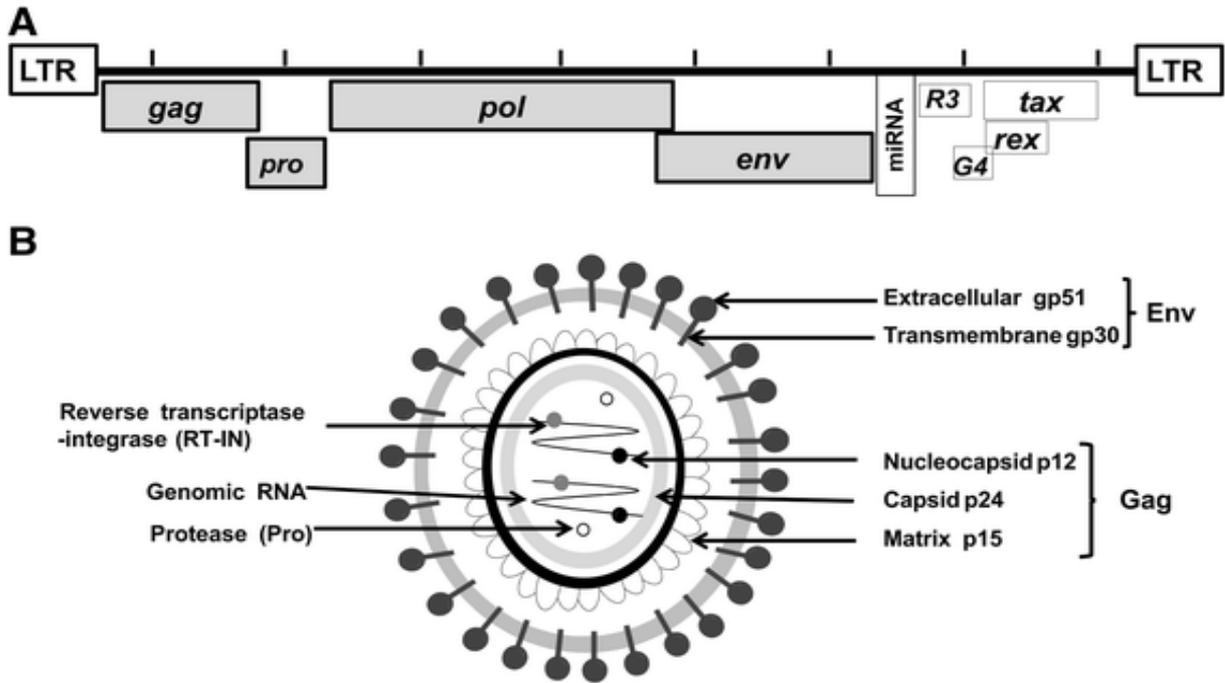


Рисунок 1.4 - Схематическое представление структуры генома BLV (А) и вирусной частицы (В).

В настоящее время на основе последовательности гена *env* выделяют 10 генотипов вируса BLV [150]. Генотип 1 вируса лейкоза крупного рогатого скота является наиболее широко распространенным и встречается в таких странах, как США, Австралия, Бразилия, Уругвай, Парагвай и Япония. В отличие от него, генотипы BLV 2-10 типов имеют ограниченное географическое распространение и связаны с региональными вспышками заболеваний. Например, генотип 6 преимущественно встречается в Китае, тогда как генотип 10 был недавно идентифицирован в странах Юго-Восточной Азии [12,13,79,116,135,130,136,139,140].

На рисунке 1.5 представлено филогенетическое дерево, построенное на основе последовательностей гена *env* (длиной 805 п.н.) различных изолятов вируса бычьего лейкоза с использованием метода «присоединения соседей».

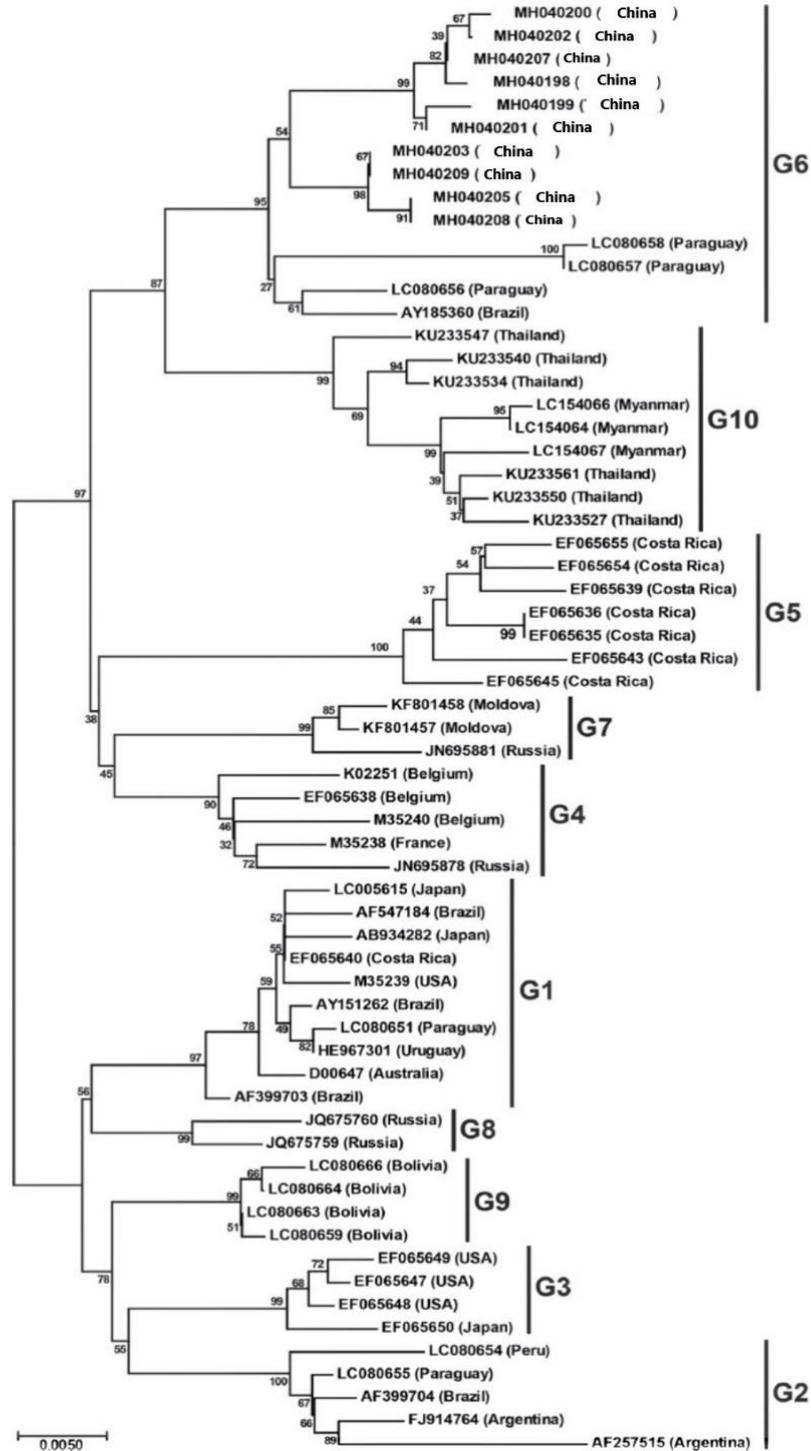


Рисунок 1.5 - Филогенетическое дерево штаммов BVDV, построенное на основе последовательностей гена *env*.

В таблице 1.5 описаны методы, применяемые для генотипирования вируса лейкоза крупного рогатого скота.

Таблица 1.5 - Методы генотипирования BLV

Метод генотипирования	Аmplифицированная область	Размер ампликона (п.н.)	Ферменты	Результат классификации	Ссылка
ПЦР-ПДРФ	Частичный регион <i>env-gp51</i>	444	<i>BamH I, Bgl I, Hae III, Bcl I, PvuI I, Dra I, Hind III, Hpa II, Stu I, Taq I</i>	7 групп: А, В, С, D, Е, F, G	[91,98, 125]
RFLP + секвенирование	Частичное секвенирование <i>gp51</i>	400-444	<i>Bam HI, Bcl I, Pvu II, Gmb H</i>	Тип на основе RFLP: австралийский тип, аргентинский тип, бельгийский тип, японский тип; Тип на основе последовательностей: аргентинский кластер, европейский кластер, японский и немецкий изолятный кластер; группы I – IV; или генотипы 1–8	[91, 117,126]
ПЦР-секвенирование	Частичное секвенирование <i>gp51</i>	346-444		Японская группа, аргентинская группа, европейская группа; или генотипы 1–8	[79,92,11 8,121,13 0,133,13 4]
	Секвенирование частичных или полных последовательностей гена <i>gp51</i>	444-903		До 10 генотипов BLV	[115,119, 139, 140]
	Секвенирование <i>env</i> (полные гены <i>gp51</i> и / или <i>gp30</i> )	до 1548		Консенсусный кластер, американский калифорнийский кластер, европейский кластер, костариканский кластер; или генотипы 1–10	[76,80, 146]
Полное секвенирование генома BLV	<i>BLV</i> полный геном	8714		генотипы -1, -2, -4, -6, -9 и -10	[132, 135]

Развитие технологий и расширение методической базы выявления ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота является динамичным процессом.

Соответственно, любое проведение исследований предполагает проведение патентного поиска в части детализации актуальных направлений развития технологий. С этой целью осуществлен ретроспективный анализ (2000-2022 гг.) патентной информации по базам ФИПС (<http://www1.fips.ru>), Европейского патентного ведомства (<http://www.epo.org/index.html>) и Евразийской патентной организации (<https://www.eapo.org/ru>) по группам C12Q 1/68, C12Q 1/66, G01N 33/49, C12Q 1/686, C12N 15/09, C12Q1/70, C07K 16/10 [106-108].

Краткое изложение формул изобретений, приведённых в опубликованных за рассматриваемый период на территории Российской Федерации патентах, представлено в таблице 1.6.

Таблица 1.6 - Информация о патентах по методам обнаружения ВБЛ, опубликованных в России

Номер патента	Дата публикации	Авторы	Краткое описание изобретения	Ссылка
RU2566071C2	2015-10-20	И. А. Шкуратова, И. М. Донник, Ю. Я. Хрунык, М. В. Ряпосова, А. Т. Татарчук, Е. Н. Шилова, И. В. Вялых, М. В. Петропавловский	Предложен способ приготовления биоматериала для ПЦР-диагностики вируса бычьего лейкоза, включающий отбор проб крови животных и подготовку образцов в форме культуры клеток СС81, культивируемой на среде Eagle MEM в форме синцития.	[50]
RU2445370C1	2012-03-20	Н. Г. Козырева, М. И. Гулюкин, Л. А. Иванова, Д. В. Колбасов, С. Ж. Цыбанов, И. М. Калабеков, А. С. Малоголовкин.	Для выделения фрагмента гена <i>pol</i> провируса лейкоза крупного рогатого скота используют олигонуклеотидные праймеры р f2 и рr2, не имеющие самокомплементарных участков, с температурой плавления 66 ° С. Эти праймеры, с составом GC 50% для р f2 и 65% для рr2, обрамляют консервативную область гена <i>pol</i> вируса, образуя фрагмент размером 438 пар оснований.	[47]

RU2521330C2	2014-06-27	Г. Ю. Косовский, Е. А. Климов, Д. В. Горюнов, А. Б. Сиволапова	Изобретение относится к медицине и ветеринарии, представляя универсальный способ обнаружения вируса бычьего лейкоза (BLV) с использованием полимеразной цепной реакции и олигонуклеотидов с консервативными областями генома BLV.	[48]
RU2558252C2	2015-07-27	А. Ю. Маркарян, И. А. Шкуратова, И. М. Донник, А. Т. Татарчук, М. В. Ряпосова, А. В. Лысов, Н. А. Безбородова	Метод включает обнаружение фрагмента LTR провируса лейкоза через электрофоретическое разделение в агарозном геле с использованием праймеров BL1.F и BL1.R. Продукт синтеза составляет 175 пар нуклеотидов, а метод применим в молекулярно-генетической диагностике заболеваний животных и в ветеринарных исследованиях.	[49]
RU2615465C2	2017-04-04	Е. С. Красникова, О. С. Ларионова, А. В. Красников, Г. Х. Утанова, А. С. Белякова	Изобретение включает метод выявления ДНК провируса лейкоза и иммунодефицита крупного рогатого скота с применением мультиплексной ПЦР, а также комплект для его реализации, содержащий прямые и обратные олигонуклеотидные праймеры.	[51]
RU2644233C2	2018-02-08	А. И. Никитин, К. В. Усольцев, Т. Х. Фаизов А. Н. Чернов, И. И. Усольцева, М. Е. Семенова, Н. И. Хаммадов, З. З. Алеева, Ф. А. Хусниев, Р. М. Ахмадеев, Ш. З. Валидов, Э. А. Шуралев	Способ экспресс-диагностики лейкоза крупного рогатого скота методом ПЦР в реальном времени включает применение специфических олигонуклеотидных праймеров и зонда с флуоресцентной меткой для обнаружения фрагмента гена провируса.	[52]

RU2694617C1	2019-07-16	Н. Г. Козырева, Л. А. Иванова, Т. В. Степанова, М. И. Гулюкин	Изобретение в области биотехнологии, молекулярной генетики и ветеринарии раскрывает способ диагностики лейкемии крупного рогатого скота с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени в мультиплексном формате. Он включает наборы генно-инженерных структур для одновременного раннего обнаружения фрагментов провирусного генома и может применяться для диагностики лейкемии у животных.	[53]
RU2694966C1	2019-07-18	Т. Л. Красовская, С. С. Абакин, Н. В. Сулыга	Изобретение предназначено для диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота (ЛКРС) с использованием специфических праймеров и ДНК-зонда для РНК вируса лейкемии. Метод включает генетическое типирование с помощью праймеров и флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов, что улучшает информативность, чувствительность и специфичность диагностики и генотипирования РНК CLV, обеспечивает минимальное загрязнение в лабораторных условиях.	[54]
RU2700245C1	2019-09-13	О. Ю. Черных, В. А. Баннов, Д. В. Малышев, А. А. Котельникова, И. М. Донник, Ю. Д. Дробин, К. А. Лайшев, Ю. А. Юлдашбаев, М. И. Гулюкин, А. А. Лысенко,	Изобретение в области биотехнологии представляет собой способ обнаружения провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота (BLV). Способ включает извлечение ДНК, одностадийную полимеразную цепную реакцию с одновременной амплификацией и обнаружением	[55]

		С. А. Мирошников, Р. А. Кривонос, В. Н. Шевкопляс, П. В. Шаравьев, А. Г. Коцаев, М. П. Семененко, Л. А. Дайбова, А. В. Молчанов	олигонуклеотидных праймеров и зондов красителей, а также измерение удельного и контрольного сигналов и интерпретацию результатов через флуоресцентное обнаружение с использованием специфических контрольных образцов.	
RU2700450C1	2019-09-17	В. А. Баннов, О. Ю. Черных, Д. В. Малышев А. А. Котельникова, А. Я. Самуйленко, Ю. Д. Дробин, А. М. Смирнов, И. М. Донник, П. Н. Сисягин, А. А. Лысенко, А. В. Иванов, Р. А. Кривонос, В. М. Авилов, В. Н. Шевкопляс, А. С. Кривоногова, А. Г. Коцаев, Л. А. Дайбова, О. П. Неверова	Изобретение в области биотехнологии представляет собой тест-систему для обнаружения провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота (BLV). Система включает пластиковые бутылки и пробирки, термостабильный фермент Таg-полимеразу, реакционный буфер, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов, образец внутреннего и положительного контроля, а также олигонуклеотидные праймеры и красители. Изобретение позволяет надежно диагностировать ген провируса бычьего лейкоза (BLV) для раннего обнаружения лейкемии.	[56]
RU2722137C1	2020-05-26	С. С. Абакин, Т. Л. Красовская	Метод включает прямые и обратные олигонуклеотидные праймеры для обнаружения генного фрагмента <i>env</i> лейкемии при условии генетических вариантов G1-G3, циркулирующих на территории Ставропольского края, что обеспечивает высокую чувствительность и специфичность диагностики.	[57]

В России производится несколько коммерческих наборов для выявления ДНК провируса, вызывающего лейкоз крупного рогатого скота (Bovine Leukemia Virus, BLV). Среди производителей таких наборов выделяются следующие:

- ООО "ИнтерЛабСервис" разработало тест-систему "ЛЕЙКОЗ" для выявления лейкоза крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Этот метод отличается высокой точностью и позволяет эффективно обнаруживать присутствие вируса в биологическом материале.

- Компания "ПЦР технологии" выпускает тест-систему "ГенТест Лейкоз", которая предназначена для выявления ДНК провируса BLV в биологическом материале и кормах для животных методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Это позволяет получать быстрые и надежные результаты.

- ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора предлагает тест-систему "ЛЕЙКОЗ" для выявления провирусной ДНК BLV в биологическом материале методом ПЦР. Набор разработан для применения в ветеринарных и научных исследованиях, обеспечивая высокую чувствительность и специфичность диагностики.

- Компания "ВЕТ ФАКТОР" производит набор реагентов "ПЦР-ЛЕЙКОЗ-КРС-ФАКТОР", который предназначен для выявления ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота в различных биологических материалах, включая цельную кровь и продукты питания (например, фарш, колбасу, шпик и др.), методом ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Этот набор обеспечивает точное и быстрое выявление вируса, что важно для мониторинга и контроля качества продукции.

Данные наборы играют важную роль в диагностике лейкоза крупного рогатого скота, позволяя своевременно выявлять инфицированных животных и принимать меры по предотвращению распространения заболевания.

### *Детекция ВБЛ с применением ПЦР в молоке-сырье*

Известно, что молоко является одним из факторов передачи восприимчивому крупному рогатому скоту ретровирусной инфекции, в данном случае индуцированной вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС). С другой стороны, одним из важнейших аспектов изучения биологических свойств ВЛКРС является потенциальная способность вируса поражать ксеногенные виды животных, в том числе и человека, употребляющего в пищу продукты животноводства и тесно контактирующего с крупным рогатым скотом в процессе хозяйственной деятельности [128,147].

В молоке могут присутствовать лейкоциты с интегрированной провирусной ДНК, продуцирующие зрелые вирионы ВЛКРС и непосредственно сами зрелые вирионы, поступившие из кровотока в процессе образования молока. Применение молекулярной диагностики данного биологического материала позволит эффективнее отслеживать зараженную молочную продукцию в хозяйствах. Вирус способен к передаче через молоко, молозиво и кровь от инфицированных животных.

Большинство исследований ВЛКРС проводится с использованием крови животных. С учетом того, что данные исследования могут проводиться несвоевременно, актуальным является исследование молока [127]. В настоящее время единая методология исследования молока и молочных продуктов на наличие BLV отсутствует. Анализ литературных данных указывает на несколько подходов исследования молока сырья:

Nossein Barzeghar с соавторами [78] изучена распространенность BLV в образцах сырого молока местных иранских и ирано-иностранных коров на традиционных, полупромышленных и промышленных молочных фермах в сельских и городских районах провинции Занджан. Образцы сырого молока коров отбирали вручную в стерильные пробирки. Образцы были протестированы методом вложенной ПЦР. Сорок образцов (9,93%) из 403 образцов показали загрязнение BLV. В этом исследовании вложенная ПЦР была

успешно применена для определения уровня загрязнения в образцах сырого молока от коров, инфицированных BLV.

Tetsuya Yamada и соавторы [157] изучали связь экзосом с вирусом лейкоза крупного рогатого скота (BLV) в коровьем молоке. При помощи вестерн-блот-анализа в экзосомах молока инфицированных коров были выявлены структурные белки BLV, такие как gp51 (Env) и p24 (Gag). Однако, в клетках, обработанных этими экзосомами, ДНК BLV не была обнаружена после трех последовательных пассажей с использованием вложенной ПЦР. Очистка экзосом от клеток, стойко инфицированных BLV, была осуществлена методом иммуномагнитного разделения с применением антител против экзосом, соединенных с магнитными шариками. В результате в очищенных экзосомах вновь были выявлены белки gp51 и p24, а также активность обратной транскриптазы, что указывает на присутствие вирусного фермента. Тем не менее, ДНК BLV не была обнаружена в клетках после инокуляции очищенными экзосомами, что указывает на их неинфекционность. Эти данные свидетельствуют о том, что белки BLV могут высвобождаться с экзосомами молока и передаваться клеткам-реципиентам телят через молочные экзосомы, обходя необходимость прямой вирусной инфекции.

Абашиным И.Ю. и Козыревой Н.Г. [1] была апробирована методика выявления НК ВЛКРС из соматических клеток молока. В процессе оптимизации условий пробоподготовки молочных образцов, по результатам амплификации внутреннего контроля (ДНК КРС), не было зафиксировано ингибирования реакции амплификации. Используя метод ПЦР-РВ, было обнаружено присутствие РНК ВЛКРС в молоке одного из пяти исследуемых животных. Для этого использовалась гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформная экстракция с последующей преципитацией спиртом. Кроме того, по результатам ПЦР-РВ было подтверждено присутствие провирусной ДНК ВЛКРС в крови, при этом воспроизведение результатов оказалось стабильным во всех сериях эксперимента.

Исследования, проведенные Mami Hiraoka и др. [105], были направлены на выявление биомаркеров энзоотического лейкоза крупного рогатого скота (ЭБЛ) в молоке. В исследовании использовались малые внеклеточные везикулы (МВВ) молока молочного скота для изучения мРНК-биомаркеров ЭБЛ. Цель - разработать неинвазивный метод выявления ЭБЛ у крупного рогатого скота. Образцы исследовали с помощью различных методик. Молочные SEV были выделены и охарактеризованы с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и анализа размеров наночастиц. Выделение РНК и синтез кДНК проводили для микрочипового анализа и количественной ПЦР (qPCR). Для анализа микрочипов использовали бычий микрочип для экспрессии генов, а для количественного определения уровня мРНК - qPCR. Полученные результаты показали, что СЭВ молока содержат биомаркеры мРНК, которые потенциально могут быть использованы для выявления ЭБЛ у крупного рогатого скота. Анализ микрочипов выявил дифференциально экспрессированные мРНК между неинфицированным и больным ВБЛ крупным рогатым скотом. Анализ методом qPCR подтвердил полезность этих мРНК-биомаркеров. В ходе исследования были получены дополнительные данные о заражении BLV и клиническом статусе, а также о морфологии и размере наночастиц молочных sEVs.

В рамках исследования, проведенного Olaya-Galán с соавторами [83], было изучено возможности передачи вируса лейкемии крупного рогатого скота человеку при употреблении продуктов, полученных от крупного рогатого скота. Для исследования материала использовался метод выделения ДНК из образцов свежего молока и сырой говядины с последующей ПЦР-амплификацией с использованием специфических праймеров к конститутивному гену GAPDH крупного рогатого скота и *gag*-гену вируса. Результаты исследования показали наличие сегмента гена *gag* вируса BLV в 49% анализируемых образцов, причем в большинстве из них он был выявлен методом нестерильной ПЦР, что свидетельствует о значительно низкой вирусной нагрузке в образцах.

Также вопросом выявления ВБЛ в молочной матрице занимались M.I. Petersen и др. [131]. Для исследования использовали международную панель образцов провирусной ДНК BLV и набор полевых образцов, полученных из основной продуктивной зоны Аргентины. Анализ BLV SYBR qPCR позволил провести высокоэффективное, воспроизводимое, чувствительное и специфичное выявление и количественное определение провирусной ДНК BLV из очищенных лейкоцитов периферической крови и молочной матрицы. Полученные результаты показали, что BLV SYBR qPCR обладает высокой чувствительностью и специфичностью: чувствительность и специфичность составили 97,2 и 97,5 соответственно. Кроме того, анализ продемонстрировал высокий уровень воспроизводимости и аналитической чувствительности, а также хорошую диагностическую эффективность по сравнению с другими методами, такими как ИФА и nPCR.

Возможность использования массовых проб молока для изучения встречаемости различных вариантов провируса BLV у естественно инфицированного крупного рогатого скота оценивали Felmer с соавторами [99]. Для исследования материала использовался метод сбора объемных проб молока из важного молокопроизводящего района на юге Чили с последующим анализом этих проб с помощью непрямого ИФА-теста для выявления антител к BLV. Затем из серопозитивных и серонегативных проб молока была выделена ДНК для проведения гнездовой ПЦР, специфичной для BLV. Полученные результаты свидетельствуют о высокой частоте точечных мутаций в гене *env* вируса BLV и выявлении как минимум двух различных генетических кластеров BLV в Чили, что позволяет предположить наличие двух независимых событий интродукции, произошедших в основном из Европы много лет назад. Кроме того, был проведен филогенетический анализ, который выявил четыре основных узла, что позволило выделить четыре различных генетических кластера для группировки почти всех изолятов BLV, не имеющих отношения к первоначальному разделению на основе рестрикционного анализа.

Исследованием тестов для выявления вируса лейкоза крупного рогатого скота (BLV) в образцах крови и молока занималась группа ученых под руководством Kuckleburg и др. [113]. В своей работе они применяли методы гнездовой полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ПЦР в реальном времени для обнаружения BLV в исследуемом материале, взятом у молочного скота. Полученные результаты показали, что гнездовая ПЦР выявила 98% серопозитивного по BLV скота из крови и 65% из молока, а ПЦР в реальном времени - 94% серопозитивного по BLV скота из крови и 59% из молока. Кроме того, BLV был обнаружен с помощью ПЦР примерно у 10% серонегативного скота, что, скорее всего, связано с ранним выявлением до сероконверсии.

Молоко остается ключевым продуктом питания, однако оно может быть фактором передачи вируса лейкоза крупного рогатого скота. Исследования показывают, что вирус может присутствовать в молоке, даже если коровы не проявляют клинических признаков заболевания. Это подчеркивает необходимость разработки и внедрения более точных методов диагностики и мониторинга молока на наличие ВЛКРС. Молекулярные методы, такие как ПЦР, играют важную роль в выявлении вируса и обеспечении безопасности молочной продукции. Осуществление тщательного контроля молока и молочных продуктов на всех стадиях их производства и переработки является критически важным для защиты здоровья как животных, так и потребителей.

### **Заключение по обзору литературы**

Резюмируя анализ литературы, можно сделать следующий вывод: не смотря на широкий список нормируемых критериев молока от КРС, актуальной остается проблема получения качественной и безопасной продукции. Так как молоко -продукт животного происхождения, важным критерием является здоровье животного. В связи с данным фактом важно обратить внимание на скачок количества выявленных неблагополучных пунктов по лейкозу КРС в России. Коровы с диагностированным лейкозом выбраковываются и сдаются на убой, при этом молоко от коров-вирусоносителей может реализовываться при выполнении определенных условий. Вопрос безопасности молока от коров с выявленным вирусом лейкоза КРС начал активно обсуждаться с развитием молекулярно-генетических методов исследования. Чтобы полностью понять воздействие ВБЛ на молочную промышленность и ее потребителей, необходимы более всесторонние исследования. Не смотря на множество подходов к идентификации ВБЛ, они все направлены на выявление вируса в крови и сыворотке животного. Возможно, отсутствие интереса к исследованиям молока от коров-вирусоносителей, прошедшего термическую обработку и продуктов его переработки связано с запретом реализации молока от лейкозных коров и рядом исследований, показывающих безопасность пастеризованного молока в связи с инаktivацией вируса. При этом эффективность пастеризации зависит от таких переменных, как температура, время выдержки и состав исследуемого продукта, так как, не смотря на инаktivацию, денатурация ДНК провируса BLV может не произойти. Следовательно, результаты литературного обзора указывают на актуальность проведения исследований провирусной нагрузки молока и продуктов его переработки вирусом лейкоза КРС. Данные исследования позволят расширить критерии безопасности и разработать методику оценки провирусной нагрузки молока и молочных продуктов вирусом лейкоза КРС.

## ГЛАВА 2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена на базе лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности».

Структура диссертационной работы состоит из теоретического и экспериментального этапов и включает следующие основные компоненты: обширное изучение и анализ научно-технической литературы, а также патентной информации, относящейся к теме исследования. При этом особое внимание уделялось выявлению вируса лейкоза крупного рогатого скота в молоке и продуктах его переработки. Обзор литературы проводился с использованием различных методик, включая поиск и анализ соответствующей научно-технической литературы, а также изучение патентной информации в данной области. В ходе исследования также использовались интернет-ресурсы и базы данных. Кроме того, была проведен выбор объектов и методов исследований, разработана общая схема исследований (рис. 2.1).

Экспериментальный этап включал в себя разработку и апробацию новых методик выделения и анализа ДНК BLV в молоке и молочных продуктах. Были проведены сравнительные исследования различных методов выделения ДНК для определения их эффективности и чистоты полученных образцов. В рамках этих исследований были разработаны и протестированы новые праймеры для ПЦР-анализа, что позволило повысить чувствительность и специфичность метода выявления BLV.

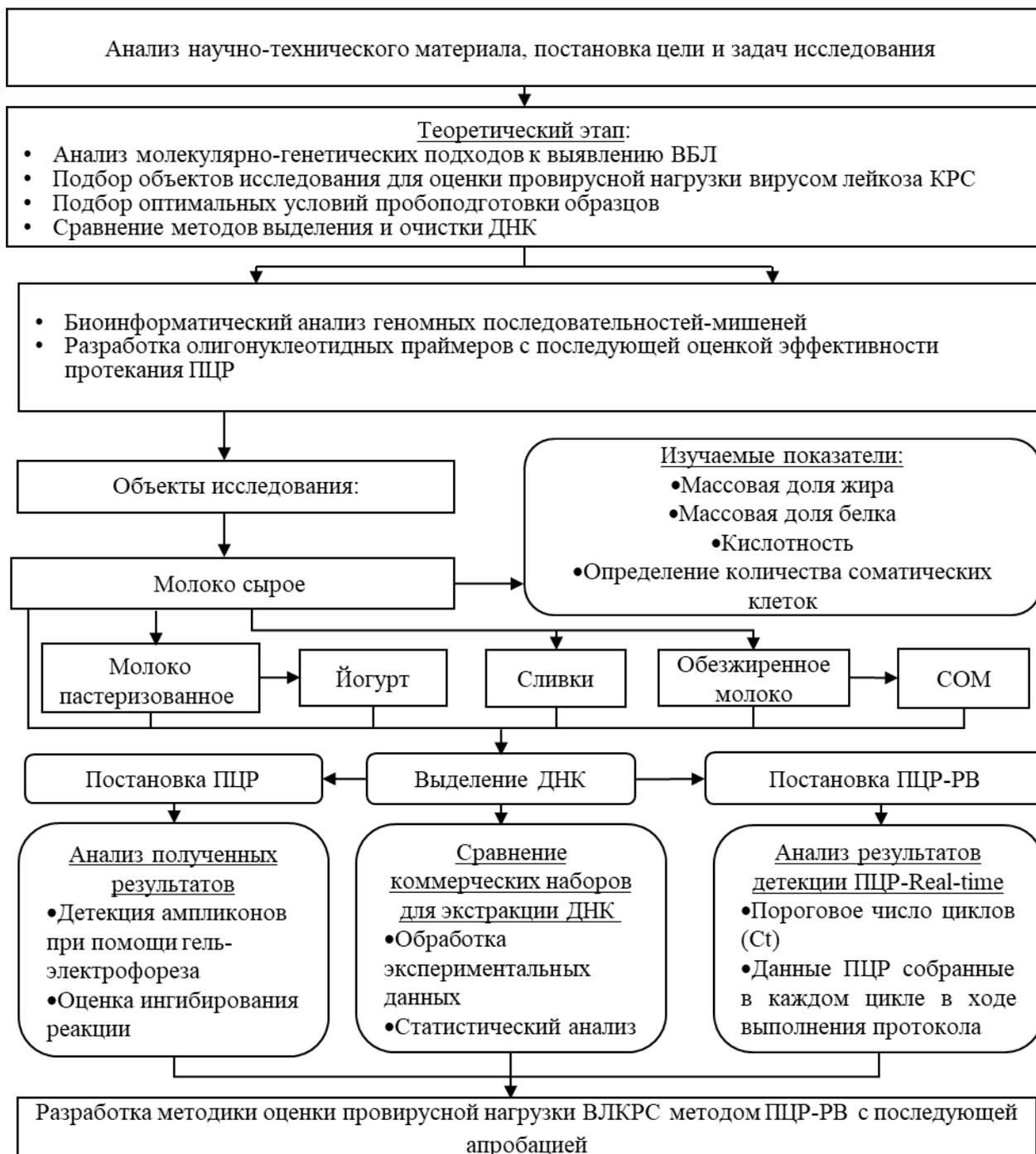


Рисунок 2.1- Общая схема исследований

### ***Объекты исследований***

В качестве объектов исследований использовали: сырое молоко и молочные продукты; сырое молоко, полученное от коров-вирусоносителей, а также продукты его переработки: пастеризованное молоко, обезжиренное молоко, сливки, йогурт, сухое обезжиренное молоко. В качестве объектов исследования использовали, также, препараты вируса лейкоза кошек, лейкоза КРС и препараты, содержащие типичную для молочной отрасли патогенную и условно-патогенную микрофлору.

### ***Физико-химический анализ образцов***

В рамках физико-химического анализа образцов исследовались следующие показатели:

- массовая доля белка путем определения массовой доли общего азота по методу Кьельдаля с последующим пересчетом на белок по ГОСТ 23327-98
- массовая доля жира по методу Гербера в соответствии с ГОСТ 5867-90;
- титруемую кислотность по ГОСТ Р 54669-2011;
- массовая доля влаги в молоке термогравиметрическими методами в соответствии с ГОСТ Р 54668-2011 и ГОСТ 29246-91;
- содержание соматических клеток по ГОСТ 23453-2014.

### ***Получение обезжиренного молока, сливок и сухого обезжиренного молока (СОМ)***

Для получения обезжиренного молока и сливок молоко предварительно нагревалось до  $T=50-55$  °С, далее производилось сепарирование при помощи сепаратора молочного Milky PP 90 (115V). Для получения сухого обезжиренного молока (СОМ) сушка молока производилась в сушилке распылительной ВХТ-2000MLH (Китай) при следующих рабочих параметрах: диаметр форсунки 1 мм,

температура на входе составляла  $(175\pm 2)$  °С, температура на выходе составляла  $(75\pm 2)$  °С [5].

### ***Получение йогурта***

Для получения йогурта молоко подвергалось пастеризации при в течение 2-8 мин температуре  $(92\pm 2)$  °С. Далее смесь охлаждали до температуры заквашивания и вносили в неё 5% по объёму заквасок, приготовленных из чистых культур термофильных молочнокислых стрептококков и болгарской палочки в соответствии с технологической инструкцией по производству и применению заквасок для кисломолочных продуктов на предприятиях молочной промышленности. Для выработки закваски использовали специально подобранные в коллекции ЦЛМ ФГАНУ «ВНИМИ» штаммы микроорганизмов *Str.thermophilus*, штамм бкб и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, штамм L37/7. Нормализованные смеси сквашивали при температуре  $(40\pm 2)$  °С в течение 4 - 5 ч до кислотности  $\geq 75^{\circ}\text{T}$  (рН 4,5-4,6). Полученный кисломолочный сгусток частично охлаждали до температуры 30-25 °С и перемешивали. Продукты расфасовывали в потребительскую упаковку, герметично укупоривали и направляли на доохлаждение, структурообразование ( $\geq 16$  ч) и хранение в холодильной камере при температуре  $(4\pm 2)$  °С. рН готового продукта составлял 4,5-4,2.

### ***Пробоподготовка и выделение ДНК из биологических материалов и пищевых продуктов***

ДНК из сырого, пастеризованного, обезжиренного и сухого молока выделяли с использованием коммерчески доступных наборов для выделения, основанных на адсорбционных методах с использованием сорбентов на основе диоксида кремния «ДНК-сорб-С-М» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) согласно рекомендациям производителя, и

основанных на жидкофазных методах с солевым осаждением «ДНК-Экстран-2» (ООО «НПФ Синтол», Россия) с незначительными изменениями – время лизирования образцов составляло 1 час. Объем буфера TE, использованного для элюции ДНК, в обоих случаях составлял 50 мкл. При выделении ДНК из жидких образцов 2 мл пробы центрифугировали при 10 000 g в течении 10 минут. Супернатант удаляли при помощи вакуумного отсасывателя, а осадок использовали в качестве источника для выделения ДНК. При работе с сухим молоком использовали навески массой 100 мг. Указанные наборы реагентов далее в тексте обозначаются как «набор №1» и «набор №2» соответственно.

### ***Определение качественных и количественных показателей препаратов ДНК***

Концентрацию ДНК в полученных препаратах измеряли на флуориметре Qubit 4 («Invitrogen», США) с использованием набора реагентов Qubit dsDNA BR Assay Kit («Invitrogen», США). Объем исследуемой пробы составлял 5 мкл. Кроме того, производилось определение ряда качественных параметров образцов ДНК (A260, A280, A230) и их соотношений с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000 («Thermo Fisher Scientific», США) в объеме 1 мкл.

### ***Скрининговый ПЦР-анализ***

Пригодность выделенных образцов для дальнейшего анализа определяли с помощью видоспецифических праймеров Bos-F6 5'-CATCAACTTCATTACAACAATGATCAACATAAAG-3' и Uni-R 5'-CCGAATGGTTCYT TTTTTCYCCYGAGTAGTA-3' с температурой отжига 49 °C, использовавшихся для амплификации участка гена COI *Bos taurus* [79]. Полимеразную цепную реакцию проводили на приборе MiniAmp («ThermoFisher Scientific», США) в объеме 25 мкл с применением реакционной смеси 5x

ScreenMix (ЗАО «Евроген», Россия). Для амплификации использовали следующую программу: начальная денатурация первичная денатурация 95°C в течение 5 минут; 35 циклов следующего вида: денатурация при 95°C в течение 15 секунд; отжиг праймеров в течение 20 секунд при температуре 49°C; элонгация цепей при 72°C в течение 25 секунд; финальная элонгация цепей в течение 10 минут при 72°C. Теоретически ожидаемая длина получаемого ампликона – 311 пар оснований.

### ***Идентификация вируса лейкоза КРС методом ПЦР-РВ***

ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I проводили при помощи комплекта реагентов «5X qPCRmix-HS SYBR» (ЗАО «Евроген», Россия). Реакцию проводили в амплификаторе LightCycler 96 («Roche», Швейцария) в объёме 25 мкл. Для выявления провирусной ДНК вируса BLV использовали три пары специфических праймеров, разработанных в соответствии с разделом «Биоинформатический анализ».

### ***Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозных гелях***

Аналитический электрофорез с целью качественной оценки препаратов ДНК осуществляли в 1% геле агарозы I (VWR International LLC, США) при напряжении электрического поля 7 В/см геля с использованием маркера длин ДНК «1 kb DNA Ladder» (ЗАО «Евроген», Россия). Разделение ПЦР-продуктов проводили в 2% в аналогичных условиях, за исключением использования маркера длин ДНК «100+ bp DNA Ladder» (ЗАО «Евроген», Россия). Гели окрашивали раствором бромистого этидия. Документирование осуществляли с использованием системы гель-документирования «Vilber E-Box-CX5.TS» (Vilber, Франция) на трансиллюминаторе «Vilber Super-Bright» (Vilber, Франция) с длиной волны 312 нм.

### ***Биоинформатический анализ***

Глобальные выравнивания последовательностей нуклеиновых кислот осуществляли с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша в модификации, обеспечивающей проведение выравнивания протяжённых последовательностей. Локальные выравнивания и поиск гомологичных последовательностей в базе данных GeneBank производили с использованием алгоритма BLAST. Разработка праймеров, обеспечивающих амплификацию фрагментов генома вируса BLV осуществлялась с помощью специализированного программного обеспечения Primer3 и Primer-BLAST. Расчёт термодинамических параметров праймеров выполнен с использованием пакета ПО Vector NTI 11.5

### ***Статистическая обработка экспериментальных данных***

Статистическую обработку полученных данных производили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2019 (Microsoft, США) и Statistica 12 (Statsoft, США). Уровень значимости  $\alpha$  принимали равным 0,001. Определение аналитической чувствительности разрабатываемой тест-системы, сходимости и воспроизводимости результатов выполняли в соответствии с ГОСТ Р 70150-2022 «Тест-системы для диагностики болезней животных методом полимеразной цепной реакции. Общие требования и методы испытаний».

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1 Сравнительная эффективность методов выделения ДНК из сырого молока

Выход суммарной коровьей ДНК из молока во многом зависит от содержания в нём соматических клеток. На первом этапе исследования молоко-сырьё исследовали на наличие соматических клеток. Допустимое значение соматических клеток в молоке по ГОСТ 31449-2013 должно быть не более 400 тыс. ед. на  $1\text{см}^3$  [29]. В исследуемом молоке данное значение не превышало данного показателя, и было равно  $270\pm 13,5$  тыс ед. на  $1\text{см}^3$ .

ДНК выделялась из образцов цельно сырого молока объёмом 2 мл. С целью определения воспроизводимости применяемых методов, ДНК выделяли из 24 образцов идентичного материала с использованием каждого из наборов для выделения ДНК, указанных в разделе «Материалы и методы». Результаты статической обработки полученных данных приведены на рисунке 3.1.

Применение двухвыборочного t-теста показало, что концентрация ДНК, выделенной двумя различными наборами достоверно отличается: при уровне значимости  $\alpha$ , равном 0,001, значение p-value составило  $1,17 \times 10^{-11}$ . Таким образом установлено, что использование для выделения суммарной ДНК из сырого молока набора №1 позволяет получить более высокий выход нуклеиновых кислот ( $8,1\pm 3,8$  нг/мкл против  $2,82\pm 0,9$  нг/мкл). При этом концентрация ДНК в препаратах, полученных с применением набора №2 имела более стабильные показатели.

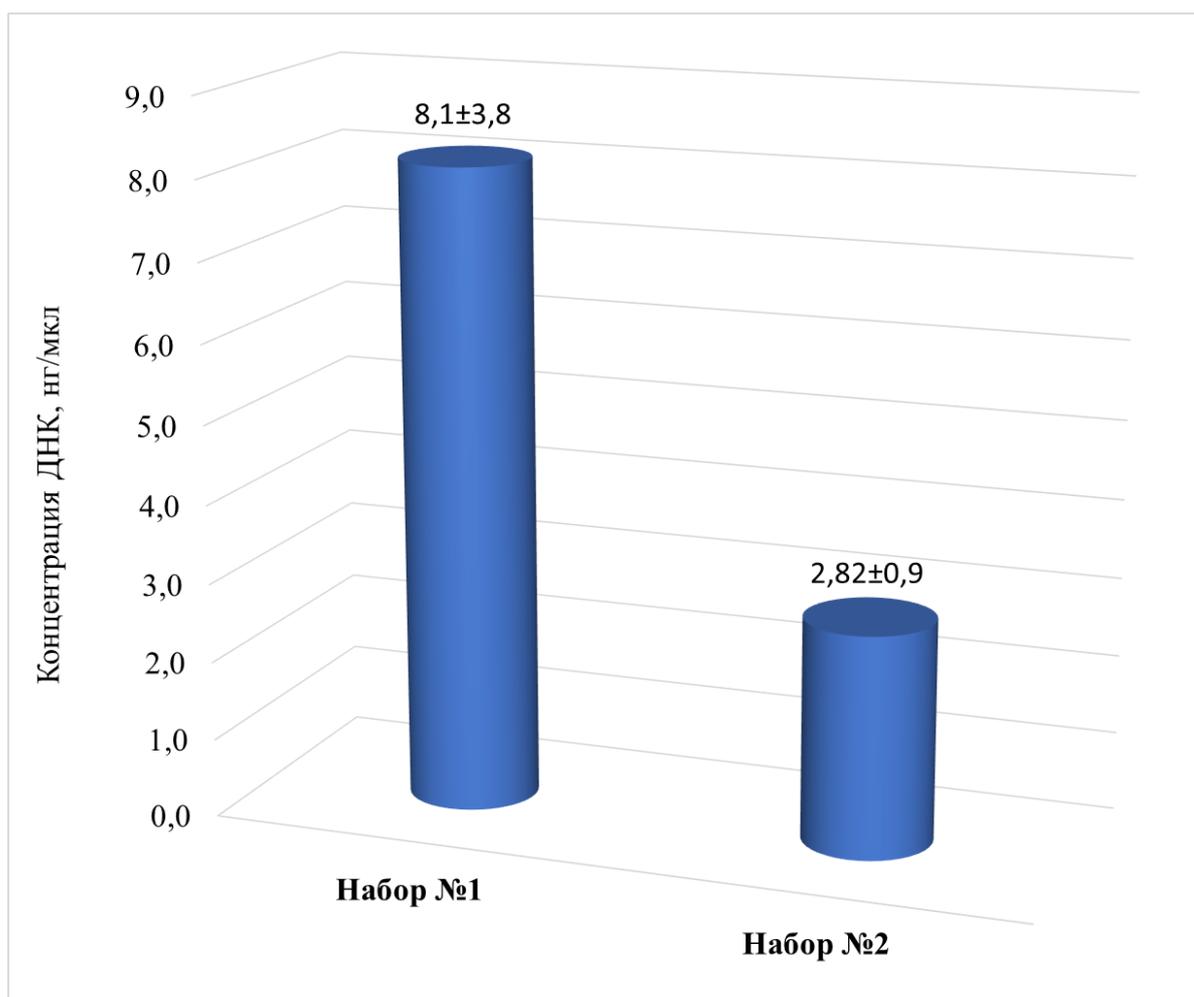


Рисунок 3.1 - Средние значения концентраций ДНК, выделенной исследуемыми наборами из сырого коровьего молока. В качестве погрешностей указаны стандартные отклонения

Для определения пригодности полученных препаратов ДНК для проведения полимеразной цепной реакции, нами была проведена амплификация фрагмента митохондриальной ДНК коровы длиной 311 пар оснований. Результаты амплификации приведены на рисунке 3.2.

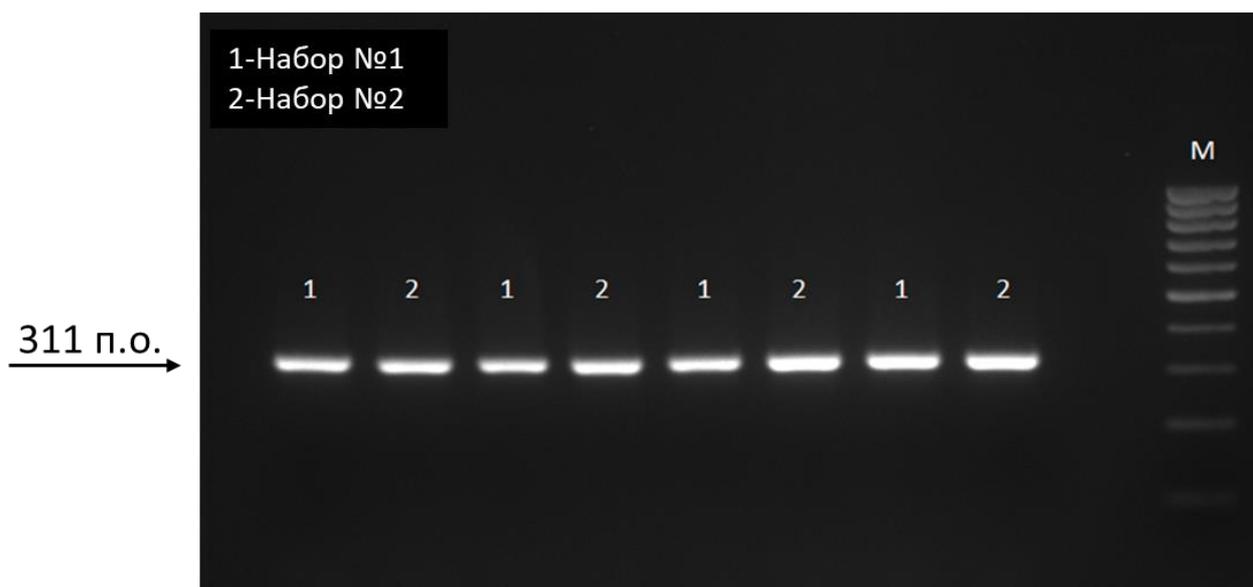


Рисунок 3.2 - Результаты типовой реакции ПЦР при использовании ДНК, выделенной из сырого молока набором №1 и набором №2. М – маркер длин ДНК 100-1000 п.н. (ЗАО «Синтол»)

Из приведённых данных видно, в обоих случаях были получены продукты теоретически ожидаемой длины в 311 пар оснований, соответствующие фрагменту митохондриального гена, кодирующего фермент цитохромоксидазу I коровы. Ингибирования реакции ПЦР при этом не наблюдалось. Это позволяет предположить, что использованные нами методы выделения ДНК позволяют эффективно избавляться от потенциально ингибирующих веществ, входящих в состав молока.

### 3.2 Сравнительная эффективность методов выделения ДНК из сухого молока

Независимо от амплифицируемой мишени, качество получаемых данных в основном зависит от используемого первичного метода выделения нуклеиновых кислот [103]. Получение интактных высокоочищенных препаратов ДНК с концентрацией нуклеиновых кислот, достаточной для проведения дальнейшего анализа, безусловно является одним из важнейших условий успешной ПЦР-диагностики. Поэтому в большинстве случаев необходим тщательный подход к выбору методов выделения ДНК из стартового материала. Особенно важным это

становится в случаях использования сложных многокомпонентных матриц, прошедших многоступенчатую термическую обработку, к которым и относится сухое молоко.

Основными концептуальными принципами, лежащими в основе выделения ДНК, являются следующие этапы: разрушение цитоплазматических и ядерных мембран (лизис матрицы); отделение ДНК от других компонентов лизата, таких как, например, белки, липиды, полисахариды, другие нуклеиновые кислоты; очистка и концентрирование ДНК [104]. Однако практическая реализация данных шагов может существенно отличаться у разных методов, что может приводить к различному качеству полученных препаратов ДНК и, как следствие, различной точности анализа (например, к появлению ложноотрицательных результатов из-за ингибирования ПЦР).

Необходимым условием успешного проведения ПЦР является предварительная оценка степени фрагментации молекул и, следовательно, их пригодности для использования в последующих ферментативных реакциях. Для этого был проведён электрофоретический анализ препаратов ДНК, полученных с использованием наборов №1 и №2, 1% в агарозном геле. Результаты аналитического электрофореза показали, что, несмотря на достаточно высокую степень фрагментации молекул ДНК, большая её часть остаётся высокомолекулярной, с длиной, достаточной для постановки ПЦР. При этом установлено, что степень деградации ДНК в полученных препаратах не зависит от используемого набора для выделения (рисунок 3.3).

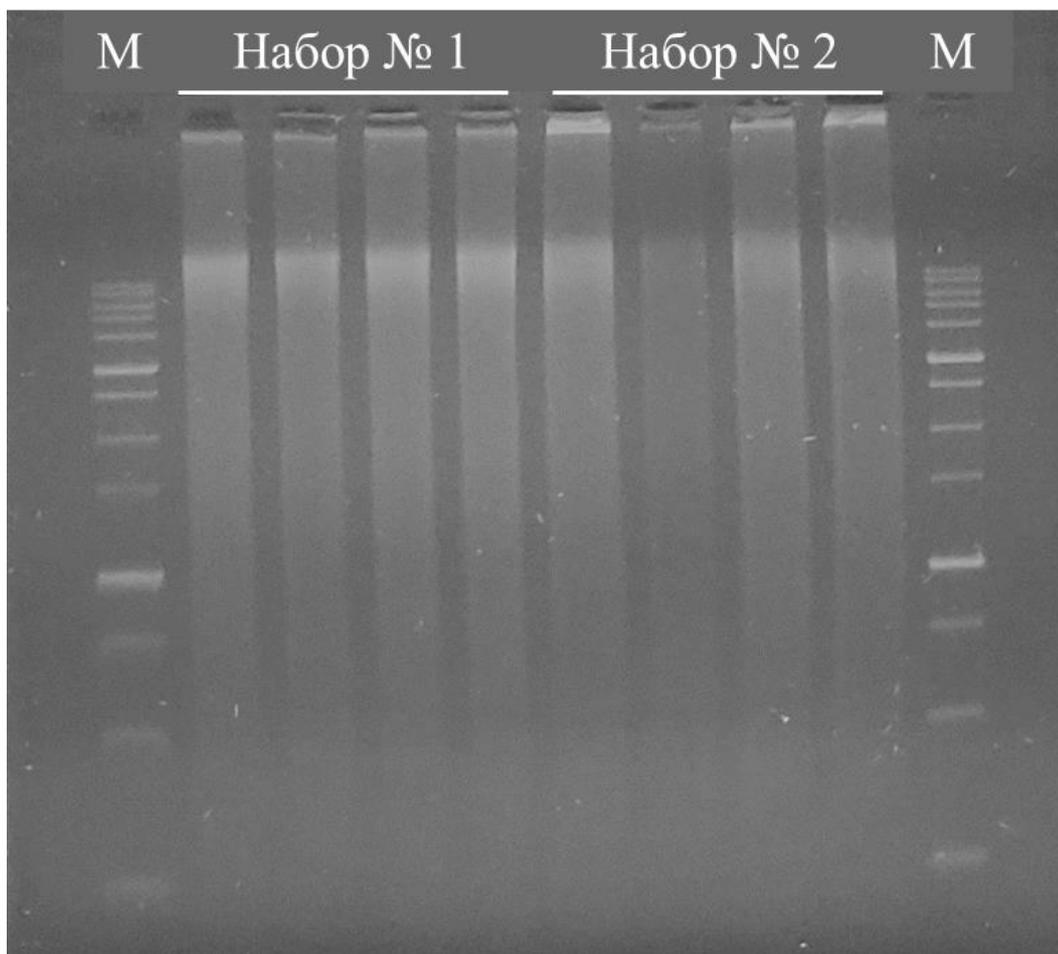


Рисунок 3.3 - Типовая электрофореграмма анализа уровня фрагментирования ДНК в препаратах, выделенных различными методами. М – маркер длин ДНК «1 kb DNA Ladder»

Результаты подчеркивают важность выбора правильного метода выделения ДНК, поскольку качество ДНК напрямую влияет на эффективность и точность ПЦР. При этом необходимо учитывать, что различные методы могут приводить к различной степени фрагментации и чистоты ДНК, что, в свою очередь, может влиять на результаты анализа. Например, использование методов, обеспечивающих более высокую степень очистки от белков и других загрязнителей, может значительно улучшить результаты ПЦР, уменьшая вероятность ингибирования реакции и повышения точности анализа.

На следующем этапе был проведён сравнительный количественный анализ эффективности выделения ДНК двумя указанными выше коммерческими наборами. С использованием каждого из наборов было выделено по 72 препарата

ДНК из навесок сухого молока массой 100 мг. Концентрация двуцепочечных молекул ДНК была специфически измерена методом флуориметрической детекции с использованием интеркалирующего красителя. Полученные данные приведены на рисунке 3.4 в виде средних значений концентрации выделенной ДНК  $\pm$  стандартное отклонение. Эти параметры для наборов №1 и №2 составили  $28,6 \pm 4,3$  нг/мкл и  $21,6 \pm 3,6$  нг/мкл соответственно. Исходя из полученных данных видно, что набор №1 обеспечивает более высокий выход ДНК по сравнению с набором №2. При этом разбросы, обусловленные обоими методами, схожи - относительные стандартные отклонения отличаются всего на 1,5% (15,1% и 16,6% соответственно).

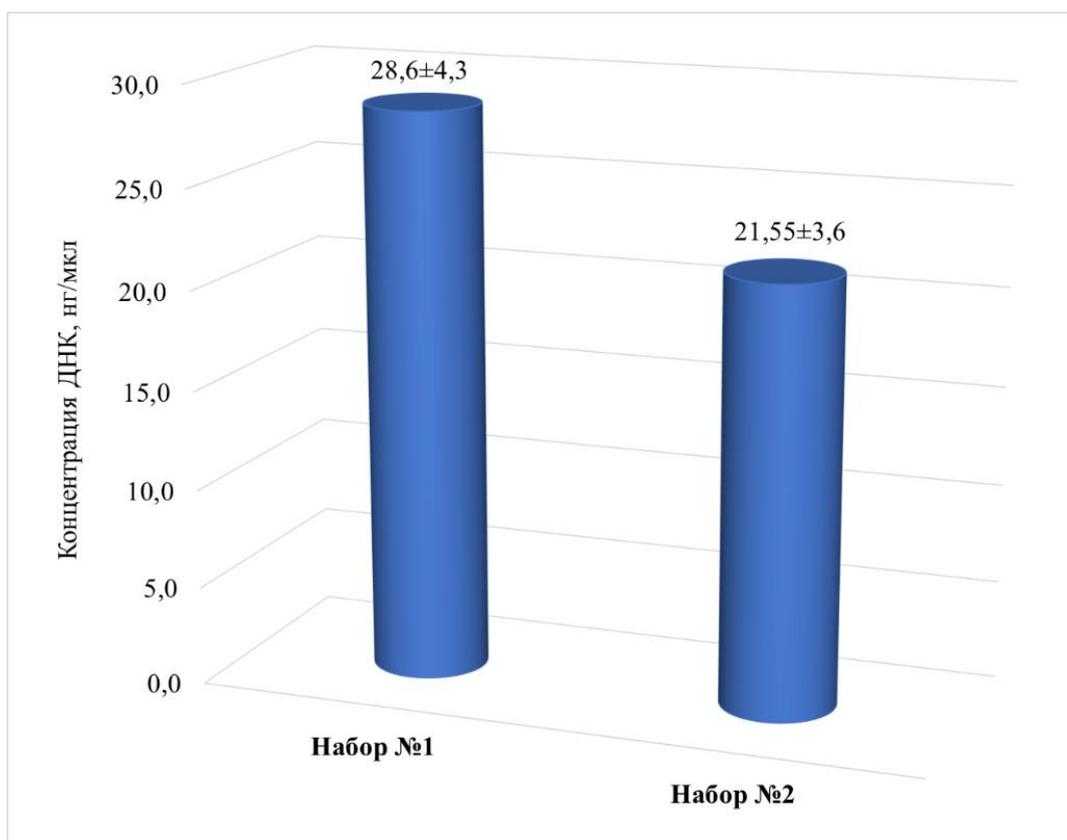


Рисунок 3.4 - Средние значения концентраций ДНК, выделенной исследуемыми наборами из сухого коровьего молока. В качестве погрешностей указаны стандартные отклонения. Разница средних значений достоверна с уровнем значимости  $p < 0.001$

Результаты анализа полученных наборов данных на их соответствие нормальному распределению, полученные с использованием ПО Statistica 12, показали, что сравниваемые выборки подчиняются нормальному распределению и однородны, что позволяет использовать параметрические методы дисперсионного анализа. В связи с необходимостью сравнения только двух выборок, был сделан выбор в пользу применения двухвыборочного t-теста с одинаковыми дисперсиями.

Полученное в результате значение  $p$ -value при заданном уровне значимости  $\alpha=0,001$  было очень мало ( $p=7,18 \times 10^{-20}$ ), что позволило отклонить нулевую гипотезу о равенстве исследуемых методов выделения ДНК. Следовательно, уровень выхода ДНК из сухого молока при использовании набора №1 статистически достоверно выше по сравнению с набором №2.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР), несмотря на свои многочисленные преимущества, демонстрирует высокую чувствительность к наличию в реакционной смеси различных ингибирующих веществ. Важным аспектом качества выделенной ДНК является не только её абсолютное или относительное содержание, но и степень её чистоты. Наличие примесей может существенно снизить эффективность амплификации и привести к ложноположительным или ложноотрицательным результатам. Поэтому для оценки уровня чистоты выделенной ДНК традиционно используются спектральные параметры, результаты которых представлены в таблице 3.1 в виде "среднее  $\pm$  стандартное отклонение".

Анализ данных из таблицы 3.1 показывает, что препараты ДНК, выделенные из сухого молока с использованием набора №2, значительно загрязнены различными полипептидами. Это подтверждается экстремально низким значением соотношения  $A_{260}/A_{280}$ , что указывает на присутствие белков и других загрязнителей, которые могут ингибировать ПЦР. В то же время, показатель соотношения  $260/230$  указывает на более качественную отмывку от хаотропных солей, используемых на этапе лизиса образцов, при применении

набора №2 по сравнению с набором №1. Это свидетельствует о том, что набор №2 эффективнее удаляет соли, что может положительно сказаться на последующих стадиях ПЦР.

Тем не менее, степень загрязнения полипептидами в наборе №2 указывает на необходимость дополнительных этапов очистки или модификации протокола для повышения чистоты ДНК. Это важно, поскольку присутствие полипептидов и других органических загрязнителей может значительно повлиять на чувствительность и специфичность ПЦР.

Таблица 3.1 - Показатели чистоты препаратов ДНК, получаемых при использовании различных методов выделения

Набор реагентов	A260, oe	A280, oe	260/280	260/230
Набор №1	1,32±0,29	0,61±0,18	2,28±0,46	0,16±0,05
Набор №2	7,67±1,96*	8,62±2,24*	0,89±0,03*	0,56±0,16*

\* различия между методами выделения ДНК статистически достоверны ( $p < 0,001$ ).

Известно, что молоко содержит в своём составе ряд веществ, которые могут при определённых условиях являться ингибиторами ферментативных реакций. Высокие концентрации белка и ионов кальция, наблюдающиеся в молоке, могут существенно снижать эффективность протекания ПЦР. Кроме того, ингибирование ПЦР может наблюдаться в результате действия протеаз молока, например, плазмина. Также есть основания предполагать, что в случае препаратов, полученных из сухого коровьего молока, препятствием для успешного протекания полимеразной цепной реакции может являться присутствие в нём лактоферрина, который традиционно считается ингибитором ПЦР при работе с образцами крови.

Для определения возможного ингибирующего действия компонентов молока, которые могли остаться в препаратах после ряда последовательных отмывок, осуществляемых в соответствии с протоколами производителей, нами было поставлено две серии ПЦР, в которых объём вносимой пробы ДНК

составлял 4% и 20% от конечного объёма реакционной смеси (1 мкл и 5 мкл соответственно), со всеми полученными в ходе исследования препаратами ДНК. Результаты амплификации фрагмента митохондриального гена COI длиной 311 пар нуклеотидов представлены на рисунке 3.5.

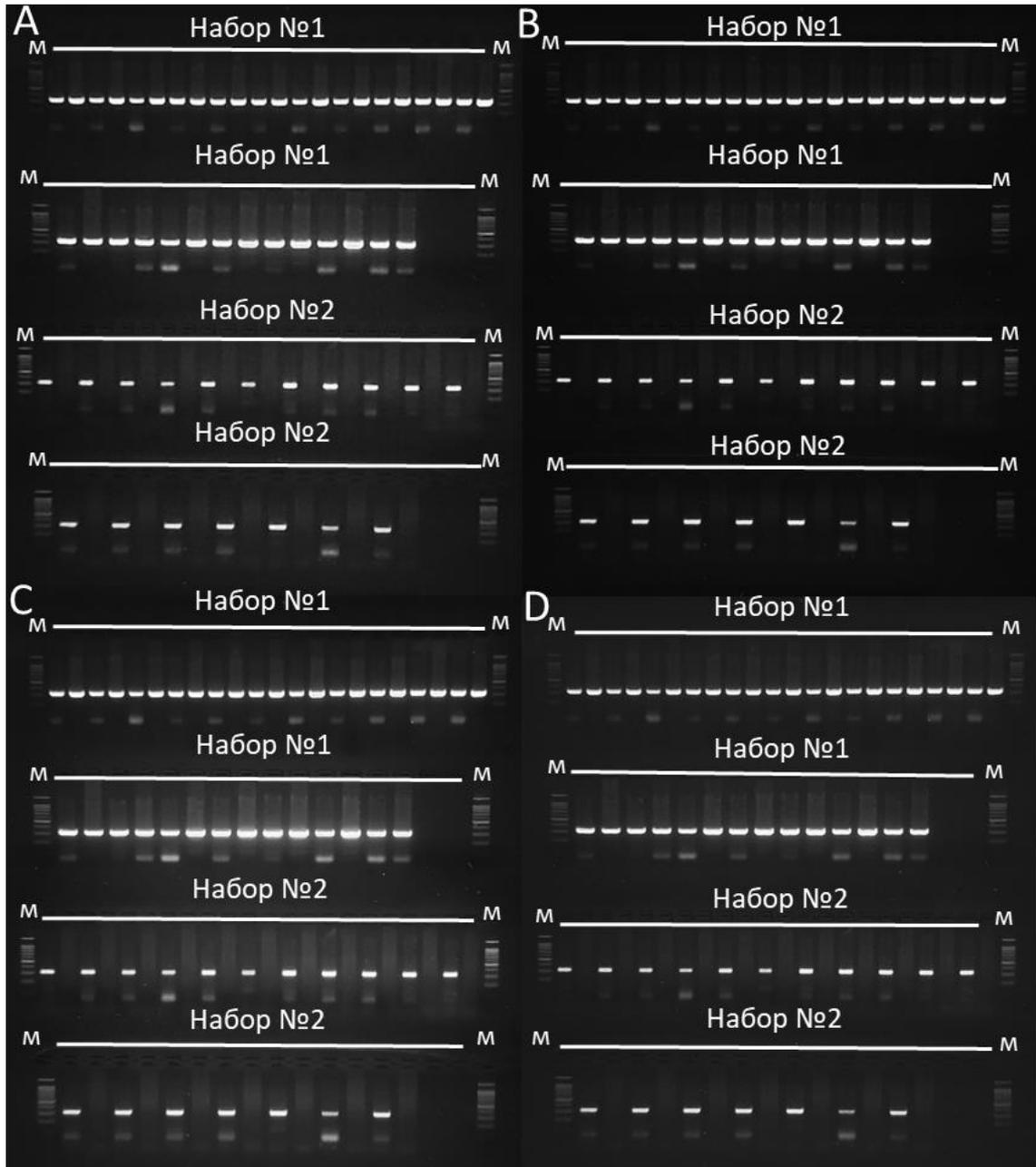


Рисунок 3.5 - Зависимость эффекта ингибирования ПЦР от объёма препаратов ДНК, выделенных из сухого молока различными методами. Результаты ПЦР сгруппированы парами «1 мкл / 5 мкл матрицы» слева направо для каждого из образцов. А – образцы 1-18; В – образцы 19-36; С – образцы 37-54; D – образцы

Как видно из приведённых данных, растворы ДНК, выделенной с использованием набора №2 при внесении в реакционную смесь для проведения полимеразной цепной реакции в объёме 20% от общего, полностью ингибировали протекание ПЦР в 100% случаев. При уменьшении относительного объёма образца до 4% (1 мкл), эффект ингибирования существенно снижался, что приводило к синтезу специфического ПЦР-продукта ожидаемой длины также в 100% случаев. Когда же в качестве матрицы использовали ДНК, выделенную набором №1, ингибирования ПЦР не наблюдалось ни в одной из серий эксперимента. Это свидетельствует в пользу того, что использование последнего набора обеспечивает более качественную отмывку от потенциально ингибирующих компонентов исходного материала, что исключает ингибирование протекания полимеразной цепной реакции.

#### ***Оценка влияния технологических процессов обработки молока-сырья на количество и качество препаратов ДНК***

Технологические процессы обработки молока-сырья существенно влияют на количество и качество препаратов ДНК, полученных из молока и продуктов его переработки. В частности, такие процедуры, как пастеризация и стерилизация, могут изменять структуру и целостность молекул ДНК, что может снижать их количество и затруднять последующую амплификацию. Высокотемпературная обработка способна разрушать клеточные мембраны и денатурировать белки, что приводит к фрагментации ДНК и снижению её концентрации. Более щадящие методы, такие как пастеризация при низких температурах, могут сохранять целостность ДНК, но не всегда гарантируют её полную чистоту. Присутствие ингибиторов, таких как белки и липиды, в конечных продуктах также может негативно влиять на качество ДНК-препаратов, усложняя процесс её выделения и снижая эффективность последующих молекулярно-генетических анализов. Таким образом, выбор и

оптимизация технологических процессов являются ключевыми факторами для обеспечения высокого качества и количества ДНК, необходимых для точной диагностики и исследований.

Следующим этапом исследований являлась оценка влияния технологических процессов обработки молока-сырья на количество и качество препаратов ДНК, полученных из молока и продуктов его переработки с использованием набора 1. На первом этапе был проведён сравнительный количественный анализ эффективности выделения ДНК из молока и продуктов его переработки, результаты представлены на рисунке 3.6.

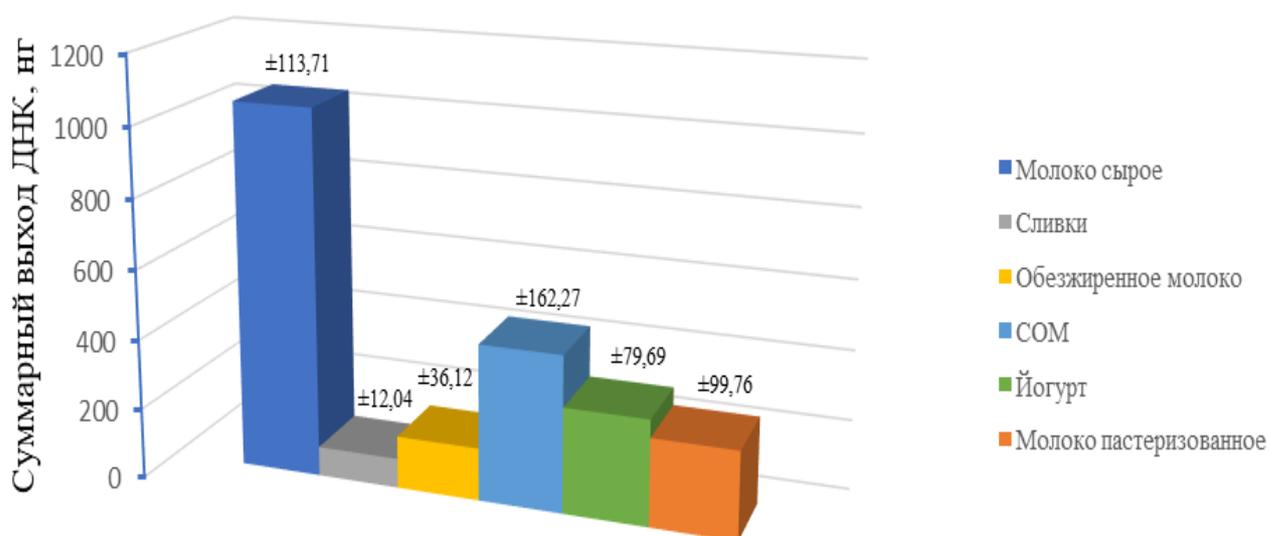


Рисунок 3.6 - Средние значения выхода ДНК, получаемой в 50 мкл элюирующего раствора. В качестве погрешностей указаны стандартные отклонения.

Для определения пригодности полученных препаратов ДНК для проведения полимеразной цепной реакции, была проведена амплификация фрагмента митохондриальной ДНК коровы длиной 311 пар оснований. Результаты амплификации приведены на рисунке 3.7.

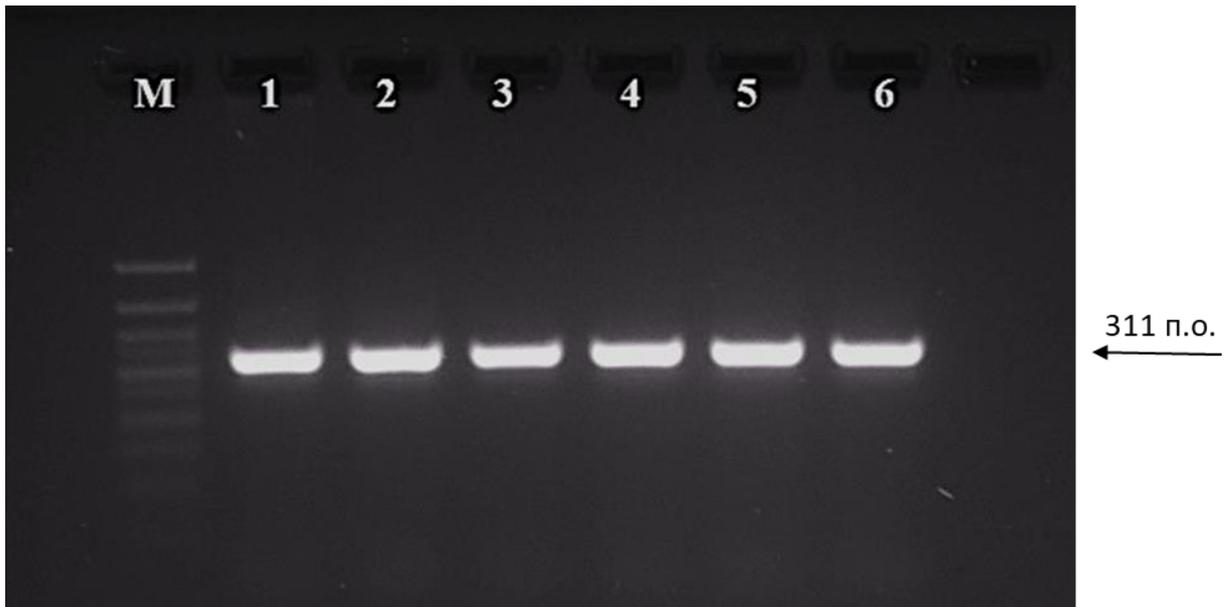


Рисунок 3.7 - Результаты ПЦР при использовании ДНК, выделенной из сырого молока (1), пастеризованного молока (2), обезжиренного молока (3), сливок (3), йогурта (5), СОМ (6). М – маркер длин ДНК 50-700 п.н. (ЗАО «Евроген»).

Из приведённых данных видно, во всех случаях были получены продукты теоретически ожидаемой длины в 311 пар оснований, соответствующие фрагменту митохондриального гена, кодирующего фермент цитохромоксидазу I коровы. Ингибирования реакции ПЦР при этом не наблюдалось.

### 3.3 Разработка олигонуклеотидных праймеров

Разработка олигонуклеотидных праймеров представляет собой важный этап в создании эффективных и специфичных тест-систем для молекулярно-генетических исследований. Праймеры являются короткими последовательностями ДНК, которые комплементарны целевым регионам генома вируса или другого патогена, и служат стартовыми точками для амплификации специфических участков ДНК в процессе полимеразной цепной реакции. При разработке праймеров учитываются несколько критически важных факторов, таких как их длина, содержание GC, температура плавления, а также

отсутствие самокомплементарных участков и вторичных структур. Эти параметры позволяют обеспечить высокую специфичность и эффективность амплификации, минимизируя возможность неспецифического связывания и амплификации ненужных фрагментов ДНК.

Поиск последовательностей, гомологичных провирусному геному BLV, проводили в базе данных GeneBank с использованием алгоритма BLAST. На их основе была проведена разработка трёх пар специфических праймеров. Разработка праймеров, обеспечивающих амплификацию фрагментов генома вируса BLV осуществлялась с помощью специализированного программного обеспечения Primer3 и Primer-BLAST. Расчёт термодинамических параметров праймеров выполнен с использованием пакета ПО Vector NTI 11.5. Сведения о праймерах приведены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 - Олигонуклеотиды, использованные в работе.

Название	Последовательность	T <sub>m</sub> , °C	Длина ампликона, п.о.
BVL_f	TTCCACAACGSCTGCCTC	55,9	294
BLV_r	GCGGTCCAGKTGATACGG	52,2	
BBPF	GCAAGTGTTGTTGGTTGGGG	55,1	119
BBPR	AATTGGAGTCGTTACGGGG	56,1	
PBPF	GTCCAATGACGTCACCATCG	53,3	111
PBPR	CAGGTGATACGGTGGGTCTC	51,5	

### 3.4 Определение эффективности протекания ПЦР-РВ

Эффективность ПЦР является одним из наиболее важных параметров, характеризующих реакцию. Её адекватная оценка позволяет существенно повысить правильность интерпретации результатов количественного ПЦР-

анализа. Эффективность реакции с использованием разработанных праймеров определяли с использованием метода последовательных разбавлений образца.

По полученным значениям  $C_t$  строили калибровочную прямую в координатах  $\log[N]/C_t$ . Следует отметить, что полученные результаты не всегда лежат на прямой, поскольку эффективность ПЦР для разных разбавлений может различаться.

На первом этапе в качестве образца использовали генно-инженерную конструкцию, состоящую из вектора рAL2-TA и клонированного в нём фрагмента генома вируса BLV длиной 294 пар оснований. Для его амплификации использовали пару праймеров BVL\_f/BLV\_r.

Для подтверждения соответствия фрагмента геному, проводилось секвенирование. Хроматограмма типового секвенирования визуализирует последовательность нуклеотидов, помогая идентифицировать конкретные нуклеотиды и выявлять возможные мутации или вариации в геномной последовательности. Хроматограмма типового секвенирования приведена на рисунке 3.8.

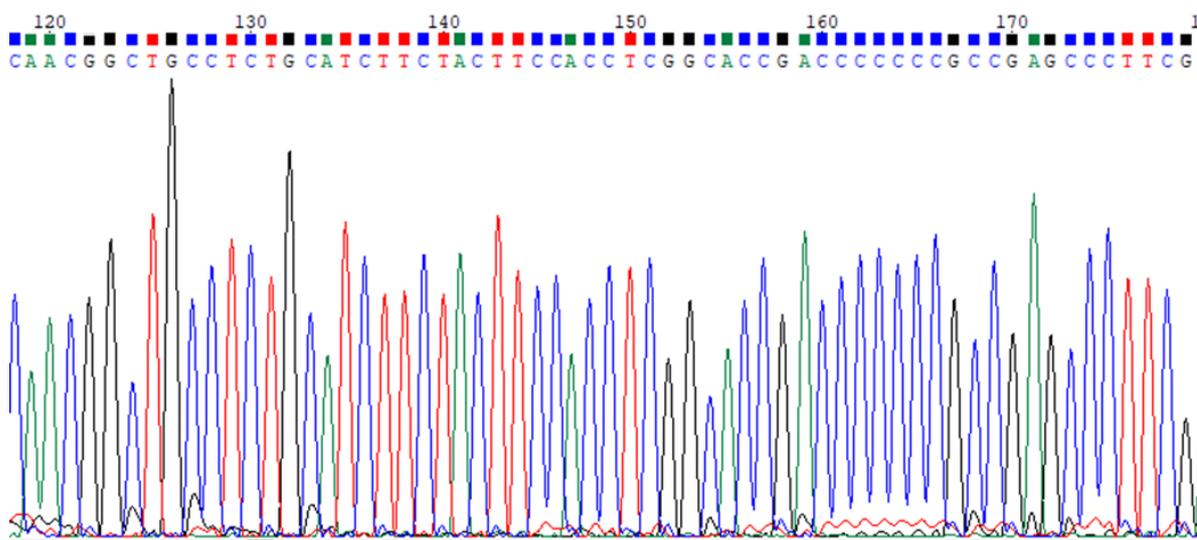


Рисунок 3.8 - Фрагмент хроматограммы, полученной при секвенировании рекомбинантного вектора с использованием пары стандартных праймеров M13.

Было использовано пять десятикратных разведений исходной матрицы

Остальные две пары праймеров были сконструированы с таким расчётом, чтобы амплифицировать области, находящиеся в пределах длинного фрагмента (ампликон ВВР – 111 пар оснований, ампликон РВР - 118 пар оснований). Генетическая карта фрагмента генома вируса BLV с указанием праймеров представлена на рисунке 3.9.

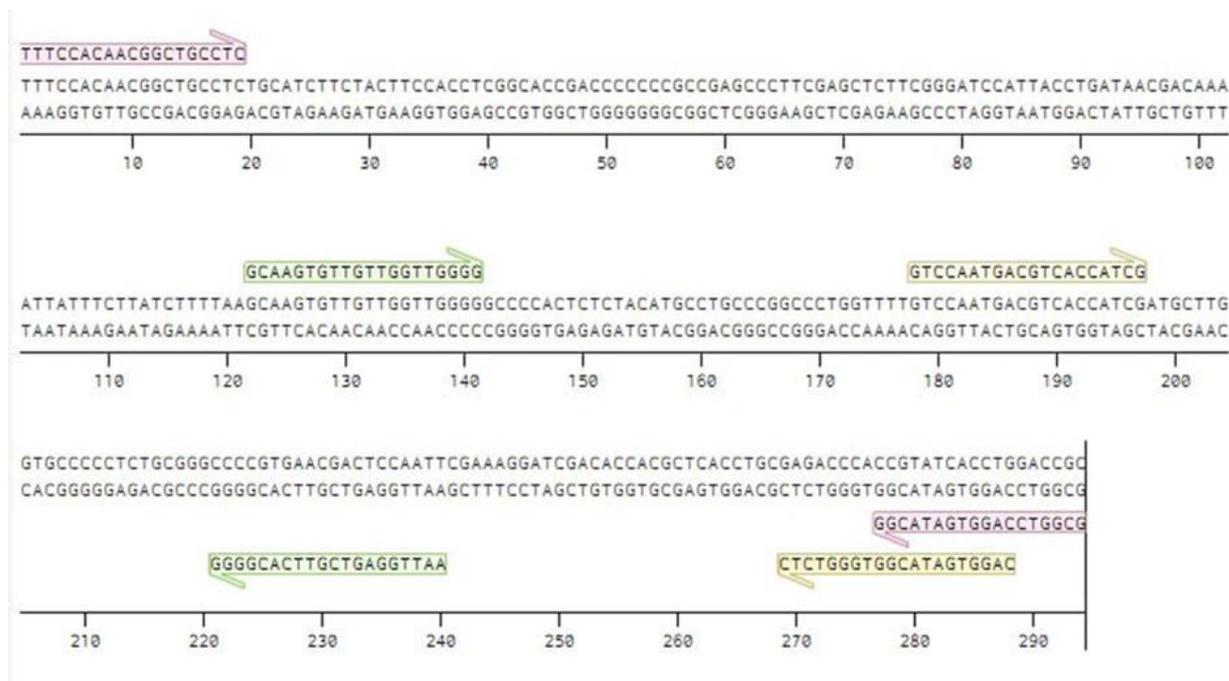


Рисунок 3.9 - Расположение сайтов связывания праймеров с провирусной ДНК вируса BLV (BLV – розовый, ВВР – зелёный, РВР – желтый)

При предварительном определении эффективности протекания полимеразной цепной реакции использовали метод ПЦР-РВ, основанный на присутствии в реакционной смеси интеркалирующего красителя SYBR Green I. Было использовано пять десятикратных разведений исходной матрицы. Стартовая концентрация плазмы составляла 0,1 нг/мкл, что соответствует числу 28074592.1 копий плазмиды и, соответственно, фрагмента вируса BLV, на микролитр. Разведения с шагом в 10 осуществлялись до нижнего порога концентрации в 0,00001 нг/мкл.

Было установлено, что амплификация клонированного в вектор фрагмента провирусной ДНК вируса BLV наблюдалась при использовании всех трёх пар праймеров в динамическом диапазоне от 0,1 нг/мкл до 0,1 пг/мкл ДНК (рисунок 3.10).

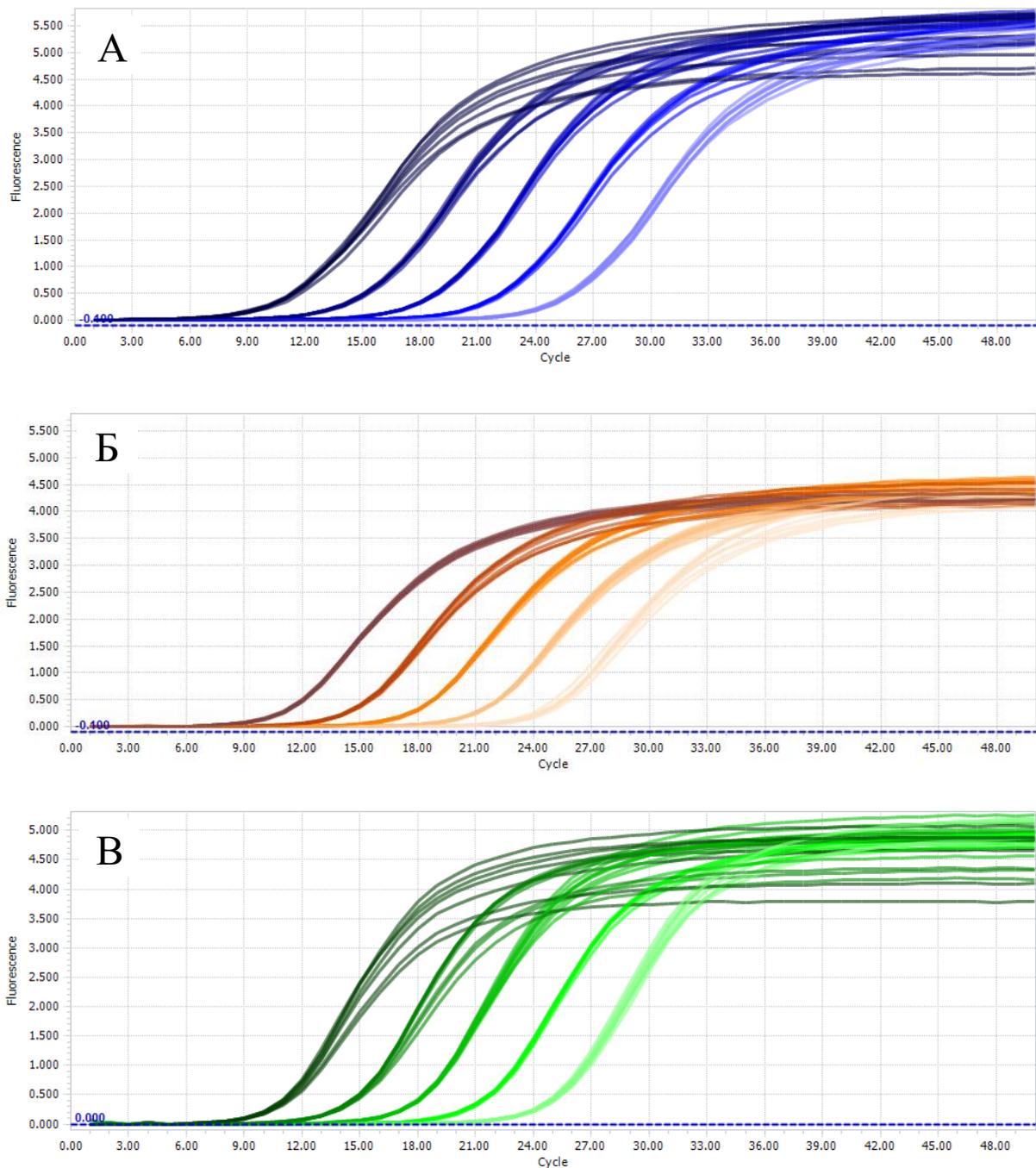


Рисунок 3.10 - Зависимость динамики накопления ПЦР-продуктов, определяемого по росту флуоресцентного сигнала, от степени разведения стандарта. А – праймеры BLV, Б – праймеры ВВР, В – праймеры РВР

Проведённый анализ данных выявил различную эффективность ПЦР при использовании различных пар праймеров. Сравнение трёх графиков зависимости порогового цикла от исходной концентрации матриц позволило установить, что наиболее эффективной является пара праймеров ВВР (рисунок 3.11).

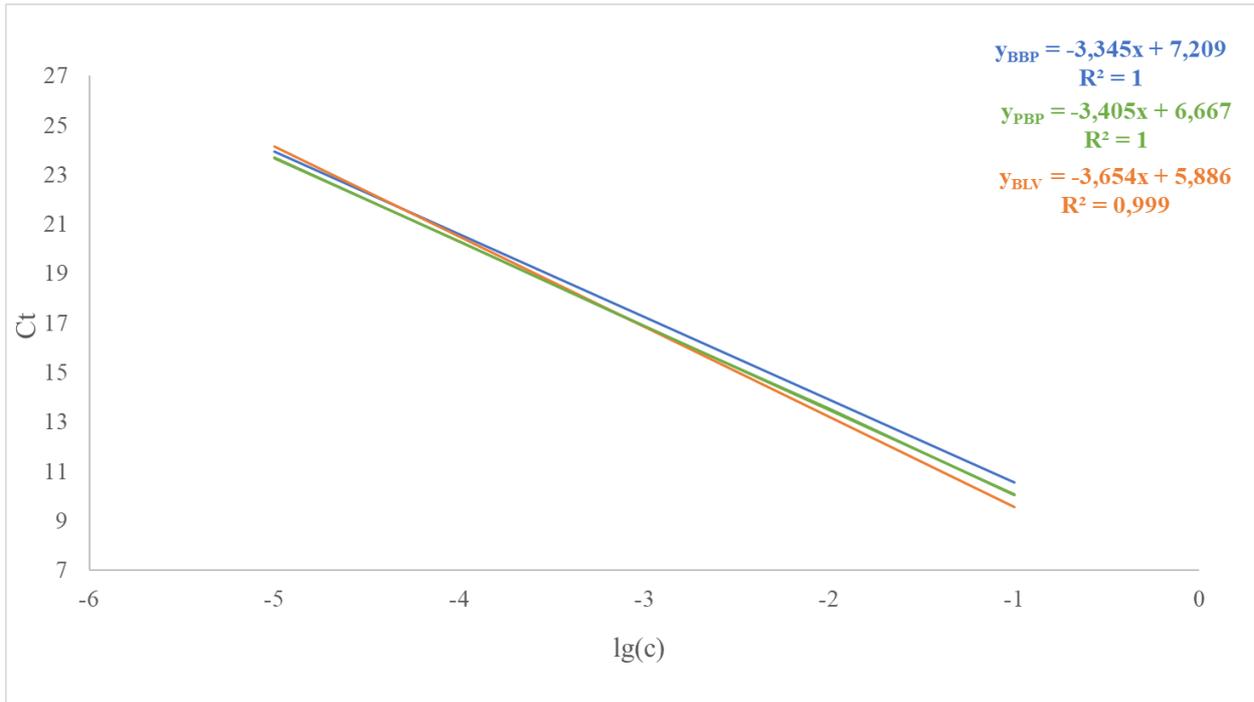


Рисунок 3.11 - Сравнение эффективности ПЦР при использовании различных пар праймеров

Таким образом, для дальнейших исследований была выбрана пара праймеров ВВР. Было установлено, что зависимость порогового цикла от исходной концентрации ДНК сохраняет линейность до предела в 0,0000001 нг/мкл, что соответствовало количеству молекул-мишеней в 28,07 копий/мкл. При этом эффективности реакции оставалась удовлетворительной ( $E = 1,73$ ), как видно из рисунка 3.12. Угловым коэффициентом прямой составил -4,2166.

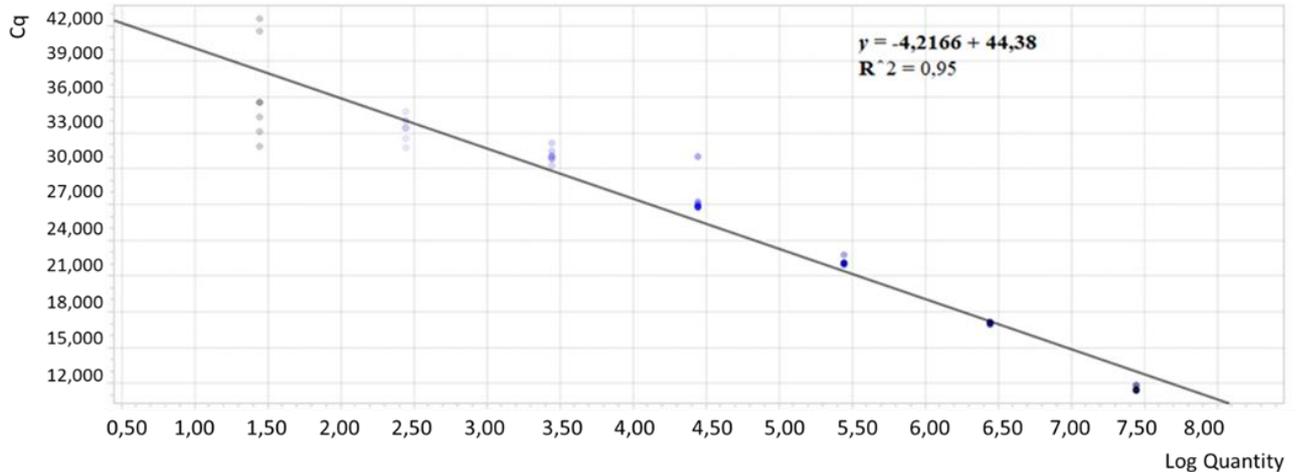


Рисунок 3.12 - График зависимости порогового цикла от исходной концентрации ДНК в реакционной смеси при использовании пары праймеров ВВР

Дальнейшее изучение пригодности системы разработанных праймеров проводили с использованием суммарной геномной ДНК, выделенной из молока коров с диагностированным энзоотическим лейкозом КРС. Было выполнено 5 серийных 10-ти кратных разведений геномной ДНК, полученных от двух больных животных с неизвестной вирусной нагрузкой (рисунок 3.13).

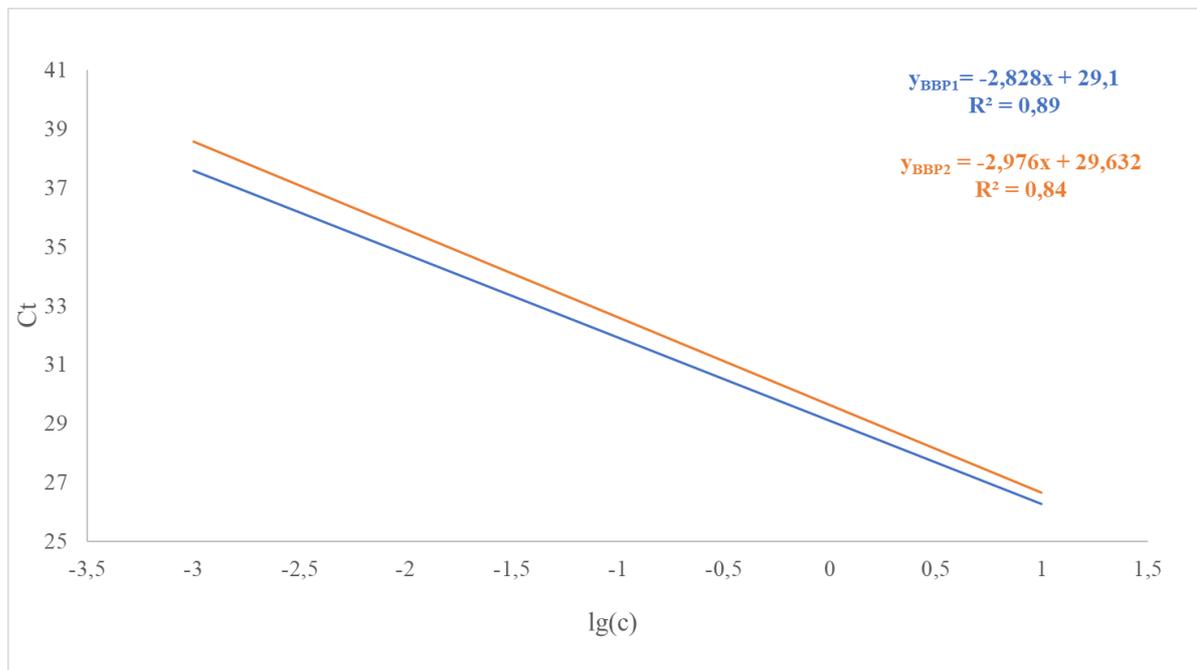


Рисунок 3.13 - Сравнение эффективности ПЦР при использовании пары праймеров ВВР на матрице геномной ДНК (ВВР1 – животное №1, ВВР2 – животное №2)

В результате установлено, что испытуемые праймеры позволяют проводить эффективную амплификацию фрагмента провирусной ДНК, интегрированной в геном хозяина, в диапазоне концентрации ДНК вирусоносителя от 10 нг/мкл до 0,001 нг/мкл, что приблизительно соответствует диапазону от 3090 до 0,309 копий генома *Bos taurus* на микролитр исследуемого раствора ДНК.

Кроме того, с использованием стандартной кривой, построенной на основе 8 десятикратных разведений плазмиды со вставкой фрагмента вируса BLV, было произведено определение количественного содержания провирусной ДНК в образцах суммарной ДНК, выделенной из цельной крови и сырого молока, полученных от двух больных животных. Содержание провирусной ДНК в препаратах, выделенных из цельной крови и молока животного №1, составило  $4,701 \times 10^4$  и  $1,931 \times 10^3$  соответственно, а от животного №2 –  $2,784 \times 10^4$  и  $9,328 \times 10^2$  соответственно. Исходя из предположения об уровне представленности провирусной ДНК в количестве одной копии на ядерный геном и содержания соматических клеток в молоке у обследованных животных №1 и №2 ( $279 \times 10^3$  клеток/мл и  $150 \times 10^3$  клеток/мл), провирусная ДНК содержалась в 17,31% и 15,547% соматических клеток молока исследованных животных соответственно.

### ***Проверка аналитической специфичности тест-системы***

Оценка аналитической специфичности набора олигонуклеотидных праймеров необходима для установления того, насколько точно и специфично праймеры обнаруживают целевую последовательность ДНК. Это важно для предотвращения ложноположительных или ложноотрицательных результатов в реакциях полимеразной цепной реакции (ПЦР) или других молекулярно-генетических методах диагностики.

Аналитическая специфичность позволяет убедиться в том, что праймеры привязываются исключительно к целевой последовательности, минимизируя вероятность ошибок и обеспечивая надежные результаты анализа.

Аналитическую специфичность набора олигонуклеотидных праймеров ВВР оценивали тестированием нуклеиновых кислот различных патогенных микроорганизмов и вирусов. Результаты анализов приведены на рисунках 3.14 – 3.16.

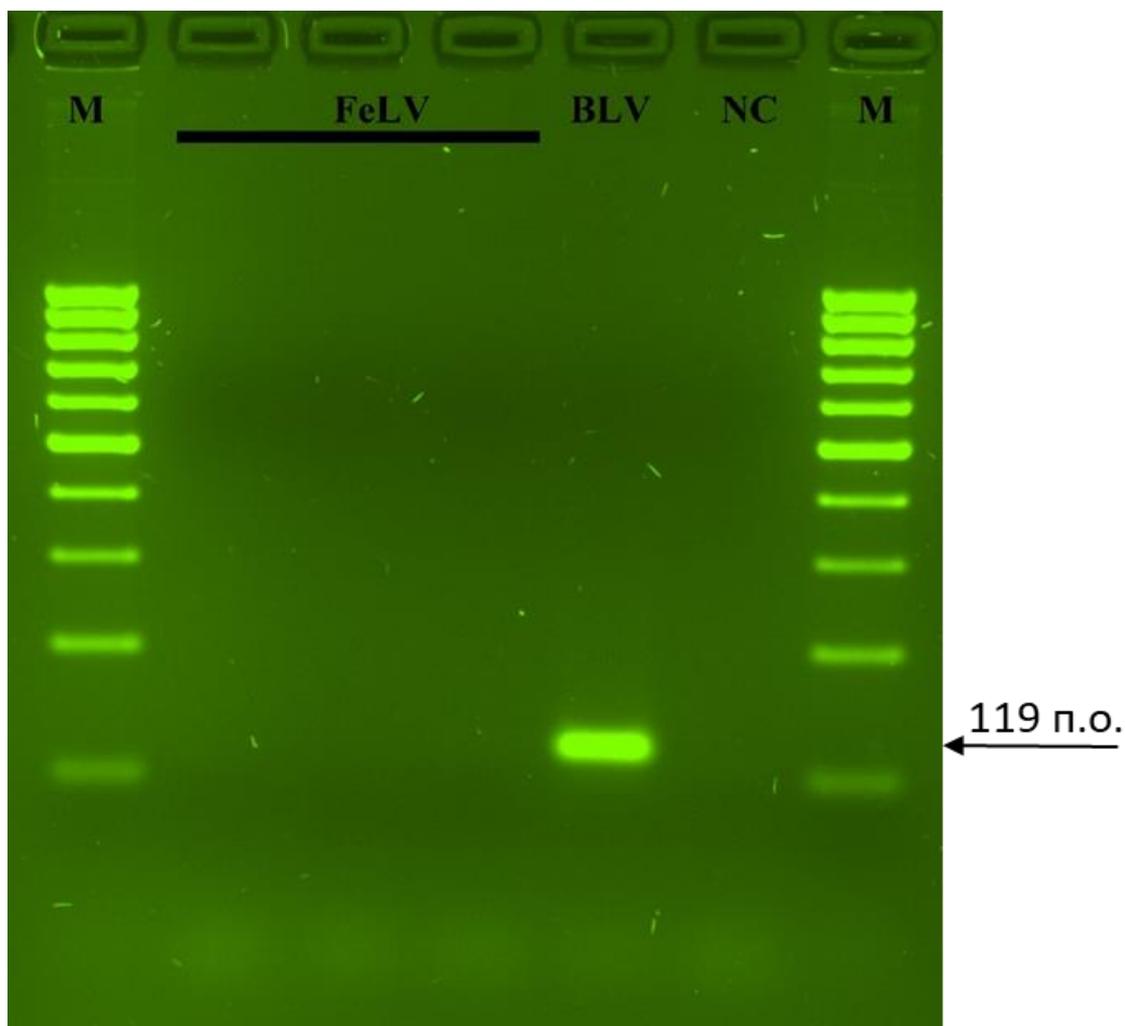


Рисунок 3.14 - Результаты типовой реакции амплификации генома вируса лейкоза кошек при помощи BLV-специфических праймеров (FeLV – *Feline leukemia virus*; BLV – *Bovine leukemia virus*; NC – отрицательный контроль; M – маркер длин ДНК 100 bp)

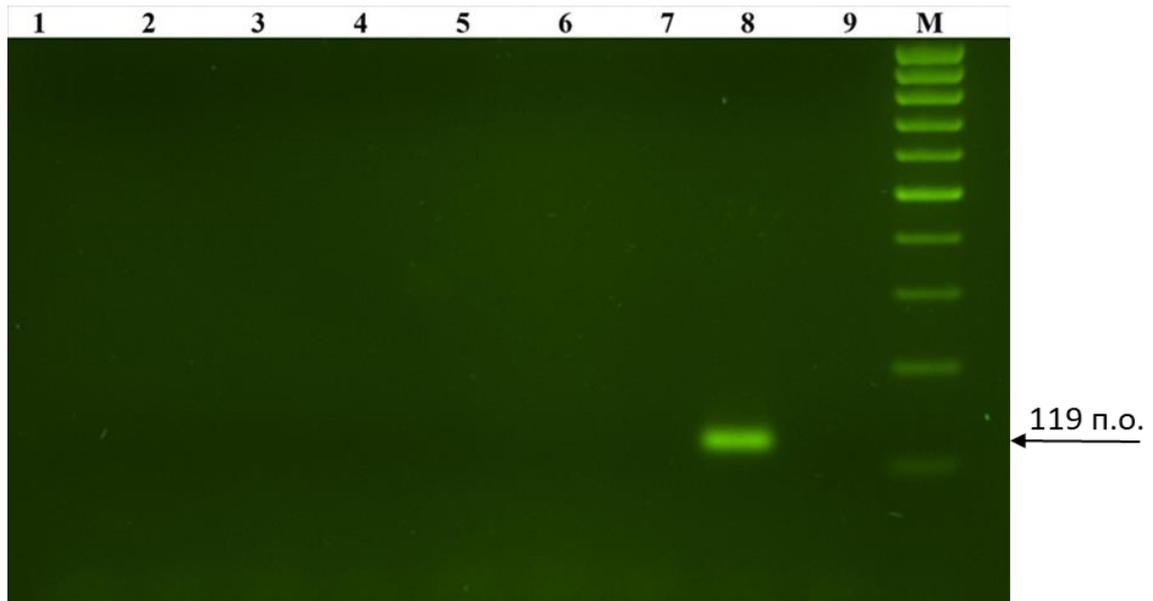


Рисунок 3.15 - Результаты типовой амплификации при оценке аналитической специфичности праймеров ВВР при использовании бактериальной ДНК (1 – *E.coli* 09:K99 и *E.coli* 0138:K88; 2 – *Salmonella dublin*; 3 – *Salmonella enteritidis*; 4 – *Salmonella typhimurium*; 5 – *Klebsiella pneumonia*; 6 – *Proteus vulgaris*; 7 – *Proteus mirabilis*; 8 – BLV; 9 – отрицательный контроль; М – маркер длин ДНК 100 bp)

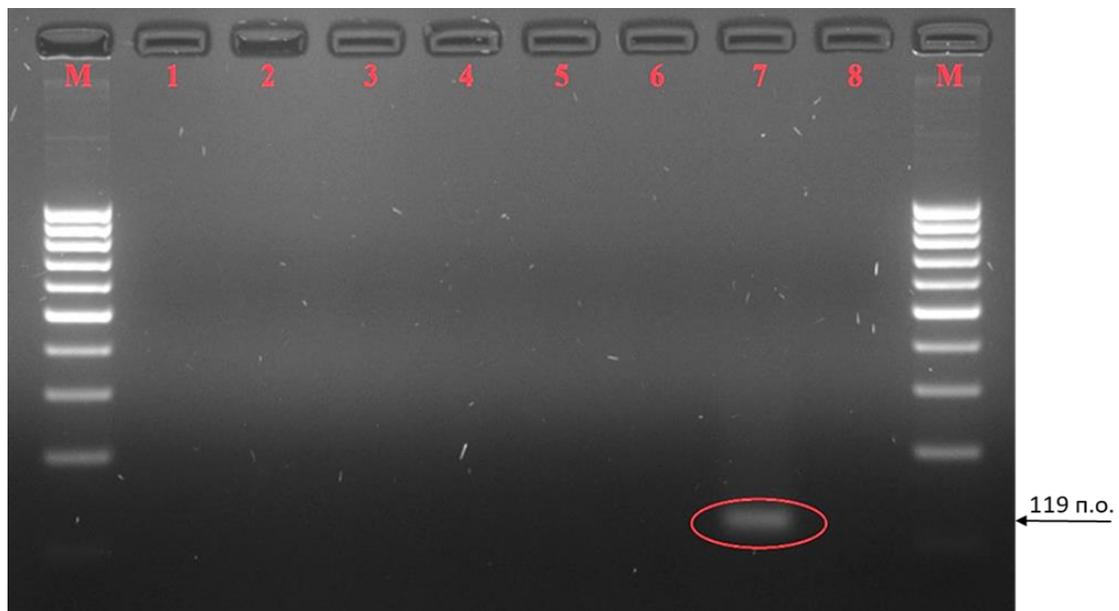


Рисунок 3.16 - Аналитическая специфичность тест-системы при проведении типовой ПЦР с использованием в качестве матрицы препаратов нуклеиновых кислот, полученных из культур различных вирусов КРС. Красным выделен специфический продукт длиной 119 пар оснований (1 – *Bovine alphaherpesvirus* 1; 2 – *Respirovirus bovis*; 3 – *Pestivirus bovis*; 4 – *Orthopneumovirus bovis*; 5 – *Bovine rotavirus A*; 6 – *Betacoronavirus* 1; 7 – BLV; 8 – отрицательный контроль; М – маркер длин ДНК 100 bp)

Проверка аналитической специфичности разрабатываемой ПЦР тест-системы показала отсутствие ложноположительных результатов при тестировании ДНК 14 различных видов патогенной микрофлоры крупного рогатого скота. Таким образом, отсутствие продуктов амплификации соответствующего размера говорит о 100%-ной специфичности разрабатываемой тест-системы для исследованной панели образцов.

### ***Определение сходимости и воспроизводимости определения значений пороговых циклов***

Для оценки сходимости результатов проводили две серии испытаний, включавших в себя амплификацию контрольных образцов в 10-кратных разведениях, а также препаратов ДНК, выделенных из образцов сырого молока и полученных из него молочных продуктов (пастеризованное молоко, обезжиренное молоко, сливки, йогурт, СОМ).

Для проверки сходимости построения стандартной кривой проводили ПЦР одним оператором, на одном приборе, в один день соответствующих положительных контрольных образцов соответствующих концентраций в 10 повторах. Оценку сходимости результатов ПЦР в системе с использованием интеркалирующего красителя для детекции продуктов ПЦР в режиме реального времени осуществляли на основании расчета коэффициента вариации значений  $C_t$  (V) для положительного контроля (образца, содержащего целевую ДНК). Результаты определения сходимости полученных значений пороговых циклов при использовании логарифмических разведений положительного контрольного образца приведены в таблице 3.3.

Таблица 3.3 - Оценка сходимости результатов построения стандартной кривой

Концентрация ДНК, нг/мкл	Количество копий на реакцию	$C_t$ , среднее	$C_t$ , среднеквадратическое отклонение	CV, %
0,1	28125729,8	10,47	0,19	1,8
0,01	2812572,98	14,37	0,48	3,4
0,001	281257,298	17,86	0,17	0,9
0,0001	28125,7298	22,49	0,33	1,4
0,00001	2812,57298	26,57	0,52	2,0
0,000001	281,257298	29,54	0,98	3,3
0,0000001	28,1257298	32,21	0,66	2,0
0,00000001	2,81257298	32,35	1,02	3,2

Из таблицы видно, что коэффициент вариации значений пороговых циклов, полученных для каждой точки, полученных в результате проведения ПЦР-РВ в 10 повторах, не превышает 5% на всём динамическом диапазоне измерения, что говорит о высоком уровне сходимости получаемых результатов. Кроме того, коэффициент вариации не превышает 3,2% даже на уровне LOD (аналитической чувствительности) метода (0,00000001 нг/мкл).

Для проверки сходимости результатов определения пороговых циклов в образцах сырого молока проводили методом ПЦР-РВ одним оператором, на одном приборе, в один день, проводили амплификацию препаратов ДНК в 18 повторах. ДНК была выделена из крови больного животного №4 с содержанием соматических клеток 124 тыс/мл, концентрация ДНК составляла с концентрацией  $8,16 \pm 0,93$  нг/мкл. Оценку сходимости результатов ПЦР в системе с использованием интеркалирующего красителя для детекции продуктов ПЦР в

режиме реального времени осуществляли на основании расчета коэффициента вариации значений  $C_t$  (V) для положительного образца, полученного от заведомо больного животного и содержащего целевую ДНК. Результаты определения сходимости полученных значений пороговых циклов приведены на рисунках 3.17, 3.18 и в таблице 3.4.

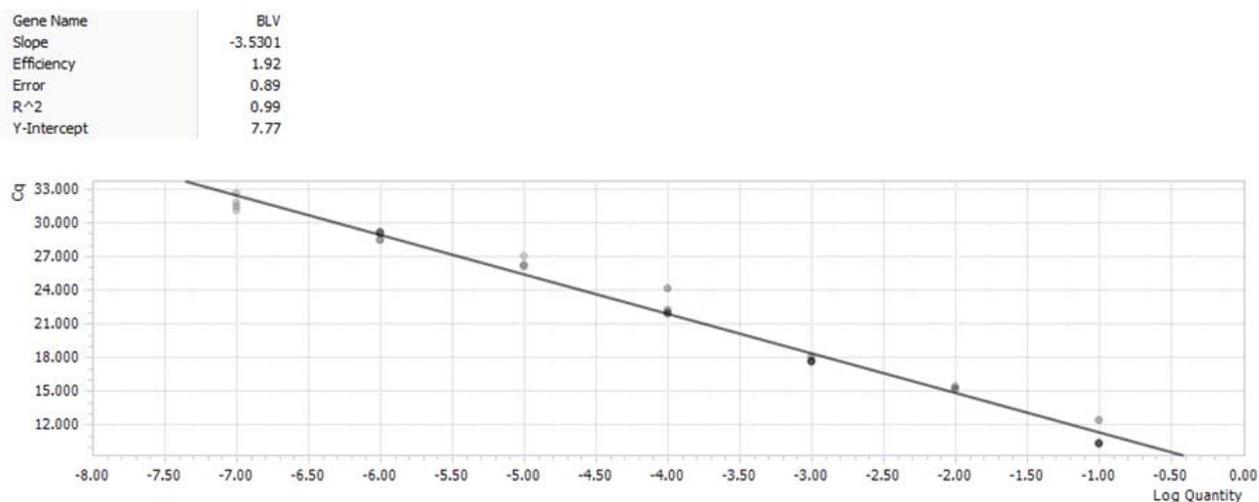


Рисунок 3.17 - Стандартная кривая определения провирусного генома BLV в сыром молоке

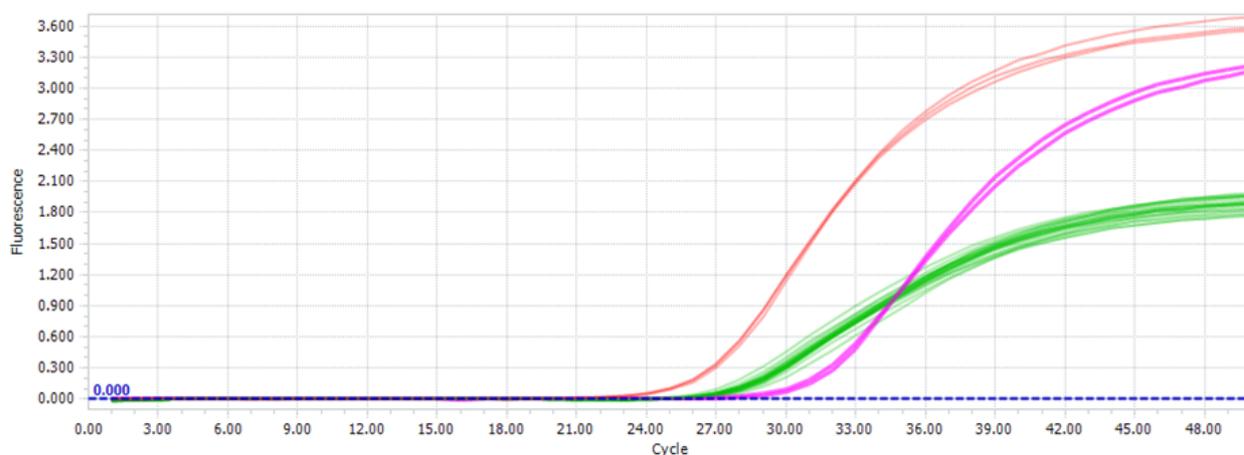


Рисунок 3.18 - Кривые амплификации провирусного генома BLV в сыром молоке

Таблица 3.4 - Оценка сходимости результатов определения провирусного генома BLV в сыром молоке

$C_t$	$C_t$ , среднее	$C_t$ , среднеквадратическое отклонение	CV, %
29,04	29.12	0,27	0,9
28,98			
28,81			
28,88			
29,89			
29,08			
29,29			
28,88			
29,05			
29,26			
28,94			
29,04			
29,30			
29,18			
29,48			
29,25			
28,72			
29,08			

Из таблицы видно, что коэффициент вариации значений пороговых циклов, полученных для каждой из повторностей, составляет 0,9% при допускаемом ГОСТ Р 70150-2022 «Тест-системы для диагностики болезней животных методом полимеразной цепной реакции. Общие требования и методы испытаний» значения не более 5%. Это позволяет сделать вывод о том, что разработанная нами тест-система позволяет производить определение значений пороговых циклов с высоким уровнем сходимости получаемых результатов при использовании в качестве мишени суммарной ДНК, выделенной из сырого молока.

Для проверки сходимости результатов определения пороговых циклов в клинических образцах обезжиренного молока проводили методом ПЦР-РВ одним оператором, на одном приборе, в один день, проводили амплификацию препаратов ДНК в 18 повторах. ДНК также была выделена из крови больного животного №4 с содержанием соматических клеток 124 тыс/мл, концентрация ДНК составляла с концентрацией  $8,16 \pm 0,93$  нг/мкл. Оценку сходимости результатов ПЦР в системе с использованием интеркалирующего красителя для детекции продуктов ПЦР в режиме реального времени осуществляли на основании расчета коэффициента вариации значений  $C_t$  (V) для положительного образца, полученного от заведомо больного животного и содержащего целевую ДНК. Результаты определения сходимости полученных значений пороговых циклов приведены на рисунках 3.19, 3.20 и в таблице 3.5.

Gene Name	BLV
Slope	-3.5301
Efficiency	1.92
Error	0.89
R <sup>2</sup>	0.99
Y-Intercept	7.77

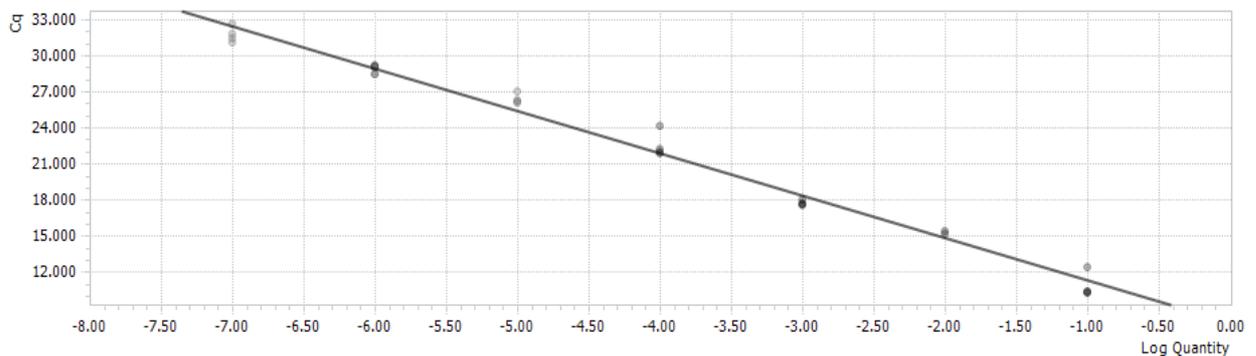


Рисунок 3.19 - Стандартная кривая определения провирусного генома BLV в обезжиренном молоке

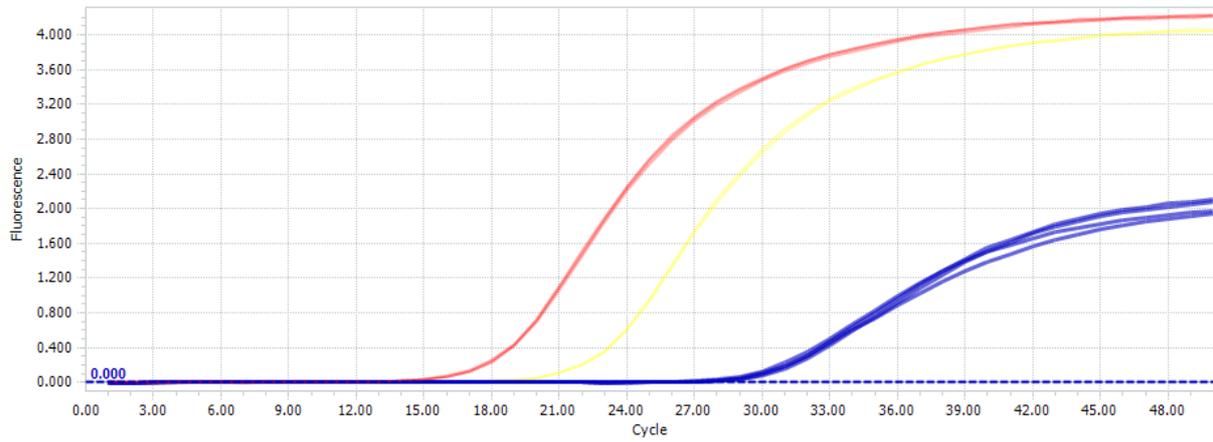


Рисунок 3.20 - Кривые амплификации провирусного генома BLV в обезжиренном молоке

Таблица 3.5 - Оценка сходимости результатов определения провирусного генома BLV в обезжиренном молоке

$C_t$	$C_t$ , среднее	$C_t$ , среднеквадратическое отклонение	CV, %
31,33	31,17	0,21	0,69
31,10			
31,20			
30,78			
31,38			
31,11			
31,24			
31,52			
30,82			
30,95			
31,54			
31,00			
31,06			
31,01			
31,22			
31,29			
31,41			
31,02			

Из данных таблицы 3.5 видно, что коэффициент вариации значений пороговых циклов, полученных для каждой из повторностей, составляет 0,69% при допуске ГОСТ Р 70150-2022 «Тест-системы для диагностики болезней животных методом полимеразной цепной реакции. Общие требования и методы испытаний» значения не более 5%. Это позволяет сделать вывод о том, что разработанная нами тест-система позволяет производить определение значений пороговых циклов с высоким уровнем сходимости получаемых результатов при выявлении провирусной ДНК вируса лейкоза КРС в обезжиренном молоке.

Для проверки сходимости результатов определения пороговых циклов в клинических образцах сухого молока проводили методом ПЦР-РВ одним оператором, на одном приборе, в один день, проводили амплификацию препаратов ДНК в 18 повторах. ДНК также была выделена из крови больного животного №4 с содержанием соматических клеток 124 тыс/мл, концентрация ДНК составляла с концентрацией  $8,16 \pm 0,93$  нг/мкл.

Оценку сходимости результатов ПЦР в системе с использованием интеркалирующего красителя для детекции продуктов ПЦР в режиме реального времени осуществляли на основании расчета коэффициента вариации значений  $C_t$  (V) для положительного образца, полученного от заведомо больного животного и содержащего целевую ДНК. Результаты определения сходимости полученных значений пороговых циклов приведены на рисунках 3.21, 3.22 и в таблице 3.6.

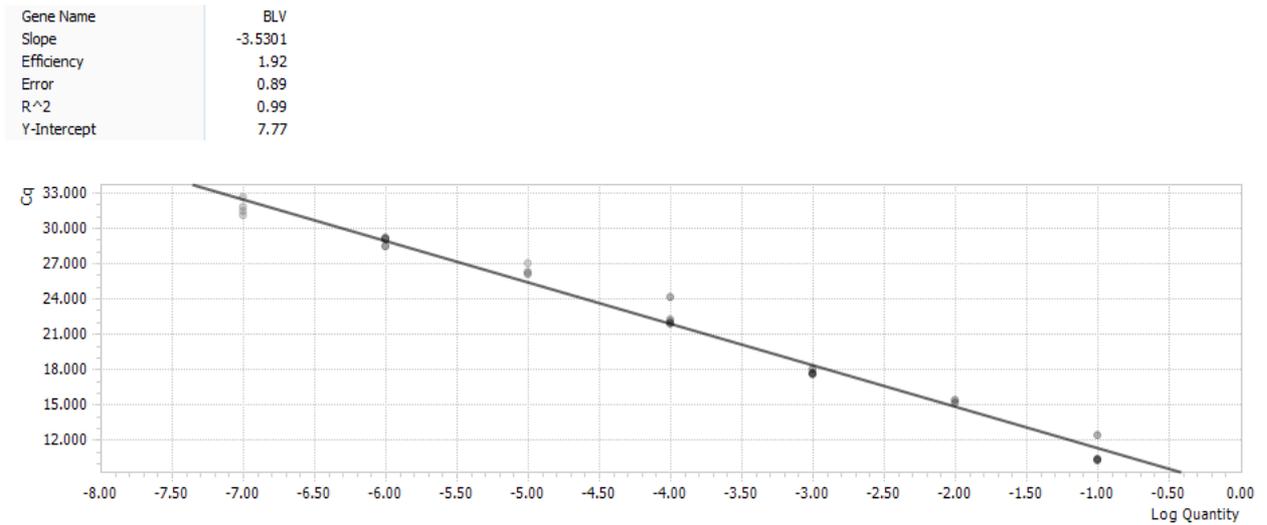


Рисунок 3.21 - Стандартная кривая определения провирусного генома BLV в сухом молоке

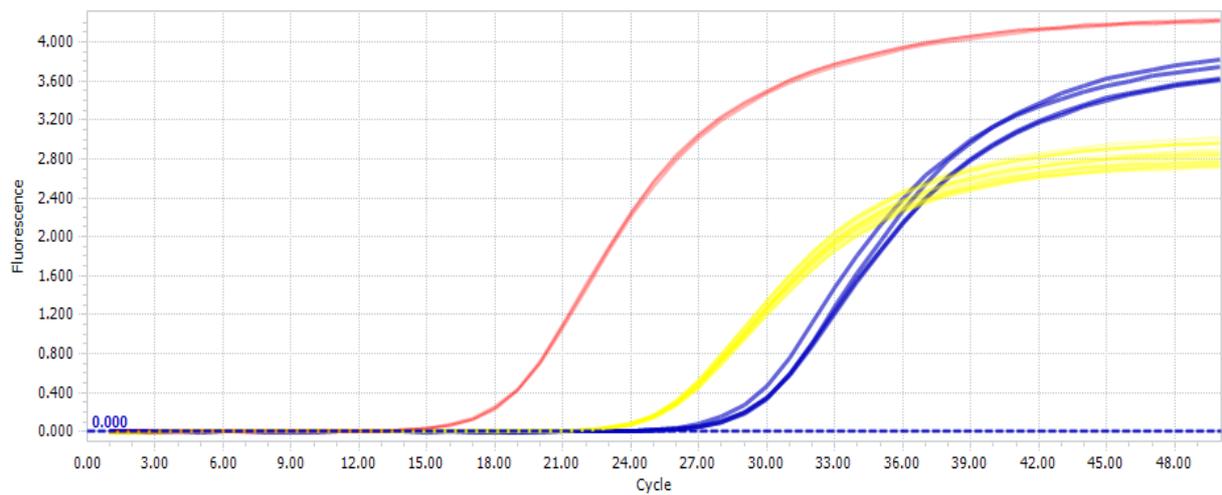


Рисунок 3.22 - Кривые амплификации провирусного генома BLV в сухом молоке

Таблица 3.6 - Оценка сходимости результатов определения провирусного генома BLV в сухом молоке

$C_t$	$C_t$ , среднее	$C_t$ , среднеквадратическое отклонение	CV, %
25.26	25,36	0,1	0,39
25.43			
25.33			
25.33			
25.51			
25.33			
25.22			
25.47			
25.25			
25.38			
25.37			
25.37			
25.46			
25.54			
25.22			
25.21			
25.34			
25.33			

Из таблицы 3.6 видно, что коэффициент вариации значений пороговых циклов, полученных для каждой из повторностей, составляет 0,39% при допуске ГОСТ Р 70150-2022 «Тест-системы для диагностики болезней животных методом полимеразной цепной реакции. Общие требования и методы испытаний» значения не более 5%. Это позволяет сделать вывод о том, что разработанная нами тест-система позволяет производить определение значений пороговых циклов с высоким уровнем сходимости получаемых результатов при использовании в качестве мишени суммарной ДНК, выделенной из сухого молока.

Определение сходимости результатов, получаемых с использованием разрабатываемой тест-системы, осуществляли в соответствии с ГОСТ Р 70150-2022 «Тест-системы для диагностики болезней животных методом полимеразной цепной реакции. Общие требования и методы испытаний» на рисунках 3.23, 3.24 и в таблице 3.7.

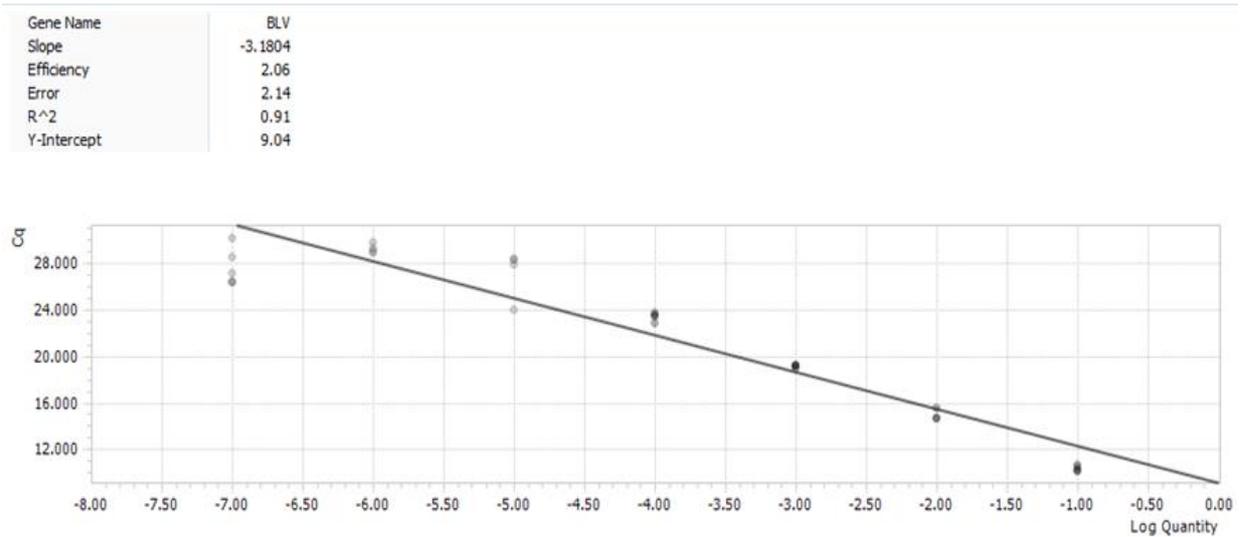


Рисунок 3.23 - Стандартная кривая определения провирусного генома BLV в пастеризованном молоке

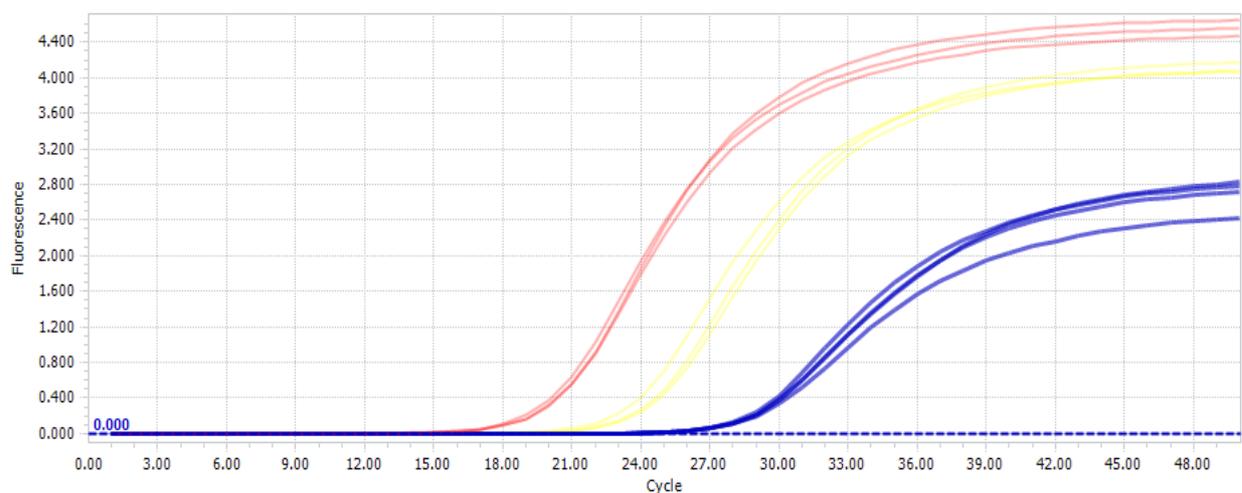


Рисунок 3.24 - Кривые амплификации провирусного генома BLV в пастеризованном молоке

Таблица 3.7 - Оценка сходимости результатов определения провирусного генома BLV в пастеризованном молоке

Ct	Ct, среднее	Ct, среднеквадратическое отклонение	CV, %
29,44	28,76	0,81	2,82
28,71			
28,41			
28,18			
28,86			
27,76			
28,35			
30,01			
29,02			
29,71			
26,94			
28,83			
28,80			
29,31			
27,89			
29,97			
27,94			
29,58			

Из таблицы видно, что коэффициент вариации значений пороговых циклов, полученных для анализируемого в 18 повторах образца пастеризованного молока, составляет 2,82% при допустимом значении не более 5%, что говорит о сходимости получаемых результатов.

Определение сходимости результатов, получаемых с использованием разрабатываемой тест-системы, осуществляли в соответствии с ГОСТ Р 70150-2022 «Тест-системы для диагностики болезней животных методом

полимеразной цепной реакции. Общие требования и методы испытаний» на рисунках 3.25, 3.26 и в таблице 3.8.

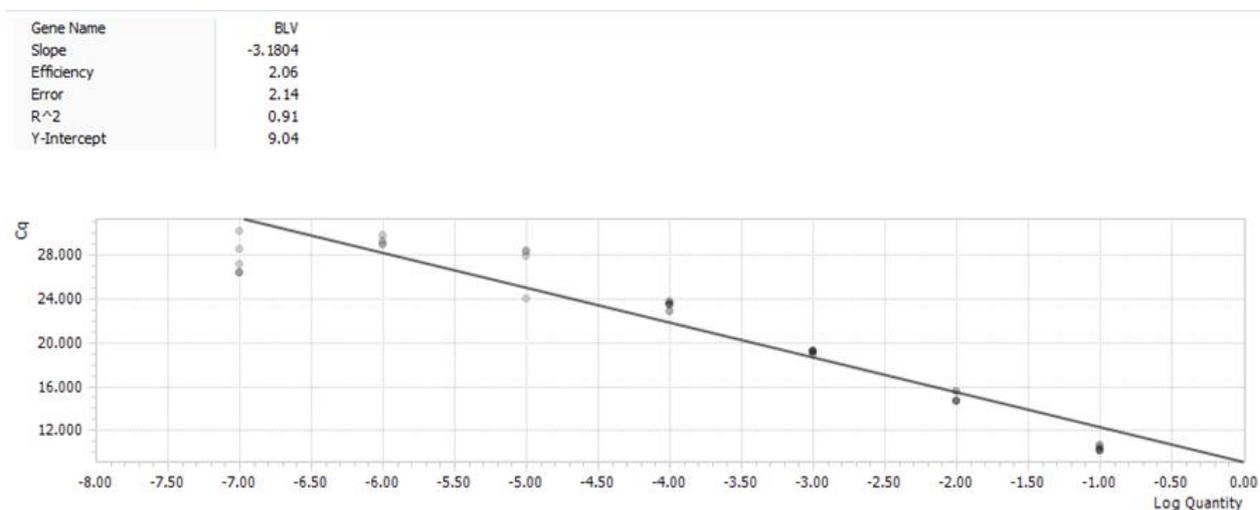


Рисунок 3.25 - Стандартная кривая определения провирусного генома BLV в сливках

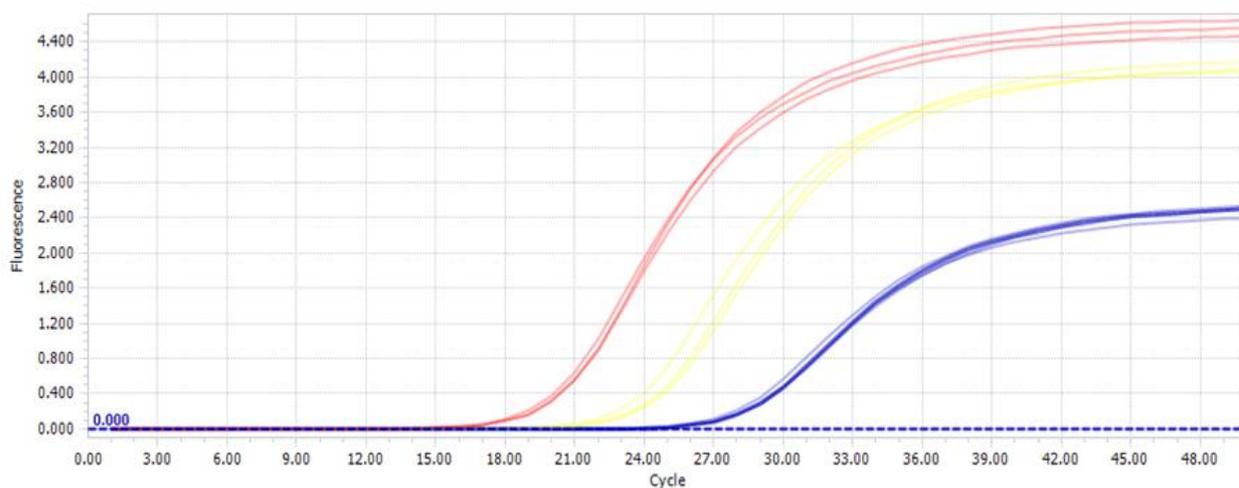


Рисунок 3.26 - Кривые амплификации провирусного генома BLV в сливках

Таблица 3.8 - Оценка сходимости результатов определения провирусного генома BLV в сливках

Ct	Ct, среднее	Ct, среднеквадратическое отклонение	CV, %
30,02	28,62	0,98	3,41
29,33			
29,93			
28,84			
28,63			
25,93			
27,19			
27,91			
28,40			
28,32			
28,33			
28,14			
29,44			
29,71			
28,36			
29,48			
28,69			
28,55			

Из таблицы видно, что коэффициент вариации значений пороговых циклов, полученных для анализируемого в 18 повторях образца сливок, составляет 3,41%, что говорит о сходимости получаемых результатов.

Определение сходимости результатов, получаемых с использованием разрабатываемой тест-системы, осуществляли в соответствии с ГОСТ Р 70150-2022 «Тест-системы для диагностики болезней животных методом

полимеразной цепной реакции. Общие требования и методы испытаний» на рисунках 3.27, 3.28 и в таблице 3.9.

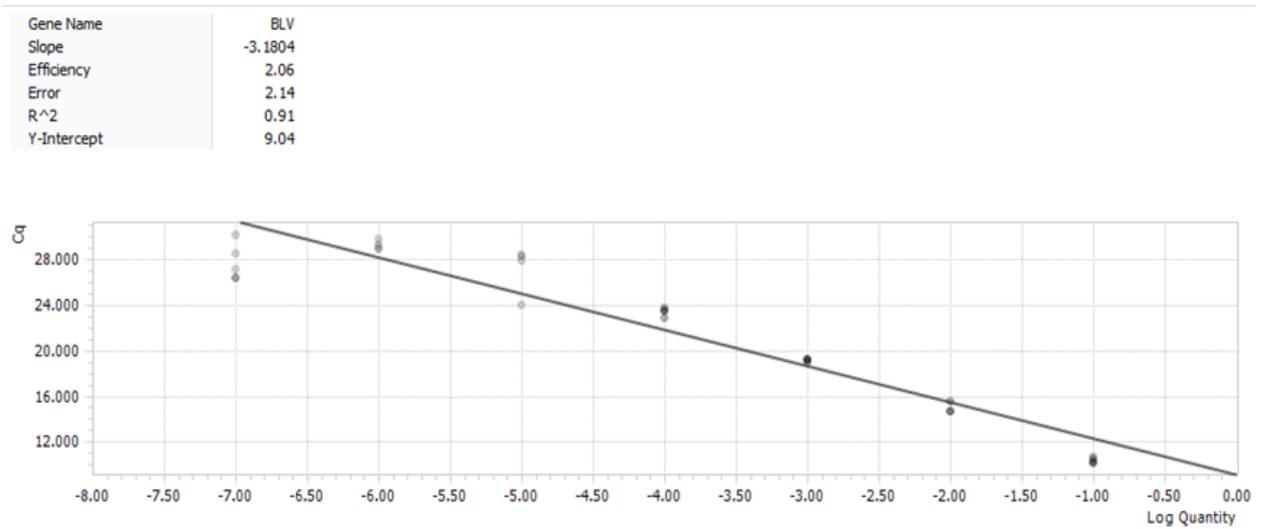


Рисунок 3.27 - Стандартная кривая определения провирусного генома BLV

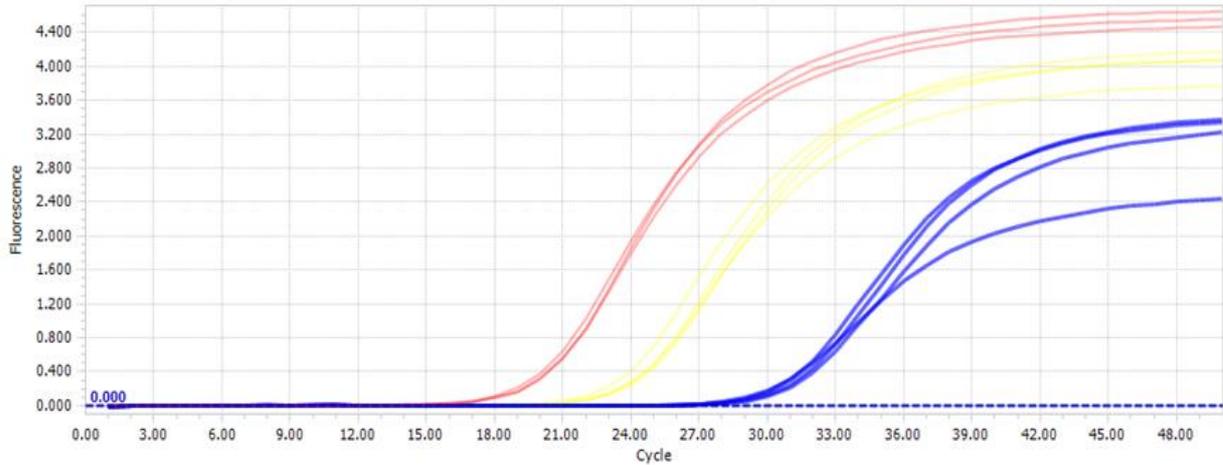


Рисунок 3.28 - Кривые амплификации провирусного генома BLV в йогурте

Таблица 3.9 - Оценка сходимости результатов определения провирусного генома BLV в йогурте

Ct	Ct, среднее	Ct, среднеквадратическое отклонение	CV, %
30,14	30,38	0,57	1,89
30,30			
30,43			
31,15			
30,70			
30,23			
29,29			
30,35			
29,10			
29,63			
30,86			
29,93			
30,53			
30,48			
30,76			
31,16			
30,70			
31,04			

Из таблицы видно, что коэффициент вариации значений пороговых циклов, полученных для анализируемого в 18 повторах образца йогурта, составляет 1,89% при допустимом значении не более 5%, что говорит о сходимости получаемых результатов.

Таким образом, установлено, что метрологические характеристики, описывающие сходимость результатов определения пороговых циклов при использовании разработанного нами набора праймеров, отвечают требованиям,

предъявляемым нормативной документацией к тест-системам для диагностики заболеваний животных с помощью полимеразной цепной реакции.

Воспроизводимость результатов измерений является одной из важнейших характеристик тест-системы, определяющих её пригодность к широкому использованию в диагностических лабораториях, оснащённых аналитическим оборудованием различных моделей и укомплектованных персоналом различного уровня компетенции. Таким образом, перед нами стояла цель продемонстрировать согласованность результатов между повторами образца в различных условиях (оператор и лабораторное оборудование).

Оценку воспроизводимости результатов ПЦР с использованием интеркалирующих красителей для детекции продуктов ПЦР в режиме реального времени осуществляли на основании расчета коэффициента вариации значений  $C_t$  (V). Результаты определения уровня воспроизводимости определения значений пороговых циклов при идентификации провирусной ДНК в сыром молоке методом ПЦР-РВ приведены на рисунках 3.29, 3.30 и в таблице 3.10.

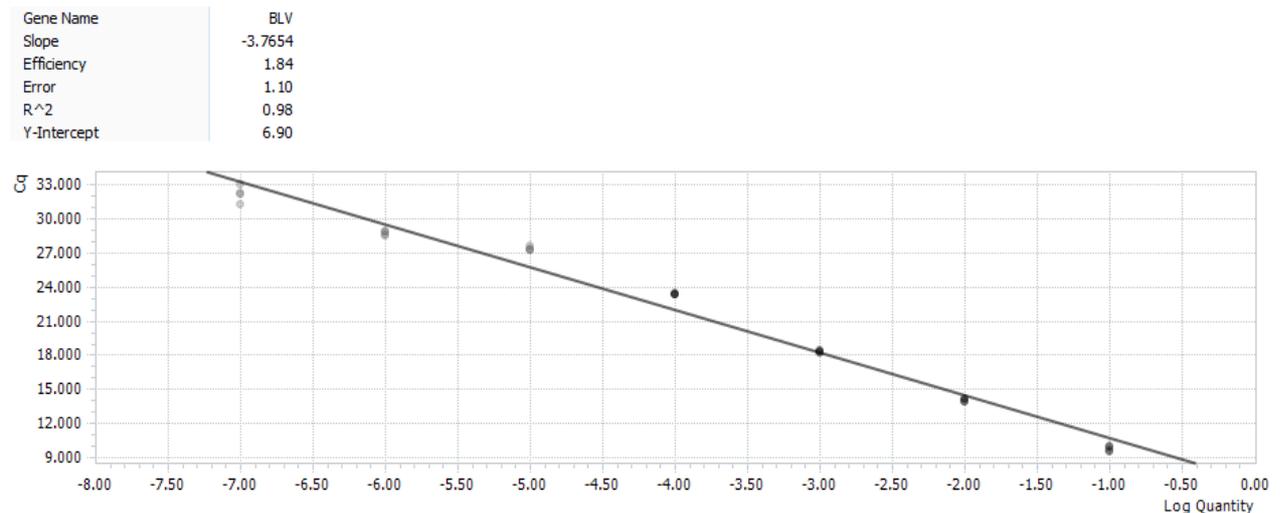


Рисунок 3.29 - Стандартная кривая определения провирусного генома BLV в сыром молоке

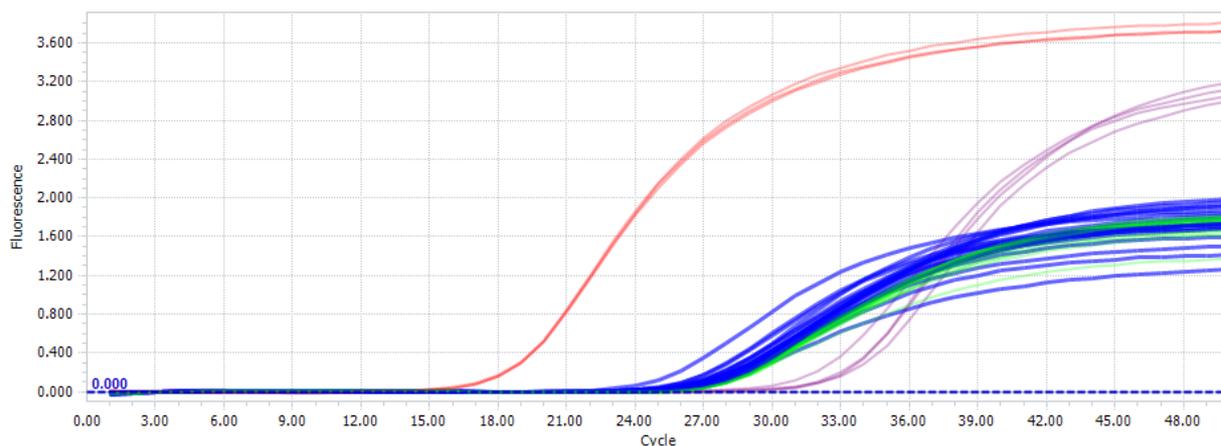


Рисунок 3.30 - Кривые амплификации провирусного генома BLV в сыром  
молоке

Таблица 3.10 - Оценка воспроизводимости результатов определения генома BLV  
в сыром молоке

Оператор I, $C_t$	Оператор II, $C_t$	$C_t$ , среднее	$C_t$ , среднеквадратическое отклонение	CV, %
29,00	29,13	28.63	0,45	2.3
28,63	29,15			
27,22	29,13			
28,78	28,79			
28,64	29,12			
27,33	29,26			
28,52	28,94			
28,29	28,99			
25,88	29,03			
27,93	29,09			
28,29	29,09			
28,19	28,94			
28,65	28,87			
28,72	29,20			
28,80	29,10			
27,91	29,23			
27,76	29,03			
28,20	28,98			
28,28	29,05			
28,89	29,15			

Определение воспроизводимости результатов тестирования образца сырого молока №4, выполненного двумя операторами, показало, что коэффициент вариации значений пороговых циклов составляет 2,3% при допустимом нормативной документацией уровне в 10%.

### ***Оценка стабильности разрабатываемой тест-системы***

Для проведения испытаний стабильности набор делили на три аликвоты, которые подвергли 1, 5 и 10 циклам замораживания и оттаивания соответственно. Аликвота №1 (прошедшая только один цикл) выступала в качестве контрольной. Каждый цикл замораживания и оттаивания включал в себя 30 минут оттаивания при комнатной температуре и 60 минут замораживания при заявленной температуре хранения (-20 °С). Стабильность реагентов, входящих в состав разрабатываемого набора, оценивали по значениям коэффициентов вариации значений пороговых циклов положительных контролей, используемых для построения стандартной кривой, полученных при проведении полимеразной цепной реакции в реальном времени в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I после прохождения аликвотами соответствующего количества циклов замораживания-оттаивания. Полученные результаты приведены в таблице 3.11.

Таблица 3.11 - Результаты оценки стабильности реагентов после многократных циклов замораживания-оттаивания

Количество копий на реакцию	1 цикл		5 циклов		10 циклов		CV <sub>10</sub> , %
	Ct, среднее±СКО	CV, %	Ct, среднее±СКО	CV, %	Ct, среднее±СКО	CV, %	
28125729,8	10,03±0,06	0,57	10,46±0,07	0,66	10,66±0,04	0,33	3,07
2812572,98	13,03±0,08	0,60	13,39±0,07	0,54	14,38±0,07	0,47	4,95
281257,298	16,77±0,1	0,59	17,35±0,43	2,49	17,41±0,05	0,28	1,92
28125,7298	20,07±0,06	0,28	20,45±0,12	0,59	20,43±0,07	0,35	0,96
2812,57298	24,81±0,13	0,53	25,15±0,17	0,68	25,35±0,09	0,36	1,78
281,257298	28,58±0,18	0,63	29,33±0,36	1,22	29,26±0,21	0,71	1,35
28,1257298	33,2±2,03	6,12	33,86±0,96	2,84	33,62±0,64	1,9	4,63

Результаты испытаний разрабатываемой тест-системы на стабильность в условиях многократных циклов замораживания-оттаивания показали её устойчивость к температурным воздействиям, о чём говорят полученные значения коэффициентов вариации Ct, не превышающие установленные нормативной документацией значение в 10%.

В результате проведённых исследований нами предлагается следующий вариант комплектации тест-системы (набора реагентов) для проведения ПЦР-РВ анализа с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I:

1. «ПЦР-смесь-1», содержащая концентрированный буфер для ПЦР, содержащий 15 ммоль хлорида магния  $MgCl_2$ , по 0,6 ммоль/мкл каждого из дезоксирибонуклеотидтрифосфатов и термостабильную ДНК-полимеразу Taq с «горячим» стартом в количестве 5 ед./мкл (коэффициент разбавления 5);

2. «ПЦР-смесь-2», содержащую водный раствор специфических праймеров для амплификации фрагмента провирусной ДНК вируса BLV;

3. Комплект положительных стандартных образцов («ПКО С1», «ПКО С2», «ПКО С3» и «ПКО С4»), используемых для построения стандартной кривой в случае количественного определения содержания провирусной ДНК (сведения о положительных контрольных образцах приведены в таблице 3.12);

4. Отрицательный контрольный образец.

Таблица 3.12 - Параметры положительных стандартных образцов

Название	Концентрация, нг/мкл	Число копий фрагмента BLV на мкл
ПКО С1	0,1	28125729
ПКО С2	0,001	281257
ПКО С3	0,00001	2812
ПКО С4	0,0000001	28

Входящие в комплект тест-системы реагенты должны быть расфасованы в пластиковые микропробирки с завинчивающимися крышками, и иметь соответствующую маркировку, обеспечивающую их однозначную идентификацию.

### **3.5 Разработка методики выполнения измерений количественной оценки провирусной ДНК BLV в молочной продукции**

Проведённые исследования позволили перейти к разработке стандарта организации (СТО) для количественного определения содержания провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота (КРС) в молоке и молочных продуктах. Разработка СТО проводилась в соответствии с требованиями ГОСТ Р 1.4 - 2004. В документе подробно определены область применения методики, нормативные ссылки, термины и определения, а также требования к точности измерений. Указанные требования включают в себя точные параметры, необходимые для достижения высокой точности и воспроизводимости результатов. Кроме того, установлены требования к средствам измерений, оборудованию, лабораторной посуде, стандартным образцам, материалам и реактивам, что обеспечивает комплексный подход к проведению исследований.

Методика измерений детально описана, начиная от процедур подготовки образцов и до этапов проведения измерений. Подготовка образцов включает в себя критические этапы, такие как отбор, транспортировка и хранение, которые могут значительно повлиять на результаты анализа. В документе также указаны требования безопасности и охраны окружающей среды, являющиеся неотъемлемой частью современных методик исследований. Для обеспечения правильного и безопасного выполнения измерений особое внимание уделено квалификации операторов, их обучению и подготовке.

Условия измерений включают определение температурных режимов, влажности и других факторов, способных повлиять на качество и точность данных. Порядок выполнения измерений включает несколько ключевых этапов: обработку данных, их интерпретацию и оформление результатов в соответствии с установленными стандартами. Это позволяет обеспечить высокую степень точности и достоверности полученных данных.

Основная цель методики – обеспечить высокую специфичность и достоверность при количественном определении провирусной ДНК вируса

лейкоза КРС в молочных продуктах. СТО разработана для точного количественного измерения числа копий провирусной ДНК вируса лейкоза коров BLV в анализируемых пробах методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I. Диапазон измерений варьируется от 28 до 28 125 730 копий на реакцию включительно, что позволяет охватить широкий спектр концентраций вирусной ДНК.

Стандарт организации направлен на решение задачи обеспечения населения безопасными продуктами питания и контроля инфекционного заболевания, наносящего значительный экономический ущерб молочной промышленности. Благодаря разработанной методике удастся своевременно выявлять инфицированные образцы и предотвращать их попадание в пищевые продукты, тем самым повышая их качество и безопасность. Стандарт помогает минимизировать риски заражения потребителей и распространения вируса среди животных, что имеет важное значение для сохранения здоровья населения и поддержания экономической стабильности в отрасли.

СТО также включает рекомендации по улучшению текущих практик контроля качества молока и молочных продуктов, способствующие повышению общей эффективности производственных процессов. Использование методики позволяет обеспечить более высокую степень контроля и мониторинга состояния молочных продуктов на всех этапах производства и распределения.

В целом, внедрение стандарта организации является важным шагом в направлении улучшения качества и безопасности молочных продуктов. Такой подход позволит не только обеспечить надежную защиту здоровья потребителей, но и создать более благоприятные условия для развития молочной промышленности в долгосрочной перспективе. (Приложение А).

## ВЫВОДЫ

1. Проведён обзор научно-технической литературы, освещающей вопросы безопасности молока и молочных продуктов в частности от КРС, зараженного *Bovine leukemia virus*, а также структуры и функционирования генома вируса BLV, представляющих интерес для разработки ПЦР-тест-систем. Установлено, что в настоящее время отсутствуют отечественные наборы реагентов для количественной детекции провирусной ДНК в молоке и молочных продуктах, прошедших термическую обработку.

2. В ходе сравнительного анализа установлено, что набор для выделения ДНК «ДНК-сорб-С-М» (набор №1), основанный на сорбционной экстракции при использовании в качестве стартового материала молока и молочных продуктов показывает большую эффективность по сравнению с основанным на селективном осаждении набором «ДНК-Экстран-2» (набор №2) по следующим характеристикам: концентрация и чистота препаратов ДНК, ингибирование протекания полимеразной цепной реакции.

3. В результате биоинформатического анализа геномных последовательностей разработан комплект специфических олигонуклеотидов для амплификации фрагмента провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота, выделенной из различных источников. Установлено, что амплификация клонированного в вектор фрагмента провирусной ДНК вируса BLV наблюдалась при использовании всех трёх пар праймеров в динамическом диапазоне от 0,1 нг/мкл до 0,1 пг/мкл ДНК.

4. Доказано, что праймеры ВВР, разработанные в рамках исследования для выявления провирусной ДНК *Bovine leukemia virus*, имеют 100% специфичность, на что указывает отсутствие ложноположительных результатов при тестировании ДНК различных видов патогенной микрофлоры крупного рогатого

скота. Произведена оценка ключевых метрологических характеристик разработанной пары праймеров для тест-системы: сходимость результатов амплификации составляет от 0,39% до 3,41% в зависимости от типа исходного образца, воспроизводимость результатов составила 2,3%.

5. Предложена тест-система для детекции провирусной ДНК BLV, включающий в себя все необходимые для проведения анализа реагенты и стандартные образцы. Установлено, что разработанная тест-система устойчива к многократному замораживанию-оттаиванию (коэффициент вариации  $C_v$  между 1 и 10 циклами не превышает 4,95%).

6. Разработан и утверждён СТО 00419785-075-2024 «Молоко и молочная продукция. Методика выполнения измерений по выявлению и количественному определению провирусной ДНК вируса лейкоза КРС».

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

КРС – крупный рогатый скот.

ПЦР – полимеразная цепная реакция.

СОМ – сухое обезжиренное молоко.

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота.

НК— нуклеиновая кислота

ПЦР-РВ —полимеразная цепная реакция в реальном времени

ВЛV

ВБЛ

ВЛКРС

} вирус энзоотического лейкоза крупного рогатого скота.

ЛКРС - лейкоз крупного рогатого скота.

СКО – среднее квадратическое отклонение

РНК - рибонуклеиновая кислота

М.д. – массовая доля.

П.о. – пары оснований.

FeLV– вирус лейкоза кошек

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абашин, И. Ю. Применение молекулярной диагностики вируса лейкоза при исследовании различного биологического материала / И. Ю. Абашин, Н. Г. Козырева // Ветеринария и кормление. – 2021. – № 3. – С. 4-6. – DOI 10.30917/АТТ-VK-1814-9588-2021-3-1.

2. Альтштейн, А.Д., Валихов, А.Ф. и др. Экспрессия оболочечного гликопротеида вируса бычьего лейкоза рекомбинантными вирусами осповакцины / А.Д. Альтштейн, А.Ф. Валихов и др.// Труды ВИЭВ, 1991.- т.70.- С.101-107.

3. Аминова, С.П. Использование моноклональных антител для диагностики лейкоза КРС / С.П. Аминова, Л.А. Глобенко, В.Н. Петров и др. // Материалы международной конференции, Харьков. – 1995. – С. 240-243.

4. Аналитический ежеквартальный, с нарастающим итогом отчет по эпидситуации в стране (по данным Департамента Ветеринарии МСХ) | Россельхознадзор [Электронный ресурс] ([fsvps.gov.ru](http://fsvps.gov.ru)).

5. Бигаева, А. В. Разработка молекулярно-генетической и биоинформационной системы оценки технологических свойств молока, ассоциируемых с направлениями его переработки: специальность 05.18.04 "Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств": диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук / Бигаева Алана Владиславовна. – Москва, 2021. – 130 с.

6. Дорош, М.В. Болезни овец и коз / М.В. Дорош— Москва. ВЕЧЕ, 2007. — 160 с. — ISBN: 978-5-9533-1873-0

7. Бурба, Л.Г. Диагностика лейкозов сельскохозяйственных животных / Л.Г. Бурба, А.А. Кунаков // Москва, Колос. – 1983. – 191 с.

8. Бурба, Л.Г. Лейкозы и злокачественные опухоли животных / Л.Г. Бурба, А.Ф. Валихов, В.А. Горбатов и др. // 2-е изд., перераб, и доп. М.: Агропромиздат, 1988, 400 с.

9. Валихов, А.Ф. Биологические свойства вируса лейкоза крупного рогатого скота: диагностика и профилактика инфекции // Автореферат дисс. докт. биол. наук. М., 1992. -46 с.

10. Валихов, А.Ф. Лейкоз крупного рогатого скота (вирусологические аспекты) / А.Ф. Валихов, В.П. Шишков, Л.Г. Бурба // М.: ВНИИТЭИСХ, 1980. – 78 с.

11. Вафин, Р.Р. Технология генодиагностики *Bovine leukemia virus* у крупного рогатого скота, в вырабатываемом сырье и производимой продукции / Р. Р. Вафин, Х. Х. Гильманов, А. Г. Галстян и др. // Известия Национальной академии наук Республики Казахстан. Серия химии и технологии. – 2021. – №. 1. – С. 119-125.

12. Вафин, Р. Р. Выявление нового (8-го) генотипа ВЛКРС в различных регионах мира / Р. Р Вафин, Н. З. Хазипов, А. Ю. Шаева, З. Р. Закирова, Л. И. Зайнуллин, С. В. Тюлькин, И. Р. Абдулина, А. М. Алимов // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10 (часть 7) – С. 1467-1471.

13. Вафин, Р.Р. Оптимизация способов генотипирования крупного рогатого скота по гену каппа-казеина / Р.Р. Вафин, Т.М. Ахметов, Э.Ф. Валиуллина, О.Г. Зарипов, С.В. Тюлькин / Ветеринарная практика. – 2007. – № 2. – С. 54-5.

14. Везирян, В. А. Технология производства сыров с отдельной пастеризацией молочной смеси / В. А. Везирян, И. А. Евдокимов, А. А. Везирян, С. В. Анисимов // Сыроделие и маслоделие. – 2015. – №. 1. – С. 34-36.

15. Виноградова, И.В. Изучение генотипического разнообразия, молекулярно-генетической структуры и филогенетический анализ возбудителя лейкоза крупного рогатого скота, циркулирующего в популяции животных из разных регионов России / И.В. Виноградова, Е.А. Гладырь, Н.В. Ковалюк, М.В. Петропавловский, И.М. Донник, Л.К. Эрнст, Н.А. Зиновьева // В сборнике: Современные молекулярно-генетические и иммуно-физиологические подходы к ликвидации гемобластозов животных. ФГБНУ Уральский научно-

исследовательский ветеринарный институт, ФГБОУ ВПО Уральский государственный аграрный университет. – Екатеринбург, 2014. – С. 3-18.

16. Гаврилова, Г.А. Диагностика лейкоза крупного рогатого скота / Г.А. Гаврилова, Ю.А. Макаров, С.В. Бахметьева // Ветеринария. – 2004. – №1. – С. 20-23.

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

18. Гильманов, Х. Х. Генотипирование крупного рогатого скота по генам, определяющим устойчивость к лейкозу, и геноидентификация его этиологического агента: специальность 06.02.07 "Разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных": диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Гильманов Хамид Халимович, 2019. – 163 с.

19. Галеев Р.Ф., Хусаинов Р. Ф. Лейкоз крупного рогатого скота. Уфа: Издательство «Новый стиль». 2009г. - 220 с

20. Горбатова, К. К. Биохимия молока и молочных продуктов / К. К. Горбатова, П. И. Гунькова; Под общ. ред. К.К. Горбатовой. - 4-е изд., перераб. и доп. - Санкт-Петербург: ГИОРД, 2010. - 336 с.: ил.; ISBN 978-5-98879-112-6

21. ГОСТ 31449-2013 «Молоко коровье сырое. Технические условия»

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

23. Гулюкин, М.И. Исключить крайности в проведении противоэпизоотических мероприятий при лейкозе крупного рогатого скота / М.И. Гулюкин // Ветеринарный консультант. – 2005. – № 13-14. – С. 4-6.

24. Донник, И. М. Чувствительность и специфичность диагностических тестов (РИД, ИФА, ПЦР) в выявлении вирусоносителей ВЛКРС среди оздоравливаемого от лейкоза поголовья крупного рогатого скота / И. М. Донник, М. В. Петропавловский, А. Т. Татарчук // Современные проблемы диагностики,

лечения и профилактики болезней животных и птиц: сб. науч. тр. вед. ученых России и Зарубежья. Екатеринбург: Уральское издательство, 2010. – Вып. 3. – С 113–118.

25. Закрепина, Е. Н. Лейкоз крупного рогатого скота и его влияние на количественные и качественные показатели молочной продуктивности коров: автореф. дис... канд. вет. наук. / Е. Н. Закрепина. – Вологда-Молочное, 2001. – 24 с.

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

27. Захарченко, Г. Л. Результаты радиационно-гигиенического мониторинга на территории орловской области/ Г. Л. Захарченко //Профилактическая медицина: матер. 3 всероссийской конф. с международным участием. СПб., 2013. С. 280-281.

28. Казиева Г. Х. Ветеринарно-санитарная оценка молока и молочных продуктов при ретровирусных инфекциях крупного рогатого скота: дис...канд. биол. наук: 06.02.05/ СГАУ им. Н.И. Вавиловаю- Саратов, 2018. - 121 с.

29. Козырева, Н. Г. Распространение лейкоза крупного рогатого скота и генетические варианты возбудителя на территории животноводческих хозяйств Центрального федерального округа Российской Федерации / Н. Г. Козырева, М. И. Гулюкин // Ветеринария Кубани. - 2017. - №6. - С.4-9.

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

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

32. Кудрявцева, Т. П. Лейкоз животных. / Т. П. Кудрявцева //М.: Россельхозиздат, 1980. - С. 158.

33. Лазаренко, Л. В. Эпизоотическая ситуация на животноводческих объектах уголовно-исполнительной системы / Л. В. Лазаренко // Ведомости уголовно-исполнительной системы. 2019. № 2. С. 75-80.

34. Ларионов, Г. А. Безопасность молока по химическим и микробиологическим показателям / Г. А. Ларионов, Н. В. Щипцова // Аграрный вестник Урала. – 2012. – № 10 (102). – С. 29-30.

35. Ларионов, Г. А. Показатели безопасности молока коров и продукции переработки / Г. А. Ларионов, Н. В. Щипцова // Ученые записки. Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2008. – Т. 193 – С. 254-256.

36. Лейкоз КРС, основные направления его профилактики и оздоровления / Ю.Х. Бахтаунов, С.Б. Маманова, А.Б. Бижанов [и др.] // Проблемы теории и практики современной ветеринарной науки: сб. науч. тр. / Казах.НИВИ. - Алматы, 2016. - Т. 62. - С.42-51.

37. Лейкоз крупного рогатого скота. Причины возникновения и пути передачи возбудителя болезни. Часть 2 / Г. А. Симонян // Farm Animals. – 2016. – Т. 11, № 1. – С. 26-28.

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

39. Методические указания по диагностике лейкоза крупного рогатого скота / Утв. Деп. вет. МСХ России, 23.08.2000 г

40. Нахмансон, В. М. Лейкоз крупного рогатого скота / В. М. Нахмансон // М.: Агропромиздат – 1986. – 221 с.

41. Об эпизоотической ситуации по значимыми особо опасным болезням животных в Российской Федерации / Муковнин А.А. <http://mcx.ru/upload/iblock/cad/cadc556bb7f2cf47f83a7b55f8309456.pdf>

42. Обзор ФСИН России от 20.12.2016 № исх-04-75258. 5 с.

43. Обзор ФСИН России от 26.12.2019 № исх-05-98662 «О результатах мониторинга эпизоотической обстановки». 7 с.

44. Обзор ФСИН России от 28.12.2017 № исх-09-89611 «О результатах эпизоотического мониторинга». 5 с.

45. Обзор ФСИН России от 28.12.2018 № исх-05-97600 «О результатах мониторинга эпизоотической обстановки». 7 с.

46. Общая эпизоотология: учебное пособие [Электронный ресурс] / Кудачева Н.А. — Самара: РИЦ СГСХА, 2017. — 152 с. — ISBN 978-5-88575-486-6

47. Патент № 2445370 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Способ диагностики лейкоза крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции: № 2010143998/10 : заявл. 28.10.2010: опубл. 20.03.2012 / Н. Г. Козырева, М. И. Гулюкин, Л. А. Иванова [и др.]; заявитель Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко (ВИЭВ).

48. Патент № 2521330 С2 Российская Федерация, МПК G01N 33/50. Способ выявления вируса лейкоза КРС по нуклеотидным последовательностям консервативных областей вирусного генома: № 2012124825/15 : заявл. 15.06.2012: опубл. 27.06.2014 / Г. Ю. Косовский, Е. А. Климов, Д. В. Горюнов, А. Б. Сиволапова; заявитель Государственное научное учреждение Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ЦЭЭРБ Россельхозакадемии).

49. Патент № 2558252 С2 Российская Федерация, МПК С12Q 1/04, С12Q 1/68, С12N 7/00. Способ обнаружения провируса лейкоза крупного рогатого скота: № 2013136252/10 : заявл. 01.08.2013: опубл. 27.07.2015 / А. Ю. Маркарян, И. А. Шкуратова, И. М. Донник [и др.]; заявитель Государственное научное учреждение Уральский научно-исследовательский ветеринарный институт (УрНИВИ).

50. Патент № 2566071 С2 Российская Федерация, МПК G01N 33/48. Способ подготовки биоматериала для ПЦР диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС): № 2013135036/15 : заявл. 25.07.2013: опубл. 20.10.2015 / И. А. Шкуратова, И. М. Донник, Ю. Я. Хрунык [и др.]; заявитель Государственное научное учреждение Уральский научно-исследовательский ветеринарный институт (УрНИВИ).

51. Патент № 2615465 С2 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Диагностическая система для выявления ДНК провирусов лейкоза и иммунодефицита крупного рогатого скота методом мультиплексной полимеразной цепной реакции: № 2015132112: заявл. 31.07.2015: опубл. 04.04.2017 / Е. С. Красникова, О. С. Ларионова, А. В. Красников [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова".

52. Патент № 2644233 С2 Российская Федерация, МПК С12Q 1/66. способ экспресс-диагностики лейкоза крупного рогатого скота: № 2016109396: заявл. 15.03.2016: опубл. 08.02.2018 / А. И. Никитин, К. В. Усольцев, Т. Х. Фаизов [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный Центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности" ФГБНУ "ФЦТРБ-ВНИВИ"

53. Патент № 2694617 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Способ диагностики лейкоза крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции: № 2018116549: заявл. 04.05.2018: опубл. 16.07.2019 / Н. Г. Козырева, Л. А. Иванова, Т. В. Степанова, М. И. Гулюкин; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук".

54. Патент № 2694966 С1 Российская Федерация, МПК G01N 33/49, С12Q 1/686. Способ диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота: №

2018132934: заявл. 18.09.2018: опубл. 18.07.2019 / Т. Л. Красовская, С. С. Абакин, Н. В. Сулыга.

55. Патент № 2700245 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Способ выявления ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота (Bovine leukosis virus, BLV): № 2018134803: заявл. 01.10.2018: опубл. 13.09.2019 / О. Ю. Черных, В. А. Баннов, Д. В. Малышев [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина".

56. Патент № 2700450 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Тест-система для выявления ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота (Bovine leukosis virus, BLV): № 2018134804: заявл. 01.10.2018: опубл. 17.09.2019 / В. А. Баннов, О. Ю. Черных, Д. В. Малышев [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина".

57. Патент № 2722137 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/66. Способ диагностики лейкоза крупного рогатого скота с использованием ПЦР в режиме реального времени: № 2018143175: заявл. 05.12.2018: опубл. 26.05.2020 / С. С. Абакин, Т. Л. Красовская; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр"(ФГБНУ "Северо-Кавказский ФНАЦ").

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

59. Полиморфизм гена BoLA-DRB3 и генетический статус выборки быков – производителей по отношению к лейкозу крупного рогатого скота / Х. Х. Гильманов, Р. Р. Вафин, Р. Г. Каримова [и др.] // Ветеринария, зоотехника и биотехнология. – 2018, № 11. – С.89-98.

60. Просеков, А. Ю. Анализ состава и свойств белков молока с целью использования в различных отраслях пищевой промышленности / А.Ю.

Просеков, М.Г. Курбанова // Техника и технология пищевых производств. - 2009. - № 4. - С. 68-71.

61. Сайт Национального союза производителей молока. [Электронный ресурс: <http://www.souzmoloko.ru>. Дата доступа 30.03.2020].

62. Сайт Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных наций [Электронный ресурс: <http://www.fao.org/faostat/ru>. Дата доступа 30.03.2020].

63. Свириденко, Г. М. Проблема безопасности молочных продуктов в связи с лейкозом крупного рогатого скота/ Г. М. Свириденко // Молочная промышленность. – 2017 – №8. – С. 13 – 15.

64. Свириденко, Г. М. Лейкоз скота и безопасность молочных продуктов / Г. М. Свириденко, Е. Г. Семова // Молочная промышленность. – 2003. – № 7. – С. 8-10.

65. Семёнов, С. Н. Качество и безопасность молока-сырья как фактор конкурентоспособности молочных продуктов / С. Н. Семёнов, И. П. Савина, П. А. Паршин // Вестник воронежского государственного аграрного университета. 2016. № 1 (48). С. 51-55.

66. Серегин, С. Н. Развитие молочного подкомплекса России / С. Н. Серегин, П. Д. Камилова // Экономика сельскохозяйственных и перерабатывающих предприятий. 2007. № 6. С. 63-65.

67. Твердохлеб Г. В. Химия и физика молока и молочных продуктов/Г. В. Твердохлеб, Р. И. Раманаускас. М. ДеЛи Принт, 2006.

68. Тёпел А. Химия и физика молока/пер. с нем. Л. Ф. Тёрчек. -М.: Пищевая промышленность, 1979.

69. ТР ТС 033/2013. О безопасности молока и молочной продукции. Принят 09.11.2013.

70. Туркова, С.О. Полиморфизм генов BoLA-DRB3, пролактина и гормона роста у крупного рогатого скота в связи с устойчивостью к лейкозу и молочной

продуктивностью: автореф. дис... канд. биол. наук: 03.00.15 / С.О. Туркова. – Москва. – 2003. – 21 с.

71. Тюлькин, С. В. Полиморфизм по генам соматотропина, пролактина, лептина, тиреоглобулина быков-производителей / С. В. Тюлькин, Т. М. Ахметов, Э. Ф. Валиуллина, Р. Р. Вафин // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Т. 16. – № 4-2. – С. 1008-1012.

72. Ушачев, И. Роль аграрной науки в обеспечении продовольственной безопасности России / И. Ушачев // АПК: экономика, управление. 2009. № 8. С. 9-14.

73. Физико-химические показатели козьего, овечьего и коровьего молока / А. С. Шуварики, К. А. Канина, О. Н. Красуля [и др.] // Овцы, козы, шерстяное дело. – 2017. – № 1. – С. 38–40.

74. Якупов, Т.Р. Возможности ИФА молока в диагностике лейкоза крупного рогатого скота / Т.Р. Якупов, А.М. Алимов, Б.В. Камалов, Н.З. Хазипов // Ученые записки КГАВМ. – 2010. – Т. 201. – С. 133-136.

75. AL-Saffar, A. M. Validating the preeminence of biochemical properties of camel over cow and goat milk during the Covid-19/ A. M. AL-Saffar //Food Science & Nutrition. – 2022. – v. 10. – №. 8. – p. 2786-2793.

76. Asfaw, Y. Distribution and superinfection of bovine leukemia virus genotypes in Japan / Y. Asfaw, S. Tsuduku, M. Konishi, K. Murakami, T. Tsuboi, D. Wu, H. Sentsui // Arch Virol. – 2005. – v. 150. – p. 493–505.

77. Balic, D. Identification of a new genotype of bovine leukemia virus / D. Balic, I. Lojkic, M. Periskic, T. Bedekovic, A. Jungic, N. Lemo, B. Roic, Z. Cacic, L. Barbic, J. Madic // Arch Virol. – 2012. – v. 157. – p. 1281–1290.

78. Barzegar, H. Identification of bovine leukemia virus in raw milk samples in North-West of Iran / H. Barzegar, et al. // Veterinary Research Forum. – Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran, 2021. – v. 12. – № 2. – p. 223.

79. Beier, D. A comparison of serological tests for the diagnosis of enzootic bovine leukosis and eradication of infection from a large herd/ D. Beier, H. Siakkou // *Tieraerztl Umsch.* – 1994. – Vol. 49. – P. 356–360.

80. Benavides, B. Epidemiological study of bovine leukemia virus in dairy cows in six herds in the municipality of Pasto Nariño / B. Benavides, D. Quevedo, M. Cruz // *Revista Lasallista de Investigación.* – 2013. – v. 10. – p. 18–26.

81. Bojarojć-Nosowicz, B. Somatic cell count and chemical composition of milk in naturally BLV-infected cows with different phenotypes of blood leukocyte acid phosphatase / B. Bojarojć-Nosowicz, E. Kaczmarczyk // *Archives Animal Breeding.* – 2006. – v. 49. – № 1. – p. 17–28.

82. Borjigin, L. A novel real time PCR assay for bovine leukemia virus detection using mixed probes and degenerate primers targeting novel BLV strains / L. Borjigin, et al. // *Journal of Virological Methods.* – 2021. – v. 297. – p. 114264.

83. Bovine leukaemia virus DNA in fresh milk and raw beef for human consumption / N. N Olaya-Galán, A. P. Corredor-Figueroa, T. C. Guzmán-Garzón [et al.] // *Epidemiology & Infection.* – 2017. – V. 145, N. 15. – P. 3125-3130.

84. Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil / Daniela Schwingel, Ana Andreolla , Luana Erpen, et al. // *Scientific Reports.* – 2019. – V. 9. Doi: 10.1038/s41598-019-39834-7.

85. Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue / G. C. Buehring, H. M. Shen, H. M. Jensen [et al.] // *Emerging Infectious Diseases.* – 2014, N. 20. – P. 772–782.

86. Bovine leukemia virus gene segment detected in human breast tissue / G. Mesa, J. C. Ulloa, A. M. Uribe [et al.] // *Open Journal of Medical Microbiology.* – 2013, N. 3. – P. 84–90.

87. Bovine leukemia virus in human breast tissues / G.C. Buehring, K. Y. Choi, H. M. Jensen. // In. 23rd Congress of the International Association for Breast Cancer Research. Dusseldorf, Germany. BioMed Central Ltd: A14. – 2001.

88. Bovine leukemia virus infection in cattle of China: Association with reduced milk production and increased somatic cell score / Y. Yang, W. Fan, Y. Mao et al. // *J Dairy Sci.* – 2016, May. – Vol. 99(5). – P. 3688-97.
89. Bovine leukosis and the possibility to cause cancer in humans: A scientific review / H. H. K. Alabbody // *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine.* – 2018, – V. 42, N. 1. – P. 52-60.
90. Bovine lymphoma / J. A. Angelos, M. C. Thurmond // *Large Animal Internal Medicine*, 4th ed. – Mosby Elsevier, St. Louis, 2008. – P. 1173-1176.
91. Camargos M. Partial sequencing of env gene of bovine leukaemia virus from Brazilian samples and phylogenetic analysis / M. Camargos, D. Stancek, M. Rocha, L. Lessa, J. Reis, R. Leite // *Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* – 2002. – v. 49. – p. 325–331.
92. Coulston, J. Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison with other isolates / J. Coulston, H. Naif, R. Brandon, S. Kumar, S. Khan, R.C. Daniel, M.F. Lavin // *J Gen Virol.* – 1990. – v. 71. – p. 1737–1746.
93. D'Angelino, J.L. Epidemiological study of enzootic bovine leukosis in Brazil / J.L. D'Angelino, M. Garcia, E.H. Birgel // *Trop Anim Health Prod.* – 1998. – v. 30. – p. 13–15.
94. Detection of bovine immunodeficiency virus DNA in the blood and semen of experimentally infected bulls / C.M. Gradil, R.E. Watson, R.W. Renshaw et al. // *Vet Microbiol.* – 1999. – Vol. 70(1–2). – P. 21–31
95. Donnik I. M. et al. Enzootic bovine leukosis—diagnostics, eradication, and anthroozoonotic potential (background) // *Biology Agricultural.* – 2021. – C. 230.
96. Effects of subclinical bovine leukemia virus infection on some production parameters in a dairy farm in southern Turkey / M. Kalea, O. Bulutb, O. Yapk, et al. // *J. S. Afr. Vet. Ass.* – 2007. – № 78(3). – P. 130–132.

97. Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: a case-control study / G. C. Buehring, H. M. Shen, H. M. Jensen H.M. [et al.] // PLoS ONE. – 2015, N. 10. – e0134304.

98. Fechner, H. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle / H. Fechner, P. Blankenstein, A.C. Looman, J. Elwert, L. Geue, C. Albrecht, A. Kurg, D. Beier, O. Marquardt, D. Ebner // *Virology*. – 1997. – v. 237. – p. 261–269.

99. Felmer R. Molecular analysis of a 444 bp fragment of the bovine leukaemia virus gp51 env gene reveals a high frequency of non-silent point mutations and suggests the presence of two subgroups of BLV in Chile / R. Felmer, et al. // *Veterinary Microbiology*. – 2005. – v. 108. – № 1-2. – p. 39–47.

100. Fonseca Júnior A.A. Evaluation of three different genomic regions for detection of bovine leukemia virus by real-time PCR / A.A. Fonseca Júnior, et al. // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2021. – v. 52. – p. 2483–2488.

101. Gillet, M. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human / N. Gillet, A. Florins, M. Boxus, C. Burteau, A. Nigro, F. Vandermeers, H. Balon, Amel-Baya Bouzar, J. Defoiche, A. Burny, M. Reichert, R. Kettmann, L. Willems // *Retrovirology* – 2007. – V. 4. – P. 18.

102. Gutiérrez S. E. et al. Development and evaluation of a highly sensitive and specific blocking enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction assay for diagnosis of bovine leukemia virus infection in cattle // *American Journal of Veterinary Research*. – 2001. – v. 62. – №. 10. – p. 1571-1577.

103. Gutierrez, S.E. Major Histocompatibility Complex-Associated Resistance to Infectious Diseases: The Case of Bovine Leukemia Virus Infection / S.E. Gutierrez, E.N. Esteban, C.M. Lutzelschwab et al. // *Trends and Advances in Veterinary Genetics*. – 2017. – V. 6. P. 101-126.

104. Heeney, J.L. Evidence for bovine leukaemia virus infection of peripheral blood monocytes and limited antigen expression in bovine lymphoid tissue / J.L.

Heeney, P.J. Vally, P.M. Jacobs, V.E. Vally // *Lab. Invest.* – 1992. – V. 66. – P. 608-617.

105. Hiraoka M. et al. Identification of potential mRNA biomarkers in milk small extracellular vesicles of enzootic bovine leukosis cattle // *Viruses.* – 2022. – v. 14. – №. 5. – p. 1022.

106. <http://www.epo.org/index.html> [Электронный ресурс. Дата доступа 28.09.2020]

107. <http://www1.fips.ru> [Электронный ресурс. Дата доступа 28.09.2020]

108. <https://www.eapo.org/ru> [Электронный ресурс. Дата доступа 28.09.2020]

109. Humans have antibodies reactive with bovine leukemia virus / G. C. Buehring, S. M. Philpott, K. Y. Choi // *AIDS Research and Human Retroviruses.* – 2003. N. 19. – P. 1105–1113.

110. Investigation of the Bovine Leukemia Virus Proviral DNA in Human Leukemias and Lung cancers in Korea / Lee J, Kim Y, Kang CS, Cho DH, Shin DH, Yum YN // *J Korean Med Sci.* 2005 Aug;20(4):603-606. Published online 2005 August 31. <https://doi.org/10.3346/jkms.2005.20.4.603>

111. Kittelberger, R. Detection of antibodies against the core protein p24 of the bovine leukaemia virus in cattle for confirmatory serological testing / R. Kittelberger, M.P. Reichel, R.M. Meynell // *J. Virol. Methods.* – 1999. – V. 77. – N. 1. – P. 109-114.

112. Konishi M. et al. The effectiveness of colostral antibodies for preventing bovine leukemia virus (BLV) infection in vitro // *BMC veterinary research.* – 2018. – v. 14. – №. 1. – p. 1-9.

113. Kuckleburg C. J. et al. Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time polymerase chain reactions // *Journal of veterinary diagnostic investigation.* – 2003. – v. 15. – №. 1. – p. 72-76.

114. Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients / R. Zhang, J. Jiang, W. Sun [et al.] // *Breast Cancer Research.* – 2016, N.18. – P. 101.

115. Lee E. J. et al. Sequencing and phylogenetic analysis of the gp51 gene from Korean bovine leukemia virus isolates //Virology journal. – 2015. – v. 12. – p. 1-13.

116. Lee E. J. et al. Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle //Infection, Genetics and Evolution. – 2016. – v. 41. – p. 245-254.

117. Licursi M. et al. Provirus variants of bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan //Veterinary microbiology. – 2003. – v. 96. – №. 1. – p. 17-23.

118. Licursi M. et al. Genetic heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts //Virus Research. – 2002. – v. 86. – №. 1-2. – p. 101-110.

119. Marin C. et al. Epidemiology of bovine leukemia in Venezuela //Annales de Recherches Vétérinaires. – 1978. – v. 9. – №. 4. – p. 743-746.

120. Martin D. et al. Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of bovine leukaemia virus //Journal of Veterinary Medicine, Series B. – 2001. – v. 48. – №. 2. – p. 97-106.

121. Matsumura K. et al. Molecular epidemiology of bovine leukemia virus associated with enzootic bovine leukosis in Japan //Virus research. – 2011. – v. 155. – №. 1. – p. 343-348.

122. Meas S. et al. Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds //Veterinary Microbiology. – 2002. – v. 84. – №. 3. – p. 275-282.

123. Mohammadabadi M. R. et al. Using PCR for early diagnosis of bovine leukemia virus infection in some native cattle //Genet Mol Res. – 2011. – v. 10. – №. 4. – p. 2658-2663

124. Molecular Detection of Bovine Leukemia Virus (BLV) in Patients with Breast Cancer in Khartoum State, Sudan / Ahmed MHM, Sami EAA, Elhasen Abdalla MMA et al. // ScholArena. -2020. – V.1, N 6.

125. Monti G., Schrijver R., Beier D. Genetic diversity and spread of Bovine leukaemia virus isolates in Argentine dairy cattle //Archives of virology. – 2005. – v. 150. – p. 443-458.

126. Monti G. E. et al. Evaluation of a new antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine leukemia virus infection in dairy cattle //Journal of veterinary diagnostic investigation. – 2005. – v. 17. – №. 5. – p. 451-457.

127. Nakanishi R. et al. Comparing microRNA in milk small extracellular vesicles among healthy cattle and cattle at high risk for bovine leukemia virus transmission //Journal of Dairy Science. – 2022. – v. 105. – №. 6. – p. 5370-5380.

128. Nandi J. S., Rathore S. S., Mathur B. R. Transmission of infectious viruses in the natural setting at human-animal interface //Current Research in Virological Science. – 2021. – v. 2. – p. 100008.

129. Nishikaku K. et al. Broadly applicable PCR restriction fragment length polymorphism method for genotyping bovine leukemia virus //Journal of Veterinary Medical Science. – 2019. – v. 81. – №. 8. – p. 1157-1161.

130. Ochirkhuu N. et al. Detection of bovine leukemia virus and identification of its genotype in Mongolian cattle //Archives of virology. – 2016. – v. 161. – p. 985-991.

131. Petersen M. I. et al. Quantification of bovine leukemia virus proviral DNA using a low-cost real-time polymerase chain reaction //Journal of dairy science. – 2018. – v. 101. – №. 7. – p. 6366-6374.

132. Polat M. et al. The molecular epidemiological study of bovine leukemia virus infection in Myanmar cattle //Archives of virology. – 2017. – v. 162. – p. 425-437.

133. Polat M. et al. Detection and molecular characterization of bovine leukemia virus in Philippine cattle //Archives of virology. – 2015. – v. 160. – p. 285-296.

134. Polat M. et al. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis //Retrovirology. – 2016. – v. 13. – №. 1. – p. 1-23. DOI: 10.1186/s12977-016-0239-z

135. Polat M., Takeshima S., Aida Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus //Virology journal. – 2017. – v. 14. – №. 1. – p. 1-16.

136. Maezawa M. et al. Phylogenetic analysis based on whole genome sequence of bovine leukemia virus in cattle under 3 years old with enzootic bovine leukosis //Plos one. – 2023. – v. 18. – №. 1. – p. 279756.

137. Reichert, M. Influence of selected technological treatments on the BLV provirus DNA occurring in the tissues of leukaemic cattle / M. Reichert, J. Grundboeck-Jusko, J. Rulka, J. Stec, W. Kozaczynski // Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy. – 1994. – V. 38. – N. 2. – P. 52-60.

138. Response to ‘Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients’ / G. C. Buehring // Breast Cancer Research. – 2017, N. 19. doi:10.1186/s13058017-0808-7

139. Rodriguez S. M. et al. Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades //Journal of general virology. – 2009. – v. 90. – №. 11. – p. 2788-2797.

140. Rola-Łuszczak M. et al. The molecular characterization of bovine leukaemia virus isolates from Eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny //PloS one. – 2013. – v. 8. – №. 3. – p. 58705.

141. Ruiz V. et al. Bovine leukemia virus infection in neonatal calves. Risk factors and control measures //Frontiers in veterinary science. – 2018. – v. 5. – p. 267.

142. Sagata N. et al. Comparison of the entire genomes of bovine leukemia virus and human T-cell leukemia virus and characterization of their unidentified open reading frames //The EMBO journal. – 1984. – v. 3. – №. 13. – p. 3231-3237.

143. Sagata N. et al. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1985. – v. 82. – №. 3. – p. 677-681.

144. Sandoval-Monzón R. S. et al. Efficacy of physical and chemical treatments on the inactivation of bovine leukosis virus present in milk //Clinical and experimental vaccine research. – 2021. – v. 10. – №. 1. – p. 52.

145. Serological and genomic detection of bovine leukemia virus in human and cattle samples / G. Nikbakht, M. Rabbani, M. Emam, et al. // *Int. J. Vet. Res.* – 2010. – V. 4, N. 4. – P. 253-258.

146. Stärk K. D. C. Animal health monitoring and surveillance in Switzerland // *Australian veterinary journal.* – 1996. – v. 73. – №. 3. – p. 96-97.

147. Stobnicka-Kupiec A. et al. Prevalence of Bovine Leukemia Virus (BLV) and Bovine Adenovirus (BAdV) genomes among air and surface samples in dairy production // *Journal of Occupational and Environmental Hygiene.* – 2020. – v. 17. – №. 6. – p. 312-323.

148. The zoonotic potential of bovine leukemia virus / M. J. Burridge // *Vet. Res. Commun.* – 1981, N. 5. – P. 117-126.

149. Úsuga-Monroy C. et al. Presence of bovine leukemia virus in colostrum samples and its potential to infect newborn calves // *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences.* – 2021. – v. 37. – №. 2. – p. 167-176.

150. Vafin, R.R. Genotypic identification of the bovine leukemia virus / R.R. Vafin, N.Z. Khazipov, A.Y. Shaeva, Z.R. Zakirova, L.I. Zaynullin, S.V. Tyulkin, I.R. Abdulina, A.M. Alimov. – 2014 – V. 29. – N. 4. – P. 195-203. DOI: 10.3103/S0891416814040120.

151. World Health Organization et al. Guidance on COVID-19 for the care of older people and people living in long-term care facilities, other non-acute care facilities and home care. – WHO Regional Office for the Western Pacific, 2020. – №. WPR/DSE/2020/015.

152. Yamada T. et al. Cell Infectivity in relation to bovine leukemia virus gp51 and p24 in bovine milk exosomes // *PloS one.* – 2013. – v. 8. – №. 10. – p. 77359.

153. Yang Y. et al. Dairy Cows Experimentally Infected With Bovine Leukemia Virus Showed an Increased Milk Production in Lactation Numbers 3–4: A 4-Year Longitudinal Study // *Frontiers in Microbiology.* – 2022. – v. 13. – p. 946463.

**Приложение А- Стандарт организации по методике выполнения измерений**

---

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ  
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ  
МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ»  
(ФГАНУ «ВНИМИ»)**

---

**СТАНДАРТ  
ОРГАНИЗАЦИИ**

**СТО  
00419785-075-2024**

---



**УТВЕРЖДАЮ**  
Директор ФГАНУ «ВНИМИ»

А.Г. Галстян  
2024 г.

**МОЛОКО И МОЛОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ.**  
Методика выполнения измерений  
по выявлению и количественному определению провирусной ДНК  
вируса лейкоза КРС

**РАЗРАБОТАНО:**

Старший научный сотрудник, к.б.н.

 О.Ю. Фоменко

Младший научный сотрудник

 Е.Г. Лазарева

Москва  
2024

## Приложение Б – Акты проведения лабораторно-производственных испытаний, опытно-промышленной апробации, внедрения результатов научной работы в учебный процесс



МИНОБРНАУКИ РОССИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ  
ПРОМЫШЛЕННОСТИ» (ФГАНУ «ВНИИМ») ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ «МОЛОКО»  
Аттестат аккредитации RA.RU.21ПЩ98

115093, Москва, ул. Люсиновская, 35 корп. 7 Тел: +7 499 236 44 81, e-mail:  
[ilmoloko@mail.ru](mailto:ilmoloko@mail.ru) [www.molokolab.ru](http://www.molokolab.ru)

### АКТ

Апробации и внедрения методики выполнения измерений по выявлению и количественному определению провирусной ДНК вируса лейкоза КРС

Мы, нижеподписавшиеся: заведующая лабораторией испытательной лабораторией «Молоко» (ФГАНУ «ВНИИМ»), к.т.н. Юрова Е.А., научный сотрудник, к.т.н. Жижин Н.А., младший научный сотрудник Лазарева Е.Г., составили настоящий акт о том, что на базе испытательной лаборатории «Молоко» проведена апробация и внедрение методики выполнения измерений по выявлению и количественному определению провирусной ДНК вируса лейкоза КРС. Методика разработана во ФГАНУ «ВНИИМ» и утверждена 27.02.2024.

Методика основана на выявлении провирусной ДНК вируса энзоотического лейкоза крупного рогатого скота, интегрированной в геном животного, с одновременным абсолютным количественным определением числа копий провирусной ДНК в диапазоне измерений от 28 до 2812572910 копий на реакцию включительно. Предел количественного определения (LOQ) составляет 28 копий провирусной ДНК на реакцию.

Проведены исследования образцов молока и молочных продуктов, отобранных в соответствии с СТО 00419785-075-2024 «Молоко и молочная продукция. Методика выполнения измерений по выявлению и количественному определению провирусной ДНК вируса лейкоза КРС». Оценка полученных результатов продемонстрировала, что показатели сходимости и воспроизводимости разработанной для выполнения методики тест-системы, не превышали значения коэффициента вариации 5% и 10% соответственно.

Применение разработанной методики позволяет расширить область оценочных критериев безопасности молока и молочных продуктов, что позволит проводить мониторинг продуктов на наличие провирусной ДНК вируса лейкоза КРС.



Е.А. Юрова

Н.А. Жижин

Е.Г. Лазарева

## АКТ

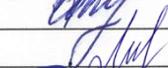
Апробации и внедрении методики выполнения измерений по выявлению и количественному определению провирусной ДНК *Bovine leukemia virus* в молоке и молочных продуктах

Мы, нижеподписавшиеся: младший научный сотрудник научно-исследовательского испытательного центра ВНИИТеК – филиал ФГБНУ "ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова" РАН Калугина З.И., заведующий сектором аналитических методов исследования научно-исследовательского испытательного центра ВНИИТеК – филиал ФГБНУ "ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова" РАН Глазков С.В., младший научный сотрудник лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов ФГАНУ «ВНИМИ» Лазарева Е.Г., заведующий лабораторией прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов ФГАНУ «ВНИМИ», к.б.н. Фоменко О. Ю., составили настоящий акт о том, что на базе сектора аналитических методов исследования научно-исследовательского испытательного центра ВНИИТеК – филиал ФГБНУ "ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова" РАН проведена апробация и внедрение методики выполнения измерений по выявлению и количественному определению провирусной ДНК *Bovine leukemia virus* в молоке и молочных продуктах.

Методика основана на выявлении провирусной ДНК *Bovine leukemia virus* с одновременным абсолютным количественным определением числа копий провирусной ДНК. Диапазон измерений данной методики составляет от 28 до 2812572910 копий на реакцию включительно. Данная методика предусматривает применение тест-системы, в состав которой входят реакционные смеси и набор положительных контролей для построения стандартной кривой при проведении полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Проведены исследования образцов молока и молочных продуктов. Отбор проб и последующая экстракция ДНК проводились в соответствии с СТО 00419785-075-2024. В результате апробации методики показатели сходимости не превышали значения коэффициента вариации 5%, показатели воспроизводимости -10%, что указывает на корректность данных, полученных при использовании тест-системы, разработанной для выполнения методики.

Методика позволяет количественно оценить содержание провирусной ДНК *Bovine leukemia virus* в молоке и молочных продуктах, что значительно расширяет возможности оценки их безопасности.

  
З.И. Калугина  
  
С.В. Глазков  
  
Е.Г. Лазарева  
  
О.Ю. Фоменко

*Подписи З.И. Калужиной, С.В. Глазкова  
заверены.  
Ситуация по кадрам*



*Мухомова Е.А.  
Сухавицкая 2024 год*

Транс 108



Министерство сельского хозяйства Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I»  
(ФГБОУ ВО Воронежский ГАУ)

20.06.2024 г.

№ 54

## СПРАВКА

о применении в учебном процессе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I» результатов диссертационного исследования Лазаревой Екатерины Германовны на тему: «Разработка тест-системы для количественного определения провирусной ДНК *Bovine leukemia virus* в молоке и молочных продуктах» (специальность 4.3.3. Пищевые системы).

Диссертационная работа Лазаревой Екатерины Германовны на тему: «Разработка тест-системы для количественного определения провирусной ДНК *Bovine leukemia virus* в молоке и молочных продуктах» прошла практическую апробацию в ходе разработки рабочих программ по дисциплинам инфекционного цикла по направлению 36.05.01 «Ветеринария» в Воронежском государственном аграрном университете имени императора Петра I. Результаты научных исследований используются при чтении лекций, проведении лабораторных и практических занятий, на семинарах для слушателей программы повышения квалификации, а также в научно-исследовательской работе кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы, эпизоотологии и паразитологии факультета ветеринарной медицины и технологии животноводства ФГБОУ ВО Воронежского ГАУ (протокол № 8 14.03.2024 г.).

В учебный процесс внедрены:

1. Введение в использование ПЦР в реальном времени для количественного определения провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота (BLV) в молоке и молочных продуктах, включая примеры и практическое применение данного метода;
2. Обучение проведению ПЦР-РВ с применением разработанных наборов реагентов и сравнительный анализ методов выделения ДНК из молока, охватывающий как сорбционную экстракцию, так и селективное осаждение, с практическими занятиями по подготовке образцов к ПЦР-анализу;
3. Обзор нормативных требований и стандартов для диагностики BLV, включая обязательные положения нормативных актов, регулирующих контроль качества молочной продукции, и разработка предложений по улучшению регуляторной среды для обеспечения безопасности молока и молочных продуктов на основе молекулярно-генетических методов диагностики;
4. Введение в методы оценки сходности и воспроизводимости результатов ПЦР-анализов, а также изучение устойчивости тест-систем к многократным циклам замораживания и оттаивания, с акцентом на сохранение точности и надежности получаемых данных.

Проректор по учебной работе



Н.М. Дерканосова

## Приложение В - Дипломы



ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ МАСЛОДЕЛИЯ И СЫРОДЕЛИЯ  
филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН



## БЛАГОДАРСТВЕННОЕ ПИСЬМО

ВНИИ маслоделия и сыроделия  
выражает искреннюю благодарность

**Младшему научному сотруднику  
лаборатории геномных и постгеномных  
технологий ФГАНУ «ВНИМИ»**

**Екатерине Германовне ЛАЗАРЕВОЙ**

за участие в Международной молочной неделе  
и выступление с докладом на международной  
научно-практической конференции  
«Производство сыра, масла и другой молочной  
продукции в современных условиях.

**Проблемы и пути решения»**

20-22 июня 2023 г.

**Директор ВНИИМС - филиала  
ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем  
им. В.М. Горбатова» РАН**



**2023 г.**

Г.Н. Рогов

**Приложение Г – Перечень публикаций в рецензируемых научных  
журналах и изданиях**

**Публикации в рецензируемых научных журналах и изданиях**

1. Vafin, R. R. Technology of bovine leukemia virus genodiagnosics in cattle, in produced raw materials and products / R. R. Vafin, Kh. Kh. Gilmanov, A. G. Galstyan, N. S. Pryanichnikova, A. V. Bigaeva, E. G. Lazareva, V. S. Kazakova // Известия Национальной академии наук Республики Казахстан. Серия химии и технологии. – 2021. – No. 1. – P. 119-125. – DOI: 10.32014/2021.2518-1491.15.

2. Михайлова, И. Ю. Влияние генетических факторов на продуктивность коров и качество молока / И. Ю. Михайлова, Е. Г. Лазарева, А. В. Бигаева [и др.] // Пищевая промышленность. – 2021. – № 1. – С. 36-40. – DOI: 10.24411/0235-2486-2021-10007.

3. Лазарева, Е. Г. К вопросу актуальности исследования молока на наличие вируса лейкоза крупного рогатого скота / Е. Г. Лазарева // Пищевая промышленность. – 2022. – № 7. – С. 45-48. – DOI 10.52653/PPI.2022.7.7.008.

4. Бигаева, А. В. Сравнительная эффективность методов выделения ДНК из сухого коровьего молока / А. В. Бигаева, Е. Г. Лазарева, А. В. Хан, О. Ю. Фоменко // Пищевая промышленность. – 2023. – № 5. – С. 87-90. – DOI: 10.52653/PPI.2023.5.5.025.

5. Лазарева, Е. Г. Исследование методов экстракции ДНК из сырого молока / Е. Г. Лазарева, Хан А.В., Фоменко О. Ю. // Молочная промышленность. – 2023. – № 5. – С. 115-116. DOI:10.21603/1019-8946-2023-5-8

**Публикации в Трудах НИИ, материалах конференций, симпозиумов,  
в специализированных журналах**

6. Бигаева, А. В. Современные молекулярно-генетические методы идентификации вируса бычьего лейкоза / А. В. Бигаева, Е. Г. Лазарева, И. В. Ржанова // Актуальные вопросы индустрии напитков. – 2019. – № 3. – С. 41-44. – DOI: 10.21323/978-5-6043128-4-1-2019-3-41-44.

7. Лазарева, Е. Г. Вирус бычьего лейкоза: потенциальные риски / Е. Г. Лазарева, А. В. Бигаева, Х. Х. Гильманов // Пищевые инновации и биотехнологии: сборник тезисов VIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Кемерово, 25–27 мая 2020 года / Под общей редакцией А. Ю. Просекова. Том 1. – Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2020. – С. 117-119.

8. Лазарева, Е. Г. К вопросу пробоподготовки сухого молока для выявления вируса бычьего лейкоза / Е. Г. Лазарева, Х. Х. Гильманов // Пищевые инновации и биотехнологии: сборник тезисов IX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Пищевые инновации и биотехнологии» в рамках III международного симпозиума «Инновации в пищевой биотехнологии», Кемерово, 17–19 мая 2021 года. Том 1. – Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2021. – С. 446-448.

9. Лазарева, Е. Г. Влияние вируса лейкоза КРС на качественные показатели молока / Е. Г. Лазарева, А. В. Бигаева // Молодые исследователи агропромышленного и лесного комплексов – регионам, Вологда-Молочное, 21 апреля 2022 года. Том 2. – Вологда-Молочное: Вологодская государственная молочнохозяйственная академия им. Н.В. Верещагина, 2022. – С. 61-64.

10. Лазарева, Е. Г. Потенциал методики молекулярно-генетической оценки безопасности молока и молочных продуктов / Е. Г. Лазарева // Зоотехническая наука в условиях современных вызовов: Сборник трудов IV научно-практической конференции с международным участием, Киров, 30 ноября 2022 года. – Киров: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Вятский государственный агротехнологический университет, 2022. – С. 90-94.

11. Лазарева, Е. Г. Анализ необходимости расширения критериев оценки безопасности молока-сырья/ Е.Г. Лазарева // Актуальные вопросы ветеринарной медицины и лабораторной диагностики: материалы международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения

профессора В.В. Рудакова, Санкт-Петербург, 25–26 мая 2023 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2023. – С. 177-180.

12. Лазарева, Е. Г. Влияние процесса распылительной сушки коровьего молока на содержание суммарной ДНК/ Е.Г. Лазарева // Производство сыра, масла и другой молочной продукции в современных условиях. Проблемы и пути решения: сборник материалов Международной молочной недели. 20–22 июня 2023 г. – Углич, ВНИИМС – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, 2023. – С. 155-158

13. Лазарева, Е. Г. Диагностирование качества молока с помощью метода ПЦР: новый подход к анализу / Е. Г. Лазарева // Пищевые инновации и биотехнологии: сборник тезисов XI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Кемерово, 18 мая 2023 года / Под общей редакцией А.Ю. Просекова. Том 1. – Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2023. С 396-397

14. Лазарева, Е. Г. Оценка влияния технологических процессов на ДНК молока и молочных продуктов / Е. Г. Лазарева, А. В. Хан // Международная научно-практическая конференция молодых учёных и специалистов отделения сельскохозяйственных наук Российской академии наук. – 2023. – № 1. – С. 163-166.

15. Лазарева, Е. Г. Идентификация Bovine Leukemia Virus (BLV) в молоке: обзор предметного поля / Е. Г. Лазарева, О. Ю. Фоменко // Пищевая Метаинженерия. – 2023. – Т. 1, № 1. – С. 89-106. – DOI: 10.1234/fme.2023.4.