

ФГБУ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ВИРУСОЛОГИИ
ИМ. Д.И. ИВАНОВСКОГО» МИНЗДРАВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ПЛОТНИКОВ ВАДИМ АЛЕКСЕЕВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛЕВЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА
ПТИЦ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

Специальность 03.02.02 - вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

На соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель-
доктор биологических наук, профессор
Алипер Т. И.

Москва-2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА	15
1.2. ХАРАКТЕРИСТИКА ВЛП.....	17
1.2.1. Классификация	17
1.2.2. Морфология и физические свойства	19
1.2.3. Организация генома и свойства кодируемых белков	20
1.2.4. Репликация вируса	22
1.2.5. Устойчивость	25
1.2.6. Антигенные свойства	26
1.2.7. Культивирование	28
1.3. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ШТАММОВ ВЛП.....	29
1.3.1. Сравнительный нуклеотидный анализ гена <i>env</i> вирусных изолятов ВЛП подгрупп А-Ј.....	30
1.3.2. Филогенетические отношения изолятов ВЛП	32
1.4. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ	33
1.5. ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКИЕ И ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ.....	36
1.6. ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВЛП.....	39
1.6.1. Распространение.....	41
1.6.2. Вирусоносительство.....	43
1.6.3. Пути передачи	44
1.7. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ВЛП	47
1.8. ИММУНИТЕТ.....	50
1.9. МЕРЫ БОРЬБЫ И ПРОФИЛАКТИКИ.....	53
1.10. ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ.....	55
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	58

2.1. МАТЕРИАЛЫ.....	58
2.1.1. Штаммы и изоляты вирусов ВЛП.....	58
2.1.2. Культуры клеток	59
2.1.3. Растворы и реагенты.....	60
2.1.4 Реагенты и наборы для молекулярной биологии.....	61
2.2. МЕТОДЫ	63
2.2.1. Сбор образцов.	63
2.2.2. Приготовление культур клеток	64
2.2.3. Выделение и идентификация ВЛП	64
2.2.4. Выявление группоспецифического антигена р27 ВЛП в сыворотке крови кур методом ИФА	65
2.2.5. Выявление антител к вирусу лейкоза птиц подгруппы-J	65
2.2.6. Определение стерильности	65
2.2.7. Замораживание клеток.....	65
2.2.8. Выделение суммарной РНК.	66
2.2.9. Полимеразная цепная реакция, совмещенная с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)	67
2.2.10. Электрофорез ДНК в агарозном геле	67
2.2.11. Конструирование рекомбинантной плазмиды	68
2.2.13. Секвенирование амплифицированных фрагментов кДНК.....	71
2.2.14. Компьютерный анализ и сравнение первичных нуклеотидных последовательностей	72
2.2.15. Статистическая обработка результатов	72
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	73
3.1. Мониторинг птицеводческих хозяйств на наличие ретровирусных инфекций на территории Российской Федерации	73
3.2. Разработка тест-системы на основе ПЦР для выявления и дифференциации вируса лейкоза птиц подгрупп А-D и J	81

3.3. <i>Изоляция и характеристика полевых изолятов вируса лейкоза птиц, циркулирующих на территории России в 2009-2011 гг.</i>	92
3.4. <i>Определение и сравнительный анализ первичной структуры вариабельной области гена envelope изолятов вируса лейкоза птиц, выделенных на птицефабриках России в 2009-2011 гг.</i>	97
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	101
ВЫВОДЫ.....	109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	111
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	139

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – антиген;
АТ – антитела;
БСА – бычий сывороточный альбумин;
ВЛП – вирус лейкоза птиц;
ВРЭ – вирус ретикулоэндотелиоза птиц;
ВСП – вирус саркомы Рауса;
ДСН – додецилсульфат натрия;
ДМСО – диметилсульфоксид;
ИФА – иммуноферментный анализ;
КЭ – куриные эмбрионы;
КК – культура клеток;
ЛЛ – лимфоидный лейкоз;
ЛС-комплекс- лейкозно-саркомный комплекс;
мРНК – матричная РНК;
МАТ – моноклональные антитела;
МПА - мясо-пептонный агар;
МПБ - мясо-пептонный бульон;
МППБ - мясо-пептонный печеночный бульон;
МСК – метод связывания комплимента;
н/о – не обнаружен;
ОТ – обратная транскриптаза;
п.н – пар нуклеотидов;
ПЦР – полимеразно-цепная реакция;
РИФ – реакция иммунофлюоресценции;
РН – реакция нейтрализации;
РЭК – развивающиеся эмбрионы кур;
РНИФ – реакция непрямой иммунофлюоресценции;

РФ – Российская Федерация;

СПФ – свободные от патогенного фактора;

ТС – тканевая среда;

ФБР – фосфатно-буферный раствор;

ФС – метод фенотипического смешивания;

ФЭК – фибробласты эмбрионов кур;

ЦНС – центральная нервная система;

ЭДТА – этилендиаминотетраацетат;

ADOL – лаборатория онкогенных болезней птиц, США;

dNTP – дезоксорибонуклеотидтрифосфат;

dATP – дезоксиаденозинтрифосфат;

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay

ВВЕДЕНИЕ

Наиболее широко встречающийся в природе ретровирус, вызывающий неопластические заболевания домашней птицы - это вирус лейкоза птиц (ВЛП). Кроме индуцирования опухолей и негативного влияния на продуктивность птицы, он является потенциальным контаминирующим агентом живых вирусных вакцин.

ВЛП является членом лейкозно-саркомной (ЛС) группы, относящейся к подсемейству *Orthoretrovirinae* семейства *Retroviridae* [207], и по свойствам гликопротеинов вирусной оболочки классифицируется на шесть подгрупп: А, В, С, D, Е и J [53, 186]. Экзогенные (подгруппы А, В, С, D и J) и эндогенные вирусы (подгруппа Е) имеют полностью сформированный геном, т.е. не являются дефектными и для трансформации клеток требуют активации генов хозяина (протоонкогенов) [55, 88].

Экзогенные ВЛП способны индуцировать различные формы новообразований; в естественных условиях самым распространенным видом опухолей, вызываемых этой группой, является лимфоидный лейкоз (ЛЛ) или В-клеточная лимфома, первично-образующаяся в Фабрициевой сумке и инициирующая образование метастазов в висцеральных органах [87, 186]. Экзогенные ВЛП передаются обычно как вертикально, так и горизонтально, в процессе, требующем наличия полной инфекционности вируса.

Эндогенные вирусные гены (ev) наследуются, как гены хозяина и могут быть, или не быть экспрессированы [24, 61]. Полностью инфекционные эндогенные вирусы могут предаваться конгенитально, горизонтально или генетически. Экспрессия эндогенных ВЛП (ВЛП-Е) изменяет восприимчивость цыплят, увеличивая продолжительность виремии и последующей толерантности к инфицированию вирусами подгруппы А [9, 61, 88].

Экономические потери птицефабрик, связанные с болезнью, вызываемых ВЛП, складываются из-за увеличения смертности и развития субклинической инфекции. Смертность из-за индуцирования новообразований у птиц может достигать до 20% [94], а субклиническая инфекция вызывает понижающее действие на большое количество показателей производительности, таких как яйценоскость и качество яиц [108, 109, 242]. Совокупный эффект болезни наносит экономические потери, исчисляемые миллионами долларов ежегодно в США [184]. В 1990-х годах бройлерные хозяйства США охватили вспышки миелоидного лейкоза, экономические потери от которых поставили под угрозу целую бройлерную отрасль птицеводства [182, 189, 190, 242].

На данный момент накоплено недостаточно информации о распространении ретровирусов в птицеводческих хозяйствах Российской Федерации. Исследования, направленные на изучение распространения вируса лейкоза птиц были проведены сотрудниками НПО «НАРВАК» в 2001-2003 гг. Частота ВЛП-пораженных хозяйств составила 50% в 2001; 64,7% в 2002; более 80% в 2003. Антиген ВЛП выявлен у птицы в возрасте от 7 до 480 дней [3].

Лечение ретровирусных инфекций не приводит к значительному положительному результату, также не существуют эффективных вакцин против ВЛП. Поэтому основной контроль данных инфекций основан на выявлении и удалении из стада инфицированной птицы [87]. Именно поэтому необходимо совершенствовать и внедрять методы диагностики.

Кроме того, во многих вакцинах медицинского и ветеринарного применения в качестве субстрата для размножения вируса обычно используются эмбрионы кур и культуры клеток куриных фибробластов. Применение этих субстратов в качестве компонентов для производства вакцин требует особого контроля в связи с широким распространением в птицеводческих хозяйствах нашей страны и других стран мира (Европа, Америка, Азия) разных вирусных инфекций с латентным и острым течением,

в том числе вызываемых вирусами лейкоза птиц, вирусами анемии цыплят. Кроме того, отсутствие периодического контроля куриных эмбрионов и клеток куриного происхождения, используемых для культивирования вирусов, может привести к контаминации вирусами животных создаваемых вакцинных препаратов для людей. Поэтому создание эффективной и быстрой тест-системы для выявления вируса лейкоза птиц в различных биологических образцах является актуальной темой.

Цели и задачи исследований.

Цель исследования - молекулярно-генетический анализ и биологическая характеристика полевых изолятов вируса лейкоза птиц, циркулирующих в птицеводческих хозяйствах Российской Федерации, а также разработка тест-системы ПЦР для выявления и дифференциации различных подтипов генома вируса.

Для достижения этой цели необходимо было решить следующие **задачи**:

- провести широкомасштабный мониторинг наличия ВЛП и антител к нему в коммерческих птицеводческих хозяйствах РФ;
- разработать тест-систему для выявления и дифференциации ВЛП подтипов А-D и J методом полимеразно-цепной реакции, оценить ее чувствительность и специфичность;
- оценить значимость разработанной тест-системы ПЦР для диагностических исследований. Разработать Методические рекомендации по выявлению вируса лейкоза птиц в куриных эмбрионах и культурах клеток куриного происхождения методом ПЦР;
- получить банк полевых изолятов ВЛП, циркулирующих на территории РФ и определить их биологические свойства;
- провести молекулярно-генетический анализ полевых изолятов ВЛП, выделенных на территории РФ, проанализировать филогенетические отношения российских и зарубежных полевых изолятов.

Объект исследования. Исследование посвящено изучению вируса лейкоза птиц (ВЛП) - ретровируса, вызывающего неопластические заболевания домашней птицы. Кроме индуцирования опухолей и негативного влияния на продуктивность птицы, он является потенциальным контаминирующим агентом живых вирусных вакцин.

Предмет исследования. Основные результаты получены в процессе изучения распространения ВЛП в коммерческих птицеводческих хозяйствах РФ, а также исследования молекулярно-генетических и биологических свойств полевых изолятов ВЛП, при разработке чувствительной и специфичной тест-системы ПЦР для выявления и дифференциации различных подгрупп ВЛП.

Теоретические и методологические основы исследования. В основу научно-квалификационного исследования легли вопросы вирусологии, молекулярной вирусологии, лабораторной диагностики ВЛП. В процессе работы применялись современные молекулярные и вирусологические методы исследования, методы лабораторной диагностики, эпидемиологические методы. Для анализа значимости выявленных закономерностей применялись современные методы оценки.

Информационная база исследования. В качестве информационных источников использовались научные публикации российских и зарубежных исследователей, материалы конференций, нормативные документы, инструкции к использованным в работе тест-системам, собственные результаты исследований.

Личный вклад автора состоит в сборе биологических образцов, выполнении исследований по молекулярной и серологической диагностике ВЛП в биологических материалах, участию в разработке и тестировании диагностической тест-системы на основе ПЦР, изучению молекулярно-биологических характеристик полевых изолятов ВЛП. Автором лично выделены и изучены молекулярно-биологические свойства 13 полевых

изолятов ВЛП. Все материалы, представленные в диссертационной работе, были обобщены и проанализированы лично автором.

Научная новизна. Получена новая информация о распространенности лейкоза птиц в коммерческих птицеводческих хозяйствах Российской Федерации 2005-2011 г.г.

Проведен молекулярно-биологический анализ российских вирусных изолятов ВЛП, выделенных в 2009-2011 гг., проведено сравнение с зарубежными штаммами. Впервые проведен филогенетический анализ полевых изолятов ВЛП. Установлено, что выделенные нами отечественные изоляты ВЛП, незначительно отличаются от зарубежных.

Впервые в РФ разработана «Тест-система для выявления и дифференциации ВЛП подтипов А-D и J методом полимеразно-цепной реакции». Тест-система предназначена для выявления и дифференциации генома ВЛП в сыворотке крови, в образцах тканей и опухолей, полученных от птиц, а также для анализа качества эмбрионов и клеточных культур птичьего происхождения.

Основные положения, выносимые на защиту.

- Широкомасштабный мониторинг птицеводческих хозяйств РФ на наличие вируса лейкоза птиц (ВЛП) и антител к нему методами ИФА и ПЦР поможет выявить эпизоотическую ситуацию по распространению ВЛП и антител к нему на территории Российской Федерации;
- Разработанная «Тест-система для выявления и дифференциации ВЛП подтипов А-D и J методом полимеразно-цепной реакции» характеризуется аналитической чувствительностью 10 копий РНК/мкл, специфичностью 100% и позволяет определять возбудителя в культуре клеток и в биологическом материале.
- Разработанная тест-система ПЦР позволяет проводить диагностику вируса птичьего лейкоза различных подгрупп, как для единичной особи, так и для группы птиц. Своевременная диагностика вируса птичьего лейкоза может существенно улучшить состояние поголовья в птицеводческих хозяйствах.

-Создание банка полевых изолятов ВЛП, выделенных на территории Российской Федерации в 2009-2011 г.г. позволит провести их биологический и молекулярно-генетический анализ.

- Филогенетический анализ первичной структуры фрагмента *envelope*-гена ВЛП показал, что выделенные нами отечественные изоляты ВЛП незначительно отличаются от изолятов, выделенных на территории других стран, что наводит на мысль об общем предшественнике.

Практическая значимость.

Результаты, полученные при выполнении диссертации, позволили охарактеризовать эпизоотическую ситуацию по лейкозу птиц в птицеводческих хозяйствах РФ.

Изолированный и охарактеризованный штамм ВЛП «2/11», представляющий подгруппу J, депонирован в государственную коллекцию вирусов Российской Федерации (ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России).

Разработан и утвержден комплект нормативно-технической документации (инструкция по применению от 21.05.2009 и ТУ 9388-003-42418073-04, изв. №1 от 20.05.2009) «Тест-системы для выявления и дифференциации ВЛП подтипов А-D и J методом полимеразно-цепной реакции». Данная тест-система может использоваться в региональных ветеринарных и медицинских диагностических лабораториях для мониторинга ВЛП.

Результаты мониторинга птицеводческих хозяйств РФ помогут улучшить контроль чистоты куриных эмбрионов и клеток куриного происхождения, использующихся для культивирования вирусов, при производстве вакцинных препаратов для людей и животных.

Тест-система может также быть использована для проведения научно-практических занятий в Университетах и Институтах медицинского и ветеринарного профиля Министерства Образования РФ.

Подготовлен проект Методических рекомендаций по выявлению вируса лейкоза птиц в куриных эмбрионах и культурах клеток куриного происхождения методом полимеразной цепной реакции. Методические рекомендации предназначены для использования организациями, зарегистрированными в Российской Федерации, выпускающими и контролирующими медицинские, ветеринарные иммунобиологические, профилактические препараты, и специалистами научных лабораторий. Методические рекомендации находятся на рецензии в Роспотребнадзоре.

Внедрение результатов работы.

Нормативно-техническая документация «Тест-системы для обнаружения и дифференциации вирусов лейкоза птиц подтипов AD и J» была передана для производства в ООО «ВЕТБИОХИМ». Разработанная тест-система используется более 5 лет в ветеринарных региональных диагностических лабораториях.

Апробация работы.

Результаты работы представлены на IX международном конгрессе «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 27-30 ноября 2008 г.), на VI Международном ветеринарном конгрессе по птицеводству (Москва, 26-29 апреля 2010), на семинарах USDA-ARS Avian disease and Oncology Laboratory (ADOL) (13 сентября 2009 г. и 20 мая 2011 г.). Материалы диссертации доложены и рассмотрены на заседаниях ученого совета ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского» в 2005-2008 гг.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 5 научных работ, из них 2 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК МинОбрНауки России для публикаций основных результатов исследования.

Структура и объем и диссертации.

Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, 2 глав собственных исследований, их обсуждения, выводов, практических предложений, списка литературы и

приложений. Работа иллюстрирована 9 таблицами, 2 гистограммами, 8 рисунками и 3 приложениями. Список литературы включает 279 источников, состоящий из 9 работ отечественных и 270 зарубежных авторов.

Благодарности.

Автор выражает искреннюю благодарность проф. Гребенниковой Т.В, к.б.н. Дудниковой Е.К., к.б.н. Южакову А. Г., к.б.н. Елисеевой О. В., к. б. н. Алексееву К. П. – за практическую помощь в выполнении отдельных этапов работ, проф. Гребенниковой Т.В. – за консультационную помощь и ценные замечания при написании диссертационной работы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Историческая справка

Лейкоз птиц (гематолимфоматоз, диффузный остеопороз, лимфоидный лейкоз, эритробластоз, миелобластоз) – злокачественная пролиферативная болезнь, вызываемая ретровирусами ВЛП и характеризующаяся поражением, главным образом, органов кроветворения. Лейкоз птиц распространен повсеместно. При обследовании некоторых птицевладельцев нашей страны установлено, что до 80% проб сыворотки крови положительны в отношении вирусов лейкоза [4, 5].

Вирусы лейкоза птиц являются представителями семейства *Retroviridae* и были классифицированы как основной вид рода *Alpharetrovirus* подсемейства *Orthoretrovirinae* [207]. Все существующие штаммы были разделены на 6 подгрупп: А, В, С, D, Е и J [53, 186].

Изучением лейкоза птиц занимались уже давно. Самым ранним сообщением было написано Roloff [211] о случае «лимфосаркомата» в 1868 году, а Caparini [46] в 1896 году описал лейкемию домашней птицы. В 1905 году Butterfield [41] поставил диагноз «нелейкозного лимфаденоза» у трех кур в Соединенных Штатах. В 1908 году в Копенгагене Ellermann и Bang [85] открыли новую ветвь науки – вирусную онкологию, они впервые передали эритролейкемию и миелоидную лейкемию цыплятам путем инокуляции бесклеточного фильтрата. Данному открытию не придали особой значимости, так как в то время лейкемия не признавалась как неопластическая болезнь. Ellermann и Bang также, первыми предложили слово «лейкоз» для обозначения лейкемичных и нелейкемичных случаев болезни.

Ellermann первым дал классификацию патологических форм лейкоза птиц, которая все еще актуальна в настоящее время. В своей монографии Ellermann [84] описал три типа лейкемии: эритроидную («внутрисосудистый

лимфоидный лейкоз»), миелоидную («лейкоз костного мозга») и лимфоидную («лимфатический лейкоз»).

В раннем десятилетии XX века над возможностью экспериментальной передачи саркомы птиц работал Rous. В 1909 году он успешно трансплантировал клетки саркомы от одной курицы другой [213]. Вскоре после этого он обнаружил, что перевиваемая опухоль может экспериментально передаваться через бесклеточные фильтраты. В следующие два десятилетия были открыты еще 20 перевиваемых опухолей птиц, передаваемых через фильтраты [18, 34, 38].

В 1920-1930 годах было выполнено огромное количество исследований по экспериментальной передаче опухолей и было выделено множество штаммов вируса лейкоза птиц [34]. В это время разрешался вопрос о том, какие каузативные агенты вызывают три вида опухолей. Эритроидный и миелоидный лейкозы легко передавались в чистой или смешанной формах, лимфоидный лейкоз не обладал данной особенностью. Только в 1946-1947 годах Furth с сотрудниками [105] в исследованиях представил доказательства экспериментальной передачи лимфоидного лейкоза через фильтраты и доказал вирусную этиологию данной формы лейкоза с помощью экспериментов, выполненных Burmester с сотрудниками [33, 36].

Значительное и быстрое накопление информации о лейкозе птиц и каузативных вирусах произошло после 1960 года. В это время были разработаны техника и методики тканевых культур для изучения взаимодействия вируса лейкоза птиц и клеток-«хозяина» на клеточном уровне [120, 247, 248, 259].

В настоящее время уже определены нуклеотидные последовательности генома многих штаммов вируса лейкоза птиц [21, 81, 148, 222, 228, 235].

1.2. Характеристика ВЛП

1.2.1. Классификация

Вирусы лейкозно-саркомной группы по новой классификации Международного Комитета по Таксономии Вирусов были отнесены к роду *Alpharetrovirus* подсемейства *Orthoretrovirinae* семейства *Retroviridae* в 2005 году [98]. До этого вирусы лейкозно-саркомной группы относили к роду птичьих ретровирусов типа С [130, 207, 260]. ВЛП по новой классификации являются представителями рода *Alpharetrovirus*, кроме ВЛП сюда отнесли онкогенные вирусы саркомы Рауса (RSV): RSV-B, RSV-C, RSV-D, и дефектно-реплекативные вирусы: вирус карциномы птиц Мила-Хилла 2 (ACMHV-2), вирус миелобластоза птиц (AMV), вирус миелоцитоматоза птиц 29 (AMCV-29), вирус саркомы птиц CT10 (ASV-CT10), вирус саркомы Фуджинами (FuSV), вирус саркомы UR2 (UR2SV) и вирус саркомы Y73 (Y73SV). Основными признаками, по которым вирусы ВЛП объединены в род *Alpharetrovirus*, являются структура генома, структура белков, круг естественных хозяев и заключенные онкогены.

Кроме рода *Alpharetrovirus*, представителем которого является ВЛП, подсемейство *Orthoretrovirinae* включает еще 5 родов: *Betaretrovirus*, *Gammaetovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus* и *Lentiretrovirus*.

Достаточно хорошо изучен представитель рода *Betaretrovirus* – вирус рака молочной железы мышей (ВРМЖМ). ВРМЖМ раньше был известен как вирус Биттнера. В 1936 году Joseph Bittner описал его как «молочный фактор», передающийся вертикальной экстра-хромосомальной передачей при выращивании потомства [22]. ВРМЖМ вызывает образование аденокарцином молочной железы у некоторых линий инбредных мышей. Вирус передается как вертикальным, так и горизонтальным путями. Экзогенные вирусы передаются от матери потомству через молоко и вызывают раннее образование аденокарцином у потомства. Эндогенные вирусы в форме провирусной ДНК, встраиваются в половые клетки и

сегрегируются как обычные клеточные гены. Новообразования у мышей, индуцируемые ВРМЖМ, являются доброкачественными и не метастазируются в другие органы.

Изученным представителем *Gammaretrovirus* является вирус лейкемии мышей Абельсона (AbMLV), вызывающий инфекционную болезнь Абельсона у мышей, характеризующуюся прогрессивной трансформацией мышинных лимфоидных клеток и возникновением лимфосарком. Вирус передается как вертикальным, так и горизонтальным путями [50, 149, 271, 274].

Представителем *Deltaretrovirus* является вирус лейкоза КРС (BLV), вызывающий инфекционное заболевание взрослого скота, характеризующееся образованием и развитием неоплазии лимфоцитов и лимфоузлов. Естественными хозяевами являются крупный рогатый скот. Заболевание может быть широко распространено в стаде, но лишь у некоторых особей развивается лимфосаркома со смертельным исходом. Инфекция распространяется горизонтальным путем. Восприимчивые животные обычно инфицируются под воздействием зараженных лимфоцитов [2].

Представителем *Epsilonretrovirus* является – вирус дермальной саркомы судака (WDSV), вызывающий кожные новообразования у морских судаков Северной Америки. Каузативный вирусный агент, вызывающий эпидермальную неоплазию, выделен у судака *Stizostedion vitreum*. Инфекция передается при прямом физическом контакте с другими рыбами, а также через воду, содержащую инфекционные вирусные частицы [262].

Наиболее хорошо изученным представителем *Lentiretrovirus* является – вирус иммунодефицита человека 1 (HIV-1), вызывающий синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД). Инфекция может передаваться через кровь, семенные жидкости, вагинальные жидкости, презервативы и грудное молоко. В данных образцах ВИЧ-1 может существовать в форме свободных вирусных частиц, так и вируса внутри инфицированных

иммунных клеток. Вирус ВИЧ-1 инфицирует основные клетки иммунной системы человека, такие как Т-клетки помощников, особенно $CD4^+$ Т-клетки, макрофаги и дендрические клетки. ВИЧ-инфекция приводит к понижению уровня $CD4^+$ Т-клеток через следующие механизмы: апоптоз неинфицированных близлежащих клеток, прямая вирусная гибель клеток и уничтожение инфицированных $CD4^+$ Т-клеток цитотоксическими лимфоцитами $CD8$, которые распознают инфицированные клетки. Когда уровень $CD4^+$ Т-клеток снижается ниже критического уровня клеточная иммунная система теряет свою эффективность и инфицированный человек становится постепенно более восприимчивым к условно-патогенным инфекциям [150, 264, 272].

1.2.2. Морфология и физические свойства

Морфология и форма вириона схожа с морфологией ретровирусов типа С. Вирионы ВЛП сферической или овальной формы (Рис.1) размером 80-145 нм; нуклеокапсид 35-45 нм, покрытый липидной оболочкой. На поверхности имеются характерные выступы длиной около 8 нм в диаметре с закругленной головкой [4]. Внутренний нуклеокапсид длиной примерно 3-5 нм; центральная сердцевина размером 35-45 нм в диаметре имеет промежуточную и внешнюю оболочки. Вирионы имеют плавучую плотность 1,154-1,17 г/мл в градиенте сазарозы [210].

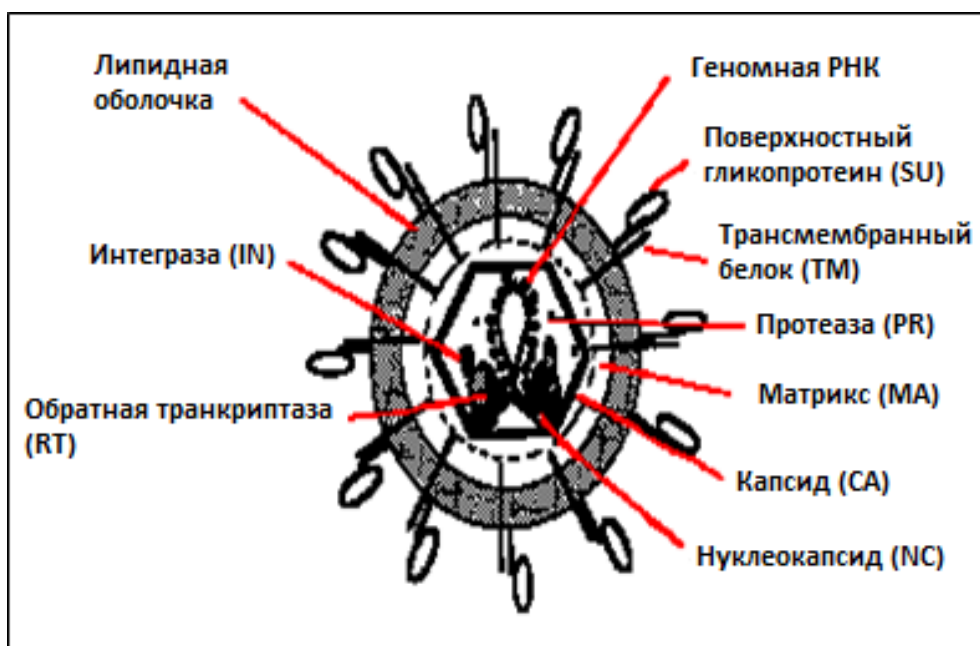


Рис. 1. Строение и структура вириона ВЛП

1.2.3. Организация генома и свойства кодируемых белков

РНК вирусного генома проходят седиментацию при 60-70S. Так же выявляется РНК при 4-5S, которая является, в основном, тРНК хозяина. Считается, что данная тРНК не играет никакой роли при репликации вируса [52, 53]. Однако, праймер тРНК, ассоциированный с 70S РНК, встречается в вирионах и играет определенную роль в цикле размножения вируса. При седиментации 18S и 28S обнаруживается небольшое количество рибосомальной РНК, вирусной и клеточной мРНК. Геномная РНК 60-70S является димерной и расщепляется на две субъединицы при 34-38S.

Геном ВЛП рассматривается как «псевдодиплоидный» из-за наличия двух идентичных положительных одонитчатых РНК, которые содержат генетический материал вируса. Для генетического материала ВЛП характерно наличие двух различных форм: вирус - ассоциированная РНК и провирусная ДНК (Рис.2) [29, 30].

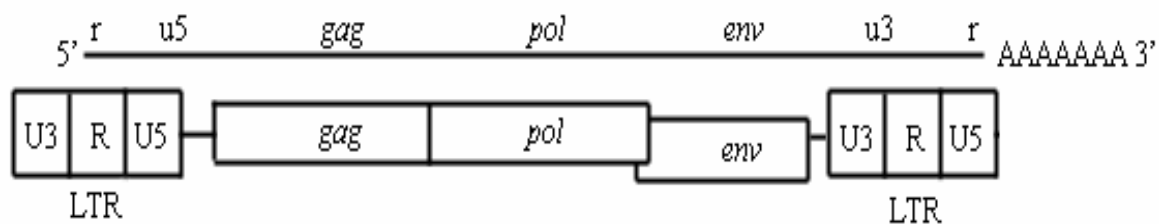


Рис. 2. Геномные структуры вирусной РНК и провирусной ДНК ретровирусов: вирусная РНК представлена тонкой линией на верху рисунка, структура провируса после обратной транскрипции – снизу

Последовательности структурных генов ВЛП от 5'- до 3'-конца молекулы РНК представлены тремя генами *gag*, *pol* и *env*. Эти гены кодируют соответственно белки группоспецифичных антигенов вириона, протеазу, РНК-зависимую ДНК-полимеразу и гликопротеины наружной оболочки вирионов [53, 78, 136]. Структурные гены фланкируются концевыми геномными последовательностями, связанными с репликацией и трансляцией вирусной РНК. Геном состоит из 7,2 тысячи п.н. [122, 123, 266].

Структурные белки ВЛП. Weiss с соавторами подробно изучили природу, локализацию и синтез белков ретровирусов птиц [266, 267]. Вирионы ВЛП содержат пять негликолизированных белков, кодированных геном *gag*. Р27 – главный антиген *gs* (27 кДа), является компонентом капсидного антигена (СА), р19 – матричный белок (МА) и р12-нуклеокапсидный белок (NC) вовлечены в процессинг и упаковку РНК. В то же время р15 и протеаза (PR) участвуют в расщеплении белков-предшественников р10. Ген *env* кодирует два оболочечных гликопротеина вируса *gp85* и *gp37*. Гликопротеин *gp85* (SU) формирует структуры в виде закругленных головок на поверхности вируса, которые определяют специфичность подгруппы ретровирусов птиц. Белок *gp37* (TM) представляет собой трансоболочковую структуру, которая прикрепляет головки к оболочке. Данные белки, связываясь друг с другом, образуют димер, называемый вирусным гликопротеином (ВГП) [147].

Фермент обратная транскриптаза кодируется геном *pol* и входит в комплекс, состоящий из бета-субъединицы (58 кДа) и альфа-субъединицы (58 кДа). Данные субъединицы представляют собой РНК - зависимую ДНК-полимеразу и ДНК:РНК гибрид-специфическую рибонуклеазу Н, соответственно. Также описаны рибонуклеаза, диоксирибонуклеаза, нуклеозидтрифосфат, нуклеотидная киназа, протеинкиназа, нуклеотидтрансфераза, РНК-метиلاза, гексокиназа, аминоксил-тРНК-синтетаза. Считается, что данные ферменты являются клеточными контаминантами [245, 247].

1.2.4. Репликация вируса

Репликация вируса лейкоза птиц происходит как у всех ретровирусов с характерным образованием провирусной ДНК, которая встраивается в клеточный геном «хозяина» при помощи фермента обратной транскриптазы. Провирусные гены транскрибируются в вирусные РНК, которые транслируют и синтезируют белки, входящие в структуру вириона. Объяснение данных событий репликации вируса, подробно описаны и экспериментально доказаны Weiss с сотрудниками [266, 267].

Проникновение вируса в клетку. Адсорбция вириона клеточной мембраной наблюдалась даже в клетках резистентных к данной инфекции, но является неспецифическим процессом [198]. Клеточное проникновение зависит от наличия рецепторов на поверхности клеточной мембраны, кодируемых генами клетки-«хозяина», специфичных для каждой подгруппы. Dales и Hanafusa [72] при наблюдении за процессом вакуолизации вирионов клеткой обнаружили, что вирусная РНК появлялась в ядре в течение 120 минут после вакуолизации.

В последние годы был достигнут значительный прогресс в понимании природы данных рецепторов, используемых вирусами лейкоза птиц различных подгрупп [103, 111, 229, 278]. Рецептор для ВЛП подгруппы А,

обозначающийся как TVA, относится к человеческому рецептору с липопротеинами низкой плотности [151, 275, 278]. После связывания вируса лейкоза птиц подгруппы А с рецептором, запускаются конформационные изменения в вирусном наружном гликопротеине, которые в свою очередь запускают слияние вируса с клеточной мембраной и проникновение вируса в клетку [151, 278]. Рецепторы для вирусов подгрупп В, D и E, обозначающиеся как TVB^{s3} и TVB^{s1}, сходные с рецепторами цитокинов семейства факторов некроза опухолей. TVB-рецепторы являются рецепторами функциональной смерти клетки и ответственны за индуцирование сигналов, ведущих к апоптозу клетки [6, 76, 137, 171, 205]. Рецептор для вируса саркомы и лейкоза птиц подгруппы С TVC относится к рецепторам суперсемейства иммуноглобулинов млекопитающих [6, 54, 56, 83]. Рецепторы клеток-«хозяина», используемые вирусом лейкоза птиц подгруппы J недавно были классифицированы исследователями как куриный Na(+)/H(+) обменный протеин типа 1 (chNHE1) [45].

Синтез и интеграция вирусной ДНК. Уникальная особенность птичьих и других ретровирусов, которая характеризует вирусную репликацию – это образование ретровирусной ДНК от матричной вирусной РНК, интеграция вирусной ДНК (провирус) в геном клетки-«хозяина» и образование новой вирусной РНК от матрицы провирусной ДНК. Основные стадии формирования ретровирусной ДНК: 1) синтез первой (минус) цепи вирусной ДНК, возможно с формированием гибридного комплекса РНК:ДНК; 2) удаление РНК из гибридного комплекса при помощи фермента РНКазы-Н и формирование второй (плюс) цепи вирусной ДНК на основе матрицы минус-цепи ДНК, дающей начало увеличению линейных спаренных ДНК (данные двойные молекулы уже обнаруживаются в цитоплазме клетки через несколько часов после инфицирования); и 3) миграция линейной ДНК в клеточное ядро.

Линейная ДНК встраивается в «хозяйскую» ДНК при помощи фермента интегразы. Интеграция может происходить во многих сайтах ДНК

и инфицированные клетки могут содержать до 20 копий вирусной ДНК. Провирусные гены совпадают с копиями РНК вириона и так же фланкируются на каждом конце идентичной нуклеотидной последовательностью – длинным терминальным повтором (LTR). Данные повторные последовательности образуются от терминальных регионов вирусной РНК и работают как промотеры, контролируя процесс транскрипции вирусной ДНК и РНК. LTR могут также вызывать аномальный процесс транскрипции генов «хозяина», ведущий к развитию онкогенеза [25, 115, 206, 230].

Транскрипция. Формирование новых вирионов в инфицированных клетках является результатом транскрипции и трансляции провирусной ДНК. Процесс включают в себя две основные стадии: 1) Транскрипция вирусной РНК на матрице провирусной ДНК при помощи фермента «хозяина» РНК-полимеразы. Молекулы вирусной РНК действуют как мРНК во взаимодействии с полирибосомами или они служат как геномные РНК для сформированных вирионов. Новая вирусная РНК обнаруживается через 24 часа после начала инфекции. 2) Матричные РНК связываются с полирибосомами и транслируют формы белков, кодируемые генами gag, pol и env, которые входят в состав вириона. Продукт gag-гена является полипротеином-предшественником (76кДа) Pr76^{gag}, который затем расщепляется на белки, входящие в состав сердцевины вириона. Продукт pol-гена – предшественник белка (180 кДа) Pr180^{gag-pol} включает в себя продукты gag-гена, который затем расщепляется на ферменты вирусную полимеразу и РНКазу. Продукт env-гена – предшественник (90 кДа) Pr90^{env} от которого образуются вирусные наружные белки gp85 и gp37. Вирусные белки локализуются в цитоплазме клетки в виде серповидных структур, которые формируются в полноценные вирионы и затем отпочковывающиеся от клетки [17, 19, 20, 54, 116, 277].

Клеточная трансформация и образование опухолей. Существуют два основных типа стратегий онкогенеза, вызываемых ретровирусами птиц [58].

Остротрансформирующие вирусы различаются опс-генами, полученными от нормальной клеточной нуклеотидной последовательности, которые ответственны за неопластическую трансформацию [62, 162, 199]. Вирусы саркомы Рауса (ВСР) несут src-гены, которые кодируют трансформационно-специфический фосфопротеин (60 кДа) pp60^{src} с протеинкиназной активностью. Считается, что метаболический дисбаланс ассоциированный с высоким уровнем pp60^{src} ответственен за состояние клеточной трансформации [23, 124, 125, 226]. Опс-гены, ассоциированные с другими остротрансформирующими вирусами, кодируют разные трансформационно-ассоциированные белки.

Медленно трансформирующие вирусы, такие как LLV, не обладают опс-генами, но вызывают трансформацию клеток опосредованно через активацию клеточных опс-генов. Молекулярные исследования показали, что LLV-провирус встраивается в «хозяйский» c-myc locus и экспрессируется вирусной нуклеотидной последовательностью LTR-промотора. Генетические делеции являются характерной особенностью индуцирования лимфомы интегрированным провирусом [48, 209]. Считается, что экспрессия c-myc гена встраиваемым промотором инициирует лимфогенетический процесс, но для полного развития лимфоидного лейкоза необходимо каскадная активация других трансформирующих генов, таких как B-lym [10, 28, 58, 124, 131, 140].

1.2.5. Устойчивость

ВЛП чувствительны к эфиру, актиномицину Д [100]. Онкогенные вирусы лейкоза птиц термолабильны и быстро инактивируются при температуре выше 46°C, погибают при 37°C в течение двух суток в зависимости от окружающей среды, при 4°C – через 3-4 недели. При 60°C инаktivация происходит за 1,5-2 часа, при 100°C – за 5-10 минут, при температуре ниже -60°C ретровирусы птиц могут храниться в течение нескольких лет без потери инфекционной активности [2, 4, 5].

ВЛП не устойчив при pH 5-9. Под действием УФ-лучей вирусы инактивируются за 45-60 минут [4].

Мгновенная гибель их происходит под действием 30%-го раствора хлорамина и 5%-го раствора карболовой кислоты. При замораживании и размораживании вирус разрушается и выделяется антиген gs [159]. В лиофилизированном состоянии ВЛП сохраняют активность до 9 лет [2, 4].

1.2.6. Антигенные свойства

В состав ретровирусов входят типоспецифические антигены (АГ). Типоспецифический АГ обусловлен белковыми компонентами вирусной оболочки и характерен для каждого из 4-х известных ВЛП. Вирусы с различными типоспецифическими АГ имеют гликопротеидный компонент с различной РНК.

Все вирусы ЛС-комплекса разделены на 6 АГ подгрупп: А (RSV-RAV-1, RSV-RIF-1, RSV-FAV-1, AWP-1, RPL-12, MH-RSV, SR-RV-1), В (RSV-RAV-2, SR-RSV-2, AWP-2, RSV-RIF-2, HA-RSV, RAV), С (RSV-RAV-3, PR-RSV), D (CZ-RSV, RSV-RAV), Е и F (RAV-50, RPL-22, RAV-5). Разделение вирусов на АГ-подгруппы основано на различии оболочек вирионов, интерферирующей активности в отношении вируса саркомы Рауса и способности поражать определенные фенотипы клеток [144, 267]. В природе наиболее распространены вирусы подгрупп А, реже В и С и почти никогда не встречаются представители остальных подгрупп [43, 160, 219]. Недавно описана новая группа вирусов ЛС-комплекса, относящихся к новой подгруппе J [184, 187].

В связи с разнообразием АГ свойств ВЛП для индикации их в исследуемом материале и изучения распространения в хозяйствах используют штаммы наиболее ярких подгрупп: А (RSV-RAV-1), В (RSV-RAV-2), С (PR-RSV), D (CZ-RSV) [2, 4, 39].

Патогенность. Большинство штаммов ВЛП были выделены из различных типов новообразований много лет назад. Впоследствии они многократно пассировались на цыплятах или в клеточных культурах. Штаммы вирусов могут вызывать формирование более одного типа опухолей. Спектр онкогенности каждого штамма имеет свои характерные черты, однако довольно часто он частично совпадает с ответными реакциями на другие штаммы. Например, штамм RPL-12 продуцирует лимфоидный лейкоз, эритробластоз, фибросаркомы, гемангиомы и остеопетроз. А штамм BAI-A продуцирует миелобластоз, саркомы, остеопетроз, гемангиомы, лимфоидный лейкоз, нефробластомы, текомы, опухоли клеток гранулезы и эпителиомы [167]. В большинстве проводившихся ранее исследований штаммы вирусов не были генетически очищены [224]. Поэтому всегда возникал вопрос: способность какого-то определенного штамма вызывать развитие различных новообразований была результатом присутствия в вирусном препарате смеси различных типов вирусов с разными онкогенными свойствами или же это плюрипотентные свойства единственного генетического типа. Исследования показали, что могут приниматься два объяснения. Клоноочищенные штаммы ВЛП могут вызывать широкий спектр новообразований в дополнение к лимфоидному лейкозу, в том числе эритробластоз, остеопетроз и нефробластомы [202]. Другие штаммы вируса состоят из смесей. Так, например, дефектные вирусы острой лейкемии требуют для проведения репликации недефектного вируса или вируса-помощника [221]. В такой ситуации онкогенные свойства могут проистекать от дефектного вируса или вируса-помощника. Тем не менее клоноочищенные штаммы вируса эритробластоза независимо от вируса-помощника могут индуцировать эритробластоз [114, 156]. Изменения в степени взаимодействия между различными чистыми штаммами вируса можно продемонстрировать с помощью методов гибридизации нуклеиновых кислот, при этом разница может быть связана с онкогенными свойствами. Такая разница может заключаться в присутствии особого гена v-онс у сильно трансформирующих

вирусов или в других частях вирусного генома у медленно трансформирующих вирусов [124, 152, 231].

1.2.7. Культивирование

При инокуляции ВСР в хориоалантоисную оболочку (ХАО) одиннадцатидневных чувствительных эмбрионов развиваются опухолевые пустулы, которые можно сосчитать через 8 дней. Количество пустул находятся в линейной зависимости от дозы вируса [80, 145].

Количество вируса можно подсчитать с помощью внутривенной инокуляции этих вирусов в 11-дневные восприимчивые куриные эмбрионы. В течение 2 недель после вылупления образуется большое количество новообразований, в основном эритробластоз, хотя могут развиваться также кровотечения и плотные опухоли, в том числе фибросаркомы, эндотелиальные опухоли, нефробластомы и хондромы. У большинства кур, переживших острые неоплазмы, спустя 100 дней после инокуляции развивается ЛЛ [153, 198].

ВЛП и ВСР вызывают быструю неопластическую трансформацию клеток при их инокуляции на монослойные культуры фибробластов куриных эмбрионов. Происходит пролиферация трансформированных клеток и в течение нескольких дней образуются разрозненные колонии или очаги трансформированных клеток, которые могут использоваться для количественной оценки вируса [248].

Размножение большинства штаммов ВЛП происходит в культурах фибробластов без продуцирования какого-либо очевидного цитопатического действия. Присутствие вирусов можно определить при помощи разнообразных диагностических методов. Вирусы лейкоза подгрупп В и D могут вызывать развитие цитопатических бляшек, которые могут использоваться в вирусологических методах [112, 113]. Помимо этого, отмечались морфологические изменения инфицированных клеток

фибробластов при продолжительном пассировании вирусом лейкоза птиц [42].

1.3. Генетическая вариабельность штаммов ВЛП

Вирусы лейкоза птиц, выделенных от птиц классифицируются на подгруппы А, В, С, D, Е и сравнительно недавно выявленную подгруппу J [182]. Данная классификация основывается на хозяинах-мишенях, на моделях интерференции вирусного наружного белка и кросс-нейтрализации. Вирусный гликопротеин (ВГП), расположенный на поверхности ретровирусных частиц, взаимодействует с рецептором клетки-мишени. Среди белков, кодируемых генами ВЛП, ВГП является главной детерминантой, определяющий фенотип подгрупп. ВГП также определяет антигенность вирусов, так как сыворотки крови, отобранные от иммунизированных кур, показывают высокую специфичность в реакциях с вирусами той же самой подгруппы, а также есть данные что и на тип вируса из той же подгруппы [246]. Данная антигенная вариация между ВЛП может быть специфичная к подгруппам и в то же время типоспецифичная в подгруппе [134]. Ген *env* кодирует два белка *gp85* и *gp37*. Данные белки синтезируются как единый полипептид, который проходит процессинг и транспортируется к клеточной мембране, где они остаются связанными дисульфидными связями [146]. Белок *gp85* содержит детерминанты подгрупповой специфичности, нейтрализации и связывания с рецептором [27].

Самые заметные свойства РНК-вирусов, особенно ретровирусов, это их генетическая нестабильность и разнообразие. Данные свойства могут проявляться в результате большого количества ошибок при синтезе вирусной полимеразы или высокой доли рекомбинации [169]. Селективность антигенных вариантов вирусов может происходить в присутствии или отсутствии иммунного ответа [76]. Было проведено очень много

исследований антигенной вариации у ретровирусов млекопитающих [117, 154, 175, 272], существование таких вариаций у птичьих ретровирусов, особенно у ВЛП, исследований проведено незначительно.

1.3.1. Сравнительный нуклеотидный анализ гена env вирусных изолятов ВЛП подгрупп А-Ж

Zhuan с соавторами сравнивали геномную последовательность двух изолятов ВЛП подгруппы В [279]. В ходе исследований, было установлено, что идентичность аминокислотной последовательности gp85 2 изолятов была 95,4%, идентичность с другими референтными штаммами ВЛП подгруппы В была 91,0-94,9% и меньше чем 87,9% с ВЛП подгрупп А, С, D, Е и Ж. Сравнение нуклеотидной последовательности gag и pol генов показало, что гомология gag-гена и pol-гена двух изолятов в сравнении с референтными штаммами других подгрупп составляла примерно 93%. Гомология LTR-последовательности 2-х изолятов с другими экзогенными ВЛП подгруппами А, В, С, D, Ж составляла 72,6-88,3%, но только 51,5% в сравнении с эндогенными ВЛП подгруппы Е. Идентичность LTR между двумя штаммами ВЛП-В составляла только 74,8% и была несколько ниже, чем идентичность других генов.

Исследования Vova с соавторами подгрупп ВЛП показали, что центральный регион гена gp85 содержит регионы варибельной последовательности и образует пять кластеров hr1, hr2, vr1, vr2 и vr3 [26]. Два больших кластера hr1 и hr2 демонстрировали очень значительную варибельность нуклеотидной последовательности, при этом hr2-домен показывал высокую варибельность в сравнении с hr1-доменом. В исследованиях Dorner и Coffin было установлено, что домены hr1 и hr2 у всех подгрупп ВЛП в основном отвечали за специфичность связывания рецепторов подгруппами А-Е у определенных фенотипических групп кур, которые отличались восприимчивостью к ВЛП различных подгрупп [79].

В дальнейших исследованиях K.Venugopal с соавторами было подтверждено, что аминокислотные замены распределялись в вирусном гликопротеине [258]. В данном исследовании группировка вариабельных последовательностей находилась рядом с вариабельными доменами hr1, hr2 и vt3. Несмотря на высокий уровень вариабельности нуклеотидной последовательности в hr1, hr2 и vt3, множество позиций внутри данных регионов было неизменным. Эти данные были получены, когда были установлены и изучены нуклеотидные последовательности этих регионов у ВЛП подгрупп А, В, С, D и Е. Bai с соавторами в исследованиях установили, что у нуклеотидной последовательности штамма HPRS-103, который относится к подгруппе J, содержалось очень мало консервативных остатков: 1 из 11 в домене hr1, 2 из 6 – в hr2 и 2 из 4 – в vt3 [15, 16]. В исследованиях K.Venugopal с соавторами только единственный консервативный остаток (глицин) в домене hr1 оставался у 11 исследованных изолятов, в одном изоляте был остаток аспартаговой кислоты в данной позиции [256, 258]. Кроме того, домен hr2 у различных вирусных последовательностей, показал очень высокий уровень вариации. При этом, два консервативных аминокислотных остатка у ВЛП всех подгрупп, включая штамм HPRS-103 (аргинин и лизин), были сохранены в последовательностях вирусов. Данные результаты наводят на мысль, что аминокислотные остатки в данных позициях являются необходимыми и не могут быть заменены.

ВЛП подгруппы А используют низкоплотный липопротеиновый рецептор (НПЛПР) для проникновения в клетку-мишень. В исследованиях Rong с соавтами было показано, что основные аминокислотные остатки в hr2 домене играют важную роль в распознавании рецептора и событиях пост-рецепторного связывания в момент вирусного проникновения [212].

1.3.2. Филогенетические отношения изолятов ВЛП

Филогенетический анализ является одним из основных подходов в молекулярной эпидемиологии, позволяющим определить степень родства между полевыми изолятами, выделенными во время различных вспышек, и референтными штаммами. Генетическую и антигенную вариабельность вирусов изучают методом частичного секвенирования определенных фрагментов геномов и аминокислотных последовательностей различных вирусных изолятов и сравнения их с рядом наиболее известных референтных штаммов, нуклеотидные и аминокислотные последовательности которых расшифрованы полностью. Надежность данного метода проявляется в том, что результаты, получаемые при секвенировании различных фрагментов геномов, четко согласуются между собой.

Основным инструментом филогенетического анализа является сравнение близких по структуре или по функции генов или белков, и, прежде всего, сравнение их первичных последовательностей. Имея множество подобных последовательностей, возможно восстановить эволюционные связи между генами и целыми организмами. Эволюционные связи иллюстрируются древовидной структурой, называемой филогенетическим деревом.

В исследованиях K.Venugopal с соавторами было построено филогенетическое дерево, в котором ВЛП подгруппы А, В, С, D и Е образовывали одну филогенетическую группу, показывая близкие отношения между ними [258]. Двенадцать изолятов ВЛП подгруппы J, штамм HPRS-103 и эндогенные ретровирусные элементы из EAV-семейства, образовывали вторую родовую группу. Члены EAV-семейства E51и EAV-HP показали высокую дивергенцию в сравнении друг с другом. Двенадцать изолятов группировали вместе три кластера, один из изолятов формировал с HPRS-103 один кластер. Три изолята образовывали второй кластер и семь изолятов – третий кластер. Включение нуклеотидных последовательностей ВЛП подгрупп J и определенных эндогенных ретровирусных последовательностей

в один филогенетический род показывает близкие отношения ВЛП подгруппы J и E51 с EAV-HP.

Филогенетический анализ нуклеотидной последовательности env-гена различных птичьих ретровирусов подтверждает результаты, что штамм HPRS-103 обособлен от других известных подгрупп ВЛП, и является более близким к EAV-семейству эндогенных ретровирусов. Кроме того, внутри данного семейства наблюдалась также большая дивергенция, но близкое отношение к подгруппе J. Данные результаты подтверждают эволюционирование штамма HPRS-103 в результате рекомбинации с env-последовательностями эндогенных элементов [218, 252]. Дивергенция между нуклеотидными последовательностями эндогенных EAV-HP и двух «хозяйских» видов было не больше чем то что экзогенные варианты ВЛП подгруппы J циркулируют в полевых условиях.

1.4. Клинические признаки

У молодых кур, индеек и диких куриц, зараженных некоторыми вирусами лейкоза (RAV-1, RAV-60, MAV-2[0]), развивались анемия, гепатит, иммунодепрессия и истощение. Некоторые из них погибали [67, 236, 267]. У кур, инокулированных ВЛП RAV-1, отмечалось развитие миокардита и хроническое расстройство кровообращения. У кур, зараженных RAV-7, развивались неврологические признаки, в том числе атаксия, заторможенность и нарушение равновесия из-за негнойного менингоэнцефаломиелита [268]. После инфицирования *in ovo* штаммом RAV-1 наблюдалась устойчивая инфекция ЦНС с воспалительными поражениями и клиническими признаками болезни. Анемия является следствием апластического криза в костном мозге, когда эритроциты не могут внедрять железо в гемоглобин и проявляют уменьшенное время выживания [71]. Изменения в иммунной системе является следствием прекращения созревания В-клеток и блокады в развитии Т-клеток

супрессоров из-за препятствия синтеза функционального интерлейкина-2 [142].

Вирусная инфекция в отсутствии явных клинических признаков заболевания неблагоприятно воздействует на продуктивность кур-несушек. Куры, являющиеся носителями вируса, несут на 25-35 меньше яиц на курицу при содержании в птичнике до 497-дневного возраста. После половозрелого созревания яйценоскость снижается, при этом куры несут яйца меньшего размера и с более тонкой скорлупой. Смертность таких кур от причин, не связанных с новообразованиями, выше на 5-15%, фертильность на 2,4% ниже, выводимость цыплят меньше на 12,4% в сравнении с незараженными курами [85, 240]. Эти вирусы подобным образом воздействуют на бройлерные породы кур, но, помимо этого, вызывают устойчивое и небольшое замедление (до 5%) в скорости роста [69, 109]. В других работах [108, 133, 238] были рассмотрены исследования пониженной продуктивности кур, пораженных ВЛП, а также генетические последствия такого поражения. Снижение выработки спермы не связывают с присутствием в ней ВЛП. Тем не менее, имеется ряд доказательств воздействия ВЛП на качество спермы и ее способность к оплодотворению [223].

Инкубационный период и клинические признаки различаются при разных формах лейкоза птиц.

Лимфоидный лейкоз. При экспериментальном заражении восприимчивых цыплят лимфоидный лейкоз появлялся в возрасте 14-30 недель [31]. Ранее 14-недельного возраста заболевание наступало крайне редко. При полевых вспышках случаи лимфоидного лейкоза могут быть в любое время после 14-недельного возраста. Наибольшая заболеваемость приходится на период половой зрелости [214].

Внешние признаки болезни не являются специфическими. Гребень может стать бледным, сморщенным, а иногда синюшным. Часто наблюдается потеря аппетита, истощение и слабость. Брюшко часто бывает увеличенным, а перья иногда покрываются пятнами уратного и желного пигмента. При

помощи пальпации обнаруживается увеличение печени, фабрициевой сумки и почек. Когда начинают развиваться клинические признаки, ход болезни становится быстрым [37, 38].

Эритробластоз. На инкубационный период влияет источник вируса, штамм вируса, доза, путь заражения, возраст и генетическая структура носителя. Основным определяющим фактором является наличие или отсутствие у вирусного штамма вирусного онкогена. Данный онкоген активирует промоторную вставку клеточного онкогена *c-erb B* и, тем самым, индуцирует эритробластоз с длительным латентным периодом [82, 194, 217, 255]. Полевые штаммы и вирусы, пассированные в клеточной культуре, индуцируют эритробластоз после более длительного инкубационного периода [31]. Полевые случаи заболевания эритробластозом наблюдаются у птиц после трехмесячного возраста [87, 195].

Самыми ранними симптомами являются заторможенность, общая слабость, а также легкая бледность или цианоз гребешка. При развитии болезни бледность или цианоз могут усиливаться. Как правило, наблюдается слабость, истощение и диарея. Кроме того, может наблюдаться обильное кровотечение из перьевых фолликул. Продолжительность такого состояния измеряется от нескольких дней до нескольких месяцев. При сильной анемии, цвет гребешка может измениться от светло-желтоватого до почти белого [87].

Миелобластоз. Самым изученным штаммом вируса, вызывающим преимущественно миелобластоз, является BAI-A. Штаммы являются дефектными и содержат вирусы-помощники подгрупп А и В [105]. После заражения восприимчивых однодневных цыплят большой дозой вируса изменения в крови могут наблюдаться через 10 дней. Пик смертности наступает приблизительно в течение одного месяца. После этого срока количество случаев гибели птиц намного меньше [64].

Симптомы миелобластоза схожи с симптомами эритробластоза. Сначала, появляется заторможенность, общая слабость и легкое побледнение

гребешка. При развитии болезни эти признаки становятся более заметными. Наблюдается потеря аппетита, обезвоживание, истощение и диарея. Может наблюдаться кровотечение из перьевых фолликулов, вызванное снижением свертываемости крови. Продолжительность течения болезни может быть разной, но в основном она больше, чем при эритроблатозе [276].

1.5. Патологоанатомические и гистологические изменения

В конкретной стае кур могут случаться одно и более характерных новообразований, индуцированных вирусами лейкоза птиц.

Опухолевые состояния.

Лимфоидный лейкоз. Часто поражает птиц в возрасте приблизительно 4-месячного возраста [31]. Самой характерной особенностью является присутствие включений с обширными узелковыми новообразованиями в бурсе. Лимфоидный лейкоз обычно вызывается вирусами ВЛП, но иногда наблюдаются случаи индуцированные вирусами ретикулоэндотелиоза. При микроскопическом исследовании диагностируются форменные большие лейкоциты или лимфобласты в новообразованиях, присутствие внутрифолликулярных новообразований в бурсе. Опухоли распространяются и на другие ткани, такие как печень и селезенка. При этом происходит обширное узелковое увеличение данных органов. Опухолевыми клетками являются В-клетки и при помощи специальных иммуноцитохимических методов В-клеточные маркеры и иммуноглобулины М можно обнаружить в опухолевых клетках [59, 164].

Опухоли мягкие на ощупь, гладкие и блестящие. На срезе цвет поверхности может быть от слегка сероватого до светло-кремневого. Иногда может случаться некроз. При узелковой форме опухоли могут варьировать от 0,5 мм до 5 см в диаметре, могут быть единичными или множественными. Гранулярная форма, которая больше проявляется в печени, состоит из множества небольших узелков диаметром менее 2 мм и одинаково

расположенных по всей паренхиме. При диффузной форме орган приобретает слегка сероватый цвет, становится непропорционально увеличенным и рыхлым. Иногда печень становится твердой, фиброзной и приобретает почти песчаный цвет.

Гистопатология. Опухоли состоят из множества лимфоидных клеток, которые немного варьируют по размеру, но все находятся на одной и той же стадии развития. У них имеется плохо определяемая цитоплазматическая оболочка, много базофильной цитоплазмы и везикулярные ядра, в которых присутствует скопление лейкоцитов по краю, а также скопление хроматина и одного или более ацидофильных ядрышек [51, 166].

Эритроидный лейкоз. У птиц, погибших от любой формы заболевания, обычно обнаруживается общая анемия в совокупности с петехиальным кровотечением в различных органах, например, в мышцах, под кожей и во внутренних органах [200]. Может наблюдаться тромбоз, инфаркт и разрыв печени или селезенки. Кроме того, могут быть подкожный отек в легких, гидроторакс и асцит, а также фибриновый сгусток на вентральной поверхности печени [201].

Самым характерным макроскопическим изменением является диффузное увеличение печени и селезенки, и в некоторой степени и почек. Эти органы мягкие и рыхлые, а их цвет обычно бывает от ярко-красного до коричнево-красного. Печень вследствие дегенерации может быть покрыта пятнами вокруг центральных вен долей этого органа. Костный мозг становится гиперпластическим, очень мягким или водянистым, а по цвету – кроваво-красным или вишнево-красным. Кроме того, могут присутствовать кровотечения [201].

При сильной анемии внутренние органы и органы иммунной системы, особенно селезенка, как правило, атрофируются [209].

Гистопатология. Микроскопические исследования костного мозга на ранних этапах эритроблатоза позволяют выявить наличие в кровеносных синусоидах быстро пролиферирующих эритроблатов, которые не могут

развиваться. На более поздних этапах болезни костный мозг состоит из гомогенных эритробластов с маленькими островками миелопоэтической активности, а также небольшим слоем жировой ткани или отсутствием ее. При наличии соответствующей анемии количество эритропоэтических клеток может уменьшаться [158].

Уменьшения во внутренних органах связаны в основном с гемостазом. Это ведет к расширению синусоидов, что особенно заметно в печени, селезенке и костном мозге. При развитии процесса синусоиды становятся значительно расширенными и приводят к сдавливающей атрофии паренхимы [177].

Основными клетками, вовлеченными в патологический процесс, являются эритробласты. Эти клетки имеют большое круглое ядро с малым количеством хроматина. Кроме того, у них имеется одно или два ядрышка и большое количество цитоплазмы, которая является базофильной. Эритробласты имеют неправильную форму. Часто у них имеется псевдоподия. На эритробластах имеются физиологические маркеры, которые определяют их как членов эритроцитного порядка [171].

Миелоидный лейкоз. Поражает в основном взрослых особей, но иногда наблюдается у молодых птиц возрастом примерно 5 недель. При миелобластозной форме наблюдается увеличенная печень, селезенка и другие органы, изменения в данных органах сходны с лимфоидным лейкозом. В хронических случаях печень может быть твердой. В печени, а иногда и в других внутренних органах, могут появиться диффузные опухолевые узелки серого цвета. Костный мозг обычно твердый. Его цвет может быть от красновато-серого до серого. На более поздних стадиях болезни печень, почки и селезенка имеют сероватые инфильтрации, которые являются обычно диффузными, но часто придают органу пятнистый или зернистый вид [114].

Гистопатология. Микроскопическое обследование паренхиматозных органов позволяет выявить скопление миелобластов внутри сосудов и вокруг них с изменчивой долей промиелоцитов. Инфильтрация и пролиферация

особенно обширны вне синусоидов и вокруг путей воротных вен в долях печени. Следовательно, проявляется заметное замещение первоначальной ткани патологическими клетками, в противоположность однородному внутрисосудистому лейкостазу, встречающемуся при эритробластозе. Интенсивная миелобластная активность в костном мозге ограничивается внутрисосудальными областями [110, 143, 187].

Патологические и гематологические особенности миелобластоза и эритробластоза частично совпадают во многих естественно возникающих случаях инфицирования [8, 193].

1.6. Эпизоотологические особенности ВЛП

Экзогенные ВЛП являются широко распространенными вирусами, циркулирующими в коммерческих птицеводческих хозяйствах во всех странах, несмотря на то, что многие птицеводческие компании разрабатывают и проводят программы искоренения ВЛП. Вирусы подгруппы А встречаются наиболее часто по сравнению с вирусами подгруппы В. В исследовании Calnek B. W. [42] 1,6-12,5% эмбрионов, полученных от 8 коммерческих стад кур, содержали ВЛП подгруппы А, при этом наблюдалось значительное распространение ВЛП в каждом стаде. ВЛП подгруппы В встречаются относительно нечасто и распространяются чрез яйца намного реже, чем ВЛП подгруппы А.

Вирусы подгрупп С и D встречаются в полевых условиях очень редко. Но было сообщение, что ВЛП подгрупп А, В, С и D были выделены в коммерческих птицеводческих хозяйствах в Финляндии, при этом 5 из 10 наблюдаемых стад имели антитела ко всем четырем подгруппам ВЛП [219].

Антитела к ВЛП подгрупп А и В были найдены у домашних кур и диких пернатых птиц в Кении и Малайзии, также были сообщения, что в Кении найдены антитела к ВЛП подгруппы D [160]. Вирусы подгруппы F были выделены у обыкновенных и зеленых фазанов [94, 104]. Вирусы

подгруппы G выделены в Эфиопии у серебряных и золотых фазанов [47, 90]. Эндогенный вирус подгруппы H был выделен от венгерской куропатки [121] и вирус подгруппы I выделен от перепелки Гамбела [251]. Также были выделены вирусы от монгольского и свайнова фазанов, китайской куропатки и кур, но они пока не помещены ни в одну из известных подгрупп [47]. Ни один вирус из известных подгрупп ВЛП не был найден у японских перепелов, голубей, пекинской и московской уток [47].

Эндогенные локусы подгруппы E присутствуют практически во всех стадах и могут экспрессироваться как экзогенные вирусы лейкоза подгруппы E. Однако, вирусные локусы подгруппы E не проявляют онкогенность. Нуклеотидная последовательность ДНК, схожая с вирусом RAV-0 – эндогенным ретровирусом птиц, была найдена в зародышевых клетках у многих видов домашних кур и некоторых семейств отряда курообразных. Куропатки, фазан обыкновенный, шотландский тетерев и кустарная дикая курица содержали нуклеотидную последовательность, комплементарную RAV-0, тогда как цесарка, перепел, павлин и индейка не имели такую последовательность [61, 101, 128, 170].

ВЛП подгруппы J распространен глобально и поражает в основном кур мясных пород. Антитела к новой подгруппе J были найдены у 3 из 5 линий кур мясной породы, у 7 линий несушек ВЛП-J обнаружить не удалось [192]. При использовании вирусологических и серологических методов распространение ВЛП подгруппы J было зафиксировано как высокое, на уровне 87% [79]. Похожие результаты были доложены другими авторами из других стран [70, 249, 273]. Потери от развития неопластических форм лейкоза, в основном от миелоидного лейкоза, могут составлять от 50% зараженного поголовья. Кроме потерь от опухолей, присутствие экзогенной ВЛП инфекции неблагоприятно влияет на яйценоскость, размер яйца, фертильность, выводимость птенцов, скорость роста и неспецифическую смертность [91, 94].

Изучение распространения ВЛП в нашей стране начались только в 1970-х годах [9], после выполнения исследований по созданию группы кур, свободной от контаминации вирусами ЛС-комплекса [5, 6]. В данных исследованиях частота выявления ВЛП подгруппы А варьировала от 4,1 до 42,3% от количества исследованной птицы. Были также обнаружены антитела к ВЛП подгруппы В с частотой 2,7 -25,9% и к ВЛП подгруппы С – 2,7-11,5%. Антител к подгруппе D не обнаружили [9].

На данный момент недостаточно информации о распространении ВЛП в птицеводческих хозяйствах Российской Федерации. Исследования, направленные на изучение распространения вируса птичьего лейкоза были проведены сотрудниками НПО «НАРВАК» в 2001-2003 г.г. [3]. Частота хозяйств пораженных ВЛП составила 50% в 2001; 64,7% в 2002; более 80% в 2003. Антиген ВЛП выявлен у птицы в возрасте от 7 до 480 дней. Дифференциация ВЛП по подгруппам в данных исследованиях не проводилась.

1.6.1. Распространение

ЛЛ лишь в некоторых случаях приводит к значительным потерям, например 23% в коммерческих племенных стадах [182, 183]. Тем не менее, спорадические случаи бывают в большинстве стад. De Boer [74, 75] отмечал в своей работе, что смертность от ЛЛ в Нидерландах составляла 2,18% среди 11220 белых несушек и 0,57% среди 7920 коричневых несушек. Исследовались различные образцы, полученные в период с 1973 по 1979 гг. Частота заболеваний ЛЛ у кур может уменьшаться из-за большого распространения вируса инфекционной бурсальной болезни (ВИББ) [66, 132]. И наоборот, наличие вируса болезни Марек 2 серотипа (ВБМ-2) в стаде увеличивал частоту случаев ЛЛ у вылупившихся цыплят некоторых линий кур после контакта с ВЛП [74, 95]. Также было отмечено повышение частоты заболеваний спонтанной бурсальной лимфомой у цыплят породы белый леггорн, инокулированных ВБМ серотипа 2 [93]. Анализ

молекулярной и *in situ* гибридизации бурс, полученных от цыплят коинфицированных ВЛП и ВБМ серотипа 2, показал, что ВБМ близко ассоциировался только с трансформированными бурсальными клетками. Исследования *in vivo* также показали, что ВБМ серотипа 2 увеличивал генную экспрессию вирусов лейкоза птиц и вируса саркомы Рауса [96, 181].

По сравнению с ЛЛ эритробластоз встречается в полевых условиях не часто [183]. Отмечалось, что в виде исключения он встречается у пятинедельных птиц эпизоотически [119]. Имеются очень мало сообщений о миелобластозе в естественных условиях. Случаи этого заболевания встречались спорадически. Спорадические случаи миелоцитоматоза встречались у молодых птиц [204, 253]. Болезнь наблюдалась примерно у 1% птиц у двух обследованных бройлерных стад в одном птицеводческом хозяйстве.

До недавнего времени и до признания существования новой подгруппы ВЛП J, болезнь в форме миелоцитоматоза в основном проявлялась спорадически у молодых и взрослых птиц [161]. Общая заболеваемость в 27% миелобластозом была отмечена у кур мясных пород, инокулированных штаммом HPRS-103 подгруппы J ВЛП [168]. Высокий уровень опухолей, индуцируемых ВЛП подгруппы J, был отмечен во многих странах [66, 219, 249, 273]. Смертность превышала на 1,5% нормальный уровень смертности в неделю в некоторых стадах коммерческих бройлеров [94].

Из всех других опухолей, не относящихся к лейкозным, гемангиомы составляют до 25 и 19%, а нефробластомы до 19 и 3-10% у бройлеров [44, 139] и несушек соответственно [204]. Эпизоотические вспышки гемангиосарком у несушек были зарегистрированы в Израиле [40].

Недостаточно информации относительно частоты развития опухолей соединительных тканей. Они не часто становятся основной причиной смерти. У бройлеров такие опухоли составляют около 20% от всех новообразований, не относящихся к лейкозной группе [44]. Тем не менее, встречаются случаи эпизоотии. Ретек сообщал о вспышках гистиоцитных сарком в стаде из 600

одногодových кур [196]. Опухоли были обнаружены у 400 птиц или 90% от общего числа стада, обследованных на протяжении четырех месяцев

Остеопетроз встречается во многих местах и эпизоотии случались спорадически у бройлеров. Было отмечено, что остеопетроз встречается у всех видов кур, при этом чаще этим заболеванием поражались петухи [127]. У индеек остеопетроз встречается очень редко [120].

1.6.2. Вирусоносительство

Естественными носителями для всех вирусов ВЛП-группы являются куры [192]. Также вирусы выделены от фазанов, куропаток и обыкновенных перепелов. При проведении исследований в лабораторных условиях, было установлено, что некоторые представители ВЛП имеют широкий круг хозяев и адаптируются к росту в необычных хозяевах. Для этого вирусы пассировали в очень молодых животных или проводили индуцирование толерантности перед инокуляцией вируса. Вирус саркомы Рауса имеет самый широкий круг хозяев. Он может вызывать развитие опухолей у кур, фазанов, цесарок, уток, голубей, японских перепелов, индеек и каменных куропаток. Некоторые штаммы ВСП способны индуцировать развитие опухолей у млекопитающих [126, 180, 259], включая представителей обезьян [141]. Nehyba и его коллеги [163] обнаружили, что, несмотря на отсутствие виремии и развития нейтрализующих антител, ВЛП продолжает существовать, по крайней мере, в течение трех лет в тканях уток, которые были инокулированы эмбрионально ВЛП. Данное открытие показывает, что утки являются идеальным экспериментальным объектом для изучения персистенции ВЛП. Однако, у уток, инфицированных в эмбриональном возрасте вирусами ЛП подгруппы С, не наблюдалось клинических признаков болезни вскоре после вылупления [238, 250].

Сообщалось также об индуцировании лимфоидного лейкоза у страусов [107]. Некоторые штаммы вируса саркомы вызывают развитие опухолей у

млекопитающих, в том числе обезьян. Остеопетроз может развиваться у индеек, при инокуляции свежей цельной кровью, полученной от инфицированных цыплят [121]. Также, индейки являются очень восприимчивыми животными к инфекции, вызываемой ВЛП подгруппы J. Штамм HPRS-103 ВЛП подгруппы J индуцировал развитие опухолей острой формы у индеек [185, 269].

1.6.3. Пути передачи

Экзогенные ВЛП передаются двумя способами: вертикально-от курицы ее потомству через яйца и горизонтально-от птицы к птице через прямой или непрямой контакт [60, 215, 216]. Несмотря на то, что в обычных условиях лишь небольшая доля цыплят инфицируется вертикально, данный маршрут передачи является важным с точки зрения эпизоотологии. Это связано с тем, что такой маршрут позволяет поддерживать инфекцию при переходе от одного поколения к другому [239]. Большинство кур заражаются при близком контакте с врожденно-инфицированными птицами. Несмотря на важность вертикальной передачи в поддержании инфекции, горизонтальное инфицирование может также быть необходимым для поддержания интенсивности вертикальной передачи на достаточном уровне для недопущения исчезновения инфекции [185]. При непосредственном контакте инфекция не распространяется быстро. Вероятно, это связано с относительно коротким сроком жизни вируса вне носителя.

У зрелых кур имеется четыре серологических класса инфекций, вызванных вирусом лейкоза птиц: 1) отсутствие виремии, отсутствие антител (V-A+); 2) отсутствие виремии, наличие антител (V-A+); 3) наличие виремии, наличие антител (V+A-) [157, 215, 216]. Птицы в стадах, свободных от возбудителей инфекционных болезней (SPF), и генетически устойчивые птицы попадают в категорию V-A-. Генетически восприимчивые птицы в инфицированных стадах попадают в одну из трех других категорий.

Большинство – в категорию V-A+, а меньшинство (обычно менее 10%) – в категорию V+A-. Преобладающее количество кур категории V+A- передают вирус лейкоза птиц разной, но сравнительно большой доле своего потомства [189, 216]. Из кур, относящихся к классу V-A+, лишь небольшая доля передает вирус потомству. К тому же это происходит не всегда. Рауне было установлено, что среди кур этой категории чаще передают вирус лейкоза птиц те особи, которые имеют низкий титр антител [183]. У врожденно-инфицированных эмбрионов развивается иммунологическая толерантность к вирусу и после вылупления они попадают в класс V+A- с высоким уровнем вируса лейкоза в крови и отсутствием антител. Куры более старшего возраста (2 или 3 года) передают вирус в свои яйца реже и меньшими дозами, чем птицы, возраст которых менее 18 месяцев [35]. Инфицирование петухов, по-видимому, не влияет на степень врожденного инфицирования потомства [155, 179]. На распространение и врожденную передачу после горизонтального инфицирования оказывает влияние генетика носителя и штамма вируса лейкоза птиц [46]. При использовании электронного микроскопа наблюдалось почкование вируса на всех структурах репродуктивных органов петухов, за исключением герминальных клеток [77]. Это доказывает, что вирус лейкоза птиц не размножается в этих клетках. Следовательно, петух выступает лишь как носитель вируса и источник контактного или полового инфицирования других птиц [163, 165]. Врожденное инфицирование эмбрионов тесно связано с распространением курами вируса лейкоза в яичном альбумине и с присутствием вируса в вагине курицы [189, 241]. Кроме того, эти особенности имеют сильную корреляцию с виремией.

Выделение вируса лейкоза птиц в яичный альбумин и, следовательно, последующая передача эмбриону – результат размножения вируса в альбуминсекретирующих железах яйцевода. Исследования с помощью электронного микроскопа показали, что уровень репликация вируса в яйцеводе значительный [77]. Почкование вируса происходит также в

различных типах клеток яичника, кроме фолликулярных клеток и яйцеклеток. Таким образом, трансовариальная инфекция не кажется значительной [189]. Полного инфицирования эмбрионов или цыплят, полученных от яиц с вирусом лейкоза птиц в альбумине, не происходит. В исследованиях Spencer и соавт. [241] и Раупе и соавт. [189] было установлено, что только $\frac{1}{2}$ - $\frac{1}{4}$ эмбрионов инфицировались в яйцах с содержанием вируса в альбумине. Данная нестабильная врожденная передача, возможно, является результатом нейтрализации вируса антителами или термальной инактивацией вируса.

В исследованиях с использованием электронного микроскопа вирусные частицы были обнаружены во многих органах инфицированных эмбрионов, при этом вирус отпочковывался и аккумулировался в значительных количествах в панкреатических ацинозных клетках эмбрионов [135, 277]. Данные частицы, являющиеся высоко инфекционными, выделялись с пометом у недавно вылупившихся цыплят [32]. Инфекционный вирус также присутствовал в слюне и экскрементах более старших птиц, которые являются источником горизонтальной передачи вируса другим птицам [68, 102, 270].

Обычно, только у меньшинства птиц, инфицированных вирусом лейкоза птиц, развивается лимфоидный лейкоз, остальные птицы остаются носителями или разносчиками инфекции. Сообщалось, что у толерантных птиц к вирусу лейкоза (V+A-) вероятность смерти от лимфоидного лейкоза в несколько раз выше, чем у птиц с антителами (V-A+) [216]. Частота заболеваемости лейкозом быстро уменьшается в случае, если инфекция заносится цыплятам через несколько недель после вылупления [37], так как именно в данном возрасте у цыплят формируются устойчивые генетические отличия к восприимчивости к лимфоидному лейкозу, которые равнозначны восприимчивости к вирусной инфекции [68].

Эндогенные ВЛП обычно передаются генетически в зародышевых клетках обоих полов. Многие из них являются генетически дефектными. Именно поэтому они не могут привести к развитию инфекционных вирионов.

Однако, некоторые из них могут экспрессироваться в инфекционную форму в эмбрионах или у вылупившихся птенцов. В этой форме они передаются впоследствии экзогенным вирусам, хотя большинство кур являются генетически устойчивыми к такой экзогенной инфекции [69].

1.7. Методы диагностики ВЛП

Быстрая и точная диагностика ВЛП – один из решающих моментов эффективной борьбы с болезнью и снижения экономических потерь у птицеводческих хозяйств. Диагностика ВЛП проводится комплексно с учетом эпизоотологических данных, результатов патологоанатомического вскрытия и гистологических исследований, выделения вируса на чувствительных биологических моделях и последующей идентификации с помощью ПЦР, РИФ, РСК, ИФА, КОФАЛ-тестов и постановки биопробы.

Выделение и идентификация ВЛП. Плазма, сыворотка и опухоль являются наилучшими материалами для выделения вируса [202]. Кроме этого, вирус можно выделить из большинства мягких органов тела, а также из оральных смывов и помета [32, 215], из альбумина только что снесенных яиц или из 10-дневного эмбриона яиц, снесенных курами, которые передают вирус вертикально [241], из перьевой пульпы и из семенной жидкости [223]. Все вирусы этой группы термолабильны и могут храниться длительное время при температуре ниже -60 С.

Первой успешной процедурой, разработанной для выделения вируса, была инокуляция чувствительных цыплят. Некоторые вирусы, например, вирус саркомы Рауса, продуцируют пустулы на хориоалантоисной оболочке эмбрионов в яйцах. Эти процедуры были в дальнейшем заменены на более быстрые и менее дорогостоящие методы с применением клеточных культур. В настоящее время используются клетки фибробластов куриных СПФ-эмбрионов, чувствительных ко всем подгруппам ВЛП, кроме подгруппы Е. Культуру клеток сажают на плашку, вносят образец и инкубируют в течение

7 дней. После инкубирования собирают супернатант и замораживают в холодильнике на -70°C , как вирусный изолят. Клетки фибробластов куриных эмбрионов разрушают ультразвуком и исследуют на наличие группоспецифического антигена ВЛП р27 при помощи коммерческих наборов ИФА [88, 129].

РИФ. Для данной реакции используют флюоресцирующую сыворотку к gs-антигену ВЛП [191]. В качестве исследуемого материала используют мазки крови кур, зараженные культуры ФЭК. Преимущество РИФ перед РСК и КОФАЛ-тестом заключается в том, что этот метод позволяет не только обнаружить антиген вируса, но и определить его локализацию на различных стадиях взаимодействия вируса и клетки.

РСК. Реакция заключается в индикации группоспецифического gs-антигена ВЛП в исследуемом материале, с помощью известной положительной сыворотки. Так как реакция группоспецифическая, положительный результат должен быть получен при использовании сыворотки для любого серотипа.

КОФАЛ-тест. В принципе он не отличается от известной методики постановки РСК и используется для обнаружения группоспецифического антигена в культуре клеток фибробластов, инокулированной вирусом [196, 220]. Данный тест применяется в тех случаях, когда в исследуемом материале антиген ВЛП находится в невысоких титрах и не улавливается в РСК, но культивирование инокулированной культуры клеток необходимо проводить в течение 14 дней.

Данный метод проводится в две стадии: размножение вируса ВЛП и обнаружение gs-антигена ВЛП реакцией связывания комплемента (РСК) [196].

Антисыворотки для КОФАЛ-теста на gs-антиген получают от хомяков с саркомой, индуцированной ВСП (обычно используют штамм the Schmidt-Ruppin strain) [196]. Также для данного теста могут использоваться антисыворотки кроликов и других млекопитающих [11, 118, 191].

РИФ-тест. Его суть заключается в том, что ВЛП предотвращает развитие очагов трансформации в культуре ФЭК после заражения ее ВСР, т.е. тест основан на интерференции между ВЛП и ВСР [196, 208, 243]. Реакция является типоспецифичной и поэтому для контрольного заражения используют типовые штаммы ВСР подгрупп А, В, С, D, J. С помощью этого метода исследуют на содержание ВЛП КЭ, сыворотки крови и надосадочную жидкость из гомогенатов органов птиц подозрительных по заболеванию лейкозом [14, 173].

Иммуноферментный анализ (ИФА). Предложена модификация метода определения ВЛП, в основу которой положено сочетание методики культивирования клеток пульпы пера, с использованием микроплашек с экстрацеллюлозной основой и ИФА. Полученные результаты указывают на высокую чувствительность метода, позволяющего классифицировать генетическую чувствительность или резистентность птицы к ВСР в короткие сроки с небольшими экономическими затратами [49, 73, 92, 232].

ИФА с использованием моноклональных антител. Позволяет дифференцировать экзогенные и эндогенные ВЛП. Получены пять линий гибридомных клеток, секретирующих моноклональные антитела к группоспецифическим gs-антигенам. Три гибридных клон секретируют моноклональные антитела к полипептиду p27 и два – к фосфопротеину p19 [49].

При сравнительном обнаружении группоспецифического gs-антигена ВЛП в альбумине яиц кур с помощью методов РСК и модифицированного ИФА с использованием моноклональных антител показана значительно большая чувствительность ELISA-метода [232].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Наиболее чувствительным методом обнаружения ВЛП в различных биологических образцах является метод ПЦР; при использовании “гнездовой” системы праймеров разрешающая способность реакции очень высока [106]. Практически все

праймеры разрабатываются к нуклеотидной последовательности env и LTR регионов.

Van Woensel, P.A., A. van Blaaderen с соавторами разработали метод ПЦР специфичный к ВЛП подгруппы А, который обнаруживал провирусную ДНК и вирусную РНК ВЛП [254]. Van Woensel, P.A., A. van Blaaderen с соавторами тестировали данный метод на различных образцах органов инфицированных цыплят. На второй неделе после инокуляции цыплят, вирусную РНК ВЛП-А удалось обнаружить в сумке Фабрициуса, тимусе, костном мозге, преджелудке, печени, селезенке, гонадах, мышцах и в крови. На 4-неделе после инокуляции провирусную ДНК ВЛП-А обнаружили во всех органах.

E.J.Smith, S.M.Williams с соавторами разработали метод ПЦР для обнаружения ВЛП подгруппы J [233]. Праймеры были гомологичны Е-элементу и 3'-концу LTR провирусному ВЛП-J. Данные авторы экстрагировали ДНК из клеток фибробластов, инфицированных штаммом HPRS-103 - прототипом ВЛП-J и полевыми изолятами ВЛП-J, выделенные от стада бройлеров с клиническими признаками миелоидного лейкоза. Данный метод обнаружения ВЛП был специфичен только для подгруппы J, вирусы подгрупп А, В, С, D и Е не обнаруживал. ПЦР также обнаруживал ВЛП-J в ДНК, экстрагированных из крови, гребня и пальца. Чувствительность данного метода обнаружения ВЛП-J составляла 10^{-15} г РНК или 210 копий ВЛП-J.

1.8. Иммунитет

Активный иммунитет. В естественных условиях большинство цыплят заражаются экзогенным ВЛП от своих собратьев или окружающих предметов. После этапа кратковременной вирусемии у них развиваются вируснейтрализующие антитела, которые растут до высоких титров и остаются у птиц на всю жизнь [216]. Вируснейтрализующие антитела служат для ограничения у птицы количества вируса, что в свою очередь может

ограничить неоплазию. Тем не менее, считается, что они оказывают малое непосредственное влияние на рост опухолей [31]. При инокуляции ВЛП цыплятам в возрасте от 4 недель и выше, кратковременная виремия наблюдалась после 1 недели, а образование антител наступало через 3 недели и позже [93]. В исследованиях естественно инфицированных цыплят после вылупления, антитела впервые обнаруживали только в 9-недельном возрасте. В возрасте 14-18 недель 80% поголовья оказалось сероположительной, при этом отмечалось увеличение пропорции антител [186]. Чем моложе птица, тем больше продолжительность виремии и длительней период формирования антител. Инокуляция однодневных цыплят приводит скорее к долговременной виремии, чем к формированию антител.

У ВЛП-инфицированных птиц часто происходит формирование антител к gs-антигену, но это не оказывает никакого влияния на рост новообразований. Данных о клеточном иммунитете при ВЛП-инфекциях недостаточно. Вероятно, он направлен одновременно против вирусной инфекции и формирования новообразований. У птиц, инфицированных ВЛП или ВСР, встречаются также цитотоксические лимфоциты, направленные против антигенов вирусной оболочки [31, 227, 261]. Экспрессированные вирусные белки на поверхности опухолевых клеток являются основными мишенями клеточного иммунитета, но также сюда входят и невирусные поверхностные антигены трансформационно-специфических клеток.

При проведении исследований сарком Рауса было установлено, что опухоленесущий хозяин реагирует на опухоль-ассоциированные поверхностные антигены клеток (ОАПА). Эта реакция служит для замедления роста опухолей или вызывает регрессию. ОАПА могут быть вирусными структурными антигенами и поражаться антивирусными реакциями организма. Кроме того, они могут быть опухолевыми антигенами, появляющимися на опухолевой клетке. Такие опухолевые антигены могут быть вирусонаправленными, вируссpezifичными или депрессивными антигенами хозяина. ОАПА могут обозначаться как опухолесpezifичными

антигенами трансплантации (ОСАТ), когда они индуцируют иммунитет *in vivo* или только как специфичные в отношении трансформации поверхностные клеточные антигены (СТПА) при проведении их в исследованиях *in vitro* [97, 171, 212]. В настоящее время недостаточно данных о противоопухолевом иммунитете при ЛЛ. В некоторых случаях инфицирование ВЛП может сопровождаться иммуносупрессией. Однако, Fadly и его коллеги [90] наблюдали, как иммунные функции В- и Т-клеток оставались нормальными на ранних и более поздних стадиях инфекции, вызванной штаммом RAV-1 ВЛП.

Генетически резистентные цыплята устойчивы к инфицированию и индуцированию развития опухолей ко всем подгруппам вирусов лейкоза и саркомы птиц. Обычно у них даже не развиваются антитела [63, 68, 99]. Генетическая устойчивость к развитию опухолей исследовалась, в основном, с саркомой Рауса, регрессия которой определялась наличием доминантного гена R-RS-1, располагающегося в главном комплексе гистосовместимости (Еа-В локус). Локус Еа-В также влияет на возникновение эритробластоза и меньшее влияние оказывает на лимфоидный лейкоз [12]. Васон L.D. с соавторами сообщали [13], что некоторое влияние на регрессию саркомы Рауса оказывает локус лимфоцитарного антигена В_ц-1, а на лимфоидный лейкоз – локус Th-1.

Генетическая устойчивость к развитию опухолей лимфоидного лейкоза, такая как у RPL линии 6, обусловлена бурсальными клетками, а не клеточными элементами иммунной системы, такими как клетками тимуса, формирующимися в тимусе или нелимфоцитарные клетки. Считается [203], что это происходит из-за внутренней неспособности бурсальных целевых клеток становиться инфицированными или трансформироваться и это является основным фактором генетической резистентности. Vaba и Humphries не обнаружили существенной разницы протекания бурсальной инфекции у чувствительных и резистентных линий кур [10].

Пассивный иммунитет. Сывороточные антитела, которые представлены в основном иммуноглобулинами класса G, передаются от курицы своему потомству [183] через яичный желток. В результате у цыплят формируется пассивный иммунитет, который длится в течение 3-4 недель. Такие пассивно приобретенные антитела задерживают инфицирование ВЛП [265, 271] и уменьшают частоту развития опухолей [32], снижают частоту вирусемии и распространение ВЛП [89]. Уровень и устойчивость иммунитета у цыпленка связаны с титрами антител в сыворотке его матери.

1.9. Меры борьбы и профилактики

Ликвидация ВЛП из племенных стад один из самых эффективных методов за контролем ВЛП-инфекции. Племенные фабрики яичного и мясного направлений достигли значительного прогресса в уменьшении или полной ликвидации вирусов лейкоза птиц подгрупп А, В и J из элитных линий племенных кур [238].

Экзогенные ВЛП можно устранить из птичьих стад. Вплоть до 1977 года данная процедура применялась только для экспериментальных или специальных, свободных от специфических возбудителей инфекционных заболеваний, стад птиц. Это было связано с тем, что применявшиеся методы были длительными по времени, сложными и дорогостоящими. В дальнейшем, благодаря применению методов Spencer [238], такие процедуры стали возможными и для коммерческих стад.

Искоренение инфекции, вызванной ВЛП, направлено на прерывание вертикальной передачи вируса от курицы к ее потомству. Чтобы сделать стаю свободной от лейкоза необходимо выводить, выращивать и содержать в изоляции группы кур, которые не передают вирус своему потомству.

Процедура устранения ВЛП включает:

1) отбор способных к оплодотворению яиц от куриц, показавших негативную реакцию в тестах с использованием яичного альбумина или влагалищных мазков [65, 88, 89, 172, 186];

2) выведение цыплят в изоляции небольшими группами в клетках с проволочным полом, отказ от ручного метода определения пола цыплят путем исследования клоаки [89] и проведения вакцинации обычной иглой [93] для предотвращения механического распространения какой-либо остаточной инфекции;

3) проверку цыплят на ВЛП с помощью биологических тестов или ПЦР образцов крови и отбраковывание цыплят с положительной реакцией и других находящихся с ними в контакте цыплят [88, 89, 176, 225];

4) выращивание в изоляции свободных от ВЛП групп птиц. На практике отбор куриц с низкой степенью распространения вируса проще для выполнения, чем последующая проверка цыплят и выращивание их в изоляции для достижения полного устранения инфекции. Поэтому некоторые коммерческие птицеводческие хозяйства концентрируют свое внимание только на уменьшении степени инфицирования посредством проверки куриц. Для многих линий кур был замечен прогресс в уменьшении степени распространения вируса, но некоторые линии плохо реагировали на отбор [172, 176]. Такая реакция не была связана с породами кур, а обусловлена, по всей вероятности, факторами внешней среды.

В США была разработана также программа для тестирования элитных племенных птиц, которая используется для устранения ВЛП подгруппы J у кур мясной породы [176, 238]. Данная программа включает в себя следующие процедуры:

А) исследуют клоакальные смывы у птиц 20-недельного возраста на наличие gs-антигена коммерческими наборами ИФА и позитивных на gs-антиген кур отбраковывают;

Б) на 22 неделе исследуют сыворотки крови у птиц на вирусемию. Изолированный вирус тестируют при помощи ПЦР для подтверждения подгрупповой специфичности;

В) на 23 неделе или старше отбирают по два первых яйца от каждой курицы и исследуют яичный альбумин на наличие gs-антигена, позитивных птиц на gs-антиген отбраковывают;

Г) на 26 неделе отбирают образцы мекониума от первых цыплят всех несушек и исследуют на gs-антиген, положительных цыплят и их родителей отбраковывают;

Д) примерно на 40 неделе повторно тестируют образцы альбумина и мекониума на наличие gs-антигена, позитивных кур и цыплят отбраковывают.

Данные пять процедур позволяют прогрессивно обследовать петухов и кур, а также их потомство на всех этапах их жизненного цикла.

Куры больше всего чувствительны к контактному инфицированию ВЛП сразу же после вылупления. Хотя основным источником инфекции являются другие цыплята, врожденно инфицированные ВЛП, разработаны ряд процедур, позволяющих уменьшить или исключить инфекцию, оставшуюся от предыдущих популяций птиц. Инкубаторы, выводные отделения, птичники и все оборудование необходимо чистить и дезинфицировать перед каждым новым их использованием. Опасность попадания в стадо штаммов вируса, еще не присутствующих в популяции, можно исключить, если не смешивать яйца или цыплят из различных источников и выращивать цыплят в изолированных условиях, позволяющих предотвратить перекрестное заражение стад [89, 176].

1.10. Заключение по обзору литературы

Таким образом, анализ литературных данных показал, что ВЛП является широко распространенным вирусом, циркулирующим во всех

хозяйствах многих стран. Самыми распространенными ВЛП являются представители подгрупп А, Е и J. ВЛП индуцирует образование обширных опухолей, тем самым наносит большие экономические потери для птицеводства.

Кроме того, во многих вакцинах медицинского и ветеринарного применения в качестве субстрата для размножения вируса обычно используются эмбрионы кур и культуры клеток куриных фибробластов. Отсутствие периодического контроля куриных эмбрионов и клеток куриного происхождения, используемых для культивирования вирусов, может привести к контаминации вирусами животных создаваемых вакцинных препаратов для людей, что отмечено в 5 главе последней редакции Европейской Фармацеи 2012.

Также анализ литературы показал, что ВЛП характеризуется высокой вариабельностью. Изучение механизмов антигенной вариабельности ВЛП позволило выявить фрагмент генома, кодирующий основной белок – наружный гликопротеин, структура которого определяет антигенные и подгрупповые особенности ВЛП. Данный фрагмент генома находится в гене *env* и центральный регион гена содержит регионы вариабельной последовательности и образует пять кластеров *hr1*, *hr2*, *vr1*, *vr2* и *vr3*. Два больших кластера *hr1* и *hr2* демонстрировали очень значительную вариабельность нуклеотидной последовательности, при этом *hr2*-домен показывал еще более высокую вариабельность в сравнении с *hr1*-доменом.

Данных о распространении ВЛП в хозяйствах Российской Федерации не достаточно. Изучение распространения ВЛП делает актуальной оценку эпизоотологической ситуации относительно ВЛП на территории России и позволит расширить представление о циркулирующих изолятах ретровирусов птиц в птицеводческих хозяйствах. Исследование и определение первичной структуры вариабельной области гена *env* позволит определить молекулярные свойства изолятов ВЛП, циркулирующих на

территории Российской Федерации и сравнить их с зарубежными штаммами и разработать адекватные методы молекулярной диагностики ВЛП.

Отсутствие препаратов для профилактики и лечения лейкоза птиц, делает основным и необходимым контроль данных инфекций, который основан на выявлении и удалении из стада инфицированной птицы. Именно поэтому необходимо совершенствовать и внедрять современные чувствительные и специфичные методы диагностики. Поэтому создание эффективной и быстрой тест-системы ПЦР для выявления вируса лейкоза птиц и в различных биологических необходимо и актуально.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Штаммы и изоляты вирусов ВЛП

В работе были использованы следующие референтные штаммы вируса лейкоза птиц, любезно предоставленные Лабораторией Онкогенных Болезней Птиц (ADOL), США:

- штамм RAV-1, представитель ВЛП подгруппы А;
- штамм RAV-2, представитель ВЛП подгруппы В;
- штамм RAV-49, представитель ВЛП подгруппы С;
- штамм RAV-50, представитель ВЛП подгруппы D;
- штамм RAV-0, представитель ВЛП подгруппы Е,
- штамм ADOL-Hc1, представитель ВЛП подгруппы J.

Изоляты ВЛП

Изоляты были получены из различных птицеводческих хозяйств России с неблагополучной обстановкой по опухолевым заболеваниям. Выделенные изоляты, исследованные в данной работе, представлены в табл 1.

Таблица 1

Полевые изоляты ВЛП, исследованные в данной работе

№	Изолят	Месяц/Год выделения	Материал	Регион
1	132	06/10	Кровь	Липецкая область
2	346	01/10	Кровь	Московская область
3	138	09/10	Кровь	Ростовская область
4	130	01/10	Кровь	Владимирская область
5	76	03/10	Кровь	Владимирская область
6	11	06/11	Кровь	Владимирская область
7	9	06/11	Кровь	Владимирская область
8	7	06/11	Кровь	Владимирская область
9	5	06/11	Кровь	Владимирская область
10	2	06/11	Кровь	Владимирская область
11	3	06/11	Кровь	Владимирская область
12	8	03/11	Кровь	Тульская область
13	654	11/09	Кровь	Новосибирская область

2.1.2. Культуры клеток

Для выделения, размножения и титрования ВЛП использовали первично- и вторичнотрипсинизированные культуры клеток фибробластов от СПФ-эмбрионов кур (ФЭК), полученных из ФГУП «Щелковского Биопредприятия» и «Lohmann Tierzucht» (Германия).

Для выделения и дифференциации ВЛП использовали вторичные культуры клеток линий: line 0, line alv6, 15B1, DF-1/J, любезно предоставленные ADOL (США).

2.1.3. Растворы и реактивы

Питательные среды, реактивы, растворы и сыворотки:

- питательная среда 199 производства фирмы «Sigma-Aldrich» (США);
- питательная среда F10 производства фирмы «Sigma-Aldrich» (США);
- питательная среда Лейбовиц, МакКой производства фирмы «Sigma-Aldrich» (США);
- 0,5% раствор трипсина;
- 0,25% раствор трипсина;
- 0,02% раствор версена;
- сыворотки крови: крупного рогатого скота, телят, плодов крупного рогатого скота (фетальная);
- мясо-пептонный агар (МПА) производства ФГУП «Щелковский Биокомбинат»;
- мясо-пептонный бульон (МПБ) производства ФГУП «Щелковский Биокомбинат»;
- мясо-пептонный печеночный бульон (МППБ) под вазелиновым маслом (среда Китт-Тароцци) производства ФГУП «Щелковский Биокомбинат»;
- тиогликолевая среда производства ФГУП «Щелковский Биокомбинат»;
- соево-казеиновый бульон производства ФГУП «Щелковский Биокомбинат»;
- агар Сабуро;
- 0,9% раствор хлорида натрия;
- фосфатно-буферный раствор с pH 7,2-7,4;
- раствор Tween 80.

Для изготовления растворов использовали реактивы квалификации «ЧДА», «ХЧ», «ОСЧ» и дистиллированную воду (ГОСТ 6709-72).

Поликлональные антитела

Для диагностики и дифференциации ВЛП использовали поликлональные антитела любезно предоставленные ADOL, США:

- anti-RAV-1;
- anti-RAV-2;
- anti-RAV-49;
- anti-RAV-50;
- anti-RAV-0;
- anti-ADOL-Hcl;

Моноклональные антитела

Для диагностики и дифференциации ВЛП использовали моноклональные антитела любезно предоставленные ADOL, США:

- 6AL42 специфичные к ВЛП-А и ВЛП-В;
- G2.3 специфичные к ВЛП-Ј.

Диагностические наборы

Для выявления ВЛП методом иммуноферментного анализа (ИФА) использовался набор фирмы «Synbiotics» (Франция) согласно инструкции.

Содержание антител против ВЛП подгруппы Ј определяли с помощью набора «Avian leukosis virus subgroup Ј antibody test kit» для иммуноферментного анализа («Sinbiotics », Франция) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

2.1.4 Реагенты и наборы для молекулярной биологии

Наборы:

- Набор для выделения ДНК из геля («Promega», DNA Purification System, Wizard);
- Набор для выделения ДНК из геля QIAEX II Gel Extraction Kit («QIAGEN»);

- Набор для очистки ПЦР-продуктов («Promega», Wizard™ PCR Preps DNA Purification system for Rapid Purification of DNA Fragments);
- Набор для получения кДНК («Invitrogen», cDNA Cycle Kit);
- Набор для выделения РНК (ООО «Ветбиохим», Россия).

Ферменты

Ревертаза (обратная транскриптаза) М-MLV(AMV) производства фирмы «Promega» (США);

Тaq-полимераза производства фирмы «Promega» (США).

2.1.5. Оборудование

При работе использовали следующее оборудование:

- СО₂-инкубатор модель CO281R фирмы «New Brunswick Scientific»;
- инкубатор для куриных яиц (Россия);
- ламинар «FASTER» модель ВН-EN 2004S;
- термостаты лабораторные с водяной рубашкой;
- рН метр марки 420А фирмы «Orion»;
- ультрацентрифуга «Eppendorf» модель 5415;
- центрифуга с охлаждением J-6В фирмы «Beckman»;
- настольные микроцентрифуги «Eppendorf»;
- центрифуга с охлаждением RC2-В производства фирмы «Sorvall»;
- прибор для проведения горизонтального электрофореза в агарозном геле (ООО «Хеликон»);
- световой микроскоп «ЛОМО» (Россия);
- люминисцентный микроскоп «Axiovert»;
- цифровая камера «Canon»;
- водяная баня «Clifton»;
- магнитные мешалки различных моделей «BELKO» производства фирмы Biotechnology;

-многоканальные и одноканальные пипетки с переменными объемами от 1-20 мкл; 20-200 мкл; 200-1000 мкл; 1000-5000 мкл и соответствующие наконечники «Eppendorf»;

-96-луночные полистировые планшеты для ИФА: использовали из полистирола (назв. США);

-спектрофотометр производства фирмы «Jurgens»;

-насос OX10;

-амплификаторы MiniCycler производства фирмы «MJ Research»;

-промывочное устройство Bio-TeK;

-ванны для электрофореза производства фирмы «Novel Experimental Technology»;

-трансиллюминатор;

-секвенаторы ABI 373 и ABI;

-программное обеспечение для анализа данных секвенирования MacVector/AssemblyLign «Oxford Molecular Group» (США) и PHYLIP «Felsenstein»;

-бытовые холодильники «Stinol» (+4 °C) (Россия);

-низкотемпературные холодильники «Sanyo UltraLow MDF-792» (-80 °C) (Япония), «Sanyo» (-20 °C) (Япония);

-РН-метр 420A+ производства фирмы «Thermo Orion» (США);

-лабораторная посуда.

2.2. Методы

2.2.1. Сбор образцов.

Кровь. Для изоляции и идентификации ВЛП использовалась цельная кровь или плазма. Кровь отбирали при помощи стерильных гепаринизированных шприцов и после сбора немедленно помещали на лед.

Пробы центрифугировали в режиме 10 мин/500 g при +4 °С. Отбирали надосадочную жидкость и переносили на культуру клеток.

Клоакальные смывы. Клоакальные смывы использовались для изоляции ретровирусов и для детекции gs-антигена. Клоакальные смывы получали вращением стерильной ватной палочки (5 раз) в клоаке. Не допускается присутствие фекального материала. Для изоляции вируса вату со смывом помещали в пробирку, содержащую питательную среду с антибиотиками (1000 ед. пенициллина-G и стрептомицина, 100 мкл гентамицина и 5 мкл амфотерицина В в 1 мл питательной среды).

Транспортировка проб осуществлялась в течение 24 часов в термосумках или термосах с вложенным в них хладогеном или льдом.

Перед тестированием из пробирки удаляли кусочек ваты и центрифугировали для удаления других твердых остатков при 2000 об/мин в течение 10 мин.

2.2.2. Приготовление культур клеток

Получение первичной и вторичной монослойной культуры фибробластов эмбрионов кур проводили по общепринятым методикам [4].

2.2.3. Выделение и идентификация ВЛП

Для выделения ВЛП использовалась первично- и вторично-трипсинизированная культура клеток фибробластов эмбриона кур (ФЭК). Для получения ФЭК использовали СПФ-эмбрионы кур («Lohmann Tierzucht», Германия). Выявление gs-антигена ВЛП в культуре клеток проводилось с использованием метода ELISA [22]. Выделение вируса и его идентификация проводилось в три стадии: 1) размножение ВЛП в культуре клеток ФЭК; 2) выявление gs-антигена ВЛП при помощи метода ELISA; 3) определение подгрупповой принадлежности при помощи ПЦР и РН.

2.2.4. Выявление группоспецифического антигена р27 ВЛП в сыворотке крови кур методом ИФА

Наличие группоспецифического антигена р27 ВЛП в исследуемых образцах и подтверждение выделения вирусных изолятов проводили с использованием коммерческого ИФА-набора производства фирмы «Synbiotics» (Франция) по методике производителя.

Обработку результатов, полученных в серологических реакциях, проводили согласно прилагаемым инструкциям.

2.2.5. Выявление антител к вирусу лейкоза птиц подгруппы-J

Наличие антител к вирусу лейкоза птиц подгруппы-J определяли с использованием коммерческого ИФА-набора «Avian leukosis virus subgroup J antibody test kit» («Synbiotics», Франция) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

2.2.6. Определение стерильности

Проверку материалов на бактериальное загрязнение проводили путем высевов в пробирки с питательными средами МПА, МПБ, МППБ и тиогликолевой средой, а при исследовании на грибковую контаминацию - в пробирки со средой Сабуро.

О стерильности материалов судили по отсутствию роста микроорганизмов на данных питательных средах.

2.2.7. Замораживание клеток

Замораживание клеток проводили по общепринятым методикам [4].

2.2.8. Выделение суммарной РНК.

Выделение РНК ВЛП из различных биологических материалов проводили двумя способами: с использованием тризола и неорганического сорбента.

Тризол. В культуральный матрас с монослоем добавляли 700 мкл тризола (из расчета 37.5 мкл на 1 см² культуральной поверхности), дожидались отделения монослоя от поверхности чашки и переносили суспензию клеток в тризоле в микроцентрифужную пробирку (1.5 мл). Инкубировали при комнатной температуре в течение 5-10 минут. Затем добавляли 200 мкл хлороформа, тщательно перемешивали и снова инкубировали 10 минут при комнатной температуре. Для разделения фаз центрифугировали 15 минут, 13000 об/мин при +4⁰С. Затем отбирали верхнюю РНК-содержащую водную фазу и добавляли к ней равный объем 100% изопропанола. Инкубировали при –20⁰С в течение 20 минут. Затем центрифугировали 15 минут, 1300 об/мин при +4⁰С. Образовавшийся осадок РНК дважды промывали 75% этанолом. Затем осадок подсушивали при 37⁰С в течение 20-30 минут и растворяли в 30-40 мкл воды, обработанной диэтилпиروкарбонатом.

Выделение РНК с использованием неорганического сорбента («Silica»). К 300 мкл образца добавляли 600 мкл раствора L6 (лизирующий буфер с гуанидинтиоционатом) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут при равномерном перемешивании на шейкере. Затем центрифугировали 5 минут, 13000 об/мин, переносили надосадочную жидкость (если формировался осадок) в чистые пробирки и добавляли 40 мкл сорбента, тщательно перемешивали на шейкере и снова инкубировали 10 минут при комнатной температуре. Центрифугировали 30 секунд при 13000 об/мин, удаляли надосадок. Затем осадок сорбента промывали 2 раза 200 мкл раствора L2 (промывочный буфер), и 2 раза 70% этанолом. Осадок подсушивали в течение 10 минут при 56⁰С. РНК элюировали с сорбента в 30-40 мкл воды, обработанной диэтилпиروкарбонатом.

2.2.9. Полимеразная цепная реакция, совмещенная с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Для амплификации были использованы праймеры, специфичные к участкам гена envelope ВЛП. Праймеры были проверены в ОТ-ПЦР на матрице РНК референтных штаммов вирусов. Затем, праймеры были использованы в ОТ-ПЦР с использованием биологических проб от птиц. Для выявления ВЛП в пробах опухолей или в других пробах с низкими титрами содержания вируса использовали «гнездовую» ПЦР (Nested-ПЦР). ОТ-ПЦР была проведена в объеме 25 мкл. Реакционная смесь для ПЦР содержала 5 мкл суммарной РНК, 10 пмоль каждого праймера, 1,25 ед. Taq-полимеразы, 1,25 ед. MMLV-ревертазы, Трис - HCl 67 mM, pH 8,8, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween-20, 1.5 mM MgCl₂. Для реамплификации использовали 3 мкл ПЦР-продуктов первой реакции.

Продукты амплификации были очищены набором Wizard PCR («Promega», США). Те же самые праймеры были использованы для секвенирования.

2.2.10. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Для анализа фрагментов ДНК методом гель-электрофореза наносили по 7 мкл ПЦР-продуктов (или по 1-2 мкл очищенной плазмидной ДНК) на 1% (при длине фрагмента более 1000 п.н) – 2% (при длине фрагмента менее 1000 п.н.) агарозный гель. Электрофорез проводили, используя Трис-ацетатный буфер, содержащий бромистый этидий в концентрации 0.4-0.5 мкг/мл, в режиме 10-15 В/см в течение 30 минут. Гели фотографировали и анализировали, используя трансиллюминатор с ультрафиолетовым светом с длиной волны 254 нм.

2.2.11. Конструирование рекомбинантной плазмиды

Праймеры для создания рекомбинантных плазмид были использованы те же, что и при разработке тест-системы. В качестве матрицы для ПЦР с данными праймерами были использованы референтные штаммы RAV-2 и ADOL-Hcl. Были амплифицированы специфические фрагменты ДНК ВЛП.

Выделение фрагментов ПЦР и геля. Проводили электрофорез в агарозном геле с продуктами амплификации. Полученные фрагменты ПЦР вырезали из геля и выделяли с использованием набора для очистки ПЦР-продуктов («Fermentas», Литва) согласно методике производителя.

Лигирование. Для получения рекомбинантных плазмид использовали плазмидный вектор pGEM T-Easy («Promega», США). Реакцию проводили в конечном объеме 10 мкл. Реакционная смесь содержала 5-7 мкл очищенной ДНК вставки, 1 мкл вектора, 1 мкл лигазы T4 и до 10 мкл буфера. Реакцию проводили в течение 10-12 часов, при 16°C.

Приготовление компетентных клеток E. coli. Свежую колонию клеток E. coli (штамм Top Ten) пересекали фламбированной вольфрамовой петлей в 10 мл питательной среды LB и наращивали в течение ночи при 37°C. Пересевали 1 мл ночной культуры в 9 мл среды LB (10% пептона, 0,5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl, pH=7.5) и инкубировали культуру при 37°C с хорошей аэрацией, контролируя величину оптической плотности культуры. Оптическую плотность определяли спектрофотометрически при $\lambda=600$ нм. По достижении середины логарифмической фазы роста оптическая плотность составляла 0,4- 0,6 ОЕ. Затем культуру быстро переносили в стерильные центрифужные пробирки и охлаждали во льду. Клетки осаждали центрифугированием при 1000 g (~3000 об/мин) в течение 15 минут при +4°C. К осадку добавляли 20 мл стерильного охлажденного 0,1 М CaCl₂. Осадок ресуспендировали и инкубировали во льду 30 минут, затем центрифугировали при 1000 g (~3000 об/мин) в течение 15 минут при +4 °C. Тщательно удаляли надосадочную жидкость. Осадок ресуспендировали в

1мл 0,1 М CaCl_2 , инкубировали во льду от 2 до 12 часов, затем добавляли стерильный глицерин (99,9%) до конечной концентрации 15%.

Клетки расфасовывали по 100 мкл в стерильные полипропиленовые пробирки и хранили при -70°C .

Трансформация компетентных клеток плазмидной ДНК и лигазными смесями. Компетентные клетки (100 мкл) размораживали во льду. К размороженным клеткам добавляли 1-2 мкл (50-150нг) плазмидной ДНК или 3-5 мкл лигазной смеси. Инкубировали 1 час во льду, затем проводили тепловой шок при 42°C в течение 50 секунд. После этого клетки быстро охлаждали, помещая пробирки обратно в лед. К каждой аликвоте трансформированных клеток добавляли по 0,5 мл среды LB и инкубировали при 37°C с умеренным встряхиванием в течение часа. Затем клетки высевали на чашки Петри с селективной средой (1,5% L-агар, содержащий 100 мкг/мл ампициллин). В дальнейшем производили учет роста колоний и проводили проверку на наличие вставки методом ПЦР. Для выделения плазмидной ДНК проводили пересев колоний в жидкую среду LB, содержащую 100 мкг/мл ампициллина.

Получение электрокомпетентных клеток. Свежую колонию клеток *E.coli* (штамм Top Ten) пересекали фламбированной вольфрамовой петлей в 10 мл среды LB и растили в течение ночи при 37°C . Далее проводили пересев 100 мкл ночной культуры в 200 мл среды LB и инкубировали культуру при 37°C с хорошей аэрацией, контролируя величину оптической плотности культуры. Оптическую плотность определяли спектрофотометрически при $\lambda=600$ нм, по достижении середины логарифмической фазы роста оптическая плотность составляла 0,4-0,6. Затем культуру быстро переносили в стерильные центрифужные пробирки и охлаждали во льду в течение 10-15 минут. Клетки осаждали центрифугированием при 1000 g (~ 3000 об/мин) в течение 10 мин при $+4^{\circ}\text{C}$. Осадок дважды промывали 100 мл стерильной деионизованной воды. Клетки ресуспендировали, центрифугировали при 1000g (~ 3000 об/мин) в течение 10 мин при $+4^{\circ}\text{C}$. Тщательно удаляли

надосадочную жидкость. Затем клетки промывали 20мл 10% глицерина, центрифугировали при 1000g (~3000 об/мин) в течение 10 мин при +4°C. Добавляли равный объему клеток 10% глицерин и ресуспендировали. Клетки расфасовывали по 40 и 80 мкл в стерильные полипропиленовые пробирки и хранили при -70°C.

Электропорация E. coli плазмидной ДНК и лигазными смесями. Электрокомпетентные *E. coli* размораживали во льду. Заранее во льду охлаждали кюветы для электропорации. К размороженным клеткам добавляли 1-2 мкл плазмидной ДНК или 1-1,5 мкл лигазной смеси. После этого смесь быстро переносили в кюветы для электропорации. Кюветы переносили в ячейку прибора для электропорации, давали разряд (1800 вольт для 1 мм кювет, 2500 вольт для 2 мм кювет). К каждой аликвоте трансформированных клеток добавляли по 0,5 мл среды LB и инкубировали при 37°C с умеренным встряхиванием в течение 20 минут. Затем клетки высевали на чашки Петри с селективной средой (1.5% L-агар, содержащий 100 мкг/мл ампициллин). В дальнейшем производили учет роста колоний и проводили проверку на наличие вставки методом ПЦР. Для выделения плазмидной ДНК проводили пересев колоний в жидкую среду (10 мл на колонию) LB, содержащую 100 мкг/мл ампициллина.

Выделение рекомбинантной плазмидной ДНК. Для выделения плазмидной ДНК использовали набор фирмы «Promega» DNA Purification System, Wizard®Plus, SV Minipreps (США). Выращивали 10 мл ночной культуры *E. coli*, содержащей плазмиду, в среде LB с 100 мкг/мл ампициллина. Выделение проводили в соответствии с инструкцией производителя. Наличие плазмиды определяли методом электрофореза в агарозном геле.

2.2.12. Подготовка ПЦР-фрагментов для секвенирования методом гель-электрофореза и очистки с NaI

1. Для выделения фрагментов ДНК из агарозного геля наносили по 30-100 мкл ПЦР-продуктов или по 20 мкл плазмидной ДНК. Электрофорез проводили при описанных выше условиях. Затем вырезали фрагмент геля, содержащий ДНК, используя трансиллюминатор с ультрафиолетовым светом с длиной волны 254 нм.
2. Вырезанные фрагменты агарозы с ДНК помещали в микроцентрифужные пробирки, затем к ним добавляли 0.9 мл NaI и инкубировали при 37⁰С до полного растворения агарозы.
3. Затем в пробирки добавляли 5-10 мкл сорбента (glassmilk), тщательно размешивали и инкубировали в течение 0.5-16 часов при периодическом помешивании.
4. Затем центрифугировали 30 секунд, при 13000 об/мин, удаляли надосадок.
5. Промывали осадок 75% этанолом и, не подсушивая, элюировали ДНК с сорбента (glassmilk) 1ХТЕ.
6. Концентрацию выделенного фрагмента ДНК определяли методом гель-электрофореза при стандартных условиях.
7. Выделенный фрагмент ДНК использовали для секвенирования.

2.2.13. Секвенирование амплифицированных фрагментов кДНК

Для секвенирования амплифицированных ПЦР-фрагментов использовали те же праймеры, что и для проведения ПЦР. Реакции секвенирования были проведены в автоматических секвенаторах ABI 373 и ABI 377 («Applied Biosystem», США) с реактивами Perkin Elmer. Не связавшиеся праймеры удаляли из продуктов амплификации с помощью spin-колонок («Princeton separations», США). Данные секвенирования были отредактированы программным обеспечением MacVector/Assemblilign (Eastman Kodak). Для выравнивания нуклеотидных последовательностей использовали пакет программ Lasergene 6, MegEling («Lasergen Inc.», США).

Построение филогенетической дендрограммы осуществляли на основе алгоритма Clustal W methods.

2.2.14. Компьютерный анализ и сравнение первичных нуклеотидных последовательностей

Данные секвенирования были проанализированы, проведено сравнение с опубликованными последовательностями изолятов ВЛП. На основе данных секвенирования, были выбраны изоляты для полной генетической характеристики ВЛП (секвенирование генома, определение филогенетических отношений). Последовательности были обработаны программным обеспечением MacVector/AssemblyLign (Oxford Molecular Group, США), PHYLIP (Felsenstein, 1993) и был проведен филогенетический анализ.

2.2.15. Статистическая обработка результатов

Анализ и статистическую обработку результатов проводили с использованием программы «Microsoft Excel», входящую в пакет программ «Microsoft office, 2007».

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа по исследованию распространения неопластических болезней птиц ретровирусной этиологии на территории Российской Федерации включала в себя следующие этапы:

- изучение распространения вируса лейкоза птиц и антител к нему в птицеводческих хозяйствах на территории России;
- разработка метода выявления и дифференциации генома вируса лейкоза птиц;
- характеристика полевых изолятов вируса лейкоза птиц, циркулирующих на территории Российской Федерации;
- секвенирование части варибельной области гена *envelope* у выделенных изолятов вируса лейкоза птиц;
- определение и сравнительный анализ первичной структуры варибельной области гена *envelope* изолятов вируса лейкоза птиц, выделенных на птицефабриках России в течение 2009-2011 гг..

3.1. Мониторинг птицеводческих хозяйств на наличие ретровирусных инфекций на территории Российской Федерации

В данных исследованиях провели эпизоотологический мониторинг птицеводческих хозяйств на наличие ретровирусных инфекций, чтобы дать оценку эпизоотологической ситуации в отношении лейкоза птиц на территории Российской Федерации, а также оценить меры контроля за ретровирусными инфекциями птиц в птицеводческих хозяйствах нашей страны.

Согласно принятому в настоящее время территориально-административному делению, в Российской Федерации имеется 83 региона, включая области, республики, края, автономные области и автономные края (в отдельные регионы вынесены города Москва и Санкт-Петербург, которые

в мониторинг не включили). Мы изучали эпизоотологическую ситуацию в отношении лейкоза птиц в 47 регионах России (табл. 2).

Обследование, совместно с коллегами из ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (г.Владимир) проводили в 2005-2011 годах в птицеводческих хозяйствах из 47 регионов России. Было исследовано 223 хозяйства: 89 –яичного, 112 - бройлерного и 22 - племенного направлений. В ходе исследований проанализировано более 10 000 сывороток крови на содержание ВЛП и антител к ВЛП подгруппы J. Для анализа использовали сыворотку крови, полученную от клинически здоровых кур. Сыворотку крови при транспортировке помещали на лед и в дальнейшем содержали при 20°С до проведения исследований. Пробы, используемые для тестирования методом ИФА, хранили в фосфатном буферном растворе (рН - 7,0) с 0,1 % Tween 80, предназначенные для анализа методом ПЦР (тест-система для обнаружения и дифференциации ВЛП) — в замороженном состоянии без добавления реагентов.

Для обнаружения вирусов в пробах и подтверждения их наличия в выделенных препаратах применяли коммерческий набор «ИФА-АВИВАК-ВЛП» предназначенный для выявления группоспецифического антигена р27 ВЛП (ООО «НПП «АВИВАК», Россия) по методике производителя. Содержание антител против ВЛП подгруппы J определяли с помощью ИФА-набора «Avian leukosis virus subgroup J antibody test kit» («Sinbiotics», Франция) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Таблица 2

Результаты исследования регионов РФ на наличие вирусного р27-антигена вируса лейкоза птиц и наличие антител к ВЛП подгруппы J в 2005-2011 г. г.

Регион	Год исследования	Количество хозяйств	мясное		яичное		племенное	
			Серопозитивное	Сероотрицательное	Серопозитивное	Сероотрицательное	Серопозитивное	Сероотрицательное
Амурская обл.	2005-2006	2	2(J)*					
Астраханская обл.	2007	2			2 (p27)**			
Башкортостан	2006-2008	4			1(p27)		2(p27);1(J)	
Белгородская обл.	2005-2009	13	6(J)	3(p27);1(J)	2(J)		2(J)	
Брянская обл.	2007	1	1(p27)					
Владимирская обл.	2005-07, 2011	9	2(p27);1(J)		4(p27)			2(p27)
Волгоградская обл.	2005-2008	7	1(p27);5(J)	1(p27);2(J)	1(p27)			
Вологодская обл.	2005-2008	6	1(p27);1(J)	1(p27);1(J)	2(p27)			
Воронежская обл.	2006	1	1(p27)					
Ивановская обл.	2006,2008	2	1(p27)		1(p27)			
Калининградская обл.	2005	1				1(p27)		
Калужская обл.	2008	1	1(J)					
Кировская обл.	2005-2008	4	1(J)	1(J)	1(p27)		1(p27)	
Коми	2005	1			1(p27)			
Костромская обл.	2005-2006	2	1(J)			1(J)		
Краснодарский край	2005-06, 2010	12	3(p27);6(J)		1(p27)		3(p27);5(J)	
Красноярский край	2006-2007	3	1(p27)		2(p27)			
Курганская обл.	2005-2007	3	2(p27);1(J)					
Курская обл.	2005-2009	5	1(p27);2(J)		3(p27);2(J)			
Липецкая обл.	2006-07, 2010	5	5(p27);2(J)	1(J)				
Мари-Эл	2005	1			1(p27);1(J)			
Мордовия	2006,2010	2			1(p27)	1(p27)		
Московская обл.	2005-08,2010	6	2(J)		3(p27)		1(p27);1(J)	
Нижегородская обл.,	2005-07, 2011	18			12(p27);4(J)	1(J)	1(p27);1(J)	1(J)
Новгородская обл.	2005-2008	5	1(J)		4(p27)	1(J)		
Новосибирская обл.	2006	1		1(J)				
Омская обл.	2005-06, 2008	3	1(p27);1(J)	1(J)				
Оренбургская обл.	2007-2008	2	2(J)					
Орловская обл.	2005-2008	5	2(p27);4(J)	1(p27);1(J)				

Продолжение таблицы 2

Пермская обл.	2005-2009	9	4(J)		4(p27)	2(J)		
Пензская обл.	2007	1	1(p27)					
Псковская обл.	2006	1			1(p27)			
Ростовская обл.	2005-06, 2008	8	3(p27);4(J)		3(p27);1(J)			
Рязанская обл.	2005-07, 2009	6	1(J)		1(p27)		4(p27);2(J)	
Самарская обл.	2005-2009	9	5(p27);7(J)					
Саратовская обл.	2005-2007	9		2(J)	2(p27)		2(p27);5(J)	1(p27);1(J)
Свердловская обл.	2005-2008	5	1(J)				4(p27);1(J)	
Ставропольский край	2006-2009	7	2(p27);1(J)		4(p27)			
Тамбовская обл.	2007	1	1(J)					
Татарстан	2005-2007	4	1(J)	1(J)	2(p27)			
Тверская обл.	2005-2007	4	1(p27);3(J)					
Тульская обл.	2005, 2007-09	8	1(p27);2(J)	1(p27)	4(p27);1(J)			
Тюменская обл.	2008	1	1(J)					
Удмуртия	2005-2006	3			2(p27)	1(p27)		
Челябинская обл.	2005-2009	8	2(J)		2(p27);2(J)		2(p27);2(J)	
Чувашия	2006-2007	2	2(J)					
Ярославская обл.	2005-08, 2010	10	1(J)		5(p27);1(J)		4(J)	

*-количество положительных/отрицательных хозяйств на наличие антител к вирусу лейкоза птиц подгруппы J;

** -количество положительных/отрицательных хозяйств на наличие общего группоспецифического p27-антигена вируса лейкоза птиц

Примерно в 50 % регионов в промышленных хозяйствах провели мониторинг присутствия антител к ВЛП у птиц, в 37 % — исследовали наличие вирусов ВЛП. В 58 % регионов России при этом использовали ИФА, в 42 % — ПЦР. Из обследованных хозяйств 50 % составили бройлерные, 40 % — яичные и 10 % — племенные (по птице как бройлерного, так и яичного направления).

Широкий анализ банка сывороток, собранных за период с 2005 по 2011 год, подтвердил, что практически все (97%) обследованные фабрики яичного направления (87 птицев хозяйств) и более чем 50% (57 птицев хозяйств) бройлерных хозяйств инфицированы ВЛП. Антитела против ВЛП подгруппы J выявили в образцах сывороток, собранных при обследовании 70% исследованных фабрик, как яичного, так и бройлерного направления. В сыворотках, полученных из 8 хозяйств (9% от обследованных), антитела против ВЛП-J не обнаружили. Исследуемые регионы РФ представлены на рис. 3. Таким образом, данные исследования указывают на широкое распространение инфекции лейкоза птиц на территории Российской Федерации.

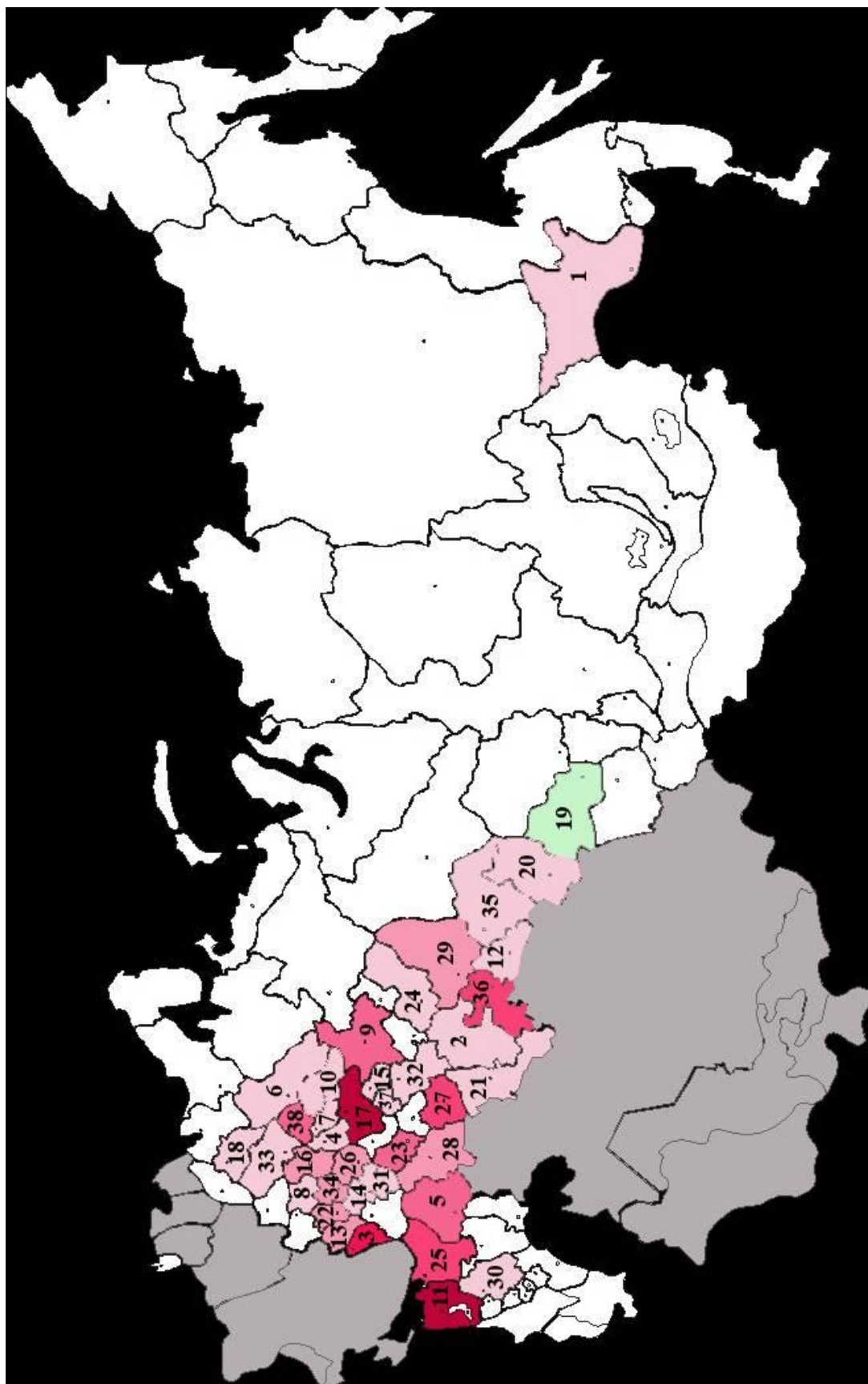
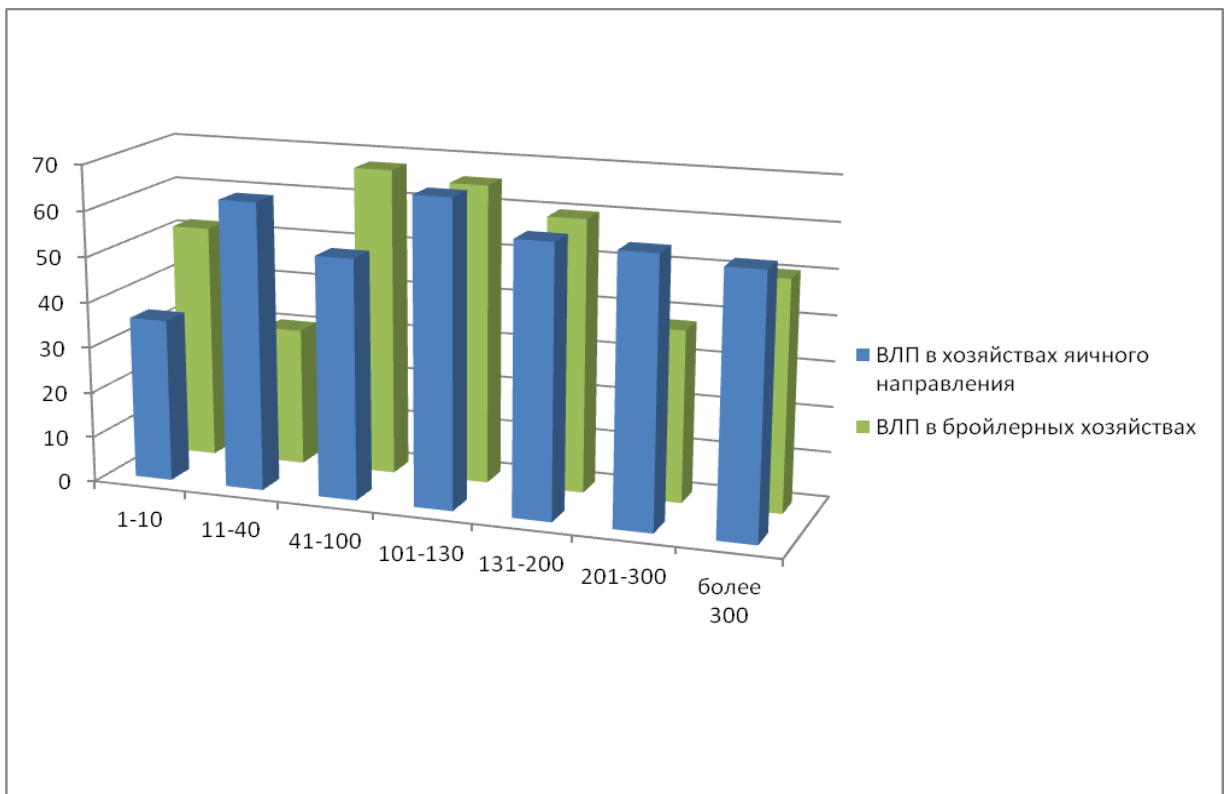


Рис. 3. Регионы РФ, в которых проводили серомониторинг инфекции ВЛП: интенсивность окрашивания отображает количество птицеводческих хозяйств с серопозитивным поголовьем в данном регионе

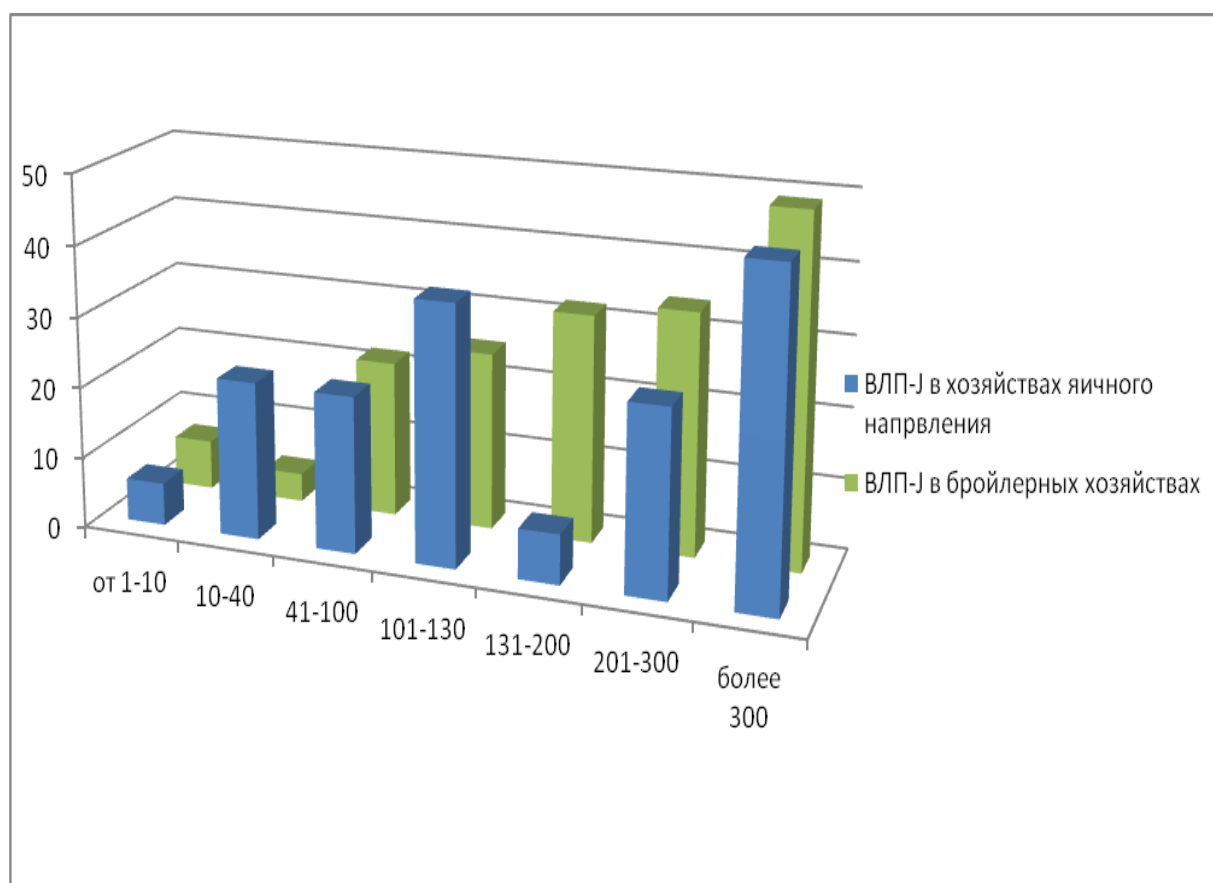
Для анализа инфицированности птицы и наличия антител к ВЛП подгруппы J в зависимости от возраста поголовья и направления использования птицы собранные сыворотки ранжировали по семи возрастным группам для яичных и бройлерных хозяйств.

Увеличение доли положительных на gs-антиген ВЛП сывороток (Гистограмма 1) наблюдали до возраста 101-130 сут., далее этот показатель постепенно уменьшался до 50% уровня. Наибольший рост числа образцов, в которых детектировали ВЛП, в птицеводческих хозяйствах яичного направления отмечали в одной возрастной группе (101-130 сут. до 67 %), бройлерного — в двух группах (41-100 сут. - 68 %; 101-130 сут. - 66 %).



Гистограмма 1. Результаты исследования сывороток птиц на наличие gs-антигена ВЛП. По вертикали: процент положительных сывороток от общего числа исследованных сывороток в различных возрастных группах кур в птицефабриках яичного (синие столбцы) и бройлерного (зеленые столбцы) направлений. По горизонтали: отображены семь возрастных групп кур в днях.

Количество сывороток положительных на наличие антител против ВЛП-*J* (Гист. 2) у птицы из хозяйств яичного направления повышалось до 130-суточного возраста, после чего доля серопозитивных особей резко снижалась (до 7 %) и затем достигала максимального значения (46 %) в старшей возрастной группе (более 300 сут). В бройлерных хозяйствах титр антител с возрастом птицы постоянно увеличивался. Наибольший процент сероположительных по ВЛП-*J* сывороток для обоих типов птицеводческих хозяйств отмечали в старшей возрастной группе (более 300 сут); для яичного и бройлерного направления значения составили соответственно 46 и 49 %.



Гистограмма 2. Результаты исследования сывороток на наличие антител к ВЛП подгруппы *J*. По вертикали: процент положительных сывороток от общего числа исследованных сывороток в различных возрастных группах кур в птицефабриках яичного (синие столбцы) и бройлерного (зеленые столбцы) направлений. По горизонтали: отображены семь возрастных групп кур в днях.

3.2. Разработка тест-системы на основе ПЦР для выявления и дифференциации вируса лейкоза птиц подгрупп A-D и J

В ходе работы по разработке тест-системы для выявления генома вирусов лейкоза птиц и его дифференциации были выделены следующие этапы:

1. Подбор специфических праймеров для детекции РНК ВЛП.
2. Подбор и оптимизация условий проведения ПЦР на референтных штаммах вируса ВЛП.
3. Определение чувствительности системы детекции РНК вируса ВЛП методом ОТ-ПЦР.
4. Проверка специфичности системы детекции РНК вируса ВЛП методом ОТ-ПЦР.
5. Проведение широких производственных и комиссионных испытаний; применение разработанного метода для скрининга большого количества полевых изолятов.

В ходе исследований нами была разработана «Тест-система для обнаружения и дифференциации вирусов лейкоза птиц типов A-D и J методом полимеразной цепной реакции».

Набор специфических праймеров был разработан на основе опубликованных первичных последовательностей геномов референтных штаммов ВЛП RAV-1, RAV-2, RSV-Pr-C, SR-RSV-D, RAV-0 и HPRS-103 (Табл. 3). Праймеры были подобраны на область гена *envelope*, т.к. именно данный ген содержит вариабельные участки ответственные за антигенные различия штаммов ВЛП разных подгрупп. При помощи компьютерной программы (Amplify 1.0, Oligo 4.0-s - Macintosh) данные праймеры были проверены на специфичность и универсальность со всеми известными референтными штаммами и изолятами ВЛП, нуклеотидные последовательности которых были опубликованы в Генбанке (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>).

Таблица 3

Праймеры, используемые для диагностики ВЛП подгрупп А-D и J

Название праймера	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')
AD 1	GGG AGG TGG CTG ACT GTG T
H 5	GGA TGA GGT GAC TAA GAA AG
H 7	CGA ACC AAA GGT AAC ACA CG

ПЦР состояла из двух раундов: ПЦР-1 – детекция ВЛП подгрупп А-D и ПЦР-2 – детекция и дифференциация ВЛП подгруппы J. В результате реакции обратной транскрипции и амплификации с системой праймеров AD1-H5 синтезируется отрезок генома гена env с расчетным размером 314 п.н. Для проб, положительных в ПЦР-1 с праймерами AD-H5 проводили второй раунд ПЦР с системой праймеров H5-H7. В результате обратной транскрипции и амплификации синтезировался фрагмент гена размером 738 п.н.

Поскольку геном ВЛП состоит из двухцепочечной РНК, а также ДНК копии, встроенной в геном птицы-хозяина, необходимо было подобрать эффективные условия для обратной транскрипции (ОТ) синтеза кДНК и ПЦР. ОТ-ПЦР проводили в одной пробирке. Был подобран следующий температурный цикл (ОТ):

50°C – 45 мин.	}	1 цикл
95°C – 5 мин		
95°C – 1 мин.	}	5 циклов
51°C - 1 мин.		
72°C – 1 мин.		
95°C – 30 сек.	}	35 циклов
51°C – 30 сек.		
72°C – 45 сек.		

Выявление продуктов реакции проводили методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. Электрофорез проводили в режиме 8 В/см в течение 30 минут. Гели фотографировали и анализировали, используя трансиллюминатор с ультрафиолетовым светом с длиной волны 254 нм. Во всех экспериментах после проведения двух раундов ПЦР (по 41 циклу) были получены фрагменты ожидаемого размера: 314 п.н. для вируса лейкоза птиц подгрупп А-Д и 738 п.н. для вируса лейкоза птиц подгруппы J (Рис. 4).

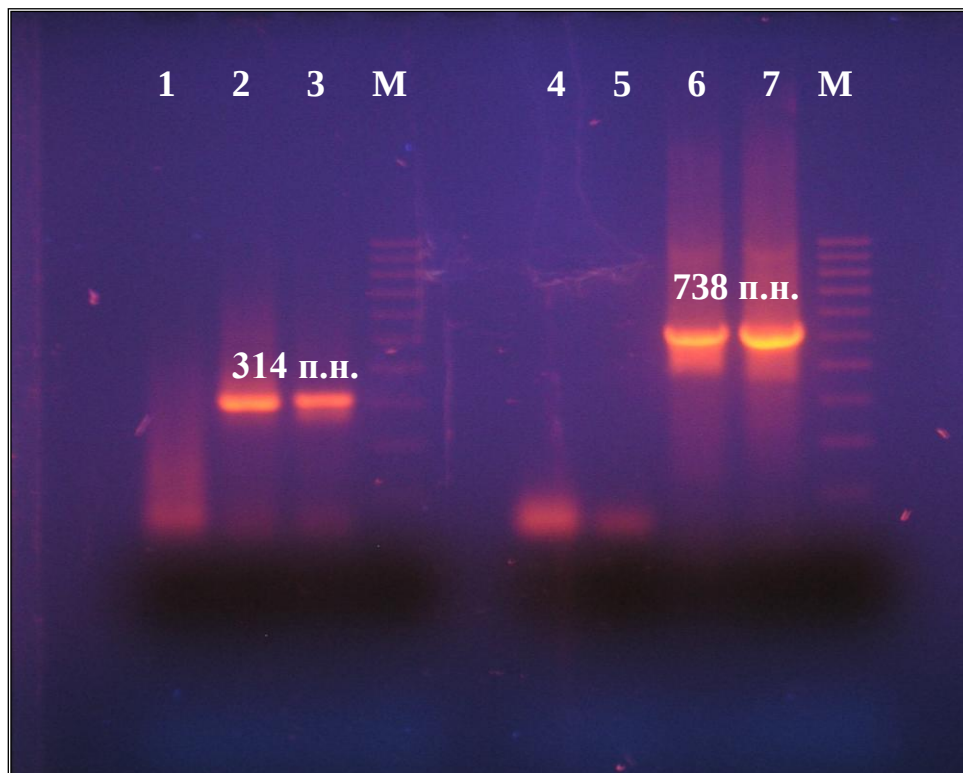


Рис. 4. Результаты ПЦР: дорожки 1, 4, 5-отрицательные пробы; дорожка 2-положительная проба, содержащая ВЛП подгруппы А-D; дорожка 3-положительный контроль А-D; дорожка 6-положительная проба, содержащая ВЛП подгруппы J; дорожка 7-положительный контроль ВЛП подгруппы J

Для конструирования генно-инженерного положительного контроля для тест-системы по обнаружению и дифференциации вирусов лейкоза птиц типов А-D и J методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) были исследованы полевые пробы сывороток и крови птиц методом ОТ-ПЦР с помощью диагностических праймеров: для дифференциации лейкоза птиц типов AD- H5 и AD1, для дифференциации лейкоза птиц типа J – H5 и H7. Исследуемые полевые пробы представлены в табл. 5.

Положительные пробы были отобраны для наработки ПЦР -фрагментов для клонирования в *Escherichia coli* (*E. coli*)(Тор Ten). Проводили трансформацию электрокомпетентных клеток плазмидной ДНК и лигазной смесью. После трансформации компетентных клеток *E.coli* проводили скрининг клонов методом ПЦР, используя диагностические праймеры H5-AD1, H5-H7, чтобы обнаружить присутствие плазмиды со специфичным

фрагментом. Анализировали по 10 колоний от каждого из фрагментов. Из проверенных 10 клонов со вставкой AD, положительно сработали 8 клонов, со вставкой J- 9 клонов. Далее проводили наращивание и выделение рекомбинантной плазмиды (по одному из положительных клонов).

Определение концентрации плазмиды проводили на спектрофотометре Biophotometr («Eppendorf», США). Концентрация выделенной рекомбинантной плазмиды оказалась равна 0,1 мкг/мкл (A-D) и 0,05 мкг/мкл (J). После измерения концентрации готовили серии разведений плазмиды (от 10^{-1} до 10^{-10}). В качестве матриц при постановке «гнездовой» ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР использовали серии разведений исходных плазмид. Положительный сигнал в обеих реакциях был получен при использовании разведений плазмид для AD от 10^{-1} до 10^{-7} , для J от 10^{-1} до 10^{-6} .

Была проведена работа по определению возможности использования смеси плазмид и их оптимальных концентраций для проведения ОТ-ПЦР.

Были приготовлены серии разведений плазмид:

1. ALV-J (10^{-4}) и ALV-AD (10^{-5})
2. ALV-J (10^{-5}) и ALV-AD (10^{-7})
3. ALV-J (10^{-6}) и ALV-AD (10^{-8})

Результаты проведения ОТ-ПЦР показали, что положительно сработали разведения ALV-J (10^{-4}) и ALV-AD (10^{-5}) и ALV-J (10^{-5}) и ALV-AD (10^{-7}) (Рис. 5).

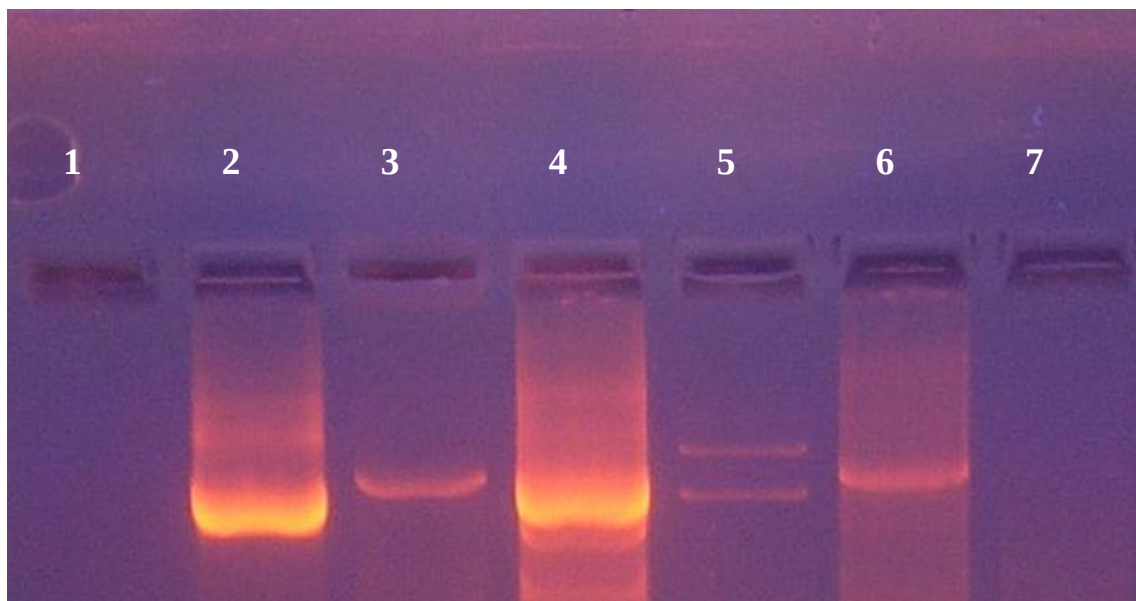


Рис. 5. Результаты ОТ-ПЦР на матрице смеси плазмид и их оптимальных концентраций: дорожка 1 – отрицательный контроль; дорожка 2 – исходная рекомбинантная плазида А-Д (0,1 мкг/мкл); дорожка 3 – смесь плазмид с ALV-J (10^{-4}) и ALV-AD (10^{-5}); дорожка 4 – исходная рекомбинантная плазида J (0,05 мкг/мкл); дорожка 5 – маркер молекулярного веса; дорожка 6 - смесь плазмид с ALV-J (10^{-5}) и ALV-AD (10^{-7}); дорожка 7 - смесь плазмид с ALV-J (10^{-6}) и ALV-AD (10^{-8})

Таким образом, оптимальная концентрация рекомбинантных плазмид в смеси для использования в качестве генно-инженерного положительного контроля составляет ALV-J 10^{-3} мкг/мл и ALV-AD 10^{-3} мкг/мл.

Было проведено исследование специфичности тест-системы для обнаружения и дифференциации вирусов лейкоза птиц типов А-Д и J методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Комиссионные испытания проводили в присутствии представителя контрольного института (ФГБУ ВГНКИ, г.Москва).

Специфичность проверяли с использованием панели контрольных образцов, представленной в Табл. 4.

Таблица 4

Панель контрольных образцов для проверки специфичности разработанного метода ПЦР

№	Материал	Результаты ПЦР	Комментарии
1	Референтный штамм ADOL Hc1 (вирус лейкоза птиц подгруппы J)	AD+ J+	Наличие РНК ВЛП A-D и J
2	Референтный штамм RAV-2 (вирус лейкоза птиц подгруппы B)	AD+ J-	Наличие РНК ВЛП A-D
3	Вирус ретикулэодотелиоза птиц (референтный штамм из ADOL, США)	AD- J-	Отсутствие РНК ВЛП
4	Вакцина против болезни Марека серотип-3 (шт. FC-196) («АВИВАК», Россия)	AD- J-	Отсутствие РНК ВЛП
5	Вакцина против ньюкаслской болезни кур (штамм «Ла-Сота») («АВИВАК», Россия)	AD- J-	Отсутствие РНК ВЛП
6	Первичная культура клеток куриных фибробластов (Lohmann Tierzucht, Германия)	AD- J-	Отсутствие РНК ВЛП
7	Первичная культура клеток перепелиных фибробластов (ФГУ Биокомбинат, Щелково)	AD- J-	Отсутствие РНК ВЛП
8	Полевой изолят вируса лейкоза птиц №130	AD+	Наличие РНК ВЛП A-D
9	Полевой изолят вируса лейкоза птиц №346 (J+)	AD+ J+	Наличие РНК ВЛП A-D и J
10	Стерильная среда культуральная MEM с L-глутамином C-42	AD- J-	Отсутствие РНК ВЛП
11	Вторичнотрипсинизированная культура клеток куриных фибробластов C/O line 0 (ADOL, США)	AD- J-	Отсутствие РНК ВЛП
12	Раствор L6 («Ветбиохим», Москва)	AD- J-	Отсутствие РНК ВЛП
13	Вода бидистиллированная	AD- J-	Отсутствие РНК ВЛП
14	Вакцина против инфекционной бурсальной болезни кур (штамм «Винтерфилд 2512») («АВИВАК», Россия)	AD- J-	Отсутствие РНК ВЛП
15	Положительная сыворотка крови на ВЛП (Тульская область)	AD+	Наличие РНК ВЛП A-D

Проверка тест-системы показала 100% специфичность и отсутствие перекрестных реакций с другими вирусами птиц. Данная тест-система позволяет надежно дифференцировать РНК ВЛП от нуклеиновых кислот других вирусов (вируса болезни Марека, вируса ретикулоэндотелиоза, вируса ньюкасловской болезни кур, вируса инфекционной бурсальной болезни).

Для определения чувствительности разработанного метода использовали референтные штаммы вирусов ADOL Hc1 и RAV-2 с начальными титрами 10^5 ТЦД₅₀/мл. Штаммы вирусов раститровали от 10^5 до 1 ТЦД₅₀/мл и проводили выделение РНК согласно наставлению по применению тест-системы ПЦР. Пределом чувствительности считали последнее разведение, при котором регистрировали положительный результат в ПЦР (Рис. 6).

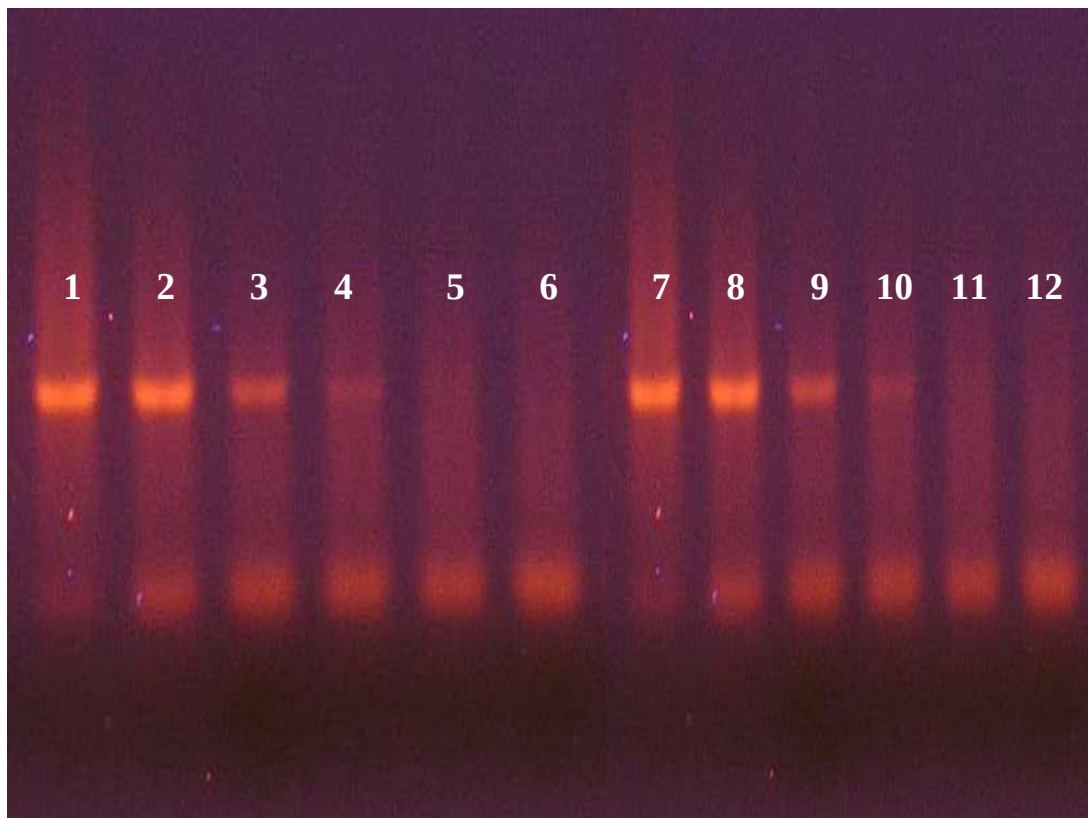


Рис. 6. Обнаружение РНК ВЛП: дорожка 1 – исходный штамм ADOL Hc1 (10^5 ТЦД₅₀/мл); дорожки 2-6 – последовательные разведения штамма ADOL Hc1 от 10^4 до 1 ТЦД₅₀/мл; дорожка 7 – штамм вируса RAV-2 (10^5 ТЦД₅₀/мл); дорожки 8-12 – разведения вируса RAV-2 от 10^4 до 1 ТЦД₅₀/мл

Предел чувствительности разработанной тест-системы обнаружения РНК ВЛП, исходя из полученных данных, составил 10^2 ТЦД₅₀/мл.

Аналитическую чувствительность оценивали при тестировании серийных десятикратных разведений рекомбинантной плазмиды с известным содержанием целевых копий ДНК ВЛП. Аналитическая чувствительность тест-системы составила 10^{-15} г РНК (10 копий РНК/мкл).

Также была определена относительная чувствительность путем сравнения разработанной тест-системы ПЦР с ИФА для обнаружения группоспецифического р27-антигена (Табл. 5). КК ФЭК инокулировали сериями последовательных 10-кратных разведений вирусами шт. RAV-2 и шт. ADOL-Hc1.

Таблица 5

Сравнение чувствительности тест-системы ПЦР и ИФА

ТЦД ₅₀ /мл (шт. RAV-2, шт. ADOL-Hcl)	Метод	Количество дней после инокуляции КК ФЭК			
		1	2	3	7
10 ⁴	ПЦР	+	+	+	+
	ИФА	-	-	-	+
10 ³	ПЦР	-	+	+	+
	ИФА	-	-	-	+
10 ²	ПЦР	-	+	+	+
	ИФА	-	-	-	+
10	ПЦР	-	-	+	+
	ИФА	-	-	-	-

Провирусная ДНК ВЛП в КК ФЭК, инокулированных вирусом с титром инфекционности 100 ТЦД₅₀/мл и более, обнаруживалась уже на второй день после инокуляции при помощи ПЦР. Группоспецифический антиген р27 обнаруживался только на седьмые сутки после инокуляции. На 2-3 сутки р27 – антиген не обнаруживался даже в культуре инокулированной до 10⁴ ТЦД₅₀/мл. Данные результаты указывают, что разработанная тест-система на основе ПЦР более чувствительна, чем ИФА.

Таким образом, в результате оптимизации условий проведения совмещенной ОТ-ПЦР для обнаружения РНК ВЛП, была разработана эффективная тест-система для идентификации и дифференциации ВЛП подгрупп А-D и J, обладающая высокой чувствительностью и специфичностью.

Тест-систему рекомендовали использовать как основную для тестирования РНК лейкоза птиц в коммерческих хозяйствах РФ. Получены сертификационные и лицензионные документы.

Исследована возможность применения данной тест-системы в племенном хозяйстве Краснодарского края. Нами было протестировано более 3300 образцов сывороток крови от живой птицы и 10 опухолевых проб органов от павших особей (Табл. 6).

Таблица 6

Результаты тестирования птицы на присутствие вируса лейкоза методом
ПЦР

Группа птиц		ПЦР на лейкоз J	ПЦР на лейкоз А- D	Отрицательные пробы
№	Поголовье			
1	118	2	109	7
2	79	0	72	7
3	145	5	92	48
4	100	5	83	12
5	133	0	90	43
6	142	0	87	55
7	160	5	132	23
8	160	5	124	31
9	145	0	127	18
10	92	0	80	12
11	141	1	110	30
12	144	3	98	43
13	70	0	62	8
14	70	3	63	4
15	30	8	20	2
16	38	5	32	1
17	95	0	58	37

Было установлено, что до 90% поголовья птицы содержит нуклеиновые кислоты вируса лейкоза птиц подгрупп А-D и свыше 10% поголовья птицы содержит нуклеиновые кислоты вируса лейкоза птиц подгруппы J.

По результатам научных исследований были подготовлены и утверждены в установленном порядке «Методические рекомендации по выявлению вируса лейкоза птиц в куриных эмбрионах и культурах клеток куриного происхождения методом полимеразной цепной реакции».

3.3. Изоляция и характеристика полевых изолятов вируса лейкоза птиц, циркулирующих на территории России в 2009-2011 гг.

Мы проводили коллекционирование проб и выделение полевых изолятов ВЛП на всем протяжении исследований. Для разработки метода идентификации ВЛП необходимо было подобрать оптимальные условия выделения изолятов ВЛП с целью увеличения количества вируса.

При анализе методов выделения ВЛП, применяемых разными исследователями, было установлено, что в качестве вируссодержащих материалов в основном использовались лейкоцитарная фракция крови и клоакальные смывы от инфицированных птиц [88]. Для выделения ВЛП нами была выбрана лейкоцитарная фракция крови птиц, поскольку данный материал меньше подвержен контаминацией различной микрофлорой и следовательно пригоден для получения более чистых изолятов на субстратах культур клеток.

Выделенная из проб крови лейкоцитарная фракция использовалась для дальнейшей изоляции вирусов в культуре клеток СПФ ФЭК, с целью создания банка вирусных изолятов и изучения их культуральных и молекулярно-генетических свойств. Выделение лейкоцитарной фракции проводили при помощи фикола («GE», США).

Для получения лейкоцитарной фракции использовали цельную кровь, отобранную от кур с клиническими признаками неопластических

заболеваний, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 минут. Переносили пастеровской пипеткой верхний слой плазмы во флакон с 5% ростовой средой.

Во многих литературных данных исследователи культивировали ВЛП на КК ФЭК не менее 10-14 дней, при этом использовали в основном вторично-трипсинизированную КК ФЭК [88]. Для такого длительного культивирования необходимо было подобрать соответствующие условия и питательные среды. В ходе исследований подбирались условия для культивирования первичной и вторичной культур клеток ФЭК. Первичную культуру клеток куриных фибробластов получали из 10-суточных эмбрионов СПФ-кур фирмы «Lohmann Tierzucht». Первичные и вторичные КК ФЭК готовились по общепринятым методикам. Культивирование инфицированных КК ФЭК проводили в пластмассовых культуральных матрасах, объемом 50 см^3 при $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Инокуляцию КК ФЭК проводили по 100 мкл вирусосодержащего материала. Для оценки наличия и накопления вируса при различных условиях использовалось титрование ВЛП при помощи метода ИФА.

При приготовлении вторично-трипсинизированной КК ФЭК монослой первичной культуры фибробластов промывали ФБР, обрабатывали раствором трипсина 0,25% до полного отслоения клеток. Суспензию отбирали в центрифужную пробирку. Клетки осаждали при 1000 об./мин. (80 g) в течение 10 мин. Затем клетки ресуспендировали в бессывороточной среде 199. Концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева. Посевная концентрация составляла 500 тыс. кл./мл. Культивирование проводили в культуральных матрасах 50 см^3 при 37°C . Росточная среда содержала 5% сыворотки КРС (рН 7,0-7,1). Монослой формировался в течение 8 часов. После заражения клетки культивировали в поддерживающей среде с 1% содержанием сыворотки КРС. Подбор питательных сред для длительного культивирования КК ФЭК представлен в Табл. 7. Результат пассажа оценивали через 14 дней с помощью разработанной ПЦР и ИФА.

Таблица 7

Сравнение питательных сред в зависимости от срока инкубации

Название питательной среды	Качество монослоя КК ФЭК на сутки инкубации				
	10	11	12	13	14
199	отслоение	отслоение	отслоение	отслоение	отслоение
DMEM	целый	част.отслоение	отслоение	отслоение	отслоение
MEM	целый	част.отслоение	отслоение	отслоение	отслоение
MEM+199	целый	целый	целый	част.отслоение	част.отслоение
F10+199	отслоение	отслоение	отслоение	отслоение	отслоение

Было показано, что использование в качестве поддерживающей бессывороточной среды MEM+199 (1:1) с содержанием 1% сывороткой КРС монослой КК ФЭК на 14 сутки инкубации частично отслаивался, но в целом оставался пригодным в сравнении с другими питательными средами.

Необходимо отметить, что ВЛП не вызывает цитопатоморфологических изменений культур клеток, что усложняет его выявление. Поэтому, в мировой практике для обнаружения ВЛП используются такие методы как ИФА и ПЦР [57, 66].

В нашей работе мы также проверяли наличие ВЛП с использованием методов ПЦР и ИФА после 10-14 дней культивирования вируса на клетках куриных фибробластов. Наличие ВЛП проверяли в культуральной жидкости и вируссодержащей массе, полученной после двукратного замораживания-оттаивания. Культуральная жидкость исследовалась на стерильность.

Каждый изолят проверяли на следующие возбудители: вирус болезни Марека (ВБМ) 1,2 и 3 серотипов, и вирус ретикуэнтотелиоза (ВРЭ).

Исследование на данные возбудители проводилось при помощи моноклональных и поликлональных антител (ADOL, США) в реакции иммунофлуоресценции.

В результате проведенных исследований было установлено, что ВЛП размножался в культуре клеток ФЭК с титром инфекционности $4,0-6,0 \pm 0,2 \lg \text{ТЦП}_{50/\text{мл}}$ при применении оптимальной схемы выделения и культивирования (Табл. 8). При этом наблюдалось, что ВЛП накапливался чуть в большем количестве при культивировании на вторичной культуре клеток ФЭК титр инфекционности достигали значений $4,75-6,125 \pm 0,25 \text{ТЦП}_{50/\text{мл}}$.

Таблица 8

Оптимальная схема выделения и культивирования ВЛП

№	Название этапа	Характеристика
1	Вирусосодержащий материал	Лейкоцитарная фракция крови
2	Культура клеток	Фибробласты эмбрионов СПФ-кур
3	Среда	МЕМ+199 (1:1)
4	Сыворотка крови и концентрация в ростовой среде	Сыворотка крови крупного рогатого скота 10%
5	Культуральные сосуды	Культуральные матрасы объемом 50 см^3
6	Температура культивирования	$37 \pm 0,5^\circ \text{C}$
7	Посевная концентрация клеток	500000 кл/см^3
8	Количество вирусного инокулята	100 мкл
9	Время культивирования	10 суток
10	Определение контаминации	БРЭ, БМ 1 сер, 2 сер, 3 сер.

Из 186 исследованных проб крови удалось выделить 13 изолятов (6,5%) из различных областей Российской Федерации, в ходе исследований проводимых в 2009-2011 годах. Выделенные изоляты, время, место изоляции,

а также характеристика биологических проб, из которых они были выделены, представлены в табл. 1 (материалы и методы).

Выделенные изоляты вируса лейкоза птиц были выделены из крови кур разных пород. Изоляты ВЛП и породы кур от которых был выделен ВЛП представлены в табл. 9.

Таблица 9

Породы кур, от которых выделены полевые изоляты ВЛП

№	Изолят	Подгрупповая принадлежность ^А	Порода кур	Тип продуктивности
1	132	AD	яичная	несушки
2	346	J	яичная	несушки
3	138	J	мясная	бройлер
4	130	AD	яичная	несушки
5	76	AD	яичная	несушки
6	11	J	яичная	несушки
7	9	J	яичная	несушки
8	7	J	яичная	несушки
9	5	J	яичная	несушки
10	2	J	яичная	несушки
11	3	J	яичная	несушки
12	8	AD	мясная	племенные
13	654	J	яичная	несушки

^А – подгрупповую принадлежность определяли при помощи методов ПЦР и РН

Из табл. 9 видно, что 2 изолята под номерами 8 и 138 были выделены от инфицированных кур мясной породы, остальные 10 изолятов – от кур яичной породы. Подгрупповую принадлежность ВЛП проверяли методом ПЦР и секвенированием. К подгруппе А-D принадлежат 4 изолята: 8, 76, 130 и 132; девять изолятов принадлежат к подгруппе J (346, 138, 11, 9, 7, 5, 2, 3, 654).

3.4. Определение и сравнительный анализ первичной структуры варибельной области гена envelope изолятов вируса лейкоза птиц, выделенных на птицефабриках России в 2009-2011 гг.

Для выявления генома вируса лейкоза птиц из инокулированных культур клеток ФЭК была выделена РНК, которую использовали как матрицу в ОТ- ПЦР. В результате амплификации с системой праймеров для выявления и дифференциации вируса лейкоза А-D синтезировали вирусспецифический фрагмент кДНК размером 314 п.н. и 738 п.н. – в результате амплификации с праймерами для лейкоза J. Фрагменты в 314 и 738 нуклеотидных пар, соответствующие варибельному 5'-концевому участку гена *envelope*, были амплифицированы у 13 российских изолятов вируса лейкоза птиц.

Подготовку ПЦР-фрагментов проводили при помощи гелелектрофореза и очищали, используя набор для выделения из геля «Geneclean kit» («Qbiogene», Канада). В качестве матрицы для секвенирования использовали амплифицированные фрагменты кДНК после очистки реакционной смеси от непрореагировавших праймеров при помощи spin-columns (Princeton separation) согласно инструкции производителя.

Исследовали 13 изолятов ВЛП, выделенных в 2009-2011 годах в птицеводческих хозяйствах различных регионов России. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей варибельной части гена *envelope*

ВЛП, позволяет не только оценивать и сравнивать нуклеотидную структуру среди штаммов, выделенных в разных регионах и в разное время на территории Российской Федерации, но и сравнивать их со штаммами, выделенными в других странах

Для выявления генетических отличий у полученных нами изолятов ВЛП был проведен анализ нуклеотидных последовательностей амплифицированного ПЦР-фрагмента гена *envelope*. Нуклеотидные последовательности выделенных ранее вирусов лейкоза птиц из других стран получали из банка данных GenBank ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/)). Необходимо отметить, что молекулярно-генетическое исследование различных подтипов вируса лейкоза птиц получило широкое распространение в последние годы [138, 174, 197, 233, 234].

При проведении филогенетических исследований важным является вопрос о выборе участка генома, на основании которого проводится анализ. Нами был выбран участок гена *envelope*, поскольку основные подгруппы вируса лейкоза птиц были выделены на основании различий в последовательностях гена вирусного оболочечного гликопротеина *env*, что определяет различное поведение в реакции нейтрализации, различие в моделях проникновения вируса в восприимчивый организм и различие в инфекционности вирусов для ряда мишеней (*in vivo* и *in vitro*) [134, 267]. Кроме того, из анализа литературы, было выявлено, что ген *envelope* содержит 5 гипервариабельных региона в участке *gp85* [27].

На рис. 7 представлена филогенетическая дендрограмма, построенная на основании частичных последовательностей гена *envelope* вируса лейкоза птиц. Данная дендрограмма отражает генетические взаимоотношения между исследованными изолятами и штаммами ВЛП, циркулирующих на территории других стран. Анализ результатов исследований позволяет наиболее полно представить вариабельность вируса ВЛП, а также генетическое родство между штаммами.

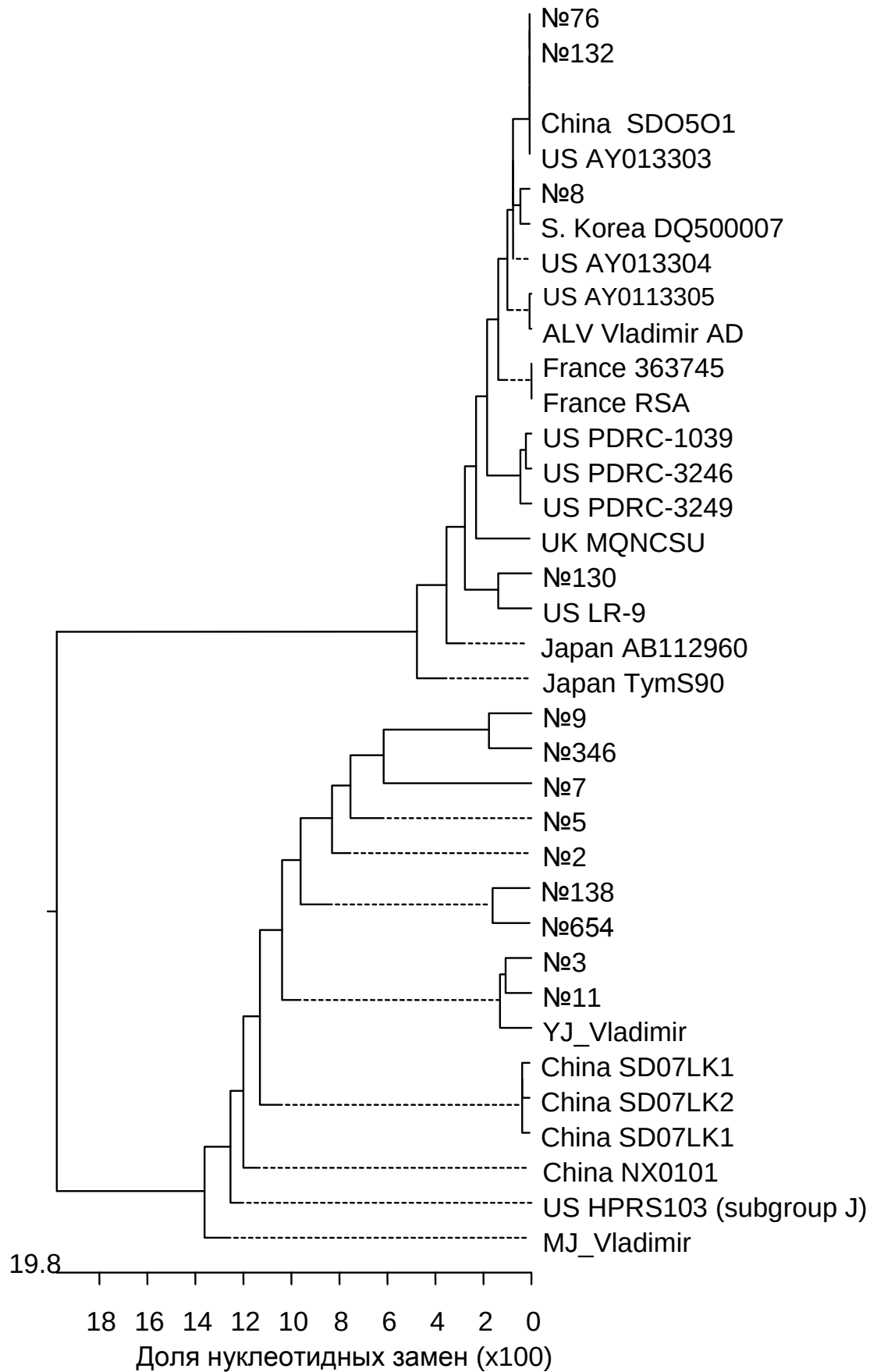


Рис. 7. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основании первичной структуры фрагмент кДНК гена envelope ВЛП

Анализ филогенетической дендрограммы (рис. 7) показал, что четыре изолята 130, 76, 132, 8 образуют с известными ранее штаммами (AY013303, EF467236, DQ500007, AY013304, EU070900, EU070901, EU070902, M37980, NC_001408, DQ365814, AY350569, AB303223, AB112960) одну генетическую группу, с уровнем внутригрупповых отличий не превышающих 5%. В данной группе представлены экзогенные и рекомбинантные штаммы ВЛП, выделенные на территориях США, Китая, Франции и Японии, начиная с 1993 г. и по настоящее время.

Изоляты 9, 7, 2, 5, 3, 11, 138, 346 и 654 образуют вторую обширную генетическую группу с изолятами ВЛП подгруппы J, выделенных на территории Китая, Франции и США. Внутригрупповые отличия в данной группе превышают 10%. В данную группу также входят 2 российских изолята ВЛП подгруппы J, выделенных и исследованных сотрудниками из ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г.Владимир, Россия): MJ и YJ. При этом изолят MJ образует отдельную подгруппу с нуклеотидными отличиями 14%.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Инфекционные ретровирусные заболевания, вызываемые вирусом лейкоза птиц, наносят серьезный экономический ущерб современной птицеводческой отрасли. В некоторых странах успешно применяются разработанные программы и меры по ликвидации ВЛП в птицеводческих хозяйствах, что благотворно сказывается на экономических показателях и эпизоотологической ситуации в целом. Одной из задач эпизоотологического мониторинга инфекционных болезней является лабораторное исследование проб биологического материала, отобранного в ходе эпизоотологического обследования территории природного очага. Результаты данных исследований позволяют оценить эпизоотическую обстановку на данной территории и также получить информацию для управленческих решений по проведению профилактических и противоэпизоотологических мероприятий.

Первоочередной задачей данного исследования стало изучение эпизоотологической обстановки в отношении ретровирусных заболеваний, адекватно отражающей состояние российских птицеводческих хозяйств в настоящее время.

Анализ литературных данных показывает, что вирусы ЛП широко распространены во многих странах с развитым промышленным птицеводством [2, 94, 134, 160, 178]. При этом отмечается, что в развивающихся странах встречаемость ретровирусных инфекций намного выше, чем в развитых странах. Это говорит о том, что в развитых странах эффективнее развита система мониторинга и контроля над данными инфекциями. Эпизоотологический мониторинг позволяет проводить исследования на наличие возбудителей инфекций и дает оценку благополучности местности или хозяйств в отношении циркулируемых инфекций. Эпизоотологический мониторинг проводится с использованием различных вирусологических, серологических и молекулярно-биологических

методов. В результате мутационных изменений и рекомбинации между экзогенными и эндогенными ВЛП, могут образовываться новые штаммы. Так недавно, был выделен новый полевой штамм HPRS-103, который в 1990-х годах, вызвал энзотическую вспышку миелоцитоматоза в бройлерных птицефабриках на территории США [184, 188, 189, 190, 244]. Данный штамм определили в новую подгруппу J [184].

Полученные нами результаты указывают на то, что вирус лейкоза птиц очень широко распространен на территории Российской Федерации. На наличие ВЛП было проверено более 10000 сывороток крови, полученных из 223 птицеводческих хозяйств, расположенных в 47 разных регионах Российской Федерации. Серологические исследования показали, что практически все обследованные фабрики яичного направления (97%) и более чем в 50% бройлерных хозяйств инфицированы ВЛП.

Серологические исследования на наличие антител к ВЛП подгруппы J проводились во многих странах. Однако данные исследования проводились в экспериментальных условиях и на небольшой популяции птиц [232, 273]. В некоторых литературных источниках встречались данные о частоте ВЛП-J-инфекций [94, 263, 272]. В сообщении Wang с соавторами [263] показано, что инфекции, индуцированные ВЛП подгруппы J, обнаружили в 1 из 3 (33,3%) обследованных птицеводческих хозяйств в Тайване. В другом исследовании [249] ВЛП-J-инфекция была зафиксирована в 5 из 8 птицеводческих хозяйств (62%). В исследованиях Wunderwald и соавторы [273] обнаружили в 3 (75%) из 4 птицеводческих хозяйств.

В наших исследованиях антитела против ВЛП подгруппы J выявили в образцах сывороток крови птиц в 70% исследованных фабрик, как яичного, так и бройлерного направления. Полученные результаты исследования указывают на критическую ситуацию в отношении распространения ВЛП подгруппы J на территории Российской Федерации, и представляется большой угрозой для отечественных птицеводческих хозяйств.

В связи с этими данными, для успешной профилактики необходимо проводить диагностику ВЛП среди птицеводческих организаций, выбраковку птиц, положительных на ВЛП, и особенное внимание уделять дезинфекции помещений и содержанию птиц после вылупления.

Поскольку не существуют вакцин для профилактики и лечения данных заболеваний во всем мире разработаны и применяются эффективные меры и процедуры по контролю распространения ретровирусных заболеваний в птицеводческих хозяйствах. Но на сегодняшний день все равно встречается очень много сообщений о вспышках данных заболеваний в птицеводческих хозяйствах по всему миру [70, 75, 94, 160, 244]. Процедуры по контролю ретровирусных инфекций птиц состоит из обнаружения сероположительных птиц и удаления их из стада [89, 189, 190, 238]. Точный и своевременный диагноз является неотъемлемой частью процедур по контролю ретровирусных заболеваний. Поэтому важным считается разработка надежного и эффективного метода по выявлению и дифференциации вируса лейкоза птиц, что и стало нашей второй задачей

Современные методы диагностики вирусов лейкоза птиц включают в себя определение вирусных группоспецифических антигенов (ГСА) при помощи иммуноферментного анализа [47, 232]. Однако этот тест не подходит для обнаружения ГСА только экзогенного происхождения, так как он будет также определять эндогенные ГСА [65]. Наиболее надежным методом диагностики экзогенных вирусов лейкоза птиц считается иммуноферментный анализ после предварительного культивирования вируса лейкоза птиц на культуре клеток эмбриональных фибробластов [94, 186]. Однако данная процедура требует больших временных затрат (минимум 7 дней).

Полимеразная цепная реакция, наряду с разносторонним применением в различных областях молекулярной биологии, является ценным инструментом для быстрой и точной диагностики множества инфекционных агентов, в том числе и вирусов лейкоза птиц [197]. При совместном

использовании дезоксирибонуклеазы и обратной транскриптазы (ОТ) можно четко определить статус ретровирусной инфекции, подтверждая наличие либо ретровирусной РНК, либо провирусной ДНК-копии [183]. Кроме того, метод ПЦР позволяет дифференцировать лейкоз типов А-D и J по существенным различиям во втором и третьем переменных участках гена *gp85-env* [26, 27].

Нами была разработана тест-система для обнаружения и дифференциации вирусов лейкоза птиц подгрупп А-D и J методом полимеразной цепной реакции, которая сейчас используется в птицеводческой индустрии в Российской Федерации для скрининга различных хозяйств на наличие вируса лейкоза птиц. Тест-система обладает высокой чувствительностью (10^{-15} г или 10^2 копий РНК/мл) и специфичностью (100%). Кроме того, данная тест-система позволяет дифференцировать подгруппы А-D и J ВЛП. Выявление ВЛП подгруппы J необходима, т.к. вирусы данной подгруппы вызывают более высокий процент заболеваемости и смертности. Смертность от миелоидного лейкоза может достигать до 50% поголовья [89].

Кроме того, разработанная тест-система позволяет работать с разными биологическими образцами и ее можно применять для дополнительного контроля чистоты ветеринарных или медицинских препаратов. Поскольку во многих вакцинах медицинского и ветеринарного применения в качестве субстрата для размножения вируса обычно используются эмбрионы кур и культуры клеток куриных фибробластов и отсутствие периодического контроля куриных эмбрионов и клеток куриного происхождения, использующихся для культивирования вирусов, может привести к контаминации вирусами животных создаваемых вакцинных препаратов для людей.

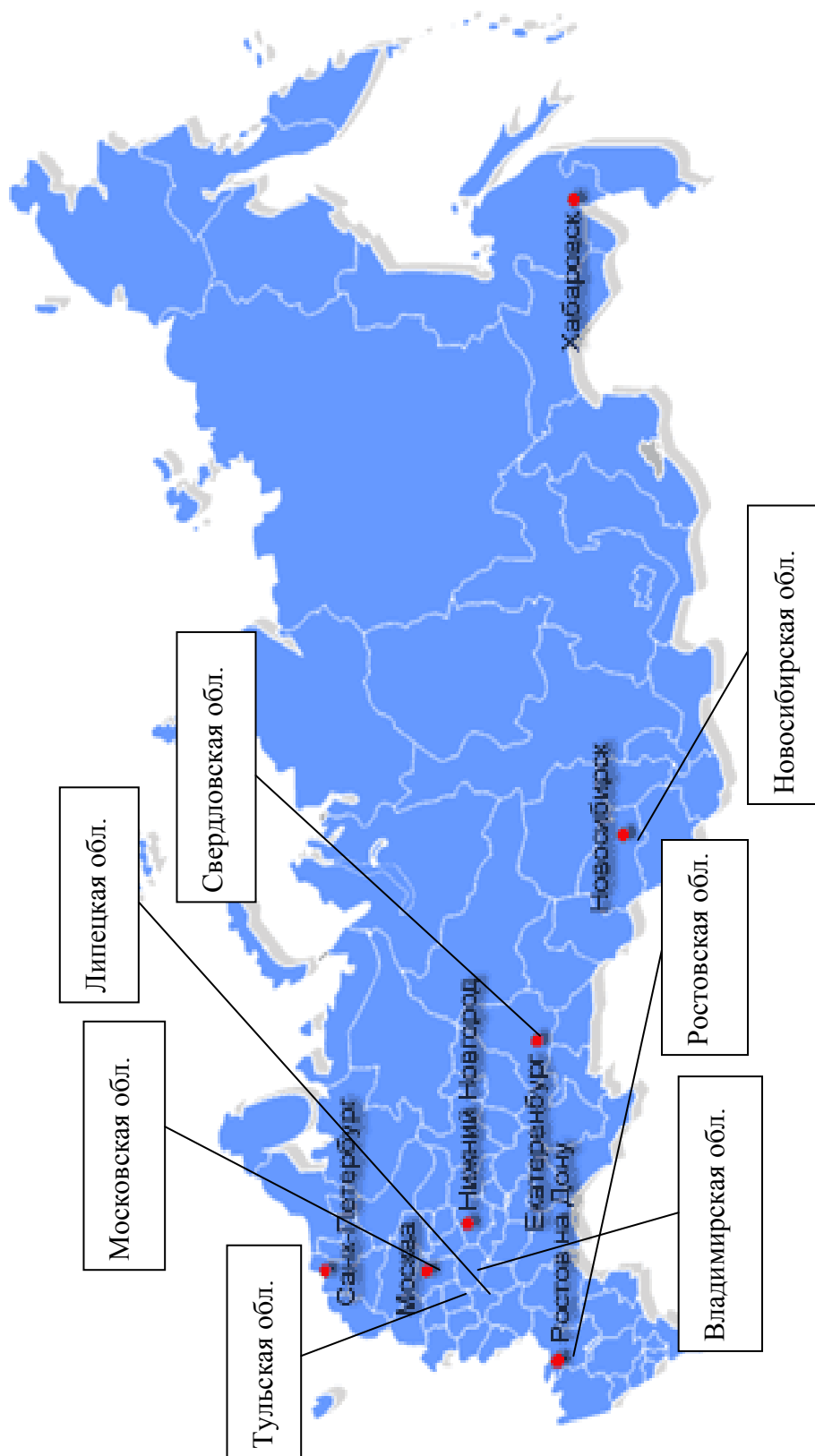


Рис. 8. Регионы, в которых были выделены изоляты ВЛП

В ходе выполнения мониторинга ретровирусных заболеваний птиц неопластической природы на территории России, параллельно велась работа по выделению и изучению молекулярно-биологических свойств изолятов ВЛП, циркулирующих в России на момент проведения исследований. Необходимо было подобрать оптимальные условия для выделения изолятов ВЛП и провести нуклеотидный анализ выделенных изолятов.

Из литературных источников [88], в качестве вируссодержащего материала использовали лейкоцитарную фракцию крови и в качестве субстрата использовали вторично-трипсинизированную культуру клеток ФЭК.

Для выделения изолятов ВЛП нами были подобраны оптимальные условия для культивирования в первичной и вторичной культурах клеток куриных фибробластов. В результате наших исследований были выявлены и охарактеризованы 13 изолятов вируса лейкоза птиц. Выделенные изоляты были идентифицированы методами ИФА и ПЦР. Регионы, в которых были выделены изоляты ВЛП, представлены на схеме карты Российской Федерации (Рисунок 8).

Во многих литературных источниках [94, 184, 235], указывалось, что ВЛП подгруппы J поражал в основном кур мясных пород. При помощи разработанной нами тест-системы, нами было установлено, что шесть изолятов относились к подгруппе J и были выделены от кур яичной породы. Основываясь на результатах серологического мониторинга и выделения, можно предположить, что данный вирус может спорадически поражать и кур яичной породы.

Следующим этапом стало изучение молекулярно-генетических свойств, выделенных отечественных изолятов. В литературных источниках [26] указывалось, что ген *envelope*, содержит пять гипервариабельных участков. А исследования Dorner и Coffin [79] установили, что домены hr1 и hr2 у всех подгрупп ВЛП в основном отвечали за специфичность связывания рецепторов подгруппами А-Е у определенных фенотипических групп кур,

которые отличались восприимчивостью к ВЛП различных подгрупп. Таким образом, нуклеотидный анализ гена *envelope* позволяет оценивать и сравнивать нуклеотидную структуру среди штаммов.

В наших исследованиях мы секвенировали часть гена *envelope*. При сравнительном анализе вирусных геномов было установлено, что выделенные нами отечественные изоляты ВЛП, незначительно отличаются от изолятов, выделенных на территории других стран, что наводит на мысль об их общем предшественнике.

Исследуемые изоляты ВЛП формируют две обширные группы, в каждую из которых входят российские изоляты. Данные результаты схожи исследованиями Vengupal K. с соавторами [257], у них было установлено три группы вирусов. ВЛП подгруппы А, В,С, D и Е образовывали одну филогенетическую группу, показывая близкие отношения между ними. Двенадцать изолятов ВЛП подгруппы J, штамм HPRS-103 и эндогенные ретровирусные элементы из EAV-семейства образовывали вместе вторую родовую группу.

В наших исследованиях одна группа изолятов образована экзогенными и эндогенными ВЛП, и в ней представлено 4 российских изолята: 76, 132, 8, 130. И вторая группа ВЛП подгруппы J в которой 9 изолятов: 654, 138, 346, 2, 3, 5, 9, 7, 11. Из генетического сравнительного анализа, видно, что большинство выделенных изолятов (девять изолятов) представляют подгруппу J, которая состоит из рекомбинантных вирусов, образованных путем рекомбинации между эндогенными и экзогенными ВЛП. В результате данной рекомбинации могут образовываться штаммы с различными генетическими подгруппами, существенно отличаясь друг от друга [54, 182].

Таким образом, в результате проведенных исследований была охарактеризована эпизоотологическая ситуация в отношении ретровирусных инфекций птиц на территории РФ, разработана, оценена и внедрена в практику тест-система для обнаружения и дифференциации вирусов лейкоза птиц подгрупп А-D и J методом полимеразно-цепной реакции,

выделены и охарактеризованы 13 изолятов вируса ЛП, циркулирующих на территории РФ в 2009-2011 годах.

ВЫВОДЫ

1. Исследование птицеводческих хозяйств различных регионов Российской Федерации показало, что 97% фабрик яичного направления и более чем в 50% бройлерных хозяйств инфицированы ВЛП.
2. Антитела против ВЛП подгруппы J выявили в образцах сывороток крови, собранных при обследовании 70% исследованных фабрик, как яичного, так и бройлерного направления. Наибольший процент сероположительных сывороток отмечали в старшей возрастной группе (более 300 сут); для яичного и бройлерного направления значения составили соответственно 46 и 49 %.
3. Показано, что максимальное количество образцов, в которых детектировали gs-антиген ВЛП, в птицеводческих хозяйствах яичного направления отмечали в возрастной группе (101-130 сут. до 67 %), а бройлерного — в двух группах (41-100 сут. - 68 %; 101-130 сут. - 66 %).
4. Показано, что разработанная тест-система для обнаружения и дифференциации ВЛП подгрупп А-D и J методом полимеразно-цепной реакции может быть использована для выявления и дифференциации различных подтипов ВЛП в птицеводческих хозяйствах РФ. Специфичность тест-системы составляет 100%, аналитическая чувствительность 10^{-15} г РНК (10 копий РНК/мкл).
5. Установлено, что 13 полевых изолятов ВЛП, выделенных на территории России в течение 2009-2011 гг., согласно нуклеотидной последовательности вариабельной части гена *envelope*, принадлежат к различным подтипам ВЛП и формируют 2 генетические группы.
6. Методом филогенетического анализа установлено, что российские изоляты ВЛП на 5-10% нуклеотидных замен отличаются от зарубежных, что прямо указывает на один общий предшественник.

Практические предложения

1. Разработана нормативно-техническая документация (инструкция по применению от 21.05.2009 и ТУ 9388-003-42418073-04, изв. №1 от 20.05.2009), утверждена в Россельхознадзоре. Производство тест-системы начато в ООО «ВЕТБИОХИМ».
2. «Тест-система для обнаружения и дифференциации вирусов лейкоза птиц подтипов AD и J» используется более 5 лет в ветеринарных региональных лабораториях.
3. Разработаны «Методические рекомендации по выявлению вируса лейкоза птиц в куриных эмбрионах и культурах клеток куриного происхождения методом полимеразной цепной реакции», которые находятся на рецензии в Роспотребнадзоре.
4. Создан банк данных нуклеотидных последовательностей вариабельной области гена *envelope* отечественных изолятов вируса лейкоза птиц, выделенных на территории РФ в 2009-2011 годах.
5. Изолированный и охарактеризованный штамм ВЛП «2/11», представляющий подгруппу J, депонирован в государственную коллекцию вирусов (ГКВ) Российской Федерации (ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России) (удостоверение о депонировании в ГКВ от 09.07.2014).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бакулин В.А. Болезни птиц/ Бакулин В.А.-СПб: В. А. Бакулин,-2006.- С. -688.
2. Валихов А.Ф. Биологические свойства вируса лейкоза крупного рогатого скота, диагностика и профилактика инфекции.: автореф. дис. . докт. биол. наук / А.Ф. Валихов.- ВИЭВ,-1992.- 46 с
3. Гребенникова Т. В., Алексеев К. П., Власова А. Н., Покровская М. А., Богосьян А. А., Забережный А. Д., Алипер Т. И. Непоклонов Е. А.- Исследование поголовья птиц на наличие вируса птичьего лейкоза методом ПЦР.// Птицы и птицепродукты. 2003. – 6. – с. 35-37.
4. Дьяконов Л. П., Глухов В. Ф., Поздняков А. А., Денисенко Г. Ф., Калмыкова Т. П. Культивирование клеток и тканей животных. - Ставрополь: Ставроп. Правда, 1988, 2 часть, 91 с.
5. Зеленский В.П., Коровин В.П. Значения для научных исследований хозяйств СПФ. // В кн. Опухолевые болезни птиц, 1984, с. 18-20, 87-126.
6. Мазуренко Н.П. и др. Опыт организации в эксплуатации хозяйства безлей-козных кур института экспериментальной и клинической онкологии АМН СССР. // Вестник АМН СССР, N4, 1974, с. 20-28.
7. Сюрин В. Н., А.Я. Самуйленко, Е.В. Соловьев, Н.В. Фомина. Вирусные болезни животных / В. Н.Сюрин, А.Я. Самуйленко, Е.В. Соловьев, Н.В. Фомина.– М.: ВНИИТиБП, 1998. – С. 376-383.
8. Сюрин В. Н., Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина. / Диагностика вирусных болезней животных: Справочник/ В. Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина.-М.: Агропромиздат, 1991. -С. 291-308.
9. Тулев Ю.В., Погребняк Л.Л., Франгулян К.Ш., Зеленский В.П. Распространение лейкоза птиц по данным ретроспективных исследований.// Физико-химические и биологические свойства некоторых онкогенных вирусов. Рига: Зинатне, 1975, -С . 261-264.

10. Adkins H. B., J. Brojatsch, and J. A. Young. Identification and characterization of a shared TNFR-related receptor for subgroup B, D, and E avian leukosis viruses reveal cysteine residues required specifically for subgroup E viral entry//J Virol.-2000.-№74 -P. 3572-78.
11. Arendrup M., A. Sonnenborg, B. Svennerholm, L. Akerblom, C. Nielsen, H. Clausen, S. Oloffson, J.O. Nielsen and J.E. Hansen. Neutralizing antibody response during human immunodeficiency virus type I infection: type and group specificity and viral escape//J General Virol.- 1993.-№74.-P. 855-863.
12. Bacon L.D., R.L. Witter, L.B. Crittenden, A. Fadly, and J. Motta. 1981. B-haplotype influence on Marek's disease, Rous sarcoma, and lymphoid leukosis virus-induced tumors in chickens. Poult Sci 60. -P. 1132-1139.
13. Bacon L.D., T.L. Fredrickson, D.G. Gilmour, A. Fadly, and L.B. Crittenden. Tests of association of alloantigen genotypes with resistance to viral oncogenesis in chickens. 2. Rous sarcoma and lymphoid leukosis in progeny derived from 6₃ x 15I and 100 x 6₃ crosses//Poult Sci.-1985.-№64.-P. 39-47.
14. Bagust T., S. Fenton, and M. Reddy. Avian Leukosis virus subgroup J (ALV-J) - Developing laboratory technologies for diagnosis in Australia.//A. government (ed.): Rual Industries Research and Development Corporation.-2004.-Vol. RIRDC Publication No 04/116.
15. Bai J., K. Howes, L. N. Payne, and M. A. Skinner. Sequence of hostrange determinants in the env gene of a full-length, infectious proviral clone of exogenous avian leukosis virus HPRS-103 confirms that it represents a new subgroup (designated J)//J Gen Virol.-1995.-№76 (Pt 1). -P. 181-187.
16. Bai J., L. N. Payne, and M. A. Skinner. HPRS-103 (exogenous avian leukosis virus, subgroup J) has an env gene related to those of endogenous elements EAV-0 and E51 and an E element found previously only in sarcoma viruses//J Virol.-1995.-№69.-P. 779-84.
17. Baker B., H. Robison, H. E. Varmus, and J. M. Bishop. Analysis of endogenous avian retrovirus DNA and RNA: viral and cellular determinants of retrovirus gene expression//Virology.-1981.-№114.-P. 8-22.

18. Beard J. Biology of avian oncoronaviruses//New York: Raven Press,-1980.-P. 82
19. Benson S. J., B. L. Ruis, A. M. Fadly, and K. F. Conklin. The unique envelope gene of the subgroup J avian leukosis virus derives from ev/J proviruses, a novel family of avian endogenous viruses//J Virol.-1998.-№72. -P. 10157-10164.
20. Benson S. J., B. L. Ruis, A. L. Garbers, A. M. Fadly, and K. F. Conklin. Independent isolates of the emerging subgroup J avian leukosis virus derive from a common ancestor//J Virol.-1998.-№72.-P. 10301-10304.
21. Bieth E., and J. L. Darlix. Complete nucleotide sequence of a highly infectious avian leukosis virus//Nucleic Acids Res.-1992.-№20.-P. 367.
22. Bittner J. J. Some Possible Effects of Nursing on the Mammary Gland Tumor Incidence in Mice//Science.-1936.-№84.-P. 162–162
23. Bizub D., R. A. Katz, and A. M. Skalka. Nucleotide sequence of noncoding regions in Rous-associated virus-2: comparisons delineate conserved regions important in replication and oncogenesis//J Virol.-1984.-№49.-P. 557-65.
24. Boyce-Jacino M. T., K. O'Donoghue, and A. J. Faras. Multiple complex families of endogenous retroviruses are highly conserved in the genus Gallus//J Virol.-1992.-№66.-P. 4919-4929.
25. Boyce-Jacino M. T., R. Resnick, and A. J. Faras. Structural and functional characterization of the unusually short long terminal repeats and their adjacent regions of a novel endogenous avian retrovirus.//Virology.-1989.-№173.-P. 157-66.
26. Bova C. A., Olsen, J.C. and R. Swanstrom. The avian retrovirus env gene family: molecular analysis of host range and antigenic variants//J Virology.-1988.-№62.-P. 75-83.
27. Bova-Hill C., J.C. Olsen, R. Swanstrom. Genetic analysis of the Rous sarcoma virus subgroup D env gene: mammal tropism correlates with the temperature sensitivity of gp85//J Virology.-1991.-№65.-P. 2073-2080.

28. Brandvold K. A., P. Neiman, and A. Ruddell. Angiogenesis is an early event in the generation of myc-induced lymphomas//Oncogene.-2000.-№19.-P. 2780-2785.
29. Breslauer K. J., R. Frank, H. Blocker, and L. A. Marky. Predicting DNA duplex stability from the base sequence//Proc Natl Acad Sci USA.-1986.-№83.-P. 3746-34750.
30. Buchschacher G. L., Jr. Introduction to retroviruses and retroviral vectors//Somat Cell Mol Genet.-2001.-№26. P. 1-11.
31. Burmester B.R. Studies on the transmission of avian visceral lymphomatosis. II Propagation of lymphomatosis with cellular and cell-free preparations//Cancer Res.-1947.-№7.-P. 786-797.
32. Burmester B.R. The shedding of the virus of visceral lymphomatosis in the saliva and feces of individual normal and lymphamatus chickens//Poult Sci.-1956.-№35.-P. 1089-1099.
33. Burmester B. R., and G. E. Cottral. The propagation of filterable agents producing lymphoid tumors and osteopetrosis by serial passage in chickens//Cancer Res.-1947.-№7.-P. 669-675.
34. Burmester B. R., and H. G. Purchase. The history of avian medicine in the United States. V Insights into avian tumor virus research//Avian Dis.-1979.-№23. - P. 1-29.
35. Burmester B. R., and N. F. Waters. Variation in the presence of the virus of visceral lymphomatosis in the eggs of the same hens//Poult Sci.-1956.-№35.-P. 939-944.
36. Burmester B. R., and T. N. Fredrickson. Transmission Of virus from field cases of avian lymphomatosis. I. Isolation of virus in line 151 chickens//J Nati Cancer Inst.-1964.-№32.-P. 37-63.
37. Burmester B. R., A. K. Fontes, and W. G. Walter. Pathogenicity of a viral strain (RPL 12) causing avian visceral lymphomatosis and related neoplasms. III. Influence of host age and route of inoculation//J Natl Cancer Inst.-1960.-№24.-P. 1423-42.

38. Burmester B. R., M. A. Gross, W.G. Walter and A.K. Fontes. Pathogenicity of a viral strain (RPL 12) causing avian visceral lymphomatosis and related neoplasms. II. Yst virus interrelations affecting response//J Natl Cancer Inst.-1959.-№22.-P. 103-127.
39. Burmester B. R., W.G. Walter, M. A. Gross, and A.K. Fontes. The oncogenic spectrum of two pure strains of avian leukosis//J Natl Cancer.-1959.-№23.-P. 277-291.
40. Burstein H., M. Gilead, U. Bendheim, and M. Kotler. Viral aetiology of haemangiosarcoma outbreaks among layer hens//Avian Pathol.-1984.-№13.-P. 715-726.
41. Butterfield E. E. Aleukaemic lymphadenoid tumors of the hen//Polia Haemotol.-1905.-№2.-P. 649-657.
42. Calnek B. W. Morphological alteration of RIF-infected chick embryo fibroblasts//Nat Cancer Inst Monogr.-1964.-№17.-P. 425-447.
43. Calnek B. W. Lymphoid leukosis virus: a survey of commercial breeding flocks for genetic resistance and incidence of embryo infection//Avian Dis.-1968.-№12.-P. 104-111.
44. Campbell J.G., and E.C. Appleby. Tumours in young chickens bred for rapid body growth (broiler chickens): A study of 351 cases//J Pathol Bacteriol.-1966.-№92.-P. 77-90.
45. Chai N. and P. Bates. Na⁺/H⁺ exchanger type 1 is a receptor for pathogenic subgroup J avian leukosis J//Proc Natl Acad Sci USA.-2006.-№103.-P. 5531-5536.
46. Caparini U. Fetati leucimici nei poli//Clin Vet.-Milan.-1896.-№19.-P. 433-435.
47. Chen Y.C., and P.K. Vogt. Endogenous leukosis viruses in the avian family Phasianidae//Virology.-1977.-№76.-P. 740-750.
48. Chesters P. M., K. Howes, J. C. McKay, L. N. Payne, and K. Venugopal. Acutely transforming avian leukosis virus subgroup J strain 966: defective genome encodes a 72-kilodalton Gag-Myc fusion protein//J Virol.-2001.-№75.-P. 4219-4225

49. Clark D. P., and R.M. Dougherty. Detection of avian oncovirus group-specific antigens by the enzyme-linked immunosorbent assay//J Gen Virol.-1980.-№47.-P. 283-291.
50. Clark S. P., and T. W. Mak. Nucleotide sequences of the murine retrovirus Friend SFFVp long terminal repeats: identification of a structure with extensive dyad symmetry 5' to the TATA box//Nucleic Acids Res.-1982.-№10.-P. 3315-3330.
51. Clurman B. E., and W. S. Hayward. Multiple proto-oncogene activations in avian leukosis virus-induced lymphomas: evidence for stage-specific events//Mol Cell Biol.-1989.-№9.-P. 2657-2664.
52. Coffin J.M. Structure of retroviral genome. RNA tumor viruses/Molecular Biology of Tumor Viruses, In R. Weiss, N. Teich, H. Vannus and J. Coffin (eds.).-2nd ed.-NY: Cold Spring Harbor Laboratory.-1982.-P. 261-368.
53. Coffin J. Structure and classification of retroviruses/The Retroviridae, In J. Levy (ed.).-Vol.1.-New York: Plenum Press,-1992.-V.1.-P. 19-49.
54. Coffin J. The viruses and their replication. In B. Fields, D. Knipe, P. Howley, and *et al.* (ed.), Fundamental Virology. -Philadelphia : Lippincott-Raven.-1996.-P. 763-843
55. Coffin J. M., P. N. Tsichlis, K. F. Conklin, A. Senior, and H. L. Robinson. Genomes of endogenous and exogenous avian retroviruses//Virology.-1983.-№126.-P. 51-72.
56. Collier H. A., C. Grandori, P. Tamayo, T. Colbert, E. S. Lander, R. N. Eisenman, and T. R. Golub. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion//Proc Natl Acad Sci USA.-2000.-№97.-P. 3260-3265.
57. Cook M.K. Cultivation of a filterable agent associated with Marek's disease//J Nail Cancer Inst.-1969.-№43.-P. 203-212.
58. Cooper G. M. Cellular transforming genes//Science.-1982.-№217.-P. 801-806.

59. Cooper M. D., L. N. Payne, P. B. Dent, B. R. Burmester, and R. A. Good. Pathogenesis of avian lymphoid leukosis. I. Histogenesis//J Natl Cancer Inst.-1968.-№41.-P. 373-378.
60. Cottral G.E., B. R. Burmester, and N.F. Waters. Egg transmission of avian lymphomatosis//Poult Sci.-1954.-№33.-P. 1174-1184.
61. Crittenden L. B. Exogenous and endogenous leukosis virus genes—a review//Avian Pathology.-1981.-№10.-P. 101-112.
62. Crittenden L. B., A. M. Fadly, and E. J. Smith. Effect of endogenous leukosis virus genes on response to infection with avian leukosis and reticuloendotheliosis viruses//Avian Dis.-1982.-№26.-P. 279-294.
63. Crittenden L. B., S. McMahon, M. S. Halpern, and A. M. Fadly. Embryonic infection with the endogenous avian leukosis virus Rous-associated virus-0 alters responses to exogenous avian leukosis virus infection//J Virol.-1987.-№61. -P. 722-725.
64. Crittenden L. B., and D. W. Salter. A transgene, alv6, that expresses the envelope of subgroup A avian leukosis virus reduces the rate of congenital transmission of a field strain of avian leukosis virus//Poult Sci.-1992.-№71.-P. 799-806.
65. Crittenden L. B., and E. J. Smith. A comparison of test materials for differentiating avian leukosis virus group-specific antigens of exogenous and endogenous origin//Avian Dis.-1984.-№28.-P. 1057-1084.
66. Crittenden L. B., and R.L. Witter. Studies of flocks with high mortality from lymphoid leukosis//Avian Dis.-1978.-№22.-P. 16-23.
67. Crittenden L. B., E. J. Smith, and A. M. Fadly. Influence of endogenous viral (ev) gene expression and strain of exogenous avian leukosis virus (ALV) on mortality and ALV infection and shedding in chickens//Avian Dis.-1984.-№28.-P. 1037-1056.
68. Crittenden L. B., H.G. Purchase, J.J. Solomon, W. Okazaki, and B.R. Burmester. Genetic control of susceptibility to the avian leukosis complex. I. The leukosis-sarcoma virus group//Poult Sci.-1972.-№51.-P. 242-267.

69. Crittenden L. B., W. Okazaki, and J. Smith. Incidence of avian leukosis virus infection in broiler stocks and its effect on early growth//Polt Sci.-1983.-№62.-P. 2383-2386.
70. Cui Z., Y. Du, Z. Zhang, and R. F. Silva. Comparison of Chinese field strains of avian leukosis virus subgroup J viruses with prototype strain HPRS-103 and United States strains//Avian Dis.-2003.-№47.-P. 1321-30.
71. Cummins T.J., and R.E. Smith. Analysis of hematopoietic and lymphopoietic tissue during a regenerative aplastic crisis induced by avian retrovirus MAV-2(0)//Virology.-1988.-№163.-P. 452-461.
72. Dales S., and H. Hanafusa. Penetration and intracellular release of the genomes of avian RNA tumor viruses // Virology.-1972.-№50.-P. 440-458.
73. de Boer G., and A. Osterhaus. Application of monoclonal antibodies in the avian leukosis virus group-specific antigen ELISA // Avian Pathology.-1984.-№14.-P. 39-55.
74. de Boer G.F., J van Vloten, and D. van Zaane. / Possible horizontal spread of lymphoid leukosis virus during vaccination against Marek's disease // Resisntence and Immunity to Marek's Disease, (P.M. Biggs ed.).-Luxembourg: C.E.C.-1980.-P. 552-565
75. de Boer G., O.J.H. Devos, and H.J.I. Maas. The incidence of lymphoid leukosis in chickens in the Netherlands // Zootechnica Intern.-1981.-№10.-P. 32-35.
76. Diaz-Griffero F., A. P. Jackson, and J. Brojatsch. Cellular uptake of avian leukosis virus subgroup B is mediated by clathrin // Virology.-2005.-№337 -P. 45-54.
77. DiStefano H.S., and R. M. Dougherty. Multiplication of avian leukosis virus in the reproductive system of the rooster // J Nat Cancer Inst.-1968.-№41.-P. 451-464.
78. Domingo E., J. Diez, M.A. Martinez, J. Hernandez, A. Holguin, B. Borego and M.G. Mateu. New observation on antigenic diversification of RNA viruses.

Antigenic variation is not dependent on immune selection // J General Virol.-1993.-№74.-P. 2039-2045.

79. Dorner A.J., and J.M. Coffin. Determinants for receptor interaction and cell killing on the avian retrovirus glycoprotein gp85 // Cell.-1986.-№45.-P. 365-374.

80. Dougherty R. M., J.A. Stewart, and H.R. Morgan. Quantitative studies of the relationships between infecting dose of Rous sarcoma virus, antiviral immune response, and tumor growth in chickens // Virology.-1960.-№11.-P. 349-370.

81. Dunwiddie C. T., R. Resnick, M. Boyce-Jacino, J. N. Alegre, and A. J. Faras. Molecular cloning and characterization of gag-, pol-, and env-related gene sequences in the ev- chicken // J Virol.-1986.-№59.-P. 669-675.

82. Eckert E.A, D. Beard, and J.W. Beard. Dose-response relations in experimental transmission of avian erythromyeloblastic leukosis. II. Titration of the virus // J Natl Cancer Inst.-1953.-№14.-P. 1055-1066.

83. Elledar D., V. Stepanets, D.S. Melder, F. Senigl, J. Geryk, P. Pajer, J. Plachy, J. Hejnar, J. Svoboda, and M. Federspiel. The receptor for the subgroup C avian sarcoma and leukosis viruses, Tvc, is related to mammalian butyrophilins, members of immunoglobulin family // J Virol.-2005.-№79.-P. 1408-1419.

84. Ellermann V. The Leukosis of Fowls and Leukemia Problems.-London, United Kingdom: Gyldendal.-1921.

85. Ellerman V., and O. Bang. Experimentelle Leukämie bei Hühnern. Zentralbl. Bakteriöl. Parasitenkd. Infektionskr // Hyg. Abt. Orig.-1908.-№46.-P. 596-609.

86. Enrietto P. J., and M. Hayman. / Structure and virus associated oncogenes of avian sarcoma and leukemia virus // Avian Leukosis.-MA: Martinus Nijhoff.-1987.-P. 29-46.

87. Ewert D. L. & DeBoer, G. F. / Avian lymphoid leukosis: Mechanism of lymphomagenesis.// Immunodeficiency Disorders. Boston: Academic Press Inc.-1988.-P. 37-53.

88. Fadly A. M. Isolation and identification of avian leukosis viruses: a review.// Avian Pathology.-2000.-№29.-P. 529-535.

89. Fadly A. M. / New Development in Detection and Eradication of Subgroup J Avian Leukosis Virus.// the XXI Worlds Poultry Congress; World Veterinary Poultry Association.-Montreal.-2000.
90. Fadly A.M., L.F. Lee, and L.D. Bacon. Immunocompetence of chickens during early and tumorigenic stages of Rous-associated virus-1 infection. *Infect Immun.*-1982.-№37.-P. 1156-1161.
91. Fadly A.M., R. F. Silva, and L. F. Lee./ Antigenic Characterization of Selected Field Isolates of Subgroup-J Avian Leukosis Virus.// The International Symposium on ALV-J and Other Avian Retroviruses.-Rauischholzhausen, Germany.-2000.
92. Fadly A. M., W. Okazaki, E. J. Smith, and L. B. Crittenden. Relative efficiency of test procedures to detect lymphoid leukosis virus infection.// *Poult Sci.*-1981.-№60.-P. 2037-2044.
93. Fadly A. M., W. Okazaki, and R. L. Witter. Hatchery-related contact transmission and short-term small-group-rearing as related to lymphoid-leukosis-virus-eradications programs.// *Avian Dis.*-1981.-№25.-P. 667-677.
94. Fadly A. M., and E. J. Smith. Isolation and some characteristics of a subgroup J-like avian leukosis virus associated with myeloid leukosis in meat-type chickens in the United States.// *Avian Dis.*-1999.-№43.-P. 391-400.
95. Fadly A. M., and R. L. Witter./ Oncornaviruses: leukosis/sarcoma and reticuloendotheliosis // A laboratory manual for isolation and identification of avian pathogens. American Association of Avian Pathologists.-Pa.-1998.-P. 185-196.
96. Fadly A. M., and R. L. Witter. Resistance of line 6(3) chickens to reticuloendotheliosis-virus-induced bursa-associated lymphomas. *Int J Cancer.*-1986.-№38.-P. 139-43.
97. Fang X., R. C. Willis, Q. Hoang, K. Kelnar, and X. Weiwei. High throughput sample preparation for gene expression profiling and *in vitro* target validation.// *Journal of the Association for Laboratory Automation.*-2004.-№9.-P. 104-145.

98. Fauquet C.M., M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball./ Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.-Elsevier: Academic Press.-2005.
99. Fearon E. / Oncogenes and tumor suppressor genes. // Clinical Oncology.- Philadelphia: Williams & Wilkins; M. Abeloff, J. Armitage, A. Lichter, and J. Niederhuber (eds.).-V.2.-2000.-P. 77-118
100. Friesen B., and H. Rubin. Some physicochemical and immunological properties of an avian leukosis virus (RIF).// Virology.-1961.-№15.-P. 387-396.
101. Frisby D., R. MacCormick, and R. Weiss. Origin of RAV-0/ The endogenous retrovirus of chickens.// Cold Spring Harbor Conf on Cell Proliferation.-1980.-№7. -C. 509-517.
102. Fung Y. K., A. M. Fadly, L. B. Crittenden, and H. J. Kung. Avian lymphoid leukosis virus infection and DNA integration in the preleukotic bursal tissues: a comparative study of susceptible and resistant lines.// Virology.-1982.-№119.-P. 411-421.
103. Fung Y. K., W. G. Lewis, L. B. Crittenden, and H. J. Kung. Activation of the cellular oncogene c-erbB by LTR insertion: molecular basis for induction of erythroblastosis by avian leukosis virus.// Cell.-1983.-№33.-P. 357-68.
104. Fujita D.J., Y.C. Chen, R.R. Friis, and P.K. Vogt. RNA tumor viruses of pheasants: Characterization of avian leukosis subgroups F and G.// Virology.-1974.-№60.-P. 558-571.
105. Furth J. Lymphomatosis, myelomatosis, and endothelioma of chickens caused by a filterable agent.// J Exp Med.-1933.-№58.-P. 253-275.
106. Garcia M., J. El-Attrache, S. M. Riblet, V. R. Lunge, A. S. K. Fonseca, P. Villegas, and N. Ikuta. Development and application of reverse transcriptase nested polymerase chain reaction test for the detection of exogenous avian leukosis virus. -2002, №47.-P. 41-53.
107. Garcia-Fernandez R.A., C. Perez-Martinez, J. Espinoza-Alvarez, A. Escudero-Diez, J.F. Garcia-Marin, A. Nunez, and M.J. Garcia-Iglesias. Lymphoid leukosis in ostrich (*Struthio camelus*).// Vet Res.-2000.-№146.-P. 676-677.

108. Gavora J. S. / Influences of avian leukosis virus infection on production and mortality and the role of genetic selection in the control of lymphoid leukosis.// Avian Leukosis. Boston: Martinus Hijhoff; G.F. de Boer (ed.).-1987.-C. 242-260
109. Gavora J. S., J. L. Spencer, R. S. Gowe, and D. L. Harris. Lymphoid leukosis virus infection: Effects on production and mortality and consequences in selection for high egg production.// Poult Sci.-1980.-№59.-P. 2165-2178.
110. Glika F., and J. Spencer. Immunohistochemical identification of group specific antigen in avian leukosis virus infected chickens.// Canadian Journal of Comparative Medicine.-1984.-№48 (3).-P. 322-326.
111. Goff S./ The retroviruses and their replication.// Fields' Virology. MA: Williams & Wilkins; D. Knipe and P. Howley (eds.).-2001.-V.1.
112. Gong M., H. L. Semus, K. J. Bird, B. J. Stramer, and A. Ruddell. Differential selection of cells with proviral c-myc and c-erbB integrations after avian leukosis virus infection.// J Virol.-1998.-№72.-P. 5517-5586
113. Graf T. A plaque assay for avian RNA tumor viruses.// Virology.-1972.-№50.-P. 567-578.
114. Graf T., and H. Beug. Avian leukemia viruses: interaction with their target cells *in vivo* and *in vitro*.// Biochim Biophys Acta.-1978.-№516.-P. 269-99.
115. Grandgenett D. P., and S. R. Mumm. Unraveling retrovirus integration.// Cell.-1990.-№60.-P. 3-4.
116. Grandori C., S. M. Cowley, L. P. James, and R. N. Eisenman. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior.// Annu Rev Cell Dev Biol.-2000.-№16.-P. 653-699.
117. Gudkov A. V., E. A. Komarova, M. A. Nikiforov, and T. E. Zaitsevskaya. ART-CH, a new chicken retroviruslike element.// J Virol.-1992.-№66.-P. 1726-1736.
118. Guesdon J. L., J. Courcon, and S. Avrameas. Magnetically responsive polyacrylamide agarose beads for the preparation of immunoabsorbents.// J Immunol Methods.-1978.-№21.-P. 59-63.

119. Hamilton C.M., and C.E. Sawyer. Transmission of erythroleukosis in young chickens.// *Poult Sci.*-1939.-№18.-P. 388-393.
120. Hanafusa T., and H. Hanafusa. Isolation of leukosis-type virus from pheasant embryo cells: Possible presence of viral genes in cells.// *Virology.*-1973.-№51.-P. 247-251.
121. Hanafusa T., H. Hanafusa, C.E. Metroka, W.S. Hayward, C.W. Rettemier, R.C. Sawyer, R.M. Dougherty, and H.S. DiStefano. Pheasant viruses: New class of re-bordeoxyvirus.// *Proc Natl Acad Sci USA.*-1976.-№73.-P. 1333-1337.
122. Hayward W. S. Size and genetic content of viral RNAs in avian oncovirusinfected cells.// *J Virol.*-1977.-№24.-P. 47-63.
123. Hayward W. S., S. B. Braverman, and S. M. Astrin. Transcriptional products and DNA structure of endogenous avian proviruses.// *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*-1980.-№44 (Pt 2).-P. 1111-1121.
124. Hayward W. S., B. G. Neel, and S. M. Astrin. Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis.// *Nature.*-1981.-№290.-P. 475-480.
125. Henriksson M., and B. Luscher. Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation.// *Adv Cancer Res.* 1996.-№68.-P. 109-182.
126. Herniou E., J. Martin, K. Miller, J. Cook, M. Wilkinson, and M. Tristem. Retroviral diversity and distribution in vertebrates.// *J Virol.* 1998.-№72.-P. 5955-66.
127. Holmes J.R. Avian osteopetrosis.// *Nat Cancer Inst Monogr.* 1964.-№17.-P. 63-79.
128. Hughes S. H., P. K. Vogt, E. Stubblefield, H. Robinson, J. M. Bishop, and H. E. Varmus. Organization of endogenous and exogenous viral and linked nonviral sequences.// *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1980.-№44 (Pt 2).-P. 1077-1089.

129. Hunt H. D., L. F. Lee, D. Foster, R. F. Silva, and A. M. Fadly. A genetically engineered cell line resistant to subgroup J avian leukosis virus infection (C/J).// *Virology*. 1999.-№264.-P. 205-10.
130. Hunter E., J. Casey, B. Hahn, M. Hayami, B. Korber, R. Kurth, J. Neil, A. Rethwilm, P. Sonigo, and J. Stoye. *Virus Taxonomy Online*. Academic Press, www.virustaxonomyonline.com.
131. Hunter T. The epidermal growth factor receptor gene and its product.// *Nature*. 1984.-№311.-P. 414-416.
132. Ianconescu M., and A. Aharonovici. Persistent viraemia in chickens, subsequent to in ovo inoculation of reticuloendotheliosis virus.// *Avian Pathol*. 1978.-№7.-P. 237-247.
133. Ignjatovic J., R.A. Fraser, and T.J. Bagust. Effect of lymphoid leukosis virus on performance of layer hens and the identification of infected chickens by tests on meconia.// *Avian Pathol*. 1986.-№15.-P. 63-74.
134. Ishizaki R., A.J. Langlois, and D.P. Bolognesi. Isolation of two subgroup-specific leukemogenic viruses from standart avian myeloblastosis virus.// *J Virol*. 1975.-№15.-P. 906-912.
135. Jordan F. T. W.// *Poultry Diseases*.-NewYork. 2001.-5th ed.
136. Katz R. A., and A. M. Skalka. A C-terminal domain in the avian sarcomaleukosis virus pol gene product is not essential for viral replication.// *J Virol*. 1988.-№62.-P. 528-33.
137. Kawalramani V.N., A.T. Panganiban, and M. Emerman. Spleen necrosis virus, an avian immunosuppressive retrovirus, shares a receptor with the Type D Simian retroviruses.// *J Virol*. 1992.-№66.-P. 3026-3031.
138. Kim Y., S. M. Gharaibeh, N. L. Stedman, and T. P. Brown. Comparison and verification of quantitative competitive reverse transcription polymerase chain reaction (QC-RT-PCR) and real time RT-PCR for avian leukosis virus subgroup J.// *J Virol Methods*. 2002.-№102 -P. 1-8.
139. Kung H., and J. Liu. / *Retroviral oncogenesis*.// *Viral Pathogenesis*.-Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; N. Nathanson (ed.). 1997.-P. 235-266.

140. Kung H. J., C. Boerkoel, and T. H. Carter. Retroviral mutagenesis of cellular oncogenes: a review with insights into the mechanisms of insertional activation.// *Curr Top Microbiol Immunol*. 1991.-№171.-P. 1-25.
141. Kumanishi T., F. Ikuta, K. Nishida, K. Ueki, and T. Yamamoto. Brain tumors induced in adult monkeys by Schmidt-Ruppin strain of sarcoma virus.// *Gann*. 1973.-№64.-P. 641-643.
142. Labat M.L. Retroviruses, immunosuppression and osteopetrosis.// *Biomed Pharm*. 1986.-№40.-P. 85-90.
143. Lagerlof B., and P. Sundelin. The histogenesis and haematology of virus-induced myeloid leukemia in the fowl.// *Acta Haematol*. 1963.-№30.-P. 111-122.
144. Laimins L. A., P. Tsichlis, and G. Khoury. Multiple enhancer domains in the 3' terminus of the Prague strain of Rous sarcoma virus.// *Nucleic Acids Res*. 1984.-№12.-P. 6427-6442.
145. Landis J. R., and G. G. Koch. The measurement of observer agreement for categorical data.// *Biometrics*. 1977.-№33.-P. 159-74.
146. Leamnson R.N., M.S. Halpern. Subunit structure of the glycoprotein complex of avian tumor virus.// *J Virology*. 1976.-№18.-P. 956-968.
147. Leis J., D. Baltimore, J. M. Bishop, J. Coffin, E. Fleissner, S. P. Goff, S. Oroszlan, H. Robinson, A. M. Skalka, H. M. Temin, and *et al*. Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses.// *J Virol*. 1988.-№62.-P. 1808-1809.
148. Lerner T. L., and H. Hanafusa. DNA sequence of the Bryan high-titer strain of Rous sarcoma virus: extent of env deletion and possible genealogical relationship with other viral strains.// *J Virol*. 1984.-№49.-P. 549-56.
149. Levinson B., G. Khoury, G. V. Woude, and P. Gruss. Activation of SV40 genome by 72-base pair tandem repeats of Moloney sarcoma virus.// *Nature*. 1982.-№295.-P. 568-72.
150. Lewis P. F., and M. Emerman. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus.// *J Virol*. 1994.-№68.-P. 510-516.

151. Lijun Rong, Kristin Gendron, Barbara Strohl, Rajeev Shenoy, Rouven J. Wool-Lewis, and Paul Bates. Characterization of Determinants for Envelope Binding and Infection in Tva, the Subgroup A Avian Sarcoma and Leukosis Virus Receptor.// J Virol. 1998.-№72.-P. 4552-4559.
152. Linial M., and M. Groudine. Transcription of three c-myc exons is enhanced in chicken bursal lymphoma cell lines.// Proc Natl Acad Sci.-USA, 1985.-№82.-P. 53-57.
153. Linial M., N. Gunderson, and M. Groudine. Enhanced transcription of cmyc in bursal lymphoma cells requires continuous protein synthesis.// Science. 1985.-№230.-P. 1126-32.
154. Luforo C.G., H.G. Purchase, and H.W. Cox. Duck infections anemia virus associated with plasmodium louvers.// Exp Parasitol. 1972.-№31.-P. 29-38.
155. Lupiani B., A. Pandiri, J. Mays, K. Conklin, R. F. Silva, W. Reed, and A. M. Fadly. /Pathogenicity of a molecular clone of a feild strain of subgroup J avian leukosis virus [abstract]. American Veterinary Medical Association. 2003.-P. 100.
156. Lupiani B., S. M. Williams, R. F. Silva, H. D. Hunt, and A. M. Fadly. Pathogenicity of two recombinant avian leukosis viruses.// Avian Dis. 2003.-№47.-P. 425-432.
157. Maas H.G.L., G.F. d. Boer, and G.E. Groenendal. Age related resistance to avian leukosis virus. III Infectious virus, neutralizing antibody, and tumors in chickens inoculated at various ages.// Avian Pathol. 1982.-№11.-P. 309-327.
158. Miles B. D., and H. L. Robinson. High-frequency transduction of c-erbB in avian leukosis virus-induced erythroblastosis.// J Virol. 1985.-№54.-P. 295-303.
159. Moloney J.B. Biological studies on the Rous sarcoma virus. V Preparation of improved standart lots of the virus for use in quantitative investigations.// J Nat Cancer Inst. 1956.-№16.-P. 877-888.
160. Morgan H.R. Avian leukosis-sarcoma virus antibodies in wild fowl, domestic chickens, and man in Kenya.// Proc Soc Exp Biol Med. 1973.-№144.-P. 1-4.

161. Morgan J. H., and J. T. Parsons. Characterization of c-myc proteins from avian bursal lymphoma cell lines.// Virology. 1986.-№150.-P. 178-86.
162. Moscovici C., and L. Gazzolo. / Virus-cell interactions of avian sarcoma and defective leukemia viruses.// Avian Leukosis. G.F. de Boer (ed.). 1987.-P. 151-169.
163. Nehyba J., J. Svoboda, I. Karakoz, J. Geryk, and J. Hejnar. Ducks: a new experimental host system for studying persistent infection with avian leukemia retroviruses.// J Gen Virol. 1990.-№71.-P. 1937-1945.
164. Neiman P. E., C. Blish, C. Heydt, G. Loring, and S. J. Thomas. Loss of cell cycle controls in apoptotic lymphoblasts of the bursa of Fabricius.// Mol Biol Cell. 1994.-№5.-P. 763-72.
165. Neiman P. E., A. Ruddell, C. Jasoni, G. Loring, S. J. Thomas, K. A. Brandvold, R. Lee, J. Burnside, and J. Delrow. Analysis of gene 89 expression during myc oncogene-induced lymphomagenesis in the bursa of Fabricius.// Proc Natl Acad Sci USA. 2001.-№98.-P. 6378-83.
166. Neiman P. E., J. Summers, S. J. Thomas, S. Xuereb, and G. Loring. Genetic instability and apoptotic cell death during neoplastic progression of v-mycinitiated B-cell lymphomas in the bursa of Fabricius.// Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1994.-№59.-P. 509-515.
167. Nesbit C. E., J. M. Tersak, and E. V. Prochownik. MYC oncogenes and human neoplastic disease.// Oncogene. 1999.-№18.-P. 3004-3016.
168. Ngo C. V., M. Gee, N. Akhtar, D. Yu, O. Volpert, R. Auerbach, and A. Thomas-Tikhonenko. An *in vivo* function for the transforming Myc protein: elicitation of the angiogenic phenotype.// Cell Growth Differ. 2000.-№11.-P. 201-210.
169. Nichol S. RNA viruses. Life on the edge of catastrophe.// Nature. 1996.-№384.-P. 218-219.
170. Nikiforov M. A., and A. V. Gudkov. ART-CH: a VL30 in chickens.// J Virol. 1994.-№68.-P. 846-53.

171. Nilsen T. W., P. A. Maroney, R. G. Goodwin, F. M. Rottman, L. B. Crittenden, M. A. Raines, and H. J. Kung. c-erbB activation in ALV-induced erythroblastosis: novel RNA processing and promoter insertion result in expression of an amino-truncated EGF receptor.// *Cell*. 1985.-№41.-P. 719-26.
172. Okazaki W., Burmester, B.R., Fadly, A., Chase, W.B. An evaluation of methods for eradication of avian leukosis virus from a commercial breeder flock.// *Avian Dis*. 1979.-№23.-P. 688.
173. Okazaki W., H. G. Purchase, and B. R. Burmester. Phenotypic mixing test to detect and assay avian leukosis viruses.// *Avian Dis*. 1975.-№19.-P. 311-317.
174. Orlando C., P. Pinzani, and M. Pazzagli. Developments in quantitative PCR.// *Clin Chem Lab Med*. 1998.-№36.-P. 255-69.
175. Osborn R., M. Rigby, K. Siebilink, J.C. Neil and O. Jarret. Virus neutralization reveals antigenic variation among feline immunodeficiency virus isolates.// *J General Virol*. 1994.-№75.-P. 3641-3645.
176. Owen R. L. Update on eradication and diagnosis of A.L.V.-J.// *Zootechnica International*. 2000.-№2.-P. 50-57.
177. Pain B., C. M. Woods, J. Saez, T. Flickinger, M. Raines, S. Peyrol, C. Moscovici, M. G. Moscovici, H. J. Kung, P. Jurdic, and *et al*. EGF-R as a hemopoietic growth factor receptor: the c-erbB product is present in chicken erythrocytic progenitors and controls their self-renewal.// *Cell*. 1991.-№65.-P. 37-46.
178. Palya V., J. Benyeda, and T. Suveges. Observations on subgroup J avian leukosis virus infection: Occurrence and economic impact of the disease in meattype breeder flocks.// *Hungarian Veterinary Journal*. 2000.-№8.-P. 460-469.
179. Parghi S. S., K. A. Brandvold, S. J. Bowers, P. E. Neiman, and A. Ruddell. Reduced Myc overexpression and normal B-cell differentiation mediate resistance to avian leukosis virus lymphomagenesis.// *Oncogene*. 2004.-№23.-P. 4413-4421.
180. Partanen A. M. Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha in the development of epithelial-mesenchymal organs of the mouse.// *Curr Top Dev Biol*. 1990.-№24.-P. 31-55.

181. Paul I., O. Cotogan, and M. Boisteanu. The incidence of Marek's disease in anti-MD infected hens. // *Lucr. Stiint. Ser Zooteh Med Vet.* 1986.-№30.-P. 95-96.
182. Payne L. N. HPRS-103: a retrovirus strikes back. The emergence of subgroup J avian leukosis virus.// *Avian Pathology.* 1998.-№27.-P. 536-545.
183. Payne L. N. Retrovirus-induced disease in poultry.// *Poult Sci.* 1998.-№77.-P. 1204-1212.
184. Payne L., S. Brown, N. Bumstead, K. Howes, J. Frazier, and M. Thouless. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens.// *J Gen Virol.* 1991.№72.-P. 801-807.
185. Payne L. S., and N. Bumstead. Theoretical considerations on the relative importance of vertical and horizontal transmission for the maintenance of infection by exogenous avian lymphoid leukosis virus.// *Avian Pathol.* 1982.-№11.-P. 547-553.
186. Payne L. N., and A. M. Fadly. Leukosis/Sarcoma Group. Iowa State University Press, Ames, IA. 1997.-V.IA
187. Payne L. N., A. M. Gillespie, and K. Howes. Myeloid leukaemogenicity and transmission of the HPRS-103 strain of avian leukosis virus.// *Leukemia.* 1992.-№6.-P. 1167-76.
188. Payne L. N., A. M. Gillespie, and K. Howes. Recovery of acutely transforming viruses from myeloid leukosis induced by the HPRS-103 strain of avian leukosis virus.// *Avian Dis.* 1993.-№37.-P. 438-450.
189. Payne L. N., A.E. Holmes, K. Howes, M. Pattison, D.L. Polock, and D.E. Waters. Further studies on the eradication and epizootology of lymphoid leukosis virus infection in commercial strains of chickens.// *Avian Pathol.* 1982.-№11.-P. 145-162.
190. Payne L. N., and K. Howes. Eradication of exogenous avian leukosis virus from commercial layer breeder lines.// *Vet Rec.* 1991.-№128.-P. 8-11.
191. Payne F. E., J.J. Solomon, and H.G. Purchase. Immunofluorescent studies of the avian sarcoma-leukosis viruses. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1966.-№55.-P. 341-349.

192. Payne L. N., K. Howes, A. M. Gillespie, and L. M. Smith. Host range of Rous sarcoma virus pseudotype RSV (HPRS-103) in 12 avian species: support for a new avian retrovirus envelope subgroup, designated J.// J Gen Virol. 1992.-№73 (Pt 11).-P. 2995-7.
193. Pelengaris S., T. Littlewood, M. Khan, G. Elia, and G. Evan. Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion.// Mol Cell. 1999.-№3.-P. 565-577.
194. Pelley R. J., N. J. Maihle, C. Boerkoel, H. K. Shu, T. H. Carter, C. Moscovici, and H. J. Kung. Disease tropism of c-erbB: effects of carboxyl-terminal tyrosine and internal mutations on tissue-specific transformation.// Proc Natl Acad Sci USA. 1989.-№86.-P. 7164-7168.
195. Pelley R. J., C. Moscovici, S. Hughes, and H. J. Kung. Proviral-activated c-erbB is leukemogenic but not sarcomagenic: characterization of a replicationcompetent retrovirus containing the activated c-erbB.// J Virol. 1988.-№62.-P. 1840-1844.
196. Perek M. An epizootic of histiocytic sarcomas in chickens induced by a cell-free agent.// Avian Dis. 1960.-№4.-P. 85- 94.
197. Persing D.H. / In Vitro Nucleic Acid Amplification Techniques.// Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications, D.H. Persing et al., Eds. Washington: American Society for Microbiology. 1993.-P. 51-87
198. Piraino F., W. Okazaki, B.R. Burmester, and T.N. Fredrickson. Bioassay of fowl leukosis virus in chickens by the inoculation of 11-day old embryos.// Virology. 1963.-№21.-P. 396-401.
199. Poeschla E., G. Buchschacher, Jr., and F. Wong-Staal. /Etiology of Cancer: RNA viruses.// Cancer: Principles and Practice of Oncology..-Philidelphia: Williams & Wilkins; V. DeVita, Jr, S. Hellman, and S. Rosenberg (eds.). 2000.-V. 6th ed.-C. 149-158.
200. Ponten J., and B. Thorell. The histogenesis of virus-induced chicken leukemia.// J Nat Cancer Inst. 1957.-№18.-P. 443-454.

201. Purchase H. / The pathogenesis and pathology of neoplasms caused by avian leukosis viruses.// *Avian Leukosis*.-MA: Martinus Nijhoff Publishing; G. De Boer (ed.). 1987.-P. 171-196
202. Purchase H.G., and A.M. Fadly. / Leukosis and sarcomas.// *Isolation and Identification of Avian Pathogens*.-PA: Kennet Square; S.B. Hitchner, C.H. Domermuth, H.G. Purchase, and J.E. Williams (eds.). 1980.-P. 54-58
203. Purchase H.G., and D.G. Gilmour, C. H. Romero, and W. Okazaki. Post infection genetic resistance to avian lymphoid leukosis redes in a B target cell.// *Nature*. 1977.-№270.-P. 61-62.
204. Purchase H.G., W. Okazaki and B.R. Burmester. Long-term field trials with the herpesvirus of turkeys vaccine against Marek's disease.// *Avian Dis*. 1972.-№16.-P. 57-71.
205. Raines M. A., W. G. Lewis, L. B. Crittenden, and H. J. Kung. c-erbB activation in avian leukosis virus-induced erythroblastosis: clustered integration sites and the arrangement of provirus in the c-erbB alleles.// *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985.-№82.-P. 2287-2291.
206. Rasheed S. / Retroviruses and oncogenes.// *The Retroviridae*.-J. Levy (ed.).-New York: Plenum Press. 1995.-V.4.-P. 293-408
207. Regenmortel M. H. V. v., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner (ed.). *Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. -CA, San Diego. 2000.
208. Rispens B. H., P. A. Long, W. Okazaki, and B. R. Burmester. The NP activation test for assay of avian leukosis-sarcoma viruses.// *Avian Dis*. 1970.-№14.-P. 738 51.
209. Robinson H. L., and G. C. Gagnon. Patterns of proviral insertion and deletion in avian leukosis virus-induced lymphomas.// *J Virol*. 1986.-№57.-P. 28-36.

210. Robinson W. S., and P. H. Duesberg. / The chemistry of RNA tumor viruses.// Molecular Basis of virology. -H. Fraenkel-Conrat (ed.).- New York: Reinhold book.. 1968.-P. 306-331
211. Roloff P. The avian leukosis complex-a review. / Mag Ges Thierlkd; cited by Chubb, L. G. and R. F. Gordon.-№34:190. 1868. // Vet Rew Annot. 1957.-№32.-P. 97-120.
212. Rong L., A. Edinger and B. Bates. Role of basic residues in the subgroup-determining region of the subgroup A avian sarcoma and leukosis virus envelope in receptor binding and infection. // J Virology. 1997.-№71.-P. 3458-3465.
213. Rous P. A transmissible avian neoplasm.// J. Exp. Med. 1910.-№12.-P. 696-705.
214. Rubin H. A virus in chick embryos which induces resistance *in vitro* to infection with Rous sarcoma virus. // Proceedings of the National Academy of Science. 1960.-№46.-P. 1105-1119.
215. Rubin H., A. Cornelius, and L. Fanshier. The pattern of congenital transmission of an avian leukosis virus. // Proc Natl Acad Sci USA. 1961.-№47.-P. 1058-1060.
216. Rubin H., L. Fanshier, A. Cornelius, and W. F. Hughes. Tolerance and immunity in chickens after congenital and contact infection with an avian leukosis virus. // Virology. 1962.-№17.-P. 143-156.
217. Ryden T. A., M. de Mars, and K. Beemon. Mutation of the C/EBP binding sites in the Rous sarcoma virus long terminal repeat and gag enhancers. // J Virol. 1993.-№67.-P. 2862-2870.
218. Sacco M. A., D. M. Flannery, K. Howes, and K. Venugopal. Avian endogenous retrovirus EAV-HP shares regions of identity with avian leukosis virus subgroup J and the avian retrotransposon ART-CH. // J Virol. 2000.-№74.-P. 1296-1306.
219. Sandelin K., and T. Estola. Occurrence of different subgroups of avian leukosis virus in Finnish poultry. // Avian Pathol. 1974.-№3.-P. 159-168.

220. Sarma P. S., H. C. Turner, and R. J. Huebner. An avian leucosis groupspecific complement fixation reaction. Application for the detection and assay of non-cytopathogenic leucosis viruses. // *Virology*. 1964.-№23.-P. 313-321.
221. Schlesinger S., B. Weiss, and D. Dohner. Defective particles in alphavirus infections. // *Med Biol*. 1975.-№53.-P. 372-379.
222. Schwartz D. E., R. Tizard, and W. Gilbert. Nucleotide sequence of Rous sarcoma virus. // *Cell*. 1983.-№32. -P. 853-869.
223. Segura J. C., J. S. Gavora, J.L. Spencer, R.W. Fairfull, R.J. Gowe, and R.B. Buckland. Semen traits and fertility of White Leghorn males shown to be positive or negative for lymphoid leukosis virus in semen and feater pulp. // *Br Poult Sci*. 1988.-№29. -P. 545-553.
224. Sevoian M., R.N. Larose, and D.M. Chamberlain. Avian lymphomatosis. VI. A virus of unusual potency and pathogenicity.// *Avian Dis*. 1964.-№3. -P. 336-347.
225. Shuman R.M., and R.N. Snoffner. Molecular approaches to poultry breeding: gene transfer by avian retroviruses. // *Poult Sci*. 1986. -№65. -P. 1437-1444.
226. Shih C. K., M. Linial, M. M. Goodenow, and W. S. Hayward. Nucleotide sequence 5' of the chicken c-myc coding region: localization of a noncoding exon that is absent from myc transcripts in most avian leukosis virus-induced lymphomas. // *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984. -№81. -P. 4697-4701.
227. Sigel M.M., P. Meyers, and H.T. Holden. Resistence to Rous sarcoma elicited by immunization with live virus. // *Proc Soc Exp Biol Med*. 1971. -№137. -P. 142-146.
228. Silva R. F., A. M. Fadly, and H. D. Hunt. Hypervariability in the envelope genes of subgroup J avian leukosis viruses obtained from different farms in the United States. // *Virology*. 2000.-№272. -P. 106-111.
229. Simpson S. B., L. Zhang, R. C. Craven, and C. M. Stoltzfus. Rous sarcoma virus direct repeat cis elements exert effects at several points in the virus life cycle. // *J Virol*. 1997. -№71. -P. 9150-9156.

230. Skalka A./ Advances in virus research. // Seminars in Virology: Retroviral DNA Integration. New York: Academic Press; K. Maramorosch, F. Murphy, and Shatk (eds.). 1999. -V. 52.
231. Skalka A., P. DeBona, F. Hishinuma, and W. McClements. Avian endogenous proviral DNA: analysis of integrated ev 1 and a related gs- chfprovirus purified by molecular cloning. // Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1980. -№44 (Pt 2). -P. 1097-1104.
232. Smith E. J., A. M. Fadly, and W. Okazaki. An enzyme-linked immunosorbent assay for detecting avian leukosis-sarcoma viruses. // Avian Dis. 1979.-№23. -P. 698-707.
233. Smith E. J., S. M. Williams, and A. M. Fadly. Detection of avian leukosis virus subgroup J using polymerase chain reaction. // Avian Dis. 1998. -№42. -P. 375-380.
234. Smith L. M., S. R. Brown, K. Howes, S. McLeod, S. S. Arshad, G. S. Barron, K. Venugopal, J. C. McKay, and L. N. Payne. Development and application of polymerase chain reaction (PCR) tests for the detection of subgroup J avian leukosis virus. // Virus Res. 1998.-№54. -P. 87-98.
235. Smith L. M., A. A. Teye, K. Howes, N. Bumstead, L. N. Payne, and K. Venugopal. Novel endogenous retroviral sequences in the chicken genome closely related to HPRS-103 (subgroup J) avian leukosis virus. // J Gen Virol. 1999. -№80 (Pt 1). -P. 261-268.
236. Smith R. E. / Immunology of avian leukosis virus infections. // Avian Leukosis. Boston: Martinus Nijhoff; G.F. de Boer (ed.). 1987. -P. 121-129
237. Smith R. E., and E.V. Schmidt Induction of anemia by avian leukosis viruses of five subgroups. // Virology. 1982. -№117. -P. 516-518.
238. Spencer J. Progress towards eradication of lymphoid leukosis viruses – a review. // Avian Pathology. 1984. -№13. -P. 599-619.
239. Spencer J and J.S. Gavora, and R.S.Gowe. Lymphoid leukosis virus: Natural transmission and nonneoplastic effects.// Cold Spring Harbor Conf on Cell Proliferation. 1980. -№7. -P. 553-564.

240. Spencer J., L. B. Crittenden, B. R. Burmester, C. Romero, and R. Witter. Lymphoid leukosis viruses and gs antigen in unincubated chicken eggs. // *Avian Pathology*. 1976. -№54. -P. 87-98.
241. Spencer J., L. B. Crittenden, B. R. Burmester, W. Okazaki, and R.L. Witter. Lymphoid leukosis: Interrelations among virus infections in hens, eggs, embryos, and chicks. // *Avian Dis*. 1977. -№21. -P. 331-345.
242. Stedman N. L., and T. P. Brown. Body weight suppression in broilers naturally infected with avian leukosis virus subgroup J. // *Avian Dis*. 1999. -№43. -P. 604-610.
243. Stephenson J.R., R.E. Wilsnack, and S.A. Aaronson. Radioimmunoassay for avian C-type virus group-specific antigen: Detection in normal and virus transformed cells.// *J Virol*. 1973. -№11. -P. 893-899.
244. Sung H., J. Kim, S. Reddy, and A. M. Fadly. Isolation of subgroup J avian leukosis virus in Korea. // *J Vet Sci*. 2002. -№3. -P. 71-74.
245. Swanberg S. E., W. S. Payne, H. D. Hunt, J. B. Dodgson, and M. E. Delany. Telomerase activity and differential expression of telomerase genes and cmyc in chicken cells *in vitro*. // *Dev Dyn*. 2004. -№231. -P. 14-21.
246. Tam W., D. Ben-Yehuda, and W. S. Hayward. *bic*, a novel gene activated by proviral insertions in avian leukosis virus-induced lymphomas, is likely to function through its noncoding RNA. // *Mol Cell Biol*. 1997. -№17. -P. 1490-1502.
247. Temin H. M. The Bertner Foundation Memorial Award Lecture-from proviruses to proviruses: RNA-directed DNA synthesis by RNA tumor viruses and cells. // *Molecular Studies in Viral Neoplasia*. -Baltimore: Williams & Wilkins. 1974. -P. 7-38
248. Temin H. M., and H. Rubin. Characteristics of an assay for Rous sarcoma virus and Rous sarcoma cells in tissue culture. // *Virology*. 1958. -№6. -P. 669-688.
249. Thu W.L., Wang, C.H. Phylogenetic analysis of subgroup J avian leukosis virus from broiler and native chickens in Taiwan during 2000-2002. // *J. Vet. Med. Sci*. 2003. -№65. -P. 325-328.

250. Trager W. A new virus of ducks interfering with development of malaria parasite (*Plasmodium Lophu-rae*). // *Proc Soc Exp Biol Med*. 1959. -№101. -P. 578-582.
251. Troesh C.D., P.K. Vogt. An endogenous virus from *Lophortyx quail* is the prototype for envelope subgroup I of avian retroviruses. // *Virology*. 1985. -№143. -P. 595-602.
252. Tsichlis P. N., L. Donehower, G. Hager, N. Zeller, R. Malavarca, S. Astrin, and A. M. Skalka. Sequence comparison in the crossover region of an oncogenic avian retrovirus recombinant and its nononcogenic parent: genetic regions that control growth rate and oncogenic potential. // *Mol Cell Biol*. 1982. -№2. -P. 1331-1338.
253. Tsukamoto K., M. Hasebe, S. Kakita, Y. Tanigichi, H. Hihara, and Y. Kono. Spradic congenital transmission of avian leukosis virus in hens discharging the virus into the oviducts. // *J Vet Med Sci*. 1992. -№54. -P. 99-103.
254. van Woensel P. A., A. van Blaaderen, R. J. Moorman, and G. F. de Boer. Detection of proviral DNA and viral RNA in various tissues early after avian leukosis virus infection. // *Leukemia*. 1992. -№6 (Suppl 3). -P. 135-137.
255. Vennstrom B., and J. M. Bishop. Isolation and characterization of chicken DNA homologous to the two putative oncogenes of avian erythroblastosis virus. // *Cell*. 1982. -№28. -P. 135-143.
256. Venugopal K. Avian leukosis virus subgroup J: a rapidly evolving group of oncogenic retroviruses. // *Res Vet Sci*. 1999. -№67. -P. 113-119.
257. Venugopal K., K. Howes, D. M. J. Flannery, and L. N. Payne. Isolation of acutely transforming subgroup J avian leukosis viruses that induce erythroblastosis and myelocytomatosis. // *Avian Pathology*. 2000. -№29. -P. 327-332.
258. Venugopal K., L. M. Smith, K. Howes, and L. N. Payne. Antigenic variants of J subgroup avian leukosis virus: sequence analysis reveals multiple changes in the env gene. // *J Gen Virol*. 1998. -№79 (Pt 4). -P. 757-766.
259. Vogt P.K. Avian tumor viruses. // *Adv Virus Res*. 1965. -№11. -P. 293-385.

260. Vogt P.K., and R. Ishizaki. / Criteria for the classification of tumor avian viruses. // *Viruses inducing Cancer*. -Salt Lake City: Univ Utah Press; W.J. Burdett (ed.). 1966. -P. 71-90
261. Wainberg M.A., and M.S. Halpern. / Avian sarcomas: Immune responsiveness and pathology. // *Avian Leukosis*. -Boston: MartinusNijhoff; G.F. de Boer (ed.). 1987. -P. 131-152
262. Walker R. Virus associated with epidermal hyperplasia in fish. // *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 1969. -№31. -P. 195-207.
263. Wang C.H., Juan, Y.W. Occurrence of subgroup J avian leukosis virus in Taiwan. // *Avian Pathol.* 2002. -№31. -P. 435-439.
264. Weeks B.B., Alcamo I.E. *AIDS: The biological basis.*— USA - Canada - UK: Jones and Bartlett Publishers, 2010. -P. 360
265. Weill J. C., and C. A. Reynaud. The chicken B cell compartment. // *Science*. 1987. -№238. -P. 1094-1098.
266. Weiss R., N. Teich, H. Varmus, and J. Coffin. *Molecular Biology of Tumor Virus*. // Cold Spring Harbor Laboratory. -Cold Spring Harbor, NY. 1982.
267. Weiss R., N. Teich, H. Varmus, and J. Coffin (eds). *RNA Tumor Viruses*, 2nd Ed. Supplements and Appendices.// Cold Spring Harbor Laboratory. -Cold Spring Harbor, NY. 1985.
268. Whalen L.R., D.W. Wheeler, D.H. Gould, S.A. Fiscus, L.C. Boggie, and R.E. Smith. Functional and structural alterations on the nervous system induced by avian retrovirus RAV-7. // *Microbial Pathog.* 1988. -№4. -P. 401-416.
269. Witter R. L., L. D. Bacon, H. D. Hunt, R. E. Silva, and A. M. Fadly. Avian leukosis virus subgroup J infection profiles in broiler breeder chickens: association with virus transmission to progeny. // *Avian Dis.* 2000. -№44. -P. 913-931.
270. Witter R. L., and A. M. Fadly. Reduction of horizontal transmission of avian leukosis virus subgroup J in broiler breeder chickens hatched and reared in small groups. // *Avian Pathology.* 2001. -№30. -P. 641-654.

271. Witter R.L., B.W. Calnek, and P.P. Levine. Influence of naturally occurring parental antibody on visceral lymphomatosis virus infection in chickens. // *Avian Dis.* 1966. -№10. -P. 43-56.
272. Wolinsky S.M., B.T. Korber, A.U. Neumann, M. Daniels, K.J. Kunstman, A.J. Whetsell, M.R. Furtado, Y. Cao, D.D. Ho and J.T. Safrit. Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type I during the natural course of infection.// *Science.* 1996. №272. -P. 537-542.
273. Wunderwald C.A., Albicker, P., Grest, P., Hoop, R.K. Avian leukosis subgroup J in broiler breeders in Switzerland. // *Schweiz Arch. Tierheilkd.* 2001. - №143. -P. 411-418.
274. Yeager M., E. M. Wilson-Kubalek, S. G. Weiner, P. O. Brown, and A. Rein. Supramolecular organization of immature and mature murine leukemia virus revealed by electron cryo-microscopy: implications for retroviral assembly mechanisms. // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998. -№95. -P. 7299-7304.
275. Young J.A., P. Bates, and H.E. Varmus. Isolation of the chicken gene that confers susceptibility to infection by subgroup A avian leukosis and sarcoma viruses. // *J Virol.* 1993. -№67. -P. 1811-1816.
276. Zavala G. / An overview of myeloid leukosis in meat-type chickens. // *The Informed Poultry Professional.* -Department of Avian Medicine, University of Georgia, Athens, GA. 1998. -V.9. -P. 1-6.
277. Ziegel R.F. Morphological evidence of the association of virus particles with the pancreatic acinar cells of the chick. // *J Nat Cancer Inst.* 1961. -№26. -P. 1011-1039.
278. Zingler K., C. Belanger, R. Peters, E. Agard, and J. A. Young. Identification and characterization of the viral interaction determinant of the subgroup A avian leukosis virus receptor. // *J Virol.* 1995. -№69. -P. 4261-6.
279. Zhuan Chang Wu. Comparison of whole genome sequences and replication ability in cell cultures between two avian leukosis viruses of subgroup B.// *Chinese Journal of Virology.* 2011. -№27. -P. 447-45.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

ОКП 93 8840

Группа Р-31

СОГЛАСОВАНО
Заместитель Руководителя
Федеральной службы
по ветеринарному и
фитосанитарному надзору



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ЗАО «НПО НАРВАК»



ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ВИРУСОВ
ЛЕЙКОЗА ПТИЦ ТИПОВ А-D И J МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ (ПЦР)

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ

ТУ 9388-003-42418073-04

Вводятся впервые с 27.07.05.
Без ограничения срока действия

СОГЛАСОВАНО
Директор ФГУ Всероссийский
государственный Центр
качества и стандартизации
лекарственных средств
для животных и кормов
(ФГУ ВГНКИ)



Приложение 2

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Руководителя
Россельхознадзора
Н.А. Власов
«*11*» *мая* 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Тест-системы
для обнаружения и дифференциации вирусов лейкоза птиц типов А-D и J
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

I ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Тест-система для обнаружения и дифференциации вирусов лейкоза птиц типов А-D и J методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

1.2 Тест-система состоит из трех наборов и рассчитана на проведение 100 анализов из 50 образцов:

№	Наименование	Количество	Упаковка
<i>Набор I - для выделения РНК и ДНК</i>			
1	Раствор №1	18,0 см ³	2 флакона
2	Раствор №2	12,0 см ³	1 флакон
3	Раствор №3	12,0 см ³	1 флакон
4	Сорбент	2,0 см ³	1 пробирка
5	Деионизованная вода	2,0 см ³	1 пробирка
<i>Набор II - для выявления РНК и ДНК вируса лейкоза птиц и дифференциации типов А-D и J методом ПЦР</i>			
1	Фермент Taq ДНК-полимераза (5ед./мкл)	0,030 см ³	1 пробирка
2	Фермент MMLV ревертаза (200 ед./мкл)	0,008 см ³	2 пробирки
3	Положительный контроль А-D	0,030 см ³	1 пробирка
4	Положительный контроль J	0,030 см ³	1 пробирка
5	Праймеры для ПЦР-1	0,27 см ³	1 пробирка
6	Праймеры для ПЦР-2	0,27 см ³	1 пробирка
7	Буфер для ПЦР-1	0,9 см ³	1 пробирка
8	Буфер для ПЦР-2	0,9 см ³	1 пробирка
9	Минеральное масло	5,0 см ³	1 флакон
<i>Набор III - для проведения электрофореза(на 10 гелей по 10 образцов)</i>			
1	Агароза	5 г	2 пакета
2	50-ти кратный ТАЕ буфер для электрофореза	20,0 см ³	2 флакона
3	Раствор бромистого этидия (10 мг/мл)	0,15 см ³	2 пробирки
4	Буфер для нанесения образца	0,3 см ³	2 пробирки

Тест-система предназначена для обнаружения и дифференциации вируса лейкоза птиц типов А-D и J методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в образцах сывороток крови, органах павших птиц, а также в инфицированных культурах клеток.

При точном соблюдении инструкции по применению анализ занимает от 8 до 16 часов (в зависимости от условий выделения).

1.3 Упаковка и маркировка

Компоненты тест-системы расфасовывают в полипропиленовые флаконы с завинчивающимися крышками вместимостью 20 мл, пробирки вместимостью 0,5-2,0 мл и 5 мл. На пробирки и флаконы наклеивают этикетку с указанием краткого названия компонента.

Флаконы и пробирки каждого набора отдельно упаковывают в полиэтиленовые пакеты с указанием: организации-производителя и разработчика и/или товарного знака, наименования каждого набора, номера серии и контроля, даты изготовления и срока годности, условий хранения.

Наборы I и III упаковывают в картонные коробки. На каждую коробку наклеивают этикетку или наносят несмываемой краской следующие обозначения: страна, город, название организации-производителя и разработчика и/или товарный знак, полное название тест-системы, номер серии и контроля, дату изготовления (месяц, год), срок годности (месяц, год), предупредительную надпись «Для животных», номер государственной регистрации, знак соответствия в системе ГОСТ Р, условия хранения, количество анализов и обозначение нормативного документа. В коробку вкладывают инструкцию по применению тест-системы.

1.4 Условия хранения

Хранение наборов I и III осуществляется при температуре от 2⁰С до 6⁰С, набора II – при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С.

Транспортирование тест-системы проводят в теплоизолирующей упаковке (термос, пенопластовая коробка) при температуре от 2⁰С до 6⁰С. Компоненты Набора II транспортируют во льду.

Срок годности тест-системы: 12 месяцев от даты изготовления. Запрещено использовать тест-систему по окончании срока годности.

Флаконы и пробирки без этикеток, с нарушением целостности, изменением консистенции или цвета компонентов, при наличии плесени или других примесей и не использованные в течение срока годности подлежат выбраковке. Обеззараживание биоматериала и реагентов проводят, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, флаконы, наконечники) на 20- 24 ч в специальный контейнер, содержащий 0,2% раствор ДП-2Т.

II ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

2 В основе ПЦР лежит многократное повторение циклов денатурации исследуемой ДНК при температуре 94⁰С, гибридизации ДНК со специфическими праймерами при температуре 51-53⁰С и синтеза с них комплементарных цепей ДНК с помощью термостабильной ДНК-полимеразы при температуре 72⁰С. В результате амплификации концентрация синтезированного фрагмента в исследуемой пробе увеличивается в миллионы раз, что позволяет визуально учитывать результаты анализа с помощью электрофореза в агарозном геле.

Поскольку геном вируса лейкоза птиц представлен молекулой РНК, а также ДНК копией, встроенной в геном птицы, полный анализ по его выявлению включает выделение суммарной РНК и ДНК, получение кДНК и амплификацию специфического фрагмента ДНК в совмещенной реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции, электрофорез в агарозном геле.

III ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

3.1 Подготовка к работе

3.1.1 Необходимые условия успешного проведения анализа

Строго соблюдать условия хранения и транспортировки компонентов тест-системы (см. п. 1.4).

Однократно использовать пластиковую посуду. Ранее использованные и мытые наконечники и пробирки использовать нельзя.

На всех этапах анализа в первую очередь проводить манипуляции с отрицательным контролем, затем с исследуемыми образцами и в последнюю очередь с положительным контролем.

Посуда для отбора образцов биоматериала должна быть одноразовой или тщательно обработана хромпиком, отмыта, простерилизована.

Перед открыванием пробирок капли жидкости на крышках удалять центрифугированием.

При открывании пробирок избегать случайного касания руками или инструментами внутренней поверхности крышек.

На всех стадиях обработки биоматериала удаление супернатанта производить одноразовыми пластиковыми наконечниками при помощи водоструйного насоса в колбу-ловушку с дезинфицирующим раствором (3% хлорамин или 5% перекись водорода и т. п.).

Бромистый этидий разлагается на свету и при нагревании. Содержащие его растворы хранить в темном месте. При длительном хранении или многократном нагревании в них перед употреблением следует внести свежую порцию бромистого этидия (5 мкл на 100 мл буфера).

3.1.2 Подготовка исследуемого материала

- **КРОВЬ:** допускается однократное замораживание проб до исследования при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С, 200 мкл крови переносят в полипропиленовую пробирку на 1,5 мл и используют для анализа.
- **СЫВОРОТКА КРОВИ:** допускается однократное замораживание при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С, 200 мкл сыворотки крови переносят в полипропиленовую пробирку на 1,5 мл и используют для анализа.
- **ТКАНИ:** кусочек ткани измельчают ножницами и растирают в физиологическом растворе или в растворе для выделения №1 (готовят примерно 10% суспензию). 200 мкл суспензии переносят в полипропиленовую пробирку на 1,5 мл и используют для анализа.
- **КОНТРОЛИ:** Положительными контролями ПЦР служат генноинженерные препараты, содержащие фрагменты геномов вирусов лейкоза птиц А – D и J. Аликвоту размораживают непосредственно перед использованием. В реакцию берут 5 мкл. В качестве отрицательного контроля используют деионизованную воду.

3.2.Выделение РНК и ДНК из исследуемого биологического материала проводят с помощью **Набора - I для выделения РНК и ДНК.**

До начала работы маркируют чистые пробирки объемом 1,5 мл и вносят в них по 600 мкл раствора №1. После этого приступают к работе с инфицированным материалом.

Образцы исследуемого биологического материала и контролей (в объеме 200 мкл) добавляют в подготовленные пробирки, содержащие 600 мкл раствора №1. Инкубируют 10 мин при комнатной температуре (20±2)⁰С, периодически плавно перемешивая. Центрифугируют в настольной центрифуге типа “Эппендорф” 1 мин при 13000 об/мин. Надосадочную жидкость переносят в чистые пробирки, а осадок отбрасывают.

К надосадочной жидкости добавляют 40 мкл сорбента (сорбент перед использованием необходимо тщательно ресуспендировать), инкубируют при комнатной температуре (20±2)⁰С в течение 10 мин, 1-2 раза перемешивая на смесителе типа “Vortex”. Центрифугируют 10-15 сек на микроцентрифуге при 6000 - 13000 об/мин, надосадочную жидкость отбрасывают.

К осадку добавляют 100 мкл раствора №2, суспендируют и осаждают сорбент центрифугированием в течение 15 сек, надосадочную жидкость отбрасывают. Процедуру повторяют 2 раза.

К осадку добавляют 100 мкл раствора №3, перемешивают, центрифугируют 15 сек, надосадочную жидкость отбрасывают. Процедуру повторяют 2 раза.

Осадок подсушивают в течение 5-10 мин при 56⁰С в пробирке с открытой крышкой.

К осадку добавляют 30 мкл деионизованной воды для элюции РНК и ДНК с сорбента, перемешивают и инкубируют 10-15 мин при 56⁰С в закрытых пробирках, 2-3 раза встряхивая на смесителе типа "Vortex". Центрифугируют в течение 0,5 мин при 13000 об/мин. Отобранную надосадочную жидкость используют для проведения ПЦР.

Выделенные РНК и ДНК хранить при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С

3.3 Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Для выполнения ПЦР используют **Набор II - для выявления РНК и ДНК вируса лейкоза птиц и дифференциации типов А-D и J методом ПЦР.**

3.3.1 ПЦР-1

В отдельной пробирке готовят общую реакционную смесь на n образцов (n – количество проб с учетом положительного и отрицательного контролей). Реактивы вносят в количестве и последовательности, указанной в таблице. Ферменты добавляют в последнюю очередь. При составлении смеси ферменты следует держать во льду.

Реактив	Кол-во на 1 пробу (мкл)	Кол-во на n проб (мкл)
Реакционный буфер	15.125	15.125 x (n+1)
Праймеры для ПЦР-1	4.5	4.5 x (n+1)
Фермент Таq-полимераза	0.25	0.25 x (n+1)
Фермент MMLV ревертаза	0.125	0.125 x (n+1)

Смесь перемешивают, избегая образования пены, и немедленно раскапывают по 20 мкл в предварительно промаркированные пробирки, в каждую пробирку добавляют по 2-3 капли масла (примерно 40 мкл).

Затем в них вносят по 5 мкл смеси РНК и ДНК соответствующих анализируемых и контрольных образцов. Пробы вносят в амплификатор со следующим температурным режимом:

50 ⁰ С – 45 мин	}	1 цикл
94 ⁰ С - 5 мин		
94 ⁰ С - 0.5 мин	}	5 циклов
51 ⁰ С - 0.5 мин		
72 ⁰ С - 0.5 мин		
94 ⁰ С - 0.5 мин	}	35 циклов
53 ⁰ С - 0.5 мин		
72 ⁰ С - 0.5 мин		

3.3.2 ПЦР-2

Для проб, положительных в ПЦР с праймерами для ПЦР-1 (для детекции вируса лейкоза птиц типа А-D), в отдельной пробирке готовят смесь на n образцов, в число которых входят положительный и отрицательный контроли. Вместо праймеров для ПЦР-1 используют праймеры для ПЦР-2, для детекции вируса лейкоза птиц типа J. Количество реактивов, последовательность приготовления реакционной смеси, температурный режим реакции используются такие же, что в пункте 3.3.1.

IV УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Результаты исследования учитываются путем анализа продуктов амплификации исследуемых образцов методом электрофореза в агарозном геле (**Набор III - для проведения электрофореза**).

4.1 Приготовление буфера для электрофореза

Для приготовления 1 л однократного буфера для электрофореза к 20 мл 50xTAE буфера добавить 980 мл дистиллированной воды и 40 мкл раствора бромистого этидия.

Буфер можно приготовить самостоятельно по следующей прописи: навеску 4,04 г Триса растворяют в 200 мл дистиллированной воды, добавляют 1,14 мл ледяной уксусной кислоты и 2 мл 0,5 М раствора ЭДТА pH 8,0 и доводят объём буфера до 1000 мл дистиллированной водой. После растворения компонентов буфера добавляют 40 мкл раствора бромистого этидия.

4.2 Приготовление агарозного геля

К 100 мл однократного буфера для электрофореза добавляют 2 г агарозы, доводят до кипения и охлаждают до 45⁰С. Заливают в специальную форму с гребёнкой и дают затвердеть. Гребёнку осторожно вынимают, форму с агарозой переносят в аппарат для горизонтального электрофореза (ПГ-9 «Диа - М») и погружают в буфер.

4.3 Электрофорез продуктов амплификации

К 7 мкл полученной амплификационной смеси (водной фазы) добавляют 3 мкл буфера для нанесения образца, перемешивают пипетированием. Полученные образцы вносят в лунки агарозного геля, образовавшиеся от зубцов гребёнки.

Электрофорез проводят при напряжении 8 вольт/ см геля. Краситель должен пройти не менее половины геля. **Направление движения образцов в геле от «-» к «+»!**

4.4 Учет результатов электрофореза

Результаты электрофореза просматривают в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на приборе "Трансиллюминатор".

Результаты реакции выявляются в виде Положительными считают пробы, полосы в которых располагаются в геле точно на таком же расстоянии от старта, что и полосы положительного контроля. В отрицательном контроле не должно выявляться никаких полос.

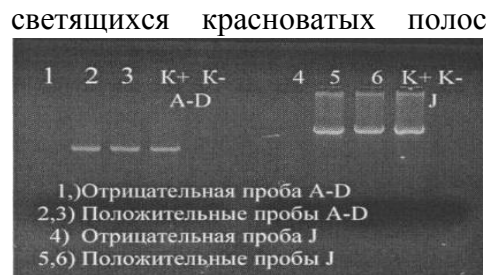
Исследуемые пробы считают отрицательными, если в них не выявлено никаких полос или полосы не соответствуют по размеру фрагменту в контрольной пробе (т. е. располагаются на другом расстоянии от старта).

Присутствие в отрицательном контроле окрашенных фрагментов на уровне полос положительного контроля свидетельствует о перекрестной контаминации в процессе анализа. Результаты аннулируются. Анализ необходимо провести заново.

Размер фрагментов после проведения ПЦР.

Матрица	Праймеры	Размер фрагментов
Лейкоз птиц типов А-D	Праймеры для ПЦР-1	314 п.н.
Лейкоз птиц типа J	Праймеры для ПЦР-2	738 п.н.

Для документирования полученных результатов используют фотопленку «Микрат – 300» и аппарат типа "Зенит" с оранжевым светофильтром, либо другие фото- и видеосистемы.



У МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

5.1 Бромистый этидий является мутагеном, проникающим через кожу. При работе с ним использовать резиновые перчатки.

5.2 Ультрафиолет вызывает ожоги слизистой оболочки глаз. При просмотре гелей пользоваться защитным экраном или очками.

5.3 Работу с химическими компонентами и биологическим материалом следует проводить с соблюдением правил техники безопасности. При случайном попадании

компонентов на кожу или слизистые оболочки рекомендуется промыть это место большим количеством водопроводной воды.

5.4 Запрещается во время работы с компонентами тест-системы прием пищи, воды, курение.

5.5 Тест-систему следует хранить в местах, недоступных для детей.

Инструкция разработана ООО «Ветбиохим». Организация-производитель – ООО «Ветбиохим». Адрес производства: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д.16

С утверждением настоящей инструкции теряет силу инструкция по применению тест-системы для обнаружения и дифференциации вирусов лейкоза птиц типов А-D и J методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), утвержденная Россельхознадзором 21 мая 2009 г.

Рекомендовано к регистрации в Российской Федерации ФГУ ВГНКИ.
Регистрационный номер ПВР-1-1.5/01440.

ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России



Государственная Коллекция Вирусов

123098, Москва, ул. Таммачи, 16
Тел.: (499) 1903060, (499) 2777820 Факс.: (499) 2777819
<http://www.viruscollection.ru> E-mail: info@viruscollection.ru

УДОСТОВЕРЕНИЕ

НАСТОЯЩЕЕ выдано в том, что в Государственную коллекцию вирусов 9 июля 2014 года депонирован оригинальный авторский вирулентный штамм «2/11» вируса лейкоза птиц, Retroviridae, Orthoretrovirinae, Alpharetrovirus, Avian Leukosis Virus.

Штамму присвоен номер в Государственной коллекции вирусов: **2805**

Родословная штамма (место, год выделения штамма): штамм выделен в 2011 г от кур птицефабрики «Юрьевская» Владимирской области. Штамм прошел 3 пассажа и поддерживается в культуре клеток эмбрионов кур линии О. Вирус размножается без проявления ЦПД, выявляется методами ПЦР и ИФА.

Штамм хранится в замороженном состоянии при минус 70°C в криопротективной среде. Инфекционная активность 5,0 lg ТЦД 50/см³.

Авторами штамма являются:

- сотрудники ФГБУ "НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского" Минздрава России: Алипер Т.И., Норкина С.Н., Гребенникова Т.В.,
- сотрудник ООО «НПП «АВИВАК» Плотников В.А.

И.О. Директора
ФГБУ "НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского"
Минздрава России
Профессор, Д.М.Н.



П.Г. Дерябин