

РОЗДІЛ 2. ВЕТЕРИНАРНА ВІРУСОЛОГІЯ ТА МІКРОБІОЛОГІЯ

УДК: 619:616-076:57.083.33:578.828.11:636.22/28

МЕТОДИ СЕРОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗУ ВРХ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Беседа Н. В.*

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,
м. Харків, Україна, e-mail: nataliabeseda85@gmail.com*

У статті наведені літературні дані щодо методів діагностики лейкозу великої рогатої худоби. Описані загальні відомості про ретровірусний генوم. Дана порівняльна характеристика методів діагностики реакції імунодифузії (РІД) та імуноферментного аналізу (ІФА). Наведено принцип методів отримання рекомбінантних антигенів, описано експресію протеїнів *env*, *gag* у клітинах *E. coli*, у векторній системі рекомбінантного вірусу віспи ВРХ та бакуловірусній системі. Тест-системи на основі *gp51* антигену мають високу специфічність і чутливість та можуть використовуватися при дослідженні об'єднаних зразків сироваток крові, що значно зменшило б витрати на проведення діагностичних досліджень. Літературні дані свідчать, що *p24* антиген є високо консервативним білком з максимальною мінливістю 5,5 % у штамів вірусів із різних географічних регіонів. Тому діагностичні методи виявлення антитіл до *p24* та *gp51*-антигенів вірусу лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ) є важливими для розробки ефективних програм з ліквідації цього захворювання.

Ключові слова: вірус лейкозу ВРХ, серологічна діагностика (РІД, ІФА), білок *p24*, *gag*-ген

Актуальною проблемою в сучасних тваринницьких господарствах практично в кожній з країн світу, де розвинене скотарство, є лейкоз ВРХ.

Ензоотичний лейкоз великої рогатої худоби – це інфекційне захворювання пухлинної природи, яке характеризується активною проліферацією клітин кровотворної тканини з порушенням їх диференціації [1].

У більшості випадків лейкоз ВРХ протікає безсимптомно, приблизно у 30 % уражених тварин впродовж 3 років проявляється персистентним лімфоцитозом, з утворенням пухлин у кровотворних органах і тканинах. Лейкоз ВРХ перебігає в хронічній формі за типом В-клітинної лейкемії і супроводжується зниженням продуктивності інфікованих тварин, та призводить до розвитку пухлин у їх організмі, що призводить до необхідності їх вибраковки. Неблагополучні господарства несуть значні економічні збитки внаслідок вимушеного забою, витрат на проведення протиепізоотичних і карантинних заходів [7].

Аналізуючи літературні дані, можна сказати, що захворювання наносить значних економічних збитків, перешкоджає селекції та вирощуванню цінних високопродуктивних тварин. Ензоотичний лейкоз зумовлює основні економічні втрати в скотарстві ряду регіонів світу (наприклад, США). По даним Nicolas Gillet (2007) збитки в молочній промисловості США у 2003 р. оцінювалися в 525 млн. доларів.

Лейкоз ВРХ внесений до списку найбільш поширених хвороб, згідно класифікації Міжнародного епізоотичного бюро. У Фінляндії існує національна програма з ліквідації цього захворювання [2]. У США, 89 % молочних стад інфіковані вірусом лейкозу ВРХ [3]. За статистичними даними ветеринарної служби Японії у 2000 р. лейкоз був виявлений на 157 фермах, а в 2007 р. виявлено у 838 позитивно реагуючих тварин на 677 фермах [3]. За даними Гулюкіна М.І. та співавторів превалентність цього захворювання серед ВРХ у Російській Федерації сягає до 60 % з-поміж інших інфекційних захворювань [4].

У всіх країнах світу особливе місце відводиться сучасним методам діагностики, оскільки ефективних методів специфічної профілактики ще не розроблено. Тварин-вірусоносіїв можна виявляти за допомогою прямих та непрямих методів. Останні мають у своїй основі виявлення антитіл до збудника за допомогою реакції імунодифузії (РІД), та імуноферментного методу (ІФА, ELISA). Золотим стандартом у діагностиці інфекційних захворювань є методи прямого виявлення збудника. Так, при лейкозі ВРХ, рекомендованим МЕБ діагностичним методом є ПЛР та ПЛР у форматі реального часу.

У сучасних умовах розробляються високочутливі методи діагностики, які основані на сучасних досягненнях біотехнології, з подальшим впровадженням вітчизняних технологій у виробничу практику. У ННЦ «ІЕКВМ» розроблено тест-систему для індикації провірусної ДНК ВЛ ВРХ методом полімеразної ланцюгової реакції [5].

Загальні відомості про збудника лейкозу. Збудником ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби є вірус лейкозу ВРХ (*Bovine leukemia virus*). Він належить до родини *Retroviridae*, підродини *Oncoviridae*, типу С. Характерною особливістю збудника є наявність у складі віріонів РНК-залежної ДНК-полімерази (зворотної транскриптази), що забезпечує синтез ДНК на матриці вірусної РНК. Це послужило основою для назви сімейства *Retroviridae* (від лат. *retro*- зворотний). Представники

родини мають наступні ознаки: наявність ліпідної оболонки і серцевини, характерна морфологія, наявність зворотної транскриптази (РНК-залежної ДНК-полімерази), всередині віріону міститься геном у вигляді одноланцюгової лінійної молекули РНК, яка утворює комплекс, що складається із двох ідентичних субодиниць, реплікація проходить стадію утворення двох ланцюгового ДНК-провірусу, що інтегрується до клітинного геному. Транскрипція його проходить за участі клітинної РНК-полімерази, дозрівання віріонів відбувається шляхом брунькування на клітинних мембранах.

Геномна РНК ретровірусів складається з 4 основних генів (5–3) *gag-pro-pol-env*, що кодують відповідно внутрішні віріонні білки, протеазу, зворотно транскриптазу і глікопротеїни зовнішньої оболонки віріонів.

Рід ретровірусів включає вірус лейкозу ВРХ, вірус Т-клітинного лейкозу людини типу 1 і 2, і вірус клітинного лейкозу мавп. Геном складається з 8,3 тис. нуклеотидних залишків, та вміщує 2 додаткових гени неструктурних білків (*tax*, *hcx*), продукти яких приймають участь у синтезі вірусної РНК.

Ретровірусний геном складається із:

1. R-короткого прямого кінцевого повтору (20-80 нуклеотидних залишків), необхідного для реплікації збудника;
2. Us-унікальної послідовності нуклеотидів між R і PBS ділянками;
3. PBS- ділянки комплементарної РНК, які слугують затравкою при синтезі мінус-ланцюгової ДНК ретровірусу, область компліментарності цієї ділянки складає 11-24 нуклеотидних залишків;
4. L-ведуча ділянка вірусного геному, що включає сигнальну послідовність для сплайсингу;
5. Ген *gag*, що кодує внутрішні структурні білки віріону;
6. Ген *pol*, що кодує поліпептиди, з ревертазною, специфічною РНК-азною і ДНК-ендонуклеазною активністю;
7. Ген *env*, що кодує поверхневі білки віріону;
8. PPT- ділянку збагачену пуриновими основами, відповідальною за ініціацію синтезу плюс-ланцюга ДНК вірусу;
9. U3- унікальної ділянки розташованої між PPT і R послідовностями реплікації, що вміщує ділянки ініціації і термінації транскрипції.

Гени *gag*, *pol*, *env* необхідні для реплікації вірусу і називаються реплікативними.

Ретровіруси часто зумовлюють розвиток різних неопластичних захворювань та швидко поширюються серед сприйнятливих тварин. Вони характеризуються відповідною морфологією, структурою РНК-геному і наявністю РНК-залежної ДНК-полімерази. Віріони включають 7 поліпептидів, при цьому поверхневі глікопротеїни (*env*) містять типоспецифічні епітопи, а внутрішні білки (*gag*) несуть перехресно-реактивні епітопи, що має важливе значення для моделювання біотехнологічних конструкцій.

Геном вірусу лейкозу ВРХ містить структурні та регуляторні гени [6]. Відомо, що в організмі інфікованих тварин індукується синтез антитіл до р24 і р15 білків збудника, які є продуктами гена *gag* [6].

Порівняльна характеристика серологічних методів діагностики лейкозу ВРХ. Інфікування тварин вірусом лейкозу призводить до утворення специфічних антитіл. Антитіла до збудника можуть бути виявлені через 3–16 тижнів після зараження. Серологічний статус тварин щодо лейкозу визначається за виявленням антитіл до gp51 антигену (продукт гена *env*), хоча на 5–7 місяців раніше ідентифікувати вірус можна за виявленням продуктів гена *gag*, який кодує вірусний протеїн р24, що є необхідним для внутрішньоклітинної збірки віріонів і виходу з клітини-хазяїна.

Для ефективного запобігання поширенню лейкозу серед тварин застосовують серологічні методи діагностики, виявляючи та ізолюючи позитивних тварин. На сьогоднішній день розроблені різні варіанти імуноферментного аналізу та реакція імунодифузії для виявлення антитіл до збудника [8, 9]. Вперше реакція імунодифузії була описана в 1970-х р. і стала першим серологічним тестом, офіційно рекомендованим Міжнародним епізоотичним бюро (МЕБ) до використання у системі діагностики хвороби та при експортно-імпортному контролі у міжнародній торгівлі. У Канаді реакція імунодифузії є офіційним діагностичним методом при лейкозі ВРХ. Цей тест використовують для відбору тварин на експорт, селекції бугаїв-плідників для виробництва сперми і акредитації стада в системі Canada Health Accredited Herd (CHAN) за програмою Canadian Food Inspection Agency (CFIA) [10].

Крім того МЕБ рекомендує використовувати імуноферментний аналіз (ІФА) для діагностики вірусу лейкозу ВРХ. Процес імуноферментного аналізу можна розділити на три основних стадії: формування специфічного комплексу антиген-антитіло (імунохімічний процес), введення до нього кольорової мітки та її виявлення (візуалізація). Нині ІФА є найпоширенішим тестом при лейкозі в світі завдяки ряду безперечних переваг. До них відноситься висока чутливість, специфічність та відтворюваність результатів, можливість використання мінімальних об'ємів досліджуваних зразків біологічних рідин, доступність і стабільність реагентів, простота та швидкість проведення реакції, інструментальний облік кінцевих результатів та автоматизація майже всіх етапів ІФА. Існує декілька варіантів ІФА- прямих, непрямих, конкурентних, і сандвіч. У всіх них використовують кон'югат ферменту зі специфічними або антивидовими антитілами чи антигенами та проявник (суміш субстрату з хромогеном). У результаті ферментативної реакції з субстратом за допомогою хромогену реакційна суміш забарвлюється. Це дає змогу візуально або автоматично оцінювати наявність антигенів або антитіл у досліджуваному матеріалі. ІФА включає як прямі так і не прямі методи виявлення антигенів у залежності від того, яким чином відбувається детекція аналізованого об'єкту. Механізм неконкурентного ІФА полягає в тому, що в системі присутня лише аналізована сполука та відповідні їй центри зв'язування, а конкурентний метод передбачає, що в системі присутня лише аналізована сполука та її аналог, який конкурує за обмежену кількість наявних специфічного зв'язування. Найбільш розповсюджений, чутливий та специфічний варіант ІФА для виявлення антигенів це так званий сандвіч-метод. Його суть складається в тому, що на тверду фазу сорбують антитіла проти досліджуваного антигену. Останнім часом використовують моноклональні антитіла, що дає можливість підвищити специфічність методу. Потім у лунки планшету вносять досліджуваний матеріал і кон'югат (моно- або поліклональні антитіла мічені ферментом). Значення оптичної

густина прямо пропорційне концентрації антигену. У світі використовуються різні варіанти ІФА для дослідження сироваток від хворих тварин на лейкоз, при цьому різні варіанти імуноферментного аналізу мають більшу діагностичну чутливість, а ніж реакція імунодифузії. Gustavo E. Monti і співавтори оцінювали блокуючий тест ІФА (M108 для молока і S108 для сироватки) у порівнянні реакцією імунодифузії, ПЛР та комерційним ІФА. Чутливість та специфічність ІФА для M108 становила 98,6 % і 96,7 %, а для S108 99,5 % і 95,4 % відповідно [11].

При дослідженні 4 комерційних наборів ІФА із США і Євросоюзу, які використовуються для виявлення антитіл до вірусу лейкозу ВРХ і набору для реакції імунодифузії Simard C. (2000) встановив кореляцію отриманими за їх допомогою результатами. При цьому, три набори ІФА були призначені для виявлення антитіл до gp51- антигену, один набір для виявлення антитіл до р24-антигену вірусу. Два набори продемонстрували 100 % співпадіння результатів з реакцією імунодифузії. 0,41 % псевдонегативних результатів та 0,43 і 0,28 % псевдо- позитивних результатів отримано при дослідженні 704 зразків сироватки крові від тварин з різним статусом. А набір для виявлення антитіл до р24 показав результат в 5,13 % [10].

У дослідженнях Simard C. (2000) відчутна різниця за чутливістю між тест-системами спостерігалася тільки при розведенні зразків. Реакція імунодифузії виявилася менш чутливою і дозволяла виявляти антитіла в розведенні сироватки 1:100, тоді як всі імуноферментні тест-системи могли виявляти антитіла в розведенні 1: 5000. При цьому, найбільшу чутливість було продемонстровано при застосуванні набору, що базується на використанні непрямого варіанту ІФА з використанням на планшетах іммобілізованих gp51 специфічними моноклональними антитілами. Інший набір базувався на блокуючому варіанті імуноферментного аналізу, де специфічні антитіла із проби сироватки зв'язувалися з іммобілізованим gp51 антигеном, блокуючи при цьому зв'язування анти-gp51-кон'югованих моноклональних антитіл. Із досліджень проведених автором можна зробити висновок, що тест-системи на основі gp51 антигену мають високу специфічність і чутливість, та можуть використовуватися при дослідженні об'єднаних зразків сироваток крові, що значно зменшило б витрати на проведення діагностичних досліджень [10].

Рекомбінантні антигени, які застосовують для діагностики вірусу лейкозу ВРХ. У діагностичних тест-системах для виявлення антитіл до вірусу лейкозу ВРХ у якості антигену традиційно використовують інактивовані вірус, який реплікується у персистентно інфікованій перещеплюваній культурі клітин FLK. Такий антиген досить часто демонструє перехресні реакції з антитілами до інших вірусів тварин. Можливою причиною зниження специфічності тесту є коінфекція культури клітин FLK вірусами, які присутні у фетальній сироватці, що додають до середовища для клітинних культур. Застосування сучасних методів генної інженерії дозволили розробити рекомбінантні антигени вірусу лейкозу ВРХ. Перевагою цих продуктів є їх висока специфічність, що зумовлено їх більш ефективним очищенням [12].

Під час вірусної інфекції глікопротеїн gp51 і основний структурний білок р24 є основними мішенями для імунної системи макроорганізму. Тому значна частина досліджень зі створення засобів діагностики зосереджена на отриманні рекомбінантних антигенів. У літературі описано експресію протеїнів *env*, *gag* у клітинах *E. coli* [6,9,13,14], у векторній системі рекомбінантного вірусу віспи ВРХ [15] та бакуловірусній системі [16, 17, 18].

У молекулярній біотехнології стійкі клітинні лінії використовуються для розмноження вірусів і для виявлення білків, які кодуються клонованими послідовностями ДНК. Також вони використовуються для виготовлення вакцин та рекомбінантних антигенів. Для оптимальної продукції рекомбінантних білків, *E. coli* та інші мікроорганізми вирощують в аеробних умовах. Ріст клітинної маси і продукція білка лімітуються вмістом розчинених у середовищі вуглеводів. Це особливо важливо для промислового отримання рекомбінантних білків за допомогою мікроорганізмів. Якщо метою культивування бактерій у лабораторії є синтез і отримання певного білка, то культури вирощують на складних живильних середовищах [19]. Тип живильного середовища впливає на кількісний вихід цільового продукту так і на розподіл його між фракціями, а також на його антигенні властивості [20].

На думку Dube S. з співавторами (2000), р24 антиген є високо консервативним білком з максимальною мінливістю 5,5 % у штамів вірусів із різних географічних регіонів. Так рекомбінантний білок р24 можна використовувати для дослідження сироваток з різних географічних регіонів, що доказано дослідженням сироваток з Євросоюзу і США методом імуноблотингу. Gutierrez G. з співавторами (2009) ампліфікували повну нуклеотидну послідовність р24 антигену із провірусу, виділеного в Бельгії. При цьому нуклеотидна послідовність ампліфікованого гену була повністю гомологічною до генів, що кодують р24-антиген збудника ізолюваного в Бельгії, Аргентині, Австралії і Японії. Крім того, нуклеотидна послідовність і амінокислотна характеристика р24-антигену польових штамів вірусу повністю підтвердила припущення, що циркулюючі штами не достатньо варіабельні, щоб виробляти антитіла, які не реагують з рекомбінантним р24-антигеном, включеним до імуноферментних тест-систем [9].

Однак, рівень діагностичних технологій і досягнень прикладної науки в області діагностики інфекційних хвороб потребує більш глибокого розуміння антигенних властивостей патогенів і їх імуногенності. Вирішення даної проблеми може полягати у створенні синтетичних пептидів, що дозволять уникнути проблем пов'язаних із застосуванням антигенів, отриманих у культурах клітин [22].

Висновки. Серологічна діагностика ґрунтується на виявленні антитіл до р24- і gp51-антигенів вірусу лейкозу ВРХ. Тобто, діагностичні процедури на виявлення антитіл у тварин до р24 і gp51-антигенів ВЛ ВРХ є важливими для розробки ефективних програм з ліквідації цього захворювання.

Так, р24 є висококонсервативним білком і тест-системи на його основі можна використовувати для дослідження сироваток з різних географічних регіонів. У препаратах рекомбінантного р24-антигену відсутні клітинні компоненти, що впливають на специфічність реакції на відміну від препаратів отриманих на основі цільовіріонних антигенів з культури клітин FLK. Тому перспективним є розроблення тест-систем з використанням рекомбінантного р24-антигену для діагностики лейкозу ВРХ.

Список літератури

1. До вивчення епізоотичної ситуації з лейкозою ВРХ та генетичних особливостей збудника в різних географічних зонах України [Текст] / С. К. Горбатенко, А. П. Герілович, О. В. Шаповалова, О. М. Корнейков // Вет. медицина : міжвід. темат. наук.зб. — Харків, 2013. — № 97. — С. 166–169.
2. Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland [Text] / L. Nuotio, H. Rusahen, L. Sihvonon, E. Neuvonen // Prev. Vet. Med. — 2003. — Vol. 59, № 1–2. — P. 43–49.
3. Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan [Text] / S. Kobayashi [et al.] // Vet. Res. — 2010. — Vol. 6, № 1. — P. 1–6.
4. Гулюкин, М. И. Усовершенствованная система борьбы с лейкозом крупного рогатого скота [Текст] / М. И. Гулюкин, С. В. Тимошина, О. Б. Бадеева // Тр. ВИЭВ. — М., 2009. — Т. 75. — С. 199–203.
5. Горбатенко, С. К. Лейкоз великої рогатої худоби. Здобутки та перспективи [Текст] / С. К. Горбатенко, О. В. Шаповалова // Вет. медицина : міжвід. темат. наук.зб. — Харків, 2013. — № 97. — С. 169–173.
6. Expression of bovine leukemia virus protein p24 in Escherichia coli and its use in the immunoblotting assay [Text] / L. Bicka [et al.] // Acta. Biochim. Pol. — 2001. — Vol. 48, № 1. — P. 227–232.
7. Смирнов, П. Н. Лейкоз крупного рогатого скота: проблемы и их решение на уровне субъекта федерации [Текст] / П. Н. Смирнов // Ветеринария Кубани. — 2007. — № 4. — С. 4–6.
8. Expression of p24 gag protein of bovine leukemia virus in insect cells and its use in immunodetection of the disease [Text] / A. Larsen [et al.] // Mol. Biotechnol. — 2013. — Vol. 54, № 2. — P. 475–483.
9. Detection of bovine leukemia virus specific antibodies using recombinant p24-ELISA [Text] / G. Gutierrez [et al.] // Vet. Microbiol. — 2009. — Vol. 137, № 3–4. — P. 224–234.
10. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnostic of bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency [Text] / C. Simard [et al.] // Can. J. Vet. Res. — 2000. — Vol. 64, № 2. — P. 101–106.
11. Evaluation of a new antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine leukemia virus infection in dairy cattle [Text] / G. E. Monti [et al.] // Vet. Diagn. Invest. — 2005. — Vol. 17, № 5. — P. 451–457.
12. Герілович, А. П. Сучасні тенденції розвитку молекулярно-генетичних досліджень у ветеринарній медицині та біології [Текст] / А. П. Герілович, А. І. Завгородній // Молекулярно-генетичні методи діагностики у ветеринарній медицині та біотехнології : навч. посіб. / Під заг. ред. д-ра вет. наук, проф., акад. НААН України та РАН Б. Т. Стегнія та д-ра вет. наук, ст. наук співр. А. П. Геріловича. — К. : СТ-Друк, 2014. — С. 6–12.
13. Mautaz, H. Expression of bovine leukemia virus p24 protein in bacterial cell [Text] / H. Mautaz, F. Hemmatzadeh, H. Kewanfar // Biol. Sci. — 2008. — № 11. — P. 2433–2437.
14. Получение рекомбинантного белкового фрагмента gp51 антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота, экспресированного в E. coli без тиоредоксиновой вставки [Текст] / К. Н. Мукантаев [и др.] // Биотехнология. Теория и практика. — 2014. — № 1. — С. 49–56.
15. Vaccination against o retroviruses, the bovine leukemia virus paradigm [Text] / G. Gutierrez [et al.] // Viruses. — 2014. — Vol. 6, № 6. — P. 2416–2427.
16. Agar gel immunodiffusion analysis using baculovirus-expressed recombinant bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51/gp30(T-)) [Text] / S. I. Lim [et al.] // J. Vet. Sci. — 2009. — Vol. 10, № 4. — P. 331–336.
17. De Giuseppe, A. Expression of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculovirus and its use in an enzyme linked immunosorbent assay [Text] / A. De Giuseppe, F. Feliziani, D. Rutili, G. M. De Mia // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 2004. — Vol. 11, № 1. — P. 147–151.
18. Expression of bovine leukemia virus Env glycoprotein in insect cells by recombinant baculovirus [Text] / S. Russo [et al.] // Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. — 1998. — Vol. 436, № 1. — P. 11–16.
19. Глик, Б. Глава 2. Биологические системы, использующиеся в молекулярной биотехнологии [Текст] / Б. Глик, Дж. Пастернак // Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. — М. : Мир, 2002. — С. 24–28.
20. Одержання рекомбінантного аналога білка p24 вірусу BLV [Текст] / А. М. Коновалова, Ю. О. Кобозев, Н. І. Грабченко, Л. О. Ганова // Біотехнологія. — 2008. — № 1. — С. 100–105.
21. The complete genomic sequence of a BLV strain from a Holstein cow from Argentina [Text] / S. Dube [et al.] // Virology. — 2000. — Vol. 277, № 2. — P. 379–386.
22. Selection of ligand peptides with the ability to detect antibodies in enzootic bovine leukosis [Text] / E. M. Dos Santos [et al.] // Afr. J. Biotechnol. — 2012. — Vol. 11, № 28. — P. 7302–7312.

THE SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF BOVINE LEUKEMIA VIRUS (LITERATURE REVIEW)

Beseda N. V.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine

The article presents data about the methods of diagnostics of enzootic bovine leucosis. This overview contains general information about bovine leukemia virus (BLV) and characteristic of the diagnostic methods such as ELISA and AGID. The methods obtaining the recombinant antigens and perspective of their using in the test-systems for bovine leukemia diagnosis are presented in the article. Test systems based on the gp51 antigen are high specificity and sensitivity and can be used in the study of blood serum pooling samples, which would significantly reduce the costs of diagnostic tests. Literature data showed that the p24 antigen is highly conserved protein with a maximum variability of 5,5% in the virus strains from different geographic regions. Therefore, diagnostic methods of the detection of antibodies to p24 and gp51-antigens are important to developing effective programs to eliminate the enzootic bovine leucosis.

Keywords: bovine leukemia virus (BLV), serological diagnostic (AGID, ELISA), p24 protein, gag gene