

Идентификация Bovine Leukemia Virus (BLV) в молоке: обзор предметного поля

Е.Г. Лазарева, О.Ю. Фоменко

Всероссийский
научно-исследовательский
институт молочной
промышленности
(ФГАНУ «ВНИМИ»), г. Москва,
Россия

АННОТАЦИЯ

Введение: С 2019 г. наблюдается растущий интерес к вопросу оценки потенциальных рисков мутации вирусных инфекций животных в опасную для человека форму. Исследования в нише безопасности животноводческой продукции ведутся в нескольких направлениях, включающих анализ и оценку влияния наиболее распространенных заболеваний скота на качество и безопасность получаемого сырья. Значительный интерес вызывает идентификация Bovine leukemia virus (BLV) в молоке. Мониторинг данного вируса позволит не только оперативно отслеживать наличие вируса в фермерских хозяйствах, но и оценивать качество и безопасность молока-сырья, используемого для дальнейшей выработки молочных продуктов.

Цель: Проанализировать основные направления исследований в сфере молекулярно-генетического подхода к детекции вируса бычьего лейкоза в молоке коров.

Материалы и методы: Данный обзор предметного поля реализовывался согласно протоколу PRISMA-ScR. Подбор статей проводился в базах данных SCOPUS и ScienceDirect. Основным критерием для включения публикации в обзор являлось наличие информации о детекции BLV в молоке методом ПЦР. Критерии приемлемости включали также язык документа (английский язык), его тип и статус (опубликованные, прорецензированные, обзорные и эмпирические статьи) без ограничений по годам.

Результаты: Суммарно было извлечено 3688 документов, среди них был проведен скрининг на наличие дубликатов, в результате чего для дальнейшего анализа было извлечено 2905 результатов поиска. На этапе отбора публикаций по названию и аннотации были исключены 2601 статья, не соответствующие контексту обзора предметного поля и типу публикации. При изучении полного текста 38 статей было исключено 23. В результате анализа выбранных источников которых в обзор было включено 15 публикаций. Анализируемые исследования базировались как на простых, так и на многоэтапных методах идентификации BLV анализа. В качестве источника биоматериала трактывались кровь, молозиво, сырое молоко и мясо от различных выборок животных.

Выводы: Данный обзор предметного поля является первым обзором, обобщающим молекулярно-генетические подходы к детекции BLV в молоке. Представленные результаты указывают на наличие научной базы методов идентификации BLV для последующей разработки методов контроля наличия вируса и его провирусной нагрузки в продуктах, ужесточения контроля за распространением экономически вредного заболевания инфекционной природы, потенциально прямо или опосредованно опасного для любого потребителя молочной продукции.

Ключевые слова: вирус бычьего лейкоза, молоко, полимеразная цепная реакция, провирусная ДНК

Корреспонденция:

Лазарева Е.Г.,

Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности (ФГАНУ «ВНИМИ»), г. Москва, Люсиновская 35, корп. 7
E-mail: e_lazareva@vniimi.org

Конфликт интересов:

авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 10.01.2023

Принята: 25.03.2023

Опубликована: 30.03.2023

Copyright: © 2023 Авторы



Для цитирования: Лазарева, Е. Г., Фоменко, О. Ю. (2023). Идентификация Bovine leukemia virus (BLV) в молоке: обзор предметного поля. *FOOD METAENGINEERING*, 1(1), 90-106. <https://doi.org/10.37442/fme.2023.1.4>

Identification of Bovine Leukemia Virus (BLV) in Milk: Scoping Review

Ekaterina G. Lazareva, Oleg Yu. Fomenko

All-Russian Scientific Research
Institute of Dairy Industry (Federal
State Autonomous Scientific
Institution «VNIIM»), Moscow,
Russia

ABSTRACT

Introduction: Since 2019, there has been a growing interest in assessing the potential risks of animal viral infections mutating into a form dangerous for humans. Research in the field of livestock product safety is being conducted in several directions, including the analysis and assessment of the impact of the most common cattle diseases on the quality and safety of the raw materials obtained. Of particular interest is the identification of Bovine Leukemia Virus (BLV) in milk. Monitoring this virus will not only allow for the timely tracking of its presence in farmsteads, but also to evaluate the quality and safety of raw milk used for further dairy product production.

Purpose: To analyze the main research directions in the field of molecular-genetic approach to the detection of bovine leukemia virus in cow's milk.

Materials and Methods: This scoping review was carried out according to the protocol PRISMA-ScR. The articles were selected from the SCOPUS and ScienceDirect databases. The main criterion for including a publication in the review was the presence of information about the detection of BLV in milk by PCR method. Acceptance criteria also included document language (English), its type and status (published, peer-reviewed, review, and empirical articles) with no limitations on years.

Results: In total, 3688 documents were extracted, among which a screening for duplicates was carried out, resulting in the extraction of 2905 search results for further analysis. At the stage of selecting publications by title and abstract, 2601 articles that did not match the context of the subject field review and the type of publication were excluded. Upon studying the full text of 38 articles, 23 were excluded. As a result of the analysis of the selected sources, 15 publications were included in the review. The studies analyzed were based both on simple and multi-stage methods of BLV identification. The source of biomaterial were blood, colostrum, raw milk, and meat from different animal samples.

Conclusion: This scoping review is the first to summarize molecular-genetic approaches to the detection of BLV in milk. The presented results indicate the presence of a scientific base of methods for identifying BLV for further development of methods for controlling the presence of the virus and its proviral load in products, tightening control over the spread of economically harmful infectious diseases, potentially directly or indirectly dangerous for any consumer of dairy products.

Keywords: bovine leukemia virus; milk; polymerase chain reaction; proviral DNA

Correspondence:

Ekaterina G. Lazareva,
All-Russian Scientific Research
Institute of Dairy Industry (Federal
State Autonomous Scientific
Institution «VNIIM»),
35 Lyusinovskaya, Building 7,
Moscow, Russian Federation.
E-mail: e_lazareva@vniimi.org

Conflict of interest:

The author report the absence of a conflict of interest.

Received: 10.01.2023

Accepted: 25.03.2023

Published: 30.03.2023

Copyright: © 2023 The Authors



ВВЕДЕНИЕ

С учетом глобальных изменений в мире, вектор внимания производителей продуктов питания смещается в сторону оценки потенциальных рисков в связи с возможными мутациями вирусных инфекций животных в форму, опасную для человека (Nandi et al., 2021). Основным источником продуктов животноводства является крупный рогатый скот (КРС). Поэтому особенно остро стоит вопрос влияния заболеваний крупного рогатого скота на качество и безопасность получаемого от них сырья, в особенности по такому заболеванию, как лейкоз КРС. Данное заболевание является опухолевым и имеет инфекционную природу. Кроме того, лейкоз крупного рогатого скота (ЛКРС) имеет повсеместное распространение практически во всех странах мира (Donnik et al., 2021). Возбудителем ЛКРС выступает вирус бычьего лейкоза (BLV), который имеет филогенетическую связь с вирусом Т-клеточного лейкоза человека 1-го типа (HTLV-1). Влияние вируса лейкоза КРС на организм человека до конца не изучено (Ruiz et al., 2018). Особенностью вируса является длительный латентный период без какой-либо симптоматики, кроме наличия антител. Данный факт препятствует возможности быстрого обнаружения вирусоносителей, от которых продолжается сбор молока. Для гарантированного исключения из цикла переработки сырья низкого качества необходима разработка достоверных и быстрых методов определения BLV, в равной степени применимых ко всем пищевым объектам.

Аспекты безопасности молока от инфицированных животных до сих пор до конца не изучены. Основной спорной темой научных исследований является взаимосвязь BLV и рака молочной железы. Согласно исследованию Buehring et al. (2001), в странах с высоким уровнем потребления мясомолочной продукции от КРС были обнаружены признаки провирусного генома BLV в молочных железах. В дальнейшей работе с применением иммуноблоттинга этой же исследовательской командой было обнаружено, что в 74 % протестированных сывороток крови человека обнаруживался, по крайней мере, один изотип антител, реагирующих с капсидным антигеном BLV (Buehring et al., 2003). Исследования Nikbakht et al. (2010) продемонстрировали с помощью непрямого фермент-связанного иммуносорбентного анализа распространенность антител против BLV в образцах человека и КРС, которая составила 12,50 % и 16,73 % соответственно. Исследования тканей молоч-

ной железы с применением метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) дополнили эти результаты, продемонстрировав детекцию провирусной ДНК BLV в тканях молочной железы (Buehring et al., 2015). Противоположные результаты представили Zhang с соавторами (Zhang et al., 2016), не получив положительные результаты ПЦР в образцах крови здоровых и больных раком молочной железы женщин. Однако они были подвергнуты критике в публикации Buehring (Buehring, 2017) из-за использования в работе коммерческих наборов, не предназначенных для анализа биоматериала человека. Далее результаты научной группы Buehring получили подтверждение в исследовании следов BLV в человеческой крови Schwingel с соавторами (Schwingel et al., 2019). Но в исследовании Ahmed с соавторами (Ahmed et al., 2019) BLV был выявлен только у 2 из 52 больных женщин, что не может быть доказательством корреляции рака молочной железы и BLV. Все описанные исследования не сосредотачивались на способах инфицирования человека и на экономическом ущербе от вируса для сельскохозяйственного сектора.

Нам не удалось обнаружить ни одного обзора, посвященного детекции BLV в молочных продуктах животноводства. Данный пробел в исследованиях может быть связан с тем, что во многих странах молоко-сырьё для обеспечения безопасности последствием разрушения посторонних микроорганизмов подвергается предварительной термизации (Galstyan et al., 2015; Turovskaya et al., 2018) и обязательной пастеризации на производстве при различной температуре и времени выдержки (Donskaya et al., 2022; Veziryan et al., 2015). В то же время нет статей, подтверждающих эффективность применяемых технологических режимов в вопросе инактивации BLV и его метаболитов. Несмотря на имеющиеся данные по определению температуры инактивации вируса (Sandoval-Monzón et al., 2021), остается неясным, насколько эффективно прошла термическая обработка и безопасно ли молоко и продукты его переработки для употребления человеком, если их дополнительно не исследуют на наличие и провирусную нагрузку BLV.

Для решения проблемы обеспечения населения безопасными продуктами питания, необходимы как продолжение исследований корреляции наличия вируса лейкоза КРС и онкозаболеваний у человека, так и разработка методов определения BLV в продуктах молочной промышленности. Цель данного обзора предметного поля — анализ имеющихся подходов к детекции

Е.Г. Лазарева, О.Ю. Фоменко

BLV методом ПЦР в молоке коров. Проведение данного анализа позволит контролировать заболевание инфекционной природы, наносящее экономический ущерб промышленности, и реализовывать качественные и безопасные молочные продукты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Протокол и регистрация

Обзор выполнен с использованием протокола PRISMA-ScR. Протокол был зарегистрирован в Open Science Framework (<https://osf.io/upd9m>)

Стратегия поиска

Поиск научной литературы был произведен по двум базам данных, ScienceDirect и Scopus. Использовались следующие поисковые запросы:

- (bovine AND leukemia AND virus)
- ({bovine leukemia virus})
- ({bovine leukemia virus} AND PCR)
- ({bovine leukemia virus} AND detection)
- ({bovine leukemia virus} AND detection AND PCR)
- ({bovine leukemia virus} AND detection AND {polymerase chain reaction})
- ({bovine leukemia virus} AND detection AND {polymerase chain reaction} AND milk)

- ({bovine leukemia virus} AND DNA)
- ({bovine leukemia virus} AND DNA AND detection)
- ({bovine leukemia virus} AND DNA AND detection AND milk)

Критерии отбора источников

В Таблице 1 даны критерии приемлемости и включения / исключения статей.

Отбор исследований

В отобранных по критериям источниках были проанализированы названия, аннотации и контент. После всех этапов сканирования были исключены 2601 публикации, 2265 из которых оказались нерелевантными уже на уровне названия и/или аннотации, 336 публикаций оказались нерелевантными с точки зрения их жанра (не эмпирические статьи и не обзорные статьи). На втором этапе был проанализирован текст всех отобранных потенциально релевантных исследований.

Извлечение и анализ данных

В процессе анализа текста источников фиксировалась следующая информация: автор(ы); год издания; происхождение/страна, в которой исследование было опубликовано или проводилось; цель(и) исследования; исследуемая популяция и размер выборки (если

Таблица 1

Критерии отбора источников для обзора предметного поля

Критерий	Включение	Исключение	Обоснование
Контекст	Объекты исследования — методология идентификации BLV методом ПЦР в молоке, отдельно или в сравнении с другими методами	Методология идентификации BLV только методами РИД и ИФА	ПЦР применителен как к крови животного, так и к молоку. Кроме того, ПЦР, в отличие от других подходов, позволяет обнаружить даже деградированную ДНК
Язык	Английский	Публикации на других языках	Для релевантности обзора оптимальным будет применение источников исключительно на английском языке.
Период	До августа 2022	Нет	Статьи не были ограничены по временному периоду в прошлом, так как тема обзора специфична и мало изучена
Типы статей	Обзорные, эмпирические	Источники, не прошедшие рецензирование (например, веб-сайты, блоги)	В виду того, что даже в рецензированных публикациях дается достаточно противоречивая информация, дабы избежать путаницы, были отсеяны материалы не рецензируемых источников
Статус публикации	Опубликованные статьи	Препринты и тезисы докладов конференций	Возможность ознакомления с заявленными в обзоре публикациями

применимо), исследуемый материал (молоко/кровь); методология идентификации BLV; ключевые выводы, относящиеся к исследовательскому вопросу(ам); doi (См. Таблица 1). Извлечение данных произведено с исключением дублей и нерелевантных источников. Все отобранные работы также были выгружены в виде файла в формате .ris и обработаны в программном обеспечении "VOSViewer" для визуализации сетей совпадений важных терминов, извлеченных из выбранных для обзора источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты поиска и процесс отбора

В базах данных Scopus и ScienceDirect суммарно были отобраны 3688 документов. Этапы работы с источниками представлены на Рисунке 1. Далее был проведен скрининг на наличие дубликатов, в результате чего для дальнейшего анализа было получено 2905 результатов поиска. На этапе отбора публикаций по названию и аннотации были исключены 2601 статья, не соответствующая

контексту обзора предметного поля и типу публикации. При изучении полного текста 38 статей было исключено 23 как не релевантные. Всего в обзор предметного поля включено 15 публикаций. Столь значимый отсев статей обусловлен тем, что их авторы формулировали нерелевантные ключевые слова (Mask, 2012) в результате чего в подборку попало значительное количество статей, находящихся вне поля нашего исследовательского интереса.

Описание отобранных публикаций

Информация об отобранных работах была выгружена из баз данных в виде файла формата .ris. Данный этап необходим для выявления ключевых слов, на основании которых формируются основные направления исследований молока на наличие BLV. Полученный файл был загружен в программу «VOSViewer». С помощью этой программы из 15 работ всего было извлечено 28 ключевых слов, которые мы в дальнейшем применили для графического представления взаимосвязи терминов в выбранных публикациях (Рисунки 2, 3).

Рисунок 1

Диаграмма процесса отбора статей для обзора предметного поля по PRISMA-ScR

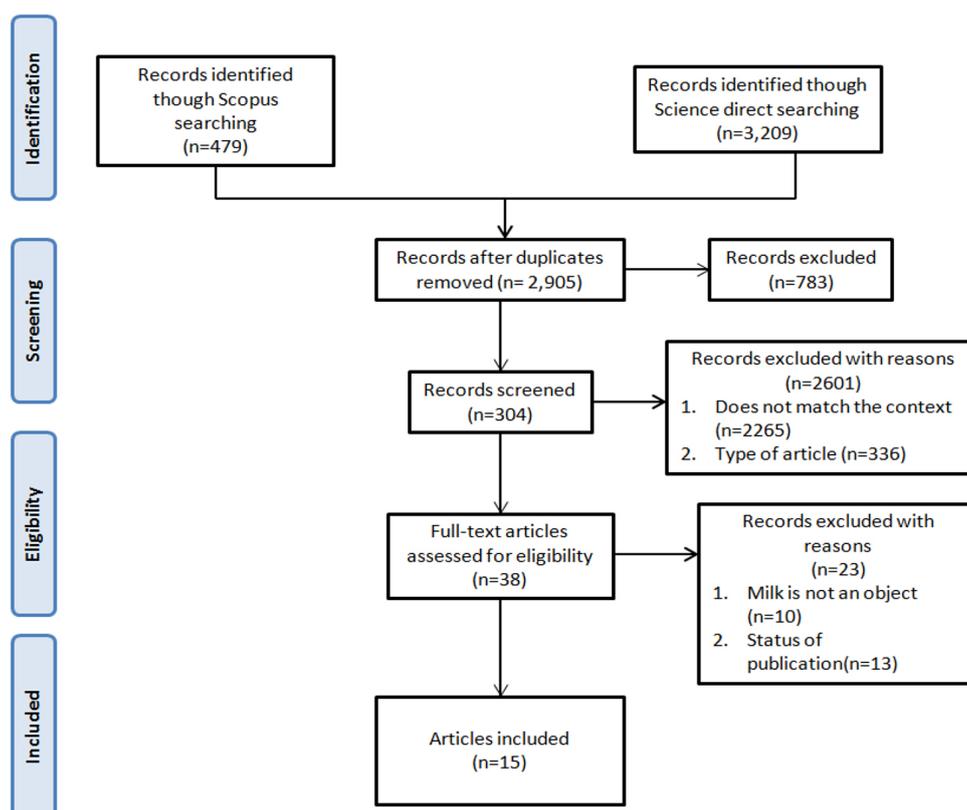


Таблица 2

Обзор критериев отбора публикаций

№	Автор(ы)	Год издания	Происхождение / страна, в которой было опубликовано или проводилось	Цели / цель исследования	Исследуемая популяция и размер выборки/количество образцов	Методология/методы	Ключевые выводы, относящиеся к исследовательскому вопросу (вопросам)	DOI
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	M. Hiraoka, S. Takashima, Y. Wakihara, Y. O. Kamatari, K. Shimizu, A. Okada, Y. Inoshima	2022	Japan	Исследование как биомаркер энзоотического лейкоза крупного рогатого скота (EBL) профилей матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК), выделенной из малых внеклеточных везикул из молока 4 здоровых и 4 инфицированных животных. Оценка как кандидатов в биомаркеры мРНК, с использованием малых внеклеточных везикул от 7 неинфицированных и 10 инфицированных голов крупного рогатого скота (КРС).	25 молочных коров голштинской породы	Гематологическое обнаружение сывоточных антител против вируса бычьего лейкоза (BLV); обнаружение вируса BLV с помощью вложенной ПЦР; измерение вирусной нагрузки BLV; измерение общей активности, выделение и характеристика малых внеклеточных везикул молока; экстракция РНК и синтез кДНК; анализ микрочипов; относительная количественная оценка мРНК, выделенной из молочных малых внеклеточных везикул с помощью количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР).	8 мРНК были идентифицированы как потенциальные биомаркеры для мониторинга развития EBL, хотя использования одной мРНК недостаточно для биомаркирования. Поскольку в качестве среды для образцов в этих тестах использовалось молоко, их можно проводить проще и чаще, чем анализы крови. Путем комбинированного использования этих биомаркеров-кандидатов мРНК и анализа колебаний их количества можно было идентифицировать КРС, подверженный риску EBL. Это исследование сосредоточено на молочном скоте, а в будущих исследованиях необходима проверка биомаркеров с помощью крови и слюны, чтобы тесты можно было проводить не только на молочном, но и на мясном скоте, и даже в сухостойные периоды.	https://doi.org/10.3390/v14051022
2	R. Nakanishi, S. Takashima, Y. Wakihara, Y. O. Kamatari, Y. Kitamura, K. Shimizu, A. Okada, Y. Inoshima	2022	Japan	Внедрение неинвазивного и рутинного контроля риска передачи BLV с помощью микроРНК у КРС. Сравнение профилей микроРНК у 4 здоровых и 4 зараженных BLV животных с помощью анализа микрочипов. Оценка полезности идентифицированных микроРНК от 5 здоровых коров и 17 зараженных BLV с высокой вирусной нагрузкой с помощью кПЦР.	30 голштинских молочных коров	Гематология; обнаружение антител против BLV в сыворотке крови; обнаружение вируса BLV с помощью вложенной ПЦР; измерение вирусной нагрузки BLV методом кПЦР; статистический анализ	Количество hsa-miR-424-5p в молоке от зараженного BLV КРС с высокой вирусной нагрузкой было выше, чем у неинфицированного КРС. Увеличение содержания в профиле микроРНК hsa-miR-424-5p может быть одним из характерных признаков КРС с высоким риском передачи BLV. Чтобы установить критерии идентификации КРС с высоким риском передачи BLV, исследователи должны изучить комбинационные параметры в дополнение к микроРНК. Результаты исследования могут способствовать дальнейшим работам по изучению биомаркеров для предотвращения распространения BLV в стадах и контроля EBL.	https://doi.org/10.3168/jds.2021-20989

1	2	3	4	5	6	7	8	9
3	H. Barzegar, H. Mirshahabi, N. Motamed, M. Yavarmanesh, B. M. Poor, S. R. Moaddab, M. Asgharzadeh	2021	Iran	Изучение распространения вируса BLV с использованием метода вложенной ПЦР в образцах сырого молока на северо-западе страны.	419 образцов сырого молока	Отбор проб и обработка проб; извлечение ДНК; амплификация фрагмента гена gag BLV методом вложенной ПЦР; секвенирование и филогенетический анализ.	В этом исследовании был выявлен относительно высокий уровень заражения BLV иранских молочных коров. Но, учитывая способность вируса передаваться от инфицированного здорового животному, а также человеку через употребление зараженного и непастеризованного молока, молочных и мясных продуктов, должны быть предložены профилактические меры для предотвращения передачи инфекции человеку.	https://doi.org/10.30466/VRF.2019.10.26862.446
4	N.N. Olaya-Galán, A.P. Corredor-Figueroa, T.C. Guzmán-Garzón, K.S. Ríos-Hernandez, S.P. Salas-Cárdenas, M.A. Patarroyo, M.F. Gutierrez	2017	Colombia	Выявление ДНК BLV в сыром мясе и свежем молоке (в т.ч. после доения), предназначаемом для употребления, как первый шаг по оценке потенциала пищевых продуктов в передаче BLV человеку.	Суммарно 100 исследованных образцов. 50 образцов говядины весом около 15 г каждый были получены от мясников в Боготе, а 50 образцов молока были получены от ферм, специализирующихся на производстве молочных продуктов, расположенных в разных частях Колумбии.	Отбор проб; пробоподготовка; выделение нуклеиновых кислот; постановка мультиплексной и вложенной ПЦР; секвенирование	Присутствие ДНК BLV в продуктах, полученных от КРС, можно интерпретировать как шаг вперед в выявлении ранее неизвестных болезней пищевого происхождения. BLV можно считать потенциальным зоонозным агентом, даже несмотря на то, что в этом исследовании сообщалось об обнаружении неинфекционных частиц. Доказательства наличия ДНК онкогенного вируса в молочных и мясных продуктах указывают на то, что такие пищевые продукты являются потенциальным источником передачи вируса человеку и могут быть результатом неизвестных в настоящее время заболеваний. Следует изучить альтернативные пути передачи таких вирусов (т. е. передачу от человека к человеку).	https://doi.org/10.1017/S0950268817002229
5	T. Yamada, H. Shigemura, N. Ishiguro, Y. Inoshima	2013	Japan	Исследование экзосом молока от BLV-инфицированного КРС и экзосом из BLV-инфицированных культуральных клеток. Исследование передачи BLV через экзосомы in vitro.	Молоко от здорового и 2 больных животных, отбиралось после дойки и замораживалось при минус 30 °С до анализа.	Подготовка образцов молока и выделение экзосом; культивирование клеток и изоляция экзосом из среды; вестерн-блот-анализ; иммуномагнитная сепарация экзосом; инокуляция клеток молоком и устойчиво инфицированными BLV клетками эмбриональной почки ягненок; ПЦР-электронная микроскопия; обратная транскрипционный анализ; статистическая обработка	Был использован эффективный метод выделения морфологически нативных и высокоочищенных экзосом коровьего молока путем ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы и иммуно-магнитной сепарации, что привело к небольшому извлечению экзосом. Нельзя полностью игнорировать возможность инфицирования BLV через экзосомы молока, и необходимы дальнейшие детальные исследования инфекции BLV, связанной с экзосомами молока, как in vitro, так и in vivo.	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077359

1	2	3	4	5	6	7	8	9
6	M.I. Petersen, I. Alvarez K.G. Trope, J.P. Jaworski	2018	Argentina	Проверка недорогой кПЦР для обнаружения провирусной ДНК BLV. В целом, анализ позволил высокочувствительно и специфично обнаруживать провирусную ДНК BLV из очищенных лейкоцитов периферической крови и молочной матрицы. Краситель SYBR Green может связываться с любым продуктом, образуя один участок амплификации, и эти участки амплификации обычно имеют одинаковый внешний вид независимо от того, состоит ли амплификация из мишени, не мишени или смеси того и другого. Учитывая это, специфичность реакции дополнительно подтверждается анализом кривых диссоциации и электрофорезом в агарозном геле.	Контрольные образцы ДНК вируса лейкоза КРС: 12 серологически положительных и 2 серологически отрицательных животных из 7 стран (Украина, Россия, Молдова, Хорватия, Япония, Аргентина и Польша).	Подготовка эталонных образцов для исследования; анализ затрат на количественную ПЦР в режиме реального времени; кПЦР в реальном времени с использованием красителя SYBR Green; стандартная кривая для количественного определения копий BLV; эффективность кПЦР с SYBR Green при использовании молочной матрицы; вложенная ПЦР; ИФА-анализ для выявления антител против BLV.	Анализ позволил высокочувствительно и специфично обнаруживать провирусную ДНК BLV из очищенных лейкоцитов периферической крови и молочной матрицы. Краситель SYBR Green может связываться с любым продуктом, образуя один участок амплификации, и эти участки амплификации обычно имеют одинаковый внешний вид независимо от того, состоит ли амплификация из мишени, не мишени или смеси того и другого. Учитывая это, специфичность реакции дополнительно подтверждается анализом кривых диссоциации и электрофорезом в агарозном геле.	https://doi.org/10.3168/jds.2017-14253
7	A. Stobnicka-Kupiec, M. Golofit-Szymczak, R. L. Górny, M. Cyprowski	2020	Poland	Оценка распространенности вирусов КРС (BLV и аденовируса КРС-BADV) на рабочих местах традиционных молочных заводов. Оценка потенциальной роли воздушного и поверхностного загрязнения в распространении этих вирусов, полученных из сырого молока.	Общее количество проб – 122, включая 37 проб воздуха (биоаэрозоли), 40 проб поверхности и 45 проб молока, было проверено на наличие геномов BLV и BAdV с использованием метода RT-qPCR / qPCR.	Характеристика мест отбора проб; отбор проб воздуха; отбор проб с поверхностей; отбор проб молока; выделение вирусной РНК/ДНК; проведение кПЦР с обратной транскрипцией и кПЦР для выявления вирусных геномов; контроль температуры и относительной влажности воздуха; статистическая обработка данных	Исследование показало, что вирусы присутствовали в 7 пробах воздуха помещений (среди них 71,4% были BLV-положительными и 28,6% были BAdV-положительными), 14 пробах с поверхностей (из них 85,7% были BLV-положительными и 14,3% были BAdV-положительными) и 34 молочных пробах (все были только BLV-положительными) образцах. Для снижения вероятности передачи вируса человеку следует внедрить эффективные процедуры очистки поверхностей, разрушающие вирусные частицы, и использовать средства индивидуальной защиты, особенно в производственных помещениях. Поскольку сырое молоко может быть источником вирусов КРС, необходимо срочно разработать стратегии как для контроля, так и для искоренения BLV и BAdV среди КРС.	https://doi.org/10.1080/15459624.2020.1742914
8	M. Konishi, H. Ishizaki, K. Kameyama, K. Murakami, T. Yamamoto	2018	Japan	Исследование колебаний в титре антител и провирусной нагрузки в молозиве/молоке и периферической крови инфицированных животных в период лактации для оценки защитных способностей антител молозива.	—	Измерение титра антител; количество соматических клеток; провирусной нагрузки (ПЦР в режиме реального времени).	Была обнаружена сильная защитная активность антител молозива против инфекции BLV in vitro, обеспеченная антителом против gp51, как это наблюдалось в сыворотке крови.	https://doi.org/10.1186/s12917-018-1724-5

1	2	3	4	5	6	7	8	9
9	C. J. Kuckleburg, C. C. Chase, E. A. Nelson, S. A. E. Marras, M. A. Dammen, J. Christopher-Hennings	2003	United States	Разработка методов гнездовой ПЦР (nPCR) и ПЦР в реальном времени для обнаружения BLV в крови и молоке с использованием географически разнообразной популяции естественного инфицированного КРС с известным серологическим статусом. Оценка влияния стадии лактации на обнаружение BLV в молоке	Использовался бессимптомный взрослый голштинский скот (n = 101) из серологически положительных стад BLV. Этот крупный рогатый скот был из Кентукки (n = 8), Миннесоты (n = 8), Южной Дакоты (n = 23), Висконсина (n = 42) и Оклахомы (n = 20).	Клетки осадили центрифугированием, а моноуклеарные клетки периферической крови получили с использованием градиента фикоколл-диатриза; выделяли ДНК коммерческим набором; с помощью nPCR оценивали 3 пары праймеров из 3 разных областей генома (ro1, epl, gag); праймеры из области ro1 дополнительно оценивали в ПЦР в реальном времени; ПЦР-продукт внешнего ро1 клонировали в систему клонирования pGEMf и использовали в качестве положительного контроля, как и ДНК из клеточной линии эмбриона ягненка, персистентно инфицированного BLV.	Показано, что использование ПЦР с праймерами из полигенного региона дает наибольшую чувствительность и позволяет выявить наибольшее количество BLV-инфицированного КРС из географически различных регионов. Учитывая экономические затраты, связанные с инфекцией BLV, и озабоченность общественного здравоохранения по поводу ретровирусов в животных и фармацевтических продуктах, обнаружение BLV в образцах крови и молока остается серьезной проблемой.	https://doi.org/10.1177/104063870301500117
10	C. Úsuga-Monroy, F. J. Díaz, J. Echeverri-Zuluaga, L. G. González-Herrera, A. López-Herrera	2021	Colombia	Определение присутствия вируса лейкомии КРС в молозиве и его способности заражать новорожденных телят.	Образцы крови, молозива и молока; экстракция сыворотки из образцов молока; выделение ДНК; вложенная ПЦР; иммуноферментный анализ (ELISA); секвенирование ПЦР-продуктов; анализ данных.	Отбор образцов крови, молозива и молока; экстракция сыворотки из образцов молока; выделение ДНК; вложенная ПЦР; иммуноферментный анализ (ELISA); секвенирование ПЦР-продуктов; анализ данных.	Шесть из семи коров дали положительный результат на BLV с помощью ELISA, а пять из семи коров были положительными с помощью ПЦР в день отела. При рождении ни у одного из телят не было антител к BLV; они были получены в результате потребления молозива и присутствовали в течение остальных дней оценки (15, 30, 45). Два из семи телят были положительными при молекулярном обнаружении ДНК провирусного гена epl на 15-й день, а один теленок был положительным на 30-й день. Это первое сообщение о присутствии ДНК BLV в образцах молозива у голштинских коров из колумбийских стад. Полученные результаты подтверждают, что молозиво является потенциальным средством вертикальной передачи инфекции BLV.	https://doi.org/10.29393/СНЖАА537-19РВСА50019
11	B. Bojarojć-Nosowicz, E. Kaczmarszyk	2006	Poland	Определение взаимосвязи между полиморфизмом лейкоцитарной кислой фосфатазы крови, инфекцией BLV, количеством соматических клеток и составом молока в I триместре лактации.	65 коров черно-пестрой породы в возрасте 3-6 лет из лейкозного стада.	Выделение ДНК и постановка ПЦР; подсчет соматических клеток; определение физико-химических показателей молока и микробиологических тесты; статистический анализ данных.	Полученные результаты свидетельствуют о связи природной BLV-инфекции с нарушением секреции молочной железы у коров, тогда как связь с полиморфизмом кислой фосфатазы не выражена. Полученные результаты побуждают к продолжению изучения роли лейкоцитарной кислой фосфатазы крови в патогенезе мастита.	https://doi.org/10.5194/aab-49-17-2006

1	2	3	4	5	6	7	8	9
12	S. E. Gutiérrez, G. L. Dolcini, G. H. Arroyo, C. R. Dubra, J. F. Ferrer, E. N. Esteban	2001	Argentina	Разработка ИФА для выявления антител к BLV, сопоставимого с анализом радиоиммунопреципитации (RIP), оценка использования этого метода для идентификации стад, инфицированных BLV, разработка ПЦР для прямой диагностики BLV.	КРС голштинской, джерсейской и гернейской пород.	Сбор образцов; серологические тесты; RIP анализ; метод ПЦР	Чувствительность и специфичность ИФА были сопоставимы с чувствительностью и специфичностью анализа RIP. Использование ИФА на объединенных образцах молока позволило идентифицировать стада, в которых распространена инфекция BLV среди лактирующих коров составляла всего 2,5%. Объединенные образцы молока из стад свободных от BLV, не реагировали на ИФА. Весь КРС, у которого были положительные результаты вложенной ПЦР, имел антитела к BLV, но КРС с неизменно низкими титрами антител требовал исследования последовательных образцов ДНК для выявления вирусных последовательностей. Ни у одного из 63 голов КРС с отрицательными антителами не было положительных результатов ПЦР.	https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.1571
13	D. Martin, A. Aijona I. Soto N. Barquero M. Viana Gómez-Lucía E.	2001	Spain	Сравнение прямых и непрямых методов диагностики BLV-инфицированных животных в двух стадах в Испании с разными значениями распространенности заболевания, для определения преимуществ и применимости диагностических методов. Сравнительная оценка ДНК, выделенной из моноцитов периферической крови или из лейкоцитов молока, в ПЦР-диагностике BLV.	Образцы были взяты на двух фермах в центральной Испании. Стадо с высокой серопозитивностью было обозначено как «А». Стадо с низкой серопозитивностью – «Ап». В стаде «А» была отобрана кровь (с и без антикоагулянта) у 17 животных и молоку у 15 из 17; в стаде «Ап» образцы крови с антикоагулянтами и без него отобраны от 15 животных, без отбора молока.	Отбор образцов сыворотки; выделение лейкоцитов; отбор образцов молока; фенольная экстракция ДНК; ПЦР; серологические тесты (иммуноферментный анализ и иммунодиффузия в агаровом геле (AGID)); статистический анализ	При выборе диагностического теста на BLV необходимо проанализировать преследуемую цель. В стадах с высокой серопревалентностью следует использовать высокоспецифичные тесты, такие как AGID, чтобы гарантировать, что животные, считающиеся положительными, действительно положительные, даже с риском получения ложноположительных результатов. Очевидно, что прямые вирусологические методы были бы лучше, но цена и простота выполнения серологических методов делают их более целесообразными при работе с большим количеством образцов. Напротив, в стадах с низкой серопревалентностью рекомендуется выбирать методы с высокой чувствительностью, такие как ПЦР, чтобы гарантировать, что все животные, считающиеся отрицательными, действительно отрицательные, даже с риском получения ложноположительных результатов. Эта рекомендация основана на том факте, что методы ПЦР позволяют выявлять животных, которые могут быть серонегативными, и, таким образом, могут не заметить некоторых инфицированных животных. Таким образом, серологические тесты и вирусологические тесты дополняют друг друга, даже если они представляют собой разные подходы, в которых исследуются два разных последствия вирусной инфекции, и поэтому их трудно сравнивать.	https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2001.100424.x

1	2	3	4	5	6	7	8	9
14	S. Meas, T. Usui, K. Ohashi, C. Sugimoto, M. Ohuma	2002	Japan	Изучить возможность передачи вируса BLV и вируса иммунодефицита (BIV) через молоко или молоко.	Образцы молока и молока были взяты у инфицированных матерей одновременно с забором крови у их потомства.	Отбор образцов крови, сыворотки, молока и молока и схема отбора пар мать–теленок; серологические тесты; анализ синцития; полимеразная цепная реакция для определения BVV и BLV	BVV может передаваться потомству внутриутробно, а BLV может передаваться через молоко или молоко, если самки инфицированы как BVV, так и BLV. Для предотвращения внутриутробной передачи доступен метод переноса эмбрионов, а для предотвращения передачи вирусов с молозивом или молоком их следует пастеризовать перед кормлением (56°C в течение 30 минут). Предоставлены дополнительные доказательства вертикальной передачи BVV и/или BVV, но еще предстоит изучить ряд потенциальных факторов инфицирования матери и плода, включая стадию материнской инфекции и вирусную нагрузку матери во время беременности.	https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00458-8
15	R. Felmer, G. Muñoz, J. Zúñiga, M. Recabal	2005	Chile	Оценка пригодности использования сборных образцов молока для изучения встречаемости различных вариантов BLV-вируса у естественно инфицированного КРС. Эта стратегия была оценена в регионе на юге Чили (IX регион), представляющем собой важный район производства молока в стране.	Отобраны образцы молока, представляющие вклад примерно 50 коров на стадо. Эти стада были хорошо распределены в регионе на юге Чили (IX регион), который представляет собой важную область производства молока в стране. 60 образцов молока были проанализированы с помощью прямого ИФА-теста (SVANOVIR, Швеция) в соответствии с инструкциями производителя. Из этих образцов 33 сильно серопозитивных и 10 серонегативных образцов молока были использованы для получения ДНК и проведения BLV-специфичной вложенной ПЦР.	Отбор проб и обнаружение антител к BLV; выделение ДНК; амплификация фрагмента еру BLV; титрование вируса RFLP; клонирование и секвенирование ДНК; анализ последовательности; филогенетический анализ	Во всех проанализированных серопозитивных образцах молока (43) амплифицировался ожидаемый фрагмент 444 п.н., соответствующий части гена еру BLV. Анализ RFLP выявил наличие двух из трех известных подгрупп вариантов вируса BLV в чилийских стадах (австралийская и бельгийская подгруппы).	https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.04.005

Источник биоматериала

В проанализированных исследованиях объектом работы в основном была кровь животных. Например, в недавних статьях японских авторов (Hiraoka et al., 2022; Nakanishi et al., 2022) кровь была необходима для проведения гематологических исследований, подкрепляющих основной этап работы, который базируется на профилях разных РНК малых внеклеточных везикул молока. Ранее в исследовании колумбийских авторов (Olaya-Galán et al., 2017) в дополнение к исследованиям на сыром молоке ДНК выделялась из сырой говядины. В некоторых исследованиях акцент был сделан на молозиво, как на объект для измерения провирусной нагрузки (Konishi et al., 2018; Meas et al., 2002; Úsuga-Monroy et al., 2021). Несмотря на разнообразие исследуемых матриц, важным аспектом проведения достоверных исследований по выявлению *BLV* является выборка животных.

Исследуемые выборки

Выборка животных является очень важным аспектом в проведении исследований, особенно в области научных исследований, связанных с биологическими и медицинскими проблемами. Она может оказать значительное влияние на результаты и выводы, сделанные на основе данных исследования. Наиболее значимые для нас результаты были получены на самых разных выборках изучаемых животных: от 3 (Yamada et al., 2013), 14 (Petersen et al., 2018; Úsuga-Monroy et al., 2021), 15 (Martin et al., 2001), 25 (Hiraoka et al., 2022), 30 (Nakanishi et al., 2022), 45 (Stobnicka-Kupiec et al., 2020), 50 (Olaya-Galán et al., 2017), 63 (Gutiérrez et al., 2001), 65 (Bojarójc-Nosowicz & Kaczmarczyk, 2006), 101 (Kuckleburg et al., 2003), 403 (Barzegar et al., 2021) голов КРС. Так как на производство молоко зачастую поступает в смешанном виде с совершенно разных хозяйств, наиболее важным запросом в молочной промышленности являются исследования, проведенные на сборном молоке (Felmer et al., 2005; Gutiérrez et al., 2001). Результаты и выводы, сделанные на основе данных исследования, могут значительно отличаться в зависимости от того, какая выборка была использована. Поэтому, для достижения достоверных результатов, необходимо тщательно подходить к выбору животных для исследования. В случае с молочной промышленностью, исследования на сборном молоке могут оказаться наиболее релевантными, так как это позволяет учесть влияние разных хозяйств на качество молока.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цель данного обзора предметного поля — анализ имеющихся подходов к детекции *BLV* методом ПЦР в молоке коров. Мы проанализировали 3688 документов и отобрали 15 статей, которые содержали качественную и количественную информацию о детекции вируса лейкоза КРС в молочных объектах. Основным тезисом всех отобранных в данном обзоре статей является тот факт, что *BLV* является серьезной проблемой для животноводства. Бычий лейкоз вызывает раковые опухоли и другие нарушения в организме крупного рогатого скота, что приводит к снижению их продуктивности и увеличению затрат на лечение и уход. Кроме того, не существует ни вакцины против инфекции *BLV*, ни лечения лейкоза КРС, что может привести к потере животных и значительному экономическому ущербу для фермеров.

Вопреки развитию молочной промышленности, основные способы производства остались неизменными. Несмотря на увеличение численности стад и увеличение количества вакцинаций и гормонального лечения, методы доения по-прежнему остаются исходными: ручное в случае небольших ферм и автоматизированное в случае агропромышленных комплексов. В то же время, развитие технологий привело к изменениям в методах содержания скота. Например, пастеризация молозива перед кормлением телят позволяет инактивировать вирус в нем и предотвратить последующую его передачу. При этом некоторые факторы риска, такие как контакт между животными и использование игл для забора крови, остаются значимыми.

Мы разделяем мнение ряда исследователей (Hiraoka et al., 2022; Nakanishi et al., 2022) о том, что молекулярно-генетические методы анализа, в частности ПЦР могут помочь развить новый уровень диагностики в животноводстве, предложивших как биомаркеры энзоотического лейкоза КРС некоторые матричные (Hiraoka et al., 2022) и микроРНК (Nakanishi et al., 2022). Гипотеза этих авторских коллективов заключалась в том, что поскольку лейкоз КРС фактически является раком крови у животных, то по аналогии с диагностикой рака у человека, РНК малых внеклеточных везикул молока могут отражать биологические реакции хозяина. Hiraoka et al. (2022) подчеркивают, что диагностика *BLV*, прогрессирования заболевания, обнаружение ДНК *BLV*, измерение числа копий *BLV* и тестирование на наличие антител, — все эти операции базируются на анализе крови.

Тогда как сбор крови у КРС является задачей времязатратной (это отдельная рабочая операция) и сложной (требуется специально обученный сотрудник). А сбор молока производится априори, поскольку молоко и высокие надои — конечная цель молочной фермы. Поэтому тестирование животных на *BLV* через экзосомы молока является перспективным, неинвазивным, безболезненным для коровы методом диагностики, который, по мнению Nakanishi et al. (2022), представляется возможным адаптировать и под мясной скот, и под коров в сухостойный период.

Единственным очевидным минусом данного метода является потребность в полноценно оснащенных исследовательских центрах, куда фермеры могли бы рутинно сдавать накопленные образцы молока от своего поголовья. Однако, на наш взгляд, им можно пренебречь, учитывая, что следующим этапом после разработки диагностических методов обычно идет их модернизация, в том числе с целью удешевления и упрощения. Так аргентинскими учеными была предложена схема недорогой количественной полимеразной цепной реакции, позволяющей высокочувствительно и специфично обнаруживать провирусную ДНК *BLV* в очищенных лейкоцитах периферической крови и в молочной матрице (Petersen et al., 2018).

Сугубо важным после аспектов правильной детекции вируса является понимание путей его распространения. Распространение вируса бычьего лейкоза происходит через горизонтальные и вертикальные пути передачи, бессимптомно. К горизонтальным путям переноса инфекции относятся, например, плохая санитария производства, прямой контакт больных и здоровых животных, ветеринарные мероприятия, проведенные с нарушением тех же санитарных правил. Мы находим, что теоретически их можно нивелировать повышением культуры производства и усилением контроля. Необходимость этого подчеркивается в работе Stobnicka-Kurpiec et al. (2020) по оценке потенциальной роли воздушного и поверхностного загрязнения в распространении вируса бычьего лейкоза и аденовируса.

Вертикальные пути переноса вируса, по нашему мнению, требуют большего внимания, а именно изучение перинатальной передачи вируса через кровь, трансплацентарное проникновение и постнатальный путь заражения через молозиво и молоко. В работе Konishi et al. (2018) исследование колебаний антител и провирусной нагрузки в молоке и молозиве, а также перифе-

рической крови инфицированных животных в период лактации для оценки защитных способностей антител молозива показал сильную защитную активность антител молозива против инфекции, обеспеченную антителом против gp51. Однако в другом исследовании (Úsuga-Monroy et al., 2021) была показана возможность передачи инфекции через молозиво новорожденным телятам, у которых не было антител к *BLV* в день отела. Анализируя и одни, и другие результаты, а также рекомендации по пастеризации молозива и молока при 65°C в течение 30 минут перед кормлением телят (Meas et al., 2002), нам кажется рациональным внедрение всех возможных мер предосторожности при работе с молодым поголовьем, от которого зависит благополучие всего производственного комплекса.

С развитием молекулярно-генетических методов исследования начал активно обсуждаться вопрос безопасности молока как источника инфицирования человека вирусом бычьего лейкоза. Внимание к данной теме было и остается связано с публикациями, анализирующими взаимосвязь рака молочной железы с присутствием *BLV* в женском организме (G. Buehring et al., 2001; G. C. Buehring et al., 2003). Опубликованные по настоящее время данные по вопросу инфицирования рассматриваемым вирусом человека являются противоречивыми. Часть ученых склоняется к тому, что вирус бычьего лейкоза может быть передан человеку различными путями (Buehring et al., 2014), другие это оспаривают (Zhang et al., 2016). Некоторые обоснованно замечают, что пищевые продукты могут быть источниками возбудителей пока не изученных заболеваний человека (Olaya-Galán et al., 2017).

В рамках данного обзора мы не смогли обнаружить публикации по исследованию молока и молочных продуктов, прошедших термическую обработку. Предположительно, данный факт связан с запретом реализации молока от лейкозных коров и исследованиями, которые показывают безопасность пастеризованного молока из-за инактивации вируса. Мы бы хотели отметить тот факт, что эффективность пастеризации зависит от таких переменных, как температура, время выдержки и состав исследуемого продукта, так как, не смотря на инактивацию, денатурация ДНК провируса *BLV* может не произойти (Sandoval-Monzón et al., 2021). Таким образом, наше исследование подтверждает необходимость дальнейшей проработки элементов контроля продуктов молочной промышленности для обеспечения насе-

Е.Г. Лазарева, О.Ю. Фоменко

ления гарантированно безопасными продуктами питания. Мы считаем, что ранее широкое распространение исследований по молекулярно-генетической детекции BLV в молоке и молочных продуктах было ограничено рядом технических условий. Например, не было методов, адаптированных под молочные системы, прошедшие технологическую обработку.

Важно отметить тот факт, что в ранее описанных работах по выявлению следов вируса бычьего лейкоза у человека не были детализированы рационы питания исследованных пациентов. Не смотря на положительные или отрицательные результаты проведенных исследований, трудно их интерпретировать с точки зрения безопасности употребляемых продуктов животного происхождения. Вопрос корреляции BLV и рака молочной железы изучается в странах, где в основном рационе человека присутствуют продукты животного происхождения, а именно получаемые от КРС. Преобладающее количество исследований проведены в США (12), далее идут такие страны, как Австралия (3), Австралия (3), Бразилия (3) и Колумбия (3). Следовательно, данная зависимость подтверждает актуальность проведения мониторинга продуктов животноводства для оценки наличия и провирусной нагрузки BLV.

ВЫВОДЫ

В рамках обзора предметного поля была проанализирована литература по диагностике вируса бычьего лейкоза у КРС в молоке с применением молекулярно-генетических методов анализа. Проверив 3688 публикаций, мы сделали вывод, что данная тема редко изучается с точки зрения безопасности молока и молочных продуктов. При этом был выявлен ряд направлений, обусловленных стремлением нивелировать распространение BLV среди мясного и молочного скота. Хотя все

представленные эмпирические статьи содержат хорошее теоретическое обоснование проведения исследований, наша работа впервые сосредоточена на молоке, как на объекте серологических и молекулярно-генетических методов детекции BLV, из-за чего мы обнаружили ряд важных пробелов. Чтобы полностью понять воздействие BLV на молочную промышленность и ее потребителей, необходимы более всесторонние исследования. Мы считаем, что результаты исследований молока на наличие BLV покажут эффективность существующих технологических этапов обработки молока для обеспечения его безопасности. Несмотря на это, полученные результаты указывают на необходимость улучшения научной базы и ужесточения контроля за распространением экономически вредного заболевания инфекционной природы, потенциально прямо или опосредованно опасного для человека. Данная статья может послужить толчком к пересмотру критериев безопасности молока и молочных продуктов. Применение метода ПЦР позволит оперативно провести оценку молока и продуктов его переработки. Для расширения критериев безопасности и разработки единой методологии оценки молока и молочных продуктов необходимо провести дополнительные исследования для определения ограничений, при которых продукт можно считать безопасным.

ВКЛАД АВТОРОВ:

Екатерина Лазарева: концептуализация, разработка методологии исследования, работа с программным обеспечением, визуализация, проведение исследования, написание-рецензирование и редактирование рукописи.

Олег Фоменко: курирование данных, написание — подготовка черновика рукописи, проведение исследования, написание-рецензирование и редактирование рукописи.

REFERENCE

- Ahmed, M., Sami, E., Elhasen Abdalla, M., Israa, M., Hussein, E. A., Isam, M., & Khalid, A. (2019). Molecular detection of Bovine Leukemia Virus (BLV) in patients with breast cancer in Khartoum state, Sudan. *SAJ Cancer Science*, 6(1), Article 105.
- AL-Saffar, A. M. (2022). Validating the preeminence of biochemical properties of camel over cow and goat milk during the Covid-19. *Food Science and Nutrition*, 10(8), 2786–2793. <https://doi.org/10.1002/FSN3.2881>
- Alabbody, H. H. K. (2018). Bovine leukosis and the possibility to cause cancer in humans: A scientific review. *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*, 42(1), 52–60. <https://doi.org/10.30539/iraqijvm.v42i1.31>
- Barzegar, H., Mirshahabi, H., Motamed, N., Yavarmansh, M., Poor, B. M., Moaddab, S. R., & Asgharzadeh, M. (2021). Identification of bovine leukemia virus in raw milk samples

- in north-west of Iran. *Veterinary Research Forum*, 12(2), 223-227. <https://doi.org/10.30466/vrf.2019.102686.2446>
- Bojarojć-Nosowicz, B., & Kaczmarczyk, E. (2006). Somatic cell count and chemical composition of milk in naturally BLV-infected cows with different phenotypes of blood leukocyte acid phosphatase. *Archives Animal Breeding*, 49(1), 17–28. <https://doi.org/10.5194/aab-49-17-2006>
- Buehring, G. C. (2017). Response to “Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients.” *Breast Cancer Research*, 19(1), Article 24. <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0808-7>
- Buehring, G. C., Philpott, S. M., & Choi, K. Y. (2003). Humans have antibodies reactive with Bovine Leukemia Virus. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 19(12), 1105-1113. <https://doi.org/10.1089/088922203771881202>
- Buehring, G. C., Shen, H. M., Jensen, H. M., Jin, D. L., Hudes, M., & Block, G. (2015). Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: A case-control study. *PLoS One*, 10(9), e0134304. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0134304>
- Buehring, G. C., Shen, H. M., Jensen, H. M., Yeon Choi, K., Sun, D., & Nuovo, G. (2014). Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. *Emerging Infectious Diseases*, 20(5), 772-782. <https://doi.org/10.3201/eid2005.131298>
- Buehring, G., Choi, K., & Jensen, H. (2001). Bovine leukemia virus in human breast tissues. *Breast Cancer Research*, 3(51), Article A14. <https://doi.org/10.1186/bcr338>
- Donnik, I. M., Gulyukin, M. I., Busol, V. A., Kovalenko, L. V., & Kovalenko, A. M. (2021). Bovine leukemia virus infection — Diagnostics, eradication, and anthrozoonotic potential (background). *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*, 56(2), 230-244. <https://doi.org/10.15389/AGROBIOLOGY.2021.2.230RUS>
- Donskaya, G. A., Krekker, L. G., Drozhzhin, V. M., & Kolosova, E. V. (2022). Lipid peroxidation and milk heat treatment to prepare fermented milk product of mixed fermentation. *Bulletin of KSAU*, 5, 226–233. <https://doi.org/10.36718/1819-4036-2022-5-226-233>
- Felmer, R., Muñoz, G., Zúñiga, J., & Recabal, M. (2005). Molecular analysis of a 444 bp fragment of the bovine leukaemia virus gp51 env gene reveals a high frequency of non-silent point mutations and suggests the presence of two subgroups of BLV in Chile. *Veterinary Microbiology*, 108(1–2), 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.04.005>
- Galstyan, A. G., Radaeva, I. A., Chervetsov, V. V., Turovskaya, S. N., Illarionova, E. E., & Petrov, A. N. (2015). Improvement of the canned milk products quality to the application of the pasteurized raw milk. *Dairy Industry*, 5, 42–44.
- Gutiérrez, S. E., Dolcini, G. L., Arroyo, G. H., Dubra, C. R., Ferrer, J. F., & Esteban, E. N. (2001). Development and evaluation of a highly sensitive and specific blocking enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction assay for diagnosis of bovine leukemia virus infection in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 62(10), 1571-1577. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.1571>
- Hiraoka, M., Takashima, S., Wakihara, Y., Kamatari, Y. O., Shimizu, K., Okada, A., & Inoshima, Y. (2022). Identification of potential mRNA biomarkers in Milk Small Extracellular Vesicles of Enzootic Bovine Leukosis Cattle. *Viruses*, 14(5), 1022. <https://doi.org/10.3390/v14051022>
- Konishi, M., Ishizaki, H., Kameyama, K. I., Murakami, K., & Yamamoto, T. (2018). The effectiveness of colostrum antibodies for preventing bovine leukemia virus (BLV) infection in vitro. *BMC Veterinary Research*, 14(1), Article 419. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1724-5>
- Kuckleburg, C. J., Chase, C. C., Nelson, E. A., Marras, S. A. E., Dammen, M. A., & Christopher-Hennings, J. (2003). Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time polymerase chain reactions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 15(1), 72-76. <https://doi.org/10.1177/104063870301500117>
- Mack, C. (2012). How to write a good scientific paper: title, abstract, and keywords. *Journal of Micro/Nanolithography, MEMS, and MOEMS*, 11(2), 020101. <https://doi.org/10.1117/1.jmm.11.2.020101>
- Martin, D., Arjona, A., Soto, I., Barquero, N., Viana, M., & Gómez-Lucía, E. (2001). Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of bovine leukaemia virus. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 48(2), 97-106. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2001.00424.x>
- Meas, S., Usui, T., Ohashi, K., Sugimoto, C., & Onuma, M. (2002). Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds. *Veterinary Microbiology*, 84(3), 275-282. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00458-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00458-8)
- Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D. G., Altman, D., Antes, G., Atkins, D., Barbour, V., Barrowman, N., Berlin, J. A., Clark, J., Clarke, M., Cook, D., D'Amico, R., Deeks, J. J., Devereaux, P. J., Dickersin, K., Egger, M., Ernst, E., ... Tugwell, P. (2009). Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *Annals of Internal Medicine*, 151(4), 264-269. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-151-4-200908180-00135>
- Nakanishi, R., Takashima, S., Wakihara, Y., Kamatari, Y. O., Kitamura, Y., Shimizu, K., Okada, A., & Inoshima, Y. (2022). Comparing microRNA in milk small extracellular vesicles

Е.Г. Лазарева, О.Ю. Фоменко

- among healthy cattle and cattle at high risk for bovine leukemia virus transmission. *Journal of Dairy Science*, 105(6), 5370–5380. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20989>
- Nandi, J. S., Rathore, S. S., & Mathur, B. R. (2021). Transmission of infectious viruses in the natural setting at human-animal interface. *Current Research in Virological Science*, 2, 100008. <https://doi.org/10.1016/j.crviro.2021.100008>
- Nikbakht, G., Rabbani, M., Emam, M., & Rezatogfighi, E. (2010). Serological and genomic detection of bovine leukemia virus in human and cattle samples. *International Journal of Veterinary Research*, 4(4), 253-258.
- Olaya-Galán, N. N., Corredor-Figueroa, A. P., Guzmán-Garzón, T. C., Ríos-Hernandez, K. S., Salas-Cárdenas, S. P., Patarroyo, M. A., & Gutierrez, M. F. (2017). Bovine leukaemia virus DNA in fresh milk and raw beef for human consumption. *Epidemiology and Infection*, 145(15), 3125-3130. <https://doi.org/10.1017/S0950268817002229>
- Petersen, M. I., Alvarez, I., Trono, K. G., & Jaworski, J. P. (2018). Quantification of bovine leukemia virus proviral DNA using a low-cost real-time polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science*, 101(7), 6366–6374. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14253>
- Ruiz, V., Porta, N. G., Lomónaco, M., Trono, K., & Alvarez, I. (2018). Bovine Leukemia virus infection in neonatal calves. risk factors and control measures. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, Article 267. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00267>
- Sandoval-Monzón, R. S., Arévalo-Rodríguez, I. C. K., Carrillo-Torres, A. A., & Ruiz-García, L. F. (2021). Efficacy of physical and chemical treatments on the inactivation of bovine leukosis virus present in milk. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 10(1), 52-58. <https://doi.org/10.7774/cevr.2021.10.1.52>
- Schwingel, D., Andreolla, A. P., Erpen, L. M. S., Frandoloso, R., & Kreutz, L. C. (2019). Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil. *Scientific Reports*, 9(1), 2949. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39834-7>
- Stobnicka-Kupiec, A., Gołofit-Szymczak, M., Górný, R. L., & Cyprowski, M. (2020). Prevalence of Bovine Leukemia Virus (BLV) and Bovine Adenovirus (BAdV) genomes among air and surface samples in dairy production. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 17(6), 312-323. <https://doi.org/10.1080/15459624.2020.1742914>
- Turovskaya, S. N., Galstyan, A. G., Petrov, A. N., Radaeva, I. A., Illarionova, E. E., Semipyatniy, V. K., & Khurshudyan, S. A. (2018). Safety of canned milk as an integrated criterion of their technology effectiveness russian experience. *Food Systems*, 1(2), 29–54. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2018-1-2-29-54>
- Úsuga-Monroy, C., Díaz, F. J., Echeverri-Zuluaga, J., González-Herrera, L. G., & López-Herrera, A. (2021). Presence of bovine leukemia virus in colostrum samples and its potential to infect newborn calves. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences*, 37(2), 167-176. <https://doi.org/10.29393/CHJAAS37-19PBCA50019>
- Vafin, R. R., Gilmanov, K. K., Galstyan, A. G., Pryanichnikova, N. S., Bigaeva, A. V., Lazareva, E. G., & Kazakova, V. S. (2021). Technology of bovine leukemia virus genodiagnosics in cattle, in produced raw materials and products. *Series Chemistry and Technology*, 1, 119–125. <https://doi.org/10.32014/2021.2518-1491.15>
- Veziryan, V. A., Evdokimov, I. A., Veziryan, A. A., & Anisimov, S. V. (2015). Production of cheese according to the technology of separate pasteurization of milk mixture. *Cheesemaking and Buttermaking*, 1, 34–36.
- Yamada, T., Shigemura, H., Ishiguro, N., & Inoshima, Y. (2013). Cell Infectivity in Relation to Bovine Leukemia Virus gp51 and p24 in Bovine Milk Exosomes. *PLoS ONE*, 8(10), e77359. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077359>
- Yang, Y., Fan, W., Mao, Y., Yang, Z., Lu, G., Zhang, R., Zhang, H., Szeto, C., & Wang, C. (2016). Bovine leukemia virus infection in cattle of China: Association with reduced milk production and increased somatic cell score. *Journal of Dairy Science*, 99(5), 3688–3697. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10580>
- Zhang, R., Jiang, J., Sun, W., Zhang, J., Huang, K., Gu, X., Yang, Y., Xu, X., Shi, Y., & Wang, C. (2016). Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients. *Breast Cancer Research*, 18(1), Article 101. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0763-8>