

УДК 619:616.98:578.825.15-076:636.22/.28

Красочко П.П. — аспирант

Жук В.П. — магистр ветеринарных наук

Максимович В.В. — научный руководитель, доктор ветеринарных наук, профессор  
УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины»

## ПЦР-ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

### Резюме

*Проведен анализ литературы по принципам постановки полимеразной цепной реакции, приведены ее преимущества перед другим методами диагностики вирусных инфекций. Приведены результаты синтеза праймеров вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота и их специфичность*

### Summary

*Polymerase chain reaction literature was analyzed in this article. There were showed it's advantages in compare with standard methods of diagnostics viral infections. Results of synthesis of primers for IBR and there specificity were discussed*

### ВВЕДЕНИЕ

Проблема вирусных инфекций в современных условиях ведения животноводства является одной из самых острых и актуальных в ветеринарной медицине. Особое место среди вирусных заболеваний крупного рогатого скота занимает инфекционный ринотрахеит. Данное заболевание вызывается бычьим герпесвирусом первого типа (BHV-1), относящимся к семейству Herpesviridae, подсемейству Alphaherpesvirinae, роду Varicellovirus. К этому вирусу восприимчивы все половозрастные группы крупного рогатого скота, а клиническое проявление инфекции достаточно многообразно.

В зависимости от локализации патологического процесса различают несколько форм болезни — респираторную, конъюнктивитальную, нервную, генитальную, абортивную, кожную, стомальную, энтеральную.

В патологии крупного рогатого скота наибольшее распространение получили респираторная, генитальная, абортивная формы, которые и наносят большой экономический ущерб животноводству.

Респираторная форма заболевания наиболее часто встречается у молодняка, хотя могут поражаться и взрослые животные. Заболевание клинически проявляется повышением температуры тела, застойной гиперемией, воспалением слизистых оболочек носа, выделением вначале серозного, а затем слизисто-гнойного экссудата. При тяжелом течении ИРТ болезнь часто заканчивается гибелью животного.

Генитальная форма проявления ИРТ у коров протекает с признаками воспаления слизистой оболочки с последующей некротизацией эпителия с образованием пустул и язв. Ло-

кализация процесса во влагалище не всегда приводит к нарушению репродуктивной функции. Если же вирус проникает в более глубокие части полового аппарата, например, при осеменении инфицированной спермой, возникают цервициты, эндометриты, сальпингиты, оварииты, которые носят временный характер, хотя могут наблюдаться случаи продолжительного бесплодного периода, который выражается в многократных перегулах.

Генитальная форма у быков-производителей проявляется в виде баланопоститов, орхитов, а также рецидивирующим дерматитом (облысением, образованием струпов) промежности, вокруг ануса, иногда на хвосте, ягодичной области и мошонке. Инфицированная вирусом сперма может быть причиной эндометритов и бесплодия коров.

У стельных животных вирус ИРТ может вызывать гибель эмбриона, а на более поздних стадиях стельности — гибель плода и аборт или же рождение нежизнеспособных, гибнущих в первые сутки телят.

Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота распространен во всем мире. В связи со значительными экономическими потерями, связанными с лечением и профилактикой при данном заболевании, во многих странах были утверждены программы по оздоровлению поголовья и элиминации данного заболевания не только из отдельно взятых хозяйств, но и из страны целиком. Благодаря этим программам Австрия, Дания, Финляндия, Швеция, Швейцария, Италия (провинция Бользано) и Норвегия считаются благополучными по данному заболеванию.

В Республике Беларусь также зарегист-

рирован инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота. Ежегодно во всех областях выявляются случаи данного заболевания. Проведенные нами исследования показали, что противовирусные антитела выявляются в среднем у 30,7% обследованных животных, что свидетельствует о высокой степени инфицированности животных вирусом.

В настоящее время для постановки диагноза на данное заболевание используют выявление вируса или вирусного антигена в биологическом материале и выявление антител у больных или переболевших животных.

Материалом для выделения вируса или вирусного антигена служат экссудат из носа, влагалища, конъюнктивы, препуция, пораженные ткани респираторных органов, кишечника, а также кровь от больных животных.

Вирусовыделение из биологического материала от больных животных проводят на первично-трипсинизированных клетках почки эмбриона коровы (ПЭК), тестикул бычка (ТБ), перевиваемых клетках почки теленка (ПТ-80 или МДБК). Для вирусыведения проводят 3 слепых пассажа на культуре клеток и затем проводят идентификацию вируса в одной из иммунологических реакций: нейтрализации (РН), иммуноферментном анализе (ИФА), непрямой гемагглютинации (РНГА), торможения непрямой гемагглютинации (РНГА).

Выявление вирусного антигена осуществляют из биологического материала — мазков отпечатков из пораженных органов — трахеи, слизистой носовой полости, легких, почек, желудочно-кишечного тракта в в одной из иммунологических реакций: иммунофлуоресценции (МФА), иммуноферментном анализе (ИФА).

Серологическую диагностику проводят путем исследования сывороток крови, молока, молозива, носовых секретов на обнаружение специфических противовирусных антител. Для подтверждения диагноза обычно используют парные сыворотки крови, взятые от животных в начале заболевания и через 2—3 недели. Также исследуют и одинарные пробы крови. Но при этом необходимо учитывать следующее: наличие антител в сыворотках крови от телят до месячного возраста свидетельствует о состоянии колостральной защиты молодняка; наличие антител у телят старше 4—5-месячного возраста свидетельствует о наличии постинфекционных антител.

Наличие антител у взрослых животных в крови, молоке или молозиве свидетельствует о

циркуляции возбудителя в стаде и о степени инфицирования животных; наличие антител в носовых секретах свидетельствует о местной иммунной защите животных (у переболевших животных — о постинфекционном иммунитете, у вакцинированных животных — о наличии поствакцинальных антител).

Для выявления антител к вирусу инфекционного ринотрахеита используют следующие иммунологические реакции: нейтрализации (РН), иммуноферментный анализ (ИФА), непрямой гемагглютинации (РНГА), задержки гемагглютинации (РЗГА), связывания комплемента (РСК).

Приведенные выше методы диагностики имеют свои недостатки. Так, вирусыведение достаточно долгий и трудоемкий процесс и при проведении массовых исследований мало применим. Серологические же методы при их доступности, простоте и скорости постановки реакций, также имеют свои ограничения. В случае инфекционного ринотрахеита это связано со способностью вируса длительно персистировать в организме животного после переболевания. То есть, клинически здоровые животные являются вирусносителями и периодически выделяют вирус во внешнюю среду с экскрементами (носовые и влагалищные истечения, сперма, молоко) представляя угрозу для неинфицированного поголовья как источники возбудителя. При этом противовирусные антитела не регистрируются серологическими методами.

Развитие молекулярной биологии позволило решить данную проблему используя полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Принцип метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) был разработан Кэрри Мюллисом в 1983 году. Открытие ПЦР стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние 20 лет. За разработку ПЦР-анализа К.Мюллис в 1993 году был удостоен Нобелевской премии в области химии. Появление метода ПЦР было обусловлено определенными достижениями в области молекулярной генетики, прежде всего расшифровкой нуклеотидной последовательности геномов ряда микроорганизмов.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - метод амплификации ДНК *in vitro*, с помощью которого в течение нескольких часов можно выделить и размножить определенную последовательность ДНК в миллиарды раз. Возможность получения огромного количества копий одного строго определённого участка генома значительно упрощает исследование имеюще-

гося образца ДНК. В основе метода ПЦР лежит природный процесс - комплементарное достраивание ДНК матрицы, осуществляемое с помощью фермента ДНК-полимеразы. Эта реакция носит название репликации ДНК.

Преимуществами метода ПЦР как метода диагностики инфекционных заболеваний являются:

1. Прямое определение наличия возбудителей. Многие традиционные методы диагностики, например иммуноферментный анализ, выявляют белки-маркеры, являющиеся продуктами жизнедеятельности инфекционных агентов, что дает лишь опосредованное свидетельство наличия инфекции. Выявление специфического участка ДНК возбудителя методом ПЦР дает прямое указание на присутствие возбудителя инфекции.

2. Высокая специфичность. Высокая специфичность метода ПЦР обусловлена тем, что в исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для данного возбудителя фрагмент ДНК. Специфичность задается нуклеотидной последовательностью праймеров, что исключает возможность получения ложных результатов, в отличие от метода иммуноферментного анализа, где нередко ошибки в связи с перекрестно-реагирующими антигенами.

3. Высокая чувствительность. Метод ПЦР позволяет выявлять даже единичные клетки бактерий или вирусов. ПЦР-диагностика обнаруживает наличие возбудителей инфекционных заболеваний в тех случаях, когда другими методами (иммунологическими, бактериологическими, микроскопическими) это сделать невозможно. В течение нескольких часов с помощью ПЦР из одного фрагмента молекулы ДНК можно получить более 50 млрд. идентичных молекул. Таким образом, можно изучить генетический материал, присутствующий в крошечных количествах. Чувствительность ПЦР-анализа составляет 10-100 клеток в пробе (чувствительность иммунологических и микроскопических тестов - 1000-100000 клеток).

4. Универсальность процедуры выявления различных возбудителей. Материалом для исследования методом ПЦР служит ДНК возбудителя. Метод основан на выявлении фрагмента ДНК или РНК, являющегося специфичным для конкретного организма. Сходство химического состава всех нуклеиновых кислот позволяет применять унифицирован-

ные методы проведения лабораторных исследований. Это дает возможность диагностировать несколько возбудителей из одной биопробы. В качестве исследуемого материала могут использоваться различные биологические выделения (слизь, моча, мокрота), соскобы эпителиальных клеток, кровь, сыворотка.

5. Высокая скорость получения результата анализа. Для проведения ПЦР-анализа не требуется выделение и выращивание культуры возбудителя (как культуральные методы), что занимает большое количество времени. Унифицированный метод обработки биоматериала и детекции продуктов реакции, и автоматизация процесса амплификации дают возможность провести полный анализ за 4-4,5 часа.

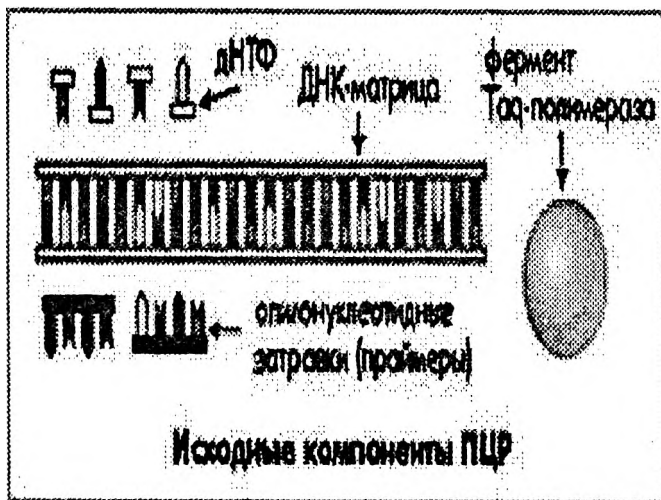
6. Возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций. Особенно эффективен метод ПЦР для диагностики трудно культивируемых, некультивируемых и персистирующих форм микроорганизмов, с которыми часто приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях, поскольку этот метод позволяет избежать сложностей, связанных с выращиванием таких микроорганизмов в лабораторных условиях. Применение ПЦР-диагностики также очень эффективно в отношении возбудителей с высокой антигенной изменчивостью и внутриклеточных паразитов.

Следует отметить, что методом ПЦР возможно выявление возбудителей не только в клиническом материале, полученном от животных, но и в материале, получаемом из объектов внешней среды (вода, почва и т.д.). Преимуществом является, то, что при хранении и транспортировке материала в лабораторию не требуется сохранение возбудителя в живом виде в отличие от других бактериологических и вирусологических методов.

Однако существуют и ограничения при проведении ПЦР. Это связано с тем, что амплифицируется ДНК как живого, так и погибшего микроорганизма. Это налагает определенные ограничения при использовании ПЦР для контроля эффективности лечения. В общем случае подобный контроль должен проводиться спустя промежуток времени, в течение которого происходит полная элиминация возбудителя. Обычно этот интервал составляет 4-8 недель. Кроме того, возможна перекрестная реакция, так как подбор праймеров происходит на основе существующих знаний о геноме данного и сходных микроорганизмов. Теоретически существует возможность присутствия тако-

го же фрагмента и у других микроорганизмов, геном которых в настоящее время не расшифрован, и которые не были протестированы на возможность перекрестной реакции. Присутствие в пробе таких микроорганизмов может привести к ложноположительному результату анализа. Также на ход реакции влияет изменчивость микроорганизмов. Хотя при конструировании тест-системы фрагмент генома, используемый для амплификации, выбирается из высоко консервативной области, изменчивость микроорганизмов может приводить к тому, что некоторые генотипы или штаммы исследуемого возбудителя могут приобретать мутации в амплифицируемом участке генома, и, таким образом, становиться неуловимыми данной тест-системой.

Для постановки ПЦР требуются следующие компоненты (Схема 1):



ных цепей ДНК).

- Фермент Taq-полимераза термостабильная ДНК-полимераза, катализирующая удлинение цепей праймеров путем последовательного присоединения нуклеотидных оснований к растущей цепи синтезируемой ДНК).

- Буферный раствор (реакционная среда, содержащая ионы  $Mg^{2+}$ , необходимые для поддержания активности фермента).

Амплификация является основным этапом постановки ПЦР. Каждый цикл амплификации включает 3 этапа, протекающих в различных температурных режимах (Схема 2).

**1 этап: Денатурация ДНК** (расплетение двойной спирали). Протекает при  $93-95^{\circ}C$  в течение 30-40 сек.

**2 этап: Присоединение праймеров (отжиг).** Присоединение праймеров происходит комплементарно к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК на границах специфического участка. Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига, значения которой располагаются в интервале  $50-65^{\circ}C$ . Время отжига - 20-60 сек.

**3 этап: Достаивание цепей ДНК.** Комплементарное достаивание цепей ДНК происходит от 5'-конца к 3'-концу цепи в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (дНТФ). Процесс синтеза катализируется ферментом термостабильной ДНК-полимеразой (Taq-полимеразой) и проходит при температуре  $70-72^{\circ}C$ . Время протекания синтеза - 20-40 сек.

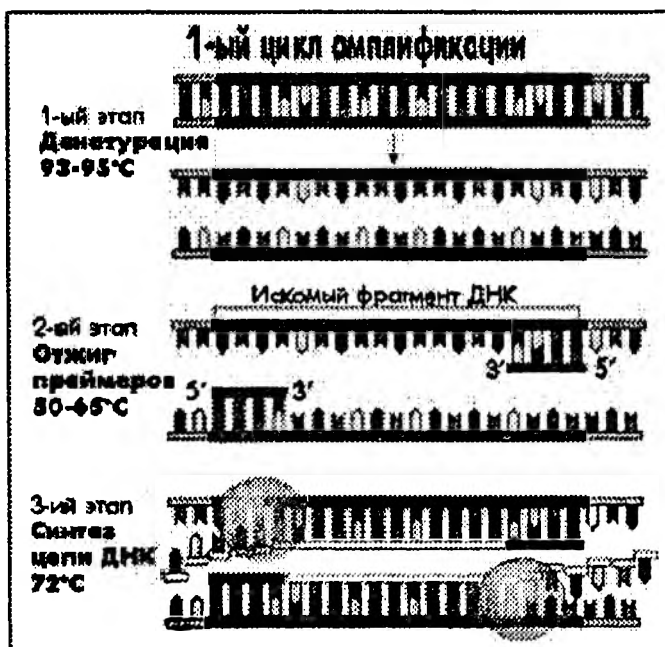


Схема 2 — Принцип 1 цикла амплификации

Схема 1 — Компоненты при постановке ПЦР

- ДНК-матрица (ДНК или ее часть, содержащая искомым специфический фрагмент);

- Праймеры (синтетические олигонуклеотиды (20-30 нуклеотидных пар), комплементарные последовательностям ДНК на границах определяемого специфического фрагмента). Конструирование праймеров является важнейшим этапом при разработке тест-системы и осуществляется на основе имеющихся расшифрованных геномов различных организмов. Амплифицируемый фрагмент должен находиться в высококонсервативной области генома организма, а также быть специфичным только для данного вида возбудителя и не встречаться в геномах других организмов. Это необходимо для избежания ложноположительных результатов.

- Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) (смесь четырех дНТФ, являющихся материалом для синтеза новых комплементар-

Образовавшиеся в первом цикле амплификации новые цепи ДНК служат матрицами для второго цикла амплификации, в котором происходит образование искомого специфического фрагмента ДНК (ампликона). (схема 3). В последующих циклах амплификации ампликоны служат матрицей для синтеза новых цепей. Таким образом происходит накопление ампликонов в растворе по формуле  $2^n$ , где  $n$ -число циклов амплификации. Поэтому, даже если в исходном растворе первоначально находилась только одна двухцепочечная молекула ДНК, то за 30-40 циклов в растворе накапливается около  $10^8$  молекул ампликона. Этого количества достаточно для достоверной визуальной детекции этого фрагмента методом электрофореза в агарозном геле. Процесс амплификации проводится в специальном программируемом термостате (амплификаторе), который по заданной программе автоматически осуществляет смену температур согласно числу циклов амплификации.

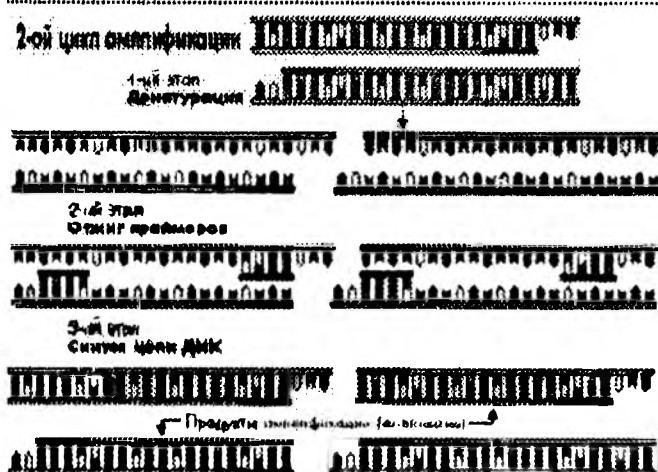


Схема 3 — Принцип 2 цикла амплификации

Заключительным этапом постановки ПЦР является детекция продуктов амплификации. В большинстве методик на данном этапе проводится разделение смеси продуктов амплификации, полученной на 2-ой стадии, методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. До проведения электрофоретического разделения, к амплификационной смеси добавляется раствор бромистого этидия, образующий с двухцепочечными фрагментами ДНК прочные соединения внедрения. Эти соединения под действием УФ-облучения способны флуоресцировать, что регистрируется в виде оранжево-красных светящихся полос после электрофоретического разделения амплификационной смеси в агарозном геле.

В качестве альтернативы электрофоретическому методу детекции, имеющему некото-

рые недостатки: субъективность чтения результатов, ограничения по определению ДНК различных микроорганизмов в одной реакции, могут быть предложены гибридационные схемы детекции. В этих схемах образующийся в результате амплификации фрагмент ДНК гибридизуется (образует 2-х цепочечные комплексы - "гибриды") со специфическим олигонуклеотидным зондом. Регистрация таких комплексов может быть проведена колориметрически или флуориметрически.

Благодаря международной программе по изучению генома бычьего герпесвируса (BHV-1) был расшифрован геном возбудителя инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Это дало возможность определить высококонсервативные области генома вируса и проводить подбор праймеров для разработки тест-систем на основе ПЦР.

Основными мишенями для амплификации были избраны участки генома, отвечающие за кодирование гликопротеинов вируса и тимидинкиназы. Так в своей работе по подбору праймеров специфичных BHV-1 M. Fuchs et al. (1999) использовали участок кодирующий гликопротеин B, R.S. Kataria et al. (1997) гликопротеин C, L.H. Wagter et al. (1996), J. Zhou et al. (1999) гликопротеин D, M. Fuchs et al. (1999) гликопротеин E, M. Wiedmann et al. (1993), S. Vilcek et al. (1994), G. Santurde et al. (1996), B.P. Sreenivasa et al. (1996) гликопротеин I, J.Q. Xia et al. (1995), C.V. Yason et al. (1995) тимидинкиназу. Разработанные учеными методики проведения полимеразной цепной реакции показали высокую чувствительность и специфичность по сравнению с традиционными методами диагностики.

Нами была протестирована тест-система для выявления вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота разработанная А.Г. Готовым с соавт. (ГНУ ИЭВСидВ). Для определения специфичности тест-системы использовали вакцинные штаммы вируса ТК-А и КМИЭВ-6, используемые в Республике Беларусь. В качестве положительного контроля использовали штамм Орегон. Результаты приведены на рисунке 1.

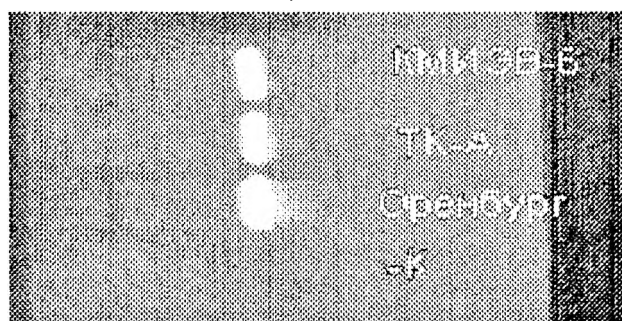


Рисунок 1 — Амплификация различных штаммов вируса инфекционного ринотрахеита



Тест-система показала высокую специфичность к исследуемому возбудителю заболевания. В доступной литературе отсутствуют данные о разработке и использовании ПЦР для диагностики инфекционного ринотрахеита крупного

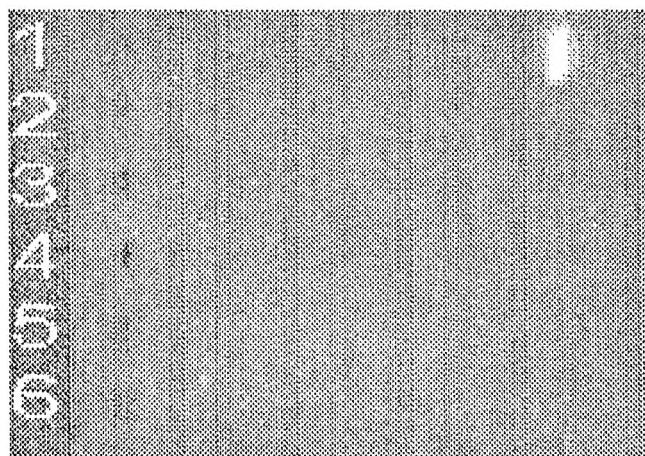
рогатого скота в Республике Беларусь. В этой связи нами были подобраны 5 пар праймеров к различным участкам генома вируса (табл. 1) и поставлены реакции для определения их специфичности.

Таблица 1 — Области-мишени генома вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота и подобранные к ним последовательности праймеров

№ п/п	Кодируемый гликопротеин/ фермент	Последовательность праймеров
1	Гликопротеин D	Sense GCGAACATGCAAGGGCCGACAT Antisense TAATCAGTCCCAGCTCGTCGTCCG
2	Гликопротеин B	Sense GGACAGCGTCGTCATCTACG Antisense GAAGAAGCGCGAGTTTTCC
3	Гликопротеин C	Sense TAGCCAGTGGCGGTGCAGGTGTAGT Antisense TTTCGCGCACGTCCGTCCTTAC
4	Гликопротеин E	Sense CTGCTGCTGCCGAGTTATTGCTTT Antisense TACAGGAAGTACACGCCGCCGT
5	Тимидинкиназа	Sense TCTCCGCGTCGTGCGTATCTACCTG Antisense TTGATCTCGCGGAGGCAGTAGC

В качестве исследуемого образца использовали вакцинный штамм вируса инфекционного ринотрахеита КМИЭВ-6.

В результате проведенной реакции установили, что пара праймеров, подобранных к участку гена, кодирующего гликопротеин D, является специфичной для данного возбудителя (рис.2).



Дорожка 1 – 5 продукты амплификации вируса ИРТ штамма КМИЭВ-6 с различными парами праймеров соответственно таблице 1, дорожка 6 – отрицательный контроль

Рисунок 2 — Электрофореграмма продуктов амплификации

Таким образом, применение полимеразной цепной реакции представляет собой новый этап в развитии диагностики инфекционных заболеваний животных. Благодаря высокой специфичности, чувствительности, скорости постановки она превосходит существующие методы диагностики и позволяет более полно отразить эпизоотическую ситуацию.

Проведенные нами исследования подтверждают высокую специфичность используемого метода диагностики. Разработанная пара праймеров к гену гликопротеина D является специфичной для вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Болезни сельскохозяйственных животных / Под ред. П.А.Красочко// Минск., „Бизнесофсет”, 2005. – 800 с.
2. Готов, А.Г. Обнаружение последовательностей бычьего герпесвируса первого типа гибридизацией с биотинилированным ДНК-зондом / А.Г. Готов, В.И. Семенихин, С.Ф. Орешкова [и др.] // Тезисы докладов 111 всесоюзной конференции по эпизоотологии (Новосибирск, 24-26 сентября 1991г.)/ ВАСХ-

- НИЛ РАСХН ИЭВСиДВ.- Новосибирск, 1991.- С. 222.
3. Глотов, А.Г. Обнаружение ДНК вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в сперме клинически здоровых быков-производителей методом молекулярной гибридизации / А.Г. Глотов // *Методология мероприятий по профилактике и ликвидации болезней сельскохозяйственных животных.* – Новосибирск, 1995. – С. 172-177.
  4. Глотов, А.Г. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота / А.Г. Глотов [и др.] // РАСХН, Сиб. отд-ние, ГНУ ИЭВСиДВ. – Новосибирск, 2006. – 196 с.
  5. Говорун, В.М. Новые направления в ДНК-диагностике / В.М. Говорун // *Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний: Материалы 2-й Всероссийской науч.-практ. конф. (Москва, 20-22 января 1998г.).* – Москва, 1998. – С. 12-13.
  6. Гусева, Е.В. Применение ПЦР в диагностике инфекционных болезней сельскохозяйственных животных / Е.В. Гусева [и др.] // *Науч. основы технологии пром. производства вет. биол. препаратов. Тез. докл. 5-й Всероссийской конф. (Щелково, 14-17 мая).* – Щелково, 1996. – С. 38 – 40.
  7. Инфекционная патология животных: в 2 т / под ред. А.Я. Самуйленко, Б.В.Соловьева, Е.А.Непоклонова, Е.С.Воронина – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – Т.1 – 2006.- 911 с.
  8. Морозов И.А. Дифференциация штаммов вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота с помощью рестрикционного анализа / И.А. Морозов [и др.] // *Мол. генет., микробиол. и вирус.* – 1991. - №4. – С. 64 – 67.
  9. Панин, А.Н. Полимеразная цепная реакция – необходимый инструмент для идентификации и типирования возбудителей инфекционных болезней животных / А.Н. Панин[и др.] // *Состояние, проблемы и перспективы развития ветеринарной науки в России. Сборник матер. науч. сессии РАСХН (к 100-лет. юбилею ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко).* – Москва, 1998. – С. 313 – 315.
  10. Belak, S. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology / S. Belak, A. Ballagi-Pordany // *Vet. Res. Commun.*- 1993.- Vol. 17. – P. 55-72.
  11. Bitsch, V. Persistence of infection with infectious bovine rhinotracheitis virus in Danish cattle herds / V. Bitsch // *Nord. Veter. Med.* – 1978. – Vol. 30, № 4 - 5. - P. 178 – 185.
  12. Engels, M. Comparison of the genomes of infections bovine rhinotracheitis and infections pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis / M. Engels, F. Steck, R. Wyler // *Arch. Virol.* – 1981. – Vol. 67, №2. P. – 169 – 174.
  13. Fuchs, M. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild – type virus and virus lacking glycoprotein E / M. Fuchs, P. Hubert, J. Detterer et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 1999. – Aug. Vol. 37, №8. – P. 2498 – 2507.
  14. Gupta, P.K. Cloning and expression of bovine herpesvirus – 1 glycoprotein C / P.K. Gupta, M. Saini, L.K. Gupta et al. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* – 1999. – Vol.47 (№2). – P. 275-282.
  15. OIE Manual, Manual of Standarts// Chapter 2.3.5. 2000.
  16. Rocha, M.A. A high sensitivity – nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls / M.A. Rocha, E.F. Barbosa, S.E. Guimaraes et al. // *Vet. Microbiol.* – 1998. – Aug. 28, Vol. 63, №1. – P. 1 – 11.
  17. Roizman, B. Family Herpesviridae. / B. Roizman, R.S. Desrosier, B. Fleckenstein / In: Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A. and Summers M.d. (Editors), *Virus Taxonomy, 6<sup>th</sup> Rep. Of the Int. Commitee on Taxonomy of viruses.* Arch. Virol., Suppl. 10, Springer-Verlag, Wien, New-York, 1995. - P. 114 - 127.
  18. Ros, C. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine, and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification / C. Ros, S. Belak // *J. Clin. Microbiol.*- 1999. – Vol.37 (№5). – P. 1247 – 1253.
  19. Vilcek, S. Detection of the bovine herpesvirus-1 (BHV-1) genome by PCR / S. Vilcek // *J. Virol. Methods.* – 1993. - Feb. Vol. 41, № 2. – P. 245 – 247.
  20. Vilcek, S. Rapid detection of bovine herpesvirus – 1 (BHV-1) using the polymerase chain reaction / S. Vilcek, P.F. Nettleton, J.A. Herring et al. // *J. Vet. Microbiol.* – 1994 в. - Sep. Vol. 42, №1. – P. 53 – 64.
  21. Zhou, J. Improved detection of bovine herpesvirus – 1 in artificially infected bovine semen by protein amplification / J. Zhou, J. Lyaku, R.A. Fredrickson // *J. Virol. Methods.* – 1999. – May. Vol. 79, №2. – P. 181 – 189.