

**Conclusions and prospects for further research:**

*It has been established that in the case of double subcutaneous administration, the inactivated vaccine against contagious agalactia of sheep and goats (NSC "IECVM") provides 100% protection for susceptible animals from clinical manifestations of the disease and is harmless, areactogenic, characterized by immunogenic and protective properties equal to the vaccine, produced in Romania, and can be recommended for further implementation.*

**Key words:** *mycoplasma, contagious agalactia, sheep, goats, inactivated vaccine*

**REFERENCES**

1. Madant A., Zendulkova D. & Pospisil Z. (2001) Contagious agalactia of sheep and goats. Review. *Acta Vet Brno.*, 7., 403-412 [in English].
2. Bergonier D., Leori G., Sautini E. et al. (1998) Contagious agalactia in France: epidemiological situation and control strategies. *Mycoplasma of Ruminants: pathogenesis, diagnostics, epidemiology and molecular genetics. J.Eds.Eur.*, 2., 102-105 [in English].
3. Cokrevski S., Crcev D., Loria G.R. et al (2001) Outbreaks of contagious agalactia in small ruminants in the Republic of Macedonia. *Vet.Rec.*, 5, 148 [in English].
4. Autu C.N., Alacan E., Jalcin B.C. et al. (1990) *Sheep and goats diseases and breeding*. Instambul, Turkey [in English].
5. Glushkov A.A. & Sydorhuk A.A. (2004) Infekcionnaja agalaktija ovec i koz [Infectious agalactia of sheep and goats]. *Mikoplazmy i mikoplazmozy sel's'kohozjajstvennyh zhivotnyh.– Mycoplasma and mycoplasmosis of farm animals.*, S.110-121 [in Russian].
6. Mare J. & Jhon C. (1998) Contagious agalactia of sheep and goats. *Foreing Animal Diseases. Richmond.VA: USA AHA.*, 147-153 [in English].
7. Potoc'kij M.K. (2004) Infekcijna agalaktija ovec' i kiz [Infectious agalactia of sheep and goats]. *Veterinarna medicina Ukraїni.– Veterinary Medicine of Ukraine.*, 9., 23-25 [in Ukrainian].

**УДК 57.043;578.71**

**СТЕГНІЙ М.Ю.**, канд. біол. наук, доцент

**СТЕГНІЙ Б.Т.**, док. вет. наук, професор, академік НААН

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» м. Харків*

## **ВИКОРИСТАННЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ВІРУСУ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ У БІОТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА ЛЕЙКОЗНОГО ДІАГНОСТИКУМУ**

*Розроблено спосіб кріоконсервування (FLK-SBBL), який включає поетапне заморожування, на першому етапі впродовж години за температури плюс чотири градуси за Цельсієм, на другому етапі: в парах рідкого азоту впродовж 18 годин з наступним занурюванням у рідкий азот; суміш поживних середовищ DMEM і 199 (1:1) (70 %), з сироваткою крові ВРХ (20 %) та діметиду (10 %). Розроблений спосіб кріоконсервування (FLK-SBBL) дозволяє зберігати на вихідному рівні антигенпродукуючу та віруспродукуючу активність штамів FLK-BLV за довготривалого зберігання в умовах кріобанку ННЦ «ІЕКВМ». За допомогою електронно-мікроскопічних досліджень встановлено, що максимальна кількість продукції вірусу лейкозу відбувалася з п'ятої по сьому доби культивування після розморожування (FLK-SBBL)*

**Ключові слова.** *лейкозний антиген, FLK-BLV, кріоконсервування.*

Вступ Вірус лейкозу великої рогатої худоби відноситься до родини *Retroviridae*, підродина *Oncornaviridae*, роду *Deltaretovirus* за останню класифікацією 2000 року [1]. Ретровіруси проникають в клітину, РНК звільняється і перетворюється в ДНК-копію, яка вбудовується як провірус в ДНК клітини хазяїна. Вбудований в геном хазяїна провірус залишається не досяжним для впливу специфічних антитіл в організмі впродовж всього життя тварин.

Для практики ветеринарної медицини велике значення має ефективна діагностика лейкозу великої рогатої худоби (ВРХ). Це хронічне злякисне інфекційне захворювання, при якому інтеграція збудника в організм сприйнятливих тварин зумовлює довічну персистенцію, наносить величезних економічних збитків. Важливим фактором запобігання розповсюдження вірусу лейкозу великої рогатої худоби (ВЛВРХ) є проведення реакції імунодифузії (РІД). Цей серологічний метод, прийнятий Міжнародним епізоотологічним бюро (МЕБ) – основний в програмах профілактики та ліквідації лейкозу КРС (BLV) ще й тому що рівень преципітуючих антитіл до глікопротеїну gp51 в організмі корів досягає РІД-позитивного через 1-3 тижні після інфікування.

В роботах [Vander Maaten, 1974] було показано, що вірус лейкозу ВРХ може розмножуватися у тканинах селезінки, нирки, легень ембріонів вівці та корів. Крім того було встановлено [2], що чутливими до ВЛВРХ є культури первиннотрипсинізованих клітин тимусу (ТЕК), селезінки (СЕК), легень (ЛЕК) ембріонів корів. Доведено [2], що поліпептидний антиген р24 накопичувався в культуральній рідині вище перелічених культур клітин у високій концентрації починаючи з 6 і до 12 пасажу, у той час як глікопротеїдний антиген gp51 – з першого по 3 пасажі. Первинні, чутливі до ВЛВРХ моношарові культури клітин можна використовувати для підтримання вірусу, що вилучений з лейкоцитами із крові інфікованих тварин впродовж декількох пасажів, також у якості тест-культур на синцитіютворення для індикації інфекційного ВЛВРХ в біологічних матеріалах.

ВЛВРХ репродукується в перещеплюваних хронічно інфікованих культурах клітин різних видів тварин. Найбільше розповсюдження отримала перещеплювана лінія клітин FLK-BLV, яку одержав в 1974 р. Van der Maaten шляхом сокультивування ембріональних клітин нирки вівці з лімфоцитами лейкозної корови. В даний час отримані і широко використовуються перещеплювані хронічно інфіковані ВЛВРХ лінії клітин: фібробласти легень ембріона корови (АІД-15), нирки ембріона корови (НЕК); нирки ембріона вівці (FLK-BLV); легень ембріона летючої миші (Т61-Lu); легень макаки-резус (BLV-Simian); селезінки вівці (FLS, J-1228); тимуса ембріона корови (ТЕК-МВА-766 LmTT).

Найбільш чутливими до зараження ВЛВРХ в процесі сокультивування із лейкоцитами інфікованих корів виявилися перещеплювані культури клітин ЛЕК та MDBK (нирка ембріона корови) [3]. Однак, спостерігалася тенденція щодо зниження продукції вірусу і його антигенів до третього пасажу в клітинах MDBK та до сьомого - в ЛЕК (до негативної в РІД). Відсутність експресії ВЛВРХ в організмі інфікованих тварин обумовила необхідність розробки систем культивування вірусу *in vitro*. Таким чином, були отримані хронічно інфіковані ВЛВРХ культури клітин FLK-BLV (fetal lamb kidney - bovine leukemia virus).

Необхідним елементом у постановці РІД залишається застосування лейкозного антигену, продуцент якого – перещеплювана культура клітин FLK-BLV. Культура була отримана в 1976 році VanderMaaten в США з роз'якшеної ембріональної нирки вівці (fetal lamb kidney), культивованої в моношарі [4]. Після чого в культуру FLK було інокульовано лейкоцити від тварин, хворих на вірусну лімфосаркому [21]. Підвищення виходу вірусу лейкозу ВРХ та його антигенів, які виробляються в культурі клітин FLK-BLV, є першочерговим завданням у викоріненні цього захворювання. Успіхи в розробці тест-систем для виявлення антитіл до gp51 ВЛВРХ у РІД пов'язані з властивостями цієї культури клітин продукувати крім віріонів зовнішній глікопротеїд, як розчинний антиген [5]. За результатами

клонування FLK-BLV було отримано декілька клонів [6], що відрізнялися за рівнем продукції вірусу та його антигенів.

**Мета роботи.** Визначити антигенпродукуючу активність віруспродукуючої культури клітин FLK-BLV за довготривалого зберігання її в умовах кріобанку «Колекції збудників інфекційних хвороб тварин», яку розпорядженням кабінету міністрів від 28.08.2014 року віднесено до об'єктів Національного надбання.

**Матеріал і методи досліджень.** Для вивчення антигенпродукуючої біологічної активності перещеплюваної культури FLK-BLV штаму FLK-SBBL за довготривалого зберігання в умовах кріобанку Національної Колекції патогенів ННЦ «ІЕКВМ» - розморожування штаму FLK-SBBL з кріобанку ННЦ «ІЕКВМ» здійснювали за допомогою водяної бані за температури (35–37)°С. Потім було проведено її ресуспендування в ростовому середовищі та висів у концентрації 180 тис. клітин/см<sup>3</sup> з наступним вирощуванням в культуральних посудинах ємністю 1500 см<sup>3</sup> з використанням ростових середовищ наступного складу: суміші поживних середовищ DMEM та 199 (1:1) з додаванням 10 % сироватки крові великої рогатої худоби (ВРХ), за температури (37±0,5)<sup>0</sup>С.

Зі збірної проби культуральної рідини була проведена очистка та концентрування вірусу лейкозу на ультрафільтраційних модулях з порожнистими волокнами. Оцінку антигену ВЛВРХ здійснювали за активністю в РІД та кількісним виходом доз антигену з 1 дм<sup>3</sup> вірус-культуральної рідини. Для чого сконцентрований антиген було ресуспендувано у фосфатно-сольовому фізіологічному розчині з рН 7,0 - 7,2.

Активність антигену була оцінена за серологічним методом граничних розведень в РІД з використанням контрольної позитивної діагностичної сироватки з «Набору компонентів сухих для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії (РІД)» за ТУУ 24.4. – 00497087-647-2002.

Постановку реакції і облік результатів було проведено згідно «Листівки-вкладки до набору компонентів для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії» (№ 3272-14-0525-04/08-1/0 від 18.03.08) у 2 повторах на чашках Петрі з використанням прямокутного штампю.

Для визначення кінцевого титру антигену готували послідовні розведення його експериментальних серій від нативного до 1:6. В якості розчинника антигенів було використано фосфатно-сольовий фізіологічний розчин з рН 7,0 - 7,2. Компоненти реакції були внесені у лунки агару в об'ємі 40 мкл. Позитивним титром антигену вважали розведення, за якого в РІД спостерігали чітку лінію преципітації з позитивною контрольною сироваткою на два ++. З метою порівняння активності отриманих антигенів підраховували кінцевий вихід антигену з 1 дм<sup>3</sup> культуральної рідини. Для цього користувалися терміном «робочий титр антигену», за який вважали таке розведення антигену, при якому позитивна реакція з позитивною сироваткою була на ++++.

Для розрахунку кінцевого виходу антигену за 1 дм<sup>3</sup> культуральної рідини (X) використовували формулу (1.1):

$$X = \frac{V_1 \times CAI \times T}{V_2}$$

× 100, (1.1)

де X – кількість отриманого антигену з 1 дм<sup>3</sup> культуральної рідини, тис. доз;  
V<sub>1</sub> – об'єм фактично отриманого антигену, см<sup>3</sup>;

[A] – ступінь концентрації отриманого антигену;

T – робочий титр отриманого антигену;

$V_2$  – об'єм культуральної рідини, використаний для виготовлення антигену;

100 – коефіцієнт для перерахунку в тис. доз.

Статистичну обробку результатів досліджень, середньостатистичних значень (M), стандартного відхилення середнього (m) і ступеню достовірності (p) проводили за методом Стьюдента – Фішера.

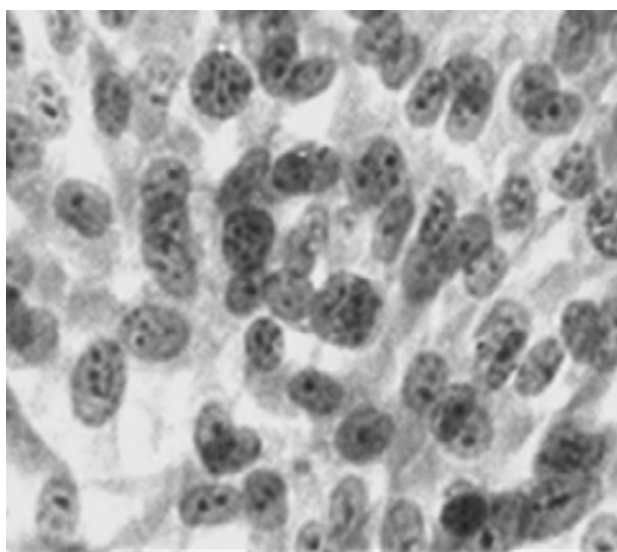
Електронно-мікроскопічні дослідження були проведені на базі Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за методом ультратонких зрізів через 24; 48; 96; 120; 240 годин культивування після розморожування [7].

**Результати досліджень та їх обговорення.** Перещеплювана культура клітин фолікулярної лімфоми ембріональної нирки вівці FLK-BLV штами (FLK-SBBL; FLK-71) складається з фібробластоподібних клітин з округлими ядрами; ріст клітин нерівномірний, ядра мають від 2-х до 7-ми дрібних ядерць різноманітної форми; цитоплазма дрібносітчаста. Реплікація вірусу лейкозу не супроводжується руйнуванням моношару клітин (Рис.1).

Геном вірусу існує в двох формах: геномної одноланцюгової РНК або у вигляді ДНК, що синтезована на геномній РНК, як на матриці та інтегрована в хромосому клітини-хазяїна у вигляді провірусу. Геномна РНК є тільки в зрілих віріонах.

Розроблений нами спосіб кріоконсервування (FLK-SBBL) включає поетапне заморожування, на першому етапі впродовж години за температури плюс чотири, на другому етапі в парах рідкого азоту впродовж 18 годин з наступним зануренням у рідкий азот; суміш поживних середовищ DMEM і 199 (1:1) (70 %), з сироваткою крові ВРХ (20 %) та діметилсульфоксиду (10 %) [8; 9].

Життєздатність клітин після розморожування була на рівні 90 % (за методом фарбування трипановим синім); культура відновлює мітотичну активність через 2-3 пасажі. При дотриманні оптимальних умов культивування, хронічно інфікована клітинна лінія (FLK-SBBL) була здатна забезпечити репродукцію вірусу протягом тривалого часу (понад 40-45 пасажів) після розморожування (термін спостереження).



**Рис.1 - Вірусспродукуюча культура клітин FLK-BLV на 3-му пасажі культивування після розморожування. Інструментальне збільшення  $\times 90$ .**

Дослідження показали, що тривалість збереження за умов рідкого азоту (мінус 196)°С хронічно інфікованого штаму (FLK- SBBL) від 4 місяців до 10 років не впливала на продукцію ВЛВРХ після його розморожування та культивування, титри лейкозного антигену, його вихід та об'єм (Табл.1) з першого по п'ятнадцятий пасажі культивування.

Штам (FLK- 71) забезпечив репродукцію вірусу протягом понад (40-43) пасажів після розморожування (термін спостереження) та зберігання в умовах (мінус 196)°С кріобанку ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (Табл.1).

Тривалість збереження за умов рідкого азоту (мінус 196)°С хронічно інфікованого штаму (FLK - 71) від 12 років 11 місяців до 16 років 7 місяців не впливала на продукцію ВЛВРХ після його розморожування та наступного культивування. Максимальний вихід антигену (3,00 тис. доз в 1 дм<sup>3</sup>) та максимальні його титри спостерігали з 10 по 18 пасажі культивування (FLK – 71). Штаму (FLK - 71) для підвищення титру лейкозного антигену було необхідно більше часу для відновлення після розморожування, але з 10 по 18 пасажі культивування значно підвищувався робочий титр та вихід антигену в 1 дм<sup>3</sup>.

Штам (FLK-SBBL) стабільно виповнював моношар на другу добу культивування після розморожування і з 1 по 10 пасажі та з 10 по 15 пасажі культивування вихід та титр антигену був однаковим.

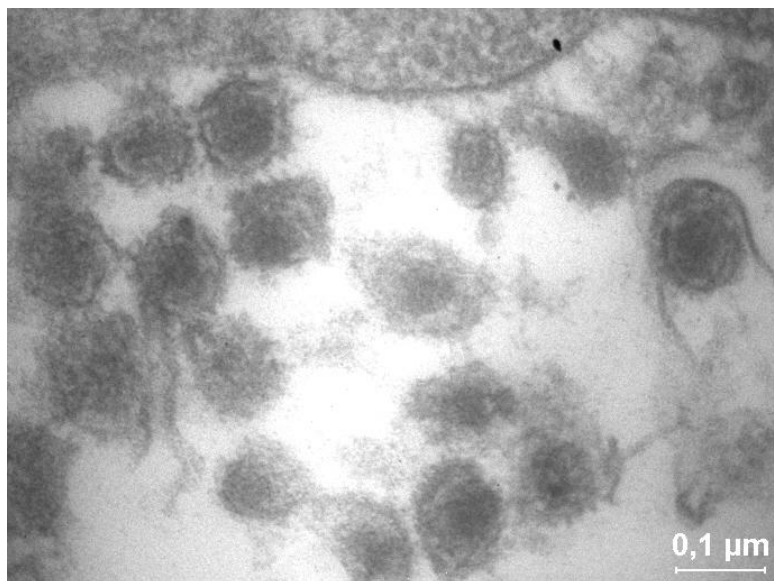
Електронно-мікроскопічні дослідження динаміки репродукції вірусу лейкозу штамом (FLK- SBBL) за методом ультратонких зрізів показали наявність зрілих віріонів ВЛ у міжклітинному просторі починаючи з третьої – п'ятої доби культивування після розморожування. Найбільший вихід вірусу при наявності цілих клітин перещеплюваної культури (FLK- SBBL) спостерігали на сьому добу культивування після розморожування (Рис. 2).

Таким чином, за допомогою електронно-мікроскопічних досліджень було встановлено, що максимальна кількість продукції вірусу лейкозу відбувалася з п'ятої по сьому добу культивування після розморожування (FLK- SBBL) (Рис. 3).

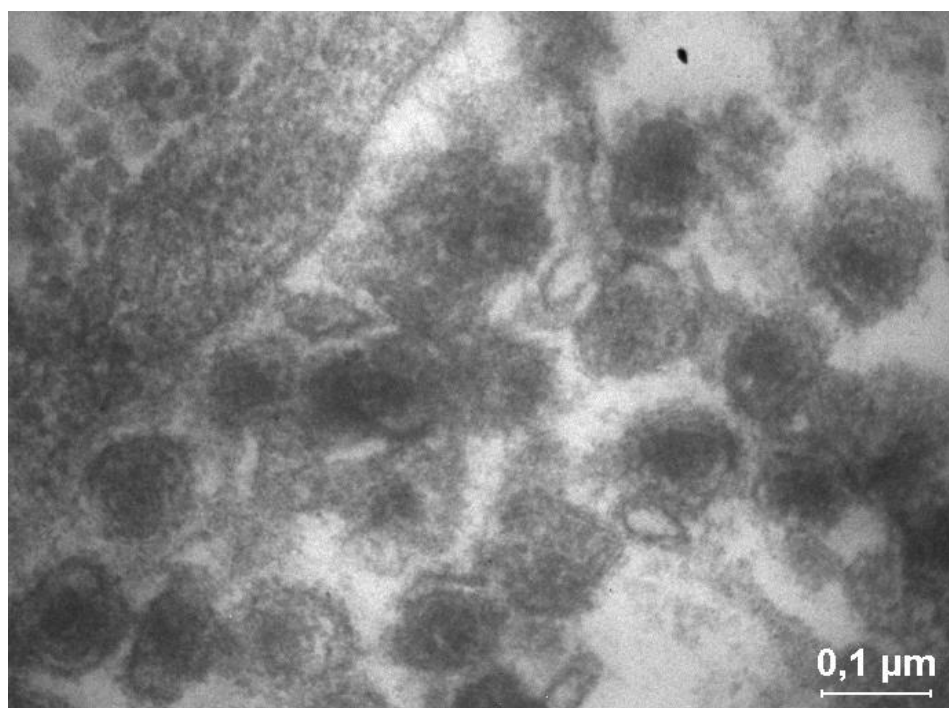
Таблиця 1

**Активність антигенів, отриманих в процесі культивування штамів (FLK-SBBL) та (FLK-71) у реакції імунодифузії (РІД)**

Штами FLK-BLV	Титр антигену в РІД	Робочий титр	Об'єм фактично отриманого антигену, см <sup>3</sup>	Вихід антигену, тис. доз в 1 дм <sup>3</sup>
FLK-SBBL 1 по 10 пасажі і 10 по 15 пас.	1:1,5 +++++ 1:2 +++++ 1:2,5 +++ 1:3 ++	1:2	50	2,00
FLK-71 1 по 10 пасажі	1:1,5 +++++ 1:2 +++	1:1,5	50	1,50
FLK-71 10 по 18 пас	1:2 +++++ 1:3 +++++	1:3	280	3,00
FLK-71 18 по 35 пас	1:1,5 +++++ 1:2 +++++ 1:2,5 +++++	1:2,5	690	2,50



**Рис. 2 – Електронограма продукції вірусу лейкозу штамом (FLK- SBBL) на сьому добу культивування**



**Рис. 3 – Електронограма продукції вірусу лейкозу штамом (FLK- SBBL) на шосту добу культивування.**

**Висновки та перспективи подальших досліджень.**

1. Розроблено спосіб кріоконсервування (FLK-SBBL), якій включає поетапне заморожування, на першому етапі впродовж години за температури плюс чотири градуси за Цельсієм, на другому етапі: в парах рідкого азоту впродовж 18 годин з наступним занурюванням у рідкий азот; суміш поживних середовищ DMEM і 199 (1:1) (70 %), з сироваткою крові ВРХ (20 %) та діметилсульфоксиду (10 %).

2. Розроблений спосіб криоконсервування (FLK-SBBL) дозволяє зберігати на вихідному рівні антигенпродукуючу та віруспродукуючу активність штамів FLK-BLV за довготривалого зберігання в умовах криобанку ННЦ «ІЕКВМ».

3. За допомогою електронно-мікроскопічних досліджень встановлено, що максимальна кількість продукції вірусу лейкозу відбувалася з п'ятої по сьому добу культивування після розморожування (FLK-SBBL).

Актуальність збереження антигенпродукуючої та віруспродукуючої активності штамів FLK-BLV, як основного продуценту лейкозного антигену для діагностики лейкозу ВРХ ставить на часи розробку методів підвищення продукції вірусу лейкозу та його антигенів штамми (FLK-BLV).

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses / M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, R. B. Wickner // Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. – San Diego : Academic Press, 2000. – 1167 p.

2. Животная клетка в культуре. Методы и применение в биотехнологии / под общ. ред. проф. Л. П. Дьяконова. – Москва : Спутник+, 2009. – С. 470–484.

3. Михалева Е. А. Сравнительная характеристика различных лабораторных систем культивирования вируса лейкоза крупного рогатого скота : дис... канд. биол. наук / Е. А. Михалева ; ВИЭВ. – Москва, 1987. – 183 с.

4. Vander Maaten M. J. Replication of bovine leukemia virus in monolayer cell culture / M. J. Vander Maaten, J. M. Miller // Bibliotheca haematologica. – 1976. – Vol. 43. – P. 360–362.

5. Bovine lymphosarcoma: processing of bovine leukemia virus-coded proteins / R. Z. Mamoun, T. Astier, B. Guillermain, J. F. Duplan // The Journal of general virology. – 1983. – Vol. 64, iss. 12. – P. 2791–2795.

6. Altaner C. Zajac Isolation and characterization of cell clones producing various amounts of bovine leucosis virus / C. Altaner, J. Van // Folia biologica. – 1985 – Vol. 31, iss. 2 – P. 107–114.

7. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / Б. Уикли; пер.с англ. И. В. Викторова. – Москва: Мир, 1975. – 336 с.

8. Декларац. пат. № u201011052 Україна, МПК А01N 1/02 (2006.01). Спосіб криоконсервування штаму перещеплюваних клітин нирки вівці FLK-SBBL, який продукує вірус лейкозу великої рогатої худоби / Б. Т. Стегній, М. Ю. Стегній, В. І. Стеценко; заявник і правласник Нац. наук. центр «Ін-т експерим. і клініч. вет. медицини». – № 60996; заявл. 14.09.2010; опубл. 11.07.2011, Бюл. № 13. – 4 с.

9. Стегній М. Ю. Криоконсервування штаму перещеплюваних клітин нирки вівці FLK-SBBL, який продукує вірус лейкозу великої рогатої худоби / М. Ю. Стегній, Б. Т. Стегній, А. М. Гольцев // Проблемы криобиологии. – 2012. – Т. 22, № 3. – С. 254.

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ЛЕЙКОЗНОГО ДИАГНОСТИКУМА/ СТЕГНИЙ М.Ю., СТЕГНИЙ Б.Т.

*Разработан способ криоконсервирования (FLK-SBBL), который включает поэтапное замораживание, на первом этапе в течение часа при температуре плюс четыре градуса Цельсия, на втором этапе: в парах жидкого азота в течение 18 часов с последующим погружением в жидкий азот; смесь питательных сред DMEM и 199 (1:1) (70 %), с сывороткой крови КРС (20 %) и димексида (10 %). Разработанный способ криоконсервирования (FLK-SBBL) позволяет сохранить на исходном уровне антигенпродуцирующую и вируспродуцирующую активность штаммов FLK-BLV при*



долгосрочном сохранении в условиях криобанка ННЦ «ІЕКВМ». С помощью электронно-микроскопических исследований установлено, что максимальная продукция вируса лейкоза происходила с пятых по седьмые сутки культивирования после размораживания (FLK-SBBL).

**Ключевые слова:** лейкозный антиген, (FLK-BLV), криоконсервирование, ультраструктура.

## APPLYING THE CRYOPRESERVATION OF BOVINE LEUCOSIS VIRUS IN BIOTECHNOLOGY OF PRODUCTION LEUKEMIA ANTIGEN / Stegnyy M.Yu, Stegnyy B.T.

**Introduction.** At the same time industrial strains serve as the raw materials for manufacturing of diagnostic antigens. In this case the basic regimens for such strains are preservation of their antigenic activity.

**The goal of the work.** The aim of our work was to study antigen production activity cell culture (FLK-BLV) during their low temperature  $-196^{\circ}\text{C}$  storage National Collection virus strains of infectious animal disease.

**Materials and methods.** The research object was the replication of bovine leukemia virus in monolayer cell culture (FLK-SBBL) and (FLK-71) strains. Electron microscopy was performed in the samples which were stored from 4 months up to 16 years and 7 months at low (liquid nitrogen temperature  $-196^{\circ}\text{C}$ ).

**Results and discussion.** Electron microscopy was performed in the samples which were stored from 4 months up to 16 years and 7 months at low (liquid nitrogen temperatures  $-196^{\circ}\text{C}$ ) showed the presence of the bovine leukemia viruses on 5-7 days after thawing of the samples and antigen production virus activity was not reduced.

**Conclusion.** Cryopreservation cell culture (FLK-BLV) during their low temperature  $-196^{\circ}\text{C}$  storage National Collection virus strains of infectious animal disease antigen production virus activity was not reduced.

**Key words:** leukemia antigen, (FLK-BLV), cryopreservation, ultrastructure.

## REFERENS

1. Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L. et al. (2009) Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses. *Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. – San Diego: Academic Press [in English].
2. D'jakonov L. P. (2009) Zhivotnaja kletka v kul'ture (Metody i primenienie v biotekhnologii) [The animal cell in culture. Methods and applications in biotechnology]. – M.: Izdatel'stvo «Sputnik+», pp. 470 – 484 [in Russian].
3. Mihaleva E.A. (1987) Sravnitel'naja harakteristika razlichnyh laboratornyh sistem kul'tivirovaniya virusa lejkoza krupnogo rogatogo skota [Comparative characteristics of various laboratory systems for the cultivation of bovine leukemia virus]. *Candidate's thesis*. Moscow [in Russian].
4. Vander Maaten M.J. & Miller J.M. (1976) Replication of bovine leukemia virus in monolayer cell culture. *Bibl. Haematol.* 43, 360-362 [in English].
5. Mamoun R.Z., Astier T., Guillermain B. & Duplan J.F. Bovine lymphosarcoma: processing of bovine leukemia virus-coded proteins. *J Gen. Virol.* v. 64, 12, 2791-2795 [in English].
6. Altaner C., Ban J. (1985) Zajac Isolation and characterization of cell clones producing various amounts of bovine leucosis virus. *Folia boil.* 31, 2, 107 – 114 [in English].
7. Uikli B. (1972) *Jelektronnaja mikroskopija dlja nachinajushchih [Electron microscopy for beginners]*. M.: Myr [in Russian].
8. Stegnyy B. T., Stegnyy M. Ju., Stecenko V. I. (2011) Deklaracijnij patent na vinahid № 60996 Ukraïna, MPK A01N 1/02 (2006.01). Sposib kriokonservuvannja shtamu pereshhepljuvanih klitin nirki vivci FLK-SBBL, jakij produkue virus lejkozu velikoï rogatoï hudobi [The method of cryopreservation of the strain of transplanted kidney cells of the sheep FLK-SBBL, which produces a leukosis virus of bovine], BJul. № 13. [in Ukrainian]
9. Stegnyy M. Ju., Stegnyy B. T., Gol'cev A. M (2012) Kriokonservuvannja shtamu pereshhepljuvanih klitin nirki vivci FLK-SBBL, jakij produkue virus lejkozu velikoï rogatoï hudobi [Cryopreservation of the strain of transfused kidney cells in the female FLK-SBBL, which produces a leukosis virus of bovine livestock]. *Problemy kriobiologii*. Vol. 22, 3., 254 [in Ukrainian].