

УДК 619: 616.1: 616-07

**Кісера Я.В.**, д.вет.н., професор ©*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*

## СЕРОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

*У статті проведена оцінка серологічних методів діагностики лейкозу великої рогатої худоби в умовах її експериментального інфікування та визначені зміни морфологічних показників крові після інфікування.*

**Ключові слова:** *велика рогата худоба, лейкоз, реакція імунодифузії, імуноферментний аналіз, полімеразна ланцюгова реакція, кров, сироватка крові, лейкоцити, лімфоцити.*

**Вступ.** Основою профілактичних та оздоровчих заходів за лейкозу великої рогатої худоби є своєчасна прижиттєва діагностика із застосуванням чутливих методів виявлення інфікованих тварин. Доведення вірусної етіології захворювання зумовило розробку та впровадження в практику сучасних методів діагностики [6, 7], в основі яких лежить дослідження сироватки крові з метою виявлення специфічних антитіл, що сприяє виявленню інфікованих тварин на ранній стадії захворювання.

На сучасному етапі основними методами діагностики лейкозу великої рогатої худоби є серологічний – реакція імунодифузії (РІД) та імуноферментний аналіз (ІФА) [2, 3, 4, 5, 10], які ґрунтуються на виявленні специфічних антитіл до антигену вірусу лейкозу великої рогатої худоби і молекулярно-генетичний – полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Суть її полягає в виділенні в досліджуваній пробі провірусної ДНК і наступна ампліфікація специфічної ділянки ДНК вірусу лейкозу великої рогатої худоби з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів і синтезу комплементарних ланцюгів ДНК за допомогою ферменту Таq-полімерази. Метод високочутливий, але наявні певні обмеження у використанні, які пов'язані з дороговизною обладнання і діагностичних наборів та дотримання особливих умов проведення діагностичної процедури [1, 8, 9].

**Матеріал і методи.** Дослідження проведені на великій рогатій худобі чорно-рябої породи 12-місячного віку, середньою живою масою 200 кг. У досліді були задіяні 15 тварин, які були розділені на дві групи – контрольну і дослідну. У контрольній групі було п'ять тварин. Тваринам дослідної групи (10 голів) введено кров в дозі 1 мл від гематологічно хворої на лейкоз корови (23,6 Г/л лейкоцитів за 81% лімфоцитів). Кров донора вводили підшкірно у ділянці середньої третини шиї. Експеримент тривав 6 місяців. Матеріал для досліджень відбирали щомісячно.

Серологічні та гематологічні дослідження на лейкоз проводили згідно з "Методическими указаниями по диагностике лейкоза крупного рогатого скота", затвердженими в 1985 році. Наявність інфекції вірусу лейкозу встановлювали виявленням специфічних антитіл за допомогою реакції імунодифузії в агаровому гелі з лейкозним антигеном та імуноферментного аналізу. РІД проводили з використанням компонентів комерційного "Набору для діагностики лейкозу великої рогатої худоби методом РІД" виробництва Інституту епізоотології НААН у стандартній постановці. Облік результатів реакції здійснювали через 48 і 72 годин після візуалізації специфічної преципітуючої лінії. Для постановки ІФА використовували імуноферментну тест-систему для детекції анти-gp51антитіл у сироватці крові великої рогатої худоби фірми IDEXX виробництва США. Діагностичну процедуру виконували згідно інструкції, що додавалась до тест-системи.

Статистичну обробку отриманих даних та оцінку вірогідності проводили за параметричним критерієм Фішера-Стьюдента з використанням ІВМ-сумісного комп'ютера.

**Результати дослідження.** Одержані результати серологічних досліджень на експериментально інфікованих вірусом лейкозу тварин показали неоднакову чутливість ІФА і РІД (табл. 1).

Як видно з таблиці 1, метод імуноферментного аналізу є більш чутливим та ефективним порівняно з реакцією імунодифузії. Так, після 1-го місяця інфікування методом ІФА отримали 80%, а з другого – 100% позитивних результатів, у той час як методом РІД одержано в 1-й місяць 100% негативних результатів, на другий місяць – 50% позитивних результатів, і лише з 3-го місяця інфікування спостерігається 100% виявлення інфікованих тварин.

Таблиця 1

**Порівняння чутливості серологічних реакцій (ІФА, РІД) в інфікованій вірусом лейкозу великої рогатої худоби**

Кількість тварин	ІФА						РІД					
	Після інфікування						Після інфікування					
	1 міс.	2 міс.	3 міс.	4 міс.	5 міс.	6 міс.	1 міс.	2 міс.	3 міс.	4 міс.	5 міс.	6 міс.
1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
3	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
8	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

Проведені гематологічні дослідження (табл. 2, 3) засвідчили однотипність змін у перші два місяці після інфікування як у клінічно здорової, так і інфікованої вірусом лейкозу великої рогатої худоби. Зокрема, спостерігається зниження гематокриту (у здорових – з  $36,02 \pm 1,05$  до

32,06±1,32%, в інфікованих – із 34,50±0,44 до 32,12±0,57), лейкоцитів (у здорових – з 6,20±0,76 до 4,60±0,42 Г/л, а інфікованих – із 6,50±0,40 до 4,84±0,57 Г/л) і гемоглобіну (у здорових – із 102,25±2,38 до 99,83±3,97 г/л, в інфікованих з 108,06±1,18 до 98,06±1,40 г/л). Починаючи з третього місяця інфікування, проявляються відмінності в цих показниках. Так, кількість сегментоядерних нейтрофілів (10,0±0,85%), еозинофілів (1,5±0,17%) в інфікованих тварин знижується, тоді як вміст лімфоцитів (81,5±0,94) підвищується порівняно з контрольною групою тварин (відповідно 22,5±1,06, 4,5±0,44, 64,5±1,30%). Абсолютний та відсотковий вміст інших клітин гранулоцитарного ряду в процесі експерименту змін не зазнають.

Таблиця 2

**Морфологічні показники крові клінічно здорової великої рогатої худоби (M ± m, n = 5)**

Назва показників	Одиниця виміру	Тварини віком 12 місяців	Вік у місяцях							
			13	14	15	16	17	18		
Гематокрит	%	36,02±1,05	35,43±0,83	* 32,06±1,32	33,08±1,40	35,02±1,59	* 31,94±1,28	* 31,12±1,46		
Еритроцити	Т/л	5,68±0,27	5,70±0,23	5,88±0,35	5,51±0,39	6,80±0,44	* 6,82±0,31	5,70±0,35		
Лейкоцити	Г/л	6,20±0,76	4,60±0,42	4,76±0,17	5,56±0,55	6,64±0,90	5,80±0,37	5,48±0,21		
Гемоглобін	г/л	102,25±2,38	99,59±3,11	99,83±3,97	93,56±4,38	99,06±3,48	95,60±2,11	* 92,68±1,88		
Лейкограма	Нейтрофіли	П	%	4,0±0,47	3,0±0,58	2,5±0,61	3,0±0,53	3,5±0,49	4,0±0,38	3,5±0,56
		С	%	29,0±1,63	29,0±1,54	* 22,5±1,63	* 22,5±1,06	* 23,0±1,12	** 22,0±0,58	25,0±1,06
	Еозинофіли	%	1,5±0,25	3,0±0,93	*** 4,0±0,29	*** 4,5±0,44	** 4,0±0,58	** 4,5±0,68	3,0±0,63	
	Моноцити	%	5,0±0,54	4,5±0,60	5,0±0,52	5,5±0,69	3,5±0,48	5,0±0,61	4,0±0,46	
	Лімфоцити	%	60,5±2,24	60,5±2,37	66,0±4,28	64,5±1,30	* 66,0±0,68	64,5±0,51	64,5±0,86	

Примітки: \* при p < 0,05; \*\* при p < 0,01; \*\*\* при p < 0,001.

Таблиця 3

**Морфологічні показники крові інфікованої вірусом лейкозу великої рогатої худоби (M ± m, n = 10)**

Назва показників		Одиниця виміру	До інфікування	Після інфікування (місяці)						
				1	2	3	4	5	6	
Гематокрит		%	34,50±0,44	33,26±0,69	32,12±0,57	30,89±0,57	32,40±1,02	31,89±0,71	30,43±0,46	
Еритроцити		Т/л	5,11±0,45	5,18±0,21	4,81±0,15	5,68±0,26	6,27±0,23	6,75±0,26	6,36±0,31	
Лейкоцити		Г/л	6,50±0,40	5,8±0,44	4,84±0,57	7,54±0,25	7,28±0,30	7,16±0,28	8,76±0,40	
Гемоглобін		г/л	108,06±1,18	100,63±1,87	98,06±1,40	98,46±1,61	98,48±1,54	99,28±2,01	100,73±1,71	
Лейкограма	Нейтрофіли	П	%	3,0±0,37	4,0±0,54	3,5±0,62	3,0±0,29	2,5±0,43	2,5±0,47	2,0±0,22
		С	%	24,5±3,57	22,0±3,02	25,0±1,94	10,0±0,85	8,5±0,50	8,0±0,49	8,5±0,60
	Еозинофіли		%	2,0±0,30	4,0±0,36	1,5±0,37	1,5±0,17	1,0±0,09	1,0±0,05	0,5±0,04
	Моноцити		%	5,5±0,61	5,5±0,70	5,0±0,83	4,0±0,78	5,0±0,68	4,5±0,74	5,5±0,69
	Лімфоцити		%	65,0±3,40	64,5±2,89	65,0±1,83	81,5±0,94	83,0±0,50	84,0±0,50	83,5±0,64

**Примітки:** \* при  $p < 0,05$ ; \*\* при  $p < 0,01$ ; \*\*\* при  $p < 0,001$ .

Одержані результати досліджень свідчать, що зміни в морфологічному складі крові на третьому місяці інфікування збігаються з наявними позитивними результатами у реакції імунодифузії. Проте методом ІФА виявити інфікованих тварин можна до початкових змін у крові.

**Висновки.**

1. В умовах експериментального зараження великої рогатої худоби кров'ю гематологічно хворої на лейкоз корови серологічну відповідь за ІФА можна виявити приблизно на місяць раніше, ніж за РІД.

2. Розвиток лейкозного процесу на третьому місяці інфікування, який характеризується початковими змінами в крові на рівні сегментоядерних нейтрофілів, еозинофілів та лімфоцитів, збігаються з одержанням позитивних результатів у реакції імунодифузії.

3. З метою прискореного оздоровлення господарств у системі заходів на завершальному етапі оздоровлення серологічні дослідження слід проводити імуноферментним методом, що дасть змогу виявити хворих тварин у перший місяць інфікування.

**Література**

1. Власенко В.С. Выявление животных с повышенным риском к заболеванию вирусом лейкоза КРС /В.С. Власенко, Т.С. Дудолодова, М.А. Бажин, А.Н. Новиков //Веткорм. – 2008. – № 4. – С. 8-9.
2. Гулюкин М.И. Разработка эффективных мероприятий против лейкоза крупного рогатого скота /М.И. Гулюкин, Л.А. Иванова, Н.В. Замараева и др. //Ветеринария. – 2002. – № 12. – С. 3-8.
3. Двоглазов Н.Г. Некоторые особенности оздоровительных мероприятий от инфекции вируса лейкоза крупного рогатого скота в хозяйствах с применением реакции иммунодиффузии и иммуно-ферментного анализа /Н.Г. Двоглазов, Т.А. Агарпова //Ветеринарный врач. – 2010. – № 1. – С. 22-24.
4. Иванов О.В. Эффективность серологических методов исследования при лейкозе крупного рогатого скота /О.В. Иванов, О.Ю. Иванова, В.П. Федотов и др. //Ветеринария. – 2008. – № 7. – С. 6-8.
5. Інструкція з профілактики та оздоровлення великої рогатої худоби від лейкозу /Затверджено наказом Державного комітету ветеринарної медицини України 21 12 2007 р. №21. Зареєстровано в Міністерстві юстиції України 11 01. 2008 р. за № 12/14703.
6. Кісера Я.В. Морфофункціональні, імунологічні та біохімічні зміни в патогенезі лейкозу великої рогатої худоби: автореферат дис. док. вет. наук; спец. 16.00.02 /Я.В. Кісера. – Київ, 2011. – 34 с.
7. Ковалюк Н.В. Современные методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота /Н.В. Ковалюк, В.Ф. Сачук, Е.В. Мачульская //Ветеринария Кубани. – 2007. – № 1. – С. 11-13.
8. Козырева Н.Г. Проблемы и перспективы применения полимеразной цепной реакции в диагностике лейкоза КРС /Н.Г. Козырева, Н.Ф. Ломакина, Л.А. Иванова, М.И. Гулюкин //Веткорм. – 2009. – № 3. – С. 8-11.
9. Лиманська О.Ю. Визначення статі ембріонів та виявлення вірусу лейкозу великої рогатої худоби за допомогою полімеразної ланцюгової реакції /О.Ю. Лиманська, О.П. Лиманський //Вісник аграрної науки. – 2001. – № 2. – С. 34-38.
10. Мельник Ю.Ф. Епізоотологічна ефективність заходів боротьби з лейкозом великої рогатої худоби /Ю.Ф. Мельник, М.С. Мандигра //Вісник аграрної науки. – 2004. – № 2. – С. 26-28.

**Summary****Kisera J.V.****SEROLOGICAL METHODS FOR DIAGNOSIS BOVINE LEUKEMIA**

*The paper deals with the evaluation of serological methods of bovine leukemia diagnosis in its experimental infection and is defined certain morphological changes of blood indices after infection.*

**Key words:** *cattle, leukemia, immunodiffusion, ELISA, polymerase chain reaction, blood, serum, leucocytes, lymphocytes.*

Рецензент – к.вет.н., професор Калініна О.С.