

На правах рукописи



ДВОЕГЛАЗОВ НИКОЛАЙ ГЕННАДЬЕВИЧ

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ
ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИИ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук



Новосибирск – 2009

12 ФЕВ 2009

Работа выполнена в ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии
Сибири и Дальнего Востока СО Россельхозакадемии

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор
Храмцов Виктор Викторович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Глотова Татьяна Ивановна,

доктор ветеринарных наук,
старший научный сотрудник
Разумовская Валентина Владимировна

Ведущая организация: **ФГОУ ВПО «Новосибирский государственный аграрный университет»**

Защита диссертации состоится *25 февраля 2009 г. в «12» ч.* на заседании диссертационного совета Д.006.045. при ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО Россельхозакадемии по адресу: 630501, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Краснообск, ГНУ ИЭВСиДВ, а/я 8, тел/факс (383) 348-44-62.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ЦНСХБ СО Россельхозакадемии.

Автореферат разослан «*15*» января 2009 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета, к.в.н.



Стеблева Г.М.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Лейкоз крупного рогатого скота (ЛКРС) широко распространен в России, а также во многих странах мира. Известно, что ЛКРС зарегистрирован более чем в трети всех стран мира. В последнее время все больше поступает сообщений о вновь выявленных очагах его распространения в тех странах, где раньше его не регистрировали (W. Wittmann, 1993; J.L.F. Cordeiro et al., 1994; E.H. Birgel et al., 1995; A. Kurdi et al., 1999; A.S. Meas et al., 2000, 2002; K.G. Trono et al., 2001; A. Zaghawa et al., 2002).

Данные о ликвидации лейкоза в ряде западных стран, а также сообщения об успехах на отдельных территориях нашей страны убедительно доказывают, что с лейкозом можно эффективно бороться вне зависимости от сложности ситуации (П.Н. Смирнов и соавт., 1989, 1992, 2004, 2005; В.В. Храмцов и соавт., 2000, 2005; В.В. Разумовская и соавт., 2003; В.И. Околелов и соавт., 2004; И.М. Донник и соавт., 2005; В.А. Апалькин и соавт., 2005; G. Schramm and A. Aragon, 1994; I. Schwartz and D. Levy, 1994).

В большинстве зарубежных стран, где ведутся мероприятия по борьбе с лейкозом, или он ликвидирован, для оздоровительно-профилактической работы используют весь спектр современных методов диагностики. В Российской Федерации основным методом диагностики на лейкоз остается реакция иммунодиффузии (РИД). В некоторых отечественных и зарубежных публикациях были показаны преимущества иммуноферментного анализа (ИФА) в сопоставлении с РИД. При не меньшей специфичности, чувствительность ИФА на порядок превосходит РИД (М.М. Маурицас и соавт., 1985; В.М. Чекишев, 1992; С.А. Малоголовкин, 1997; Р.З. Файзулин и соавт., 1997; Л.А. Иванова, 2000; M.J. Burridge et al., 1982; K.W. Perlberg et al., 1984; V.K. Nguyen and R.F. Maes, 1993).

Как у любого метода, у ИФА есть свои недостатки. Например, он, как и РИД, не позволяет отличать колостральные антитела от активных антител, продуцирующихся при вирусной инфекции. В этом случае высокая чувствительность ИФА может затруднять оценку нормы продолжительности колострального иммунитета, так как позволяет выявлять материнские антитела в более поздние сроки, чем РИД (С.А. Мурватуллоев и соавт., 1981; E. Forschner und D. Heiseke, 1988; K. Klintevall et al., 1991; D. Beier et al., 1998). У некоторых животных инфекция протекает атипично, без образования антител. Такие животные серологическими методами не выявляются и в дальнейшем могут служить источником новых вспышек инфекции в оздоровленных стадах (М.И. Гулюкин и соавт., 2002; В.А. Крикун, 2002; D. Beier et al., 1998).

В подобных случаях актуальным является применение генно-молекулярных методов диагностики, таких как молекулярная гибридизация и полимеразная цепная реакция (ПЦР). ПЦР позволяет выявлять, по разным данным, на 10 – 42% больше инфицированных ВЛКРС животных, чем РИД или ИФА. Также при помощи ПЦР возможно отличить инфицированных телят от телят с колостральными антителами (Н.В. Кузнецова и соавт., 1997; Л.Б. Прохвятилова и соавт., 1998; В.А. Бусол и соавт., 1999; Н.Т. Джапарали-

ев и соавт., 2000; Н.А. Мальцева, 2002; В.А. Апалькин и соавт., 2005; K.B. Mullis et al., 1986; H.M. Naif et al., 1990; A. Agresti et al., 1993; A. Popov et al., 1993; H. Poon et al., 1993; H. Fehner et al., 1996; U. Czarnik et al., 2000; S.E. Gutierrez et al., 2001; M. Rola and J. Kuzmak, 2002; D.W. Nagy et al., 2003; C.J. Kuckleburg et al., 2003).

Однако в связи с тем, что все перечисленные методы имеют недостатки, актуальными являются исследования по оптимизации регламента для каждого метода в системе оздоровительно-профилактических мероприятий при лейкозе.

Цель работы: провести сравнительное изучение эффективности существующих методов диагностики ВЛКРС-инфекции (РИД, ИФА и ПЦР) и оптимизировать регламент их применения в системе оздоровления крупного рогатого скота от лейкоза.

Задачи исследований:

1. Провести сравнительный анализ диагностической эффективности методов РИД и ИФА в сопоставлении с результатами ПЦР на крупном рогатом скоте неблагополучных по лейкозу хозяйств.

2. Оптимизировать регламент применения методов РИД, ИФА и ПЦР в системе оздоровления крупного рогатого скота от лейкоза.

Научная новизна работы. Установлено, что относительное содержание антител к ВЛКРС в сыворотке крови коров выше, чем у молодняка крупного рогатого скота. Так, у взрослых животных этот показатель, по результатам ИФА, составил 42,29 о.е. (для отрицательных в РИД), 75,46 о.е. (для слабоположительных в РИД, титр антител от 1:1 до 1:4) и 85,45 о.е. (для положительных в РИД, титр антител свыше 1:8), у телок случного возраста – 35,59 о.е., 49,23 о.е. и 78,25 о.е. соответственно.

Проведенный на репрезентативном поголовье сравнительный анализ эффективности методов РИД, ИФА и ПЦР при диагностике ВЛКРС-инфекции показал, что ни один из этих методов не позволяет полностью выявить всех животных-вирусоносителей. Так, эффективность РИД составила 76,1%, ИФА – 83,3%, ПЦР – от 58,3 до 72,6%.

Научно обоснован регламент использования ИФА и ПЦР в хозяйствах с разной эпизоотической ситуацией по ВЛКРС-инфекции.

Практическое значение работы. Инструментальный вариант учета результатов ИФА в сопоставлении с визуальным позволяет дополнительно выявлять до 2% инфицированных животных, так как пробы сыворотки крови, дающие сигнал менее 30 о.е. при инструментальном учете, при визуальном оцениваются как сомнительные.

Предложен вариант применения ИФА в системе общепринятых методов диагностики инфекции ВЛКРС, который предусматривает регламент исследования животных в зависимости от напряженности эпизоотической ситуации по лейкозу. С целью рационального использования ИФА рекомендуется применять данный тест при первичном разделении неблагополучного стада и на завершающей стадии оздоровления.

Оптимизирован регламент применения тест-систем РИД, ИФА и ПЦР при диагностике ВЛКРС-инфекции.

Результаты исследований использованы при разработке методических рекомендаций.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Результаты сравнительного изучения эффективности тест-систем РИД и ИФА в сопоставлении с ПЦР при диагностике ВЛКРС-инфекции.

2. Оптимизированный регламент применения РИД, ИФА и ПЦР в системе оздоровительно-профилактических мероприятий при ВЛКРС-инфекции.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях ученого совета ГНУ ИЭВСиДВ СО Россельхозакадемии (2002-2004 гг.); научно-практической конференции, посвященной 70-летию Иркутской НИВС (Иркутск, 2002); международной научно-практической конференции «Современные проблемы эпизоотологии» (Новосибирск, 2004); международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы ветеринарной медицины» (Новосибирск, 2005); Сибирской Межрегиональной научно-практической конференции (Новосибирск, 2008).

Публикация результатов исследований. По теме диссертации опубликованы 8 научных работ, в том числе одна - в журнале «Сибирский вестник сельскохозяйственной науки», рекомендованном ВАК РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 125 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов исследований, выводов, практических предложений, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 15 таблицами и 4 рисунками. Список использованной литературы включает 245 источников.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в лаборатории лейкозов Государственного научного учреждения Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (ГНУ ИЭВСиДВ) СО Россельхозакадемии и лаборатории биотехнологии Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии (ГНЦ ВБ) «Вектор» в 2002-2008 гг.

Объектом исследования служил интактный, инфицированный ВЛКРС и больной лейкозом крупный рогатый скот в возрасте 3-7 лет и телки случного возраста из хозяйств Новосибирской области.

Предметом исследования были: пробы периферической крови, сыворотки крови, ДНК животных и процедуры сопоставления эффективности тест-систем.

Для сравнительного изучения эффективности существующих методов диагностики ВЛКРС-инфекции были проанализированы результаты серологических (РИД, ИФА), гематологических и молекулярно-генетических (ПЦР) исследований животных. Диагностические исследования крупного рогатого

скота на лейкоз и инфекцию ВЛКРС проводили в соответствии с Методическими указаниями по диагностике лейкоза крупного рогатого скота, утвержденными ДВ МСХ РФ (М., 1999).

Серологические исследования (РИД, ИФА) проведены на поголовье крупного рогатого скота разных возрастных групп из благополучных и неблагополучных хозяйств. Всего исследовано 3500 животных.

Комплексные серологические, гематологические и молекулярно-генетические исследования сыворотки крови, крови и ДНК животных проведены на 120 головах крупного рогатого скота из неблагополучных хозяйств Новосибирской области.

Серологические методы. Антитела к ВЛКРС выявляли с помощью реакции иммунодиффузии в агаровом геле (РИД), используя набор Курской биофабрики согласно наставлению производителя (фирма «Биок», г. Курск). Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили в соответствии с наставлением по применению (производство НПО «Нарвак», г. Москва). Учет и интерпретацию результатов реакции осуществляли визуально и инструментально.

Гематологический метод. Подсчет абсолютного количества лейкоцитов в 1 мкл периферической крови производили методом микрокопирования в камере Горяева, а лимфоцитов – методом фазово-контрастного микрокопирования с применением КФ-4 по методике С.С. Бирбина в модификации П.Н. Смирнова, А.Т. Левашева (1989).

Выделение образцов ДНК из лейкоцитов периферической крови проводили в лаборатории биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор» по методу К. Смита и соавт. (1990) с небольшими модификациями.

Молекулярный метод (ПЦР). Образцы ДНК исследовали в ПЦР при помощи набора для экспресс-индикации ДНК профага вируса лейкоза КРС (ВЛКРС) методом полимеразной цепной реакции согласно инструкции по применению производства «Лагис» (Россия). А также в «Nested» - ПЦР для сегмента гена *env* (444-bp) ВЛКРС по методу, описанному М. Licursi et al. (2002). Олигонуклеотидные праймеры синтезировали на автоматическом синтезаторе ASM 102 (фирма «Биосет»). Продукты амплификации анализировали электрофорезом в 2%-м агарозном геле (AGAROSE, ICN Biomedicals inc) с последующим окрашиванием в растворе бромистого этидия с концентрацией 1 мг/мл (Т. Маниатис и соавт., 1984). В качестве маркера молекулярного веса использовали 100 bp («СибЭнзим», г. Новосибирск). Визуализацию электрофореграмм проводили при помощи УФ-трансиллюминатора УВТ-1 («Биокот», Россия).

Статистическая обработка цифровых данных, полученных в результате экспериментальных исследований, была выполнена на персональном компьютере с использованием стандартных программ и включала подсчет средних арифметических (M), стандартных ошибок (m), стандартных отклонений (σ) и коэффициентов корреляции (r). Уровень значимости вариационных рядов оценивался параметрическим t -критерием Стьюдента (Ю.Г. Попов и соавт., 2000).

Автор выражает благодарность сотрудникам лаборатории биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор», доктору биологических наук Туманову Ю.В. и со-

трудникам лаборатории лейкозов ГНУ ИЭВСиДВ за оказанную помощь в подготовке работы.

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1. Сопоставление результатов диагностических исследований крупного рогатого скота на инфекцию вируса лейкоза в РИД и ИФА

В таблице №1 приведены объединенные данные сопоставления результатов РИД и ИФА на материале из нескольких неблагополучных по лейкозу хозяйств.

Таблица 1 – Результаты исследований сыворотки крови в РИД и ИФА

Группы животных	Количество голов	ИФА			
		(+)		(-)	
		кол-во	%	кол-во	%
РИД (+)	423	423	100	-	-
РИД (-)	2191	158	7,2	2033	92,8

Данные таблицы свидетельствуют о том, что ИФА является более чувствительным методом, чем РИД. Анализ, проведенный на большом поголовье крупного рогатого скота из хозяйств с разной степенью распространения инфекции, свидетельствует о том, что всегда удается дополнительно выявить при помощи ИФА животных, не выявленных в РИД. Зачастую это связано с недостаточным для предела чувствительности РИД низким уровнем иммунного ответа животного. В наших исследованиях при помощи ИФА удавалось дополнительно выявлять от 1,5 до 15,3% инфицированных животных из числа отрицательных в РИД.

ИФА, как и РИД, можно с успехом использовать в хозяйствах для контроля благополучия по ВЛКРС. Для оценки работы ИФА на благополучных по лейкозу стадах параллельно с РИД исследовали 550 животных из хозяйств, свободных от ВЛКРС (учхоз «Тулинское», ОПХ «Элитное» и др.), иммуноферментным анализом. Результаты тестов были отрицательными.

Анализ результатов исследований в ИФА проб сыворотки крови, сомнительных в РИД

Предметом изучения являлись пробы сыворотки крови, учтенные при постановке в РИД как сомнительные. Реагирование таких проб проявлялось в основном в виде слабого утолщения или слабого размытия концевой участка контрольной линии преципитации. Так как чувствительность РИД зависит не от серии используемых реагентов, а определяется пределом чувствительности самой реакции, то и перестановка сомнительных проб в РИД не целесо-

образна. Поэтому, на наш взгляд, такие пробы необходимо дополнительно исследовать более чувствительным методом. В качестве такого метода использовали ИФА. Пробы до постановки в ИФА хранили при $t = -20^{\circ}\text{C}$.

Всего было исследовано 137 проб сыворотки крови от коров. Из них 97 (71%) проб были положительными в ИФА, а соответственно 40 (29%) – отрицательными. Проведя инструментальный учет результатов, получили значения оптической плотности проб и провели математическую обработку результатов анализа. Самые низкие показатели относительного содержания антител в положительных в ИФА пробах соответствовали значениям 75-80 о.е., самые высокие достигали значений в 98-100 о.е. Учитывая эти данные можно предположить, что сыворотки со значениями относительного содержания антител ниже 80 о.е. не будут выявлены в РИД из-за недостаточной чувствительности метода, либо покажут сомнительный или слабopоложительный результат.

Надо отметить, что такие пробы чаще всего встречались в хозяйствах с низкой инфицированностью поголовья или в хозяйствах, где интенсивно ведется оздоровление от лейкоза. Количество сомнительных в РИД проб не превышало 5-10% от числа выявленных за исследование.

Чем ближе к завершающему этапу оздоровления от лейкоза находится хозяйство, тем опаснее и недопустимее передержка в стадах инфицированных животных. А именно на этом этапе выявляются единичные животные, реагирующие, по литературным данным, в 80-100% случаев слабopоложительно (А.Т. Левашев, 1992). В подобных ситуациях рациональнее будет исследовать все поголовье не при помощи реакции иммунодиффузии, а с применением иммуноферментного анализа, который в более короткие сроки позволит выявить всех инфицированных животных и удалить их из стада. Сомнительные в РИД пробы необходимо дополнительно исследовать в ИФА, для получения более объективных результатов.

Сравнение визуальной и инструментальной оценки результатов ИФА

Как известно, учет результатов иммуноферментного анализа предполагает как инструментальную, с помощью ридера, так и визуальную оценку. Для того чтобы узнать насколько эти способы учета информативны и сопоставимы, предварительно (до сканирования планшета в ридере) проводили визуальную оценку реакции. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты визуальной и инструментальной оценки ИФА

Иssl-но, гол/%	Положительные в ИФА, гол/%		Сомнительные в ИФА, гол/%	
	визуально	инструментально	визуально	инструментально
820/100	61/7,4	78/9,5	55/6,7	27/3,3

Выявлено, что около 2% положительных проб при визуальной оценке выпадают из поля зрения исследователя. Это те пробы, которые имеют сла-

бый сигнал, около 30 о.е. и ниже ($23,45 \pm 5,27$, $P < 0,001$). В лучшем случае такие пробы могут быть учтены как сомнительные и переставлены, но гарантии, что сигнал будет выше, нет. Сомнительные в ИФА пробы при инструментальном учете в наших исследованиях регистрировали достаточно часто. В среднем около 3%, а при визуальной оценке 6,7%.

Исходя из выше приведенных данных, очевидно, что использование тест-систем ИФА без специального оборудования для учета не целесообразно.

Изучение взаимосвязи между возрастом и относительным содержанием антител у крупного рогатого скота

Ранее проведенные нами исследования по сопоставлению результатов РИД и ИФА на большом поголовье крупного рогатого скота из разных хозяйств, разных возрастных групп, разной степени компрометации к лейкозу продемонстрировали различия как по количеству дополнительно выявленных в ИФА животных, так и по ряду других показателей (слабоположительные в РИД, реагирующие в РИД на две линии и др.).

Слабоположительными считали те пробы, которые в РИД реагировали на один и два креста (+, ++), что соответствует титрам антител 1:1-1:2 и 1:2-1:4 соответственно. Положительными – пробы, реагирующие в РИД на три и четыре креста, т.е. в титрах антител выше, чем 1:8 (А.И. Испуллаев, 1993).

Для установления взаимосвязей между отдельными показателями, такими как возраст животных, относительное содержание антител у реагирующих на ВЛКРС животных и количество дополнительно к РИД выявленных в ИФА животных, было выбрано модельное хозяйство, неблагополучное по ВЛКРС-инфекции, – ЗАО «Кубанское». В нем активно проводятся оздоровительные мероприятия по лейкозу, в том числе и с использованием ИФА. Как модельные были определены две, наиболее значимые в хозяйственном отношении, возрастные группы: коровы и телки случного возраста. В РИД и ИФА были исследованы образцы сыворотки крови от 428 коров и 490 телок случного возраста. Результаты представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3 – Результаты анализа сыворотки крови коров в РИД и ИФА

Тест-система	Распределение результатов										Общее кол-во
	+	+	-	-	+/-	+/-	+	-	+	-	
ИФА	+	+	-	-	+/-	+/-	+	-	+	-	
РИД	+	-	+	-	+	-	//	//	сл(+)	сл(+)	
Кол-во (%)	66 (15,4)	16 (4,4)	0	341	0	5	6	0	27	0	
Всего	82			341		5					428

Примечание: +/- – сомнительные в ИФА;

Из числа положительных в РИД:

// - реагирующие в РИД на две линии, сл(+)- слабоположительные в РИД

Из представленных данных видно, что по результатам РИД инфицированность поголовья коров составляет 15,4%, а в ИФА дополнительно выявлено 4,4% животных.

Из 66 реагирующих в РИД коров у 27 реакция была отмечена как слабоположительная, а 6 реагировали на два антигена, что характеризует переход инфекционного процесса в следующую (гематологическую) стадию заболевания. Все 5 сомнительных в ИФА проб при перестановке показали отрицательную реакцию.

Таблица 4 – Результаты анализа сыворотки крови телок в РИД и ИФА

Тест-система	Распределение результатов										Общее кол-во
	+	+	-	-	+/-	+/-	+	-	+	-	
ИФА	+	+	-	-	+/-	+/-	+	-	+	-	
РИД	+	-	+	-	+	-	//	//	сл(+)	сл(+)	
Кол-во (%)	95 (19,4)	6 (1,5)	0	384	0	5	3	0	12	0	
Всего	101			384		5					490

Примечание: +/- – сомнительные в ИФА;

Из числа положительных в РИД:

// - реагирующие в РИД на две линии, сл(+)- слабоположительные в РИД

Из таблицы 4 видно, что инфицированность ВЛКРС поголовья телок, согласно данным РИД – 19,4%, в ИФА дополнительно выявлено 1,5% животных. Из 95 положительно реагировавших в РИД телок слабоположительную реакцию показали 12 животных, на две полосы реагировали 3. Сомнительные в ИФА пробы при перестановке показали отрицательную реакцию.

По результатам, представленным в таблицах 3 и 4, все животные были распределены по следующим группам:

- 1) РИД отрицательные, ИФА положительные (РИД-, ИФА+);
- 2) РИД слабоположительные, ИФА положительные (РИД сл+, ИФА+);
- 3) РИД и ИФА положительные (РИД+, ИФА+);
- 4) РИД и ИФА отрицательные (РИД-, ИФА-).

В последней группе относительное содержание антител в ИФА не превышало 14 о.е., а в остальных группах их значения различались. Эти данные представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Показатели относительного содержания антител в сыворотке крови у коров и телок в разных по степени реагирования в РИД и ИФА группах, о.е.

Возрастная группа	1) РИД-, ИФА+	2) РИД сл+, ИФА+	3) РИД+, ИФА+	Всего исследовано
	кол-во / М±m	кол-во / М±m	кол-во / М±m	
Коровы	16 / 42,29±6,9 (P<0,001)	27 / 75,46±4,57 (P<0,001)	39 / 85,45±3,01 (P<0,001)	428
Телки	6 / 35,59±7,02 (P<0,01)	12 / 49,23±6,29 (P<0,001)	83 / 78,25±2,1 (P<0,001)	490

При расчете критерия достоверности разности (t_n) установили, что разница в содержании антител у коров в 1-й и 2-й группах высоко достоверна ($P<0,001$), а во 2-й и 3-й не достоверна. В содержании антител у телок между 1-й и 2-й группой нет достоверной разницы, а между 2-й и 3-й разница высоко достоверна ($P<0,001$).

Относительное содержание антител по всем трем группам у взрослых животных выше, чем у телок. Причем, если в 1-й (РИД-, ИФА+) и 3-й (РИД+, ИФА+) группах нами не выявлено достоверной разницы, то во 2-й (РИД сл+, ИФА+) разница между коровами и телками достоверна ($P<0,001$).

Сопоставляя данные по уровню антител у коров и телок по группе животных, слабopоложительных в РИД, можно предположить, что в формировании положительного сигнала в РИД участвуют не только IgG антитела, которые регистрирует ИФА, но и другие, присутствующие в сыворотке, например IgM. Известно, что в начале инфекционного процесса образуются IgM антитела, которые в дальнейшем замещаются в организме животного антителами группы IgG. Также, возможно, сигнал в РИД могут совместно с gp51 формировать антитела против других антигенов ВЛКРС. Коммерческий антиген, используемый в РИД, не отличается высокой степенью очистки и, как минимум, содержит кроме gp51 p24 антиген. Например, O. Kaaden и соавт. (1977) успешно использовали в РИД антиген p15.

В данном случае правомерно предположить, что количественные изменения антител у телок напрямую связаны с переходом инфекционного процесса на новый уровень. В то время как для коров, небольшую разницу между слабopоложительными и положительными в РИД группами, можно объяснить низкой специфичной чувствительностью РИД, для которой количества антител только IgG на уровне, определяемом в ИФА, ниже 75 о.е. не достаточно.

Определяя степень реагирования (по количественному признаку), как качественную характеристику, предполагали возможное качественное различие между животными разных возрастов по характеру протекания инфекционного процесса, что должно находить отражение в уровне специфических противовирусных антител.

При более низкой, по сравнению с телками (по данным РИД), инфицированности поголовья коров (15,4% у коров против 19,4% у телок) дополнительно в ИФА животных выявляется больше в этой же возрастной группе (4,4% против 1,5%). Это может являться подтверждением того, что реакция организма на внедрение ВЛКРС связана с возрастом животного, и инфекционный процесс у молодого и взрослого животного протекает не одинаково.

2.2.2. Сравнительное изучение эффективности тест-систем на основе ПЦР

По литературным данным, ПЦР значительно превосходит другие, не прямые методы детекции ВЛКРС. В нашем исследовании было проведено изучение двух отличающихся тест-систем с праймерами к env гену ВЛКРС. В первой, коммерческой, содержится одна пара праймеров, во второй, сконструированной по описанию в статье М. Licursi et al. (2002), – две пары.

В качестве референс-системы использовали РИД как официально утвержденный метод диагностики ВЛКРС. По результатам РИД сформировали 2 группы животных: РИД - отрицательные (условно-здоровые) и РИД – положительные (инфицированные).

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 6.

При сравнении результатов РИД и ПЦР отмечены случаи обнаружения провируса у серонегативных животных, а также отрицательные случаи в ПЦР у животных, имеющих антитела к ВЛКРС.

Таблица 6 – Результаты исследований животных методом ПЦР

Статус животных	Количество голов	Комм. набор ПЦР «Лагис»		«Nested»-ПЦР	
		ПЦР +	ПЦР -	ПЦР +	ПЦР -
РИД +	64	45	19	49	15
РИД -	56	5	51	12	44

Значительный процент случаев несовпадений данных ПЦР с результатами серологических исследований в наших экспериментах может свидетельствовать о низком уровне провирусной ДНК, находящейся ниже предела чувствительности ПЦР, т.е. животные могут находиться либо в стойкой алиментарной стадии, либо в начальной стадии персистирующего лимфоцитоза. Также нельзя исключить и возможность региональной вариативности провирусной ДНК в исследуемых нами образцах в месте посадки праймеров. Возможно, существуют и другие, еще не до конца изученные факторы.

При сравнении результатов двух тест-систем обратили внимание, что с помощью коммерческого набора «Лагис» нам не всегда удавалось обнаружить наличие провируса лейкоза, в то время как использование «nested»-ПЦР позволяло в этих же пробах выявлять специфический фрагмент.

Следует отметить, что в группе РИД-отрицательных животных методом «nested»-ПЦР в 12 пробах из 56 обнаружен провирус лейкоза КРС, а с помощью коммерческого набора «Лагис» выявлено всего 5 таких проб.

Нами были проанализированы случаи совпадения и расхождения результатов в двух тест-системах (табл. 7).

Таблица 7 – Результаты сопоставления двух ПЦР тест-систем

Статус животных	Совпадения	Количество	
		голов	%
РИД +	ПЦР ₁ + ПЦР ₂ +	38	59,3
	ПЦР ₁ + ПЦР ₂ -	7	11
	ПЦР ₁ - ПЦР ₂ +	11	17,2
	ПЦР ₁ - ПЦР ₂ -	8	12,5
РИД -	ПЦР ₁ - ПЦР ₂ -	41	73,2
	ПЦР ₁ + ПЦР ₂ -	3	5,4
	ПЦР ₁ - ПЦР ₂ +	10	18,0
	ПЦР ₁ + ПЦР ₂ +	2	3,4

Примечание: ПЦР₁ – коммерческий набор «Лагис»; ПЦР₂ – «nested» ПЦР.

Из таблицы видно, что в группе серопозитивных животных около 60% результатов совпадают в обеих тест-системах с результатами РИД. В ПЦР₁ («Лагис») дополнительно к этому подтвержден статус у 7 (11%) животных, а в «nested»-ПЦР получен положительный результат еще у 11 (17,2%) животных.

Во второй группе, составленной из РИД-отрицательных животных, около 70% результатов ПЦР совпадают с РИД, а также обнаружен провирус лейкоза у 2 животных в обеих тест-системах. Следует отметить, что с помощью ПЦР₂ дополнительно выявлено еще 10 животных, а ПЦР₁ – 3.

Оказалось, что метод «гнездовой» («nested»-ПЦР) обладает более высокой чувствительностью, чем коммерческий набор «Лагис», так как в нем используются две пары праймеров (внешние и внутренние), что позволяет увеличить чувствительность и специфичность реакции, а также свести к минимуму возможность получения ложноположительных результатов.

Этот метод, благодаря возможности анализа результатов после первого раунда ПЦР, можно считать полуколичественным, так как он позволяет оценивать количество провирусной ДНК, которое соответствует различным стадиям субклинического течения инфекции (S. Tajima et al., 1998).

Сравнительное изучение тест-систем РИД, ИФА и ПЦР в диагностике ВЛКРС-инфекции

Сравнительное изучение тест-систем РИД, ИФА и ПЦР проводилось на материале (кровь, сыворотка крови и ДНК), полученном от 120 коров с разной степенью компрометации к лейкозу.

По результатам РИД и гематологических исследований животных разделили на 3 группы: 1) больные (в эту группу вошли гематологически боль-

ные животные и реагирующие на антиген р24 в РИД), 2) инфицированные (РИД(+)) и 3) интактные (РИД(-)).

Результаты исследования образцов крови различными методами (РИД, ИФА и ПЦР) представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты исследования животных с разной степенью компрометации к лейкозу в РИД, ИФА и ПЦР

Группы животных	Кол-во голов	ИФА		ПЦР ₁		ПЦР ₂	
		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
		Кол-во / %	Кол-во / %	Кол-во / %	Кол-во / %	Кол-во / %	Кол-во / %
Больные	13	13 / 100	-	13 / 100	-	13 / 100	-
РИД (+)	51	51 / 100	-	32 / 62,7	19 / 37,3	36 / 70,6	15 / 29,4
РИД (-)	56	6 / 10,7	50 / 89,3	5 / 8,9	51 / 91,1	12 / 21,4	44 / 78,6

Как видно из таблицы, при исследовании больных лейкозом коров (первая группа) и в ИФА, и в ПЦР были получены положительные результаты в 100% случаев, что подтверждает наличие ВЛКРС у животных.

Результаты относительно ИФА (во второй и третьей группах) свидетельствуют о том, что ИФА является более чувствительным, чем РИД, методом, что согласуется и с литературными данными, по которым в ИФА дополнительно выявляют 10-20% инфицированных животных, отрицательных в РИД (G. Dolz and E. Moreno, 1999; C. Simard et al., 2000; K.G. Trono et al., 2001; K.Y. Choi et al., 2002)

Из 51 животного второй группы только 32 дали положительные результаты в ПЦР₁ и 36 – в ПЦР₂. На наш взгляд, этот факт можно объяснить рядом причин: специфичность и чувствительность ПЦР-анализа зависят от параметров амплификации, используемой пластиковой посуды, соблюдения определенных мер предосторожности при проведении ПЦР, качества подготовки клинического материала и качества тест-систем. Последнее определяется качеством используемой воды, термостабильной ДНК-полимеразы, а также праймеров — степенью гомологии олигонуклеотидов. Степень гомологии праймеров является ключевым параметром, определяющим специфичность и чувствительность ПЦР. Выбор праймеров из консервативных участков ВЛКРС с высокой степенью гомологии очень важен. При рутинном использовании ПЦР-диагностики возникают сложности в интерпретации результатов, так как совпадение данных ИФА, РИД и ПЦР-анализа по выявлению ДНК ВЛКРС составляет 60-100%, а для РНК – 60%. Использование праймеров с невысокой степенью гомологии (90% и менее) может существенно понижать чувствительность и специфичность ПЦР-анализа и приводить к появлению ложноположительных и ложноотрицательных результатов (Н.В. Кузнецова и соавт., 1997).

Однако в ПЦР₁ нами были дополнительно выявлены 5 коров-вирусоносителей, которых ни РИД, ни ИФА не регистрировали. А при помощи ПЦР₂ – 11 таких животных и 1 животное положительное только в ИФА. Более высокую чувствительность ПЦР₂ можно объяснить использованием двух пар праймеров.

Для анализа совпадения дополнительно выявленных проб была составлена таблица 9.

Таблица 9 - Результаты иммунологических (РИД, ИФА) и молекулярно-генетических (ПЦР) тестов при диагностике ВЛКРС-инфекции

Метод	Качественная оценка реакции (+/-)															
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
РИД	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ИФА	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
ПЦР ₁	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
ПЦР ₂	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
Кол-во	38	6	11	0	9	0	0	0	36	9	3	5	2	1	0	0

Если для упрощения задачи всех реагирующих животных, выявленных разными методами, принять за 100%, то можно рассчитать процентное соотношение (чувствительность) каждого метода в общей сумме. Всего прореагировало положительно 84. В РИД было выявлено 64 животных, т.е. 76,1%, в ИФА – 70 животных, что составляет 83,3%, в ПЦР₁ – 49, в ПЦР₂ – 61 и это соответственно 58,3% и 72,6%. Полученные данные свидетельствуют о том, что ни один из использованных методов не позволяет однозначно выявлять всех инфицированных ВЛКРС животных, и что для достижения наилучшего диагностического эффекта необходимо комбинированное использование серологических и генно-молекулярных методов.

2.2.3. Роль и место ИФА и ПЦР в системе общепринятых методов диагностики инфекции ВЛКРС и оптимизации схемы оздоровительно-профилактических мероприятий

Предлагается использовать ИФА как для оздоровления хозяйств от лейкоза, так и для контроля эпизоотической ситуации в благополучных стадах.

1. В неблагополучных хозяйствах алгоритм серологического обследования на лейкоз методом ИФА предполагает:

а) отрицательные результаты в РИД должны быть перепроверены в ИФА и только после этого животные могут считаться серонегативными.

б) первичное тестирование проб в ИФА проводится в скринирующем тесте и при отсутствии положительной реакции выдается заключение об отсутствии серологических данных инфицирования ВЛКРС. При положительном результате теста проба подлежит исследованию в подтверждающем тесте. При отрицательном результате подтверждающего теста проба считается серонегативной

по ВЛКРС, положительный результат является основанием для окончательного подтверждения серологического диагноза на лейкоз.

2. В благополучных по лейкозу хозяйствах (стадах) ИФА может быть основным методом контроля эпизоотической ситуации.

Следует отметить, что если имеется финансовая возможность (исследование одной пробы в подтверждающем тесте обходится дороже, чем в скринирующем), то вместо скринирующего ИФА-набора можно сразу же использовать ИФА-набор VeriTest и тем самым упростить алгоритм серологического обследования на лейкоз и сократить число необходимых анализов.

ПЦР можно использовать на завершающем этапе оздоровления, когда в стаде не выявляются серологически положительные животные. И в случае получения отрицательных результатов, такое стадо можно считать оздоровленным от лейкоза (рисунок).

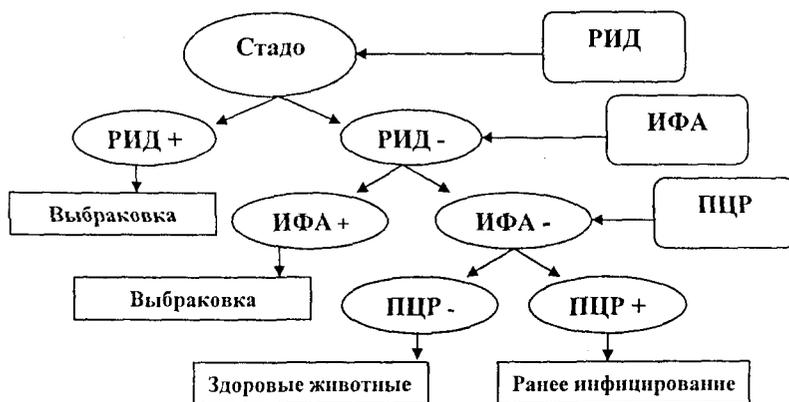


Схема последовательного применения диагностических тестов при проведении противолейкозных мероприятий («-» и «+» - отрицательные и положительные пробы (животные) соответственно).

Ниже приведены варианты оздоровления хозяйств в зависимости от эпизоотической ситуации по лейкозу.

Вариант 1. Оздоровительные мероприятия по лейкозу крупного рогатого скота в сельхозпредприятиях с инфицированностью у животных менее 10%

Специальные оздоровительные мероприятия по лейкозу крупного рогатого скота в хозяйствах предлагаем ограничивать проведением ежеквартальных серологических исследований в ИФА с последующей выбраковкой инфицированных животных до получения двух подряд отрицательных результатов с интервалом в 3 мес. С целью ускорения сроков оздоровления таких хозяйств можно увеличить кратность серологических исследований коров до 1 раза в месяц.

На заключительном этапе можно рекомендовать исследование методом ПЦР.

Вариант 2. Оздоровительные мероприятия по лейкозу крупного рогатого скота в сельхозпредприятиях с инфицированностью коров до 30%

- По результатам однократного серологического исследования в ИФА изолировать инфицированных коров в отдельные дворы с постепенной выбраковкой малопродуктивных животных;

- условно свободное от ВЛКРС стадо исследовать серологически в ИФА каждые 6 мес. с последующим перемещением и обособленным содержанием вновь выявленных инфицированных коров;

- инфицированных коров исследовать гематологически 2 раза в год с интервалом 6 мес. Гематологически больных коров подвергать убою;

- с целью создания безвирусного дойного стада организовать выращивание первотелок, свободных от ВЛКРС. Для этого обязательному серологическому ИФА-исследованию подвергается молодняк в возрасте 6 мес. и перед случкой. Инфицированный молодняк переводить в группу откорма. Ремонтный (ИФА-отрицательный) молодняк также выращивать на отдельной ферме или отдельными группами;

- быков-производителей исследовать в ИФА каждые 3 мес. Инфицированных быков-производителей немедленно выбраковывать.

При наличии в неблагополучных хозяйствах отдельных ферм (отделений) для содержания свободного от вируса лейкоза скота данную схему оздоровления можно применять в хозяйствах с инфицированностью коров до 50%.

Вариант 3. Оздоровительные мероприятия по лейкозу крупного рогатого скота в сельхозпредприятиях с инфицированностью коров свыше 30%

- Коров серологическому исследованию в РИД не подвергать, исследовать только гематологически 2 раза в год. Гематологически больных подвергать убою;

- с целью создания здорового дойного стада формировать отдельные группы ИФА-отрицательных первотелок с последующим их серологическим исследованием в ИФА каждые 3 мес. ИФА-положительных первотелок переводят в стадо инфицированных коров с последующей выбраковкой малопродуктивных животных;

- молодняк в возрасте 6 мес., первотелок и быков-производителей исследовать с использованием ИФА.

Во всех вариантах, при исследовании в ИФА коров, можно использовать наряду с сывороткой крови молоко.

ПЦР целесообразно использовать в стадах крупного рогатого скота с низкой инфицированностью, для исследования племенного скота, при купле-продаже племенного молодняка и быков-производителей, для обследования молодняка до 6-месячного возраста с целью исключения внутриутробного заражения, а также наряду с ИФА на завершающих этапах оздоровления хозяйств.

ВЫВОДЫ

1. ИФА позволяет дополнительно к РИД выявлять до 15,3% животных в зависимости от эпизоотической ситуации по инфекции ВЛКРС.

Для получения более объективных результатов сыворотка животных, показавших сомнительную в РИД реакцию, подлежит дополнительному исследованию в ИФА, так как 71% сомнительных в РИД проб по результатам ИФА содержит антитела к ВЛКРС.

Инструментальная оценка результатов ИФА более объективна (достоверна) в сопоставлении с визуальной. До 2% реагирующих в ИФА проб по результатам инструментальной оценки остаются неучтенными при визуальной. Сигнал, ниже 30 о.е., регистрируемый при инструментальном учете, при визуальном оценивается как сомнительный.

2. Слабоположительные реакции в РИД (титры антител до 1:4) чаще (33%) регистрируются у коров и значительно реже (12%) у телок случного возраста. Уровень относительного содержания антител к ВЛКРС, регистрируемый в ИФА, выше у коров, чем у телок. У коров, слабоположительных в РИД, относительное количество антител составило – $75,46 \pm 4,57$ о.е., тогда как у телок – $49,23 \pm 6,29$ о.е. ($P < 0,001$).

При более низком уровне инфицированности ВЛКРС (15,4%) коров, в сопоставлении с телками случного возраста (19,4%), случаи дополнительного выявления в ИФА среди взрослых животных были выше и составили 4,4% против 1,5% у телок.

3. Из двух тест-систем на основе ПЦР «nested»-ПЦР более чувствительная в сравнении с коммерческой ПЦР тест-системой «Лагис», что, по-видимому, связано с использованием в «nested»-ПЦР двух пар праймеров. Из 120 исследованных проб в ПЦР₁ («Лагис») дополнительно было выявлено – 5 проб, а в ПЦР₂ («nested»-ПЦР) – 12 проб.

4. Соотношение всех реагирующих животных, выявленных разными методами, составляет: РИД - 76,1%, ИФА – 83,3%, ПЦР₁ («Лагис») – 58,3%, ПЦР₂ («nested»-ПЦР) – 72,6%. Таким образом, для максимального выявления всех инфицированных ВЛКРС животных необходимо комбинированное использование серологических и молекулярных методов.

У гематологически больных лейкозом животных наличие ВЛКРС было подтверждено РИД, ИФА и ПЦР методами в 100% случаев.

5. Регламент применения ИФА и ПЦР в сельскохозяйственных предприятиях обусловлен особенностями эпизоотической ситуации по ВЛКРС-инфекции. С целью рационального применения ИФА возможно использование данного теста при первичном разделении неблагополучного стада и на завершающей стадии оздоровления хозяйств от инфекции.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для реализации в условиях ветеринарной практики разработаны методические рекомендации:

1. «Иммуноферментный анализ при диагностике инфекции вируса лейкоза крупного рогатого скота» (утв. подсекцией «Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока», прот. № 2 от 29.06.2007 г.).

2. «Комплексная система оздоровления и профилактики лейкоза крупного рогатого скота в Новосибирской области на 2007–2011 гг. (теоретические и практические аспекты)» (утв. подсекцией «Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока», прот. № 14 от 5.10.2007 г.).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сравнительный анализ антигенов при выявлении антител к вирусу лейкоза методом ИФА у инфицированного крупного рогатого скота / Соавт.: Ю.В. Туманов, В.В. Храмцов // Сиб. вестник с.-х. науки - Новосибирск, 2007. - № 8. – С. 91-94.

2. Сравнительный анализ антигенов в диагностике антител к ВЛКРС / Соавт.: О.Н. Паршина, Р.З. Файзулин, Ю.В. Туманов, В.В. Храмцов // Матер. науч.-практ. конф., посвящ. 70-летию Иркутской НИВС. – Иркутск, 2002. – С. 12-13.

3. Создание стандартной лабораторной панели сывороток для выявления антител к ВЛКРС / Соавт.: Р.З. Файзулин, Ю.В. Туманов, В.А. Белявская, В.В. Храмцов // Матер. науч.-практ. конф., посвящ. 70-летию Иркутской НИВС. – Иркутск, 2002. – С. 21-23.

4. Сравнительный анализ разных коммерческих тест-систем и методов в диагностике ВЛКРС / Соавт. Ю.В. Туманов // Актуальные вопросы ветеринарии: матер. Сиб. междунар. науч.-практ. конф. - Новосибирск, 2004. – С. 304-308.

5. Результаты сравнительных диагностических исследований лейкоза крупного рогатого скота при использовании ПЦР / Соавт. С.В. Чичинина // Современные проблемы эпизоотологии: матер. междунар. науч. конф. (Краснообск, 30 июня 2004 г.). - Новосибирск, 2004. – С. 282-286.

6. Значение ИФА и ПЦР в диагностике вирусного лейкоза крупного рогатого скота / Соавт.: С.В. Чичинина, О.П. Иванов, М.Н. Ткаченко // Актуальные вопросы ветеринарной медицины: матер. Сиб. междунар. ветеринар. конгр. / НГАУ. – Новосибирск, 2005. – С. 123-124.

7. Использование различных по природе антигенов для диагностики инфекции ВЛКРС / Соавт.: В.В. Храмцов, Ю.В. Туманов, С.Я. Таслицкий // Актуальные проблемы ветеринарного обеспечения животноводства Сибири: сб. науч. тр. / РАСХН. Сиб. отд.-ние. ИЭВСиДВ. - Новосибирск, 2006. – С. 73-76.

8. Проблема интерпретации сомнительных, по результатам РИД, проб в диагностике инфекции вируса лейкоза крупного рогатого скота / Адаптация, здоровье и продуктивность животных: сб. науч. тр. (Новосибирск, 22-23 мая 2008 г.). - Новосибирск, 2008. – С. 81-82.

Подписано в печать 30.12.08. Формат 60x84 1/16
Объем 1 п.л. Тираж 100 экз. Заказ № 12.

Отпечатано в ИИЦГНУ ЦНСХБ
630501, Новосибирская обл., пос. Краснообск