



На правах рукописи

ТКАЧЕНКО Марина Николаевна

**ОСОБЕННОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ У
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПРИ ЛЕЙКОЗЕ С УЧЕТОМ
ВЛИЯНИЯ БИОТИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ**

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

М.С.Ткаченко 14 МАЯ 2009

Новосибирск 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 ветеринарных наук,
старший научный сотрудник
Разумовская Валентина Владимировна,
кандидат ветеринарных наук,
доцент
Вольф Виктор Теодорович

Ведущая организация: **Всероссийский** научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко (ВИЭВ)

Защита диссертации состоится *26 мая 2009 г. в 14⁰⁰* ч. на заседании диссертационного совета Д.006.045.01 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 *«22» апреля 2009 г.*

Учёный секретарь
диссертационного совета, к.в.н.



Стеблева Г.М.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Необходимость эпизоотологического мониторинга при инфекции вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) и гематологическом проявлении болезни очевидна, поскольку определяет эффективность последующих специальных и организационно-хозяйственных мероприятий на уровне ферм, сельхозпредприятий, районов, областей и краев РФ (В.М. Нахмансон, 1986; В.М. Авилов, 1995; П.Н. Смирнов, 1995; А.Т. Татарчук и др., 1996; И.М. Донник, 1997; А.Г. Незавитин, 1997; Н.И. Петров, 1998; М.И. Гулюкин, 1999; В.В. Разумовская, 2000; А.А. Русинович, 2002).

Оздоровительные мероприятия от лейкоза крупного рогатого скота базируются на качественном зоотехническом учете поголовья животных, эффективной диагностике болезни и организационно-хозяйственных мероприятиях, предполагающих своевременное выявление инфицированных и больных лейкозом животных и удаление их из стада; изолированном выращивании благополучного молодняка; рациональном внутривладельческом перемещении животных, исключающим распространение инфекции; системе учета и статистической обработки данных ветеринарной отчетности (В.В. Храмов и др., 2000; Л.Б. Прохвятилова и др., 2001; Ю.П. Смирнов, 2001; М.И. Гулюкин и др., 2002; С.И. Логинов, 2002; М.И. Гулюкин, Л.А. Иванова и др., 2008).

При проведении диагностических (серологических и гематологических) исследований необходимо учитывать возможное влияние на картину крови и уровень специфических антител некоторых физиологических и биотических факторов, которое изучено недостаточно. Такое влияние определяется в основном сочетанным течением инфекции и лейкоза с другими распространенными бактериальными и вирусными болезнями, а также некоторыми физиологическими особенностями и адаптивными реакциями организма (Г.А. Симонян, 1995; А.Н. Трунов и др., 1999; И.М. Донник, 2000; А.И. Павлова, 2001; А.С. Кашин, 2002; J. Franc et al., 1979; T. Inone, 1981; P. Rainard, 1986; J. Hadden, 1992).

Доказано, что изменение количественного соотношения клеток крови возможно при паразитарных заболеваниях, ассоциациях с бактериями и грибами, влиянии других биологических агентов (Ф.А. Волков, 1996; Ю.Н. Федоров, 1996; А.Ф. Бакшеев, 2003; V. Valpotic et al., 1986; P.L. Skipper et al., 1994).

Необходимо также учитывать возможность количественных изменений форменных элементов крови и титра антител при развитии симптомов иммунологической недостаточности, обусловленной влиянием ВЛКРС. Все это определяет необходимость дальнейшего поиска и изучения биотических и абиотических факторов, влияющих на показатели иммунного ответа, в том числе качественные и количественные характеристики крови крупного рогатого скота, что повысит объективность оценки результатов

диагностических исследований на лейкоз, в том числе и в Ханты-Мансийском автономном округе.

Цель работы. Изучить особенности распространения инфекции ВЛКРС и лейкоза в Ханты-Мансийском автономном округе, влияние биотических и физиологических факторов на картину крови, количество антител в сыворотке крови животных с разной степенью компрометации к лейкозу и объективность результатов диагностических исследований.

Задачи исследований:

1. Определить показатели инфицированности, заболеваемости и территориальной приуроченности лейкоза крупного рогатого скота в сельхозпредприятиях Ханты-Мансийского автономного округа.

2. Оценить эффективность гематологического метода диагностики лейкоза путем выведения лейкоформулы в сопоставлении с результатами, полученными при фазово-контрастном микрофотографировании.

3. Изучить влияние физиологических и биотических факторов на картину крови и количество антител в сыворотке крови животных с разной степенью компрометации к лейкозу и на результаты диагностических исследований.

4. Сопоставить эффективность гематологических и серологических (РИД, ИФА) методов диагностики инфекции ВЛКРС и лейкоза и предложить рациональные схемы применения тест-системы РИД при разработке противолейкозных мероприятий на примере отдельных хозяйств.

Научная новизна работы. Проведен анализ эпизоотической ситуации в округе по показателям инфицированности, заболеваемости и территориальной приуроченности инфекции ВЛКРС и лейкоза крупного рогатого скота. Показана динамика последующего улучшения эпизоотической ситуации по инфекции и лейкозу крупного рогатого скота, как результат реализации комплексной научнообоснованной системы профилактики и борьбы с лейкозом крупного рогатого скота в сельхозпредприятиях ХМАО.

Установлено, что определенные периоды стельности (третий триместр) могут влиять на результаты диагностических (серологических и гематологических) исследований. Определены некоторые особенности реагирования животных после введения вакцины против сибирской язвы.

Изучена диагностическая эффективность РИД, ИФА-тест-систем.

Практическое значение работы. Проведено ранжирование территории округа в разрезе районов в зависимости от эпизоотической ситуации по инфекции ВЛКРС и лейкозу крупного рогатого скота.

Реализация окружной программы специальных и организационно-хозяйственных мероприятий позволила снизить уровень инфицированности животных с 10,3 (в 2001г.) до 1,0% (в 2007г.) и стабилизировать уровень заболеваемости в среднем по округу в пределах 1,6%.

На примере хозяйств определены схемы применения тест-системы РИД. Установлено, что максимальное количество инфицированных животных выявляется при двух (первом и втором) исследованиях. При этом,

увеличение кратности исследований обосновано при высоком уровне инфицированности и нерационально – при низком.

В условиях производственного эксперимента показано, что разделение стада на группы инфицированных и интактных животных необходимо проводить по результатам двух, а не однократных исследований.

Получены данные о том, что классический гематологический метод выведения лейкоформулы, в отличие от фазово-контрастного микрофотоирования, позволяет более объективно оценивать картину крови и подтверждать диагноз на лейкоз, однако уступает последнему по длительности проведения исследований и трудоемкости. Таким образом, метод выведения лейкоформулы предпочтительно применять в случае диагностирования у животных других, ассоциативных заболеваний, вызывающих изменение картины крови.

Установлено, что породный состав и молочная продуктивность животных не требует дополнительной дифференциальной диагностики.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Особенности эпизоотической ситуации по инфекции ВЛКРС и лейкозу крупного рогатого скота в сельхозпредприятиях Ханты-Мансийского АО.

2. Показатели диагностической эффективности гематологического метода диагностики лейкоза путем выведения лейкоформулы в сопоставлении с результатами, полученными при фазово-контрастном микрофотоировании.

3. Оценка влияния на картину крови и содержание в сыворотке крови относительного количества антител к ВЛКРС биотических и физиологических факторов.

4. Регламент применения РИД тест-системы при диагностике и профилактике инфекции вируса лейкоза крупного рогатого скота в зависимости от эпизоотической ситуации.

Апробация работы. Результаты исследований доложены и обсуждены на межрегиональной научно-практической конференции «Проблемы экологии в программах профессионального образования» (Новосибирск, 2000 г.); на 2-й международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы зоотехнической науки и практики» (Ставрополь, 2003г.); на 6-й Международной конференции «Аграрная наука Сибири, Монголии, Казахстана и Башкортостана» (Павлодар, 2003г.); на 4-й Сибирской международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы ветеринарной медицины» (Новосибирск, 2004г.).

Публикация результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 4 научные работы, в том числе 1 в журнале, рекомендованном ВАК РФ.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 120 страницах и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения, список литературы и приложение. Диссертация иллюстрирована 26

таблицами и 3 рисунками. Список литературы включает 240 источников, в том числе 74 зарубежных.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнялась в 2000-2008 гг. в лаборатории лейкозов ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО Россельхозакадемии, а также с использованием материально-технической базы окружной лаборатории (ХМАО).

Объект и предмет исследований - клинически здоровый (интактный), спонтанно инфицированный вирусом и больной лейкозом крупный рогатый скот, содержащийся в хозяйствах округа.

Диагностические исследования проводили в соответствии с Методическими указаниями по диагностике лейкоза крупного рогатого скота (М., 2000). Были также использованы данные официальной ветеринарной отчетности Управления ветеринарии и ветеринарной лаборатории Ханты-Мансийского АО.

Показатели эпизоотического процесса определяли в соответствии с методическими рекомендациями, рассчитывая уровень инфицированности, заболеваемости, территориальной приуроченности и процент охвата поголовья животных диагностическими исследованиями (С.И. Джупина, А.А. Колосов, 1991).

Относительное количество антител в сыворотке крови крупного рогатого скота определяли в тест-системе ИФА с использованием автоматического спектроанализатора и коммерческих стандартных наборов в соответствии с наставлением. Исследованию подвергались животные разных пород, возраста и сроков стельности.

В общей сложности комплексному лабораторному исследованию было подвергнуто более 550 голов крупного рогатого скота.

Статистическая обработка полученных данных включала подсчет средних арифметических (M), стандартных ошибок (m). В таблицах информация представлена в виде $M \pm m$. Уровень значимости различий вариационных рядов оценивали параметрическим t -критерием Стьюдента.

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1. Распространение инфекции ВЛКРС и частота гематологического проявления лейкоза в сельхозпредприятиях в Ханты-Мансийском автономном округе

По результатам диагностических исследований было установлено, что при благополучии округа по туберкулезу и бруцеллезу более 11% животных

сельхозпредприятий округа было поражено вирусом лейкоза, а в отдельных хозяйствах Сургутского района инфицированность достигала 21%.

Расчет показателей территориальной приуроченности инфекции ВЛКРС показал, что минимальные показатели (первая группа) были определены в Белоярском, Октябрьском, Советском и Кондинском районах - 0,05-5,8%. Максимальный уровень инфицированности животных зарегистрирован в четвертой группе в которую вошел Сургутский район с показателем инфицированности 23,2%.

Анализ результатов гематологических исследований показывает, что за период 2000-2004 гг. исследованию было подвергнуто 13150 коров в 9 административных районах округа. В целом по округу просматривается тенденция снижения заболеваемости от 2,2 в 2000г. до 1,8 в 2002г. и 1,5% в 2003 г. Вариабельность показателей заболеваемости, была значительной и находилась в среднем за 4 года в пределах 0,96 – 13,9% в Сургутском и Кондинском районах соответственно.

Расчеты показателей территориальной приуроченности по заболеваемости свидетельствуют о следующем. В первой группе районов - Белоярском и Советском, случаи больных лейкозом животных не регистрируются с 2000 г. Вторая группа представлена Березовским, Октябрьским, Сургутским, Нефтеюганским и Нижневартовским районами, имеющими показатели заболеваемости 0,9-4,2%. В третью группу с заболеваемостью содержащихся на их территории животных 4,2-7,4% вошел Ханты-Мансийский район. Четвертая группа районов с уровнем заболеваемости 7,4-10,7% не представлена. В пятую группу с максимальными показателями заболеваемости 10,7-13,9 вошел Кондинский район – 13,9%.

Таким образом, принятие и выполнение специальных и организационно-хозяйственных мер позволило за 2001-2007 гг. улучшить эпизоотическую ситуацию и выйти на полное оздоровление округа (табл.1).

По результатам гематологического исследования видно, что средний показатель заболеваемости варьировал от 1,8% в 2001г до 1,1% в 2002г. и до 1,7% в 2006. В 2006г. гематологическому исследованию было подвергнуто 1327 коров, из этого количества у 23-х (1,7%) был подтвержден диагноз на лейкоз. Средний показатель за 6 лет составил 1,6%. В 2007г. уровень заболеваемости и инфицированности по сельхозпредприятиям округа составил 0,8 и 1,0% соответственно. Показатель инфицированности животных ВЛКРС уменьшился за анализируемый период от 10,3 в 2001г до 1,0% в 2007г.

Таблица 1 – Результаты гематологического и серологического исследований крупного рогатого скота на лейкоз и инфекцию ВЛКРС по округу в динамике

Год	Результаты гематологических исследований			Результаты серологических (РИД) исследований		
	исследовано всего, гол	выявлено больных	%	исследовано всего, гол.	выявлено носителей ВЛКРС	%
2001	4630	84	1,8	18584	1927	10,3
2002	5024	60	1,1	18382	1056	5,7
2003	1677	23	1,3	16718	1582	9,4
2004	2113	60	2,8	16812	1103	6,5
2005	1279	19	1,4	15372	648	4,2
2006	1327	23	1,7	14486	363	2,5
2007	1200	10	0,8	14400	153	1,0

Более благоприятная эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в хозяйствах округа объясняется территориальной изолированностью хозяйств, ограниченным контактом животных, менее интенсивными межхозяйственными связями, в том числе закупом и ввозом скота, что связано с большими расстояниями, разделяющими территории районов и сельхозпредприятий.

2.2.2. Физиологические, биотические и абиотические факторы, влияющие на картину крови и относительное количество специфических антител у животных с разной степенью компрометации к лейкозу

2.2.2.1. Сопоставление результатов гематологических исследований на лейкоз, полученных методами выведения лейкоформулы и фазово-контрастного микрокопирования

Гематологическая диагностика лейкоза основывается на определении количества лейкоцитов в 1 мкл крови, выявлении изменений в процентном соотношении отдельных видов лейкоцитов в лейкограмме и сдвигов в абсолютном числе их в 1 мкл крови, а также в обнаружении молодых, незрелых форм белых кровяных телец, в основном лимфоидного ряда и атипичных клеток в крови.

Модификацией классического гематологического метода диагностики следует считать фазово-контрастное микрокопирование крови для постановки диагноза.

При сопоставлении данных (табл.2), полученных гематологическим методом светового и фазово-контрастного микрофотоирования установлено, что при исследовании методом фазово-контрастного микрофотоирования выявлено 11 животных, больных лейкозом, тогда как при выведении лейкоформулы – 10. При исследовании крови подозреваемых в заболевании коров с использованием КФ-4 выявили 3 головы (10%), а при выведении лейкоформулы 10 гол. (33%).

Таблица 2- Результаты сопоставления гематологического исследования на лейкоз с использованием фазово-контрастного устройства и выведением лейкоформулы

Стадия проявления болезни	Метод исследования	
	фазово-контрастный	выведение лейкограммы
Лейкоз	11 гол	10 гол
	36,7 %	33,3 %
Подозрение на лейкоз	3 гол	10 гол
	10,0 %	33,3 %
Инфицированные ВЛКРС	15 гол	9 гол
	50,0 %	33,3%
Интактные (контроль)	5гол	5 гол

Все животные с диагнозом - лейкоз, поставленным методом микрофотоирования с фазово-контрастным устройством, но не совпадающим с диагнозом, установленным по лейкоформуле, попали в группу с диагнозом подозреваемые в заболевании

Таким образом, результаты, полученные как классическим методом с выведением лейкоформулы, так и с использованием фазово-контрастного устройства, объективны и, отчасти, сопоставимы.

Наибольшее совпадение получено при исследовании больного лейкозом крупного рогатого скота, наименьшее при постановке заключительного диагноза у животных с подозрением на лейкоз.

Следует считать, что классический метод наиболее точен, так как позволяет выявлять не только повышение количества лимфоцитов в крови, но и обнаруживать молодые, незрелые формы белых кровяных телец, в основном, лимфоидного ряда. Однако он не технологичен, менее производителен и более трудоёмок, особенно, при проведении массовых диагностических исследований. Использование фазово-контрастного микрофотоирования позволяет поднять производительность исследований в 3,5-4 раза.

При проведении массовых гематологических исследований, целесообразно использование устройства ФК-4, а пробы крови подозреваемых в заболевании животных рекомендуется исследовать классическим методом с выведением лейкоформулы. Комбинированное

использование методов позволяет повысить производительность и объективность результатов исследования.

2.2.2.2. Результаты гематологической оценки картины крови у инфицированных ВЛКРС животных, разной породной принадлежности, продуктивности и сроков стельности

По результатам проведенных исследований достоверной разницы по клеткам крови (за исключением сегментоядерных) в зависимости от породной принадлежности не установлено.

При гематологическом исследовании коров с молочной продуктивностью от 1500 до 4500кг. достоверной разницы по количеству определяемых форменных элементов крови также не установлено.

Важным является изучение влияния на картину крови и объективность диагностических исследований такого физиологического состояния, как стельность (табл.3).

Таблица 3-Результаты гематологических исследований инфицированных ВЛКРС коров в разные сроки стельности

Показатель	Срок стельности, мес.			
	1-3 n=12	4-6 n=12	7-9 n=12	Не стельные (контроль)
Лейкоциты	7,7+1,4	5,9+0,33	8,4+1,1*	6,0+0,5
Лимфоциты,%	55,2+1,3*	50,4+2,0	63,1+2,4*	50,7+2,1
Эозинофилы,%	20,3+2,1*	14,4+2,0*	12,3+1,9*	8,3+1,6
Палочкоядерные,%	1,8+0,39	1,8+0,21	2,9+0,4*	1,9+0,3
Сегментоядерные,%	18,3+3,2	30,8+3,0	34,0+3,3*	25,3+1,9

Примечание: * Разница достоверна ($P < 0,034$)

Повышенное количество лимфоцитов 55,2+1,3 и 63,1+2,4% установлено у коров в первом и третьем триместре стельности.

Установлено, в сопоставлении с контролем, увеличение относительного количества эозинофилов у коров первого, второго и третьего триместра стельности. Максимальные их значения зарегистрированы в первом (20,3+2,1) и во втором (14,4+2,0) триместре стельности. У животных в третьем триместре стельности достоверно выше количество палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов. Однако возможность лабораторной ошибки при постановке диагноза на лейкоз при этом не велика.

2.2.2.3. Гематологические показатели коров с разной степенью компрометации к лейкозу, больных маститами и некробактериозом

По результатам исследования установлено, что изменения картины крови подозрительных и больных лейкозом животных при сочетанном течение с маститами и некробактериозом, характеризуются увеличением

количества лейкоцитов, прежде всего, за счет нейтрофилов со сдвигом ядра влево. Как правило, такое увеличение количества клеток носит ареактивный характер и не связано с поражением лимфоидной ткани.

При изучении картины крови больных лейкозом животных в ассоциации с диктиокаулезом показано, что изменение крови происходит за счет лейкоцитов, в частности эозинофилов.

Целый ряд острых и хронических заболеваний сопровождаются изменениями в составе крови, в частности, изменением количества и соотношения различных типов лейкоцитов. Однако, эти изменения носят реактивный, защитный характер и определяются как лейкомоидная реакция организма. Они отличаются от изменений, возникающих при лейкозе и других заболеваниях кроветворной системы тем, что отражают функциональные, а не органические нарушения в кроветворных органах.

2.2.2.4. Относительное количество антител и особенности реагирования в ИФА инфицированного ВЛКРС крупного рогатого скота разных возрастных групп и сроков стельности

Из данных, представленных в таблице 4, видно, что максимальные средние значения определены у животных в возрасте 8-10 лет – 109,70 EU; далее у животных в возрасте 2лет -109,50; 3-4 лет – 109,07 и 5-7 – 102,81 EU.

Наибольший разброс максимальных и минимальных показателей оптической плотности зарегистрирован у животных 3-4 лет – 100,22 и 109,07. Минимальный у коров 5-7 лет – 99,39 и 102,81 EU.

Таким образом, разница показателей относительного содержания антител у инфицированных животных разных возрастных групп не существенна и не влияет на результаты исследований в РИД и ИФА.

Таблица 4 - Относительное содержание антител (EU) в сыворотке крови инфицированных ВЛКРС коров разных возрастных групп

№ группы животных	Возраст животных	Максимальное значение в группе	Минимальное значение в группе	Среднее значение в группе
1	8 лет (n=50)	109,70	103,55	105,67
2	5-7лет (n=50)	102,81	99,39	101,19
3	3-4года (n=50)	109,07	100,22	104,67
4	2года (n=50)	109,50	100,00	104,1

Далее оценивали возможное влияние на результаты диагностических исследований при инфекции ВЛКРС стельности (табл.5).

Таблица 5 - Содержание относительного количества антител в сыворотке инфицированного ВЛКРС крупного рогатого скота в зависимости от сроков стельности, (EU)

Физиологическое состояние животных			
стельность 1-3мес (n=20)	стельность 4-6 мес (n=20)	стельность 6-9мес (n=20)	контроль (n=20)
относительное количество антител к ВЛКРС (макс/мин/средн.)			
105,0/103,2/104,5	109,7/110,2/109,9	98,1/90,4/94,2*	117,5/115,0/116,2

Примечание: * Разница достоверна в сопоставлении с показателями животных других экспериментальных групп и контролем.

В группе нестельных животных среднее значение относительного количества антител в сыворотке крови было максимальным - 116,6 EU, у коров во втором триместре стельности - 110,2, в первом - 103,2 в третьем - 90,4 EU.

Было установлено, что фактор стельности влияет на относительное количество антител и, следовательно, на результаты серологических исследований и должен быть учтен при постановке реакции, учете и интерпретации результатов.

Понижение относительного количества антител у животных со стельностью 6-9 мес. обусловлено, вероятно, периодом запуска и обратной (частичной) транспортировкой иммуноглобулинов из сыворотки крови в молоко.

Результаты сопоставления особенностей реагирования в ИФА пренатально и постнатально инфицированных ВЛКРС телят показали, что уровень антител спонтанно инфицированных телят, по результатам исследования их в возрасте 6 мес. (67,31EU), достоверно превышал значения, полученные у животных, инфицированных пренатально (18,82EU). Эта группа телят не реагировала в РИД.

2.2.2.5. Относительное количество антител и особенности реагирования в РИД и ИФА крупного рогатого скота до и после вакцинации против сибирской язвы

Одним из факторов, влияющих на особенности проявления серологических реакций могут быть, по мнению некоторых исследователей, средства специфической профилактики животных.

Показатели исследований сыворотки крови животных в РИД и ИФА до применения вакцины свидетельствуют о том, что у 14 из 20 животных, исследованных в РИД и ИФА, результаты тестирования совпали.

Дополнительно в ИФА выявлено 6 животных. Таким образом, у 6 животных имело место «выпадение» реакции иммунодиффузионной преципитации. Следует отметить, что относительное количество антител к

ВЛКРС у таких животных не превышало значений 15,09-99,3 EU. Максимальные значения относительного количества антител (более 100 EU), определены у 10 коров и варьировали от 138,14 до 104,32 EU. Минимальные показатели (менее 100 EU) определены у 8 животных и варьировали от 18,24 до 99,32 EU.

Результатами повторного исследования крупного рогатого скота в РИД и ИФА, проведенного через 24 дня после вакцинации против сибирской язвы установлено, что из 20 исследованных в РИД реагировало 11, в ИФА -19 животных. При этом изменения относительного количества антител имели следующий характер: у 4-х животных содержание антител возросло - от 74,52 до 76,24, от 99,32 до 101,23, от 117,10 до 118,22 и от 127,53 до 130,53 EU. У 7 животных зарегистрировано понижение количества антител от 16,99 до 29,60 EU. У одного реакция в ИФА исчезла.

У других животных двух опытных групп, показатели оставались на относительно равном уровне.

Таким образом, установлено влияние поливалентной вакцины на относительное количество антител у инфицированных животных, что необходимо учитывать при проведении диагностических исследований.

Механизм такого воздействия требует дополнительного изучения.

2.2.2.6. Относительное количество антител и особенности реагирования в РИД и ИФА крупного рогатого скота, инфицированного ВЛКРС первого генотипа

С целью изучения возможного влияния ВЛКРС 1-го генотипа (в сопоставлении с другими, не изученными) на относительное содержание антител у инфицированных животных были проведены исследования, результаты которых представлены в табл.6, 7.

Таблица 6 – Результаты диагностических исследований в ИФА сыворотки крови крупного рогатого скота, инфицированного ВЛКРС первого генотипа

Животные	Количество исследованных проб	Результаты ИФА (EU)	Количество выявленных животных данного генотипа	
			2	РИД (1:6)
Инфицированные ВЛКРС	10	27,1+0,6	2	РИД (1:6)
Больные лейкозом	10	125,4+0,4*	4	РИД (1:12)

Таблица 7 – Результаты диагностических исследований в ИФА сыворотки крови крупного рогатого скота, инфицированного ВЛКРС не установленных генотипов

Животные	Количество исследованных проб	Результаты ИФА (EU)	Количество выявленных животных других генотипов	
Инфицированные ВЛКРС	10	26,8±0,4	8	РИД (1:6)
Больные лейкозом	10	123,5±0,3*	6	РИД (1:12)

Примечание: * Разница достоверна в сопоставлении с инфицированными животными

Возможно в число животных, представленных как инфицированных ВЛКРС неизвестных генотипов, входят и инфицированные первым генотипом, что затрудняет интерпретацию данных. Тем не менее, не установлено различия по относительному количеству содержащихся в сыворотке крови антител у животных, инфицированных ВЛКРС 1-го генотипа в сопоставлении с животными, инфицированными другими генотипами вируса. По результатам исследований установлено, что показатель относительного количества антител варьировал от 26,8 до 27,1 EU у инфицированных и от 123,5 до 125,4 - у гематологически больных животных.

2.2.2.7. Регламент исследований крупного рогатого скота в РИД в хозяйствах с разной эпизоотической ситуацией по инфекции ВЛКРС

По результатам проведенных серологических исследований установлено, что независимо от уровня вирусоносительства максимальное количество инфицированных ВЛКРС выявляется при проведении первых трех диагностических исследований с интервалом 1 раз в 4 мес. (табл. 8), а не в 2 и 3 мес., как рекомендуется.

Таблица 8 – Результаты трехкратных, последовательно проведенных серологических исследований в РИД животных, при первоначальном среднем уровне инфицированности – 10, 30 и 60%

Средний (по группе) уровень инфицированности животных ВЛКРС- 10%									
коровы	первое исследование	РИД (+)	%	второе исследование	РИД (+)	%	третье исследование	%	РИД (+)
Средний (по группе) уровень инфицированности животных ВЛКРС- 30%									
коровы (n=200)	первое исследование			второе исследование			третье исследование		
	исследовано	РИД (+)	%	исследовано	РИД (+)	%	исследовано	РИД (+)	%
	200	58	29	142	15	14,1	127	13	10,2
Средний (по группе) уровень инфицированности животных – 60%									
коровы n=150	исследовано	РИД (+)	%	исследовано	РИД (+)	%	исследовано	РИД (+)	%

Так, при уровне инфицированности 10% группы животных в количестве 200 голов, первое исследование позволило выявить 13,5, второе - 8,6 и третье - 3,1%. При последующем исследовании был получен первый «отрицательный» результат, позволяющий объявить стадо (двор) условно благополучным по инфекции вируса лейкоз. Последующие исследования допустимо проводить с интервалом 1 раз в 5-6 мес., поскольку дополнительное выявление инфицированных возможно по мере нарастания титра антител у животных-вирусоносителей, что согласуется с данными, полученными ранее другими исследователями. Это определяет, за счет сокращения кратности серологических исследований и снижения необходимого количества дорогостоящего антигена, экономичность регламента работ.

Таким образом, оздоровление или создание условно благополучных групп (стад, гуртов) при таком регламенте возможно через 12 мес. Однако это предполагаемая схема распространяется только при оздоровлении групп животных с низкой или средней инфицированностью.

При проведении исследований животных с инфицированностью 30% с кратностью 1 раз в 4 мес. по результатам первого, второго и третьего исследований было выявлено в РИД 29,0, 14,1 и 10,2% соответственно. При последующих исследованиях животных-носителей вируса лейкоза выявляется в пределах 4%. Такой вариант оздоровления позволяет снизить уровень инфицированности от 30 до 10% и проводить в этой группе (ферме, хозяйству) оздоровление по варианту (схеме), представленному и рассмотренному выше (группы животных с инфицированностью 10%).

Таким образом, это также позволяет проводить оздоровительную работу с наименьшими финансовыми затратами, которые включают стоимость диагностикума, диагностических исследований, оплату рабочих-фиксаторов, потерю молока на 4-8%, обусловленную стрессом при фиксации и кровобратии, транспортные расходы, связанные с доставкой биоматериала и т.д.

Гематологическому исследованию при данном варианте оздоровления подлежат только инфицированные, а не вся группа животных. В данном случае - 86 коров. Такой регламент серологических исследований позволяет избежать массовых и трудоемких гематологических исследований групп животных при уровне инфицированности до 30 и более процентов, как это регламентировано Правилами, а также получать молодняк от животных условно благополучных групп, молоко для выльйки телят.

При уровне инфицированности группы животных до 60%, по результатам исследований было выявлено реагирующих в РИД 58, 39,6 и 31,5%. Результаты исследований показывают, что удаление инфицированных животных с высоким уровнем инфицированности позволяет свести этот показатель до 30% и вести оздоровление по второму варианту. Однако, как видно из таблицы 8 из 150 трехкратно исследованных животных остается только 26.

Следовательно, разделение стада в данной ситуации возможно только при имеющемся резерве благополучного по ВЛКРС ремонтного молодняка. При отсутствии такой возможности разделение стада животных с инфицированностью 60%, тем более по результатам первичного исследования, нецелесообразно. Экономически обоснованно проведение гематологических исследований только инфицированных коров.

При всех рассматриваемых вариантах и уровнях инфицированности, последующие исследования позволяли выявлять единичное количество животных-вирусоносителей. Это объясняется пределом чувствительности используемых для диагностики тест-систем и количеством животных, имеющих низкие титры антител, не выявленных при проведении ранее трехкратных исследований. При этом, чем ниже инфицированность стада, тем целесообразнее, как это не парадоксально, максимальное увеличение интервала между исследованиями в РИД или применение наиболее чувствительных методов диагностики, в частности, ИФА. Частые исследования в РИД стад с низким уровнем инфицированности не дают должного эффекта.

ВЫВОДЫ

1. В 2007г. уровень заболеваемости и инфицированности по сельхозпредприятиям округа составил 0,8 и 1,0%. Среднее значение показателя инфицированности за период 2001-2007гг. уменьшилось от 10,3 до 1,0%.

2. Результаты гематологического исследования, полученные как методом выведения лейкоформулы, так и фазово-контрастного микрофотографирования, объективны и сопоставимы. При исследовании подозрительных в заболевании животных методом выведения лейкоформулы диагноз на лейкоз подтверждается в 30%, а при использовании фазово-контрастного микрофотографирования в – 10% случаев от числа исследованных. Метод выведения лейкоформулы рекомендуется при исследовании подозрительных в заболевании животных, однако он менее производительен и более трудоемок при проведении массовых диагностических исследований.

3. Породная принадлежность и молочная продуктивность животных, не влияют на количество форменных элементов крови и, следовательно, на результаты гематологических исследований и постановку диагноза на лейкоз.

Количество лейкоцитов возрастает от $8,4 \pm 1,1$ до $6,0 \pm 0,5$ тыс/мкл, у коров в третьем триместре, а количество лимфоцитов от $55,2 \pm 1,3$ до $63,1 \pm 2,4\%$ у животных в первом и третьем триместре стельности.

4. У подозрительных и больных лейкозом животных при сочетанном течении с маститами и некробактериозом увеличивается количество лейкоцитов, прежде всего, за счет нейтрофилов со сдвигом ядра влево. При сочетанном течении с маститами и некробактериозом соотношение лейко-лимфоцитов было $23,8 \pm 1,1 : 15,6 \pm 1,3$ и $26,5 \pm 2,3 : 18,1 \pm 0,3$ в 1 мкл крови, соответственно.

5. Разница показателей относительного содержания антител у инфицированных животных разных возрастных групп не существенна, не влияет на результаты диагностических исследований в РИД и ИФА и не требует дифференцированного подхода при интерпретации результатов.

Максимальный «разброс» показателей оптической плотности установлен у животных 3-4 лет – 100,22 и 109,07; минимальный - у коров 5-7 лет – 99,39 и 102,81 EU.

6. Состояние стельности влияет на относительное количество антител и результаты серологических исследований, и должно учитываться при интерпретации результатов исследований, полученных в РИД и ИФА.

7. Уровень антител, у постнатально инфицированных телят (67,31+2,4 EU) достоверно превышал значения, полученные у животных, инфицированных пренатально. У 10% таких телят индивидуальные показатели оптической плотности были на границе, нерегистрируемой в РИД.

8. Введение вакцины Антравак шт. 55 влияет на количество антител у инфицированных ВЛКРС животных. Из 20 исследованных в РИД животных до введения вакцины реагировало 14, в ИФА – 20. После введения вакцины реагировало 11, в ИФА - 19. Эти изменения имели следующую динамику: у 4-х животных содержание антител возросло от 74,52 до 130,53 EU; у 7 - зарегистрировано понижение количества антител от 16,99 до 29,60 EU и у одного - реакция в ИФА исчезла.

9. Не выявлено разницы по относительному количеству содержащихся в сыворотке крови антител у животных, инфицированных ВЛКРС 1-го генотипа в сопоставлении с животными, инфицированными другими, не установленными генотипами вируса. Относительное количество антител варьировало от 26,8 до 27,1 у инфицированных и от 123,5 до 125,4 EU - у больных животных.

10 Регламент диагностики в РИД 1 раз в 4 мес. рационально использовать в хозяйствах с инфицированностью от 10 до 30%. Он позволяет по результатам двукратных исследований выявить максимальное (до 75%) количество инфицированных животных и обуславливает, за счет сокращения кратности исследований, издержек, связанных с кровобращением, потерей молока, обработки сыворотки крови и ее доставки и стоимости исследований, экономическую составляющую мероприятий.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Специалистам ветеринарных лабораторий при проведении гематологических исследований рекомендовано использовать комбинированный метод выведения лейкоформулы и фазово-контрстного микроскопирования.

Предложены рациональные схемы диагностики и оздоровления от инфекции ВЛКРС в хозяйствах с разным уровнем инфицированности.

Разработаны методические рекомендации: «Комплексная система профилактики и борьбы с лейкозом крупного рогатого скота для сельхозпредприятий всех форм собственности ХМАО» (утв. подсекцией «Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока» отделения ветеринарной медицины СО РАСХН, протокол № 2 от 19 апреля 2001 г. и заместителем председателя Правительства ХМАО, протокол № 26 от 25 июня 2001 г.).

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССРЕТАЦИИ

1. Определение относительного содержания антител с помощью иммуноферментного анализа при инфекции вируса лейкоза крупного рогатого скота / Соавт. В.Ф. Рудницкий // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. - №9. - 2007. - С. 103-106.

2. Комплексная научно обоснованная программа оздоровления стад крупного рогатого скота от лейкоза в Ханты-Мансийском автономном округе / Соавт. О.П. Иванов // Актуальные вопросы зоотехнической науки и практики, как основа улучшений продуктивных качеств и здоровья сельскохозяйственных животных: Матер. 2-й Междунар. научн.-практ. конф. - Ставрополь, 2003. - С. 325-326.

3. Методология организации и проведения противолейкозных мероприятий в хозяйствах ХМАО / Соавт. О.П. Иванов // Аграрная наука Сибири, Монголии и Башкортостана сельскому хозяйству: Матер. 6-й междунар. конф. (Павлодар, 9-10 июля 2003г.) / РАСХН. Сиб. отд-ние. - Новосибирск, 2003. - С. 122-124.

4. Иммунобиохимический интерьер крупного рогатого скота, содержащегося в хозяйствах разных форм собственности / Соавт.: С.Н. Магер, Е.С. Демиентьева // Актуальные вопросы ветеринарной медицины: Матер. Сибирской ветеринарной конф. - Новосибирск, 2008. - С. 229-231.

Отпечатано в типографии Новосибирского
государственного технического университета
630092, г. Новосибирск, пр. К. Маркса, 20,
тел./факс (383) 346-08-57
формат 60 X 84/16, объем 1.25 п.л., тираж 100 экз..
заказ № 245 подписано в печать 16.04.09 г.