

На правах рукописи



**Бахметьева Светлана Васильевна**

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕРОЛОГИЧЕСКОГО ТЕСТА РИД  
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БОЛЬНЫХ ЛЕЙКОЗОМ ЖИВОТНЫХ**

**16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология,  
эпизоотология, микология с микотоксинологией, иммунология**

**А в т о р е ф е р а т**  
**диссертации на соискание ученой степени**  
**кандидата ветеринарных наук**

**Благовещенск – 2006**

Работа выполнена в Государственном учреждении Дальневосточном зональном научно-исследовательском ветеринарном институте

**Научный руководитель:** доктор ветеринарных наук  
Гаврилова Галина Антоновна

**Официальные оппоненты:** - доктор ветеринарных наук, профессор  
Салимов Рафазль Маммедсалим оглы  
- кандидат ветеринарных наук  
Копейкин Юрий Александрович

**Ведущая организация** – ФГОУ ВПО Приморская государственная сельскохозяйственная академия (г. Уссурийск)

Защита состоится «19» мая 2006 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета КМ 220.027.01 в Дальневосточном государственном аграрном университете (675005, Благовещенск, ул. Политехническая, 86)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Дальневосточного государственного аграрного университета (675005, Благовещенск, ул. Политехническая, 86)

Автореферат разослан «17» *сентября* 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор ветеринарных наук, профессор



Мандро Н.М.

2006 А  
8179

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** В настоящее время среди инфекционных болезней сельскохозяйственных животных особого внимания заслуживает лейкоз крупного рогатого скота (Г.А. Симонян, 1997; П.Я. Гушин, 1999; Г.Ф. Коромыслов, 1999; В.Л. Тихонов, 1999; Ю.П. Смирнов, 2002; Г.А. Гаврилова, 2005; М.И. Гулюкин, 2005; А.М. Смирнов, 2005).

Открытие вируса лейкоза крупного рогатого скота (J. Miller et al., 1972), разработка методов его обнаружения позволили по-новому строить как диагностику, так и систему оздоровления стад крупного рогатого скота от лейкозов.

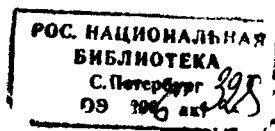
Известные на сегодняшний день методы прижизненной диагностики, основанные на детекции ВЛКРС при помощи РИД с гликопротеидным антигеном, различных модификаций ИФА и ПЦР, достаточно эффективны в борьбе с лейкозом. Об этом свидетельствуют многочисленные сообщения о положительных результатах, полученных в различных регионах РФ и за ее пределами (Н.И. Петров, 1997; Л.А. Иванова, 1999; А.А. Русинович, 1999, 2004; В.Л. Тихонов и соавт., 1999; Т.В. Щекотурова и соавт., 1999; А. Горбунов и соавт., 2000; М.И. Гулюкин и соавт., 2000, 2001; А.Т. Татарчук и соавт., 2001; В.В. Храмцов, 2001; Н.Т. Джапаралиев, 2002; К. Klintevall, 1995; В. Kozaczynska, 1999 и др.).

Однако, появление в оздоровленных хозяйствах вновь инфицированных вирусом лейкоза особой ставит под сомнение полноту выявления больных лейкозом и вирусносителей. Такие животные способствуют распространению инфекции, обуславливая непрерывность эпизоотического процесса и, как следствие, сохранение напряженной эпизоотической ситуации во многих регионах РФ (П.Н. Смирнов и соавт., 1989; И.И. Русанов, 2002; М.И. Гулюкин, 2005; И.М. Донник, 2005).

В связи с этим разработка и совершенствование методов и средств диагностики лейкоза по-прежнему остается важной задачей исследователей (Н.А. Мальцева, 2002; М.И. Гулюкин и соавт., 2002; А.М. Смирнов, 2005 и др.). Особый научный и практический интерес представляет изучение диагностических возможностей серологического (РИД) метода исследования крупного рогатого скота на лейкоз для выявления заболевания животных на ранних стадиях развития инфекционного процесса.

### **Цель работы.**

Изучить распространенность лейкоза крупного рогатого скота в Амурской области и выявить взаимосвязь титра антител к антигенам ВЛКРС при серологической (РИД) диагностике лейкоза крупного рогатого скота с гематологическими показателями инфицированных вирусом лейкоза животных.



### **Основные задачи исследований:**

1. Изучить уровень инфицированности крупного рогатого скота вирусом лейкоза в Амурской области.

2. Выявить корреляционную зависимость титра антител к антигенам ВЛКРС при серологической (РИД) диагностике лейкоза крупного рогатого скота с гематологическими показателями инфицированных вирусом лейкоза животных.

3. Усовершенствовать методику использования серологического теста РИД для выявления больных лейкозом животных.

### **Научная новизна.**

Впервые изучена распространенность лейкоза крупного рогатого скота в Амурской области, определен характер динамики проявления эпизоотического процесса, установлена зараженность ВЛКРС быков-производителей в зависимости от породного состава.

Выявлена прямая умеренная связь титра антител к антигенам вируса лейкоза крупного рогатого скота и количества лейкоцитов крови, а также прямая значительная связь титра антител к антигенам ВЛКРС и абсолютного количества лимфоцитов периферической крови по «лейкозному ключу».

Усовершенствована методика выявления больных лейкозом животных с использованием серологического теста РИД.

### **Практическая значимость работы.**

Данные по распространенности лейкоза в стадах крупного рогатого скота сельскохозяйственных предприятий и индивидуальных подворьях граждан области использованы для разработки рекомендаций по проведению профилактических и оздоровительных противолейкозных мероприятий в Амурской области, которые нашли отражение в Комплексной программе «Экономическое и социальное развитие Амурской области на 2004 – 2010 гг.».

Выявление в стаде серопозитивных животных с высокими (1:8 и выше) титрами антител к антигенам вируса лейкоза крупного рогатого скота может служить диагностическим и прогностическим признаком развития лейкозного и эпизоотического процессов.

Усовершенствованная методика диагностики лейкоза крупного рогатого скота с использованием РИД упрощает выявление больных животных, сокращает срок их нахождения в стаде, тем самым способствует снижению напряженности эпизоотической ситуации по лейкозу, дает возможность при однократном взятии для серологического в РИД исследования крови крупного рогатого скота на лейкоз повторного использования испытуемых положительно прореагировавших в РИД сывороток крови, проста в выполнении, не требует больших материальных затрат, дополнительных реакти-

вов и времени на проведение гематологических исследований, доступна любой ветеринарной лаборатории.

**Апробация работы.** Материалы диссертации доложены на Второй научной конференции с международным участием «Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера» (г. Новосибирск, 2002); на совместном заседании Бюро Отделений ветеринарной медицины и зоотехнии Россельхозакадемии «Опыт и стратегия борьбы с лейкозом крупного рогатого скота в племенных хозяйствах России» (г. Москва, 2002); на международной научно-практической конференции «Биологические ресурсы Российского Дальнего Востока» (г. Благовещенск, 2004); на I-ой, IV-ой, V-ой региональных межвузовских научно-практических конференциях «Молодежь XXI века: шаг в будущее» (г. Благовещенск, 2002, 2003, 2004); на ученых советах ДальЗНИВИ (2000 – 2005).

**Публикации результатов исследований.** По материалам исследований опубликовано 10 работ (из них 3 – в реферируемых журналах), в которых отражены основные положения и выводы по теме диссертации.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

- результаты изучения распространенности лейкоза крупного рогатого скота в Амурской области;
- материалы по выявлению корреляционной зависимости серологических (РИД) и гематологических показателей при развитии лейкозного процесса;
- усовершенствованная методика выявления больных лейкозом животных.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 134 страницах компьютерного текста. Состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических предложений, списка использованной литературы и приложения. Работа иллюстрирована 12 таблицами, одним рисунком. Список использованной литературы включает 260 источников, в т.ч. 44 - иностранных авторов.

## **СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **1. Материалы и методы исследований**

Работа выполнена в 2000 – 2005 гг. в лаборатории вирусологии ДальЗНИВИ, в хозяйствах Амурской области, на базе районных ветеринарных лабораторий в соответствии с заданиями тематических планов НИР института по государственным научно-техническим программам (№№ гос. рег. 01.99.0010757; 01.2.00306833) и договорами с АПК Амур-

ской области (№ 10-99; № 10-01). Использовали эпизоотологический, серологический (РИД), гематологический методы исследований.

При изучении эпизоотологических аспектов лейкоза крупного рогатого скота использовали рекомендации И.А. Бакулова (1979), В.М. Нахмансона и соавт.(1981), ретроспективные и экспериментальные приемы и способы исследований (В.А. Бусол, 1982). Использованы данные ветеринарной отчетности, материалы областной и районных ветеринарных лабораторий, результаты собственных исследований.

Исследования проводили согласно методическим указаниям по диагностике лейкоза крупного рогатого скота (М., 2000). Для серологической диагностики использовали реакцию иммунодиффузии (РИД) в агаровом геле согласно наставлению (1987). Использовали наборы Курской биофабрики. При обнаружении антител к ВЛКРС серологические исследования проводили в титрах до предельного разведения, начиная с разведения 1:2. Исследовано 2853 пробы крови крупного рогатого скота, в том числе от коров – 1599, телок разного возраста – 761, быков – 493. Проверка усовершенствованной методики проведена на поголовье 1583 голов.

Для гематологических исследований использовали стабилизированную 10 %-ным раствором «Трилон Б» кровь. Количество лейкоцитов определяли в камере Горяева, лейкоцитарную формулу выводили в мазках крови, окрашенных по Паппенгейму. Показатели абсолютного количества лимфоцитов оценивали по "лейкозному ключу". Микроскопирование проводили под иммерсией с помощью бинокулярного микроскопа «Биолан» (увеличение x900).

Для изучения инфицированности ВЛКРС быков-производителей работа проведена в 73 хозяйствах различных форм собственности 9 районов Приамурья, представленных колхозами, ООО, ТОО, СХА, агрофирмами, СП, ЗАО, СПК, КФХ, ОПХ, учхозом, частным сектором и подсобным хозяйством. РИД и гематологически исследовано 188 имеющих статус племенных быков-производителей четырех пород. При обнаружении антител к вирусу лейкоза серологические исследования проводили в титрах до предельного разведения.

Исследования по выявлению взаимосвязи титра антител к антигенам ВЛКРС с гематологическими показателями инфицированных вирусом лейкоза животных выполнены в базовом хозяйстве – СХА «Согласие» Ивановского района Амурской области. В опыте было 174 телочки, которых в двухмесячном возрасте метили жидким азотом. Содержание и кормление групповое. Наблюдения, серологические (РИД), а по достижении двухлетнего возраста в том числе и гематологические исследования опытных животных проводили до 39-месячного возраста (срок наблюдения).

При обнаружении антител к ВЛКРС отбирали сыворотки крови, положительно прореагировавшие в РИД и проводили их разведение в 2, 4, 8, 16 и т. д. раз до предельного разведения, при котором обнаруживались ан-

титела к антигенам ВЛКРС. Проведено 12803 исследования. Для разведения испытуемой положительной в РИД нативной сыворотки крови дополнительно к перечисленному в разделе 2.1.4. «Методических указаний по диагностике лейкоза крупного рогатого скота» (2000) оборудованию требуются стандартные планшеты для серологических реакций.

Исследование положительно реагирующих сывороток крови в разведениях проводили по той же методике, что и для нативной сыворотки. Отличием являлось то, что все 4 периферические лунки одной фигуры в чашке Петри заполняли разведенной в 2, 4, 8, 16 раз испытуемой сывороткой крови одного животного. При оценке реакции учитывали максимальное разведение, при котором образуется специфическая линия преципитации, которая соединяется с полосой преципитации контрольной сыворотки, образуя непрерывную линию.

При достижении опытными животными двухлетнего возраста проводили гематологические исследования.

Для изучения неспецифических защитных механизмов и специфического иммунного ответа у животных, находящихся на разных стадиях инфекционного процесса лейкоза, исследовали сыворотку от 27 коров. Определение общего белка сыворотки крови проводили биуретовой реакцией, белковых фракций сыворотки крови – турбидиметрически, фагоцитарной активности нейтрофилов (ФА), фагоцитарного индекса (ФИ), фагоцитарного числа (ФЧ) по Емельяненко (1987), лизоцимной активности (ЛА) сыворотки крови по Дорофейчику (1968), циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) методом преципитации в 3,5%- ном растворе полиэтиленгликоля. Определяли титр нормальных антител (ТНАТ), элиминирующую способность крови (ЭСК). Исследования проведены в трехкратной повторности. Выполнено 340 анализов.

Статистическая обработка проведена по И.А. Ойвину (1960). Полученные данные обработаны с помощью методов альтернативного варьирования и вариационной статистики. Среднее арифметическое (М), ошибка средней (m), показатель достоверности (t), коэффициент корреляции (r) рассчитывались по общепринятым формулам (Л.С. Каминский, 1964; И.Т. Шевченко и соавт., 1970).

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1 Распространенность лейкоза крупного рогатого скота в Амурской области

Анализ материалов ветеринарной статистической отчетности, научных публикаций прошлых лет показал, что в Амурской области заболевание крупного рогатого скота лейкозом впервые зарегистрировано в 1961 г. в совхозе «Егорьевский» Благовещенского района, где выращивали симментализированный скот. В 80 – 90-е гг. лейкоз крупного рогатого скота проявлялся серологически (РИД) с тенденцией к распространению.

В 90-е гг. резкое уменьшение численности молочного скота послужило причиной создания отрасли мясного скотоводства за счет завоза чистопородного скота и проведения промышленного скрещивания маточного поголовья симментальской и черно-пестрой пород с быками мясных пород. Отдельные случаи обнаружения лейкоза у крупного рогатого скота не принимались во внимание. Серологические (РИД) исследования на лейкоз до 2000 г. проводились в объеме 10 % поголовья. Невысокий процент выявленного серопозитивного скота приводил к тому, что его, как правило, выводили из стада. Считалось, что на этом мероприятия по борьбе с лейкозом были выполнены.

Распространению лейкозов крупного рогатого скота в области характерны приуроченность хозяйств к урбанизированным районам южной зоны и увеличение количества животных, генетически предрасположенных к лейкозу, в частности, черно-пестрой породы, количество которой и ее помесей в эти годы ежегодно увеличивалось.

С 2000 г. в области увеличился объем серологических (РИД) исследований крупного рогатого скота на лейкоз: за 2000 – 2003 гг. он в среднем составил 61 %, в том числе коров 39,7 % в 2000 г. с увеличением до 52,9 % в 2003 г. (табл. 1).

Таблица 1 – Охват поголовья крупного рогатого скота серологическими (РИД) исследованиями на лейкоз в Амурской области

Год	Исследовано в РИД, %	
	всего	в т.ч. коров
2000	64,3	46,2
2001	46,8	19,4
2002	67,6	40,4
2003	64,4	52,9



Инфицированность крупного рогатого скота вирусом лейкоза составила в среднем  $10,0 \pm 0,76$  % ( $P < 0,001$ ) с ростом этого показателя с 8 % в 2000 г. до 11,7 % в 2003 г. Динамике эпизоотического процесса характерно ежегодное стабильное увеличение серопозитивности животных в среднем на 1,2 %. Заболеваемость крупного рогатого скота лейкозом составила в среднем за анализируемый период  $0,41 \pm 0,08$  % ( $P < 0,05$ ), при этом следует отметить ее рост в 3,5 раза с 0,17% в 2000 г. до 0,59% в 2003 г. (табл. 2).

Таблица 2 – Показатели интенсивности проявления лейкозного процесса крупного рогатого скота в Амурской области в динамике за 4 года, %

Показатели	Год				Средний показатель	P <
	2000	2001	2002	2003		
Заболеваемость	0,17	0,41	0,48	0,59	$0,41 \pm 0,08$	0,05
Превалентность	8,0	9,9	10,4	11,7	$10,0 \pm 0,76$	0,001

В хозяйствах разных форм собственности и личных подворьях граждан четырех районов (Благовещенского, Ивановского, Константиновского, Тамбовского) южной зоны Приамурья с наиболее развитым животноводством лейкозная инфекция регистрируется практически во всех гуртах крупного рогатого скота общественного и частного секторов. Зарегистрировано 106 неблагополучных пунктов, из них с пораженностью до 10 % - 70, до 30 % - 25, свыше 30 % - 11 пунктов. Количество вирусоносителей колеблется от 0,4 до 66,6 %. Охват поголовья серологическими (РИД) исследованиями составил в среднем 42,1 % с колебаниями от 1,5 до 100 %. Таким образом, за период 2000 – 2003 гг. в области отмечается рост инфицированности крупного рогатого скота ВЛКРС и его заболеваемости лейкозом. Показатель инфицированности скота ВЛКРС в целом по области к 2004 году перешагнул 10 %-ный барьер и составил 11,7%. Районов, где крупный рогатый скот свободен от ВЛКРС-инфекции, в Амурской области нет.

Из представленного материала следует, что в Амурской области длительное время имеется постоянный источник ВЛКРС-инфекции.

В связи с тем, что в хозяйствах Амурской области просматривается тенденция распространения лейкозной инфекции и увеличения заболеваемости животных лейкозом, следовательно, существуют пути и механизм передачи вируса, который обеспечивает непрерывность и развитие эпизо-

отического процесса. К такому механизму передачи ВЛКРС мы предположительно отнесли быков-производителей, использование которых стали практиковать в Амурской области в 90-е годы для осеменения коров и телок наряду с искусственным осеменением.

### 2.2.1 Исследование на лейкоз быков-производителей

В 73 хозяйствах 9 районов области исследовано 188 имеющих статус племенных быков-производителей четырех пород. Инфицированность быков-производителей вирусом лейкоза в хозяйствах обследованных районов колеблется в пределах 6,25 – 56,3% (табл. 3).

Таблица 3 – Результаты серологического исследования быков-производителей на лейкоз по районам Амурской области

Район	Обследовано хозяйств	Исследовано быков, гол.	РИД(+), гол.	Инфицированность, %
Серышевский	7	16	9	56,3
Ивановский	7	21	11	52,4
Тамбовский	11	41	15	36,6
Белогорский	10	22	7	31,8
Ромненский	4	10	3	30,0
Константиновский	13	21	5	23,8
Октябрьский	11	31	7	22,6
Свободненский	6	10	1	10,0
Благовещенский	4	16	1	6,25
Всего	73	188	59	

Из 73 хозяйств инфицированных ВЛКРС быков-производителей выявили в 37 (50,7%). Из 59 серопозитивных в РИД быков-производителей у трех обнаружены морфологические изменения крови, свойственные больным лейкозом животным по «лейкозному ключу».

Вирусом лейкоза крупного рогатого скота наиболее инфицированы быки-производители черно-пестрой породы (48,9%), наименее – симментальской (23,8%) (табл. 4).

Быки-производители, используемые в хозяйствах Амурской области для вольной случки коров и телок, являются источником ВЛКРС-инфекции, способствуют ее распространению.

Учитывая растущий характер динамики показателей, есть все основания опасаться дальнейшего роста инфицированности и заболеваемости животных лейкозом в Амурской области.

Таблица 4 – Инфицированность быков-производителей в зависимости от породы

Район	Порода			
	черно-пестрая	красно-пестрая	герефордская	симментальская
Тамбовский	19 (10)	11 (2)	10 (3)	1 (0)
Константиновский	6 (3)	9 (2)	4 (0)	2 (0)
Ивановский	7 (4)	нет	12 (6)	2 (1)
Белогорский	4 (3)	4 (2)	10 (2)	4 (0)
Октябрьский	10 (3)	нет	12 (1)	9 (3)
Серышевский	нет	2 (1)	13 (8)	1 (0)
Свободненский	нет	1 (0)	8 (1)	1 (0)
Ромненский	1 (0)	нет	8 (2)	1 (1)
Благовещенский	породный состав не учитывался			
Всего	47 (23)	27 (7)	77 (23)	21 (5)

Примечание: в скобках указано количество инфицированных ВЛКРС голов из числа исследованных

### 2.3 Экспериментальные исследования в производственных условиях по изучению титра антител к ВЛКРС у крупного рогатого скота и их взаимосвязи с гематологическими показателями

Цель исследования – изучить динамику титра антител к антигенам вируса лейкоза крупного рогатого скота в возрастном аспекте и их возможную корреляцию с развитием инфекционного процесса у спонтанно зараженных ВЛКРС животных, связав их в последующем в единый патогенетический процесс.

Исследования выполнены в базовом хозяйстве СХА «Согласие» Ивановского района Амурской области. При первичном обследовании 330 голов дойного стада на лейкоз реакцией иммунодиффузии антитела к ВЛКРС обнаружены у 46,6% коров. Сформировали опытную группу из 174 телочек по мере отела как серопозитивных так и серонегативных коров. Наблюдения и серологические исследования проводили на одних и тех же животных от рождения до 39-месячного возраста (срок наблюдения). Использовали реакцию иммунодиффузии в агаровом геле согласно наставлению (1987). Применяли наборы Курской биофабрики. При обнаружении антител к вирусу лейкоза исследования в РИД проводили до предельного разведения, при котором выявлялись антитела к ВЛКРС (табл. 5).

Таблица 5 – Динамика титров антител к ВЛКРС в крови молодняка крупного рогатого скота

Возраст животных	Титр антител М ± m
1-26 дн	1 : 4,0 ± 1,30
2,5-5,5 мес	1 : 3,0 ± 0,59
13 мес	1 : 5,8 ± 0,80
18-19 мес.	1 : 5,5 ± 3,57
22 мес.	1 : 6,6 ± 2,29
26 мес	1 : 9,7 ± 1,37
30 мес	1 : 7,5 ± 0,91
36 мес	1 : 9,0 ± 1,66
39 мес.	1 : 13,7 ± 3,15

Изучение титра антител к ВЛКРС в возрастной динамике у крупного рогатого скота показало достоверное их нарастание. У опытных животных в 39-месячном возрасте титр антител к антигенам ВЛКРС составил 1:13,7 ± 3,15 (P<0,001). Это в 3,42 превышает этот показатель у этих же животных, когда они находились в 1 – 26-дневном возрасте (1: 4 ± 1,30).

При достижении опытными телками двухлетнего и трехлетнего возраста одновременно с серологическими (РИД) были проведены гематологические исследования (табл. 6).

Таблица 6 – Гематологические показатели у крупного рогатого скота в возрастной динамике

Показатели	2 года		3 года	
	РИД (+) (n=43)	РИД (-) (n=36)	РИД (+) (n=36)	РИД (-) (n=34)
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	13,97±3,75	7,98±0,48	13,61±1,29	7,74±0,69
Абсолютное количество лимфоцитов, 10 <sup>9</sup> /л	11,00±3,55	5,70±0,11	12,00±1,31	5,57±0,49

Содержание лейкоцитов и абсолютного количества лимфоцитов у инфицированных ВЛКРС животных в двух- и трехлетнем возрасте достоверно увеличено по сравнению с их количеством у РИД-отрицательных. У РИД-положительных животных эти показатели практически не отличаются

в абсолютных величинах, но в относительном соотношении у животных в трехлетнем возрасте лимфоцитов в 1,1 раза больше, чем в двухлетнем.

Изучением возможной взаимосвязи титра антител с гематологическими показателями (табл. 7) установлено, что при таком высоком титре антител ( $1:13 \pm 3,15$ ) количество лейкоцитов и абсолютного числа лимфоцитов в единице объема крови по «лейкозному ключу» соответствуют показателям гематологически больным животным. При выявлении зависимости между этими биологическими явлениями (титр антител – лейкоцитоз и титр антител – абсолютный лимфоцитоз) отмечается умеренная связь титра антител к вирусу лейкоза и количеством лейкоцитов крови ( $P < 0,05$ ) и прямая значительная связь титра антител к вирусу лейкоза с абсолютным количеством лимфоцитов крови ( $P < 0,01$ ).

Таблица 7 – Корреляционная зависимость между уровнем антител к ВЛКРС и содержанием лейкоцитов и лимфоцитов в крови животных

Титр антител	Количество лейкоцитов, тыс/мкл	$r_1$	Количество лимфоцитов, тыс/мкл	$r_2$
1 : 13,7 ± 3,15	13,61 ± 1,29	0,46 ± 0,17	12,0 ± 1,31	0,50 ± 0,17

Примечание:  $r_1$  – коэффициент корреляции между уровнем антител и содержанием лейкоцитов;  $r_2$  – коэффициент корреляции между уровнем антител и содержанием лимфоцитов

На следующем этапе исследований из возможного числа опытных животных 2 – 4-летнего возраста выбрали серопозитивных телок и молодых коров в количестве 27 голов и такого же возраста 8 серонегативных животных. Сыворотку крови серопозитивных животных исследовали в разведениях, одновременно провели гематологические исследования. Полученные данные сравнили с показателями «лейкозного ключа» для крупного рогатого скота 2 – 4-летнего возраста (табл. 8).

При выявлении специфических преципитирующих антител к антигенам вируса лейкоза в разведении 1 : 8 – 1 : 64 достоверно увеличивается количество лейкоцитов и абсолютное количество лимфоцитов до показателей, свойственных больным лейкозом животных по «лейкозному ключу». В нативной сыворотке и в разведениях до 1 : 4 гематологические показатели спонтанно зараженных ВЛКРС животных соответствуют по «лейкозному ключу» показателям здоровых животных.

Таблица 8 — Гематологические показатели крови крупного рогатого скота 2 – 4-летнего возраста, серопозитивного и серонегативного в РИД к ВЛКРС

Группа	Отношение животных к ВЛКРС в РИД	Количество лейкоцитов, тыс/мкл	Абсолютное количество лимфоцитов, тыс/мкл	Больные лей-козом животные по «лейкозному ключу»		Здоровые животные по «лейкозному ключу»	
				кол-во лейкоцитов, тыс/мкл	абсолютное кол-во лимфоцитов, тыс/мкл	кол-во лейкоцитов, тыс/мкл	абсолютное кол-во лимфоцитов, тыс/мкл
1.	РИД (-) (n = 8)	7,31 ± 0,46	5,46 ± 0,35			до 11,0	до 7,7
2.	РИД (+)						
	- нативная, 1:2, 1:4 (n = 10)	8,95 ± 0,92	7,28 ± 0,62				
	- в титрах 1:8-1:64 (n = 17)	17,1 ± 1,44	15,53 ± 1,53	>11,0	>10,0		
		P<0,001	P<0,001				

Примечание. РИД (-) – животные, не зараженные ВЛКРС;  
РИД (+) – животные, зараженные ВЛКРС;  
P - (уровень доверительной вероятности) определяли в группе РИД(+) животных

С помощью корреляционного анализа определили связь титра антител к антигенам вируса лейкоза крупного рогатого скота с гематологическими показателями опытных животных. Для получения более точных показателей натуральные числа титра антител ввиду их большого разброса (1 : 2 – 1 : 64) были прологарифмированы и обработаны математически, после чего среднее арифметическое логарифма титра антител переводили в натуральные числа (табл. 9).

У зараженных вирусом лейкоза животных, сыворотка крови которых дает положительную РИД в разведении 1 : 8 и выше, установлена прямая умеренная связь титра антител с количеством лейкоцитов крови (P < 0,05) и прямая значительная связь титра антител с абсолютным количеством лимфоцитов крови (P < 0,001).

Таблица 9 – Корреляционная связь между уровнем антител к ВЛКРС и содержанием лейкоцитов и абсолютного количества лимфоцитов в крови крупного рогатого скота, спонтанно инфицированного вирусом лейкоза

Титр антител к ВЛКРС в РИД	Количество лейкоцитов, тыс /мкл	$r_1$	Абсолютное количество лимфоцитов, тыс/мкл	$r_2$
1:7,07±1,25	14,44±1,41	0,45±0,17	12,47±1,25	0,61±0,15

Примечание.  $r_1$  – коэффициент корреляции между уровнем антител и количеством лейкоцитов;  $r_2$  – коэффициент корреляции между уровнем антител и абсолютным количеством лимфоцитов

Результаты наших исследований показывают, что развитие инфекционного процесса при лейкозе крупного рогатого скота сопровождается увеличением титра антител к ВЛКРС. Отмечена прямая корреляция между титром антител к вирусу лейкоза и гематологическими показателями, свойственными больным по «лейкозному ключу» животным.

#### 2.4 Показатели естественной резистентности коров, инфицированных ВЛКРС и больных лейкозом

Цель опыта заключается в изучении неспецифических защитных механизмов и специфического иммунного ответа у животных, находящихся на разных стадиях инфекционного процесса при лейкозе.

Для исследования отобрали 27 коров, которые они были исследованы на лейкоз клинически, серологически (РИД) и гематологически. РИД-положительные сыворотки крови исследовали в разведениях. Подсчитывали лейкоциты, выводили лейкоцитарную формулу, показатели абсолютного количества лимфоцитов оценивали по "лейкозному ключу".

У коров, прореагировавших в цельной сыворотке и в разведении 1:2 – 1:4, показатели крови находятся в пределах физиологической нормы. У коров, сыворотка крови которых реагирует при разведении 1:8, отмечается лейкоцитоз ( $24,00 \pm 2,62 \cdot 10^9/л$ ), относительный ( $88,70 \pm 1,30\%$ ) и абсолютный ( $21,11 \pm 1,19 \cdot 10^9/л$ ) лимфоцитоз. Показатели достоверны ( $P < 0,001$ ).

Использовали некоторые тесты, с помощью которых возможно оценить естественную резистентность инфицированного и больного лейкозом крупного рогатого скота.

Установлено достоверное ( $P < 0,001$ ) снижение титра нормальных антител до  $1 : 39,80 \pm 2,20$  у животных с высоким титром антител к ВЛКРС. Титр нормальных антител серонегативных и серопозитивных животных, титр антител к антигенам ВЛКРС которых не превышал  $1 : 4$ , составил соответственно  $1 : 50,85 \pm 1,17$  и  $1 : 48,63 \pm 1,23$ . Следовательно, ТНАТ сыворотки крови у коров, реагирующих в РИД при ее разведении в 8 раз, ниже в 1,27 и 1,22 раза по сравнению с серонегативными и реагирующими в нативной сыворотке и при ее разведении в 2 – 4 раза соответственно.

У животных, прореагировавших в РИД в титре  $1 : 8$ , наблюдается также достоверное ( $P < 0,001$ ) снижение лизоцимной активности сыворотки крови до  $6,00 \pm 3,22\%$ . В группе свободных от вируса лейкоза коров и инфицированных ВЛКРС, реагирующих в нативной сыворотке и в титрах  $1 : 2 - 1 : 4$ , показатель лизоцимной активности был выше в 2,3 – 2,6 раза и составил соответственно  $14,01 \pm 1,28$  и  $15,63 \pm 2,66\%$ .

Выявлено достоверное ( $P < 0,001$ ) увеличение элиминирующей способности крови до  $32,18 \pm 0,13$  тыс.мкб.тел, у коров, реагирующих в титре  $1:8$ . У РИД (-) и РИД (+) животных, реагирующих в нативной сыворотке и в титрах  $1 : 2 - 1 : 4$ , эти показатели составили соответственно  $8,13 \pm 1,08$  и  $8,39 \pm 1,30$  тыс.мкб. тел. Увеличение элиминирующей способности сыворотки крови инфицированных вирусом лейкоза животных с высокими титрами антител к антигенам ВЛКРС свидетельствует о высокой функциональной нагрузке на макрофаги.

Таким образом, у серопозитивных в отношении ВЛКРС животных, сыворотка крови которых реагирует в РИД при ее разведении в 8 раз и выше, повреждается функция естественной защиты, о чем свидетельствуют факты достоверного снижения лизоцимной активности сыворотки крови ( $P < 0,001$ ), элиминирующей способности крови ( $P < 0,001$ ), титра нормальных антител ( $P < 0,001$ ).

## 2.5 Проверка метода выявления больных лейкозом животных

Результаты экспериментальных исследований крупного рогатого скота на лейкоз проверены на базе ОПХ ВНИИ сои, колхоза «Луч», СХА «Согласие», КФХ «Зенит» и «Баскиаз» на поголовье 1583 голов.

Результаты проверки усовершенствованной методики диагностики лейкоза крупного рогатого скота с использованием РИД на поголовье коров первого отделения в одном из хозяйств области приведены в таблице 10.

В исследуемом стаде из 297 голов выявлено инфицированных ВЛКРС 85 коров (28,6 %). Серопозитивных животных по показателям титра антител к антигенам вируса лейкоза разделили на 2 подгруппы. В первую включили 67 голов, которые реагировали в РИД с нативной сыворот-



кой и при её разведении в 2 – 4 раза, во вторую - 18 голов, которые реагировали в РИД при разведении сыворотки крови в 8 – 16 раз.

Таблица 10 – Гематологические показатели крови крупного рогатого скота 3 – 6-летнего возраста, серопозитивного и серонегативного в РИД по отношению к ВЛКРС

Группа	Отношение животных к ВЛКРС в РИД	Количество лейкоцитов, тыс/мкл	Абсолютное количество лимфоцитов, тыс/мкл	Большие лейкозом животные по «лейкозному ключу»		Здоровые животные по «лейкозному ключу»	
				кол-во лейкоцитов, тыс/мкл	абсолютное кол-во лимфоцитов, тыс/мкл	кол-во лейкоцитов, тыс/мкл	абсолютное кол-во лимфоцитов, тыс/мкл
1	РИД (-) (n=212)	7,85 ± 0,26	4,92 ± 0,43			до 11,0	до 7,7
2	РИД (+) нативная, 1:2, 1:4 (n=67) в титрах 1:8 - 1.16 (n=18)	8,10 ± 0,45	4,91 ± 0,40				
		13,50 ± 1,67	11,31 ± 2,53	>11,0	>10,0		

Примечание. РИД (-) – животные, не зараженные ВЛКРС; РИД (+) – животные, зараженные ВЛКРС;

У 67 животных первой подгруппы, прореагировавших в нативной сыворотке и при её разведении в 2 – 4 раза, выявлено нормальное количество лейкоцитов (8,10 ± 0,45) и нормальное абсолютное количество лимфоцитов в 1 мкл периферической крови (4,91 ± 0,40).

У 18 животных второй подгруппы, сыворотка крови которых прореагировала в РИД при её разведении в 8 – 16 раз, выявлен лейкоцитоз (13,50 ± 1,67 тыс/мкл), абсолютный лимфоцитов (11,31 ± 2,53 тыс/мкл), относительное содержание лимфоцитов составляет 83,8%, то есть, в данном случае гематологические показатели (количество лейкоцитов, относительное содержание лимфоцитов, абсолютное количество лимфоцитов) по «лейкозному ключу» свойственны показателям больных лейкозом животных.

Таким образом, нами в условиях хозяйства подтверждено, что у животных, сыворотка крови которых реагирует при исследовании в РИД на лейкоз при её разведении в 8 и более раз, происходит развитие инфек-

ционного процесса и их можно относить к больным лейкозом. Совпадение высоких титров антител к антигенам ВЛКРС при серологической (РИД) диагностике лейкоза с гематологическими показателями серопозитивных животных, выходящими за пределы нормы, является прямым подтверждением развивающейся в организме животных лейкозной патологии.

## ВЫВОДЫ

1. В Амурской области Дальневосточного федерального округа отдельные случаи заболевания крупного рогатого скота лейкозом отмечены с 60-х годов прошлого столетия. В настоящее время районов, свободных от лейкозной инфекции, в области нет. Уровень инфицированности крупного рогатого скота ВЛКРС к 2004 году составил 11,7%.

Уровень напряженности эпизоотического процесса лейкоза крупного рогатого скота в Амурской области определяется как стабильно растущий. Динамике эпизоотического процесса лейкоза крупного рогатого скота характерно ежегодное стабильное увеличение серопозитивности животных на 1,2% и заболеваемости – с 0,17% в 2000 году до 0,59% в 2003 году.

2. У инфицированных ВЛКРС животных в возрастной динамике установлена прямая корреляционная связь титра антител к антигенам ВЛКРС с гематологическими показателями, свойственными больным лейкозом животным.

Достоверное совпадение высоких (1 : 8 и выше) титров антител к антигенам ВЛКРС с выходящими за пределы нормы показателями относительного и абсолютного количества лимфоцитов является прямым подтверждением развивающейся в организме животных лейкозной патологии. Животных, сыворотка крови которых реагирует в РИД при исследовании на лейкоз при её разведении в 8 и более раз, следует относить к больным лейкозом.

3. Установлена зависимость показателей естественной резистентности от специфического иммунного ответа животных, реагирующих в РИД в нативной сыворотке крови и при её разведениях. Эта зависимость выражается в достоверном ( $P < 0,001$ ) повреждении функции естественной защиты у инфицированных ВЛКРС животных, сыворотка крови которых реагирует в титре 1:8 и выше.

4. Научно-обоснованная усовершенствованная методика выявления больных лейкозом животных с использованием РИД дает возможность при однократном взятии для серологического исследования крови на лейкоз повторного использования испытуемых сывороток крови.

4.1. На первом этапе исследований с помощью РИД выявляют инфицированных ВЛКРС животных (на это уходит 4 – 6 дней).

4.2. После этого на втором этапе дополнительно проводят серологические исследования испытуемой положительной в РИД сыворотки крови в разведениях. При обнаружении в ней специфических преципитирующих антител к антигенам вируса лейкоза в титре 1 : 8 и выше животное оценивают как больное лейкозом (на это требуется еще 2 – 4 дня).

5. Предлагаемая методика ускоряет выявление больных лейкозом животных, сокращает срок нахождения их в стаде, тем самым способствует снижению напряженности эпизоотической ситуации по лейкозу, является простой и доступной для выполнения в любой ветеринарной лаборатории.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Рекомендации по проведению профилактических и оздоровительных противолейкозных мероприятий в Амурской области включены в Комплексную программу «Экономическое и социальное развитие Амурской области на 2004 – 2010 гг.».

Усовершенствованную научно-обоснованную методику выявления больного лейкозом крупного рогатого скота с использованием РИД необходимо рекомендовать для внедрения в лабораторную практику.

**Основные материалы диссертации опубликованы в работах:**

1. Бахметьева, С.В. Распространение лейкозной инфекции у быков-производителей / С.В. Бахметьева ; науч. рук. Ю.А. Макаров // Тезисы докладов 2-ой межвузовской научно-практической конференции «Молодежь XXI века: шаг в будущее» / [АГМА]. – Благовещенск, 2001. – Вып. 2. – С. 32 – 33.
2. Бахметьева, С.В. Оценка показателей естественной резистентности коров, инфицированных ВЛКРС и больных лейкозом / С.В. Бахметьева ; Науч. рук. Г.А. Гаврилова // Молодежь XXI века: шаг в будущее : материалы четвертой регион. науч.-практ. конф. / ДальГАУ. – Благовещенск, 2003. – С. 315 – 316.
3. Бахметьева, С.В. Эпизоотическая ситуация по лейкозу быков-производителей / Г.А. Гаврилова, Ю.А. Макаров, С.В. Бахметьева, Я.Г. Диких // Ветеринария. – 2003. - №6. – С. 10 – 12.
4. Бахметьева, С.В. Диагностика лейкоза крупного рогатого скота / Г.А. Гаврилова, Ю.А. Макаров, С.В. Бахметьева / Ветеринария. – 2004. – №1. – С. 20 – 23.
5. Бахметьева, С.В. Выявление больного лейкозом крупного рогатого скота с использованием РИД : Метод. рекомендации / РАСХН. Дальневост. научн.-метод. центр. ДальЗНИВИ. – Благовещенск, 2004. – 13 с.

6. **Бахметьева, С.В.** Развитие эпизоотического процесса лейкоза крупного рогатого скота в Амурской области / Г.А. Гаврилова, С.В. Бахметьева // Биологические ресурсы российского Дальнего Востока : материалы междунар. науч.-практ. конф. / ДальГАУ. – Благовещенск, 2004. – С. 111 – 114.

7. **Бахметьева, С.В.** Распространенность лейкозной инфекции в Среднем Приамурье / С.В. Бахметьева ; науч. рук. Г.А. Гаврилова // Молодежь XXI века: шаг в будущее : материалы пятой науч.-практ. конф. / АмурНЦ ДВО РАН [и др.]. – Благовещенск, 2004. – Т. 3. – С. 105 – 107.

8. Анализ эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота на Дальнем Востоке / Ю.А. Макаров, Г.А. Гаврилова, С.В. Бахметьева. – Благовещенск: РАСХН, Дальневост. науч. – метод. центр, ДальЗНИВИ, 2005. – 28 с.

9. **Бахметьева, С.В.** Неспецифическая резистентность коров, инфицированных и больных лейкозом / Г.А. Гаврилова, С.В. Бахметьева // Сибирский вестник с.-х. науки. - №1. – 2005. – С. 118 – 121.

10. **Бахметьева, С.В.** Ретроспективный обзор по распространению лейкозов крупного рогатого скота на Дальнем Востоке / Ю.А. Макаров, Г.А. Гаврилова, С.В. Бахметьева, Е.А. Ян : сборник научных трудов, посвящ. 70-летию ДальЗНИВИ. – Благовещенск, 2005. – С. 64 – 69.

**Бахметьева Светлана Васильевна**

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕРОЛОГИЧЕСКОГО ТЕСТА РИД  
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БОЛЬНЫХ ЛЕЙКОЗОМ ЖИВОТНЫХ**

*Автореферат*

Лицензия ЛР 020427 от 25.04.1997 г.

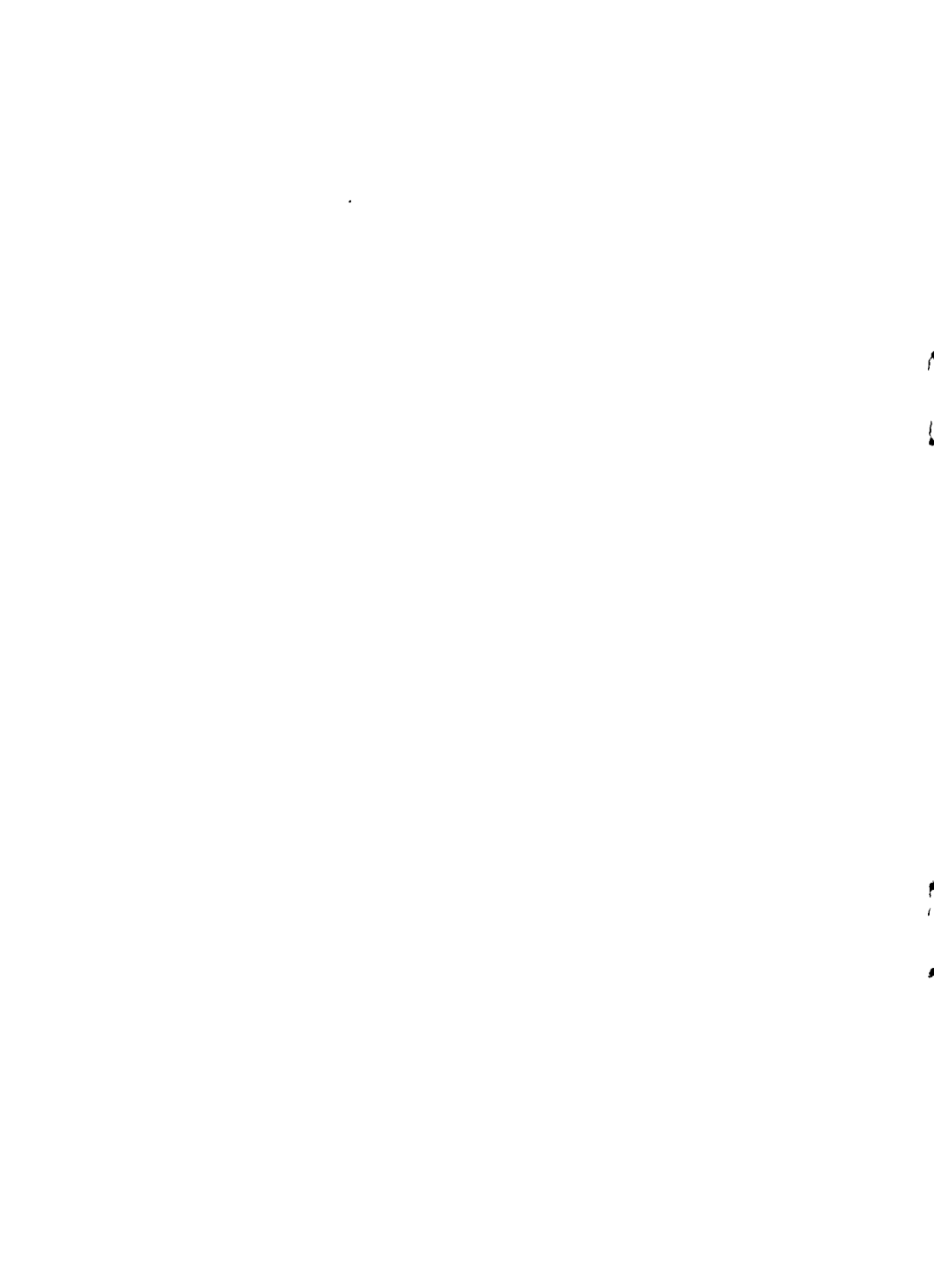
Подписано к печати 12.04.2006 г. Формат 60 × 84  $\frac{1}{16}$

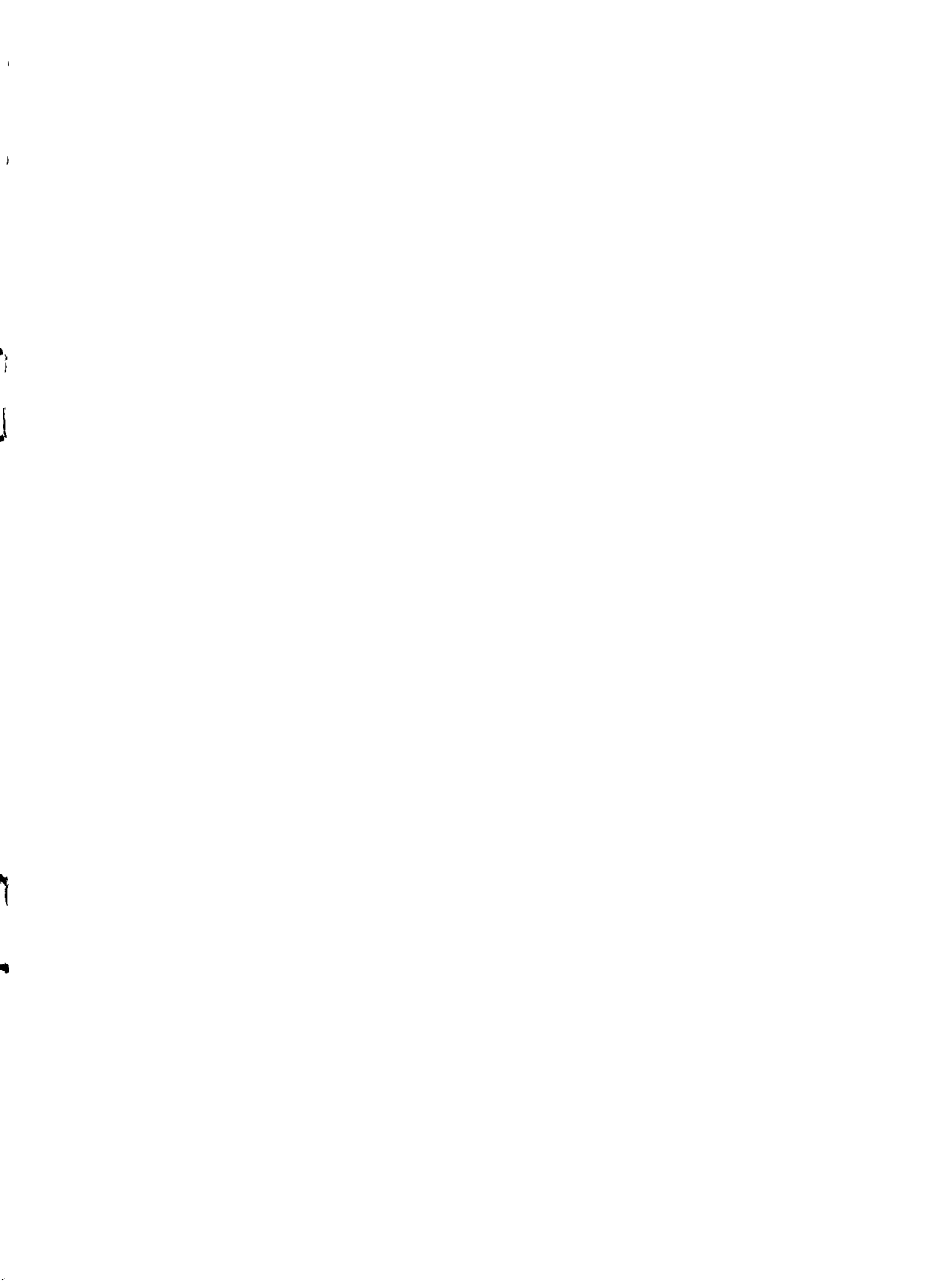
Уч.-изд. л. – 1,0.

Тираж 100 экз. Заказ 69.

---

Отпечатано в отделе оперативной полиграфии издательства ДальГАУ  
675005, г. Благовещенск, ул. Политехническая, 86





2006A

---

8179

#-8179