

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» апреля 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.

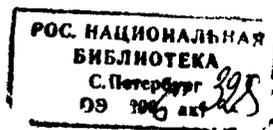
Известные на сегодняшний день методы прижизненной диагностики, основанные на детекции ВЛКРС при помощи РИД с гликопротеидным антигеном, различных модификаций ИФА и ПЦР, достаточно эффективны в борьбе с лейкозом. Об этом свидетельствуют многочисленные сообщения о положительных результатах, полученных 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 гемато- логических 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	геррефордская	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 ⁹ /л	13,97±3,75	7,98±0,48	13,61±1,29	7,74±0,69
Абсолютное количество лимфоцитов, 10 ⁹ /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

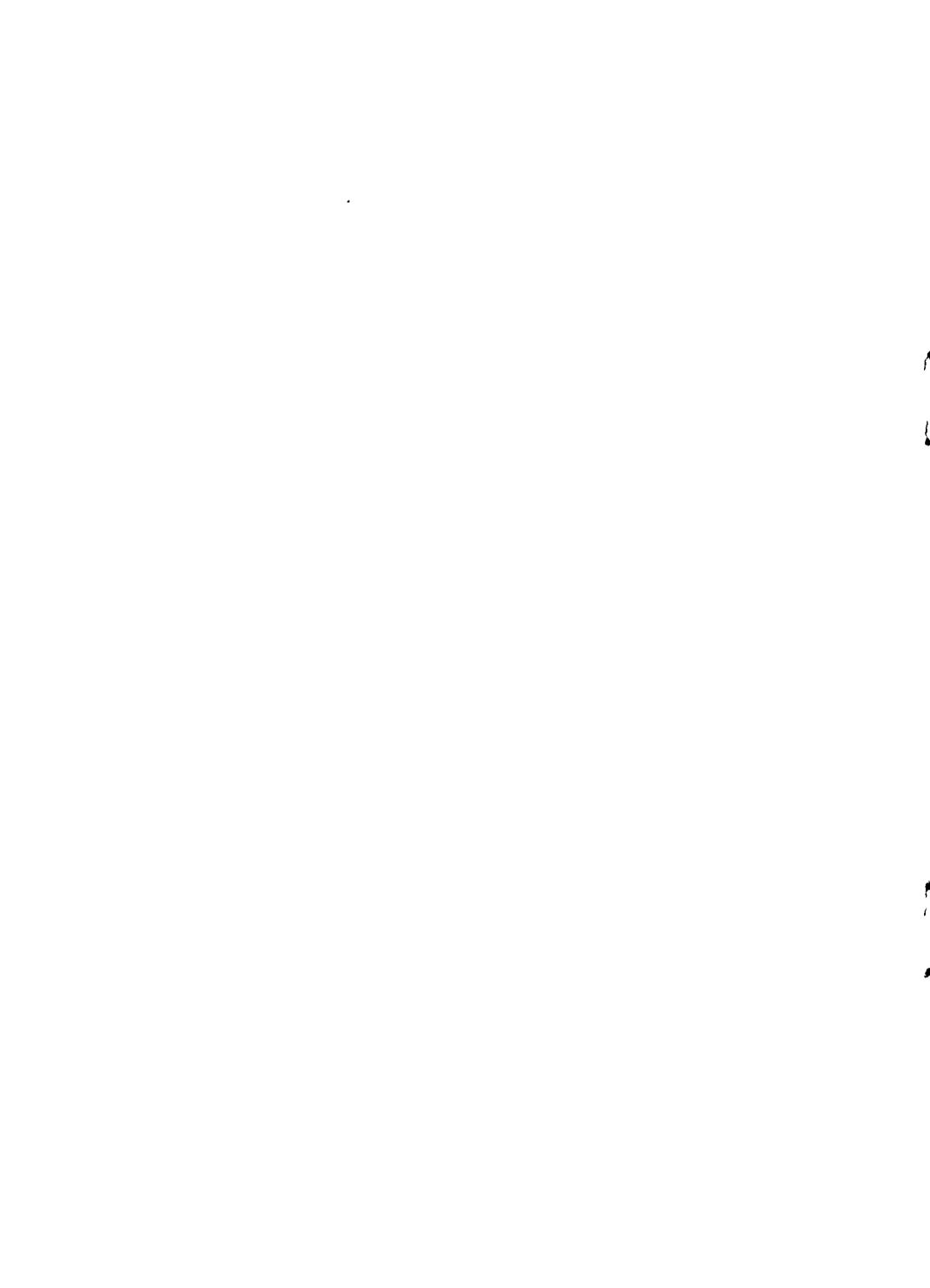
Лицензия ЛР 020427 от 25.04.1997 г.

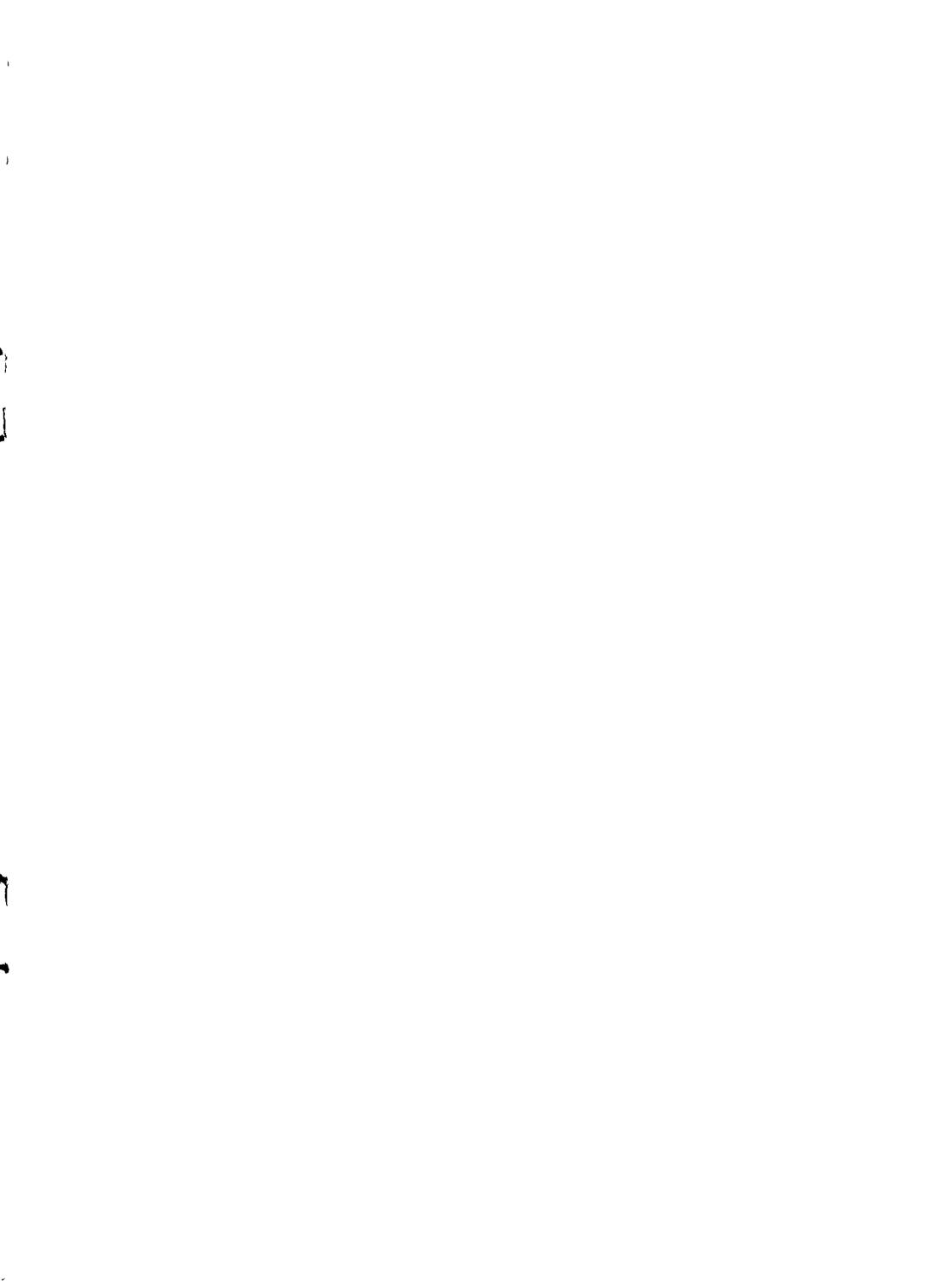
Подписано к печати 12.04.2006 г. Формат 60 × 84 $\frac{1}{16}$

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