

МАСЛЕННИКОВ НИКИТА НИКОЛАЕВИЧ

**СПОСОБЫ ДИАГНОСТИКИ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ
АСПЕКТЫ ЛЕЙКОЗА И ТУБЕРКУЛЁЗА КРУПНОГО РОГАТОГО
СКОТА**

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»

Научный руководитель: **Якупов Талгат Равилович**
доктор ветеринарных наук, доцент

Официальные оппоненты: **Будулов Нурдин Рагимханович** – доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник лаборатории инфекционной патологии сельскохозяйственных животных Прикаспийского зонального научно-исследовательского ветеринарного института – филиал ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Республики Дагестан»

Протодияконова Галина Петровна – доктор ветеринарных наук, доцент, заведующая кафедрой паразитологии и эпизоотологии животных ФГБОУ ВО «Арктический государственный агротехнологический университет»

Ведущая организация: Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Сибирского Федерального научного центра агробιοтехнологий Российской академии наук

Защита диссертации состоится «27» декабря 2024 года в 13³⁰ часов на заседании диссертационного совета 35.2.016.01 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» по адресу: 420029, г. Казань, Сибирский тракт, 35.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и на сайте <https://kazanveterinary.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2024 года и размещен на сайтах: <https://kazanveterinary.ru> и <https://vak.minobrnauki.ru>

Ученый секретарь диссертационного
совета, доктор ветеринарных наук

Юлия Вадимовна Ларина

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Туберкулез и лейкоз крупного рогатого скота наиболее распространенные хронические инфекции в животноводстве и представляют собой важные проблемы не только ветеринарной медицины, животноводства, но биологии и экологии в целом и имеющие непосредственное отношение к безопасности здоровья человека. На современном этапе борьбы с туберкулезом и лейкозом животных, основой профилактических и оздоровительных мероприятий была и остаётся своевременная и точная диагностика этих инфекций (Якупов Т. Р., 2011; Кужебаева, У. Ж., 2022).

Определение современными методами уровня и спектра противотуберкулезных антител далеко не исчерпало себя в качестве средства иммунодиагностики и характеристики особенностей течения туберкулеза, а сами противотуберкулезные антитела недостаточно используются для характеристики микобактериальных антигенов, приготовления диагностикумов и других целей (Якупов Т. Р., 2011).

Весьма актуальной задачей является изучение иммунологических аспектов патогенеза лейкоза крупного рогатого скота. Определение динамики образования и спектра антител, идентификация и изучение состава иммунных комплексов способствуют расшифровке молекулярно-клеточных механизмов взаимодействия вируса лейкоза с макроорганизмом и объяснению особенностей патогенеза.

Накопление новых научных данных, характеризующих особенности ассоциативного проявления таких хронически протекающих инфекций, как лейкоз и туберкулез крупного рогатого скота продолжают оставаться весьма актуальной задачей. Для диагностики и борьбы с этими инфекциями предлагаются различные современные высокоэффективные методики и технологии, основанные на изучении антигенных и иммунологических свойств возбудителей (Итэсь Ю.Р., 2005; Репин Ю.М., 1984; Marawan M. A., 2021). Однако, вопрос о возможной реакции на туберкулин у коров, инфицированных ВЛКРС продолжает оставаться открытым. В научной литературе встречаются утверждения разнопланового характера. Если одни выявляют прямую связь между уровнем инфицированности ВЛКРС и реагированием животных на туберкулин, то другие утверждают, что крупный рогатый скот с диагнозом на лейкоз по гематологическим показателям, а также инфицированный ВЛКРС, как правило, не реагируют на туберкулин (Донник И.М., 2010; Кондратьев В.С., 1985; Баратов М.О., 2021). Причинами таких утверждений, несомненно, являются как сложная антигенная структура микобактерий, у которых выявляется множество антигенов общих для всех групп микобактерий (Ионина С.В., 2016; Репин Ю.М., 1984), так и неоднородность, перекрестная реактивность, постоянное изменение титров и спектров антител, соотношения между свободными и связанными антителами к ВЛКРС у инфицированных

животных с развитием инфекционного процесса (Якупов, Т. Р., 2021; Сергеев В.А., 1983).

Степень разработанности темы. Впервые, о возможности реакций на туберкулин у скота, инфицированного вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), упоминает Магер С.Н. в своей работе 2006 года. Он указывает на прямую связь между уровнем инфицированности ВЛКРС и реагированием животных на туберкулин. Скоробогатова Е. А., 2015 утверждает, что введение ППД туберкулина искажает результаты гематологического и серологического тестов на лейкоз КРС. Также теоретической базой и предпосылкой для исследований по изучению иммунологических аспектов лейкоза и туберкулеза крупного рогатого скота, в том числе, коров при сочетанном течении этих инфекций (Якупов, Т. Р., 2021) послужили научные изыскания на кафедре биологической и органической химии ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ. На основе полученных результатов в настоящее время в лабораториях кафедры и академии совместно с другими научными организациями разрабатываются различные методы диагностики и меры борьбы с лейкозом и туберкулезом крупного рогатого скота.

Цель исследований – совершенствование способов диагностики лейкоза и изучение особенностей иммунного ответа у коров, инфицированных ВЛКРС и микобактериями туберкулеза

В соответствии с целью решались следующие задачи:

1. Изучить сравнительную эффективность иммунохимических и потенциометрических методов диагностики лейкоза КРС.
2. Выявить особенности патогенеза и гуморального иммунитета инфицированных ВЛКРС коров.
3. Изучить перекрёстную реактивность анти-ВЛКРС антител с микобактериальными антигенами.
4. Изучить иммунореактивность ВЛКРС инфицированных коров на основе ПЦР-ПДРФ анализа гена env-BLV.

Научная новизна. Доказана перекрестная реактивность антител против антигенов вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) с антигенами микобактерий туберкулеза. Впервые показана возможная детерминантная общность антигенов ВЛКРС и микобактерий птичьего вида. Установлено, что изменения потенциала индикаторного электрода в образце сыворотки крови до и после формирования иммунных комплексов может использоваться для диагностики лейкоза крупного рогатого скота и других инфекционных заболеваний. Научная новизна исследований подтверждена патентом на изобретение RU 2757078 C1.

Теоретическая и практическая значимость работы. Представленные в диссертационной работе материалы дополняют теоретические знания по изучению и диагностике лейкоза и туберкулёза крупного рогатого скота.

Показана возможность к автоматизации диагностики лейкоза КРС при помощи «Иммунопотенциометрии». Результаты исследований свидетельствуют о перекрестной реактивности антител против антигенов ВЛКРС с антигенами микобактерий туберкулеза.

Практическая значимость работы заключается в расширении способов диагностики и разработке мер по борьбе с лейкозом крупного рогатого скота. Результаты исследований внедрены в учебный процесс ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана» и внедрены в работу ГБУ "Республиканская Ветлаборатория" РТ.

Методология и методы исследований. Методологические подходы основаны на литературном поиске, анализе данных отечественных и зарубежных научных источников, на актуальности, целях и задачах исследований. В работе использованы, иммунопотенциометрические, иммунохимические и молекулярно-биологические методы исследований. В главе «Материалы и методы исследований» отражено подробное описание данных методов исследования. Для проведения исследований использовали пробы крови и сывороток крови крупного рогатого скота из благополучных и неблагополучных по лейкозу хозяйств Республики Татарстан.

Основные положения, выносимые на защиту.

- 1) Особенности патогенеза и гуморального иммунитета инфицированных коров могут служить для совершенствования методов диагностики лейкоза.
- 2) существует перекрестная реактивность между антителами против ВЛКРС и микобактерий туберкулеза крупного рогатого скота.

Степень достоверности и апробация результатов. Степень достоверности результатов научных исследований и сформулированных выводов подтверждается использованием современных методов и оборудования. Экспериментальные исследования проведены на достаточном количестве проб сыворотки крови и молока крупного рогатого скота. При проведении опытных работ использованы иммунопотенциометрические, иммунохимические и молекулярно-биологические методы, которые позволили получить достоверные результаты.

Заключение, выводы и рекомендации обоснованы данными, которые представлены в таблицах, рисунках и приложениях диссертации. Достоверность и практическая значимость подтверждены апробацией материалов в научных статьях и актом внедрения в учебный процесс.

Материалы диссертационной работы доложены, обсуждены и одобрены на итоговых заседаниях кафедры по научно-исследовательским работам в период с 2021 по 2024 годы; Международной научной конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи, посвященной 150-летию со дня рождения профессора К.Г. Боля «Молодежные разработки и инновации в решении приоритетных задач АПК» (Казань, 2021); Национальной научно-практической

конференции с международным участием, посвященной памяти профессора Е.П. Ващекина «Актуальные проблемы ветеринарии и интенсивного животноводства» (Брянск, 2021); Международной научно-практической конференции «Современные проблемы и достижения зооветеринарной науки», посвященной памяти академиков М.П. Тушнова и А.З. Равилова (2022 г.); в конкурсе «50 лучших инновационных идей РТ».

Публикации результатов исследований. Результаты исследований, выполненные по теме диссертационной работы опубликованы в 11 печатных работах, 6 из них ВАК Российской Федерации, 1 в Scopus и 1 патент.

Объем и структура дипломной работы. Работа изложена на 125 страницах компьютерного текста, содержит 13 таблиц и 3 рисунка. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материал и методы исследований, результаты собственных исследований, заключение, практические предложения, список сокращений, список литературы и приложения. Библиографический список использованной литературы включает 165 источников, в том числе 62 на иностранных языках.

Личный вклад автора. Диссертационная работа аспиранта является результатом самостоятельных исследований, проведенных в период с 2021 по 2024 гг. Личное участие включает аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы по направлению исследований, формулирование и обоснование темы, цели и задач, методическое обоснование выбора способов их решения, непосредственное участие в выполнении теоретических и экспериментальных исследований, анализ полученных первичных данных и их статистическую обработку, формулирование заключения и практических предложений интерпретации, подготовку статей и оформление диссертации.

Автор приносит глубокую благодарность за оказание научно-методической помощи научному руководителю д. в. н., профессору кафедры Якупову Т.Р., к. биол. наук, доценту Зиннатову Ф.Ф. и всем сотрудникам кафедры биологической химии, физики и математики за содействие в выполнении работы.

2 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 Материалы и методы исследований

Исследования по диссертационной работе проводились в период 2021 – 2024 гг на кафедре биологической химии, физики и математики ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, а также в ГБУ Республиканская ветеринарная лаборатория РТ и ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Всего происследовано более 5000 проб, получали их в Республиканской ветеринарной лаборатории РТ.

Постановка ИФА. Исследование сывороток крови и молока на лейкоз крупного рогатого скота проводили методом ИФА с применением «Набора для выявления антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота в сыворотке крови и молоке иммуноферментным методом (ВАРИАНТ №1-СКРИНИНГ)»

производства ФКП «КУРСКАЯ БИОФАБРИКА – ФИРМА БИОК». Учёт результатов реакции проводили согласно инструкции диагностических наборов.

Иммуноферментный анализ для выявления специфических антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота и микобактериям туберкулёза ставили в твердофазном непрямом по методу, описанному Woller A. et al. (1976), с использованием липосахаридных антигенов.

Постановка РИД. Реакцию иммунодиффузии в агарозном геле для диагностики лейкоза крупного рогатого скота проводили согласно с использованием «Набора для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота» производства ФКП «КУРСКАЯ БИОФАБРИКА – ФИРМА БИОК». Учёт результатов проводили согласно инструкциям диагностических наборов.

Постановка ПЦР. Полимеразная цепная реакция выполнялась по следующему протоколу. Приготовление ПЦР-смесей (на 1 образец) осуществляли по представленной ниже прописи: 2 мкл 10-ти кратного ПЦР-буфера, 2 мкл 2,5 мМ раствора нуклеозидтрифосфатов, 2 мкл 25 мМ раствора магния хлорида, по 1 мкл 10 рМ прямого (5'-GGCACCGGGTCTCGCAAGTATG-3'), обратного (5'-CGGTTAGGCTGGTCATGTGGCC-3') праймеров и зонда типа TaqMan (ROX-AAACACTACGACTTGCAATCTTACAGGCCGAC-RTQ2) (праймеры и зонд патент RU 2644233 С2), 1 мкл Taq-полимераза (5 ед. акт./мл), 10 мкл исследуемого образца ДНК. Общий объём реакционной смеси – 20 мкл. Постановка ПЦР осуществлялась по следующей программе: 1 повтор (95 °С - 5 мин); 5 повторов (95 °С - 30 с., 60,5 °С - 30 сек), 40 повторов (95 °С - 30 с., 60,5 °С - 30 сек). Детекция результатов осуществлялась по каналу ROX при температуре «отжига» праймеров (60,5 °С).

2.2 Результаты собственных исследований

2.2.1 Сравнительная эффективность РИД и ИФА в диагностике лейкоза крупного рогатого скота

В Российской федерации диагностика лейкоза крупного рогатого скота преимущественно осуществляется с помощью реакции иммунодиффузии в геле (РИД), в то время как в других странах мира широко используется иммуноферментный анализ.

В рамках исследования было продиагностировано 3073 пробы сыворотки крови, полученные из «ГБУ Республиканской ветеринарной лаборатории РТ». Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты сравнительных исследований в РИД и ИФА проб сывороток крови

Хозяйства	Всего проб	РИД		ИФА	
		Полож.	%	Полож.	%
Благополучные по лейкозу	2350	82	3,5	66	2,8
Не благополучные по лейкозу	723	66	9,2	79	11,0
Всего	3073	148		166	

Из таблицы видно, что 2350 (76,5%) были получены из благополучных хозяйств по лейкозу, из них 16 проб положительные в РИД, в ИФА показали отрицательные результаты. 723 пробы (23,5%) из неблагополучных хозяйств показали, что положительные и в РИД, и в ИФА оказались только 58 проб, то есть из 66 проб положительных в РИД из этой группы, 8 – в ИФА дали отрицательны результат. Кроме того, в ИФА 13 проб отрицательные в РИД, в ИФА показали положительный результат. Если, считать, что более высокая специфичность и чувствительность ИФА доказанным, то данный факт ещё раз свидетельствует о недостаточной специфичности РИД и о ложноположительных результатах.

2.2.2 Иммунопотенциометрия в диагностике лейкоза крупного рогатого скота

Потенциометрический иммуноанализ является способом прямого определения связывания антигенов или антител без необходимости введения метки. В водном растворе белки являются полиэлектролитами и поэтому имеют определённый результирующий электрический заряд. Полярность и величина этого заряда зависят от изоэлектрической точки белка и от ионного состава раствора. Связывание одного белка с другим приведёт к образованию комплекса, результирующий заряд которого будет отличаться от зарядов исходных белков.

На разработанный нами “Способ потенциометрической диагностики лейкоза крупного рогатого скота” получен патент на изобретение RU2757078C1 от 20.02.2021. В целях изучения сравнительной эффективности иммунопотенциометрии в диагностике лейкоза было происследовано более 300 проб из неблагополучных по лейкозу хозяйств методом ИФА. Из них около 50 % оказались инфицированы ВЛКРС. В качестве электрода используют реконструированный индикаторный электрод для рН метрии и определяют показатели электродвижущей силы (ЭДС) с помощью рН метра в режиме mV в сыворотке крови до и после внесения антигенов.

В лунку иммунологического полистиролового планшета для серологических реакций вносили 0,5 мл исследуемой сыворотки крови, измеряли потенциал индикаторного электрода, добавляли 10 мкл антигена ВЛКРС и вновь проводили измерения. Результаты исследований приведены в таблице 2.

Таблица 2 – показатели потенциометрии сывороток крови

№ п/п	Результат ИФА	Электродный потенциал, mV	
		до образования ЦИК	после образования ЦИК
1	Отр.	0,31±0,070	0,35±0,075
2	Отр.	0,29±0,068	0,33±0,072
3	Отр.	0,30±0,069	0,34±0,072
4	Отр.	0,31±0,070	0,36±0,075
5	Отр.	0,31±0,070	0,35±0,073
6	Отр.	0,32±0,072	0,35±0,074
7	Отр.	0,30±0,071	0,33±0,072
8	Отр.	0,32±0,072	0,35±0,076
9	Отр.	0,31±0,070	0,33±0,073
10	Отр.	0,31±0,070	0,35±0,074
11	Полож.	0,33±0,072	0,48±0,081
12	Полож.	0,34±0,074	0,50±0,083
13	Полож.	0,31±0,072	0,51±0,083
14	Полож.	0,33±0,074	0,53±0,085
15	Полож.	0,35±0,075	0,50±0,080
16	Полож.	0,34±0,075	0,52±0,082
17	Полож.	0,33±0,074	0,52±0,082
18	Полож.	0,35±0,076	0,50±0,081
19	Полож.	0,36±0,074	0,53±0,084
20	Полож.	0,33±0,073	0,53±0,083

$p < 0,005$

Из результатов, приведённых в таблице видно, что потенциометрические показатели сывороток крови здоровых коров после добавления антигена ВЛКРС меняются не более чем на 0,05 единиц, а проб сывороток крови от инфицированных вирусом коров – на 0,15 и более единиц. Таким образом, измерение потенциала индикаторного электрода в исследуемой пробе сыворотки крови до и после образования иммунных комплексов может служить основой для диагностических исследований при лейкозе крупного рогатого скота и других инфекционных болезнях.

Преимущество предлагаемого метода заключается в возможности автоматизации процесса, что отличает его от других экспресс-тестов. Потенциометрический метод представляется перспективным и целесообразным, так как этот метод является простым, точным и экономически оправданным.

2.2.3 Особенности патогенеза и гуморального иммунитета инфицированных с ВЛКРС коров.

В крови инфицированных животных образуются циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК), содержащие провирусную ДНК. Традиционные серологические методы не всегда точно отражают динамику вирусной нагрузки и степень инфекционности.

В этой связи, для изучения патогенеза и особенностей гуморального иммунитета, инфицированных с ВЛКРС коров, были созданы две экспериментальные группы по 12 коров в каждой. Все животные были из одного

стада в возрасте от 2 до 4 лет. В первую группу вошли коровы, заражённые вирусом лейкоза КРС в естественных условиях, диагностированные с помощью РИД и ИФА. Во вторую группу включили двух гематологически больных коров (№5 и №6), остальные животные были положительны по результатам РИД и ИФА. Через каждые 2 месяца брали пробы крови и молока у коров для исследования. Результаты исследования представлены в таблицах 3-4.

Таблица 3 – Динамика изменения титров свободных и связанных в иммунных комплексах антител против gr51 в сыворотке крови

№ проб	Титры антител в ИФА					
	1 – исследование		2 – исследование		3 – исследование	
	свободные	связан.	свободные	связан.	свободные	связан.
1	1:216	1:216	1:648	1:216	1:72	1:216
2	1:216	1:648	1:24	1:216	1:72	1:72
3	1:72	1:648	1:72	1:216	1:648	1:216
4	1:216	1:72	1:648	1:72	1:648	1:72
5	1:216	1:216	1:24	1:72	1:8	1:72
6	1:216	1:216	1:216	1:72	1:24	1:24
7	1:72	1:216	1:72	1:216	1:216	1:216
8	1:72	1:648	1:72	1:648	1:72	1:216
9	1:216	1:648	1:24	1:648	1:72	1:216
10	1:648	1:72	1:216	1:72	1:24	1:216
11	1:216	1:216	1:216	1:216	1:72	1:648
12	1:648	1:216	1:216	1:648	1:72	1:216

Из данных в таблице 3 видно, что титры свободных и «связанных» антител в сыворотке крови меняются с развитием болезни.

Таблица 4 – Динамика изменения титров свободных и связанных в иммунных комплексах антител против gr51 в пробах молока

№ проб	Титры антител в ИФА					
	1 - исследование		2 - исследование		3- исследование	
	свободные	связан.	свободные	связан.	свободные	связан.
1	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:2
2	1:8	1:8	1:8	1:2	1:16	отр.
3	1:16	1:2	1:16	1:2	1:16	1:8
4	1:2	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
5	1:2	отр.	отр.	1:2	отр.	отр.
6	1:8	1:2	1:2	1:4	отр.	1:2
7	1:8	1:8	1:8	1:4	1:16	1:2
8	1:2	1:8	1:16	1:2	1:8	1:8
9	1:8	1:16	1:8	1:8	1:8	1:16
10	1:8	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2
11	1:2	1:16	1:16	1:8	1:16	1:8
12	1:2	1:8	1:8	1:2	1:8	1:8

Когда титры свободных антител уменьшаются, титры «связанных» антител обычно увеличиваются, что говорит о повышении степени образования циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). Это видно на примере проб № 1, 3, 9, 10, 11.

Титры антител в молоке инфицированных коров не коррелируют с титрами в сыворотке крови. При высоких титрах сывороточных антител титры антител в молоке могут быть низкими (пробы № 12, 10, 4), и наоборот (проба № 3, 8). Несмотря на изменения титров сывороточных антител, титры противолейкозных антител в молоке могут оставаться неизменными (пробы № 1, 9).

Целью наших экспериментов во второй опытной группе было определить зависимость появления ЦИК в пробах крови и молока, содержащих провирусную ДНК, от стадий развития инфекционного процесса. Определяли количество лейкоцитов в 1 мл крови, титры циркулирующих иммунных комплексов в молоке и наличие провирусной ДНК в ЦИК. Результаты исследования представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Результаты исследований проб крови и молока инфицированных ВЛКРС коров

№ проб	Порядок исследований, показатели											
	1			2			3			4		
	кол-во лейкоцитов в 1 мкл ($\times 10^3$)	титр ЦИК	провирусная ДНК	кол-во лейкоцитов в 1 мкл ($\times 10^3$)	титр ЦИК	провирусная ДНК	кол-во лейкоцитов в 1 мкл ($\times 10^3$)	титр ЦИК	провирусная ДНК	кол-во лейкоцитов в 1 мкл ($\times 10^3$)	титр ЦИК	провирусная ДНК
1	9,7	1:8	-	9,1	1:8	-	9,8	1:2	-		1:4	-
2	10,2	1:8	-	9,9	1:2	-	10,1	отр.	-	10,1	1:4	-
3	8,6	1:2	-	9,2	1:8	+	14,5	1:8	+	17,3	1:8	+
4	8,9	1:8	-	8,9	1:8	-	9,2	1:8	-	9,9	1:4	+
5	9,1	отр.	-	9,2	1:2	-	10,1	1:4	-	10,2	1:2	+
6	9,5	1:2	-	8,9	1:4	-	9,9	1:2	-	9,8	1:8	-
7	8,7	1:8	-	9,7	1:4	+	10,1	1:2	+	16,2	1:8	+
8	8,8	1:8	-	10,1	1:2	-	10,1	1:8	-	10,3	1:4	-
9	9,1	1:16	-	9,8	1:8	-	10,2	1:16	-	12,4	1:4	+
10	8,8	1:2	-	8,7	1:2	-	9,8	1:8	-	9,8	1:8	-
11	9,7	1:16	-	8,8	1:8	-	10,3	1:8	-	10,3	1:2	-
12	10,1	1:8	-	9,5	1:2	-	9,9	1:8	+	16,8	1:4	+

Исходя из результатов исследований видно, что после I и II исследований количество лейкоцитов в крови у всех экспериментальных животных в пределах нормы, гематологически больных коров нет.

В пробах молока у всех животных, кроме коровы №5, были обнаружены антитела против лейкоза в титрах от 1:2 до 1:16. Они сохранялись в молоке на

протяжении всего эксперимента, за исключением №2 пробы, у которой антитела исчезли через 6 месяцев.

Провирусная ДНК в ЦИК молока была впервые обнаружена у проб №3 и №7 через 4 месяца после начала эксперимента. Это указывает на активное развитие инфекции, хотя гематологические показатели оставались в норме. После третьего исследования провирусная ДНК была обнаружена в молоке №12 пробы, но её гематологические показатели оставались в норме.

На четвёртом этапе исследований провирусная ДНК была обнаружена только в 6 из всех исследованных проб. Среди них у трёх проб, а именно под номерами 4, 5 и 9, провирусная ДНК была обнаружена впервые. Только у №9 пробы, наряду с обнаружением провирусной ДНК, также были выявлены характерные для лейкоза гематологические изменения.

Результаты исследований по изучению патогенеза и особенностей формирования гуморального иммунитета у инфицированных с ВЛКРС коров указывают на необходимость пересмотра критериев определения статуса животного как инфицированного или больного лейкозом, так как ЦИК содержащие провирус начинают появляться в молоке на более поздних стадиях заболевания, когда уровень вирусной нагрузки в организме животного становится высоким, что делает его потенциальным источником заражения для остального стада. В то же время, гематологические изменения в этот период часто остаются стабильными.

2.2.4 Изучение перекрестной реактивности анти-влкрс антител крови и молока с микобактериальными антигенами.

В рамках изучения перекрестной реактивности анти-ВЛКРС антител крови и молока с микобактериальными антигенами было происследовано более чем 1000 проб сывороток крови и молока. Все пробы сыворотки крови из каждой группы были подвергнуты иммуноферментному анализу с использованием микобактериальных антигенов (*M. bovis*, *M. avium*, *M. scotochromogenes* и *M. nonchromogenes*).

В таблице 6 приведены результаты анализа проб сывороток крови коров, инфицированных ВЛКРС, но отрицательные в ППД. В 30% образцов обнаруживаются микобактериальные антитела против *M. avium*. В шести пробах №№ 4, 5, 6, 19, 20, 21 где были найдены микобактериальные антитела, но не выявляются антитела против ВЛКРС. Это может говорить о ложноположительных результатах в РИД из-за инфицированности коров атипичными микобактериями.

Таблица 6 – Результаты ИФА проб сывороток крови, инфицированных ВЛКРС и отрицательных в ППД коров

№ п/п	РИД	ППД	ИФА				
			на лейкоз	на микобактериальные антитела			
				M.bovis	M.avium	M.scot-s	M.nonchr-s
1.	+	-	+	-	-	-	-
2.	+	-	+	-	-	-	-
3.	+	-	+	-	-	-	-
4.	+	-	-	-	+	-	+
5.	+	-	-	-	+	-	+
6.	+	-	-	-	+	-	+
7.	+	-	+	-	-	-	-
8.	+	-	+	-	-	-	-
9.	+	-	+	-	-	-	-
10.	+	-	+	-	-	-	-
11.	+	-	+	-	-	-	-
12.	+	-	+	-	-	-	-
13.	+	-	+	-	+	-	+
14.	+	-	+	-	+	-	+
15.	+	-	+	-	+	-	+
16.	+	-	+	-	-	-	-
17.	+	-	+	-	-	-	-
18.	+	-	+	-	-	-	-
19.	+	-	-	-	+	-	-
20.	+	-	-	-	+	-	-
21.	+	-	-	-	+	-	-
22.	+	-	+	-	-	-	-
23.	+	-	+	-	-	-	-
24.	+	-	+	-	-	-	-
25.	+	-	+	-	-	-	-
26.	+	-	+	-	-	-	-
27.	+	-	+	-	-	-	-
28.	+	-	+	-	-	-	-
29.	+	-	+	-	-	-	-
30.	+	-	+	-	-	-	-

В таблице 7 представлены результаты ИФА крови коров положительных на ППД и отрицательные в РИД. Положительные результаты на микобактериальные антигены были получены в 24 пробах (80% от общего числа).

Таблица 7 – Результаты ИФА проб сывороток крови положительных на ППД и отрицательные в РИД

№ п/п	РИД	ППД	ИФА				
			на лейкоз	на микобактериальные антитела			
				M.bovis	M.avium	M.scot-s	M.nonchr-s
1.	-	+	-	-	-	+	-
2.	-	+	-	-	-	+	-
3.	-	+	-	-	-	+	-
4.	-	+	+	-	+	-	+
5.	-	+	+	-	+	-	+
6.	-	+	+	-	+	-	+
7.	-	+	-	-	-	+	+
8.	-	+	-	-	-	+	+
9.	-	+	-	-	-	+	+
10.	-	+	-	-	-	-	-
11.	-	+	-	-	-	-	-
12.	-	+	-	-	-	-	-
13.	-	+	+	-	-	+	+
14.	-	+	+	-	-	+	+
15.	-	+	+	-	-	+	+
16.	-	+	+	-	+	-	-
17.	-	+	+	-	+	-	-
18.	-	+	+	-	+	-	-
19.	-	+	-	-	-	+	+
20.	-	+	-	-	-	+	+
21.	-	+	-	-	-	+	+
22.	-	+	-	-	-	-	-
23.	-	+	-	-	-	-	-
24.	-	+	-	-	-	-	-
25.	-	+	-	-	-	+	-
26.	-	+	-	-	-	+	-
27.	-	+	-	-	-	+	-
28.	-	+	+	-	+	-	+
29.	-	+	+	-	+	-	+
30.	-	+	+	-	+	-	+

В таблице 8 приведены результаты ИФА сывороток крови положительные в РИД и на ППД коров. В 9 пробах (1, 2, 3, 10, 11, 12, 25, 26, 27) результаты ИФА на обнаружение противотуберкулёзных антител были отрицательные. Также в 9-ти пробах (7, 8, 9, 19, 20, 21, 28, 29, 30) результаты ИФА на лейкоз были отрицательными, но совпадений между ними нет.

Таблица 8 – Результаты ИФА проб сывороток крови положительных в РИД и на ППД

№ п/п	РИД	ППД	ИФА				
			на лейкоз	на микобактериальные антитела			
				M.bovis	M.avium	M.scot-s	M.nonchr-s
1.	+	+	+	-	-	-	-
2.	+	+	+	-	-	-	-
3.	+	+	+	-	-	-	-
4.	+	+	+	-	+	-	+
5.	+	+	+	-	+	-	+
6.	+	+	+	-	+	-	+
7.	+	+	-	-	+	-	+
8.	+	+	-	-	+	-	+
9.	+	+	-	-	+	-	+
10.	+	+	+	-	-	-	-
11.	+	+	+	-	-	-	-
12.	+	+	+	-	-	-	-
13.	+	+	+	-	-	+	+
14.	+	+	+	-	-	+	+
15.	+	+	+	-	-	+	+
16.	+	+	+	-	-	+	-
17.	+	+	+	-	-	+	-
18.	+	+	+	-	-	+	-
19.	+	+	-	-	+	-	+
20.	+	+	-	-	+	-	+
21.	+	+	-	-	+	-	+
22.	+	+	+	-	-	-	+
23.	+	+	+	-	-	-	+
24.	+	+	+	-	-	-	+
25.	+	+	+	-	-	-	-
26.	+	+	+	-	-	-	-
27.	+	+	+	-	-	-	-
28.	+	+	-	-	+	-	+
29.	+	+	-	-	+	-	+
30.	+	+	-	-	+	-	+

На следующем этапе исследований мы изучили перекрестную реактивность противолейкозных и противомикобактериальных антител в крови и молоке. В таблице 9 представлены результаты сывороток крови и молока, от 25 одних и тех же коров. Из них 15 были положительны в РИД. 13 были положительно реагирующие на ППД. 3 пробы были положительны и в РИД, и на ППД.

Таблица 9 – Результаты ИФА проб сывороток крови и молока на обнаружение противолейкозных и противомикобактериальных антител

№ п/п	РИД	тубер. реак-я	ИФА			
			сыворотка крови		молоко	
			ВЛКРС АТ	МБТ АТ	ВЛКРС АТ	МБТ АТ
1	+	-	+	-	-	-
2	+	-	+	+	+	+
3	+	-	-	+	-	+
4	+	-	+	-	-	-
5	+	-	+	+	+	+
6	+	-	+	-	+	-
7	+	-	-	+	-	-
8	+	-	+	-	+	-
9	+	-	+	-	+	-
10	+	-	+	+	+	+
11	+	-	+	+	-	-
12	+	-	-	+	-	-
13	+	+	-	-	-	-
14	+	+	+	-	+	-
15	+	+	+	-	-	-
16	-	+	-	-	-	-
17	-	+	+	+	+	+
18	-	+	+	+	-	-
19	-	+	-	-	-	-
20	-	+	-	-	-	-
21	-	+	-	-	-	-
22	-	+	+	+	+	+
23	-	+	+	+	+	-
24	-	+	-	+	-	-
25	-	+	-	-	-	-

В 7-ми (№ 2, 3, 5, 7, 10, 11, 12) пробах (46%) сывороток крови от инфицированных ВЛКРС коров (№ 1-15) обнаруживаются микобактериальные антитела в диагностируемых титрах. В 4-х пробах молока (№ 2, 3, 5, 10) от этих же коров также обнаруживаются микобактериальные антитела.

4 пробы (№ 3, 7, 12, 13), из числа положительных в РИД, в ИФА показали отрицательные результаты. В 3-х из них (№ 3, 7, 12) обнаруживаются микобактериальные антитела. Кроме того, в одной пробе молока (№ 3) от этих же животных также обнаруживаются микобактериальные антитела.

В пробах молока и сыворотки крови от животных положительных в РИД и реагирующих на ППД туберкулин в иммуноферментном анализе противотуберкулёзные антитела не обнаружены.

Из группы отрицательных в РИД, но реагирующие на туберкулин животных (№ 16-25) в 5 пробах сыворотки крови и в 2-х пробах молока зарегистрированы положительные реакции в ИФА с микобактериальным антигеном. Однако, нужно отметить, что из этих 5 проб, в 4-х (№ 17, 18, 22, 23) в ИФА на обнаружение анти ВЛКРС антител были положительные, что свидетельствует о перекрестной реактивности антител.

2.2.5 Изучение иммунореактивности ВЛКРС-инфицированных коров на основе ПЦР-ПДРФ анализа гена env-BLV

В рамках данного исследования было проанализировано 300 проб сывороток крови, положительно реагирующие в РИД. Данные пробы исследовали с помощью ИФА, 95,6% (287) из исследованных проб сыворотки крови показали положительные результаты на наличие противолейкозных антител. Все эти пробы были подвергнуты дополнительному анализу для выявления противотуберкулезных антител методом ИФА. В результате этого анализа у 73,8% (212) проб были выявлены специфические антитела к микобактериальным антигенам. Эти антитела были обнаружены в следующих комбинациях: 60 проб показали антитела к одному виду антигена, 123 пробы — к двум видам антигенов, а 29 проб — ко всем трем видам микобактериальных антигенов.

Для более глубокого анализа иммунореактивности и перекрестных реакций случайным образом отобрали 24 пробы для проведения ПЦР, с целью выявления провирусной ДНК BLV и ДНК микобактерии туберкулеза (*M. bovis*) в сыворотке крови.

Нужно отметить, что все пробы получены из благополучных по туберкулезу хозяйств и результаты ПЦР на микобактерии были во всех пробах отрицательные.

В таблице 10 Три пробы под номерами 12, 13 и 21 показали отрицательные результаты ПЦР ВЛКРС.

Из 24 исследованных образцов в 6-ти пробах (1,3,14,16,23,24) обнаружили антитела против всех трёх микобактериальных антигенов. В 2-х пробах (4,8) — против двух видов микобактерий: *M. bovis* и *M. scrotochomogenes*. В 2-х пробах (12,15) — против *M. bovis* и *M. avium*, а в 3-х (6,17,18) — против *M. avium* и *M. scrotochomogenes*. В 11 образцах антитела были обнаружены только против одного конкретного антигена: три образца показали наличие антител к *M. bovis*, три — к *M. avium*, и пять образцов содержали антитела против *M. scrotochomogenes*.

Результаты исследований доказывают возможную детерминантную общность антигенов между микобактериями и ВЛКРС, что может объяснить перекрестные иммунные реакции. Инфекция ВЛКРС может привести к развитию иммунологической толерантности, что затрудняет диагностику и лечение заболеваний.

Таблица 10 – Результаты ИФА ПЦР проб сывороток крови с микобактериальными антигенами

№ п/п	ИФА			ПЦР на ВЛКРС	ПЦР на микобактерии
	<i>M. bovis</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. scro.</i>		
1	+	+	+	+	–
2	–	–	+	+	–
3	+	+	+	+	–
4	+	–	+	+	–
5	–	–	+	+	–
6	–	+	+	+	–
7	–	–	+	+	–
8	+	–	+	+	–
9	–	+	–	+	–
10	–	+	–	+	–
11	–	+	–	+	–
12	+	+	–	–	–
13	–	–	+	–	–
14	+	+	+	+	–
15	+	+	–	+	–
16	+	+	+	+	–
17	–	+	+	+	–
18	–	+	+	+	–
19	–	–	+	+	–
20	+	–	–	+	–
21	–	–	+	–	–
22	+	–	–	+	–
23	+	+	+	+	–
24	+	+	+	+	–

Для дальнейшего изучения иммунореактивности и выявления возможных патогенетических связей отобрали несколько групп проб сывороток для проведения ПЦР-ПДРФ анализа на присутствие гена env-BLV. Всего было проанализировано 10 проб: 3 проб – 1 группа, реагирующая на антиген *M. avium*; 2 проб – 2 группа, реагирующая на *M. bovis*; 5 проб – 3 группа -на *M. scro.*

Для детекций результатов ПЦР-ПДРФ был использован горизонтальный электрофорез в 2,5% агарозном геле. Этот метод позволяет визуализировать результаты реакции и оценить присутствие или отсутствие целевых молекул ДНК в образцах. Электрофорез в агарозном геле представляет собой ключевой этап в молекулярной биологии для анализа размера и количества молекул ДНК, что показано на картинках 1 и 2, где представлены результаты.

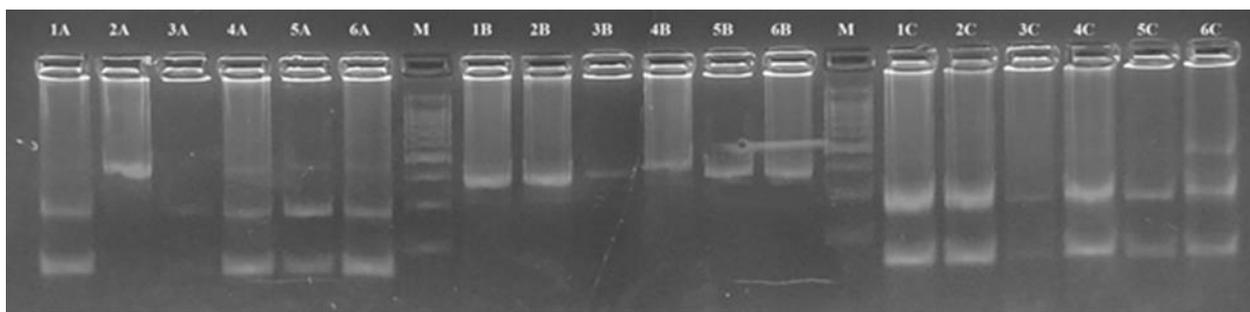


Рисунок 1 – Результаты ПЦР-ПДРФ гена env BLV

Обозначения: М – маркер молекулярного веса ДНК от 100 до 1000 пар нуклеотидов (п.н.); 1А – 6А – образцы ДНК, обработанные рестриктазой PvuII; 1В – 6В – образцы ДНК, обработанные рестриктазой SspI; 1С – 6С – образцы ДНК, обработанные рестриктазой BstDEI.

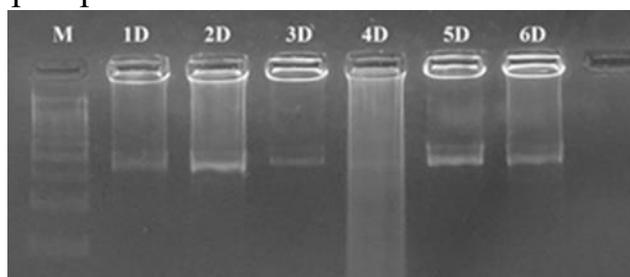


Рисунок 2 – Результаты ПЦР-ПДРФ гена env BLV

Обозначения: М – маркер молекулярного веса ДНК от 100 до 1000 пар нуклеотидов (п.н.); 1D – 6D – образцы ДНК, обработанные рестриктазой BamHI.

При проведении ПЦР-ПДРФ анализа ДНК изолятов 1 группы с использованием рестриктазы PvuI были обнаружены два паттерна: 164 п.н. и 280 п.н., что указывает на принадлежность к четвертому генотипу.

В ДНК изолятов 2 и 3 группы обнаружен паттерн размером 444 п.н., относящий их к седьмому или восьмому генотипу.

Применение рестриктазы SspI в ДНК всех изолятов выявило паттерны от 395 до 444 п.н.

Использование рестриктазы BstDEI позволило обнаружить паттерны 168 и 276 п.н., также во всех изолятах, что позволяет отнести их к четвертому, седьмому или восьмому генотипу.

Дальнейший анализ с BamHI показал, что в первой группе изолятов выявляется паттерн 444 п.н., что еще раз подтверждает принадлежность этих изолятов к 4 генотипу.

Таким образом, можно утверждать, что между лейкозом и туберкулезом крупного рогатого скота существует перекрестная иммунореактивность и коровы, инфицированные 4 генотипом ВЛКРС дают положительные результаты в ИФА с антигенами *M. avium*, что одновременно может служить причиной положительных ППД реакций.

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диагностика лейкоза и туберкулёза крупного рогатого скота остаётся одной из наиболее актуальных задач в современной ветеринарной медицине. При исследовании данных инфекций необходимо учитывать методы исследований, патогенез и гуморальный иммунитет, перекрёстную реактивность между антителами ВЛКРС и микобактериями туберкулёза. Поэтому расширение способов и разработка новых методов диагностики позволят точнее и быстрее определять инфекцию.

На основании полученных результатов нами сформулированы следующие выводы:

1. Иммуноферментный анализ (ИФА) обладает высокой чувствительностью, что делает его предпочтительным для раннего выявления инфекций, в то время как реакция иммунодиффузии (РИД) должна использоваться как вспомогательный метод из-за своей простоты, но меньшей эффективности.

2. Иммунопотенциметрические методы диагностики лейкоза по чувствительности не уступают иммунохимическим, являются более дешёвыми и могут использоваться для мониторинга эпизоотической ситуации в хозяйствах.

3. Появление ЦИК содержащих провирусных ДНК ВЛКРС может считаться началом болезни несмотря на стабильность гематологических показателей.

4. Антигены ВЛКРС и микобактерии имеют общие антигенные детерминанты, что влияет на иммунореактивность организма при различных диагностических тестах.

5. У коров, заражённых 4 генотипом ВЛКРС наблюдаются перекрестная иммунореактивность с микобактериями туберкулёза, а именно *M. avium*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Для мониторинга эпизоотической ситуации в хозяйствах по лейкозу использовать иммунопотенциметрический метод как более доступный и не уступающий по чувствительности другим современным методам.

2. Для оценки эпизоотической ситуации в хозяйствах и для определения статуса животных по лейкозу использовать ПЦР-тестирование проб молока на обнаружение провируса в ЦИК.

3. Проведение диагностических мероприятий на лейкоз и туберкулёз крупного рогатого скота должны основываться на результатах анализа эпизоотической ситуации по этим инфекциям.

РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Исходя из результатов проведенных исследований, перспектива для дальнейшей разработки темы может быть направлена на разработку новых методов исследований ВЛКРС и туберкулеза крупного рогатого скота, а также профилактики, основываясь на полученные данные.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в ведущих научных журналах, рекомендованных Перечнем ВАК Минобрнауки РФ

1. Якупов, Т.Р. Провирусная ДНК ВЛКРС в патогенезе лейкоза коров / Т.Р. Якупов, Ф.Ф. Зиннатов, А.В. Гатина, Н.Н. Масленников // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2020. – Т. 244, № 4. – С. 262-271.

2. Якупов, Т.Р. Возможности иммунопотенциометрии в диагностике лейкоза крупного рогатого скота / Т.Р. Якупов, Ф.Ф. Зиннатов, А.Т. Якупов, Н.Н. Масленников // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2021. – Т. 248, № 4. – С. 297-300.

3. Якупов, Т. Р. Иммунологические аспекты лейкоза и туберкулеза крупного рогатого скота / Т. Р. Якупов, Ф. Ф. Зиннатов, Н. Н. Масленников // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2021. – Т. 245, № 1. – С. 224-227.

4. Масленников, Н.Н. Особенности иммунореактивности ВЛКРС-инфицированных коров / Н.Н. Масленников, К.В. Усольцев, Р.И. Шангараев [и др.] // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2024. – Т. 258, № 2. – С. 119-122.

5. Масленников, Н.Н. Сравнительная эффективность методов диагностики лейкоза крупного рогатого скота / Масленников Н.Н. // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2024. – Т. 259, № 3. – С. 147-150.

6. Якупов, Т.Р. Изучение иммунореактивности ВЛКРС-инфицированных коров на основе ПЦР-ПДРФ анализа гена env BLV / Т.Р. Якупов, К.В. Усольцев, Р.И. Шангараев, Ф.Ф. Зиннатов, Н.Н. Масленников // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2024. – Т. 259, № 3. – С. 313-316.

Статьи, опубликованные в других изданиях

7. Масленников, Н.Н. Особенности иммунного ответа у коров инфицированных ВЛКРС и микобактериями туберкулеза / Н.Н. Масленников, Ф.Ф. Зиннатов // Актуальные проблемы ветеринарии и интенсивного животноводства: Материалы национальной научно-практической конференции с международным участием посвященной памяти доктора биологических наук,

профессора Е.П. Ващекина, Заслуженного работника Высшей школы РФ, Почетного работника высшего профессионального образования РФ, Почетного гражданина Брянской области, Брянск, 22 января 2021 года. Том Часть I. – Брянск: Брянский государственный аграрный университет, 2021. – С. 84-87.

8. Масленников, Н.Н. Перекрестные реакции в ИФА диагностике лейкоза и туберкулеза коров / Н.Н. Масленников // Молодежные разработки и инновации в решении приоритетных задач АПК: Сборник материалов международной научной конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи, посвященный 150-летию со дня рождения профессора Карла Генриховича Боля, Казань, 08 апреля 2021 года. Том I. – Казань: Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана, 2021. – С. 253-256.

9. Якупов, Т.Р. Диагностика лейкоза коров иммунопотенциометрией / Т.Р. Якупов, Ф.Ф. Зиннатов, А.Т. Якупов, Н.Н. Масленников // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2022. – № 2. – С. 52-56.

Публикации, индексируемые в Scopus / Web of Science

10. Yakupov, T. Age-related resistance of cattle to leukemia virus / T. Yakupov, F. Zinnatov, S. Mingazova, R. Musin, N. Maslennikov, R. Papaev, G. Shalamova, A. Rozhentsov, L. Holodova, E. Mikhalev and E. Chirgin // BIO Web of Conferences. – EDP Sciences, 2024. – Т. 130. – С. 07008.

Патент

11. Патент № 2757078 С1 Российская Федерация, МПК G01N 33/49. Способ потенциометрической диагностики лейкоза крупного рогатого скота: заявл. 20.02.2021; опубл. 11.10.2021 / Т. Р. Якупов, Ф. Ф. Зиннатов, А. Т. Якупов, Н. Н. Масленников; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана».