

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАЗАНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ
МЕДИЦИНЫ ИМЕНИ Н.Э. БАУМАНА»

На правах рукописи

МАСЛЕННИКОВ НИКИТА НИКОЛАЕВИЧ

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

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:

Якупов Талгат Равилович,

д.вет.н., доцент

Казань – 2024

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Общая характеристика лейкоза крупного рогатого скота.....	10
1.2 Антигенная структура вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС)	11
1.3 Диагностика, профилактика и меры борьбы лейкозом крупного рогатого скота.....	12
1.4 Туберкулёз крупного рогатого скота. Общие сведения.....	20
1.5 Антигенная структура микобактерий.....	23
1.6 Методы диагностики.....	25
1.7 Методы иммуноферментного анализа в диагностике туберкулеза и лейкоза крупного рогатого скота.....	31
2 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	38
2.1 Материалы и методы исследований.....	38
2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	46
2.2.1 Сравнительное изучение иммунохимических и потенциометрических методов диагностики лейкоза крупного рогатого скота.....	46
2.2.1.1 Сравнительная эффективность РИД и ИФА в диагностике лейкоза крупного рогатого скота.....	46
2.2.1.2 Иммунопотенциометрия в диагностике лейкоза крупного рогатого скота.....	49
2.2.2 Особенности патогенеза и гуморального иммунитета инфицированных с ВЛКРС коров.....	55
2.2.3 Иммунологические аспекты лейкоза и туберкулеза крупного рогатого скота.....	66
2.2.3.1 Изучение перекрестной реактивности анти-ВЛКРС антител крови с микобактериальными антигенами.....	66
2.2.3.2. Изучение перекрестной реактивности противолейкозных и туберкулезных антител в молоке.....	75
2.2.4. Изучение иммунореактивности ВЛКРС-инфицированных коров на основе ПЦР-ПДРФ анализа гена env-BLV.....	80

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	92
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	97
СПИСОК СОРАЩЁННЫХ ТЕРМИНОВ.....	98
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	100
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	120

ВВЕДЕНИЕ

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 туберкулёзом и лейкозом животных, основой профилактических и оздоровительных мероприятий была и остаётся своевременная и точная диагностика этих инфекций [37, 100].

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 не достаточно используются для характеристики микобактериальных антигенов, приготовления диагностикумов и других целей [100].

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 [31, 58, 140]. 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 [4, 23, 35]. Причинами таких утверждений, несомненно, являются как сложная антигенная структура микобактерий, у которых выявляется множество антигенов общих для всех групп микобактерий [30, 58], 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 [64, 103].

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 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.

Теоретическая и практическая значимость работы включает в себя расширение способов диагностики лейкоза крупного рогатого скота. Результаты исследования будут использованы в разработке по борьбе с лейкозом крупного рогатого скота в ветеринарной лаборатории (Приложение № 2). Полученные результаты рекомендованы к использованию в учебном процессе высшего учебного заведения ветеринарного профиля по дисциплине: «биохимия» (Приложение № 1)

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 доктора биологических наук, профессора Е.П. Ващекина, Заслуженного работника Высшей школы РФ, Почетного работника высшего профессионального образования РФ, Почетного гражданина Брянской области «Актуальные проблемы ветеринарии и интенсивного животноводства» (Брянск, 2021); Международной научно-практической конференции «Современные проблемы и достижения зооветеринарной науки», посвященная 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, 7 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.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика лейкоза крупного рогатого скота

Лейкоз крупного рогатого скота — это хроническое инфекционное заболевание опухолевой природы, которое чаще всего протекает без симптомов. Если же появляются признаки озлокачествления процесса, то это проявляется увеличением количества лимфоцитов в крови (лимфоцитоз), а также образованием опухолей в органах и тканях, участвующих в кроветворении, и в других органах и тканях [92, 126]. Возбудитель болезни (вирус лейкоза крупного рогатого скота – ВЛКРС) – онкогенный РНК-содержащий вирус, экзогенного происхождения, семейства ретровирусов, обладающий тропизмом к лимфоидным клеткам и размножающийся в них. Вирус неустойчив во внешней среде. Дезинфицирующие средства и высокая температура, используемая в процессе технологической пастеризации, оказывают разрушительное воздействие. [18, 147]. ВЛКРС передаётся исключительно через лимфоциты, которые были заражены этим вирусом. Это происходит в результате несоблюдения правил асептики и антисептики во время проведения зооветеринарных процедур, таких как ректальное исследование, ректоцервикальный способ осеменения, таврение телят, взятие проб крови и парентеральное введение препаратов. Также вирус может передаваться через молоко от коров-вирусоносителей быкам-производителям, которые инфицированы ВЛКРС. Кроме того, около 10% новорождённых телят могут заразиться вирусом внутриутробно [45, 65, 145]. На основании комплексной диагностики было установлено, что лейкоз крупного рогатого скота регистрируется почти во всех странах мира. Особенно большое распространение заболевание получило в странах с развитым племенным молочным скотоводством [1, 60, 138]. В 1858 году в Германии А. Лейзеринг впервые описал случай лейкемии у животного. Он заметил, что у лошади,

страдающей лейкозом, сильно увеличена селезёнка, в которой преобладали белые кровяные тельца. В конце XIX века заболевание было зафиксировано у крупного рогатого скота, свиней, собак, кошек, овец, коз и кур. На протяжении почти целого столетия учёные разных стран исследовали причины возникновения лейкоза. И только в 1969 году был открыт вирус лейкоза крупного рогатого скота [61, 137]. Отечественные учёные провели глубокое исследование лейкоза. Благодаря многолетним исследованиям и анализу литературных данных, В. П. Шишков в 1988 году предложил вирусоиммуногенетическую теорию о причинах и развитии лейкозов и некоторых других видов опухолевых болезней животных. Эта теория находит постоянное подтверждение в многочисленных исследованиях, проводимых по всему миру [17, 51].

1.2 Антигенная структура вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС)

Антигенная структура вируса лейкоза крупного рогатого скота изучена многими авторами [Г.Ф.Коромыслов и др. 1979; J.F.Fe; А.Ф.Валихов,1978; Донник И.М., Петропавловский М.В., 2010] [100]. Установлено, что в составе вириона содержатся белки с молекулярной массой р24, р15, р12 и р10 и гликопротеиды гр51, гр30, при этом в наибольшем количестве обнаруживается структурный белок р24 – который имеет общую антигенную детерминанту с вирусами лейкоза саркомы птиц, вирусов типа С млекопитающих (мышей, хомяков, обезьян) и вируса Д (вирус обезьян) [99, 107]. Белок р24 ВЛКРС и р24 Т-клеточного лейкоза человека HTLV1 имеет перекрестную реакцию в иммуноблоте. На структурные белки р24, р15, гр30 гр 51 в сыворотках крови больных коров обнаруживаются комплементсвязывающие антитела [64, 132, 148].

Гликопротеины gp30 и gp 51 обладают гидрофобными свойствами и входят в состав вирусной оболочки. Они являются производными гена env [72, 159, 165].

В антигенном отношении ВЛКРС отличается от известных вирусов типа С. Не выявлено с помощью ИФ и иммунодиффузии АГ родства между главным внутренним белком ВЛКРС р24 и группоспецифическими АГ вирусов лейкозов мышей и кошек, опухолей молочных желёз мышей, вирусов бабуинов, Мезон-Пфайзера, шерстистых обезьян. ВЛКРС, являясь экзогенным ретровирусом КРС, отличается от известных ретровирусов по АГ свойствам, морфогенезу, способности индуцировать синцитий в монослойных культурах клеток и по свойствам ревертазы. Кроме того, в отличие от большинства других лейкемогенных вирусов, он присутствует у инфицированных животных в непродуктивном состоянии. На основании этих различий Ferrer считает, что ВЛКРС является особым лейкемическим вирусом, принадлежащим к особой группе *Oncovirinae*, обозначенной как тип E [16, 23, 100].

1.3 Диагностика, профилактика и меры борьбы лейкозом крупного рогатого скота

Среди мер по борьбе с лейкозом крупного рогатого скота особое значение имеет своевременная и точная диагностика. Именно ранняя и точная диагностика лежит в основе всех профилактических и оздоровительных мероприятий против лейкоза [23, 89, 93, 94, 122].

Диагноз на лейкоз ставят на основании эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований, которые включают гематологические, гистологические и серологические исследования [55, 125, 128].

Животное считают больным лейкозом при наличии одного из следующих показателей:

- 1) клинических признаков болезни;
- 2) положительных результатов гематологических исследований;
- 3) обнаружении у павшего (убитого) животного характерных патологоанатомических изменений;
- 4) установлении положительного результата гистологического исследования патологического материала в случае падежа (убоя) животных.

Клинические признаки проявляются, как правило, к концу болезни, поэтому в диагностике заболевания они имеют лишь вспомогательное значение [7, 21, 121].

Гематологическое исследование заключается в обнаружении в периферической крови повышенного числа лейкоцитов, в основном лимфоидного ряда, и слабо дифференцированных клеток (родоначальных, пролимфоцитов, лимфобластов), а также полиморфных, атипичных клеток кроветворных органов [41, 42, 153].

Подсчет лейкоцитов проводят при помощи электронного счетчика или в камере Горяева, а процентное соотношение отдельных форм лейкоцитов крови – в окрашенном мазке под микроскопом. Результаты гематологических исследований оценивают по так называемому лейкозному ключу и морфологическому характеру клеток крови (табл. 1).

Таблица 1 – Число лейкоцитов и лимфоцитов у здорового, подозрительного по заболеванию и больного лейкозом крупного рогатого скота («лейкозный ключ»)

Возраст животных	Число лейкоцитов в 1 мкл крови	Абсолютное число лимфоцитов в 1 мкл крови	
		Подозрительные	Больные лейкозом
лет	Здоровые	Подозрительные	Больные лейкозом
От 2 до 4	До 11000	От 8000 до 10000	Свыше 10000
От 4 до 6	До 10000	От 6500 до 9000	Свыше 9000
6 и старше	До 9000	От 5500 до 8000	Свыше 8000

Если количество лейкоцитов у животных будет ниже числа, указанного во второй графе таблицы, то результат исследования на лейкоз считают отрицательным, если выше, то готовят мазки и определяют лейкоцитарную формулу. У быков-производителей во всех случаях независимо от числа лейкоцитов выводят лейкоцитарную формулу [84, 144].

Обнаружение возбудителя лейкоза крупного рогатого скота и разработка серологических методов диагностики инфекции коренным образом изменили подход как в выяснении эпизоотической ситуации, так и проведении профилактических и оздоровительных мероприятий [98, 119, 129].

Характерной особенностью ВЛКРС инфекции у крупного рогатого скота является пожизненная персистенция вируса и вирусоспецифических антител у больного животного [Валихов А.Ф., 1976; Смирнов П.Н. и др., 1998]. Поэтому серологические методы обнаружения специфических сывороточных антител являются наиболее практичными, экономичными и широко используемыми в диагностике лейкоза крупного рогатого скота [83, 95, 140].

Противолейкозные мероприятия с использованием серологических методов выявления инфицированных животных нашли широкое применение

почти во всех странах мира и позволили полностью искоренить лейкоз в ряде стран Западной Европы [В.К.Двойников и др., 1994; И.И.Барабанов и др., 1994; В.М. Нахмансон и др., 1997; и др.] [106].

Из серологических методов в диагностике лейкоза животных применяли РСК, РИФ (реакция иммунофлуоресценции), РИП (реакция иммунопреципитации), РИД (реакция иммунодиффузии) и др. [34].

Наиболее широкое применение в практике ветеринарии нашла реакция иммунодиффузии в геле (РИД), как наиболее простая и доступная для сероэпидемиологических исследований, выполняемых в полевых условиях [143]. В настоящее время у нас в стране и в большинстве зарубежных государств РИД принята в качестве основного серологического теста для диагностики лейкоза [21, 158].

Реакцию иммунодиффузии в агаровом геле по Ouchterlony (1958), впервые применили для прижизненной диагностики лейкоза крупного рогатого скота Miller and Olson (1972), используя антиген р24 ВЛКРС. Достаточно высокая специфичность, чувствительность, а также эффективность метода в диагностике лейкоза крупного рогатого скота по сравнению с клинико-гематологическими и гистологическими исследованиями считается доказанной, что подтверждается в работах многих авторов [9, 11, 70, 100].

РИД выявляет в сыворотке крови животных специфических преципитирующих антител к ВЛКРС. Пробы крови для исследования берут не ранее чем через 15 суток после введения животным вакцин или аллергенов, за 30 суток до отела и спустя такой же срок после него [69]. Специфические антитела появляются в крови через 1-2 месяца после заражения вирусом лейкоза и сохраняются пожизненно [113]. Серологическому исследованию на лейкоз подвергают пробы сыворотки крови от животных в возрасте 6 месяцев и старше [157]. Время с момента внедрения вируса до образования антител к

ВЛКРС, определяемых в реакции иммунодиффузии, составляет 1-1,5 месяца [9, 67].

Для постановки РИД используют диагностические наборы, которые состоят из специфического антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота, специфической преципитирующей сыворотки к ВЛКРС, отрицательной сыворотки и других компонентов. К набору прилагается наставление по его применению для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота [68, 118].

Генотипы вируса лейкоза крупного рогатого скота.

Вирус лейкоза крупного рогатого скота (более известный как вирус Бовиного лейкоза, BLV) имеет генетическую структуру, которая обычно состоит из одноцепочечной РНК в оболочке белка. Генотипы этого вируса могут варьироваться в зависимости от различных факторов, включая его распространение, эволюцию и воздействие окружающей среды [109, 156].

Вирус Бовиного лейкоза обладает высокой вариабельностью, что может приводить к существенным изменениям в его геноме. Основные компоненты генотипа включают различные гены, кодирующие структурные белки вируса, такие как гликопротеин, капсидные белки и белки матрикса. Мутации в этих генах могут влиять на вирулентность (способность вызывать болезнь) и способность вируса интегрироваться в геном клетки хозяина [150].

Кроме того, вирус Бовиного лейкоза имеет геном, способный интегрироваться в геном ДНК хозяина, что может привести к появлению определенных генетических изменений в зараженных клетках. Эти изменения могут также варьироваться и могут влиять на развитие лейкоза или других патологий у зараженного скота [78, 108].

Следует отметить, что изучение генотипов вируса Бовиного лейкоза является важным аспектом для понимания его эпидемиологии, эволюции и для разработки эффективных методов контроля и лечения этой инфекции.

В настоящее время выделены четыре главных группы генотипов. Эти группы, обычно обозначаемые как группы А, В, С и D, различаются по своим генетическим характеристикам и распространению в различных регионах мира [140].

Группа А: Эта группа генотипов широко распространена во многих странах, включая Северную и Южную Америку, Европу, Японию и другие. Она характеризуется разнообразием подтипов и часто ассоциируется с развитием лейкоза у крупного рогатого скота. Данная группа:

- включает в себя генетически разнообразные штаммы вируса;
- характеризуются большой генетической вариабельностью, особенно в генах, кодирующих поверхностные гликопротеины gp51 и gp30;
- Штаммы этой группы могут вызывать разнообразные клинические формы заболевания у скота, включая лейкоз и лимфомы.

Группа В: Этот генотип обычно ассоциируется с крупным рогатым скотом в Японии. Он имеет свои собственные уникальные характеристики, которые отличают его от других генотипов:

- Генотипы этой группы имеют меньшую генетическую вариабельность по сравнению с группой 1.
- Они характеризуются более консервативными генетическими последовательностями.
- Генотипы группы 2 обычно менее вирулентны, но все равно могут вызывать развитие лейкоза у скота.

Группа С: Эта группа встречается в Центральной и Южной Америке, а также в некоторых других регионах. Она также имеет свои собственные генетические особенности:

- Эта группа отличается от предыдущих групп более высокой консервативностью генетических последовательностей.
- Генотипы группы 3 имеют ограниченную генетическую вариабельность.
- Они обычно менее вирулентны, но могут присутствовать у зараженных животных.

Группа D: Этот генотип был обнаружен в Южной Америке и характеризуется уникальными мутациями и особенностями:

- Основной характеристикой этой группы является высокая степень консервативности генетических последовательностей.
- Генотипы этой группы имеют ограниченную генетическую вариабельность.
- Они обычно менее вирулентны по сравнению с другими группами, но всё же могут вызывать заболевания.

Эти группы генотипов могут быть важны для понимания распространения и эпидемиологии вируса лейкоза крупного рогатого скота в различных частях мира, а также для разработки стратегий контроля и предотвращения его распространения.

Группа А имеет свои подтипы, их 4:

1. 1-й подтип:

- Этот подтип характеризуется специфическими генетическими вариантами, которые могут иметь особые последовательности в генах, кодирующих поверхностные белки вируса.

- Подтип 1a может быть связан с определенными клиническими формами болезни у зараженных животных, такими как лейкоз и лимфомы.
- Генетические варианты этого подтипа могут влиять на патогенез заболевания и его прогрессию у инфицированного скота.
- Изучение подтипа 1a важно для понимания механизмов вирулентности BLV и разработки стратегий контроля этого вируса.

2. 2-й подтип:

- Этот подтип также обладает своими уникальными генетическими характеристиками, которые могут отличаться от подтипа 1a.
- Подтип 1b может иметь определенные мутации или варианты генов, которые могут влиять на его распространение и клинические проявления у зараженных животных.
- Генетические особенности подтипа 1b могут быть важными для определения его патогенеза и роли в развитии лейкоза у скота.
- Исследования подтипа 1b могут помочь в понимании разнообразия BLV и его эпидемиологии в конкретных регионах.

3. 3-й подтип:

- Этот подтип также представляет собой вариацию генетической структуры вируса BLV.
- Подтип 1c может иметь свои уникальные мутации или варианты генов, которые могут влиять на его свойства и распространение.
- Изучение генетических особенностей подтипа 1c может помочь в понимании его вирулентности и вклада в развитие лейкоза у скота.

4. 4-й подтип:

- Этот подтип также характеризуется уникальными генетическими особенностями, отличающими его от других подтипов.

- Подтип 1d может иметь свои особенности в распространении и патогенезе болезни у скота.
- Исследования подтипа 1d могут помочь в понимании его роли в эпидемиологии и развитии лейкоза у крупного рогатого скота.

1.4 Туберкулёз крупного рогатого скота. Общие сведения

Первые упоминания о признаках туберкулеза встречаются еще в IV веке до нашей эры. В то время Гиппократ описал общие клинические симптомы и реакции на заболевание у людей, плюс к тому дал рекомендации по лечению [152].

Сам термин был введен в обращение французским врачом по фамилии Ленек примерно в 1819 году. Исследователь Виллемен в 1869 году доказал, что данное заболевание относится к заразным [110]. Оно может быстро приобретать форму эпидемии.

В 1882 году немецкий ученый Р. Кох выявил и описал микроорганизм, который является основным возбудителем заболевания, после чего его стали называть палочкой Коха [155]. Этот же Кох провел первые серьезные диагностические исследования, в результате чего в 1890 году на свет появился туберкулин, дающий реакцию на туберкулез [49, 74, 131].

Выявление туберкулеза крупного рогатого скота относят к 1828 году, но признаки и основные симптомы были описаны лишь в 1895 году и получили название по имени исследователя – паратуберкулезный энтерит Йоне.

Туберкулёз — инфекционная, хронически протекающая болезнь животных всех видов и человека, характеризующаяся поражением органов и тканей с образованием в них туберкулов [76, 115].

Возбудитель — бактерии из рода *Mycobacterium*, в который входят более 38 самостоятельных видов. Болезнь у животных вызывают микобактерии туберкулёза бычьего (*M. bovis*), человеческого (*M. tuberculosis*) и птичьего (*M.*

avium) видов. Каждый из них является патогенным для животных соответствующего вида или человека, возможно перекрестное заражение [154]. Микобактерии туберкулёза бычьего вида патогенны для крупного рогатого скота. К ним также восприимчивы все млекопитающие животные и человек. К возбудителю туберкулёза человеческого вида восприимчивы, кроме человека, свиньи, козы, кошки, собаки. Этот вид, в основном, сенсibiliзирует крупный рогатый скот к туберкулину и лишь иногда вызывает незначительные очаги в отдельных лимфатических узлах [4, 38].

M. avium — возбудитель туберкулёза домашних и диких птиц. Он может вызывать патологические изменения у свиней. У крупного рогатого скота возбудитель туберкулёза птичьего вида вызывает кратковременную сенсibiliзацию организма к туберкулину [82, 141, 160].

Отдельные виды атипичных микобактерий или их ассоциации могут вызывать сенсibiliзацию крупного рогатого скота, свиней и птиц к туберкулинам и в отдельных случаях патоморфологические изменения в лимфатических узлах у свиней, неотличимые от туберкулёзных изменений [59].

По мнению ряда исследователей, атипичные микобактерии относятся не к микобактериям туберкулеза, а являются самостоятельными видами, потенциально патогенных для человека и животных [Т.Б. Ильина, 1975]. Считают также, что атипичные микобактерии произошли в результате изменения свойств микобактерий туберкулеза под влиянием антибактериальных препаратов или же они являются сапрофитами, которые попадают в организм животного или человека из внешней среды; будучи потенциально патогенными, они при особых условиях могут вызвать заболевание [М.А. Сафин, Г.З. Идрисов, 1992].

По классификации Раниона все атипичные микобактерии разделены на 4 группы.

Первая группа – фотохромогенные, кислотоустойчивые палочки, образующие на свету лимонно-желтый пигмент, переходящий в оранжевый или коричнево-красный; микробы растут в течение двух недель при 37°С на твердых средах и при 25°С – в течение трех недель (чаще R-формы); патогенны для мышей при внутривенном заражении. Основные представители этой группы получили название *M. kansasii*.

Вторая группа – скотохромогенные, кислотоустойчивые микобактерии, образующие оранжевый пигмент на свету и в темноте; медленно растут при комнатной температуре, быстрее при 37°С, колонии обычно S-формы; для лабораторных животных не патогенны. Типичные представители – *M. gordona*, *M. scrofulaceum*.

Третья группа – нефотохромогенные, эти микобактерии могут быть не окрашенными или иметь желтовато-оранжевые оттенки; однако пигментация не зависит от экспозиции на свету: растут 3-4 недели при 37-45°С и более медленно при 25°С. Колонии обычно S-формы. Представители: *M. intracellulare*, *M. battey*.

Четвертая группа – быстрорастущие микобактерии. В течение 3-6 дней при температуре 25-37°С они заканчивают рост, образуя зрелые колонии. Эта группа объединяет кислотоустойчивые сапрофиты – *M. phlei*, *M. stegmatis*, *M. fortuitum* [22].

Количество обнаруживаемых видов, подвидов, вариантов атипичных микобактерий постоянно растет. Так по данным А.И. Кузина (1992), известно более 160 видов микобактерий. Их удается обнаружить во всех объектах внешней среды, в организме насекомых, птиц, диких и домашних животных, а также в различных выделениях животных и человека. Наибольший вклад в исследование атипичных микобактерий внесли Г.А. Юдина (1986); Ю.К. Вейсфеллер (1975); и др.

Интерес к атипичным микобактериям вызван, с одной стороны, необходимостью дифференцировать их от микобактерий туберкулеза, а с другой – тем, что они вызывают путаницу в аллергической диагностике туберкулеза крупного рогатого скота. Обстоятельные работы по изучению парааллергических реакций у крупного рогатого скота провели Г.А. Юдин, 1986; О.В. Мартма, 1971; и другие [85].

Немаловажную роль в сенсibilизации крупного рогатого скота играют и сапрофитные микобактерии, которые в отличие от туберкулезных, апатогенны как для человека, так и для животных. Они свободно обитают в природе, их можно выделить как из материала здорового человека, так и из патологического материала, а также и из внешней среды [В.Н. Васильев, 1971] [104]. Разными авторами описано более 200 штаммов кислотоустойчивых сапрофитных микобактерий. О возможности перекрестной реакции при сенсibilизации организма микобактериями *phlei*, *fartuitum*, *kansasi* и др. сообщили В.Г. Чепик (1980) и другие [62].

1.5 Антигенная структура микобактерий

В современной классификации возбудителя туберкулеза относят к роду *Mycobacterium*, который объединяет обширную группу кислотно- и спиртоустойчивых микробов семейства *Mycobacteriaceae*. Род микобактерий включает много различных видов, патогенных и непатогенных для животных и человека. Около 200 видов микобактерий обитает в воде, земле, на растениях и животных. Однако в настоящее время идентифицировано только около 30 видов, среди которых выделяют 4 патогенных и 9 потенциально патогенных видов для человека и животных [Ковалев Г.К., 1984; Репин Ю.М., 1984] [149]. Далее следует группа микобактерий, объединенная под общим названием атипичных или неклассифицированных микобактерий [Власенко В.В., 1999].

Микобактерия имеет форму тонкой палочки, иногда прямой, чаще слегка изогнутой, с несколько округленными концами. Длина палочек колеблется от 0,8 до 3-5 мкм, ширина – от 0,2 до 0,5 мкм. По мере старения культуры микобактерий образуют кокковые формы [Вейсфейлер Ю.К., 1975] [142].

Электронной микроскопией установлено, что микобактериальная клетка имеет тонкую, состоящую из трех слоев стенку, в которых определяются пептидогликолипиды и липополисахариды. Наиболее важным для сохранения жизнеспособности компонентом являются сшитые между собой молекулы пептидогликана, обладающие высокой механической прочностью, которая обусловлена межмолекулярными связями пептидогликолипидной цепи микобактерий как внутри слоя, так и между слоями клеточной стенки [80].

В клеточной стенке находятся видоспецифические антигены. Принято считать, что оболочки микобактериальных клеток индуцируют в макроорганизме антителообразование. Они являются полными антигенами (полисахаридо-липидный комплекс) [Авербах М.М., 1976] [135].

Химический состав антигенов возбудителя туберкулеза крупного рогатого скота, способность их вызывать образование различных антител, интерферона является предметом изучения многих исследователей. Изучается культуральный фильтрат и сами клетки [57, 134]. По данным Gupta V.K. и др. (1994) культуральные фильтраты вакцинного штамма БЦЖ при гельфильтрации дают 4 основных фракций. Из них вторая фракция показывает наибольшую антигенную активность в реакциях иммуноферментного анализа, а также развивает гиперчувствительность у морских свинок.

Растворимые антигены из микобактерий подразделяются на 4 основные группы:

- антигены группы I - являются общими для всех видов микобактерий и близких бактериальных родов;
- антигены группы II - характерны для медленно растущих микобактерий;
- антигены группы III - характерны для быстро растущих микобактерий;
- антигены группы IV являются специфическими для отдельных видов микобактерий.

В этой связи главный вывод заключается в том, что иммунные реакции к патогенным медленно растущим микобактериям не являются специфическими, так как это одновременно является реакцией и на антигены общие для других видов. И наоборот, быстрорастущие микобактерии могут вызывать образование антител к антигенам патогенных микобактерий, то есть неизбежно наличие перекрестных реакций [24].

1.6 Методы диагностики

1) *Аллергический метод* – внутрикожная туберкулиновая проба с применением Пурифид Протеин Дериватив – туберкулина (ППД-туберкулин) для млекопитающих. Туберкулин вводят крупному рогатому скоту в середину шеи. Учет и оценку реакции на введение туберкулина проводят через 72 часа. Животных считают положительно реагирующими на туберкулин при утолщении кожной складки на 3 мм и более. Толщину кожной складки в месте введения туберкулина измеряют кутиметром, а полученный показатель сравнивают с толщиной кожной складки рядом с местом введения препарата [3, 4, 15, 89, 115].

Для дифференциации парааллергических реакций у крупного рогатого скота используется симультанная проба с одновременным применением двух туберкулинов – для млекопитающих и для птиц или туберкулина для

млекопитающих и комплексного аллергена из атипичных микобактерий (КАМ) [25, 77, 111].

Симультанная проба проводится в том же порядке, что и туберкулиновая. Проба является групповой и дает возможность оценить ситуацию по туберкулезу лишь в целом по стаду или по группе (не менее 6 голов) обследуемых животных. Под достоверностью различия понимают такое различие в величине показателей интенсивности реакций на туберкулин и КАМ, которое дает возможность с уверенностью не менее чем на 95 % сделать заключение о состоянии по туберкулезу обследуемой группы животных [3, 32, 75].

Офтальмопроба на туберкулез (глазной метод туберкулинизации).

Туберкулин в количестве 3–5 капель наносится на конъюнктиву нижнего века или на поверхность роговицы глаза животного. Проводится офтальмопроба двукратно с 5–6-дневным интервалом [6, 86]. Результаты офтальмопробы оценивают через 6, 9, 12 и 24 часа после первого и через 3, 6, 9 и 12 часов после повторного введения туберкулина. Реакция считается положительной, если образуется гнойный или слизисто-гнойный секрет, который накапливается в конъюнктивальном мешке или вытекает в виде шнура из внутреннего угла глаза. Кратковременная гиперемия слизистых оболочек глаза и слезотечение с образованием небольшого количества слизистого секрета рассматриваются как отрицательная реакция [3, 63, 124].

Факторы, обуславливающие проявление неспецифических реакций на туберкулин у КРС. В многочисленных исследованиях было показано, что проявления неспецифических реакций на туберкулин у крупного рогатого скота обусловлены многочисленными факторами внешней среды и индивидуальными особенностями организма животного [2, 6]. Неспецифические реакции подразделяются на две основные группы: парааллергические и псевдоаллергические (см. таблицу 2) [8, 91].

Таблица 2 – Причины возникновения неспецифических реакций у крупного рогатого скота на введение туберкулина

Неспецифическая реакция	Фактор, обуславливающий проявление неспецифической реакции	Особенности неспецифической реакции
Парааллергическая	Атипичные (нетуберкулезные) виды микобактерий и их ассоциации. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (микобактерии туберкулеза человека). <i>Mycobacterium avium</i> (микобактерии туберкулеза птичьего)	Непостоянство реакции на туберкулин. Сенсибилизация организма животного сохраняется от 1 до 3 месяцев после инфицирования [6]. Выявление наибольшего количества животных с выраженными реакциями на КАМ
Псевдоаллергическая	Наличие гельминтов (фасциол, дикроцелий, эхинококков). Актиномикоз. Микологические поражения легких. Гнойные или гнойно-некротические процессы во внутренних органах. Нарушения обмена веществ.	В благополучных по туберкулезу стадах у отдельных животных регистрируется увеличение толщины кожной складки на месте введения туберкулина на 3–4 мм, признаки воспаления отсутствуют [87].

Причиной возникновения неспецифических реакций у крупного рогатого скота на введение туберкулина могут служить:

1) несоблюдение трехнедельного интервала между туберкулинизацией и вакцинацией (в этот период происходит сенсibilизация организма, и здоровые животные дают положительную реакцию на туберкулин);

2) «человеческий фактор» (диагностические исследования проводят профессионально не подготовленные лица; нарушается методика проведения туберкулинизации и т. д.) [8, 52].

Лабораторные методы диагностики туберкулеза КРС
К лабораторным методам диагностики туберкулеза относятся бактериологическое исследование, серологическое исследование и молекулярно-биологическое исследование. Бактериологическое исследование проводится с целью выделения возбудителя туберкулеза [73, 146].

Отбор проб биоматериалов для бактериологического исследования производят как от животных с клиническими признаками туберкулеза, так и от животных, вызывающих подозрение на туберкулез. Исследуют молоко, мокроту, мочу. От павших и убитых животных для исследования отбирают пораженные участки органов на границе со здоровой тканью и измененные лимфатические узлы.

При наличии характерных для туберкулеза изменений исследуются портальные, предлопаточные, надвыменные, поверхностные паховые лимфатические узлы и фрагменты внутренних органов – легких, печени, почек [32].

Бактериологическое исследование биоматериалов на туберкулез занимает срок до 3 месяцев. Заболевание животных туберкулезом считается установленным в случаях выделения микобактерий туберкулеза бычьего или человеческого из материала от убитых животных [3, 5, 9].

Серологическое исследование на туберкулез проводится в реакции связывания комплемента (РСК). РСК применяется в двух вариантах:

1) для обнаружения в сыворотке больного животного специфических антител к возбудителю туберкулеза;

2) для выявления и идентификации в исследуемом материале антигена возбудителя туберкулеза.

Проводят серологическое исследование в сельскохозяйственной организации в случаях, предусмотренных пунктом 2.7 раздела 2 «Инструкции о мероприятиях по профилактике и ликвидации туберкулеза животных», а именно «...в случаях выявления в благополучном по туберкулезу стаде (на ферме) крупного рогатого скота при плановом исследовании реагирующих на туберкулин животных...» [5].

Молекулярно-биологическое исследование на туберкулез.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является одним из высокочувствительных и специфичных методов диагностики туберкулеза. Чувствительность метода ПЦР – от 10 до 100 микроорганизмов в пробе (чувствительность микроскопического метода – от 10³ до 10⁵ микроорганизмов). В основе метода лежит амплификация специфических участков ДНК возбудителя, которые содержатся в исследуемой пробе. В настоящее время в лабораторной практике применяются тест-системы как для выявления ДНК конкретного вида, так и для дифференцирования видов, входящих в *Mycobacterium tuberculosis complex*: микобактерий человеческого вида (*M. tuberculosis*), бычьего вида (*M. bovis*) и вакцинного штамма микобактерий бычьего вида (*M. bovis BCG*). Для проведения анализа используют следующие образцы биопроб от крупного рогатого скота: цельную кровь, молоко, фарингеальные смывы, мочу, фекалии, носовую слизь и биопсийные материалы, в том числе лимфатические узлы [3, 136].

Молекулярно-биологическое исследование позволяет значительно ускорить раннюю диагностику туберкулеза, дифференцировать пара- и псевдоаллергические реакции на туберкулин, снизить количество подозреваемых в заражении туберкулезом и подвергаемых диагностическому убою животных [6, 133].

Патологоанатомические исследования. Для убоя с диагностической целью отбирают животных по результатам вышеизложенных методов исследования. Патологоанатомические изменения в организме больного туберкулезом животного зависят как от его возраста, так и от стадии инфекционного процесса. В начальных стадиях инфекционного процесса туберкулы имеют вид серых полупрозрачных узелков размером от булавочной головки до чечевичного зерна. Затем они становятся мутными, приобретают бело-желтый цвет, заполняются некротизированной сухой творожистой массой. В легких туберкулезные очаги поражения чаще выделяются над плеврой по тупому краю органа.

Молочная железа, печень, селезенка и почки у крупного рогатого скота поражаются обычно при генерализованном процессе. «Жемчужница» (туберкулезное поражение серозных покровов) регистрируется с одновременным поражением паренхиматозных органов и региональных лимфатических узлов.

Гистологические исследования проводят для дифференциации туберкулезных патологоанатомических изменений от сходных изменений, наблюдаемых при других заболеваниях, например, для дифференциации от гранулем паразитарного и микотического происхождения. В положительных случаях в гистологических препаратах, окрашенных по Цилю – Нильсену, находят гранулемы с некротизированным центром, окруженные зоной эпителиоидных, отдельных гигантских лимфоидных клеток и соединительно-тканной капсулой [47, 127].

1.7 Методы иммуноферментного анализа в диагностике туберкулеза и лейкоза крупного рогатого скота

В настоящее время согласно стандартам МЭБ (OIE. World Animal Health in 2005) узаконенными методами диагностики лейкоза крупного рогатого скота являются реакция иммунодиффузии в геле агара и метод иммуноферментного анализа [159].

Несмотря на то, что РИД остается одним из основных диагностических методов, именно ИФА широко используют в Национальных программах по борьбе с лейкозом крупного рогатого скота во многих странах Западной Европы и Америки. Практическая диагностическая эффективность ИФА нашло широкое освещение в литературе [Шишков В.П. и др., 1998; Итэсь Ю.Р. и др., 2005; Гулюкин М.И. и др., Иванов О.В. и др., 2008; M.van den Heuvel et al., 2003; Simard C. et al., 2000; Nguyen V.K., Maes R.F., 1992; 1999; Carli K.T et al., 1999].

Иммуноферментные методы анализа (ИФА) антигенов и антител открыли новую эпоху в иммунодиагностике различных инфекционных и инвазионных заболеваний. Метод иммуноферментного анализа впервые был предложен в начале 70-х годов тремя независимыми группами исследователей: Engvall E. и Perlmann (1971) в Швеции, Van Weemen и Schuurs (1971) в Нидерландах, Rubenstein с соавторами (1972) в США [90].

Метод иммуноферментного анализа, или ELISA от англ. Enzyme Linked Immunosorbent Assay, что означает – фермент – зависимый иммуносорбционный анализ.

Принцип метода состоит в том, что антигены или антитела, вступающие в иммунную реакцию, метятся ферментом. Ферментативная активность измеряется по интенсивности окрашивания субстратной смеси, которая регистрируется спектрофотометрически или визуально [13]. Чувствительность ИФА настолько высокая, что позволяет определять

минимальные количества вещества (нано- и пикограммы), что значительно превосходит все известные серологические реакции [79, 117]. Установлено, однако, что чувствительность её может существенно варьировать при изменении физико-химических условий проведения эксперимента. Поэтому при постановке твердофазных методов ИФА значительного внимания требуют вопросы выбора концентрации реагентов (антигена, антител, конъюгата) и определение основных параметров постановки реакции [81, 161]. Как правило, выбор условий проведения иммуноферментного анализа осуществляется для каждой конкретной системы антиген-антитело, поскольку результаты анализа определяются в основном природой и свойствами антигена [Вишняков И.Ф., 1983; Новошинов Г.П., 1985; Сорокина и др., 1986; Пантелеев и др., 1986] [53].

С точки зрения способа выполнения все методы иммуноферментного анализа подразделяются на две большие группы: гомогенные (системы не требующие разделения компонентов) и гетерогенные (системы, в которых несвязанные компоненты реакции удаляются многократным отмыванием).

В настоящее время гетерогенный (твердофазный) метод иммуноферментного анализа получил более широкое распространение и используется в различных модификациях – непрямой, конкурентный [36, 105].

Гомогенные методы иммуноферментного анализа основаны на эффекте модуляции антителами активности фермента (или кофермента) используемого в качестве метки антигена. Эти методы успешно применяются для определения низкомолекулярных соединений в биологических жидкостях [Boguslaski R.C., Li T.M., 1982; Grenner G., 1982].

Метод ИФА обладает рядом значительных преимуществ: более высокая, чем в РИД, чувствительность и специфичность, возможность автоматизации процесса и сокращения времени анализа. Сравнение результатов РИД и ИФА показало, что последний можно эффективно

применять для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота [46, 120].

Чувствительность ИФА, испытанного в лабораториях Германии, в диагностике лейкоза крупного рогатого скота, составляла в среднем 97,6%, что в 4 раза выше РИД. Специфичность ИФА равнялась в среднем – 98,1%. Методы ИФА позволяют выявлять антитела в титрах в 10-100 раз меньших, чем обнаруживает РИД [Кукайн Р.А. и др. 1982] [112]. Кроме того, методом твердофазного иммуноферментного анализа положительно реагирующие пробы выявляются на 30-45 дней раньше с момента заражения чем в РИД [Иванова Л.А., 2000].

Важным преимуществом иммуноферментных методов перед РИД также является то, что ИФА будучи более чувствительным позволяет выявлять специфические антитела в пробах сборного молока. Если учесть доступность и простоту выполнения данного метода, то ИФА проб сборного молока в хозяйствах может стать важнейшим элементом в системе противолейкозных мероприятий по части контроля за эпизоотическим состоянием в хозяйствах «зоны риска» [14].

В настоящее время все большее значение приобретают высокочувствительные иммунологические тесты диагностики, такие как иммуноферментный анализ (ИФА) основанный на применении специфических антител, в том числе моноклональных (МКА), для выявления инфицированных и больных вирусом лейкоза КРС [Итэсь Ю.Р., Ткаченко М.Н., 2005; Малоголовкин С.А., 1997] [151].

В комплексе профилактических мероприятий, направленных на предотвращение возникновения туберкулеза и распространения его среди животных, особое место занимает своевременная диагностика болезни, как можно более ранние выявления первых случаев заболевания скота [116]. Основополагающими принципами всех программ по борьбе с туберкулезом

являются строго поставленный учет, аттестация стад, карантинирование, своевременная диагностика болезни, убой больных животных и др. [97].

Ветеринарная практика нашей страны располагает значительным числом средств и методов для эффективной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота. К ним относятся эпизоотологический, аллергический, патологоанатомический и лабораторные методы. В отечественной и зарубежной литературе имеется много данных об усовершенствовании методов диагностики туберкулеза [Драбкина Р.О., 1963; 1982; Татьков С.И. и др., 2006; Овдиенко Н.П. и др., 1987; Вишневский Б.И., 1975; Евглеевский А.А., 1997].

В системе профилактики и ликвидации туберкулеза животных, решающее место отводится диагностике [139]. Современные методы исследования в области диагностики туберкулеза животных и человека ведутся в основном в соответствии с двумя основными задачами:

- отдифференцировать туберкулез от микобактериозов;
- разграничить микобактериозы между собой.

Выбор условий проведения иммуноферментного анализа осуществляется для каждой конкретной системы антиген-антитело, поскольку результаты анализа определяются в основном природой и свойствами антигена. Поэтому, начиная с первых работ по изучению возможности применения ИФА в диагностике туберкулеза [Nassau E. Et al., 1976; Thoen S.O. et al., 1978], многими учеными ведутся работы по изысканию специфической фракции туберкулезных бактерий, пригодной для использования в анализе в качестве тест-антигена и получения высокоспецифичной иммунной сыворотки. Для этих целей использовали экстракты из культуральных фильтратов микобактерий [Nassau E. Et al., 1976; Laughlin L. et al., 1980; Gupta V.K. et al., 1994; Gulle H. et al., 1995]; применяли ультразвуковые экстракты микобактериальных клеток [Garcia-Drigoza E. et

al., 1982; Grange J.M., Kardjito T., 1982 и др.]; использовали ППД-туберкулины [Mauch H., Brehmer W., 1982; Amadpri M., Tameni S. Et al., 1998 и др.]. В последние годы для изучения иммунного статуса животных, дифференциальной диагностики туберкулеза с помощью иммунных реакций используются высокоочищенные белковые, гликопротеидные, гликолипидные и рекомбинантные антигены.

Первая отечественная иммуноферментная тест-система для выявления антител к *M. tuberculosis*, разработана в 1992 году и предназначена в качестве стандартного туберкулезного диагностикума для медицинской практики. Были сделаны попытки использования стандартной тест-системы иммуноферментной, предназначенной для определения противотуберкулезных антител (ПТАТ) в сыворотке крови человека, - для определения ПТАТ в сыворотках крови крупного рогатого скота для экспресс-диагностики туберкулеза [Кислицина И.С., и др., 2003].

В ветеринарии метод ИФА впервые был применен для диагностики туберкулеза у барсуков в 1979 году Morris с соавт., используя антиген из *M. tuberculosis*, установили наличие туберкулезных антител у 20 из 30 инфицированных животных [162]. Аналогичные результаты были получены при использовании антигенов, приготовленных из *M. avium*, *M. paratuberculosis*. Авторы пришли к выводу, что иммуноферментный тест может иметь практическую ценность лишь в случае получения высокоспецифичного антигена [56].

Многочисленные попытки применения ИФА были предприняты и для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота [Auer L.A., 1987; Auer L.A. et al., 1988; Plackett P. et al., 1989; Ritacco V. et al., 1987; Hanna J. et al., 1989; Grange M.J., 1984].

Огромный практический интерес представляет возможности иммуноферментного анализа при обнаружении и типизации

микобактериальных антигенов в патологическом материале [Хазипов Н.З. и др., 1989]. ИФА является потенциально ценным для ускоренного обнаружения микобактерий и их антигенов в тканевых пробах при отрицательных результатах гистологических исследований [114].

В 1975 году Келлер и Мильштейн разработали методику получения клеточных гибридов-гибридом путем слияния нормальных лимфоцитов иммунизированных животных с культивируемыми в питательной среде клетками миеломных штаммов. Слившиеся гибридомные клетки получают от лимфоцитов способных синтезировать определенное антитело и выживать в селективной среде, а от миеломных клеток принимающие способность бесконечно размножаться. Полученные таким образом гибридомный клон синтезирует моноклональные антитела в неограниченном количестве и по всем параметрам совершенно идентичные, взаимодействующие только с одной антигенной детерминантой. Это открытие создало хорошую основу для поиска моноклональных антител, идеальных диагностикумов для бактериальных и вирусных болезней человека и животных [130].

Многие исследователи пытались получить моноклональные антитела как к цельным клеткам различных видов микобактерий, так и к определенным эпитопам и отдельным антигенам микобактериальных клеток [Goates A.R. et al., 1981; Daniel T.M. et al., 1984; Morris Y.A., Forn C.Y., 1985; Ranchoff B.I., 1986; Wood R.R., 1988; Mauch H. et al., 1988; Mauch H., Brechmer W., 1982].

В целом метод иммуноферментного анализа в диагностике туберкулеза крупного рогатого скота является перспективным как для определения титра специфических антител в сыворотке крови, так и для обнаружения туберкулезного антигена в тканях исследуемых животных [123]. Однако, имеющиеся литературные данные свидетельствуют о разноречивости диагностической ценности ИФА, что связано, с одной стороны, различием

используемых антигенов и низкой специфичностью применяемых иммунных сывороток с другой [50].

По мнению Татькова С.И., Насаревой О.В. и др. (2006) причиной отсутствия единого мнения о целесообразности применения ИФА для диагностики туберкулеза являются: 1) слабая выявляемость антимикобактериальных антител на фоне, индуцируемого возбудителем, угнетения процессов антителопродукции и снижения содержания в крови свободных антител; 2) низкая специфичность ИФА-тестов, основанных на использовании суммарных антигенов.

Использование этого метода для диагностики бактериальных инфекций затрудняет ряд объективных причин, к которым относится и чрезвычайно сложная антигенная структура бактерий в сравнении с вирусами.

По данным Н.И. Цунской и др. (1988) при использовании иммуноферментного метода для обнаружения в сыворотке крови специфические противотуберкулезные антитела, совпадение положительных реакций в ИФА с выявленным туберкулезным процессом было более чем в 53% случаев. Кроме того, по данным зарубежной литературы, специфические антитела обнаруживаются в титре выше 1:40 не менее чем у 80% животных больных туберкулезом [Grange G.M. 1980; Kalish S.B. et al., 1983; Daniel T.M. et al., 1987].

Обобщая вышеизложенное, можно сказать, что методы ИФА в диагностике туберкулеза крупного рогатого скота являются перспективными для обнаружения как специфических антител в сыворотке крови, так и микобактериального антигена в тканях исследуемых животных.

2 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Материалы и методы исследований

Исследования проводились на кафедре биологической химии, физики и математики ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, а также в ГБУ Республиканская ветеринарная лаборатория РТ и ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

Исследовали пробы сывороток крови и молока от крупного рогатого скота из различных по эпизоотической ситуации по лейкозу и туберкулёзу хозяйств. Всего исследовано более 5000 проб, получали их в Республиканской ветеринарной лаборатории РТ.

Иммуноферментный анализ для выявления противолейкозных антител проводили с использованием «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». Учет результатов реакции ИФА проводили по методике описанной производителем.

Иммуноферментный анализ (ИФА) по определению специфических антител к микобактериям. Осуществляли по стандартной методике в твердофазном непрямом варианте по методу, описанному Woller A. et al. (1976). Использовали полистироловые планшеты для иммунологических реакций производства «Медполимер» (г.Санкт-Петербург) [20].

В лунки планшета вносили по 100 мкл растворов антигенов в 0,01 М карбонатном буфере (рН 9,6) и инкубировали 16-18 часов при комнатной температуре. После 3-х кратного промывания раствором для промывки в лунки вносили по 100 мкл исследуемых и контрольных сывороток, разведенных в фосфатносолевом буфере (ФСБ) с рН 7,3. Инкубировали 1 час при 37°C и промывали 3-4 раза. После этого в лунки вносили по 100 мкл

конъюгата, разведенного в том же буфере. Инкубировали планшет в течение 30 мин при 37°C, промывали лунки планшета не менее 5 раз и вносили в каждую лунку по 100 мкл раствора субстрата. После выдерживания планшет в течение 15 минут при 37°C, реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2н раствора серной кислоты в каждую лунку.

Учет результатов реакции ИФА проводили на вертикальном сканирующем спектрофотометре. Для оценки результатов реакции использовали коэффициент специфичности (К), который равняется отношению величины оптической плотности исследуемой пробы (ОПО) на величину оптической плотности контрольной пробы (ОПК). Положительно реагирующими считали пробы с К более 2 при разведении 1:200.

Получение микобактериальных антигенов. Микобактериальные антигены получали из инактивированных автоклавированием культур методом экстрагирования органическими растворителями (диметилсульфоксидом). При этом исходили из того, что обработка клеток органическими растворителями не разрушает клетку, экстрагируя антигенсодержащий материал в щадящем режиме.

Материалы и оборудования.

- навеска автоклавированной массы микобактериальных культур различных видов (M. Bovis, M. Avium, M. Scotochromogenes, M. nonchromogenes, M. Phlei);
- физиологический раствор;
- ацетон;
- раствор диметилсульфоксида (коммерческий препарат – “Димексид”);
- 0,01 М карбонатный буфер (рН 9.6);
- силикагель L 100/250 для хроматографии;
- центрифуга, термостат, холодильник;
- стаканы химические, колбы мерные, пробирки стеклянные [40];

Методика получения.

1) Навеску автоклавированной и высушенной массы микобактериальной культуры гомогенизируют и промывают физиологическим раствором в центрифужных пробирках при 3000 об/мин в течение 20 минут.

2) Микробные клетки заливают ацетоном из расчёта 1:2 и инкубируют в термостате при 37°C в течение 3-х часов при периодическом перемешивании, после чего центрифугируют при названных выше условиях и ацетон сливают, микобактерии подсушивают на воздухе.

3) Обработанные ацетоном микробные клетки заливают раствором диметилсульфоксида (коммерческий препарат – “Димексид”), подогретым до 37 С, из расчёта 6 мл на 1 г бактерий и инкубируют, при постоянном перемешивании, в течение 40 минут при 37°C. Микробные клетки отделяют центрифугированием в том же режиме, супернатант диализируют против дистиллированной воды в течение 3-х суток при комнатной температуре.

4) Диализат центрифугируют при 6000 об/мин 20 минут. Супернатант оставляют в стеклянных пробирках (высотой не менее 10 см) на 3 месяца в холодильнике (+4°C). За время выдержки, видимо, за счёт естественных процессов коагуляции в пробирке выпадает осадок.

5) Супернатант отделяют с помощью центрифугирования при выше названном режиме и концентрируют против силикагеля L 100/250 до желеобразного состояния.

6) Полученную массу растворяют в 2 мл 0,01 М карбонатноо буфера (рН 9.6), центрифугируют в том же режиме и супернатант используют в качестве антигена (ДМСО-м антиген) при постановке реакций ИФА.

Серологические исследования молока с помощью ИФА.
Предварительно пробы молока обезжирили методом центрифугирования при 3000 об. /мин. в течение 5мин. После разделения пробы молока на верхний

(жировой) и нижний слой осторожно прокалывали верхний слой иглой от шприца и отбирали около 1 мл жидкого нижнего слоя в отдельную пробирку.

При постановке ИФА пробы обезжиренного молока предварительно разводили в твинфосфатно-солевом буфере (рН-7.3) в соотношении 1:1, далее соблюдали стандартные последовательности этапов постановки реакции, которая изложена выше.

Реакция иммунодиффузии (РИД). Метод основан на обнаружении в сыворотке крови животных специфических преципитирующих антител к антигенам вируса лейкоза крупного рогатого скота. Специфические антитела появляются в крови через 2-8 недель после заражения животного ВЛКРС и сохраняются в организме пожизненно.

Пробы крови для исследований берут не ранее чем через 30 суток после введения животным вакцин и аллергенов, у стельных животных - за 30 суток до отела или через 30 суток после него [19].

Для постановки РИД использовали «Набор для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота» производства ФКП «КУРСКАЯ БИОФАБРИКА – ФИРМА БИОК», в состав которого входят:

- сухой специфический антиген ВЛКРС;
- разбавитель антигена, специфическая преципитирующая сыворотка (СПС) к вирусу лейкоза;
- солевая смесь агара (ССА) и разбавитель ССА;
- контрольные сыворотки: отрицательная, положительная, слабоположительная и положительная с антителами к р-24 антигену ВЛКРС.

Оборудование и реактивы:

- чашки Петри диаметром 100 мм;
- стандартный штамп-пробойник для пресечения лунок в агаре;
- дозаторы со сменными наконечниками;
- рН-метр;

- осветитель;
- хлорид натрия (х.ч.);
- дистиллированная вода.

Методика постановки. Подготовку компонентов реакции к работе осуществляют в соответствии с «Наставлением по применению набора для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота». Антиген растворяют в 5 см³ разбавителя. Разбавитель ССА и солевую смесь агара переносят в колбу и приливают дистиллированную воду до объема 200 см³, затем колбу помещают в водяную баню и выдерживают до полного расплавления гранул агара. Расплавленный агаровый гель, имеющий температуру 50-70°С, разливают слоем 2-3 мм (12-15 мл) в обезжиренные чашки Петри и оставляют их приоткрытыми при комнатной температуре в течение 1 ч. После застывания агара специальным штампом-пробойником делают лунки в геле, не допуская образования трещин между ними и отслоения агара от дна чашки. В каждой чашке делают по 5 фигуры, каждая из которых состоит из 7 лунок: одна в центре, остальные по периферии.

Антиген, контрольные и испытуемые сыворотки вносят в лунки каждой фигуры дозатором со сменными наконечниками.

Антиген (А) вносят в центральную лунку, две диаметрально противоположные лунки заполняют контрольной сывороткой (КС). Оставшиеся в фигуре 4 периферические лунки (1, 2, 3, 4) заполняют испытуемыми сыворотками. Лунки заполняют доверху, не допуская переливания жидкости через край. После заполнения всех лунок чашки Петри закрывают крышками и ставят в термостат при T= 20 на 48 ч.

Учет и оценка результатов реакции. Реакцию учитывают не ранее, чем через 48 ч и не позднее, чем через 96 ч.

Чашки просматривают на темном фоне, направляя сфокусированный луч осветителя на дно чашки под углом 30-45°. Реакцию оценивают только в

том случае, если в геле агара между лунками сформирована четкая линия преципитации. Если она отсутствует или слабо выражена, то реакцию следует повторить.

Специфическая линия преципитации, формируемая преципитирующей контрольной сывороткой и антигеном, должна быть четкой, иметь форму прямой, располагаться на одинаковом расстоянии от лунок с антигеном и контрольной сывороткой.

Неспецифической считают линию преципитации, которая образуется между лунками с испытуемой сывороткой и антигеном, но не сливается с контрольной линией преципитации, а пересекает ее или упирается в нее, образуя угол.

В зависимости от наличия специфических антител против антигенов ВЛКРС в испытуемой сыворотке реакцию оценивают, как положительную или отрицательную.

Положительной считают реакцию, если между лунками с антигеном и испытуемой сывороткой образуется полоса преципитации, которая соединяется с полосой преципитации контрольной сыворотки, образуя непрерывную линию, то есть идентична ей.

- если линия преципитации между лунками с испытуемой сывороткой и антигеном отсутствует, но контрольная линия преципитирующей сыворотки образует вблизи лунки с испытуемой линией изгиб, направленный в сторону лунки с антигеном – слабоположительная сыворотка;

- если контрольная линия значительно укорочена со стороны лунки с испытуемой сывороткой и имеет размытый изгиб к лунке с антигеном или образует линию преципитации, расположенную очень близко от лунки с антигеном – резко положительная сыворотка.

Положительно реагирующая сыворотка может образовывать вторую линию преципитации, которая располагается ближе к лунке с испытуемой

сывороткой. Эта линия указывает на наличие в сыворотке преципитирующих антител против второго антигена (p24) ВЛКРС.

При образовании толстой, короткой, без загибов контрольной линии преципитации, не достигающей до лунки с испытуемой сывороткой, необходимо провести раститровку этой испытуемой сыворотки физ. раствором до получения результата, который можно будет оценить, как отрицательный, положительный или неспецифический. Для этого необходимо физиологический раствор в объеме 100-500 мкл. разлить в пробирки или в лунки стандартных пластиковых плат для постановки серологических реакций (количество пробирок или лунок соответствует числу необходимых разведений). В первую пробирку или лунку с физраствором внести такой же объем сыворотки, тщательно перемешать и перенести той же пипеткой в том же объеме в следующую пробирку или лунку, затем после перемешивания - в следующую и т.д.

В результате в первой пробирке или лунке испытуемая сыворотка разведена в 2 раза, во второй - в 4 раза, в третьей - в 8 раз и т.д.

Реакцию считают отрицательной, если контрольная линия продолжается до лунки с испытуемой сывороткой без загиба.

В случаях, когда линия преципитации плохо просматривается или имеется зона опалесценции вокруг лунок, реакцию следует переставить.

Сдвиг контрольной линии преципитации в сторону лунки с антигеном или с контрольной сывороткой указывает на нарушение соотношения антигена и антител в тест- системе. В этом случае необходимо использовать другую серию диагностического набора.

Животных, сыворотки крови которых дали положительный результат в РИД, признают зараженными вирусом лейкоза и их необходимо исследовать гематологическим методом.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Пробоподготовка осуществлялась следующим образом. Образцы сыворотки крови были осаждены при 13000 об/мин в течение 10 мин.

Выделение ДНК проводили из осадка после центрифугирования посредством набора «ДНК-сорб В» (Интерлабсервис) согласно инструкции производителя [43].

Постановка ПЦР 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 объем 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) [10, 40].

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1 Сравнительное изучение иммунохимических и потенциометрических методов диагностики лейкоза крупного рогатого скота

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

Характерной особенностью ВЛКРС-инфекции является выработка специфических антител, которые выявляются в сыворотке крови через 2-8 недель после заражения животного. Эти антитела сохраняются в организме инфицированного животного на протяжении всей его жизни. Кроме того, установлено, что на разных этапах развития иммунного ответ изменяется спектр и титры антител. Антитела выявляются не только к основным белкам, но и к продуктам их распада. Таким образом, серологические методы представляют собой основу для прижизненной диагностики лейкоза крупного рогатого скота. На сегодняшний день в соответствии со стандартами МЭБ (Международное Эпизоотическое Бюро) признанными методами диагностики лейкоза крупного рогатого скота являются РИД и методы ИФА.

В Российской Федерации диагностика инфекций, вызванных ВЛКРС, преимущественно осуществляется с помощью реакции иммунодиффузии в геле (РИД), в то время как в других странах мира широко используется иммуноферментный анализ [20].

Метод широко используется в ветеринарной практике благодаря своей надежности и простоте в применении. ИФА, в свою очередь, представляет собой более современный и чувствительный метод, который позволяет не только определить наличие антител к вирусу, но и количественно оценить их уровень. Этот метод обладает высокой специфичностью и чувствительностью,

что делает его незаменимым инструментом в диагностике различных инфекционных заболеваний, включая лейкоз крупного рогатого скота.

Для сравнительного анализа эффективности РИД и ИФА в диагностике лейкоза крупного рогатого скота проанализировали 3073 пробы сыворотки крови, полученные из хозяйств разных районов РТ. Результаты исследования представлены в таблице 3. Эти хозяйства были выбраны на основании данных эпизоотического мониторинга, который проводится ветеринарной службой Республики Татарстан. Важно отметить, что выборка была сформирована таким образом, чтобы охватить широкий спектр случаев заболевания, включая как клинически выраженные формы лейкоза, так и бессимптомное носительство вируса. Это позволило получить репрезентативные данные, которые могут быть использованы для оценки эпидемиологической ситуации по лейкозу в регионе и разработки эффективных мер по контролю и профилактике этого заболевания.

Все образцы сыворотки крови, поступившие в лабораторию, были тщательно обработаны и подготовлены для проведения лабораторных анализов в соответствии с установленными протоколами и рекомендациями.

Таблица 3 – 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	

По данным приведённым в таблице 1 видно, что из исследованных 3073 проб сывороток крови, были получены из благополучных хозяйств по лейкозу, а 723 из неблагополучных хозяйств, что, следовательно, соответствует 76,5% и 23,5%. Исследования 2350 проб из благополучных по лейкозу хозяйств дали следующие результаты: 82 пробы (3,5%) положительные в РИД и 66 проб (2,8%) положительные в ИФА, то есть 16 проб положительные в РИД, в иммуноферментном анализе показали отрицательные результаты. Если, считать, что более высокая специфичность и чувствительность ИФА доказанным, то данный факт ещё раз свидетельствует о недостаточной специфичности РИД и о ложноположительных результатах.

При исследовании 723 пробы из хозяйств неблагополучных по лейкозу оказались положительные 66 проб (9,2%) в РИД и 79 проб (11%) в ИФА.

Приведённые исследования по изучению сравнений эффективности РИД и ИФА в диагностике лейкоза крупного рогатого скота показали, что в благополучных по этой инфекции хозяйствах применение РИД исследований нецелесообразно, так как высока вероятность получения ложноположительных результатов.

Нужно отметить, что в исследованиях проб из неблагополучных хозяйств такая тенденция также сохраняется. 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 отрицательный результат. Кроме того, в ИФА 13 проб отрицательные в РИД, показали положительный результат.

Таким образом, проведенные исследования позволили не только выявить уровень инфицированности лейкозом среди крупного рогатого скота в хозяйствах Республики Татарстан, но и оценить эффективность используемых методов диагностики. Результаты исследования показали, что лейкоз остается серьезной проблемой для животноводческих хозяйств региона, и для борьбы с ним необходимо использовать современные методы

диагностики, такие как ИФА, которые позволяют с высокой точностью выявлять заболевание на ранних стадиях и проводить своевременные меры по его контролю. В дальнейшем полученные данные могут быть полезны для разработки более эффективных стратегий контроля и профилактики этого заболевания, включая разработку новых вакцин и иммуномодулирующих препаратов, а также проведение образовательных программ для фермеров и ветеринарных специалистов.

2.2.1.2 Иммунопотенциометрия в диагностике лейкоза крупного рогатого скота

В диагностике инфекционных заболеваний и для выяснения эпизоотической ситуации в мировой практике широко применяются различные экспресс технологии. Особенно широкое распространение нашло это направление с развитием нанобиотехнологии. Экспресс-диагностика инфекционных заболеваний развивается в нескольких перспективных направлениях, таких как: иммуноферментное, иммунофизическое, иммунохимическое и др. Каждое направление подразделяется на отдельные группы методов и технологий. Например, иммунохимическим и иммунофизическим направлениям можно отнести наиболее бурно развивающиеся технологии – электрохимические, в основе которых лежит главным образом, применение иммуносенсоров.

Современные электрохимические методы иммуноанализа объединяют чувствительность электрохимического детектора и высокую специфичность реакции взаимодействия антиген-антитело. Электрохимические сенсоры подразделяются на две основные группы: амперометрические и потенциометрические. В амперометрических методах измеряется сила тока, как результат реакции, инициированной потенциалом измерительного

электрода. В потенциометрических – мембранный или электродный потенциал, которые устанавливаются на границе раздела сенсор-раствор. В каждой из этих групп методов можно выделить несколько направлений. В потенциометрическом иммуноанализе, например, наиболее известным и широко применяемым является прямое определение степени связывания белков.

Прямое определение степени взаимодействия антигенов и антител считается наиболее целесообразным, так как при этом отпадает, во-первых, необходимость введения метки и, во-вторых, использования дополнительного измерительного оборудования. Как известно, белки – амфотерные высокомолекулярные соединения и поэтому в водном растворе частицы белка приобретают определённый электрический заряд. Качественные и количественные показатели этого заряда зависят, прежде всего, от рН среды и ионной силы раствора. В изоэлектрическом состоянии частицы белка в растворе могут коагулировать с образованием комплексов, что приводит к измерению физико-химических параметров системы, в том числе и электропроводности [102].

Такая особенность в поведении белка в растворе была применена впервые Джанатой для определения дрожжевого маннана при взаимодействии конканавалином А, иммобилизованным на покрытой поливинил хлоридом проволоке. В настоящее время известны множество способов диагностики патологических состояний живого организма основанные на выявлении иммунокомплексов в режиме амперометрии или потенциометрии в растворе, а также на поверхности электрода.

Потенциометрический иммуноанализ является способом прямого определения связывания антигенов или антител. Такое определение степени связывания антигенов и антител представляется вполне целесообразным, поскольку при этом отпадает необходимость во введении 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.

При многих инфекционных болезнях животных постоянным и характерным признаком инфицированности животных является наличие антител к антигену возбудителя и, общепринятые в ветеринарной практике, методы диагностики этой инфекции основаны на их обнаружении. При взаимодействии антител со специфическими антигенами образуются иммунные комплексы, которые могут свободно циркулировать в сыворотке крови, а также появляться в биологических жидкостях. Аналогичное взаимодействие будет происходить и в условиях «in vitro».

Нужно отметить, что используемые в настоящее время в иммунологии электрохимические методы определения патологических состояний требуют, во-первых, сложного и дорогостоящего оборудования, во-вторых, антитела, конъюгированные с ферментом или ионами металлов для использования в качестве метки.

Электрохимические способы выявления молекул в растворах высокомолекулярных соединений, антигенов и антител в биологических жидкостях, основанные на регистрации изменений показателей электропроводности и электродного потенциала при образовании комплексов являются наиболее перспективными.

На разработанный нами “Способ потенциометрической диагностики лейкоза крупного рогатого скота” получен патент на изобретение RU2757078C1 от 20.02.2021 [54].

Нами установлено, что существует значительная разница в потенциалах индикаторного электрода в пробах сыворотки крови от здоровых и инфицированных ВЛКРС животных до и после образования ЦИК «in vitro». Также проведено сравнительное изучение изменений потенциала электрода в таких же условиях после введения изменений в его конструкцию. Изменения в конструкции индикаторного электрода произведены с целью повышения его чувствительности и уменьшения размеров измерительной ячейки. Результаты исследований показали, что изменения потенциала фиксируются в достаточно больших пределах, значительно превышающих погрешность измерений.

Всего исследовано более 300 проб сывороток крови из неблагополучных по лейкозу хозяйств РТ. Уровень инфицированности животных вирусом лейкоза определяли методом ИФА. Около 50% исследованных коров были инфицированные с ВЛКРС. В процессе исследования использовался реконструированный индикаторный электрод, специально предназначенный для измерения рН и электродного потенциала. Этот электрод был адаптирован для работы в специфических условиях нашего исследования, что включало необходимость работы с малыми объемами образцов крови и обеспечение высокой точности измерений. Такой подход был необходим для того, чтобы точно измерять и фиксировать изменения в электродном потенциале сыворотки крови, которые могли возникать до и после добавления антигенов.

Показатели электродвижущей силы (ЭДС) измерялись с помощью рН-метр, работавший в режиме измерения милливольт (мВ), позволял фиксировать даже незначительные изменения электродного потенциала сыворотки крови.

При постановке опыта 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 исследования [54]. Результаты исследований двадцати проб приведены в таблице 4.

Таблица 4 – 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. Также нужно отметить, что электродный потенциал проб от инфицированных с ВЛКРС коров изначально выше на 0,03 – 0,06 единиц. Этот факт можно объяснить тем, что ВЛКРС инфекция сопровождается с появлением в сыворотке крови иммунных комплексов, и как, известно, динамика и спектр сывороточных антител и иммунных комплексов зависят от стадии развития инфекционного процесса и индивидуальных особенностей организма животного.

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 болезней.

Преимущество потенциометрического метода заключается в его возможности к автоматизации. Автоматизация процесса измерения делает этот метод не только чрезвычайно удобным, но и значительно упрощает весь процесс диагностики. Это означает, что потенциально сложные и трудоёмкие этапы диагностики могут быть выполнены с минимальным вмешательством человека. В результате этого упрощения значительно снижаются трудозатраты, которые обычно требуется для ручного выполнения анализа. Более того, автоматизация снижает вероятность ошибок, связанных с человеческим фактором, таких как неправильно выполненные измерения или неправильная интерпретация данных. Это особенно важно в медицинских и ветеринарных исследованиях, где точность и надёжность результатов имеют критическое значение.

В отличие от других экспресс-тестов, которые могут требовать значительного участия оператора и подвержены субъективным ошибкам, метод потенциометрии предлагает высокую степень объективности. Результаты, полученные с использованием потенциометрии, являются воспроизводимыми и точными, что делает этот метод более надёжным по сравнению с другими тестами. В таких тестах, как правило, может быть сложно устранить влияние человеческого фактора, что иногда приводит к ошибкам и вариациям в результатах. Потенциометрия же минимизирует эти риски благодаря своей автоматизированной природе и высокому уровню стандартизации процессов.

2.2.2 Особенности патогенеза и гуморального иммунитета инфицированных с ВЛКРС коров

Исследования в области лечения лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) сталкиваются с рядом сложностей, главным образом из-за недостаточной изученности патогенеза данного заболевания. Лейкоз крупного рогатого скота представляет собой хроническую инфекционную болезнь, вызываемую ретровирусом, который поражает иммунную систему животных. На данный момент основным подходом к диагностике этого заболевания являются серологические методы. Эти методы направлены на выявление антител, которые образуются в ответ на инфекцию вирусом лейкоза. Антитела к вирусу лейкоза начинают появляться в крови инфицированных животных примерно через 2-8 недель после начала инфицирования и сохраняются на протяжении всей жизни животного [101]. Этот длительный период наличия антител делает серологическую диагностику важным, но не всегда достаточным инструментом для контроля за состоянием инфекционного процесса.

Доказано, что, в крови инфицированных животных также образуются циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК). Эти комплексы представляют собой агрегаты, состоящие из антител и вирусных антигенов, которые могут также включать провирусную ДНК. Провирусная ДНК играет важную роль в патогенезе заболевания, так как она может сохраняться в клетках организма и способствовать дальнейшему распространению инфекции. ЦИК могут поглощаться макрофагами, что иногда приводит к восстановлению инфекционности вируса [26, 101].

Из-за этих сложностей разовые серологические тесты могут быть недостаточно эффективными. Традиционные серологические методы, такие как ИФА и РИД, не всегда могут адекватно отразить динамику изменения вирусной нагрузки и степени инфекционности. Поэтому рекомендуется использовать более современные и точные методы диагностики, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Проведение исследований проб молока является еще одним важным аспектом диагностики. Такие исследования могут быть более экономически выгодными по сравнению с анализом крови и позволяют эффективно отслеживать наличие ЦИК и провирусной ДНК в молоке. Это может быть особенно полезным для мониторинга стад и определения зависимости появления ЦИК и провирусной ДНК от стадии инфекции.

Для проведения исследований были сформированы 2 экспериментальные группы из 12 коров в каждой. Все коровы в экспериментальных группах из одного стада в возрасте от 2 до 4 лет. В первой группе животных были инфицированные ВЛКРС в естественных условиях и диагностированы впервые по результатам РИД исследований и ИФА. Во второй группе 2 коровы (№5 и №6) гематологически больные, остальные положительные в РИД и ИФА.

Пробы сывороток крови и молока получены от инфицированных ВЛКРС коров. Выявление антител к ВЛКРС в пробах сывороток крови и молока проводили методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем. Учёт результатов реакции проводили визуально и спектрофотометрически. Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) выделяли методом преципитации в полиэтиленгликоле (ПЭГ). При этом, пробы сыворотки крови смешивали в соотношении 1:1 с 7% раствором ПЭГ-6000 в 0,1М боратном буфере (рН 8,8), перемешивали и инкубировали при +4°С в течение 72-х часов. Преципитат осаждали центрифугированием при 5000g в течении 20 минут и трижды промывали десятикратным объёмом ПЭГ в концентрациях: 3,5%, 7% и 10,5% в боратном буфере. Выделенные иммунные комплексы растворяли в физиологическом растворе и изучали их активность в ИФА. Комплексы разбивали с предварительной инкубацией проб при 50°С в течение 2 часов.

Для изучения ПЭГ на свободные иммуноглобулины проводили исследования по определению титра анти-ВЛКРС антител в пуле сывороток крови и молока до и после обработки с ПЭГ-6000. В результате было установлено, что после осаждения ЦИК из пула сывороток крови и молока 3,5%-ным раствором ПЭГ титры противолейкозных антител в ИФА не изменялись и были равны титрам антител в исходной пробе.

Подсчёт лейкоцитов проводили в счётной камере с сеткой Горяева. Статус животного по лейкозу определяли исходя из количества лейкоцитов и лимфоцитов в 1 мкл крови животного согласно “лейкозному ключу”.

Этот метод позволяет точно определить количество различных типов клеток крови, что важно для диагностики лейкоза и других заболеваний, связанных с изменениями в кроветворной системе. Количественный анализ лейкоцитов и лимфоцитов является ключевым показателем для оценки

состояния иммунной системы и помогает в выявлении патологических изменений, связанных с лейкозом.

Во второй опытной группе наблюдения велись в течении 6 месяцев. Титры связанных и свободных антител в исследуемых пробах определялись методом иммуноферментного анализа через каждые два месяца. Результаты исследований представлены в таблица 5 и 6.

Таблица 5 – Динамика изменения титров свободных и связанных в иммунных комплексах антител против gp51 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

Таблица 6 – Динамика изменения титров свободных и связанных в иммунных комплексах антител против gp51 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

Данные представленные в таблицах свидетельствуют о том, что изменения титров противолейкозных антител, в сыворотке крови естественно инфицированных ВЛКРС коров, значительно отличаются от данных экспериментального заражения. Если в случае экспериментального заражения алгоритм изменения титров антител равен трём месяцам, то при естественном заражении коров вирусом лейкоза, он оказался разным. За период исследования титры сывороточных антител в отдельных пробах оставались неизменными как в достаточно высоких, так и в относительно низких уровнях.

Однако, в целом изменения титров антител в исследованных пробах происходили синусоидально.

Ungar-Waron H. et al. (1999), создали экспериментальную модель хронической инфекции лейкоза на телятах и отмечают, что серьёзных различий в показателях клеточного иммунитета при развитии лейкоза крупного рогатого скота полученных в полевых условиях и в лабораториях нет. Тем не менее, они и другие авторы отмечают, что около 30 % ELISA-положительного скота подвержены лимфоцитоарному лейкозу (лимфоцитоз), который сопровождается подавлением иммунитета и различными паттернами развития гуморального иммунитета при прогрессировании болезни [B. Yakobson et. al., 1998; Vickie Ruggiero et al., 2019].

Титры антител в молоке инфицированных коров не коррелируют с таковыми в сыворотке крови. При достаточно высоких титрах сывороточных антител, титры антител в молоке, у одних и тех же коров могут быть минимальными (пробы № 12, 10, 4) и наоборот, при низких титрах сывороточных антител – высокие титры антител в молоке (№ 3, 8). Кроме того, несмотря на значительные изменения титров сывороточных антител по периодам исследования, титры противолейкозных антител в молоке могут не измениться (№ 1, 9).

Сравнивая титры свободных и «связанных» антител в сыворотке крови (таблица 5) можно сказать, что они с развитием болезни меняются и прослеживается определённая зависимость между ними. При уменьшении титров свободных антител наблюдается, в большинстве случаев, увеличение титров «связанных» антител, то есть повышается степень образования циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). Типичными примерами подобных изменений являются пробы № 1, 3, 9, 10, 11.

В динамике изменений титров свободных и связанных в иммунных комплексах антител против gp51 в пробах молока нет чётко выраженной

зависимости. Титры свободных и связанных антител молока в течение длительного времени могут оставаться в одинаковых, как в низких, так и достаточно высоких уровнях. Определение ЦИК имеет большое значение в мониторинге эпизоотической ситуации по лейкозу и может служить индикатором инфицированности животных вирусом. Идентификация и изучение состава иммунных комплексов способствует объяснению патогенетических аспектов лейкоза крупного рогатого скота.

Изучение динамики образования иммунных комплексов раскрывают перспективы совершенствования ранней диагностики лейкоза животных. Серологические методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота должны быть направлены и на обнаружение связанных в составе ЦИК антител в биологических пробах с учётом соотношения между свободными и связанными антителами в сыворотке крови постоянно меняется в течение 2-4 месяцев.

Провирус большинства ретровирусов считается инфекционной единицей, а количество интегрированного в геноме клетки провруса (PVL), связано с увеличением риска распространения инфекции. Учитывая, что диагностические мероприятия при лейкозе крупного рогатого скота по исследованию проб молока являются экономически более выгодными, целью наших экспериментов во второй опытной группе являлось определение зависимости появления ЦИК в пробах молока, содержащих провирусную ДНК, от стадий развития инфекционного процесса. Наблюдения в данной группе велись в течении года. Через каждые 2 месяца брали пробы крови и молока. Определяли количество лейкоцитов в 1 мкл крови, титры циркулирующих иммунных комплексов в молоке и наличие провирусной ДНК в ЦИК. Результаты исследований представлены в таблице 7.

Таблица – 7 Результаты исследований проб крови и молока инфицированных ВЛКРС коров, содержащие провирусную ДНК

.№ проб	Порядок исследований, показатели											
	1			2			3			4		
	кол-во лейкоцитов в	титр ЦИК	провирусная	кол-во лейкоцитов в	титр ЦИК	провирусная	кол-во лейкоцитов в	титр ЦИК	провирусная	кол-во лейкоцитов в	титр ЦИК	провирусная
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, представленных в таблице 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, за исключением коровы №5, после первого исследования были обнаружены ЦИК, содержащие противолейкозные антитела в титрах от 1:2 до 1:16. Эти антитела сохранялись в молоке на протяжении всего эксперимента практически у всех животных, что указывает на длительный характер их присутствия. Исключение составила только корова №2, у которой в третьем исследовании (через 6 месяцев) ЦИК не были обнаружены. Это может указывать на вариативность иммунного ответа у разных животных.

Провирусная ДНК в ЦИК молока была обнаружена впервые у двух коров под номерами 3 и 7 в ходе уже второго исследования, то есть через 4 месяца после начала эксперимента. Эти данные являются значимыми, так как наличие провирусной ДНК указывает на активное развитие инфекции. Гематологические показатели у этих животных на момент обнаружения провирусной ДНК оставались в пределах физиологической нормы, что может свидетельствовать о начальной стадии вирусной нагрузки. Корова №7 нормальные гематологические показатели и после третьего исследования, что указывает на отсутствие значительных изменений в её здоровье на момент завершения эксперимента.

После проведения третьего цикла исследований, которые были осуществлены спустя 6 месяцев с начала эксперимента, в пробе молока под номером 12 была выявлена провирусная ДНК в циркулирующих иммунных комплексах (ЦИК). Это новое обнаружение подчеркивает продолжающееся развитие инфекции и наличие вирусной нагрузки в молоке данного животного. Несмотря на присутствие провирусной ДНК, гематологические показатели у коровы, из которой был взят образец № 12, остаются в пределах нормы, составляя 9900 лейкоцитов на 1 мкл крови. Это значение лейкоцитов ниже порогового уровня, который установлен для диагностики гематологических нарушений, характерных для лейкоза крупного рогатого скота. Согласно «лейкозному ключу», у гематологически больных коров возрастом от 2 до 4 лет количество лейкоцитов в 1 мкл крови должно превышать 11 тысяч. Поэтому нормальные показатели лейкоцитов в данном случае указывают на отсутствие явных гематологических изменений на момент проведения исследования.

На четвертом этапе исследований, проведенном спустя еще 2 месяца, было обнаружено наличие провирусной ДНК в ЦИК молока только в 6 из всех исследованных проб. Среди этих шести проб, у трех проб, а именно под

номерами 4, 5 и 9, провирусная ДНК была обнаружена впервые. Это указывает на потенциальное развитие инфекции в новых животных и необходимость дальнейшего мониторинга. Особенно важно отметить, что только у коровы № 9, наряду с обнаружением провирусной ДНК в ЦИК молока, также были выявлены характерные для лейкоза гематологические изменения. У данной коровы содержание лейкоцитов в крови превысило 12 тысяч на 1 мкл, что свидетельствует о наличии выраженных гематологических нарушений, характерных для поздних стадий лейкоза и предполагает активное развитие заболевания.

Согласно действующим правилам профилактики и борьбы с лейкозом крупного рогатого скота, животные, у которых сыворотки крови дают положительный результат на реакцию иммунодиффузии (РИД) или иммуноферментный анализ (ИФА), считаются инфицированными вирусом лейкоза. Такие животные подлежат дополнительному исследованию с интервалом в 6 месяцев, используя гематологические методы для оценки состояния их здоровья. Если у животных выявляются изменения в крови, характерные для лейкоза, они признаются больными, изолируются от основного стада и направляются на убой. Эти меры направлены на предотвращение распространения инфекции и защиту других животных от потенциального заражения.

Однако наличие в крови и молоке циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), содержащих провирусную ДНК, ставит под сомнение существующие методики диагностики и определения срока эксплуатации инфицированных животных. Провирусная ДНК сохраняет жизнеспособность даже после длительной термической обработки, что может влиять на эффективность традиционных методов диагностики и профилактики.

Необходимо учитывать, что провирусная ДНК может сохраняться в молоке и крови животных на протяжении длительного времени, что делает

диагностику более сложной и требующей постоянного мониторинга. Появление провирусной ДНК даже у тех животных, у которых гематологические показатели остаются в пределах нормы, указывает на возможность скрытого течения инфекции. Это может приводить к тому, что животные, которые кажутся здоровыми по результатам стандартных серологических тестов, на самом деле могут быть носителями вируса и представлять риск для других животных и для здоровья стада в целом.

Роль циркулирующих иммунных комплексов в патогенезе ВЛКРС инфекции недостаточно изучена. ЦИК, содержащие провирусную ДНК, возможно, формируются в процессе гибели инфицированных В-лимфоцитов путем соединения не встроенных в геном вирусных ДНК с поверхностными IgM, обладающими высокой аффинностью к ДНК. Очевиден тот факт, что появляются они в молоке на более поздних стадиях болезни, при выраженной вирусемии организма, когда животное становится потенциально опасным источником заражения стада. Гематологические изменения в этот период, в большинстве случаев остаются стабильными. Использование образцов молока для проведения молекулярно-генетических анализов по выявлению ВЛКРС в ЦИК является достаточно перспективным направлением для оценки эпизоотической ситуации в хозяйствах и весьма информативным при определении статуса животного, а также возможностей и сроков эксплуатации инфицированного животного в производственных условиях. Результаты исследований дают основание пересмотреть критерии «инфицированного» и «больного» лейкозом животного.

2.2.3 Иммунологические аспекты лейкоза и туберкулеза крупного рогатого скота

2.2.3.1 Изучение перекрестной реактивности анти-ВЛКРС антител крови с микобактериальными антигенами

Туберкулёз и лейкоз крупного рогатого скота наиболее распространённые 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.

Несмотря на то, что для борьбы с ними предложены высокоэффективные мероприятия, проблема лейкоза и туберкулёза ещё далека от окончательного решения.

Одной из основных проблем в диагностике туберкулёза крупного рогатого скота является дифференциация неспецифических туберкулиновых реакций. Считается, что уровень специфических антител отражает степень активности инфекционного заболевания. Иммуноблот анализом доказано, что фракции с молекулярными массами 20, 30, 45, 50, 97 кД являются общими для всех групп микобактерий [103, 163].

У заражённых ВЛКРС животных в крови циркулируют антитела к р24, р15, р12, р10, гр30, гр51 и другим антигенам. Однако титры и спектр антител, а также соотношение между свободными и связанными антителами в сыворотке крови постоянно меняется с развитием инфекционного процесса [164].

Серьёзную проблему при проведении диагностических мероприятий представляет также ассоциативное течение лейкозной инфекции с вирусными и бактериальными инфекциями, в том числе с туберкулёзом крупного рогатого

скота. Открытым остаётся вопрос и о возможной реакции на туберкулин у скота, инфицированного с ВЛКРС.

В целях изучения перекрёстной реактивности анти ВЛКРС антител крови с микобактериальными антигенами, и влияния BLV инфекции на иммунологические параметры КРС при диагностике туберкулёза исследовали более 1000 проб сыворотки крови коров как инфицированных ВЛКРС, так и реагирующих на ППД туберкулин. Нужно отметить, все хозяйства были благополучны по туберкулёзу.

Было сформировано три экспериментальные группы методом случайной выборки из исследованных проб. Первая группа включала пробы с положительной РИД, которые были получены от животных, не реагирующих на туберкулин. Эта группа была выбрана для изучения случаев, когда реакция на лейкоз была явной, но отсутствие реакции на туберкулин может указывать на отсутствие микобактериальной инфекции. Вторая группа состояла из образцов с отрицательной РИД, полученных от животных, реагирующих на ППД. Эти пробы были выбраны для исследования случаев, когда наличие противомикобактериальных антител подтверждается, но лейкоз не выявляется. Третья группа включала пробы, которые были положительными по РИД и получены от животных, реагирующих на туберкулин. Эта группа предназначалась для анализа случаев, когда одновременно присутствуют антитела против лейкоза и микобактериальные антитела, что может указывать на перекрестные реакции или сопутствующие инфекции. Каждая из этих групп содержала по 30 проб.

Все сыворотки крови из каждой группы были подвергнуты иммуноферментному анализу для выявления четырех видов микобактериальных антигенов: *M. bovis*, *M. avium*, *M. scrotochromogenes* и *M. nonchromogenes*. Эти микобактерии являются основными патогенами, вызывающими туберкулез у крупного рогатого скота, и могут вызывать

перекрестные реакции с антителами против лейкоза. Результаты тестирования оценивались как положительные или отрицательные, обозначаемые знаками "+" и "-", что позволяло четко определить наличие или отсутствие специфических антигенов в сыворотке крови.

Результаты данного исследования предоставят важные данные о взаимосвязях между различными видами антител и помогут улучшить диагностику и интерпретацию результатов тестов на лейкоз и микобактериальные инфекции. Полученные данные могут способствовать разработке более точных диагностических методов и стратегий лечения, а также улучшению понимания клинических проявлений и перекрестных реакций антител в крови животных. Результаты исследований представлены в таблицах 8-10.

Таблица 8 – Результаты ИФА проб сывороток крови, инфицированных ВЛКРС и отрицательные в 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.	+	-	+	-	-	-	-

Продолжение таблицы 8

17.	+	-	+	-	-	-	-
18.	+	-	+	-	-	-	-
19.	+	-	-	-	+	-	-
20.	+	-	-	-	+	-	-
21.	+	-	-	-	+	-	-
22.	+	-	+	-	-	-	-
23.	+	-	+	-	-	-	-
24.	+	-	+	-	-	-	-
25.	+	-	+	-	-	-	-
26.	+	-	+	-	-	-	-
27.	+	-	+	-	-	-	-
28.	+	-	+	-	-	-	-
29.	+	-	+	-	-	-	-
30.	+	-	+	-	-	-	-

Результаты проведенных исследований по анализу проб сывороток крови, взятых у коров, инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), и представленные в таблице 8, показывают важные закономерности в обнаружении микобактериальных антител. В частности, было выявлено, что в девяти пробах сывороток (что составляет 30% от общего количества исследованных образцов) обнаружены микобактериальные антитела, имеющие диагностическое значение в отношении антигена *M. avium*. Данное наблюдение позволяет предположить наличие микобактериальной инфекции у этих животных, что требует дальнейшего уточнения и углубленного анализа.

Особенно примечательны результаты шести проб (под номерами 4, 5, 6, 13, 14 и 15), в которых, несмотря на выявление микобактериальных антител, не было обнаружено антител против вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) при проведении иммуноферментного анализа (ИФА). Это отсутствие противолейкозных антител может свидетельствовать о возможных ложноположительных результатах, полученных методом реакции иммунодиффузии (РИД). Такие результаты подчеркивают необходимость

критического пересмотра и подтверждения данных, полученных различными методами, чтобы избежать диагностических ошибок.

Важно отметить, что все пробы, как из первой группы, так и из остальных исследованных категорий, были собраны из хозяйств, официально признанных свободными от туберкулеза. Этот факт имеет ключевое значение для правильной интерпретации полученных данных, так как отсутствие зарегистрированных случаев туберкулеза в этих хозяйствах снижает вероятность перекрестных реакций, которые могли бы повлиять на результаты исследования. Тем не менее, выявление микобактериальных антител в условиях, свободных от туберкулеза, поднимает вопросы о потенциальных источниках микобактериальной инфекции и подчеркивает необходимость более тщательной эпидемиологической оценки.

Данные, полученные в ходе этого исследования, подчеркивают важность использования нескольких методов диагностики для более точного выявления инфекций у животных. Использование таких методов, как РИД и ИФА, в сочетании с тщательным эпидемиологическим мониторингом, может значительно улучшить диагностику и управление здоровьем скота, особенно в хозяйствах, где риск инфекции высок. Также необходимо учитывать, что ложноположительные результаты могут вносить значительные искажения в данные, и поэтому необходимо их тщательно проверять с помощью дополнительных тестов.

Таблица 9 – 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.	-	+	-	-	-	+	-

Продолжение таблицы 9

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.	-	+	+	-	+	-	+

При детальном анализе представленных данных в таблице можно заметить, что результаты проведенных исследований показывают важные различия в обнаружении антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) и микобактериям. В результате проведения иммуноферментного анализа (ИФА) антитела против ВЛКРС были обнаружены у 12 проб сыворотки крови, а именно под номерами 4, 5, 6, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 28, 29 и 30. Это является весьма важным и объяснимым фактом, поскольку ИФА, как известно, обладает более высокой диагностической эффективностью по

сравнению с реакцией иммунодиффузии (РИД), что подтверждается соответствующими исследованиями и данными [96]. Высокая чувствительность ИФА позволяет с большей точностью выявлять присутствие антител к ВЛКРС, что крайне важно для точной диагностики и последующего управления заболеванием.

Кроме того, данные, полученные в результате ИФА, указывают на высокую распространенность микобактериальной инфекции среди исследуемых животных. В ИФА на выявление микобактериальных антител в 24 пробах, что составляет 80% от общего числа исследованных образцов, были зафиксированы положительные результаты. Это свидетельствует о том, что инфицированность атипичными микобактериями может являться основной причиной положительной реакции на введение туберкулина у исследуемых животных. Такой высокий процент положительных результатов на микобактериальные антитела подчеркивает необходимость более тщательной оценки и контроля микобактериальных инфекций в популяции крупного рогатого скота.

Однако стоит отметить, что из 12 проб, в которых были обнаружены антитела против ВЛКРС, девять показали положительные результаты на антиген *M. avium*. Этот факт указывает на возможную перекрестную реактивность между антителами к ВЛКРС и *M. avium*, что требует дополнительного исследования и проверки. Перекрестные реакции могут усложнять интерпретацию серологических тестов и создавать ложное представление о распространенности определенных инфекций в стаде. Это особенно важно в контексте ветеринарной диагностики, так как точность и надежность диагностических тестов имеют решающее значение для принятия управленческих решений.

Таким образом, данные исследования подчеркивают необходимость использования различных методов диагностики для точного определения

инфекционного статуса животных. Комплексный подход, включающий как ИФА, так и другие диагностические методы, позволяет минимизировать риск диагностических ошибок и обеспечивает более точное выявление инфекций, что, в свою очередь, способствует более эффективному контролю за здоровьем стада.

Таблица 10 – 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.	+	+	-	-	+	-	+

Причину возникновения туберкулиновых реакций у коров, из которых были отобраны пробы сывороток крови для исследования в третьей группе, можно также рассматривать как связанную с наличием атипичных микобактерий, которые могут быть присутствовать в организмах этих животных. В ходе анализа проб было выявлено наличие антител против всех микобактериальных антигенов, за исключением антигена *M. Bovis*. Это наблюдение указывает на то, что в сыворотках были обнаружены антитела, специфичные к другим видам микобактерий, помимо *M. Bovis*, что может говорить о том, что данные пробы могут содержать антитела, выработанные против других микобактериальных антигенов.

Тем не менее, важно отметить, что в девяти из исследованных проб, а именно в пробах под номерами 1, 2, 3, 10, 11, 12, 25, 26 и 27, результаты иммуноферментного анализа (ИФА) на выявление противотуберкулезных антител оказались отрицательными. Эти пробные образцы, несмотря на положительные результаты в тестах РИД и ИФА на лейкоз, показали отсутствие специфических антител к микобактериям, что может свидетельствовать о ложноположительных результатах РИД. Это несоответствие в результатах поднимает вопросы о возможных перекрестных реакциях и специфичности используемых диагностических тестов.

Согласно имеющимся данным, случаи туберкулиновых реакций у коров могут быть также связаны с инфицированностью вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС). Сведения о том, что у животных, инфицированных ВЛКРС, могут наблюдаться реакции на туберкулин, присутствуют в научной литературе. Например, в работе Магера С.Н. (2006) подчеркивается наличие

прямой связи между уровнем инфицированности ВЛКРС и реакцией на туберкулин, что подтверждает возможность влияния ВЛКРС на результаты туберкулиновых тестов.

Дополнительно, из девяти проб сывороток крови в третьей группе, а именно проб под номерами 7, 8, 9, 19, 20, 21, 28, 29 и 30, результаты ИФА на лейкоз оказались отрицательными. Это обстоятельство указывает на то, что результаты РИД в этих пробах, скорее всего, являются ложноположительными. Эти наблюдения поддерживают гипотезу о том, что инфицированность атипичными микобактериями, такими как *M. Avium* и представители группы *M. Nonchromogenes*, может быть причиной выявленных туберкулиновых реакций.

Обобщая все полученные данные, можно заключить, что результаты тестов подчеркивают необходимость более глубокого анализа и перепроверки диагностических методов, используемых для выявления инфекций у крупного рогатого скота. В частности, необходимо учитывать возможные перекрестные реакции и специфику антигенов, чтобы улучшить точность диагностики и предотвратить ложные результаты, которые могут влиять на ветеринарную практику и здоровье скота. Эти выводы могут способствовать совершенствованию диагностических методик и обеспечению более точного контроля за состоянием здоровья животных.

2.2.3.2. Изучение перекрестной реактивности противолейкозных и туберкулезных антител в молоке

С учётом высокой информативности иммуноферментного анализа (ИФА) молока в диагностике лейкоза крупного рогатого скота и наличия соответствующих рекомендаций, проводили исследования по выявлению перекрестной реактивности антител, используя в качестве материала как пробы сывороток крови, так и молока. Иммуноферментный анализ, являясь

одним из самых чувствительных и специфичных методов, широко применяется в ветеринарной диагностике. В нашем исследовании мы стремились максимально использовать его преимущества, что позволило нам более точно и надёжно оценить состояние здоровья коров, а также выявить возможные патологические изменения.

Исследовали 500 проб сывороток крови и молока собранные от одних и тех же коров. Такая большая выборка обеспечила репрезентативность результатов и позволила сделать более обоснованные выводы. Примерно 70% (351 проба) из этих проб были взяты у коров, которые показали положительную реакцию в реакции иммунодиффузии (РИД). Около 30% проб были взяты у коров, которые реагировали на туберкулин.

Важно подчеркнуть, что в данном хозяйстве была благополучная эпидемиологическая ситуация по туберкулёзу крупного рогатого скота. Однако в результате исследования были выявлены неспецифические реакции на туберкулин у некоторых коров. Причины таких неспецифических реакций остаются невыясненными, что требует дальнейших исследований для более глубокого понимания процессов, происходящих в организме животных.

Для обнаружения противотуберкулёзных антител использовали микобактериальный комплексный антиген, полученный путём экстракции органическими растворителями.

По результатам проведённых анализов было установлено, что в более чем 40% проб с положительной реакцией в РИД были обнаружены противомикобактериальные антитела.

В дополнение к этому, в нашем исследовании было проведено сравнение результатов анализов сыворотки крови и молока. В 25 пробах, взятых у одних и тех же коров, одновременно проводились тесты на наличие как противомикобактериальных, так и противолейкозных антител. Из этих 25 проб положительные результаты, показывающие присутствие антител, были

обнаружены только в реакции иммунодиффузии (РИД) в 15 случаях. Эти данные подтверждают эффективность РИД в выявлении иммунных ответов на присутствие патогенов. В 10 случаях положительные результаты были получены у коров, реагирующих на туберкулин (ППД).

Только в трёх пробах, которые обозначены номерами от 13 до 15, были обнаружены положительные результаты как в РИД, так и при тестировании на ППД. Это редкое совпадение позволяет предположить наличие смешанных инфекций или перекрестной реактивности антител, что требует дальнейшего исследования. Полученные результаты представлены в таблице 11, где детально изложены данные по каждой пробе. Эти данные являются важным вкладом в понимание иммунных реакций коров и могут быть полезны для разработки более точных диагностических тестов в будущем.

Таблица 11 – 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.	+	+	+	-	-	-

Продолжение таблицы 11

16.	-	+	-	-	-	-
17.	-	+	+	+	+	+
18.	-	+	+	+	-	-
19.	-	+	-	-	-	-
20.	-	+	-	-	-	-
21.	-	+	-	-	-	-
22.	-	+	+	+	+	+
23.	-	+	+	+	+	-
24.	-	+	-	+	-	-
25.	-	+	-	-	-	-

+ - положительная реакция;

- - отрицательная реакция;

Результаты, полученные в ходе проведённых исследований, и данные, представленные в таблице, дают нам более глубокое понимание о состоянии здоровья коров и уровне инфицирования среди животных. Как показано в таблице, в 7-ми пробах (№ 2, 3, 5, 7, 10, 11, 12) сывороток крови, что составляет 46% от общего числа проб, обозначенных как № 1-15, были выявлены микобактериальные антитела в диагностируемых титрах. Эти пробы были взяты у коров, заражённых вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС). Наличие микобактериальных антител в сыворотке крови этих коров свидетельствует о наличии иммунного ответа против микобактерий, что может указывать на предыдущий контакт с микобактериями или возможное сопутствующее инфицирование. Данный факт может указывать на сложные иммунные взаимодействия у инфицированных ВЛКРС животных и требует дальнейшего изучения для более точного понимания природы обнаруженных антител.

Кроме того, 4 пробы молока (№ 2, 3, 5, 10) от тех же коров также показали наличие микобактериальных антител. Это может указывать на то, что микобактериальные инфекции или перекрестные реакции могут быть более распространены, чем предполагалось ранее, и могут присутствовать как

в сыворотке крови, так и в молоке. Наличие микобактериальных антител в молоке также говорит о том, что иммунная система коров активно реагирует на микобактерии и вырабатывает антитела, которые могут быть выявлены как в крови, так и в молоке. Это может иметь важное значение для диагностики и мониторинга состояния здоровья коров, а также для разработки стратегий контроля и профилактики инфекционных заболеваний в стаде.

Из этих четырёх проб, которые были обозначены как № 3, 7, 12, 13 и отмечены как положительные в реакции иммунодиффузии (РИД), результаты иммуноферментного анализа (ИФА) показали отрицательные результаты. В трёх случаях из этих же проб (№ 3, 7, 12) обнаруживаются микобактериальные антитела. Это означает, что несмотря на положительные результаты в РИД, ИФА не выявил присутствие антител в этих пробах, что указывает на возможные различия в чувствительности и специфичности методов тестирования. Важно отметить, что в этих пробах всё же были обнаружены микобактериальные антитела, что подчёркивает необходимость комплексного подхода при проведении диагностических тестов. Различие в результатах может быть связано с тем, что ИФА и РИД обнаруживают разные типы антител или реагируют на различные антигенные детерминанты, что необходимо учитывать при интерпретации результатов.

Кроме того, в одной пробе молока (№ 3), которая была взята от тех же самых животных, также были выявлены микобактериальные антитела. Это говорит о том, что даже при отсутствии положительного результата в ИФА для сыворотки крови, молоко этих коров может содержать антитела, которые можно выявить другим методом. Данный факт подчёркивает значимость мультиплексного подхода в диагностике, при котором использование различных методов тестирования может предоставить более полную картину инфекционного статуса животного. Это также указывает на возможную

необходимость корректировки и оптимизации методов диагностики для более точного определения статуса животных по микобактериальным инфекциям.

В пробах молока и сыворотки крови от животных, которые были положительными в РИД и реагировали на туберкулин (ППД), противотуберкулёзные антитела не были обнаружены в иммуноферментном анализе. Это может свидетельствовать о том, что иммунная реакция на туберкулин может быть неспецифической или что уровень антител, специфичных к туберкулёзу, слишком низок для их обнаружения с помощью ИФА. Важно понимать, что отсутствие антител не всегда означает отсутствие инфекции; это может также указывать на низкий уровень циркулирующих антител или на то, что инфекция находится на стадии, когда антитела ещё не сформировались или уже исчезли.

Интересно, что среди животных, которые были отмечены как отрицательные в РИД, но всё же реагировали на туберкулин, то есть пробы № 16-25, в 5-ти пробах (№ 17, 18, 22, 23, 24) сыворотки крови и в 2-х (№ 17, 22) пробах молока были зафиксированы положительные реакции в иммуноферментном анализе с микобактериальным антигеном. Однако из этих 5 проб, в 4 (№ 17, 18, 22, 23) случаях результаты иммуноферментного анализа на наличие антител против ВЛКРС также были положительными, что может свидетельствовать о перекрестной реактивности антител или о наличии множественных инфекций.

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

Чтобы всесторонне изучить иммунореактивность коров, инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), необходимо провести тщательное и многогранное исследование, основываясь

на полимеразной цепной реакции с детекцией продукции реакции флуоресценции (ПЦР-ПДРФ) анализа гена env-BLV. Это исследование должно охватывать несколько ключевых этапов, каждый из которых имеет важное значение для понимания особенностей иммунного ответа у инфицированных животных.

Во-первых, важно оценить влияние инфекции ВЛКРС на иммунореактивность организма коров. Это подразумевает необходимость проведения комплексного анализа того, как вирусное инфицирование влияет на способность иммунной системы коров реагировать на различные антигены. В данном контексте необходимо рассмотреть, как специфические, так и неспецифические иммунные ответы. Специфический иммунный ответ включает выработку антител и активацию Т-клеток против определённых антигенов, связанных с вирусом, в то время как неспецифический ответ может включать общий воспалительный процесс и реакцию со стороны различных клеток иммунной системы, таких как макрофаги и нейтрофилы.

Кроме того, необходимо выявить перекрестно реагирующие антитела в иммуноферментном анализе (ИФА), используя микобактериальные антигены. Это позволяет определить, присутствуют ли антитела, которые способны реагировать не только с антигенами ВЛКРС, но и с антигенами других микобактерий. Определение таких перекрестных реакций имеет ключевое значение для точной диагностики и понимания механизмов взаимодействия вируса с иммунной системой. Это также может помочь избежать ложноположительных или ложноотрицательных результатов, которые могут возникнуть из-за перекрестного реагирования антител.

В рамках данного исследования было проанализировано 300 проб сывороток крови. Все эти пробы проявили реакцию в реакции иммунодиффузии (РИД), что позволило провести детальный анализ иммунореактивности. С целью выявления перекрестных реакций с

микобактериальными антигенами, было важно провести тщательное исследование всех полученных проб. Все сыворотки были исследованы на наличие как специфических, так и неспецифических антигенов, что позволило получить более полное представление о взаимодействии вируса лейкоза крупного рогатого скота с иммунной системой коров.

Для подготовки сывороток крови и их обработки для последующего анализа использовались различные методики, включая осаждение сыворотки крови при высоких оборотах центрифуги и выделение ДНК из осадка. Эти предварительные шаги были необходимы для обеспечения точности и надежности последующих лабораторных исследований.

Первый этап анализа включал использование реакции иммунодиффузии (РИД) для оценки наличия противолейкозных антител в сыворотках крови коров. Все образцы сыворотки крови, выбранные для исследования, показали положительную реакцию в РИД, что подтвердило наличие антител к вирусу лейкоза в исследуемых пробах. На основе этих данных был проведен иммуноферментный анализ (ИФА), который продемонстрировал, что 95,6% (287) из исследованных проб сыворотки крови показали положительные результаты на наличие противолейкозных антител. Это значительное количество положительных результатов подтвердило активную реакцию иммунной системы на вирус лейкоза.

Следующим этапом стало исследование проб, которые показали положительные результаты на наличие антител к BLV в ИФА. Все эти пробы были подвергнуты дополнительному анализу для выявления противотуберкулезных антител. Это сделано для того, чтобы выяснить, существуют ли перекрестные реакции, то есть, есть ли антитела, которые могут взаимодействовать не только с антигенами BLV, но и с антигенами микобактерий, вызывающих туберкулез. 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 был проведен случайный отбор проб из всех трех групп для последующего исследования с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Основной целью этого анализа было выявление присутствия провирусной ДНК ВЛВ и микобактерии туберкулеза (*M. bovis*) в сыворотке крови. В итоге для ПЦР было выбрано 24 пробы.

Предварительно перед проведением ПЦР образцы сыворотки крови были подвергнуты центрифугированию при скорости 13000 об/мин в течение 10 минут. После этого из осадка, образовавшегося в результате центрифугирования, была выделена ДНК с использованием набора «ДНК-сорб В» (производство Интерлабсервис) в соответствии с инструкцией производителя. Этот этап был необходим для получения чистого образца ДНК, который можно было бы использовать в ПЦР для дальнейшего анализа.

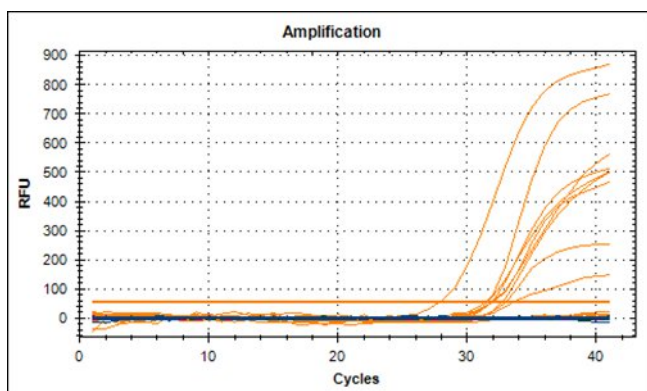


Рисунок 1 – График амплификации провирусной ДНК ВЛКРС по каналу ROX.

Таблица 13 – 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. sctoc.</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	+	+	+	+	–

Постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики лейкоза крупного рогатого скота (ЛКРС) осуществлялась по строго установленному протоколу, который включал несколько ключевых шагов. В рамках этого протокола было разработано и проведено приготовление ПЦР-смесей для одного образца, что являлось важным этапом в подготовке для проведения реакции. Конкретно, для приготовления одной ПЦР-смеси использовалось 2 микролитра десяти кратного ПЦР-буфера, который обеспечивал необходимую среду для протекания реакции. Также добавлялось 2 микролитра раствора нуклеозидтрифосфатов с концентрацией 2,5 миллимоль/литр, что способствовало образованию новых цепей ДНК. Для обеспечения правильного функционирования ПЦР было добавлено 2

микролитра раствора магния хлорида с концентрацией 25 миллимоль/литр, который являлся важным коферментом.

Каждая ПЦР-смесь содержала по 1 микролитру прямого и обратного праймеров с концентрацией 10 пикомоль/микролитр. Прямой праймер имел последовательность 5'-ggcaccgggtctcgcaagtatg-3', а обратный праймер — 5'-cggtaggctgggtcatgtggcc-3'. Эти праймеры были специально подобраны для того, чтобы точно амплифицировать целевой участок ДНК. Для детекции продуктов ПЦР использовался олигонуклеотидный зонд типа TaqMan с флуоресцентной меткой, а именно ROX- aaactacgacttgcaatcttacaggccgac-RTQ2, который обеспечивал флуоресцентную сигнальную информацию о ходе реакции. В дополнение к этому, 1 микролитр Taq-полимеразы, активность которой составляла 5 единиц активности на миллилитр, был добавлен для катализирования процесса синтеза ДНК. Вся смесь ПЦР-смеси завершалась добавлением 10 микролитров исследуемого образца ДНК, что позволило обеспечить необходимое количество исходного материала для реакции.

Для идентификации *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) использовался метод ПЦР-реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). В этом методе применялись специфические праймеры и зонд, разработанные Duffy SC и соавторами. В частности, использовались праймеры IS1081_Forward (ggctgctctcgacgttcac) и IS1081_Reverse (cgctgattggaccgctcat), которые позволяли амплифицировать специфичные участки ДНК *M. bovis*. Олигонуклеотидный зонд IS1081_Probe (FAM- ctgaagccgacgccctgtgc-MGBNFQ) был предназначен для точного выявления и количественного определения целевой ДНК. Результаты проведенных исследований были подробно представлены в таблице 13 и на рисунке 1, что позволило наглядно визуализировать и проанализировать данные, полученные в ходе ПЦР.

Результаты проведенного анализа методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) подтвердили, что в исследуемых пробах не обнаружен

генетический материал микобактерий, что указывает на отсутствие их ДНК в данных образцах. Однако, несмотря на это, результаты иммуноферментного анализа (ИФА), который был проведен для обнаружения антител против микобактериальных антигенов, продемонстрировали наличие положительных результатов во всех исследуемых пробах. При этом уровень положительных результатов по ИФА был значительным, достигая коэффициента равного двум или более при разведении образцов в соотношении 1:200. Это подтверждает присутствие микобактериальных антител в образцах, несмотря на отсутствие их генетического материала.

Из 24 исследованных образцов, которые были представлены в таблице, в шести пробах были обнаружены антитела против всех трех микобактериальных антигенов. Это означает, что в этих пробах присутствовали антитела, способные связываться с антигенами всех трех исследуемых микобактерий. В семи пробах были обнаружены антитела против двух конкретных видов микобактерий: *M. bovis* и *M. scrochomogenes*. В двух пробах было выявлено наличие антител против микобактерий *M. bovis* и *M. avium*, в то время как в трех пробах антитела обнаружены против *M. avium* и *M. scrochomogenes*. 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. scrochomogenes*.

Стоит отметить, что три конкретных пробы, обозначенные номерами 12, 13 и 21, показали отрицательные результаты при проведении ПЦР на вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), что указывает на отсутствие провирусной ДНК ВЛКРС в этих образцах.

Представленные результаты исследований, проведенных с целью изучения иммунореактивности у коров, инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), дают основания для предположения о

возможной детерминантной общности антигенов между микобактериями и ВЛКРС. Это открытие имеет значительные последствия для понимания того, как инфекции могут вызывать перекрестные иммунные реакции. Наблюдения показывают, что среди выявленных антител наблюдаются перекрестные реакции, что указывает на потенциальные структурные или антигенные сходства между антигенами микобактерий и вируса.

Кроме того, результаты подчеркивают изменение иммунореактивности у коров, инфицированных ВЛКРС. Известно, что инфекция ВЛКРС может приводить к развитию иммунологической толерантности, что выражается в том, что иммунная система животных становится менее способной реагировать на определенные антигены. Это явление приводит к снижению или даже полному отсутствию иммунного ответа на эти антигены, что может затруднить диагностику и лечение заболеваний. Однако важно отметить, что эта толерантность не является универсальной и не затрагивает все антигены. В некоторых случаях, несмотря на развитие иммунологической толерантности к определенным антигенам, способность иммунной системы реагировать на другие антигены может сохраняться.

По данным исследований, представленных Ивановым О.В., инфицирование ВЛКРС нарушает регуляцию иммунной системы хозяина. Это нарушение происходит как на клеточном уровне, затрагивая различные типы клеток, такие как В-лимфоциты, определенные Т-лимфоциты и моноциты, так и на гуморальном уровне. В частности, наблюдается дефицит иммуноглобулинов IgM и IgA, что свидетельствует о нарушении гуморального иммунного ответа. Эти изменения в иммунной системе могут способствовать тому, что инфицированные коровы становятся более восприимчивыми к другим инфекциям или заболеваниям, поскольку их иммунная система может быть ослаблена или дисфункциональна.

Для дальнейшего изучения иммунореактивности и выявления возможных патогенетических связей, отобрали несколько групп сывороток крови, которые показали антитела к одному виду антигена. Эти образцы были затем использованы для проведения ПЦР-ПДФ (полимеразной цепной реакции с детекцией продукции реакции флуоресценции) анализа на присутствие гена env-BLV. Всего было проанализировано 11 проб: первые 3 проб были отобраны из группы, реагирующей на антиген *M. avium*; следующие 3 проб были отобраны из группы, реагирующей на антиген *M. bovis*; оставшиеся 5 проб были выбраны из группы, реагирующей на антиген *M. scot*. Такая выборка позволила оценить различия в иммунореактивности и выявить возможные перекрестные реакции с другими антигенами.

Для детекций результатов ПЦР-ПДФ 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 иллюстрируется на рисунках 2 и 3, где представлены результаты анализа для дальнейшего интерпретирования и обсуждения.

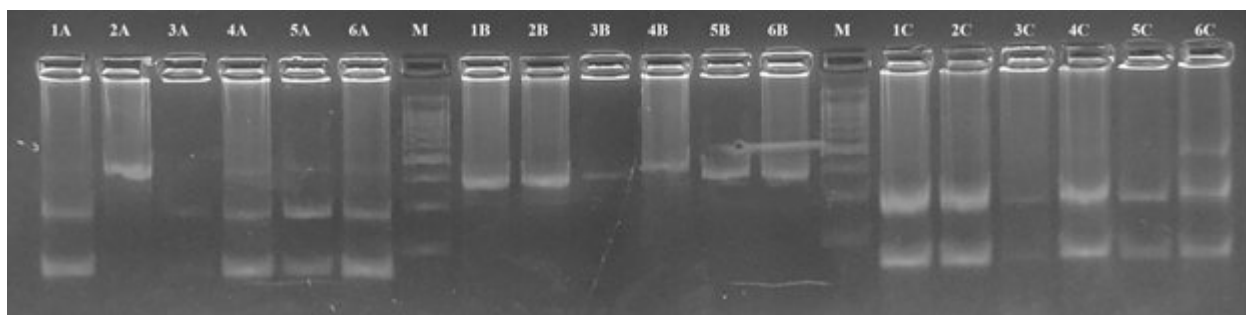


Рисунок 2 – Результаты ПЦР-ПДФ гена env BLV

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.

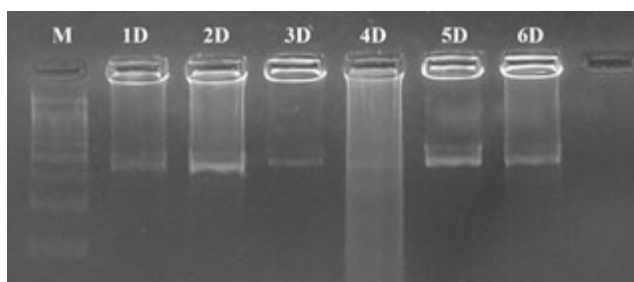


Рисунок 3 – Результаты ПЦР-ПДРФ гена env BLV

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 был идентифицировано два различных паттерна. Первый паттерн имел размер 164 п.н., а второй — 280 п.н. Согласно современным методам филогенетической классификации, данные паттерны указывают на то, что представленные изоляты могут относиться к четвёртому генотипу. Это наблюдение подтверждает, что изоляты, подвергнутые анализу, имеют характерные для этого генотипа молекулярные маркеры.

В то же время, в ДНК изолятов 2 и 3 группы был обнаружен один паттерн размером 444 п.н. Это однозначно указывает на то, что эти изоляты относятся либо к седьмому, либо к восьмому генотипу. Такой результат подчеркивает различие между исследованными группами изолятов, и делает необходимым дальнейшее уточнение принадлежности этих изолятов к определённым генотипам.

Кроме того, при применении рестриктазы SspI к ДНК всех исследованных изолятов был обнаружен единичный паттерн, размер которого варьировался от 395 до 444 п.н. Этот диапазон размеров паттернов затрудняет точное определение принадлежности к конкретному генотипу. Отсутствие четкой идентификации подчеркивает необходимость проведения

дополнительных исследований для более детального анализа и точной классификации исследуемых образцов.

Использование рестриктазы BstDEI, которая представляет собой изошизомер эндонуклеазы DdeI, дало возможность провести детальный анализ исследуемых образцов ДНК, выявив два четко различимых паттерна размера 168 и 276 пар нуклеотидов (п.н.). Эти два паттерна, обнаруженные в каждом из исследованных изолятов, на основании текущих данных филогенетической классификации, указывают на то, что данные изоляты, вероятно, принадлежат к четвертому, седьмому или восьмому генотипу. Это предположение основано на известных свойствах рестриктаз и характерных паттернах, которые они создают при расщеплении ДНК, что позволяет классифицировать генотипы вирусов или бактерий с определенной степенью вероятности.

Дальнейшее исследование с использованием другой рестриктазы, BamHI, показало, что в первой группе анализируемых образцах ДНК, подвергнутых действию этой рестриктазы, был выявлен только один паттерн размером 444 п.н. Это означает, что данные изоляты, вероятно, принадлежат к четвертому генотипу. Такой результат соответствует предположениям, сделанным на основе анализа с BstDEI, но требует дополнительного подтверждения.

Вместе с тем, следует отметить, что проведенный рестрикционный анализ дает только приблизительное представление о принадлежности изолятов к определенным генотипам. В данном случае, изоляты 1-ой группы, вероятно, относятся к четвертому генотипу, а изоляты 2 и 3 группы, вероятно, принадлежат к седьмому генотипу. Однако, учитывая сложность и потенциальные нюансы в генотипировании, полученные результаты желательно подтвердить дополнительными и более детализированными методами. Например, секвенирование ДНК может предоставить более точную

и достоверную информацию о генетическом составе изолятов и их принадлежности к конкретным генотипам. Секвенирование позволит проанализировать полные последовательности нуклеотидов, что даст возможность более точно идентифицировать генотипы и устранить любые неопределенности, связанные с результатами рестрикционного анализа.

Таким образом, для окончательного подтверждения и более глубокого понимания генотипического разнообразия исследуемых образцов необходимо провести дополнительные исследования. Это может включать использование других рестриктаз, различных методов молекулярной биологии, а также проведение сравнительного анализа с данными из других лабораторий и литературных источников. Такие шаги помогут повысить точность и надёжность полученных данных, обеспечивая более полное и обоснованное заключение о генотипе каждого из исследуемых изолятов.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование методов диагностики лейкоза и туберкулёза крупного рогатого скота остаётся одной из наиболее актуальных задач в современной ветеринарной медицине. Эти две инфекции, протекая в хронической форме, не только наносят ущерб здоровью животных, но и приводят к значительным экономическим потерям в животноводческих хозяйствах, влияя на продуктивность стада и качество получаемой продукции. В условиях масштабного производства и интенсивного животноводства, своевременное выявление и контроль над распространением этих инфекций играют ключевую роль в обеспечении эпизоотического благополучия. Для борьбы с этими заболеваниями применяются современные методы диагностики, такие как реакция иммунодиффузии (РИД), иммуноферментный анализ (ИФА), потенциометрия и полимеразная цепная реакция (ПЦР). Эти методы основаны на изучении антигенных и иммунологических свойств возбудителей, что позволяет более точно выявлять заражение на ранних стадиях.

Исследования по сравнительной эффективности методов диагностики лейкоза крупного рогатого скота показали, что иммуноферментный анализ (ИФА) обладает значительно большей чувствительностью по сравнению с реакцией иммунодиффузии (РИД). ИФА позволяет выявлять антитела на ранних стадиях заболевания, что делает его незаменимым для ранней диагностики, особенно при скрининговых исследованиях и выявлении бессимптомных носителей. Этот метод основан на связывании специфических антител с антигенами вируса, что позволяет обнаруживать даже минимальные концентрации вируса в биоматериале.

В то же время, РИД остаётся популярным благодаря своей простоте и доступности, особенно в полевых условиях, но его чувствительность ниже. Это делает его менее эффективным для ранней диагностики или при низком

уровне антител. РИД может использоваться как вспомогательный метод для подтверждения диагноза на поздних стадиях или при ограниченных ресурсах.

Кроме того, ИФА имеет преимущества в автоматизации процесса, что сокращает время анализа и повышает его воспроизводимость, особенно в крупных хозяйствах и лабораториях. Проведённые исследования подчёркивают, что для точной и своевременной диагностики лейкоза предпочтительно использовать ИФА, а РИД – как дополнительный метод.

В свою очередь, потенциометрические исследования продемонстрировали, что в диагностике лейкоза крупного рогатого скота не уступает таким традиционным методам, как реакция иммунодиффузии (РИД) и иммуноферментный анализ (ИФА). Одним из главных его достоинств является возможность автоматизации исследований. Это означает, что процесс диагностики может быть выполнен с минимальным вмешательством человека, что значительно снижает вероятность ошибок, связанных с человеческим фактором, что является критически важным в условиях массовой диагностики и эпидемиологического мониторинга. Кроме того, автоматизация процесса анализа с использованием потенциометрии не только минимизирует возможность ошибок, но и существенно сокращает время, необходимое для выполнения диагностики. Потенциометрический метод также могут способствовать сокращению затрат на исследования. Благодаря высокой чувствительности и специфичности этого метода можно добиться более эффективного выявления инфицированных животных, что в свою очередь позволяет уменьшить экономические потери, связанные с инфекцией.

Установлено, что в крови инфицированных животных образуются циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК). Эти комплексы состоят из антител и вирусных антигенов, а также могут включать провирусную ДНК. Провирусная ДНК играет ключевую роль в патогенезе, так как она может сохраняться в клетках организма, способствуя дальнейшему распространению

инфекции. ЦИК способны поглощаться макрофагами, что в некоторых случаях может привести к восстановлению инфекционности вируса. Это делает их важными для понимания динамики заболевания и его течения. В ходе исследований отмечено, что с прогрессированием болезни происходит изменение титров свободных и связанных антител в сыворотке крови, выявляя определённую зависимость между ними. При снижении титров свободных антител обычно наблюдается увеличение титров «связанных» антител, что свидетельствует о повышении уровня формирования ЦИК.

Выявлено, что титры антител в молоке инфицированных коров не всегда коррелируют с титрами антител в сыворотке крови. Например, при высоких титрах антител в сыворотке молока уровень антител у одних и тех же коров может быть минимальным, и наоборот, при низких титрах антител в сыворотке молока могут наблюдаться высокие титры антител. Это подтверждает сложность иммунного ответа у инфицированных животных.

Более того, несмотря на значительные изменения титров антител в сыворотке крови в течение исследуемого периода, титры противолейкозных антител в молоке могут оставаться стабильными. Эти наблюдения подчеркивают необходимость глубокого изучения иммунных механизмов и патогенеза лейкоза, что в конечном итоге может привести к разработке более эффективных стратегий лечения и профилактики этого заболевания в животноводстве.

Существуют данные, подтверждающие, что у животных, заражённых вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), могут проявляться определённые реакции на туберкулин, что отражено в ряде научных источников. Например, в работе Магера С.Н. (2006) акцентируется внимание на том, что существует явная взаимосвязь между степенью инфицированности ВЛКРС и возникновением реакций на туберкулиновые пробы. В частности, результаты, представленные в таблицах 8-11, ясно демонстрируют, что такая

перекрёстная реактивность действительно имеет место. Это говорит о том, что при проведении туберкулиновых тестов у инфицированных ВЛКРС животных может возникать ложноположительная реакция, что осложняет диагностику. Эти данные имеют значительное практическое значение для ветеринаров и специалистов в области животноводства, поскольку они подчёркивают необходимость тщательного учета возможных перекрёстных реакций. Это особенно важно для повышения точности диагностических процедур. Если не принять во внимание подобные факторы, можно получить искажённые результаты тестов, что в конечном итоге может привести к неверным выводам о состоянии здоровья животных. В свою очередь, такие ошибки могут отрицательно сказаться на эпидемиологической ситуации, а также на эффективности программ по контролю и профилактике заболеваний в поголовье скота.

В процессе исследования иммунной реактивности коров, инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), с использованием ПЦР-ПДРФ анализа гена env-BLV, было установлено, что существует перекрёстная иммунореактивность между лейкозом и туберкулёзом у крупного рогатого скота. Это означает, что у коров, заражённых ВЛКРС, наблюдаются иммунные ответы, которые могут приводить к ложноположительным результатам при диагностике других заболеваний, в частности туберкулёза.

Более детальный анализ показал, что коровы, инфицированные четвёртым генотипом ВЛКРС, часто дают положительные результаты при проведении иммунноферментного анализа (ИФА) с антигенами *Mycobacterium avium*, возбудителя туберкулёза. Этот факт указывает на возможность перекрёстной реакции их иммунной системы на данные антигены. Таким образом, такие положительные результаты при ИФА могут вызывать ложные заключения о наличии туберкулёза у этих животных.

Кроме того, выявленная перекрёстная реактивность также объясняет появление положительных реакций на туберкулиновые пробы (ППД), что усложняет диагностику туберкулёза у ВЛКРС-инфицированных коров. Это требует более тщательного подхода к анализу результатов подобных тестов, чтобы исключить вероятность ошибок в диагностике. Перекрёстные реакции между ВЛКРС и микобактериальными антигенами представляют собой важный аспект, который следует учитывать в ветеринарной практике, чтобы избежать ложных диагнозов и оптимизировать лечение и профилактику заболеваний среди крупного рогатого скота.

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. Иммунопотенциометрические 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 иммунопотенциометрический 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.

СПИСОК СОРАЩЁННЫХ ТЕРМИНОВ

- АГ – антиген;
- АТ – антитело;
- ВЛКРС – вирус лейкоза крупного рогатого скота;
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- ИФ – иммунодиффузия;
- ИФА – иммуноферментный анализ;
- КАМ – аллерген очищенный комплексный из атипичных микобактерий;
- КГАВМ – Казанская государственная академия ветеринарной
медицины;
- КРС – крупный рогатый скот;
- мВ – милливольт;
- мкл – микролитр;
- мл – миллилитр;
- мм – миллиметр;
- МЭБ – Международное Эпизоотическое Бюро;
- ООО – общество с ограниченной ответственностью;
- ППД – пурифицированный протеин дериватив;
- ПТАТ – противотуберкулёзные антитела;
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ПЦР-ПДРФ – полимеразная цепная реакция с детекцией продукции
реакции флуоресценции;
- ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени;
- ПЭГ – метод преципитации в полиэтиленгликоле;
- РИД – реакция иммунодиффузии;
- РИП – реакция иммунопреципитации;
- РИФ – реакция иммунофлуоресценции;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

РСК – реакция связывания комплемента;

РТ – Республика Татарстан;

ФГБОУ ВО– Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования;

ФСБ – фосфатносолевой буфер;

ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы;

ЭДС – электродвижущая сила;

BLV – bovine leukemia virus;

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay;

pH– водородный показатель;

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абакин С. С. Лейкоз крупного рогатого скота и овец на Ставрополье: монография / С. С. Абакин. – Ставрополь, 2014. – 312 с.
2. Авдиенко, В.Г. Получение хроматографических фракций антигенов *M. bovis* 8 и их диагностическая оценка / В.Г. Авдиенко, Т.Н Грязнева, Ю.О. Берестова, А.Б. Аракелов // Ветеринарная патология. – 2003. - №1. - С.121-124.
3. Барабанов, И.Н. К мероприятиям по оздоровлению ферм крупного рогатого скота от лейкоза / И.Н. Барабанов, В, Ф. Гричко, В.М. Нахмансон и др. // Сб. науч. тр. ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. - М.-1994. - Т.93. - Ч.II. - С.52-59.
4. Баратов, М.О. К поиску причин сенсibilизации крупного рогатого скота к ППД-туберкулину для млекопитающих / М.О. Баратов, П.С. Гусейнова // Ветеринария сегодня. – 2021;10(4): 271 - 276.
5. Белоусов, В.И. Лабораторная диагностика туберкулеза животных в РФ / В.И. Белоусов, М.В. Калмыков, Л.А. Таранова // Ветеринарная патология. - 2004. - № 1-2. – С. 23-25.
6. Бродилкин, В.А. Микобактериоз вызванный *M.fortuitum* у крупного рогатого скота / В.А. Бродилкин, В.Г. Сафронов, Н.А. Мякин // Профилактика и лечение инфекционных и инвазионных заболеваний с/х животных в Нечерноземье. - Горький, 1988. - С.14-16.
7. Бублий, А.Ф. Борьба с лейкозом крупного рогатого скота / А.Ф. Бублий // Ветеринария. – 1980, № 11. - С.34-35.
8. Бузмаков, И.Г. Причины неспецифических туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота в хозяйствах Алтайского края / И.Г. Бузмаков // Тезисы докладов Всесоюзной конференции: Состояние и перспективы научных исследований по диагностике, профилактике туберкулеза,

бруцеллеза и меры борьбы с этими болезнями с/х животных. – Омск, 20-23 мая 1980. - М., 1980. – 58 с.

9. Бурба, Л.Г. Временные методические рекомендации по постановке реакции иммунодиффузии для выявления антител к антигену р24 онкорнавируса в сыворотках крови крупного рогатого скота при диагностике лейкоза / Л.Г. Бурба, А.Ф. Халихов. - М., 1976. - 7 с.

10. Гафарова, И. Э. Обнаружение провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота методом ПЦР / И.Э. Гафарова, Е.С. Лисицына, Ю.А. Савочкина [и др.] // Ветеринария. – 2020. – № 2. – С. 20-26.

11. Валихов, А.Ф. Лейкоз крупного рогатого скота: контроль и профилактика болезни: обзор // Молочная промышленность. – 2018. - № 9. - С. 74-77.

12. Васильев, В.Н. Микобактериозы и микозы легких / В.Н. Васильев // Медицина и физкультура. – София, 1971. – 383 с.

13. Верховский, О. А. Иммуноферментный анализ в диагностике лейкоза крупного рогатого скота/ О.А. Верховский, В.В. Цибезов, М.В. Баландина, И.В. Непоклонова Ветеринария. - 2002, № 12. - С.145-148.

14. Гаврилова, Г.А. Эпизоотический процесс лейкоза и туберкулеза крупного рогатого скота на Дальнем Востоке и совершенствование методов диагностики / автореф. дисс. д-ра вет.наук. – М., 2005. 59с.

15. Гизатуллин, Г.Х. Нетуберкулезные микобактерии и аллергическая диагностика туберкулеза крупного рогатого скота / Г.Х. Гизатуллин, М.А. Сафин // Тезисы докл. Респ. науч.-произв. конф. по туберкулезу. - Минск, 1977. - С. 34-36.

16. Гулюкин, М.И. Медико-биологические аспекты вируса лейкоза крупного рогатого скота / М.И. Гулюкин, Н.В. Замараева // Актуальные вопросы диагностики, профилактики и борьбы с лейкозами с-х животных и

птиц: Материалы Всес. конф. к 65-летию Свердловской НИВС. – Екатеринбург, 2000. -С. 12-25.

17. Гулюкин, М.И. Обзор эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота / М.И. Гулюкин, Г.А. Симонян, Н.А. Ажиркова // Ветеринарная жизнь. – 2005. - №6. – 17 с.

18. Гулюкин, М.И. Выявление специфических антител классов G и M к вирусу лейкоза крупного рогатого скота в сыворотках крови/ М.И. Гулюкин, О.В. Капустина, И.Ю. Ездакова, С.В. Вальциферова, Т.В. Степанова, М. Аноятбеков// Вопросы вирусологии. – 2019. - 64 (4). - С.173-177.

19. Двоглазов, Н.Г. Сравнительный анализ разных коммерческих тест-систем и методов в диагностике ВЛКРС / Н.Г. Двоглазов // Матер. Сибирской междунар. науч. прак. конф.:” Актуальные вопросы ветеринарии”. Новосибирск. -2004. - С.304-309.

20. Джакаит, Д. А. Усовершенствование иммунохимических методов диагностики лейкоза и туберкулеза крупного рогатого скота: специальность 06.02.02 "Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология": диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Джакаит Джулиет Акамуран, 2018. – 113 с.

21. Джупина, С.И. Эпизоотический процесс лейкоза крупного рогатого скота и перспективы девакации возбудителя этой инфекции / С.И. Джупина // Ветеринарная патология. – 2014. – №1. – С.98–103.

22. Донченко, А. С. Дифференциальная диагностика туберкулиновых реакций в благополучных по туберкулезу хозяйствах: Методические рекомендации / А.С. Донченко, Н.А. Донченко, А.А Колосов // Новосибирск, 2002. – 19с.

23. Донник, И.М. Региональная молекулярно - генетическая структура вируса лейкоза крупного рогатого скота / И.М. Донник, М.В. Петропавловский // Ветеринария Кубани. – 2010. - № 3. - С.12-13.

24. Дрaбкина, Р.О. Микробиология туберкулеза / Р.О. Дрaбкина // М.: Медгиз. – 1963. – 148 с.

25. Евглеевский, А.А. Научные основы и практические подходы к разработке новых средств аллергической диагностики и специфической профилактики туберкулеза крупного рогатого скота: Автореф. дис. д-ра вет. наук / А.А. Евглеевский; С.-Петербург, – 1997. – 40 с.

26. Зиннатов, Ф.Ф. Диагностическая ценность выявления провирусной ДНК ВЛКРС в молоке / Ф.Ф. Зиннатов, Т.Р. Якупов // Вопросы нормативноправового регулирования в ветеринарии. – 2010. – № 4. – С. 290-293.

27. Иванов, О.В. Эффективность серологических методов исследования при лейкозе крупного рогатого скота / О.В. Иванов, О.Ю. Иванова, В.П. Федотов и др. // Ветеринария. – 2008. - № 7. - С. 6-8.

28. Иванова, Л.А. Выявление иммунного ответа на вирус лейкоза крупного рогатого скота иммуноферментным методом / Л.А. Иванова// Автореф. дисс. канд. наук. М. – 2000. – 23с.

29. Ильина, Т.Б. Бактериологическая и биохимическая идентификация микобактерий / Т.Б. Ильина // Методические рекомендации. - Москва, 1975. - 21 с.

30. Ионина, С.В. Взаимосвязь циркуляции микобактерий во внешней среде с туберкулиновыми реакциями у животных / С.В. Ионина, Н.А. Донченко, В.Н. Донченко // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2016;(2); С.61-66.

31. Итэсь, Ю.Р. Применение «МултисканМультисофт» для иммуноферментного анализа инфекции вируса лейкоза крупного рогатого скота / Ю.Р.

Итэсь, М.Н. Ткаченко // Матер. междунар. вет. конгресса «Актуальные вопросы ветеринарной медицины. - Новосибирск, 2005. - С.134.

32. Кассич, Ю.Я. Комплексная диагностика туберкулеза / Ю.Я. Кассич, А.Т. Борзяк // Ветеринария. - 1985. - № 4. - С. 28-29.

33. Ковалев, Г.К. О дифференциации микобактерий туберкулеза / Г.К. Ковалев // Ветеринария. - 1984. - № 3. - С. 72-73.

34. Ковалюк, Н.В. Методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота: Учебное пособие/ Н.В. Ковалюк, Л.И. Якушева. – Краснодар: ГНУ СКНИЖ, 2012. – 39с.

35. Кондратьев, В.С. Оценка реакции иммунодиффузии в комплексе клинико-лабораторных методов диагностики лейкоза крупного рогатого скота / В.С. Кондратьев, М.А. Хафез // Профилактика и ликвидация заразных болезней с-х животных. – Л., 1985. - С.25-31.

36. Коромыслов, Г.Ф. Иммуноферментный анализ и применение его в ветеринарии / Г.Ф. Коромыслов, В.С. Авилов // Бюллетень / ВИЭВ. –1985. – Вып.58. – С. 6-9.

37. Кужебаева, У. Ж. Определение вируса лейкоза у крупного рогатого скота серологическим методом / У.Ж. Кужебаева, С.Г. Канатбаев, А.Т. Кайленова // Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. – 2022. – Т. 11, № 1. – С. 302-305.

38. Кузин, А.И. Туберкулез сельхоз животных и его профилактика /А.И. Кузин. - М.: Агропромиздат, 1992. – 189 с.

39. Магер, С.Н. Биологическая характеристика потомства здоровых и больных лейкозом коров, и ассоциативное развитие лейкоза и туберкулеза у животных / Автореферат диссертации на соискание д.б.н., Новосибирск. - 2006. - 42с.

40. Максимович, В.В. Сравнительная эффективность методов диагностики энзоотического лейкоза крупного рогатого скота / В.В.

Максимович, О. Ю. Черных, Н. В. Бабахина // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2019. – № 2(11). – С. 72-78.

41. Малоголовкин, С.А. Роль моноклональных антител в диагностике лейкоза крупного рогатого скота / С.А. Малоголовкин // Ветеринария. -1997. - № 4. - С.16.

42. Малинин, М.Л. Зависимость восприимчивости крупного рогатого скота к лейкозу от биохимических показателей крови / М.Л. Малинин, А.Е. Кузнецова, М.А. Шibaева и др. //Фундаментальные исследования. – 2013. №10. Вып.8. С. 132-136.

43. 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.

44. 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.

45. Мищенко, В.А. Проблема лейкоза крупного рогатого скота / В.А. Мищенко, О.Н. Петрова, А.К. Караулов, А.В. Мищенко // Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ». – 2018. - 38 с.

46. Мникова, Л.А. Определение антител иммуноферментным методом / Л.А. Мникова, В.С. Авилов, М.М. Гоголев // Ветеринария. –1983. - № 4. – С. 64-66.

47. Найманов, А.Х. Диагностика туберкулеза крупного рогатого скота в индивидуальных хозяйствах. / А.Х. Найманов, Н.П. Овдиенко, Н.П. Помыканов // Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных. Материалы международной научно-практической конференции Москва, 16-17 мая, 2006. – М.: ИзографЪ. 2006. - С. 297-302.

48. Нахмансон, В.М. Серологический метод диагностики в системе противолейкозных мероприятий / В.М. Нахмансон, М.И. Гулюкин, Е.А. Дун // Ветеринария. – 1997. - № 3. - С. 7-10.

49. Новак, Д.Д. Туберкулез сельскохозяйственных животных / Д.Д. Новак. – Алма-Ата, 1977. – 140 с.

50. Нуруллин, А.А. Иммуноферментный анализ для выявления возбудителя туберкулеза крупного рогатого скота в патологическом материале: Дис. ... канд. биол. наук / А.А. Нуруллин; Каз. вет. ин-т. - Казань, 1987. – 147с.

51. Орлов, Д. Ю. Сравнительный анализ методов прижизненной диагностики различных стадий лейкоза и ветеринарно-санитарная экспертиза молока при этой болезни / Д. Ю. Орлов, М. А. Шариати // Агробизнес и экология. – 2016. – Т. 3, № 1. – С. 49-61.

52. Ощепков, В.Г. Динамика возможного проявления неспецифических реакций на туберкулин у крупного рогатого скота в хозяйствах, благополучных по туберкулезу /В.Г. Ощепков, Л.А. Талер, Г.М. Дюсенова// Сборник научных трудов Сиб. НИВИ, ВНИИБТЖ. – Омск, 2001, с. 211-216.

53. Пантелеев, О.А. Непрямой твердофазный метод иммуноферментного анализа, его точность и источники погрешностей / О.А. Пантелеев, Л.И. Ванеева // ЖМЭИ. – 1986. -№ 3. – С. 95-99.

54. 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».

55. Петров, Н.И. Изучение зараженности ВЛКРС молодняка в специализированных хозяйствах по выращиванию нетелей / Н.И. Петров, Д.И. Шелехов // Сб. науч. тр. ДВИ. - 1993. - С.28-31.

56. Покровский, В.И. Настоящее и будущее иммуноферментного метода исследования в инфекционной патологии / В.И. Покровский, Т.А. Ермолин, С.В. Шабалина // ЖМЭИ. – 1983. - № 8. – С. 3-7.

57. Авербаха, М.М. Противотуберкулезный иммунитет. Научный обзор. / Под ред. М.М.Авербаха // ВНИИ мед. и мед. - тех. инф. - М.,1973. - 13 с.

58. Репин, Ю.М. Хирургия туберкулеза легких / Ю.М. Репин // Медицина. – Л., 1984. – С.34.

59. Ротов, В.И. Туберкулез сельскохозяйственных животных /В.И. Ротов, П.И. Кокуричев, П.Е. Савченко и др. // Издательство Киев, 1978. - 237с.

60. Русинович, А. А. Результаты гематологических исследований инфицированных ВЛКРС волов-продуцентов крови / А. А. Русинович, Н. С. Мотузко, Е. Н. Кудрявцева // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2018. – № 3. – С. 33-36.

61. Русинович, А. А. Лейкоз крупного рогатого скота в Беларуси в историческом аспекте / А. А. Русинович, Н. С. Мотузко, Е. Н. Кудрявцева // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2024. – № 1(20). – С. 52-54.

62. Сафин, М.А. Совершенствование методов диагностики и профилактики туберкулеза крупного рогатого скота: Дис. ... д-ра вет. наук / М.А. Сафин; Каз. вет. институт. – Казань, 1981. – 363с.

63. Сафин, М.А. Современные методы борьбы с туберкулезом животных / М.А. Сафин, Г.З. Идрисов. - Казань, 1992. - 168 с.

64. Сергеев, В.А. Структура и биология вирусов животных / В.А. Сергеев, Б.Г. Орлянкин. - М, 1983. – 336с.

65. Симонян, Г.А. Пути передачи онкорнавирусной инфекции в неблагополучных по лейкозу стадах крупного рогатого скота / Г.А. Симонян, Е.Ф. Бражин // Сб. науч. тр. Донского с-х ин-та. – 1980. - Т.15. - В.4. - С.62-65.

66. Скоробогатова, Е. А. Повышение достоверности лабораторной диагностики лейкоза крупного рогатого скота в период после введения биопрепаратов / Е. А. Скоробогатова, С. И. Логинов // Инновационные технологии и технические средства для АПК: Материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов, Воронеж, 26–27 ноября 2015 года / Под общей редакцией Н. И. Бухтоярова, Н. М. Дерканосовой, А. В. Дедова и др. Том Часть III. – Воронеж: Воронежский государственный аграрный университет им. Императора Петра I, 2015. – С. 118-121.

67. Смирнов, А.М. Современные проблемы диагностики и профилактики туберкулеза животных /А.М. Смирнов // Ветеринарная патология. – 2004, № 1-2(9), С. 10-13.

68. Смирнов, П.Н. Выявление коров, больных лейкозом, путем постановки РИД с р24-антигеном ВЛКРС / П.Н. Смирнов // Методические рекомендации. – Новосибирск. - 1991. – 7 с.

69. Смирнов, П.Н. Использование реакции иммунодиффузии для оценки состояния стад крупного рогатого скота по лейкозу / П.Н. Смирнов, Л.Г. Бурба, А.Т. Левашов и др. // Науч. тех. бюлл. ВАСХНИЛ/ Сиб. отд. - 1983. - В.37. - С.3-11.

70. Смирнов, П.Н. Практические аспекты лейкоза крупного рогатого скота / П.Н. Смирнов // Ветеринарная газета. – № 13. –1998. – 4 с.

71. Сорокина, А.И. Изучение влияния инфицированности вирусом лейкоза и гельминтозов на проявление аллергических туберкулиновых

реакций у крупного рогатого скота / Автореферат диссертации на соискание кандидата ветеринарных наук, Благовещенск – 2000. – 18с.

72. Сюрин, В.Н. Вирус лейкоза крупного рогатого скота / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина. – М.: МВА.1986. - С.76-85

73. Сюрин, В.Н. Диагностика вирусных болезней животных / В.Н. Сюрин, Н.В. Фомина. - М.: Агропромиздат, 1991. – С.38-50

74. Тузова, Р.В. Туберкулез сельскохозяйственных животных и птиц / Р.В. Тузова. – Минск: Урожай, 1983. – 263с.

75. Урбан, В.П. Аллергическая диагностика туберкулеза крупного рогатого скота /В.П. Урбан, М.М. Ширококов, Г.М. Громов // Сб. науч. тр. ЛВИ. – Вып. 48. – 1977. С.68-72.

76. Урбан, В.П. Природа рецидивов при туберкулезе крупного рогатого скота /В.П. Урбан// Тезисы докладов Всесоюзной научной конференции (Омск, 20-23 мая 1980), М., 1980, С.14-15.

77. Урбан, В.П. Причины аллергических реакций на внутрикожное введение туберкулина у крупного рогатого скота в благополучных по туберкулезу хозяйствах /В.П. Урбан, Ю.Ю. Данко, В.А. Пескова // Сб. науч. тр. ЛВИ. – Ленинград, 1988.

78. Фролова, Н. С. Современные методы диагностики лейкоза КРС / Н.С. Фролова, Е.В. Фролов // Актуальные вопросы и инновационные технологии в ветеринарной медицине, животноводстве и природоохранном комплексе : Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 40-летию юбилею со дня образования ветеринарного факультета, Уссурийск, 06–08 ноября 2019 года. Том 2. – Уссурийск: Приморская государственная сельскохозяйственная академия, 2019. – С.128-134.

79. Хазипов, Н.З. Использование ИФА для выделения возбудителя туберкулеза в патологическом материале / Н.З. Хазипов, Р.П. Тюрикова, А.А.

Нуруллин // Актуальные вопросы эпизоотологии и меры борьбы с туберкулезом животных: Сб. ст. – Казань, 1989. - С. 27-28.

80. Хазипов, Н.З. Биохимическая структура клеточной стенки микобактерий туберкулеза / Н.З. Хазипов, Р.П. Тюрикова, А.А. Нуруллин // Сб. науч. тр. – Казань, 1986. - С.10-19.

81. Хамзин, Р. А. Иммуноферментный метод при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота / Р.А. Хамзин, М.А. Сафин, К.Г. Идрисова // Диагностика, профилактика и меры борьбы с туберкулезом животных: Сб. ст. КВИ. – Казань, 1985. - С. 6-7.

82. Хамзин, Р. А. Совершенствование диагностики, профилактики и мер ликвидации туберкулеза крупного рогатого скота в зоне длительного неблагополучия : специальность 06.02.02 "Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология" : диссертация на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук / Хамзин Рафат Асванович. – Казань, 2006. – 366 с.

83. Хисамутдинов, Ф.Ф. Диагностика и меры борьбы с лейкозом крупного рогатого скота / Ф.Ф. Хисамутдинов, Г.А. Симонян // Труды I-съезда вет. врачей Республики Татарстан. – Казань. -1996. - С.124-128.

84. Царев, Ю.П. Сравнительные результаты исследования сыворотки крови крупного рогатого скота при лейкозе/ Ю.П. Царев// Матер. Сиб. Муждунар. вет. конгресса. – Новосибирск, - 2005. – С. 14.

85. Чепик, Г.В. Вопросы дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота / Г.В. Чепик // Тезисы докладов Всесоюзной научной конференции. – Омск, 1980, - С. 56-57.

86. Шаров, А.Н. К вопросу аллергической диагностики туберкулеза / Тезисы докладов Всесоюзной конференции: Состояние и перспективы научных исследований по диагностике, профилактике туберкулеза,

бруцеллеза и меры борьбы с этими болезнями с/х животных (Омск, 20-23 мая 1980). - М., 1980. - С.17.

87. Шаров, А.Н. Эффективность методов прижизненной диагностики туберкулеза / А.Н. Шаров, Л.А. Ерошенко, И.П. Суханов и др. // Ветеринария. - 2000. - № 2. - С.16.

88. Шишков, В.П. Наступление на лейкозы животных / В.П. Шишков // Наука и человечество. - М., 1988. - С.103-113.

89. Шкуратова, И.А. Диагностические исследования при антропозоонозных инфекциях (на примере туберкулеза крупного рогатого скота) / И. А. Шкуратова, А. П. Порываева, А. С. Красноперов, С. В. Малков // БИО. – 2018. – № 2(209). – С. 22-25.

90. Шлыгин, И.В. Значение иммунологических реакций при эпизоотическом обследовании свежих и стационарных очагов туберкулеза крупного рогатого скота / И.В. Шлыгин, Э.Д. Лакман // Сб. ст. НИВИ. – Вып. 27. – Омск, 1976. - С. 35-41

91. Юдин, Г.А. Неспецифические реакции на туберкулин у крупного рогатого скота и их профилактическое значение в системе противотуберкулезных мероприятий: Автореф. дис. ... д-ра вет. наук / Г.А. Юдин. – М., 1986, - 44 с.

92. Юшкова, Л.Я. Анализ нормативно-правового регулирования при лейкозе крупного рогатого скота / Юшкова, Л.Я. Агаркова Т.А., Донченко Н.А., Донченко А.С., Ким А.С., М.А. Амироков // Инновации и продовольственная безопасность. – 2022;(2): С.7-22.

93. Якупов, Т.Р. Способ диагностики лейкоза крупного рогатого скота / Т.Р. Якупов, А.М. Алимов, Н.З. Хазипов //Патент на изобретение RU 2425377 С1., 27.07.2011.

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

95. Якупов, Т. Р. Динамика изменений титров "свободных" и "связанных" антител у инфицированных ВЛКРС коров / Т. Р. Якупов, Н. З. Хазипов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2009. – Т. 197. – С. 150-154.

96. Якупов, Т.Р. Возможности ИФА молока в диагностике лейкоза крупного рогатого скота / Т.Р. Якупов, Н.З. Хазипов, А.М. Алимов, Б.В. Камалов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2010. Т.201. С.133-136.

97. Якупов, Т.Р. Иммуноблот анализ в диагностике туберкулеза / Т.Р. Якупов, К.С. Хаертынов // Ветеринарный врач. – 2011. - №1. -С.29-31.

98. Якупов, Т.Р. Новые подходы в диагностике лейкоза крупного рогатого скота / Т.Р. Якупов //Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2010.- Т.204. -С.342-347.

99. Якупов, Т.Р. Антигенное родство ВЛКРС с вирусом иммунодефицита человека / Т.Р. Якупов, Н.З. Хазипов, В.П. Коксин // Ветеринарный врач. – 2008. №2. С.13-14.

100. Якупов, Т. Р. Молекулярно-генетические и иммунохимические методы в диагностике, индикации и идентификации возбудителей туберкулеза и лейкоза крупного рогатого скота : специальность 06.02.02 "Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология" : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук / Якупов Талгат Равилович. – Казань, 2011. – 49 с.

101. 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.

102. 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.

103. 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.

104. Al-Asady, I.N. Virulence factors of Mycobacterium tuberculosis / I.N. Al-Asady et al. //Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology. – 2023. – Т. 2. – №. 3. – С. 221-237.

105. Alhajj, M. Enzyme linked immunosorbent assay / M. Alhajj, M. Zubair, A. Farhana // StatPearls. – 2023. – С. 154-163.

106. Andreolla A. P. et al. Desenvolvimento de um ELISA in house indireto baseado na proteína p24 recombinante para diagnóstico da leucose enzoótica em bovinos. – 2017. – С. 41.

107. Bai L. Study on epitope mapping of bovine leukemia virus for vaccine development : дис. – Tohoku University, 2016. – С.121.

108. Bai, L. Bovine leukemia virus infection affects host gene expression associated with DNA mismatch repair / Bai L. et al. // Pathogens. – 2020. – Т. 9. – №. 11. – С. 909.

109. Bai, L. Antigenicity of subregions of recombinant bovine leukemia virus (BLV) glycoprotein gp51 for antibody detection / Bai L. et al. //Journal of Virological Methods. – 2023. – Т. 311. – С. 114644.

110. Bansal, R. Mycobacterial Tuberculosis: A Highly Contagious / R. Bansal // CONFERENCE PROCEEDING OF INTERNATIONAL MULTIDISCIPLINARY CONFERENCE 2022. – 2022. – C. 87.

111. Baratov, M.O. Evaluation of the effectiveness of blood-drop agglutination test for chicken tuberculosis diagnosis / M.O. Baratov //Veterinary Science Today. – 2023. – T. 12. – №. 1. – C. 66-72.

112. Basha, M. Immuno-techniques / M. Basha //Analytical Techniques in Biochemistry. – 2020. – C. 77-102.

113. Benitez, O.J. Impact of bovine leukemia virus infection on beef cow longevity / O.J. Benitez et al. // Preventive veterinary medicine. – 2020. – T. 181. – C. 105055.

114. Blanco Vázquez, C. Detection of latent forms of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection using host biomarker-based ELISAs greatly improves paratuberculosis diagnostic sensitivity / Blanco Vázquez C. et al. // PLoS One. – 2020. – T. 15. – №. 9. – C. e0236336.

115. Borham, M. Review on bovine tuberculosis: An emerging disease associated with multidrug-resistant Mycobacterium species / M. Borham et al. // Pathogens. – 2022. – T. 11. – №. 7. – C. 715.

116. Cardoen, S. Preparedness activities and research needs in addressing emerging infectious animal and zoonotic diseases / S. Cardoen et al. // Revue Scientifique et Technique. Office International des Epizooties. – 2017. – T. 36. – №.2. – C.624.

117. Chen, Y. Evaluation and application of a milk antibody ELISA for assessing the prevalence and incidence of bovine tuberculosis in dairy herds in Hubei Province, China / Y. Chen et al. //Animal Diseases. – 2023. – T. 3. – №. 1. – C. 8.

118. Daiji, Y. Enzootic bovine leukosis caused by bovine leukemia virus classified as Group C based on viral whole genome sequencing in a 23-month-old

Holstein-Friesian heifer / Y. Daiji et al. // *Journal of Veterinary Medical Science*. – 2023. – Т. 85. – №. 12. – С. 1291-1295.

119. Dawood, A. Mycoplasmas as host pantropic and specific pathogens: clinical implications, gene transfer, virulence factors, and future perspectives / A. Dawood et al. // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – 2022. – Т. 12. – С. 855731.

120. Duraisamy, S. An Overview of Various Diagnostic Methods to Detect Antinuclear Antibodies of Connective Tissue Diseases / S. Duraisamy // *National Journal of Laboratory Medicine*. – 2021. – С. 355-361.

121. EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW). Enzootic bovine leukosis // *EFSA Journal*. – 2015. – Т. 13. – №. 7. – С. 4188.

122. Egamberdiyevich, R.Z. SOME ASPECTS OF THE IMPROVEMENT OF FARMS FROM BOVINE LEUKEMIA / R.Z. Egamberdiyevich // *NeuroQuantology*. – 2022. – Т. 20. – №. 12. – С. 1444.

123. Gilbride, B. Development and evaluation of nanoparticle-based immunoassays for TB detection and speciation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* : дис. – Queen's University Belfast, 2022. – С. 216.

124. Good, M. The history of in vivo tuberculin testing in bovines: tuberculosis, a “One Health” issue / M. Good et al. // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2018. – Т. 5. – С. 59.

125. Gutiérrez, S. E. et al. Bovine leukosis: an updated review. – 2020. – С.11.

126. Hamada, R. Detection and molecular characterization of bovine leukemia virus in Egyptian dairy cattle / R. Hamada et al. // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2020. – Т. 7. – С. 608.

127. Hussain, R. Clinico-hematological, patho-anatomical and molecular based investigation of blackleg disease in Cholistani cattle / R. Hussain et al. // *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*. – 2021. – Т. 58. – №. 3. – С. 151-155.

128. Jacobs, R.M. Bovine lymphoma / R.M. Jacobs // *Comparitive Pathobiology of Viral Diseases*. – CRC Press, 2019. – C. 21-51.
129. Kahrs, R.F. *Global Livestock Health Policy: Challenges, Opportunities and Strategies for Effective Action*. – John Wiley & Sons, 2008. – C. 74.
130. Kang J. *Development and Characterization of Monoclonal Antibodies against Pseudomonas aeruginosa* : дис. – West Virginia University, 2023. – C. 67.
131. Kaufmann, S.H.E. Vaccine development against tuberculosis over the last 140 years: Failure as part of success / S.H.E. Kaufmann // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – T. 12. – C. 750124.
132. KETTMANN, G.R. BOVINE LEUKEMIA VIRUS: PAST, PRESENT AND FUTURE / G.R. KETTMANN et al. // *RNA Tumor Viruses, Oncogenes, Human Cancer and AIDS: On the Frontiers of Understanding: Proceedings of the International Conference on RNA Tumor Viruses in Human Cancer, Denver, Colorado, June 10–14, 1984*. – Springer Science & Business Media, 2012. – T. 28. – C. 306.
133. Khairullah, A.R. Unveiling insights into bovine tuberculosis: A comprehensive review / A.R. Khairullah et al. // *Open Veterinary Journal*. – 2024. – T. 14. – №. 6. – C. 1330.
134. Köhler, H. Interferon- γ Response of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Infected Goats to Recombinant and Synthetic Mycobacterial Antigens / H. Köhler et al. // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2021. – T. 8. – C. 645251.
135. Kushkevych, I. *Bacterial Physiology and Biochemistry*. – Elsevier, 2022. – C. 367.
136. Lopes, B.C. A molecular strategy to optimize bovine tuberculosis post-mortem diagnosis and the exposure to Mycobacterium tuberculosis variant bovis / B.C. Lopes et al. // *Molecular biology reports*. – 2020. – T. 47. – №. 9. – C. 7291-7296.

137. Lv, G. The Global Epidemiology of Bovine Leukemia Virus: Current Trends and Future Implications / G. Lv et al. // *Animals*. – 2024. – T. 14. – №. 2. – C. 297.
138. Ma, B.Y. Prevalence of bovine leukemia in 1983–2019 in China: A systematic review and meta-analysis / B.Y. Ma et al. // *Microbial Pathogenesis*. – 2021. – T. 150. – C. 104681.
139. MacGregor-Fairlie, M. Tuberculosis diagnostics: overcoming ancient challenges with modern solutions / M. MacGregor-Fairlie et al. // *Emerging topics in life sciences*. – 2020. – T. 4. – №. 4. – C. 435-448.
140. Marawan, M.A. Bovine leukaemia virus: Current epidemiological circumstance and future prospective / M.A. Marawan et al. // *Viruses*. – 2021. – T. 13. – №. 11. – C. 2167.
141. Matthews, C. Johne's disease and the microbiome; current knowledge and future considerations / C. Matthews, P.D. Cotter, J. MAP O'Mahony // *Animal Microbiome*. – 2021. – T. 3. – №. 1. – C. 34.
142. Meyer R.J., Brown S.A. Challenges of the Unseen World: A Laboratory Course in Microbiology. – John Wiley & Sons, 2020. – C. 23.
143. Mukherjee, S. Development of a Diagnostic Platform to Detect Protein Biomarkers of Infectious Diseases / S. Mukherjee // *Development*. – 2020. – T. 2020. – C. 04-28.
144. Nakada, S. Estimation of circulating bovine leukemia virus levels using conventional blood cell counts / S. Nakada, J. Kohara, K. Makita // *Journal of dairy science*. – 2018. – T. 101. – №. 12. – C. 11229-11236.
145. Nakanishi, R. Comparing microRNA in milk small extracellular vesicles among healthy cattle and cattle at high risk for bovine leukemia virus transmission / R. Nakanishi et al. // *Journal of Dairy Science*. – 2022. – T. 105. – №. 6. – C. 5370-5380.

146. Natarajan, A. A systemic review on tuberculosis / A. Natarajan et al. // *Indian Journal of Tuberculosis*. – 2020. – T. 67. – №. 3. – C. 295-311.
147. Ochiai, C. Characterization of microRNA expression in B cells derived from Japanese black cattle naturally infected with bovine leukemia virus by deep sequencing / C. Ochiai et al. // *PLoS One*. – 2021. – T. 16. – №. 9. – C. e0256588.
148. Oliveira UD, Santos FLN, Galvão-Castro B, Krieger MA, Zanchin NIT. Novel Genetic Constructs for Production of Recombinant HTLV-1/2 Antigens and Evaluation of Their Reactivity to Plasma Samples from HTLV-1-Infected Patients. *J Clin Microbiol*. 2021 Mar 19;59(4):e02701-20.
149. Pavlik, I. Nontuberculous mycobacteria as saprozoites: a review / I. Pavlik et al. // *Microorganisms*. – 2022. – T. 10. – №. 7. – C. 1345.
150. Pavliscak, L.A. et al. Tracing viral transmission and evolution of bovine leukemia virus through long read Oxford nanopore sequencing of the proviral genome / L.A. Pavliscak et al. // *Pathogens*. – 2021. – T. 10. – №. 9. – C. 1191.
151. Peng, P. Emerging ELISA derived technologies for in vitro diagnostics / P. Peng et al. // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2022. – T. 152. – C. 116605.
152. Radović, M. The burden of tuberculosis as a permanent medical and legal challenge for mankind through centuries / M. Radović, A. Đorđević, B. Božanić // *Acta facultatis medicae Naissensis*. – 2021. – T. 38. – №. 3. – C. 210-224.
153. Ramaiah, L. Hematopoietic system / L. Ramaiah, D.I. Bounous, S.A. Elmore // *Haschek and Rousseaux's handbook of Toxicologic pathology*. – Academic Press, 2013. – C. 1863-1933.
154. Recht, J. Host diversity and origin of zoonoses: The ancient and the new / J. Recht, V.J. Schuenemann, M.R. Sánchez-Villagra // *Animals*. – 2020. – T. 10. – №. 9. – C. 1672.


155. Roberts, C.A. The history of tuberculosis from earliest times to the development of drugs / C.A. Roberts, J.E. Buikstra // *Clinical tuberculosis*. – CRC Press, 2020. – C. 3-15.
156. Selim, A. Seroprevalence, risk factors and molecular identification of bovine leukemia virus in Egyptian cattle / A. Selim et al. // *Animals*. – 2021. – T. 11. – №. 2. – C. 319.
157. Selim, A. Risk factor analysis of bovine leukemia virus infection in dairy cattle in Egypt / A. Selim et al. // *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. – 2020. – T. 72. – C. 101517.
158. Sökmen, A. Seroprevalence of Bovine Leukemia Virus Infection in Cattle in Muş Province, Türkiye / A. Sökmen, A.R. Babaoğlu // *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*. – 2023. – T. 11. – №. 10. – C. 1878-1881.
159. Tomé-Poderti, L. Characterization and application of recombinant Bovine Leukemia Virus Env protein / L. Tomé-Poderti et al. // *Scientific Reports*. – 2024. – T. 14. – №. 1. – C. 12190.
160. Vourc'h G. et al. Zoonoses: The ties that bind humans to animals. – éditions Quae. – 2022. – C. 168.
161. Wang, J. Development of a novel monoclonal antibody-based competitive ELISA for antibody detection against bovine leukemia virus / J. Wang et al. // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2024. – T. 267. – C. 131446.
162. Wilson, C. Animal tuberculosis / C. Wilson // *Clinical Tuberculosis*. – CRC Press, 2020. – C. 415-435.
163. Yakupov, T.R. Diagnostic Role of Circulating Immune Complexes During Cow Leukemia / T.R. Yakupov, M.M. Valiev, F.F. Zinnatov [et al.] // *Bioscience Biotechnology Research Communications*. – 2020. – Vol. 13, No. S15. – P. 27-29.

164. Yakupov, T.R. Features of humoral immunity in cows infected with the leukaemia virus / T.R. Yakupov, M.M. Valiev, F.F. Zinnatov [et al.] // International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences. – 2020. – Vol. 11, No. 1. – P. 290-293.

165. Zhao, Y. The Prevalence and Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus among Dairy Cattle in Henan Province, China / Y. Zhao et al. // Viruses. – 2024. – T. 16. – №. 9. – C. 1399.

ПРИЛОЖЕНИЯ

УТВЕРЖДАЮ:



Проректор по учебно-воспитательной работе и молодежной политике
доцент Л.Р. Загидуллин
« 18 » Июня 2024 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ
результатов научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технических работ


Наименование материалов, предложенных к внедрению: материалы кандидатской диссертации Масленникова Никиты Николаевича на тему: «Способы диагностики и иммунологические аспекты лейкоза и туберкулёза крупного рогатого скота» по специальности 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

Кем предложено: аспирантом кафедры биологической химии, физики и математики Масленниковым Н.Н.

Где внедрено: в учебный процесс кафедры биологической химии, физики и математики ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана».

Результаты применения: в ходе учебного процесса с представленными научно-исследовательскими данными ознакомлено 173 студента очной и заочной формы обучения (лекции и практические занятия)

Эффективность внедрения: углубление знаний по способам диагностики лейкоза и туберкулёза крупного рогатого скота и методам борьбы с данными инфекциями

Ответственный за внедрение:
заведующий кафедрой
биологической химии, физики и математики
ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия
ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»
доктор биологических наук, профессор  Т.М. Ахметов

УТВЕРЖДАЮ:

Директор ГБУ «Республиканская
ветеринарная лаборатория РТ
А.Р. Гараев
« 5 » _____ 2024 г.



КАРТА ОБРАТНОЙ СВЯЗИ

Материалы диссертации, аспиранта кафедры биологической химии, физики и математики ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» Масленникова Никиты Николаевича на тему: «Способы диагностики и иммунологические аспекты лейкоза и туберкулёза крупного рогатого скота», представленной на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных, будут использованы для совершенствования мер борьбы и диагностики крупного рогатого скота.

Материалы рассмотрены и приняты к внедрению в ГБУ «Республиканскую ветеринарную лабораторию РТ»

Директор ГБУ «Республиканская
ветеринарная лаборатория РТ»

А.Р. Гараев

Контактная информация:
Гараев Айрат Рашитович,
директор
Адрес: 420087, г Казань, ул Даурская, д. 34
тел.: +7 (843) 298-56-38

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 757 078** (13) **C1**

(51) МПК
G01N 33/49 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/00 (2021.05); G01N 33/49 (2021.05)

(21)(22) Заявка: 2021104413, 20.02.2021
(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
20.02.2021
Дата регистрации:
11.10.2021

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 20.02.2021

(45) Опубликовано: 11.10.2021 Бюл. № 29

Адрес для переписки:
420029, Респ. Татарстан, г. Казань, ул.
Сибирский тракт, 35, Рашидов Рустам
Хаматович

(72) Автор(ы):
Якупов Талгат Рашидович (RU),
Зиннатов Фарит Фатихович (RU),
Якупов Айрат Талгатович (RU),
Масленников Никита Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Казанская государственная
академия ветеринарной медицины имени
Н.Э. Баумана» (RU) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2200955 C2, 20.03.2003. RU
2377962 C1, 10.01.2010. RU 2425377 C1,
27.07.2011. ЗУБОВА Т.В. и др.
СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ И ОПЫТ
БОРЬБЫ С ЛЕЙКОЗОМ КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА / В мире научных
открытий, 2018, т. 10, N 5, стр. 119-131.
KHUDHAIR Y.I. et al. Serological and molecular
detection of bovine leukemia virus in cattle in
Iraq / Emerging Microbes (см. прод.)

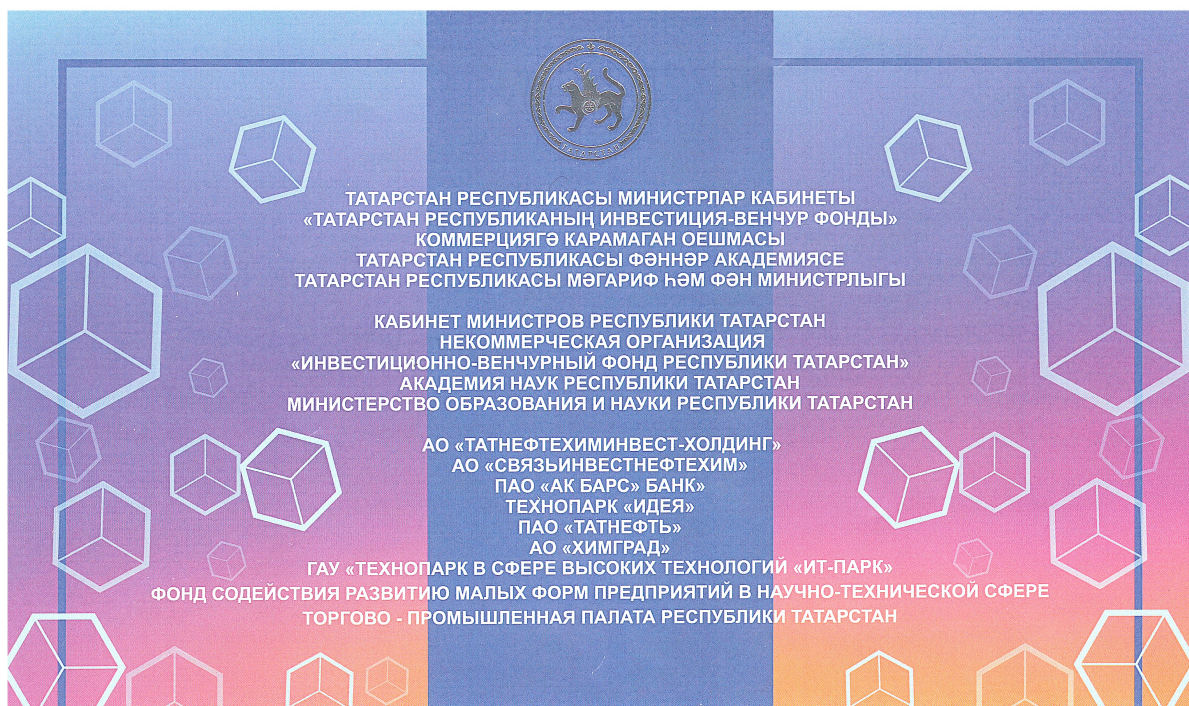
(54) Способ потенциометрической диагностики лейкоза крупного рогатого скота

(57) Реферат:
Изобретение относится к ветеринарии, а
именно к физической химии и иммунологии.
Способ потенциометрической диагностики
лейкоза крупного рогатого скота заключается в
том, что выявляют анти-ВЛКРС (вирус лейкоза
крупного рогатого скота) антитела в сыворотке
крови животного путем измерения потенциала
индикаторного электрода для рН метрии. При
этом в лунку иммунологического
полистиролового планшета для серологических
реакций вносят 0,5 мл исследуемой сыворотки
крови. Измеряют потенциал индикаторного

электрода. Добавляют 10 мкл антигена ВЛКРС
и вновь проводят измерения с помощью рН метра
в режиме mV. При изменении электродного
потенциала не более чем на 0,05 единиц
диагностируют отсутствие лейкоза крупного
рогатого скота, при изменении электродного
потенциала на 0,15 и более единиц диагностируют
лейкоз крупного рогатого скота. Способ
позволяет упростить метод анализа, повысить
достоверность результатов диагностирования. 1
пр., 1 табл.

RU 2 757 078 C 1

RU 2 757 078 C 1



ДИПЛОМ

50 ЛУЧШИХ ИННОВАЦИОННЫХ ИДЕЙ ДЛЯ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН
НОМИНАЦИЯ «ПАТЕНТ ГОДА»

НАГРАЖДАЕТСЯ

Масленников Никита Николаевич

ПО ПРОЕКТУ

Потенциометрия в диагностике лейкоза крупного рогатого скота и других инфекционных заболеваний

Премьер-министр
Республики Татарстан

А.В. Песошин

КАЗАНЬ 2023