

УДК 619.616.006.441.084

**ГЕМАТОЛОГІЧНІ І МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ
КРОВІ ТВАРИН ПІД ЧАС ВИПРОБУВАНЬ ПРЕПАРАТУ «ЛЕЙКОЗАВ»
ПРОТИ ВІРУСУ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ**

Г. А. ЗАВІРЮХА, кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий
співробітник

У. М. ЯНЕНКО, кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник

О. Ю. БАЛАБАН, молодший науковий співробітник

ДНУ «Державний центр інноваційних біотехнологій», м. Київ

E-mail: annazavir@gmail.com, uyanakuzyk@ukr.net, aleks91.00@mail.ru

***Анотація.** В даній роботі наведено результати досліджень крові ВРХ за лейкозу великої рогатої худоби. Встановлено, що формування антитіл проти вірусу лейкозу в сироватці крові корів починається через 6 місяців перебування тварин в неблагополучному стаді. Полімеразно-ланцюгова реакція у реальному часі виявилась більш чутливим методом діагностики ніж реакція імунодифузії. За допомогою ПЛР дослідили початок накопичення нуклеїнових кислот провірусу лейкозу – на шостий місяць перебування тварини в неблагополучному стаді. Профілактична імунізація хворих на лейкоз корів експериментальним препаратом «Лейкозав» зменшує кількість копій НК провірусу лейкозу в крові на 7-420 разів. У тварин контрольної групи за період проведення експерименту відмічається підвищення кількості лейкоцитів на 34 % відносно норми. Через 6 місяців після імунізації препаратом «Лейкозав» концентрація лейкоцитів крові у дослідних корів зменшуються, але знаходяться в межах норми. Для підтримки стабільності благополуччя щодо лейкозу в стадах великої рогатої худоби рекомендуємо всіх тварин щеплювати один раз на рік, навесні або восени, препаратом «Лейкозав», дотримуючись правил асептики і антисептики.*

***Ключові слова:** лейкоз, діагностика, гематологія, ІФА, ПЛР, велика рогата худоба*

Лейкоз великої рогатої худоби – пухлинна хвороба ретровірусної етіології, яка завдає великих збитків тваринництву. В господарствах, де реєструються випадки захворювання на лейкоз корів, тварини зменшують продуктивність, порушується відтворення, племінна робота [1, 2].

Лейкоз – хронічне захворювання, для великої рогатої худоби притаманний латентний перебіг, що супроводжується злякисним розростанням клітин кровотворних органів, на місці яких формуються злякисні пухлини. Крім прямих збитків в результаті захворювання, величезні витрати несуть господарства на проведення протилейкозних заходів [2, 3]. У зв'язку з ураженням кровоносних органів зменшується термін експлуатації тварин, реєструється раптова загибель хворих і виснажених корів.

З відкриттям вірусу лейкозу і розробкою стандартного антигену для проведення реакції преципітації в агаровому гелі дали можливість діагностувати захворювання на ранніх стадіях. Ці роботи були інноваційними й внесли вагомий внесок у боротьбу з лейкозом великої рогатої худоби [4-9].

Згодом були розроблені й запропоновані сучасні методи діагностики: імуноферментний аналіз (ІФА) та полімеразно–ланцюгова реакція, які дають змогу проводити діагностику лейкозу на початкових етапах захворювання.

Вивчаючи проблему лейкозу вчені дійшли спільного висновку – для активної боротьби необхідно створити імуногенний протилейкозний препарат.

Отримані дані експериментальних робіт, проведених в умовах епізоотологічних дослідів є новими і зможуть надати допомогу практичним і науковим фахівцям ветеринарної медицини в проведенні заходів в боротьбі цією небезпечною хворобою тварин і людини. Для цієї мети нами розроблена нова технологія виготовлення імуногенних інактивованих препаратів, у тому числі і проти лейкозу великої рогатої худоби, випробування якого на коровах показало позитивні результати [10 – 14].

Співробітниками ДНУ «ДЦБ» запропонована нова інноваційна технологія виготовлення інактивованого, імуногенного, нешкідливого препарату «Лейкозав», який отримав позитивні результати в умовах лабораторних та епізоотологічних експериментів. Препарат володіє не тільки специфічними захисними властивостями, а й позитивно впливає на РІД–позитивних тварин (у ході експериментів отримали 50–70% оздоровлення) [15, 16].

Мета досліджень – встановити інкубаційний період розвитку лейкозу корів в умовах епізоотологічного експерименту за допомогою РІД, ІФА та ПЛР, також вплив препарату «Лейкозав» на популяцію вірусу в організмі хворих корів та на гематологічні показники дослідних тварин.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження проводили в неблагополучному щодо лейкозу ВРХ господарстві «Данівка» Козелецького району Чернігівської області з дійним стадом у кількості 460 корів. Перед проведенням досліду кров і сироватки крові тварин досліджували за РІД, ІФА, ПЛР та гематологічно. Дослідження за РІД та ІФА показали, що інфікованість тварин вірусом лейкозу в стаді корів становить 20 %. За результатами гематологічних досліджень середня кількість лейкоцитів у крові тварин склала $17,5 \pm 3,76 \times 10^9 / \text{л}$, а кількість нуклеїнових кислот (НК) вірусу в межах $56 - 190 \times 10^6$ мл крові. Після проведення лабораторних досліджень зразків крові поголів'я корів господарства було встановлено, що серед 460 тварин тільки у чотирьох не виявлено змін у крові за РІД, ІФА, ПЛР та гематологічно, які характерні за захворювання на лейкоз. Ці тварини були відібрані до контрольної групи і залишені у стаді для вивчення тривалості інкубаційного періоду розвитку лейкозу в умовах епізоотологічного експерименту.

Для вивчення впливу поствакцинального імунітету на популяцію вірусу в крові хворих корів була сформована група ($n = 6$), якій вводили препарат «Лейкозав» підшкірно в дозі 4 см^3 двічі з інтервалом 21 доба, дотримуючись правил асептики і антисептики. Коровам контрольної групи вводили фізіологічний розчин (0,9 % NaCl) за аналогічною схемою.

Зразки крові для дослідження відбирали перед початком проведення експерименту та щоквартально протягом дев'яти місяців (термін спостереження). Дослідження сироваток крові за РІД проводили за загальноприйнятою методикою з використанням діагностичного набору – «Набір компонентів рідких стабілізованих для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії» (РП №3268–14–0526–04 (08–01)), НДП «Ветеринарна медицина».

Визначення ВЛ ВРХ імуноферментним методом (ІФА) проводилося за допомогою тест-системи імуноферментна DIA® – BLV–Ab (для визначення антитіл до вірусу лейкозу Bovine leukemia virus (BLV) в сироватці крові і молоці великої рогатої худоби) АТС vet код: QV04CX. Принцип методу заснований на зв'язуванні антитіл, що містяться в сироватці крові або в пулі молока ВРХ з рекомбінантними білками р24 і gp51, які сорбовані в лунках планшета. Аналіз проводили згідно з інструкцією, яка входить до складу тест-системи. Проведення аналізу вважали коректним, якщо ОП К – не вище 0,2 оптичної одиниці (ОО), а ОП К + не нижче 0,6 ОО.

Гематологічні дослідження проводили зі свіжою цілісною кров'ю корів, що відбиралася з яремної вени в пробірки з антикоагулянтом (3 %-й розчин К2ЕДТА). Зразки були досліджені на гематологічному аналізаторі ABC VET (Horiba ABX, France). Аналізатор Animal blood counter, модель ABC VET. За показники «норми» кількості лейкоцитів брали діапазон нормальних значень параметрів, зазначених в інструкції до гематологічному аналізатору ABC VET// Horiba ABX, Франція для ВРХ (табл. 1).

1. Діапазон нормальних значень показників крові великої рогатої худоби

Гематологічні показники	Норма
кількість лейкоцитів	4,0-12,0 × 10 ⁹ /л
кількість еритроцитів (RBC)	5,0-10,0 × 10 ¹² /л
концентрація гемоглобіну (HGB)	80-150 г/л
гематокрит (HCT)	0,240-0,460 л/л
тромбоцитів (PLT)	200-733 × 10 ⁹ /л

З даних таблиці 1 видно, що норма вмісту лейкоцитів у великої рогатої худоби складає 4,0–12,0 × 10⁹/л. Результати розрахунків лейкоцитів оцінювалися за діапазоном нормальних значень показників крові великої рогатої худоби. Верхня межа кількості лейкоцитів в крові великої рогатої худоби складає 12 × 10⁹/л, а нижній – 4 × 10⁹/л [17].. За результатами досліджень у контрольну групу було відібрано чотири здорових корови, які були вільні від копій ДНК провірусу в сироватці крові.

Матеріалом для дослідження в ПЛР була свіжа цільна кров корів, що відбиралася з яремної вени в пробірки з антикоагулянтном (2 %-й розчин К2ЕДТА). Зразки були протестовані на наявність ДНК провірусу лейкозу з використанням комплекту реагентів «ДНК–Сорбо–В» для екстракції ДНК і комплекту реагентів для проведення ПЛР з детекцією продуктів у режимі реального часу «Лейкоз», варіант FRT з використанням системи для детекції ПЛР – продуктів у режимі «реального часу» IQ5 («Bio–Rad», США) [18].

Для проведення кількісного визначення використано набір «Лейкоз», але з відомою концентрацією ДНК у позитивному контрольному зразку (ПКО ДНК BLV) – $4,5E + 04$ копій в мл (45000 копій в мл).

Для проведення кількісного визначення було приготовано серію 10-разового розведення ПКО ДНК BLV. Стандартні зразки – це зразки з відомою концентрацією (табл. 2).

2. Концентрація розведення стандартних зразків ПКО ДНК BLV

№ п/п	Стандарт	Кількість копій в мл
1	ПКО ДНК BLV/1	$4,5E+04$
2	ПКО ДНК BLV/2	$4,5E+03$
3	ПКО ДНК BLV/3	$4,5E+02$
4	ПКО ДНК BLV/4	$4,5E+01$

Стандартні зразки були використані для побудови калібрувальної кривої, а також в якості позитивного контролю. Ампліфікація кожного із клінічних зразків здійснювалась у 2 повторах. Ампліфікація стандартних зразків здійснювалась у 3 повторах. За отриманими графіками ампліфікації визначали середнє значення C_t для кожного зразка та стандарту. Аналітичні результати оцінювались за допомогою регресійного аналізу і побудови стандартного графіку залежності C_t від логарифму початкової концентрації субстрату. Брали до уваги значення нахилу кривої ампліфікації (slope), ефективність ампліфікації (E) та коефіцієнт кореляції лінійної регресії (R^2) калібрувальних графіків із використанням стандартів ПКО ДНК BLV.

Отримані результати оброблено статистично з використанням комп'ютерної програми M. Excell 2011 року, з обчисленням середньої арифметичної (M) і статистичної помилки середньої арифметичної (m).

Результати дослідження та їх обговорення. Перші ознаки захворювання на лейкоз серед здорових корів (контрольна група), що знаходяться серед тварин неблагополучного стада, з'явилися через 6 місяців з початку досліду (табл. 3).

3. Результати досліджень по РІД, ІФА, ПЦР крові корів контрольної групи ($n = 4, M \pm m$)

№ п/п	На початок досліду			Через 6 місяців			Через 9 місяців		
	РІД	ІФА	ПЦР*	РІД	ІФА	ПЦР*	РІД	ІФА	ПЦР*
1	–	–	0	–	+	0	+	+	90200
2	–	–	0	–	+	70600	+	+	5420000
3	–	–	0	–	–	0	–	–	730
4	–	–	0	–	–	0	+	–	1270000
$M \pm$ m									1695232,50±1274 826,25

Примітка: * К-ть НК вірусу в 1 мл крові (SQ Mean)

Аналіз даних таблиці 3 показав, що перший випадок захворювання на лейкоз тварин у здоровій (контрольній) групі корів зареєстрований через 6 місяців після початку експерименту. В крові корови № 2 було виявлено 70600 копій ДНК провірусу в одному мл плазми крові. Протягом наступних трьох місяців популяція вірусу збільшилася в 77 разів. Важливо відзначити, що за даними РІД у цієї тварини не було виявлено специфічних антитіл проти вірусу лейкозу. Через три наступні місяці (на 9 місяць від початку досліду) обсяг популяції вірусу в даній корови вже становив 5420000 НК вірусу, а кількість противірусних антитіл досягло рівня адекватного чутливості реакції імунодифузії.

На 9 місяць експерименту в корови № 3 було виявлено всього 730 копій НК вірусу, за РІД в сироватці крові не було виявлено специфічних антитіл в кількості, адекватній чутливості. Це свідчить про початок розвитку лейкозної інфекції в останні місяці досліду.

З отриманих результатів дослідження можна зробити висновок, що здорові корови, перебуваючи серед хворих тварин неблагополучного на лейкоз поголів'я, хворіють на лейкоз через 6 місяців від початку досліду, а за РІД протівірусні антитіла виявляються в сироватці крові через 9 місяців. Це свідчить про те, що не у всіх корів контрольної групи одночасно розвивається інфекційний процес захворювання лейкозом.

В дослідному господарстві «Данівка» була сформована група із хворих тварин (n = 6) для вивчення поствакцинального імунітету після застосування препарату «Лейкозав». Зразки крові досліджувалися вищезазначеними методами (табл. 4).

4. Результати досліджень крові корів за РІД, ІФА, ПЦР дослідної групи (РІД-позитивні) після застосування препарату «Лейкозав» (n = 6, M ± m)

№ п/п	До введення препарату			Після введення препарату, через 6 міс.			Після введення препарату, через 9 міс		
	РІД	ІФА	ПЦР	РІД	ІФА	ПЦР	РІД	ІФА	ПЦР
1	+	+	281248	-	-	123	-	-	2230
2	+	-	0	+	-	0	-	-	941
3	+	+	56935	-	+	26800	-	-	3040
4	+	+	52200	+	+	55600	+	+	70600
5	+	-	991800	-	+	128	-	-	2360
6	+	-	9603	+	+	1100	+	-	740
M ± m			231964,33 ± 157689,74			9938,5 ± 91830,17			1651,84 ± 1176356,35

З даних таблиці 4 видно, що імунізація РІД-позитивних тварин препаратом «Лейкозав» впливає на зменшення кількості копій ДНК провірусу лейкозу. Після застосування препарату кількість копій зменшилася в 7-420 разів. Отже, для підтримки здоров'я тварин у неблагополучному щодо лейкозу поголів'ї їх необхідно щорічно захищати активним імунітетом – щепленнями запропонованим препаратом один раз на рік. Паралельно з накопиченням ДНК провірусу в плазмі крові зараженої тварини накопичуються специфічні антитіла в кількості, адекватній чутливості РІД.

Одночасно реєструються гематологічні зміни в крові корів контрольної (не вакцинованої) і дослідної групи (РІД-позитивні). Результати досліджень представлені в таблицях 5 і 6.

5. Результати гематологічних досліджень крові корів контрольної (не щепленої) групи ($n = 4, M \pm m$)

№ п/п	На початку дослідження				Через 6 місяців						Через 9 місяців				
	концентрація лейкоцитів (WBC), [10 ⁹ /л]	концентрація еритроцитів (RBC), [10 ¹² /л]	концентрація гемоглобіну (HGB), [г / дл]	гематокрит (HCT), [%]	концентрація тромбоцитів (PLT), [10 ⁹ /л]	концентрація лейкоцитів (WBC), [10 ⁹ /л]	концентрація еритроцитів (RBC), [10 ¹² /л]	концентрація гемоглобіну (HGB), [г / дл]	гематокрит (HCT), [%]	концентрація тромбоцитів (PLT), [10 ⁹ /л]	концентрація лейкоцитів (WBC), [10 ⁹ /л]	концентрація еритроцитів (RBC), [10 ¹² /л]	концентрація гемоглобіну (HGB), [г / дл]	гематокрит (HCT), [%]	концентрація тромбоцитів (PLT), [10 ⁹ /л]
1	5,8	6,35	97	0,29	435	6,5	6,50	96	0,288	503	5,0	5,99	98	0,289	565
2	16,6	7,13	118	0,35	117	19,8	6,78	112	0,322	148	22,7	6,03	98	0,282	207
3	11,0	6,14	104	0,302	275	9,6	5,99	100	0,290	387	13,7	6,14	104	0,302	566
4	15,8	8,42	130	0,38	250	27,4	5,98	111	0,321	267	23,0	6,50	92	0,269	280
$M \pm m$	12,3 ± 2,49	7,01 ± 0,52	112,25 ± 7,35	0,33± 0,02	269,25 ± 65,23	15,8 ± 4,79	6,31 ± 0,20	104,7± 3,99	0,305± 0,01	326,25 ± 76,49	16,1 ± 4,28	6,17 ± 0,12	98 ± 2,45	0,286 ± 0,01	404,5 ± 94,14

У тварин контрольної групи за період проведення експерименту відмічається підвищення кількості лейкоцитів на 34 % відносно норми (табл.1), тоді як інші гематологічні показники (еритроцити, гемоглобін, гематокрит та тромбоцити) залишаються в межах норми.

Застосування експериментальної серії препарату «Лейкозав» хворим лейкозом коровам дослідного господарства призвело до незначних гематологічних змін, які представлені у табл. 6.

6. Результати гематологічних досліджень крові корів дослідної групи при застосуванні препарату «Лейкозав» (n = 6, M ± m)

№ п/п	На початку дослідження					Через 6 місяців					Через 9 місяців				
	концентрація лейкоцитів (WBC), [10 ⁹ / л]	концентрація еритроцитів (RBC), [10 ¹² / л]	концентрація гемоглобіну (HGB), [г / дл]	гематокрит (HCT), [%]	концентрація тромбоцитів (PLT), [10 ⁹ / л]	концентрація лейкоцитів (WBC), [10 ⁹ / л]	концентрація еритроцитів (RBC), [10 ¹² / л]	концентрація гемоглобіну (HGB), [г / дл]	гематокрит (HCT), [%]	концентрація тромбоцитів (PLT), [10 ⁹ / л]	концентрація лейкоцитів (WBC), [10 ⁹ / л]	концентрація еритроцитів (RBC), [10 ¹² / л]	концентрація гемоглобіну (HGB), [г / дл]	гематокрит (HCT), [%]	концентрація тромбоцитів (PLT), [10 ⁹ / л]
1	15,1	6,77	112	0,328	175	9,2	8,32	141	0,405	46	8,9	5,05	83	0,243	368
2	14,9	8,97	131	0,390	339	8,6	8,16	130	0,353	337	12,8	7,37	98	0,284	183
3	13,3	10,11	179	0,532	236	10,3	7,29	138	0,387	332	14,9	6,30	104	0,301	218
4	35,5	7,93	127	0,360	99	22,2	8,28	130	0,360	244	32,1	7,99	123	0,357	365
5	10,1	8,67	131	0,397	379	10,0	8,43	141	0,386	272	12,5	6,68	108	0,313	552
6	13,4	8,89	133	0,405	93	7,5	8,90	139	0,411	211	13,1	5,74	92	0,265	387
M	17,05	8,56	135,5	0,402	220,2	11,3	8,23	136,5	0,384	240,3	15,72	6,52	101,3	0,29	345,5
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
m	3,8	0,46*	9,24*	0,03*	49,16	2,21*	0,22***	2,11***	0,01***	43,74*	3,37	0,44	5,64	0,02	54,14

Примітка: * $p < 0,1$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ – достовірність показників у тварин дослідної групи, в порівнянні з контрольною групою

Через три місяці після імунізації препаратом «Лейкозав» у щеплених корів окремі показники крові зменшилися, але залишилися в межах норм. Так, концентрація лейкоцитів на початку досліду була $17,05 \pm 3,76$, через 9 місяців експерименту – $15,72 \pm 3,37$. Спостерігається тенденція до зменшення. В даному випадку концентрація лейкоцитів зменшилася на 15,7 %. Показники еритроцитів, гемоглобіну, гематокриту і тромбоцитів у щеплених тварин суттєво не змінюються протягом дослідного періоду та знаходяться у межах норми. Отже, препарат не викликає негативних змін в крові тварин після імунізації їх із профілактичною метою препаратом «Лейкозав».

Висновки і перспективи подальших досліджень

1. В здорових тварин, що перебувають у неблагополучному щодо лейкозу стаді, розвиток інфекційного процесу реєструється на 6-9-й місяць, що підтверджується дослідженнями ІФА та ПЛР.

2. Позитивна реакція за РІД виявляється на 9 місяць перебігу захворювання у разі перебування тварин у неблагополучному щодо лейкозу стаді.

3. Використання методу кількісного визначення ДНК провірусу лейкозу за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції не лише дозволяє виявити інфікованих тварин на найбільш ранніх стадіях захворювання, а й дає змогу в майбутньому оцінювати ефективність препаратів, що рекомендуються для профілактики та лікування лейкозу ВРХ.

4. Профілактична імунізація хворих на лейкоз корів препаратом «Лейкозав» зменшує кількість копій ДНК провірусу в крові в 7-420 разів.

5. Для підтримки стабільності благополуччя щодо лейкозу в стаді корів рекомендуємо всіх тварин щеплювати один раз на рік, навесні або восени, препаратом «Лейкозав», дотримуючись правил асептики і антисептики.

Список літератури

1. Ярчук Б. М. Эпизоотическая ситуация и организационно-методические основы оздоровления от лейкоза хозяйств Украины / Б. М. Ярчук, Р. В. Трсин, О. В. Довгань // Научный вестник ветеринарной медицины. – 2013. – Вып. 12 (107). – С. 83-87.

2. Мандыгра М. С. Оценка прижизненной диагностики лейкоза крупного рогатого скота / М. С. Мандыгра, Н. В. Любар, В. М. Удяк // НТБ Институт биологии животных и ГНИКИ ветпрепаратов и кормовых добавок. – Львов, 2011. – Вып. 12. – № 1, 2. – С. 362-367.

3. Інструкція з профілактики та оздоровлення великої рогатої худоби від лейкозу/ Затвердж. наказом Держ. комітету вет. мед. України 21.12.2007 № 21. зареєстровано в Мін. юст. України 11.01.2008 р. за №12/14703. –13 с.

4. Бусол В. О. Імуногенні характеристики інактивованих вакцин проти лейкозу великої рогатої худоби / В. О. Бусол, Л. В. Коваленко, Т. Г. Тонська // Науковий вісник ветеринарної медицини. – Біла Церква, 2010. – Вип. 79. – С. 44-46.

5. Бусол В. А. Эпизоотология лейкозов крупного рогатого скота / В. А. Бусол // Распознавание и меры борьбы с лейкозом человека и животных: тез. доклад. Всесоюз. Конф, Москва, 18-22 октября 1982 г. – М., 1982. – С. 191-192.

6. Бусол В. А. Эпизоотический процесс при лейкозе крупного рогатого скота / В. А. Бусол, А. Б. Домбровский. // Теоретические и практические вопросы ветеринарии: – Тарту, 1987. – С. 28-29.

7. Гулюкин М. И. Изучение степени опасности животного в скрытой стадии инфекции, как источника вируса лейкоза крупного рогатого скота / М. И. Гулюкин, Н. В. Замираева // Современные достижения в борьбе и профилактике лейкоза крупного рогатого скота: тез. докл. науч. – произв. конф. Кишинев, 15-18 сентября. 1994 г. – Кишинев, 1994. – С. 15-16.

8. Мандыгра Н. С. Теоретические и практические основы борьбы с лейкозом крупного рогатого скота / Н. С. Мандыгра // Проблема оздоровления хозяйств от лейкоза крупного рогатого скота: тез. докл. Всесоюз. науч.-произв. конф., Новосибирск, 11–13 апреля 1990 г. – Новосибирск, 1990. – С. 27-28.

9. Шиков А. Т. Исследования по выяснению этиологии лейкоза КРС / А. Т. Шиков, Е. А. Андриян, Р. А. Аваненсов // В кн. Всесоюз. симпозиума по проблеме лейкоза сельскохозяйственных животных. – М., 1972. – с. 24.

10. Завірюха Г. А. Профілактична імунізація корів вакциною «Лейкозав» – основа оздоровлення та активної боротьби з лейкозом великої рогатої худоби / Г. А. Завірюха // Вет. Біотехнологія: Бюл. – УААН. Ін-т вет. медицини. – К.: Дорадо – Друк, 2009. – № 14. – С. 103-111.

11. Завірюха Г. А. Формування імунітету у корів, щеплених вакциною «Лейкозав», в умовах епізоотичного експерименту та його вплив на оздоровлення від лейкозу / Г. А. Завірюха // Вет. медицина. – Міжвід. темат. наук. зб. – Харків, 2009. – № 92. – С. 203-207.

12. Завірюха Г. А. Вплив вакцини «Лейкозав» на елімінацію вірусу лейкозу в щеплених РІД–позитивних корів / Г. А. Завірюха, А. І. Завірюха // Ветеринарна медицина / Міжвід. темат. наук. зб. – Харків, 2010. – № 94. – С. 173-175.

13. Завірюха Г. А. Розробка методики стандартизації інактивованих вакцин проти лейкозу великої рогатої худоби / Г. А. Завірюха // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. – Харків, 2011. – Вип. 23. – Ч. 2 –т. 1. – С. 169-172.

14. Завірюха Г. А. Новий ефективний спосіб оздоровлення великої рогатої худоби враженої вірусом лейкозу / Г. А. Завірюха, А. І. Завірюха // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнології ім. С.З. Гжицького. – Т. 13. – № 4 (50). – ч. 1. – Львів, 2011 – С. 141-147.

15. Завірюха Г. А. Профілактичні та протипухлинні властивості вакцини «Лейкозав» / Г. А. Завірюха // Ветеринарна медицина України. – Міжвід. темат. наук. збірник. – Вип. 96. – Харків, 2012. – С. 157-158.

16. Завірюха Г. А. Ефективність профілактичних щеплень худоби вакциною «Лейкозав» в боротьбі з лейкозом великої рогатої худоби / Г. А. Завірюха // Науковий вісник Львівського національного університету

ветеринарної медицини та біотехнології ім. С.З. Гжицького. – Т. 14 – № 3 (53). – ч. 1. – 2012 – С. 55-58.

17. Ковалюк Н. В. Методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота / Н. В. Ковалюк, Л. И. Якушева // Краснодар. – 2012. – 39 с.

18. Подымалкин А. А. Использование метода Real-Time PCR для диагностики генетической устойчивости КРС к лейкозу [Эл. ресурс] / А. А. Подымалкин // Режим доступа: http://www.biotech-bryansk.net/nfiles/news/b_A0514E5A-53E6-4F46-B765-DA28B6922049.pdf

Referense

1. Yarchuk B. M., Trsyn R. V., Dovhan' O. V. (2013) Epizooticheskaya situatsyya y organizatsionno-metodicheskiye osnovy ozdorovlenyya ot leykoza khozyaystv Ukrainy [Epizootological situation, organization-methodical and molecular-biological aspects of environmental sanitation of large horned cattle from a leucosis in Ukraine], Scientific Journal of Veterinary Medicine, 12 (107), 83 – 87.

2. Mandygra M. S. Lyubar N. V., Udyak V. M. (2011) Otsenka pryzhiznennoy dyahnostyky leykoza krupnoho rohatoho skota [Estimation of life diagnostics methods of leucosis of cattle], State Research Control Institute of veterinary drugs and feed additives, 12. № 1, 2, 362 – 367.

3. Instruktsiya z profilaktyky ta ozdorovlennya velykoyi rohatoyi khudoby vid leykozu [Instructions for the prevention and rehabilitation of bovine leukemia] (2007), State Committee for Veterinary Medicine of Ukraine 13

4. Busol V. O., Kovalenko L.V., Tons'ka T. H. (2010) Imunohenni kharakterystyky inaktyvovanykh vaktsyn proty leykozu velykoyi rohatoyi khudoby [Immunogenicity characteristics versus inactivated vaccine bovine leukemia], Scientific Journal of Veterinary Medicine, 6 (79), 44–46.

5. Busol V. A. (1982) Epizootology leukemia cattle. All-Union Conference, Moscow, 18-22 oktobre, 191–192.

6. Busol V. A. Dombrovskyy A. B. (1987) Epyzootycheskyy protsess pry leykoze krupnoho rohatoho skota [Epizootic process in leukemia cattle] Theoretical and practical issues in veterinary medicine, 28–29.

7. Hulyukyn M. Y. Zamaraeva N. V. (1994) The study of the level of danger of the animal in a latent stage of infection, as a source of virus bovine leukemia. Recent advances in the fight against and prevention of bovine leukemia: Mes. Rep. Scientific. Manuf. Conf. Kishinev, 15-18 September 15–16.

8. Mandyhra N. S. (1990) Theoretical and practical basis of the fight with leukemia cattle. The problem of improvement of farms from bovine leukemia. All Union. Scientific-Manuf. Conf., Novosibirsk, 11-13 april, 27–28.

9. Shykov A. T., Andriyan E. A, Avansensov R. A. (1972) V kn. Vsesoyuz. sympozyuma po probleme leykoza sel'skokhozyaystvennykh zhyvotnykh [Union in the book. Symposium on leukemia farm animals], Moscow, Russia, 24.

10. Zaviryukha H. A. (2009) Profilaktychna imunizatsiya koriv vaktsynoyu «Leykozav» – osnova ozdorovlennya ta aktyvnoy borot'by z leykozom velykoyi

rohatoyi khudoby [Preventive immunization of cattle vaccine "Leykozav" – the foundation of health and active fight against bovine leukemia]. Veterinary Biotechnology Newsletter, 14, 103–111.

11. Zaviryukha H. A. (2010) Formuvannya imunitetu u koriv, shcheplenykh vaktsynoyu «Leykozav», v umovakh epizootychnoho eksperymentu ta yoho vplyv na ozdorovlennya vid leykozu [Formation of immunity in cattle vaccinated vaccine "Leykozav" in terms of epizootic experiment and its impact on recovery from leukemia]. Veterinary medicine, 92, 203–207.

12. Zaviryukha H. A., Zaviryukha A. I. (2010). Vplyv vaktsyny «Leykozav» na eliminatsiyu virusu leykozu v shcheplenykh RID–pozytyvnykh koriv [The impact of the vaccine "Leykozav" on elimination leukemia virus in vaccinated RID-positive cows]. Veterinary medicine, 94, 173–175.

13. Zaviryukha H. A. (2011) Rozrobka metodyky standartyzatsiyi inaktyvovanykh vaktsyn proty leykozu velykoyi rohatoyi khudoby [Development of methods for standardization of inactivated vaccines against bovine leukemia] / Problems zooengineering and Veterinary Medicine, 23 (1), 169–172.

14. Zaviryukha H. A., Zaviryukha A. I. (2011) Novyi fektivnyy sposib ozdorovlennya velykoyi rohatoyi khudoby vrazhenoyi virusom leykozu [The new efficient way to healing the affected bovine leukemia virus]. Scientific Bulletin of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnology named. S. Z. Gzhytsky, 13 (50), 141–147.

15. Zaviryukha H. A. (2012) Profilaktychni ta protypukhlynni vlastyvosti vaktsyny «Leykozav» [Preventive vaccines and antitumor properties "Leykozav"]. Veterinary medicine, 96, 157–158.

16. Zaviryukha H. A. (2012) Efektyvnist' profilaktychnykh shcheplen' khudoby vaktsynoyu «Leykozav» v borot'bi z leykozom velykoyi rohatoyi khudoby [The effectiveness of preventive vaccination of cattle vaccine "Leykozav" in the fight against bovine leukemia]. Scientific Bulletin of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnology named. S. Z. Gzhytsky, 14 (53), 55–58.

17. Kovalyuk N. V., Yakusheva L. Y. (2012) Metody dyahnostyky leykoza krupnoho rohatoho skota [Methods of diagnosis of bovine leukemia]. Krasnodar, 39.

18. Podymalkyn A. A. The use of Real-Time PCR for the diagnosis of genetic resistance to cattle leukemia Available at: http://www.biotech-bryansk.net/nfiles/news/b_A0514E5A-53E6-4F46-B765-DA28B6922049.pdf

**ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ ЖИВОТНЫХ ПРИ ИСПЫТАНИИ
ПРЕПАРАТА «ЛЕЙКОЗАВ» ПРОТИВ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

А. А.Завирюха, У. М. Яненко, О. Ю.Балабан

Аннотация. В данной работе приведены результаты исследований крови КРС при лейкозе крупного рогатого скота. Установлено, что формирование

антител против вируса лейкоза в сыворотке крови коров начинается через 6 месяцев пребывания животных в неблагополучном стаде. Полимеразно-цепная реакция в реальном времени оказалась более чувствительным методом диагностики чем реакция иммунодиффузии. С помощью ПЦР установили, что начало накопления нуклеиновых кислот провируса лейкоза происходит на шестой месяц пребывания животного в неблагополучном стаде. Профилактическая иммунизация больных лейкозом коров экспериментальным препаратом «Лейкозав» уменьшает количество копий ДНК провируса лейкоза в крови в 7-420 раз. У животных контрольной группы за период проведения эксперимента отмечается повышение количества лейкоцитов на 34 % по отношению к норме. Через 6 месяцев после иммунизации препаратом «Лейкозав» концентрация лейкоцитов крови у опытных коров уменьшилась, но находилась в пределах нормы. Для поддержания стабильности благополучия по лейкозу в стадах крупного рогатого скота рекомендуем всех животных прививать один раз в год, весной или осенью, препаратом «Лейкозав», соблюдая правила асептики и антисептики.

***Ключевые слова:** лейкоз, диагностика, гематология, ИФА, ПЦР, крупный рогатый скот*

**HEMATOLOGIC AND MOLECULAR GENETIC STUDIES OF
ANIMAL BLOOD FOR TESTING PREPARATION "LEYKOZAV"
AGAINST THE VIRUS BOVINE LEUKEMIA
A. A. Zaviriukha, U. M. Yanenko, O. Y. Balaban**

***Abstract.** This paper presents the results of the blood of cattle research in leukemia cattle. It was found that the formation of antibodies against leukemia virus in the serum of cows blood begins after 6 months in the animals in the herd unfavorable. Polymerase chain reaction in real time was a more sensitive diagnostic method than the reaction of immunodiffusion. By using PCR found that the beginning of the accumulation of proviral nucleic acid leukemia occurs in the sixth month of the animal's stay in a dysfunctional herd. Preventive immunization of cows suffering from leukemia experimental drug "Leykozav" reduces the amount of proviral DNA copies of leukemia in the blood to 7-420 times. The animals of the control group for the period of the experiment marked increase in the number of leukocytes by 34% compared to normal. 6 months after immunization preparation "Leykozav" the concentration of white blood cells in the experimental cows decreased, but are within the normal range. In order to maintain stability on the well-being of leukemia in herds of cattle is recommended to vaccinate all animals once a year, in spring or autumn, the preparation "Leykozav", observing the rules of asepsis and antisepsis.*

***Keywords:** leukemia, diagnosis, hematology, ELISA, PCR, cattle*