

УДК 619.616.006.441.084

Завірюха Г.А., к.с.-г.н., завідувач відділу мікробіології, **Поліщук І.В.**,
Афанасьєва К.В., **Бурлакова Н.О.**, молодші наукові співробітники ©
ДНУ «Державний центр інноваційних біотехнологій», м. Київ

ЗМІНИ В ПОПУЛЯЦІЇ РЕТРОВІРУСУ ЛЕЙКОЗУ В КРОВІ ХВОРИХ КОРІВ ПІСЛЯ ІМУНІЗАЦІЇ ВАКЦИНОЮ «ЛЕЙКОЗАВ»

У статті представлені результати вивчення впливу поствакцинального імунітету на зміни в популяції ретровірусу лейкозу великої рогатої худоби в плазмі крові РІД-позитивних тварин.

Ключові слова: велика рогата худоба, лейкоз, імунізація, вакцина.

Вступ. З відкриттям вірусу лейкозу великої рогатої худоби, розпочався новий етап і напрямок активної боротьби з цією небезпечною хворобою [1,2,3].

Розробка методики постановки реакції імунодифузії з використанням стандартного стабілізованого лейкозного антигену дала можливість впливати на перебіг активності лейкозного процесу в неблагополучному щодо лейкозу стаді, з вилученням тварин у ранній (продромальній) стадії захворювання.

Ізоляція інфікованих вірусом лейкозу великої рогатої худоби тварин не могла забезпечити повного оздоровлення, бо після чергових серологічних досліджень у стаді залишилися тварини, хворі в латентній стадії захворювання, та хворі тварини, організм яких нездатний напрацьовувати специфічні противірусні антитіла. Оздоровлення розтягувалось на десятки років. Видалення із стада РІД-позитивних та ІФА-позитивних корів не гарантує повного оздоровлення. З часом латентно хворі на лейкоз тварини «дозрівають» і виявляються під час чергових серологічних досліджень. За час перебування хворих тварин у стаді вони є джерелом інфекції для підростаючого молодняка та ще не вражених вірусом корів. Отже, відсутність РІД-позитивних ВРХ у стаді не гарантує повного оздоровлення від онкорнавірусної інфекції [4].

В боротьбі з інфекційними хворобами вірус-бактеріальної етіології науковцями розроблені специфічні вакцини, які захищають тварин від захворювань. До цього часу ефективна вакцина проти лейкозу великої рогатої худоби ще не розроблена.

Нами запропонована інактивована вакцина «Лейкозав» проти лейкозу великої рогатої худоби, на яку після щеплення формується у чутливих до лейкозу тварин специфічний противірусний імунітет із титром антитіл 2-4 Іg₂ за РІД [5, 6].

Як показали наші дослідження, противірусний імунітет з такою напругою захищає тварин від спонтанного зараження та позитивно впливає на здоров'я окремих інфікованих вірусом тварин (РІД+) та відновлення кількості лейкоцитів до фізіологічної норми [7, 8].

Нижче ми наводимо результати вивчення впливу поствакцинального імунітету на зміни кількості ретровірусу в плазмі крові РІД-позитивних тварин.

Матеріали і методи. В досліді було 150 корів молочного стада, яких досліджували за РІД, ІФА та ПЛР, використовуючи сучасне обладнання для лабораторних досліджень.

Корів молочного стада, неблагополучного по лейкозу ВРХ, імунізували вакциною «Лейкозав» згідно вимог «Настанови по застосуванню вакцини «Лейкозав» великої рогатої худоби», затвердженої Держдепартаментом ветеринарної медицини 26.10.2000 р., №15-14/193. Коровам, сироватка крові яких реагувала позитивно в РІД, ІФА та які мали підвищену кількість лейкоцитів у крові, вводили вакцину підшкірно, в ділянці верхньої третини шиї, двічі з інтервалом 21-30 днів по 2 см³ за одне введення (2+2 см³), дотримуючись правил асептики та антисептики. Групі корів, сироватка крові яких реагувала позитивно під час дослідження за РІД та мала підвищену кількість лейкоцитів в крові, вакцину вводили за такою ж схемою, але в дозі по 4 см³ (4+4 см³).

Контролем служили тварини, сироватка крові яких не реагувала із стандартним лейкозним антигеном (РІД-негативні), показники кількості лейкоцитів у крові були в межах фізіологічної норми, а також були відсутні копії ДНК-провірусу лейкозу. Дослідження сироватки крові за РІД проводили згідно загальноприйнятої методики з застосуванням діагностичного набору (Набір компонентів рідких стабілізованих для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії (РІД) (РП №3268-14-0526-04(08-01)), НДП «Ветеринарна медицина».

Матеріалом для кількісного визначення ДНК-провірусу лейкозу були зразки крові, які були відібрані від корів у системи для відбору крові з 3% розчином ЕТДА (VACUTEST®, Італія) та надходили до лабораторії в день відбору. Зразки були протестовані на наявність ДНК провірусу лейкозу з використанням комплекту реагентів «ДНК-СОРБ-В» для екстракції ДНК і комплекту реагентів для проведення ПЛР з детекцією продуктів у режимі реального часу «Лейкоз», варіант FRT із використанням системи для детекції ПЛР – продуктів у режимі «реального часу» IQ5 («Bio-Rad», США). З метою визначення вірусного навантаження було протестовані 150 зразків крові тварин.

Кількісне визначення вірусу лейкозу ВРХ у крові проводили з використанням тест-системи «Лейкоз» для виявлення ДНК-провірусу лейкозу великої рогатої худоби в біологічному матеріалі методом ПЛР в режимі «реального часу» у варіанті FRT, виробництва «ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзор», Росія. Варіант FRT використовується для виявлення ДНК-провірусу лейкозу великої рогатої худоби у біологічному матеріалі методом полімеразної ланцюгової реакції з гібридаційно-флуоресцентною детекцією в режимі «реального часу» [9].

В основі методу лежить ампліфікація специфічної ділянки ДНК-провірусу лейкозу великої рогатої худоби (послідовності, інтегрованої в ДНК лейкоцитів ВРХ) за рахунок багаторазового повторення циклів денатурації ДНК

у досліджуваній пробі, відпалу специфічних олігонуклеотидних затравок (праймерів) і зондів, мічених флуоресцентними барвниками і синтезу комплементарних ланцюгів ДНК за допомогою ферменту Таq-полімерази [10].

Для проведення аналізу був використаний набір «Лейкоз», з уже відомою концентрацією ДНК у позитивному контрольному зразку (ПКО ДНК BLV) – $4,5E+04$ копій в мл (45000 копій в мл).

Отримані дані у вигляді кривих накопичення флуоресцентного сигналу, аналізувалися за допомогою програмного забезпечення системи для детекції ПЛР – продуктів у режимі «реального часу» IQ5.

Для проведення кількісного визначення було виготовлено серію 10-кратного розведення ПКО ДНК BLV. Стандартні зразки – це зразки з відомою концентрацією (табл. 1).

Таблиця 1

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 та в якості позитивних контролів. За отриманими графіками ампліфікації визначали середнє значення S_t для кожного зразка та стандарту. Брали до уваги значення нахилу кривої ампліфікації (slope), ефективність ампліфікації (E) та коефіцієнт кореляції лінійної регресії (R^2) калібрувальних графіків з використанням стандартів ПКО ДНК BLV» [11].

Дослідження сироваток крові за ІФА проводили на тест-системі імуноферментній «DIA-BLV-Ab». Тест-система призначена для аналізу сироваток крові та молока, а також пулів зразків сироваток і пулів зразків молока великої рогатої худоби на наявність антитіл до вірусу лейкозу методом імуноферментного аналізу. Результати аналізу оцінювали за допомогою спектрофотометра (TECAN «Sunrise», Австрія), при довжині хвиль 450/620нм. Інкубацію планшет проводили в термошейкері BioSAN «PST-60 HL-4».

Гематологічні дослідження проводили на гематологічному аналізаторі «Animal blood counter, модель ABC VET//Horiba ABX, Франція». Використовували реагенти, які містяться в ветпаке АБЦ АВХ: АВХ Minoton - від 100 мл; АВХ Mynolyse - від 25 мл; АВХ Cleaner - 40 мл; АВХ Minocclair - 6 мл; при дослідженнях використовували контрольний зразок Para 12 Extend - 30-60 мкл.

Результати дослідження. Після проведення серологічних досліджень було встановлено, що в результаті систематичних щорічних досліджень кількість реагуючих за РІД корів в кінці року зменшувалась до десяти відсотків. Зокрема, за нашими даними піддослідне стадо складалось з РІД-негативних тварин, а 10% становили корови, сироватка крові яких реагувала позитивно в РІД у нативному вигляді та в розведенні 1:2-1:4.

Для проведення досліджень було сформовано три групи: дві піддослідні та одна контрольна. Контрольній групі тварин вводили підшкірно фізіологічний розчин в дозі 2+2см³ (табл. 2). Тваринам дослідної групи, з яких у 50% виявлено копії ДНК провірусу лейкозу, було введено вакцину «Лейкозав» в дозі 2+2см³ (табл. 3).

В дослідній групі сироватка крові 50% тварин не реагувала в РІД, але в крові виявлено від 9,8 тис. до 2,8 млн. копій ДНК-провірусу лейкозу. Через 8 місяців після проведення імунізації вакциною «Лейкозав» у чотирьох корів кількість копій ДНК-провірусу зменшилась в (до щеплення вакциною - 2,3 млн. копій ДНК-провірусу, після щеплення – 4,8 тис. копій ДНК провірусу). В кінці досліду, через 12 місяців, 60% корів цієї групи звільнились від специфічних провірусних антитіл і на основі досліджень за РІД вони були визнані РІД-негативними і вважались здоровими. Отримані експериментальні дані свідчать про те, що вакцина «Лейкозав» впливає оздоровче на інфікованість корів вірусом лейкозу.

У третій групі (9 корів) сироватки крові реагували позитивно в РІД у нативному вигляді та в розведенні 1:2-1:4, а кількість лейкоцитів була в межах 15,5-24,9 Г/л. Корови цієї групи в досліді не приймали участі, їх господарники здали на забій, виконуючи вимоги чинної Інструкції. Наслідки перебування здорових тварин у неблагополучному щодо лейкозу ВРХ стаді подані в таблиці 2.

Таблиця 2

Результати дослідження крові ВРХ на лейкоз, контрольна група (n=4)

№ тварини в групі	Результати досліджень, дати														
	02. 2012					10.2012					2.2013				
	РІД	ПЛР, копій ДНК-провірусу	ПЛР, негативно/ позитивно	ІФА	лейкоцити, Г/л	РІД	ПЛР, копій ДНК-провірусу	ПЛР, негативно/ позитивно	ІФА	лейкоцити, Г/л	РІД	ПЛР, копій ДНК-провірусу	ПЛР, негативно/ позитивно	ІФА	лейкоцити, Г/л
1	-	-	-	+	гемоліз	-	-	-	+	гемоліз	+	920000	+	+	5,0
2	-	-	-	+	16,6	-	-	-	+	16,6	+	5420000	+	+	22,7
3	-	-	-	-	11,0	-	-	-	-	11,0	-	730	+	-	13,7
4	-	-	-	-	гемоліз				-	гемоліз	+	12700000	+	-	26,6
%% позити- вних	-			50		-			50		75		100	50	
%% негати- вних	100		100	50		100			50		25			50	
M±m					6,9±2,3		-		-	6,9±2,3		760182,5± 2312,6			10,4±5 ,8*

З таблиці 2 видно, що в контрольну групу були відібрані корови, які за даними сучасних лабораторних досліджень (РІД, ІФА, ПЛР, гематологічно) були здоровими. Ця група тварин була досліджена і сформована після проведення планових досліджень на лейкоз з вилученням із стада позитивно реагуючих тварин.

Під час перебування тварин контрольної групи в неблагополучному щодо лейкозу стаді впродовж восьми місяців і досліджених двічі за РІД, ІФА, ПЛР та гематологічно, у них не виявили ознак захворювання на лейкоз. Результати досліджень за вказаними тестами були негативними.

Таблиця 3

Результати дослідження крові ВРХ на лейкоз, дослідна група, щеплено вакциною «Лейкозав» (n=10)

№ тварини в групі	Результати досліджень, дати														
	до щеплення					після щеплення									
	02. 2012					10.2012				2.2013					
	РІД	ПЛР, копій ДНК-прівірусу	ПЛР, негативно/позитивно	ІФА	лейкоцити, Г/л	РІД	ПЛР, копій ДНК-прівірусу	ПЛР, негативно/позитивно	ІФА	лейкоцити, Г/л	РІД	ПЛР, копій ДНК-прівірусу	ПЛР, негативно/позитивно	ІФА	лейкоцити, Г/л
1	-	981248	+	+	15,1	-	123	+	-	9,2	-	2230	+	-	8,9
2	-	-	-	+	гемо ліз	-	4020	+	+	12,7	-	4660	+	+	14,5
3	-	-	-	-	14,9	+	10	+	-	8,6	-	9410	+	+	12,8
4	-	56935	+	+	13,3	-	268000	+	+	10,3	-	3004000	+	-	14,9
5	-	-	-	+	35,5	+	556000	+	+	22,2	+	7060000	+	+	32,1
6	-	991800	+	-	10,1	-	128	+	-	10,0	-	23600	+	-	12,5
7	-	-	-	-	15,7	-	359000	+	+	21,0	+	8250000	+	+	21,0
8	-	-	-	+	21,0	+	2410000	+	+	18,9	+	4300000	+	+	26,8
9	-	9603	+	-	13,4	-	1100	+	+	7,5	+	7400000	+	-	13,1
10	-	281248	+	-	15,3	-	207000	+	+	15,8	-	6100000	+	+	20,7
%% негативних			50	50		30		100	20		40		100	60	
%% позитивних	100		50	50		70			80		60			40	
M±m		232083,4 ±1258,7			13,9± 3,4*		380538.1 ±246273, 8			13,62± 1,8**		3615390± 11476242			17,73 ±2,4* **

*P-0,05, ** P-0,01, ***P-0,001

Ознаки захворювання з'явилися упродовж останніх чотирьох місяців проведення дослідю. У трьох тварин контрольної групи кількість копій ДНК-прівірусу була в межах 920 тис. - 12 млн. і лише в однієї корови в крові

виявили всього 730 копій. Ці показники свідчать про те, що спонтанне зараження корів в неблагополучному стаді відбувається через вісім місяців з наростанням копій вірусу. Кількість лейкоцитів підтримується організмом в межах верхньої границі показників норми. Кількість лейкоцитів починає збільшуватись коли кількість вірусу сягає 5-122 млн. копій ДНК-прівірусу лейкозу. Паралельно з показниками збільшення кількості копій ДНК-прівірусу збільшується кількість лейкоцитів (22,7-26,6 Г/л).

Отже, з отриманих даних можна зробити висновок, що перебування здорових тварин у неблагополучному щодо лейкозу стаді впродовж 12 місяців зумовлює спонтанне зараження вірусом лейкозу. Тварини стають хворими за всіма показниками лабораторних досліджень щодо лейкозу. Варто звернути увагу на результати досліджень за ПЛР крові у корови № 3 з контрольної групи. У цієї тварини виявлено всього 730 копій ДНК- прівірусу. Це означає, що ця тварина заразилась недавно і вірус не встиг напрацювати високі показники кількості копій. Результати досліджень із використанням інших лабораторних досліджень були негативними. Отже, вилучення із неблагополучного стада РІД-позитивних тварин не гарантує його оздоровлення від вірусу лейкозу.

Корови 2 групи (10 голів) були щеплені профілактичною дозою вакцини (2+2см³) (табл.3).

З таблиці 3 видно, що за даними лабораторних досліджень, проведених перед щепленням, усі тварини були РІД-негативними, але в крові окремих корів кількість вірусу була в межах від 9603 до 981248 копій ДНК-прівірусу.

Через вісім місяців після щеплення вакциною у чотирьох корів кількість копій вірусу зменшилась у 4 рази, в окремих тварин кількість копій ДНК-прівірусу зменшилась у 8-10 разів. Під кінець досліду 60% тварин цієї групи були здоровими за показниками серологічних досліджень.

Висновки. 1. Видалення із стада РІД-позитивних корів, хворих у продромальній стадії лейкозу, лише стримує активність розвитку інфекційного процесу лейкозу серед чутливих тварин і не сприяє оздоровленню стада у цілому. 2. Після видалення із стада РІД-позитивних тварин, джерелом вірусу лейкозу залишаються в стаді тварини (10-20% загальної кількості тварин в стаді) хворі у латентній стадії перебігу лейкозу, які не виявляються за РІД, ІФА. 3. Під час перебування здорових тварин серед тварин неблагополучного щодо лейкозу стада впродовж 8-12 місяців проходить спонтанне зараження вірусом. 4. Поствакцинальний імунітет, сформований після щеплення вакциною «Лейкозав», активно впливає на зменшення (у 4 рази) кількості копій ДНК-прівірусу в плазмі крові.

Література

1. Мандигра М.С. Лейкоз великої рогатої худоби: розробка та впровадження широкомасштабних протилейкозних заходів у господарствах Львівської області. - М.С. Мандигра. - Львів - Рівне, 1999.- 34с.
2. Нагаєва Л. І. Діагностика та профілактика лейкозу великої рогатої худоби/ Л. І. Нагаєва, С. В. Аранчій //Бібліотека ветер. мед. – К., 2003. – 65 с.

3. Інструкція з профілактики та оздоровлення великої рогатої худоби від лейкозу /Затверджено наказом Державного комітету ветеринарної медицини України 21.12.2007р. № 21. Зареєстровано в Міністерстві юстиції України 11.01.2008р. за № 12/14703.

4. Кісера Я.В. Серологічні методи діагностики лейкозу великої рогатої худоби/Я.В. Кісера // Науковий вісник ЛАВМ імені С.З. Гжицького.- Т.-14. - №3 (53).- Ч.-1.-Львів, 2012.-с. 89-92.

5. Нагаєва Л. І. Діагностика та профілактика лейкозу великої рогатої худоби/ Л. І. Нагаєва, С. В. Аранчій, В. А. Синицин [та ін.]. – К., 2003. – 64 с.

6. Завірюха Г.А. Випробування вакцини «Лейкозав» проти лейкозу великої рогатої худоби на вівцях / Г.А. Завірюха, С.М. Дзюба, А.І. Завірюха/ Ветеринарна біотехнологія. - К. :Аграрна наука, 2002. - №2.- С.73-82.

7. Завірюха Г.А. Вплив вакцини «Лейкозав» на організм хворих лейкозом корів на різних стадіях розвитку інфекції / Г.А. Завірюха, С.М. Дзюба, А.І. Завірюха // Ветеринарна біотехнологія. - К.:Аграрна наука, 2004.- №5.- С.23-33.

8. Завірюха Г.А. Формування імунітету у корів, щеплених вакциною «Лейкозав», в умовах епізоотичного експерименту та його вплив на оздоровлення від лейкозу / Г.А. Завірюха // Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб. - Х., 2009. - № 92.- С.203-207.

9. Инструкция по применению тест-системы «ЛЕЙКОЗ» для выявления вируса лейкоза крупного рогатого скота (КРС) методом полимеразной цепной реакции - ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.- Москва. – 2009. – 19 с.

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

11. Гриневич О.Й. Кількісне визначення ДНК провірусу лейкозу великої рогатої худоби – як метод оцінки інфікованості тварин/О.Й. Гриневич, І.Г. Маркович, І.В. Поліщук // Ветеринарна медицина України. – 2013. – №05 (207). - С. 14-16.

Summary

Zaviruha G.A., Polechuk I.V., Afanaseva K. V., Burlakova N.O.
CHANGES IN THE POPULATION OF LEUKEMIA RETROVIRUS IN THE BLOOD OF SICR COWS AFTER IMMUNIZATION LEYKOZAV

*In the article is presented the results of studying the influence of post-vaccination immunity to changes in the population of retrovirus bovine leukemia in the blood plasma of RIA positive animals. **Key words:** cattle, leukemia, immunization, vaccine.*

Рецензент – к.вет.н., доцент Калініна О.С.