

Научная статья

УДК 619:616.155.392(470.55/.57)

Верификация методов диагностического тестирования при лейкозе хозяйств Оренбуржья

**Ирина Сергеевна Пономарёва, Рахима Мукташевна Нурғалиева,
Анастасия Михайловна Вязикова, Анна Сергеевна Гостюшкина**
Оренбургский ГАУ

Аннотация. В статье представлены результаты исследований по диагностике гемобластоза у крупного рогатого скота. Лейкоз является болезнью, поражающей органы кроветворной системы. Характеризуется патологически усиленной пролиферацией лимфоидных клеток и появлением злокачественных образований в кроветворных и других органах и тканях. Цель исследования – оценка эпизоотической ситуации и верификация различных методов диагностики для раннего выявления инфицированности вирусом лейкоза крупного рогатого скота. Анализ показателей эпизоотической ситуации проведён на основании статистических данных ветеринарных организаций Оренбургской области за период с 2010 по 2020 г. Установлено, что показатели интенсивности эпизоотического процесса характеризуются снижением уровня инфицированности вирусом лейкоза в 1,8 раза; превалентность составила в среднем по области $1,12 \pm 0,91$ % при отрицательной динамике темпов прироста. Скрининговые исследования методом реакции иммунодиффузии (РИД) позволили выявить наличие антител к ВЛКРС в биоматериалах на 17,0 % меньше, чем при исследовании методом ПЦР. Методом прямого обнаружения фрагментов ДНК возбудителя лейкоза крупного рогатого скота с помощью молекулярно-генетических исследований выявлено инфицированных животных до РИД-позитивности в 2,1 раза больше. Показано, что диагностические системы на основе РИД не позволяют выявить трансмиссии и распространение вируса лейкоза в категории ранее 6-месячного возраста, полимеразная цепная реакция как высокоточный метод позволяет обнаружить возбудителя на ранних стадиях заболевания.

Ключевые слова: лейкоз, инфекционный процесс, диагностическое тестирование, иммунологические, гематологические исследования, реакция иммунодиффузии (РИД), полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Для цитирования: Верификация методов диагностического тестирования при лейкозе хозяйств Оренбуржья / И.С. Пономарёва, Р.М. Нурғалиева, А.М. Вязикова [и др.] // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2021. № 1 (87). С. 196–200.

Original article

Verification of diagnostic testing methods with leukemia in the Orenburg region

Irina S. Ponomareva, Rakhima M. Nurgalieva, Anastasia M. Vyazikova, Anna S. Gostyushkina
Orenburg State Agrarian University

Abstract. The article presents the results of studies on the diagnosis of hemoblastosis in cattle. Leukemia is a disease that affects the organs of the hematopoietic system. It is characterized by pathologically enhanced proliferation of lymphoid cells and the appearance of malignant formations in the hematopoietic and other organs and tissues. The aim of the study is to assess the epizootic situation and verify various diagnostic methods for the early detection of infection with the bovine leukemia virus. The analysis of indicators of the epizootic situation was carried out on the basis of statistical data of veterinary organizations of the Orenburg region for the period from 2010 to 2020. It was found that the indicators of the intensity of the epizootic process are characterized by a decrease in the level of infection with the leukemia virus by 1.8 times; the prevalence averaged over the region 1.12 ± 0.91 % with negative growth rates. Screening studies by the method of immunodiffusion reaction (RID) revealed the presence of antibodies to BLV in biomaterials by 17.0 % less than in the study by PCR. By the method of direct detection of DNA fragments of the causative agent of bovine leukemia using molecular genetic studies, infected animals were identified up to RID-positivity 2.1 times more. It has been shown that diagnostic systems based on RID do not allow detecting transmission and spread of the leukemia virus in the category earlier than 6 months of age; polymerase chain reaction as a high-precision method allows detecting the pathogen in the early stages of the disease.

Keywords: leukemia, infectious process, diagnostic testing, immunological, hematological studies, immunodiffusion reaction (RID), polymerase chain reaction (PCR).

For citation: Verification of diagnostic testing methods with leukemia in the Orenburg region / I.S. Ponomareva, R.M. Nurgalieva, A.M. Vyazikova et al. *Izvestia Orenburg State Agrarian University*. 2021; 87(1): 196–200. (In Russ.).

Инфекционная патология хронической этиологии в настоящее время становится наиболее сложной проблемой эпизоотологической науки и практики. Лейкоз коров играет ведущую роль в структуре инфекционных болезней крупного рогатого скота [1].

Лейкоз вызывает злокачественное поражение органов кроветворения, наносит большой экономический ущерб. В настоящее время наука и практика не располагают терапевтическими и специфическими биопрепаратами для эффективного применения в условиях эпизоотического неблагополучия. Среди болезней заразной этиологии у крупного рогатого скота в РФ на гемобластоз приходится примерно 40 %. Эта динамика наблюдается в течение последних десятилетий. В рамках государственной программы развития сельского хозяйства Минсельхоз России ежегодно закупает за счёт средств федерального бюджета наборы для диагностики лейкоза [2].

Идентичность результатов, полученных с помощью реакции иммунной диффузии (РИД) и полимеразной цепной реакции (ПЦР), составляет в интервале от 30 до 100 % случаев. Если РИД-диагностика ориентирована на выявление антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), т.е. затрагивает реакцию организма в ответ на наличие ВЛКРС, то ДНК-диагностика позволяет выявлять собственную провирусную ДНК ВЛКРС вне зависимости от реакции организма на инфекцию. Сопутствующие заболева-

ния, стельность могут также оказывать влияние на результаты РИД-исследований. Каждый из используемых методов анализа (РИД и ДНК-анализ) имеет свои преимущества и недостатки [3, 4]. Использование комбинированной РИД/ПЦР-диагностики более чем в два раза ускоряет процесс оздоровления стада от лейкоза, чем использование только РИД-диагностики [5].

В современных условиях иммунологические методы исследований сыворотки крови на лейкоз крупного рогатого скота ориентированы на выявление антител gp51. Течение инфекционного процесса характеризуется вариабельностью титра и спектра иммуноглобулинов. На разных стадиях развития иммунитета при лейкозе крупного рогатого скота спектр свободно циркулирующих в сыворотке крови антител меняется. Данный факт свидетельствует о недостаточной эффективности серологических методов, основанных на выявлении антител только против одного антигена [6].

Планомерная работа по введению здорового поголовья и изолированное содержание РИД+ приводят к существенному снижению вновь выявленных вирусносителей и больных животных. Такая борьба с вирусом лейкоза в хозяйстве, хоть и показывает положительную динамику искоренения вирусносителей и больных животных, имеет и определённые трудности. Необходимо наличие свободных помещений для изоляции животных, специального рабочего персонала, задействованного на работе только с чистым от

вируса лейкоза поголовьем, а также инвентаря и других средств содержания и обслуживания животных. Это несёт дополнительную нагрузку на животноводческое хозяйство и экономические показатели производства продукции животноводства. В свою очередь эти проблемы вызывают необходимость изыскивать современные научные пути решения оздоровления лейкозного поголовья. Поэтому разработка и совершенствование мероприятий по борьбе с лейкозом крупного рогатого скота является значимой и актуальной темой в животноводстве [7].

Г.А. Симонян (2008) убеждён, что успешная борьба с любым инфекционным заболеванием находится в прямой зависимости от знания причин возникновения болезни, наличия достоверных методов ранней диагностики, выяснения истинной эпизоотической ситуации и, как следствие, разработки и внедрения научно обоснованных методов её искоренения [8].

Уровень инфицированности скота в Оренбуржье составляет около 30 %. Поэтому представляются актуальными дальнейшие поиски решения эпизоотологических проблем в данной области, которые должны основываться на принципиально новых мировоззрениях и подходах. ПЦР как высокоразрешающий вариант прямой микробиологической диагностики очень перспективна для таких целей [9–11].

Цель исследования – оценка эпизоотической ситуации и верификация различных методов диагностики для раннего выявления инфицированности вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС).

Материал и методы. Анализ показателей эпизоотической ситуации проводили по методу И.А. Бакулова с соавт. (1979) на основании статистических данных ветеринарных организаций (УВ Оренбургской области, ветеринарных лабораторий области) за период с 2010 по 2020 г. Для гематологических исследований кровь отбирали из яремной вены, с применением системы Vacutainer (пробирки сенсibiliзирoванные активатором свёртывания и антикоагулянтom). Проведение полимеразной цепной реакции осуществляли сорбционным способом в геле (горизонтальный электрофорез) (1,5 %), применялся набор для диагностики лейкоза (ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва, Россия), маркёр молекулярных масс: GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas). Для диагностики лейкоза методом РИД применяли стандартный набор.

Биометрическая обработка результатов исследования проводилась с применением программного обеспечения Stat Plus 2008 Professional.

Результаты исследования. Лейкоз является болезнью, поражающей органы кроветворной системы. Характеризуется патологически уси-

ленной пролиферацией лимфоидных клеток и появлением злокачественных образований в кроветворных и других органах и тканях. Динамика инфицированности и превалентности по результатам иммунологических и гематологических исследований в Оренбургской области за исследуемый период характеризуется положительно. Уровень инфицированности снизился в 1,8 раза. Темпы роста составили 56,8 %, при отрицательной динамике темпов на уровне 43,2 %. Превалентность у коров составила в среднем по области $1,12 \pm 0,91$ %, темпы роста – 0,9 %, при отрицательной динамике темпов прироста на уровне 99,1 %.

Корреляция между количеством инфицированного поголовья и гематологически позитивного сильной степени положительная ($r = +0,98$). Стационарность болезни и возможность циркуляции вируса обусловлены передержкой инфицированных животных в стаде и сущностью методов диагностики.

В регионе неблагополучие установлено в 80-х гг. прошлого столетия. Для диагностики лейкоза ветеринарными лабораториями области проводятся гематологические исследования проб крови и иммунологические: иммуноферментный анализ сыворотки крови при племпродажах и реакция иммунодиффузии в рамках плановых диагностических мероприятий (ИФА и РИД). Преимущество реакции иммунодиффузии – в простоте исполнения и отсутствии зависимости результата исследований от качества сыворотки. Полимеразная цепная реакция (ПЦР), основанная на достраивании ДНК матрицы, обладает высоким уровнем идентификационной способности микроорганизмов. Проведённые нами исследования методом ПЦР позволили обнаружить вирусспецифическую последовательность в ДНК лимфоцитов у 33 % животных (рис. 1).

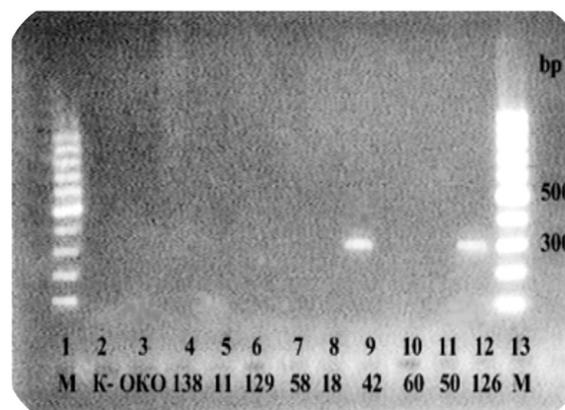


Рис. 1 – Электрофореграмма продуктов ПЦР: М – маркёр молекулярных масс; К – отрицательный контроль; ОКО – отрицательный контрольный образец. Дорожки № 9, 12 – специфический продукт реакции, размером 294 bp

На рисунке 1 представлена электрофореграмма продуктов ПЦР. При положительном результате видны яркие специфические светящиеся полосы на геле на уровне 294 п.н. (количество ДНК в продуктах ПЦР) и полосы внутреннего контроля (известная последовательность ДНК в реакционной смеси) на уровне 582 п.н. (ген альфа-актина крупного рогатого скота).

Результаты исследования сыворотки крови в реакции иммунодиффузии (рис. 2) показали, что РИД-положительных животных было на 17,0 % меньше, чем при исследовании методом ПЦР. Фактическое несоответствие результатов тестирования в РИД и ПЦР вполне объяснимо целевыми возможностями, технической сущностью этих методов. В соответствии с существующими представлениями диагноз на лейкоз крупного рогатого скота устанавливается на основе РИД-положительности у животных старше 6 месяцев. К данному периоду постнатального периода в условиях инфекционного процесса количество антител достигает уровня, необходимого для индикации иммунологическим методом реакцией иммунодиффузии.



Рис. 2 – Линии преципитации, образованные гомологичными антителами и антигенами:
1 – контроль; 2 – положительная проба

Метод иммунодиффузии является качественной реакцией, позволяющей оценить наличие или отсутствие антител к специфическому возбудителю по дихотомическому принципу в условиях *in vitro*. Также не представляется возможным осуществление мониторинга динамики уровня инфицированности поголовья и распространения ретровируса среди животных до 6 месяцев. И напротив, применение полимеразной цепной реакции, как метода прямого обнаружения фрагментов ДНК, – высокоэффективно. Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что контроль над эпизоотической ситуацией и регулирование интенсивности проявления эпизоотического процесса при лейкозе крупного рогатого скота существенно возрастают.

Выводы

1. Показатели интенсивности эпизоотического процесса характеризуются снижением уровня инфицированности вирусом лейкоза в 1,8 раза; превалентность составила в среднем по области $1,12 \pm 0,91$ % при отрицательной динамике темпов прироста.

2. Скрининговые исследования методом реакции иммунодиффузии (РИД) позволили выявить наличие антител к ВЛКРС в биоматериалах на 17,0 % меньше, чем при исследовании методом ПЦР.

3. Методом прямого обнаружения фрагментов ДНК возбудителя лейкоза крупного рогатого скота с помощью молекулярно-генетических исследований выявлено инфицированных животных до РИД-положительности в 2,1 раза больше.

Литература

- Смирнов Ю.П., Суворова Л.И. Некоторые гематологические показатели у коров в бессимптомной стадии развития лейкозного процесса // Ветеринарная патология. 2009. № 1 (28). С. 26–29.
- Боровой В. Проблемы профилактики и ликвидации лейкоза крупного рогатого скота на территории РФ: по итогам круглого стола XVI Российской агропромышленной выставки «Золотая осень» // Farm Animals. 2015. № 1. С. 30–37.
- Ковалюк Н.В. Молекулярно-генетические аспекты в селекции и ранней диагностике лейкоза крупного рогатого скота: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Дубровицы, 2008. 32 с.
- Detection of avian leukosis virus (ALV) / A. Mohammadi [et al.] // Jranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University, 2008. Vol. 9. P. 245–249.
- Макаров В.В., Гринишин Д.П. ПЦР в диагностике лейкоза крупного рогатого скота // Ветеринария. 2005. № 4. С. 9–11.
- Якупов Т.Р. Новые подходы в диагностике лейкоза крупного рогатого скота // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. 2010. Вып. № 5. Т. 204. С. 342–347.
- Зубова Т.В., Плешков В.А., Миронов А.Н. Современные методы и опыт борьбы с лейкозом крупного рогатого скота // В мире научных открытий. 2018. Т. 10. № 5. С. 119–131.
- Симонян Г.А. Эффективный и безущербный метод борьбы с лейкозом крупного рогатого скота // Материалы междунар. конф., посвящённой 80-летию Самарской НИВС Россельхозакадемии. Самара, 2008. С. 413–416.
- Пономарёва И.С. Показатели эпизоотической ситуации по лейкозу коров на Южном Урале и система профилактических мер // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2010. № 1 (25). С. 165–166.
- Полимеразная цепная реакция в диагностике лейкоза КРС при оздоровлении хозяйств Оренбуржья / Пономарёва И.С. и [др.]. // Ветеринарная патология. 2009. № 1 (28). С. 60–64.
- Приказ Минсельхозпрода РФ от 11 мая 1999 г. № 359 «Об утверждении Правил по профилактике и борьбе с лейкозом крупного рогатого скота»

Ирина Сергеевна Пономарёва, доктор биологических наук, доцент. ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный аграрный университет». Россия, 460014, г. Оренбург, ул. Челюскинцев, 18, konponir@mail.ru

Нургалиева Рахима Мукташевна, кандидат ветеринарных наук, доцент. ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный аграрный университет». Россия, 460014, г. Оренбург, ул. Челюскинцев, 18, sycheva_maria@mail.ru

Вязикова Анастасия Михайловна, соискатель. ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный аграрный университет». Россия, 460014, г. Оренбург, ул. Челюскинцев, 18, Vet_fac@mail.ru

Гостюшкина Анна Сергеевна, соискатель. ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный аграрный университет». Россия, 460014, г. Оренбург, ул. Челюскинцев, 18, Vet_fac@mail.ru

Irina S. Ponomareva, Doctor of Biology, Associate Professor. Orenburg State Agrarian University. 18, Chelyuskintsev St., Orenburg, 460014, Russia, konponir@mail.ru

Rakhima M. Nurgalieva, Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor. Orenburg State Agrarian University. 18, Chelyuskintsev St., Orenburg, 460014, Russia, sycheva_maria@mail.ru

Anastasia M. Vyazikova, research worker. Orenburg State Agrarian University. 18, Chelyuskintsev St., Orenburg, 460014, Russia, Vet_fac@mail.ru

Anna S. Gostyushkina, research worker. Orenburg State Agrarian University. 18, Chelyuskintsev St., Orenburg, 460014, Russia, Vet_fac@mail.ru