

На правах рукописи

ДЖАКАИТ ДЖУЛИЕТ АКАМУРАН

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ  
ДИАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗА И ТУБЕРКУЛЕЗА  
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология  
с микотоксикологией и иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Казань – 2018

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

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

**Официальные оппоненты:** **Фаизов Тахир Хадиевич** - доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий лабораторией биохимии и молекулярно-генетического анализа ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»

**Шуралев Эдуард Аркадьевич** – кандидат ветеринарных наук, доцент, доцент кафедры прикладной экологии Института экологии и природопользования ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет»

**Ведущая организация:** ФГБНУ «Уральский научно-исследовательский ветеринарный институт»

Защита состоится «14» июня 2018 года в «14<sup>00</sup>» часов на заседании диссертационного совета Д 220.034.01 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э.Баумана» по адресу: 420029, г. Казань, Сибирский тракт, 35.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э.Баумана» и на сайтах <http://www.vak.ed.gov.ru> и [www.ksavm.senet.ru](http://www.ksavm.senet.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

Г. Р. Юсупова

## 1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Наиболее часто встречающимися хроническими инфекциями в животноводстве являются лейкоз и туберкулез крупного рогатого скота. Они представляют собой важные проблемы как в ветеринарии и животноводстве, так и в экологии и биологии в целом. Своевременная и четкая диагностика является основой оздоровительных и профилактических мероприятий в борьбе с этими инфекциями.

Широкая распространенность, а также отсутствие средств профилактики и терапии определяют актуальность научных исследований в борьбе с лейкозом крупного рогатого скота (Амироков М.А и др., 2007; Гулюкин М.И и др., 2000, 2002; Донник И.М и др., 2005; Смирнов А.М., 2005; и др.).

Основным и общепринятым методом диагностики туберкулеза крупного рогатого скота является внутрикожная проба с применением ППД-туберкулина для млекопитающих. Главным недостатком данного метода является проблема неспецифических реакций. Поэтому, усовершенствование существующих и разработка новых методов диагностики туберкулеза животных является не менее актуальной задачей ветеринарной науки.

Результаты научных исследований, направленные на совершенствование методов, диагностики являются основой для создания современных высокоспецифичных методов выявления животных инфицированных возбудителями лейкоза и туберкулеза и для организации наиболее достоверной системы мер борьбы с этими опасными инфекционными болезнями.

**Степень разработанности темы.** На сегодняшний день единственным и наиболее эффективным методом борьбы с лейкозом крупного рогатого скота является его ранняя диагностика, изоляция и методичная выбраковка больных животных с последующим формированием свободного от вируса лейкоза стада. В ветеринарной науке большое внимание уделяется разработке высокочувств-

ительных методов прижизненной диагностики лейкоза крупного рогатого скота, исследованиям по изучению закономерностей и особенностей инфекционного процесса (Бусол В.А и др.,1999; Верховский О.А. и др., 2002; Гулюкин М.И. и др., 2002, 2005, 2007; Донник И.М. и др., 2009, 2010; Смирнов А.М., 2005).

Возможность и необходимость применения иммунологических методов для диагностики лейкоза крупного рогатого скота, как наиболее чувствительных в сравнении с клинико-гематологическими исследованиями, были показаны многими исследователями (Кумков В.Т. и др.,1979; Смирнов П.Н., 1991;.Miller J.M and Olson, 1972; S. Chander, 1976).

Ветеринарная практика нашей страны располагает большим количеством средств и методов для эффективной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота. По диагностике туберкулеза крупного рогатого скота ветеринарная наука проделала большой и сложный путь постоянного ее совершенствования. В изучение эпизоотологии, диагностики и ликвидации туберкулеза сельскохозяйственных животных огромный вклад внесли такие ученые как Донченко А.С и др.(2004, 2008), Калмикова М.С.(2007), Данко Ю.Ю. (2009), Шуралев Э.А В.Г.Ощепков (2001), А.Х. Найманов (2006, 2009 Di Marco et al. (2012), Faye S et al (2011) и другие.

Особое внимание уделяется разработке иммунологических методов диагностики туберкулеза. 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 (Лысенко А.П, 1987; ЯкуповТ.Р., 2011).

**Цели и задачи исследований.** Цель - усовершенствование иммунохимических методов диагностики туберкулеза и лейкоза крупного рогатого скота. В соответствии с целью решались следующие задачи:

1. Определить диагностическую ценность ИФА и РИД при изучении эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в хозяйствах РТ;
2. Изыскать способы повышения чувствительности иммуноферментного анализа в диагностике лейкоза крупного рогатого скота;
3. Разработать способ получения антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота, обеспечивающего индикацию антител к ВЛКРС во всех стадиях развития инфекционного процесса;
4. Изучить антигенную структуру полученных препаратов и антителигенез у крупного рогатого скота к различным его компонентам;
5. Разработать дот-блот ИФА тест-системы для выявления антител к микобактериям туберкулеза и к вирусу лейкоза крупного рогатого скота;
6. Изучить возможности разработанных тест-систем в скрининговых исследованиях для выяснения эпизоотической ситуации в хозяйствах по туберкулезу и лейкозу крупного рогатого скота.

**Научная новизна.** Впервые разработан способ получения антигенов вируса лейкоза крупного рогатого скота, обеспечивающих более полное выявление противолейкозных антител в сыворотках крови крупного рогатого скота, инфицированных вирусом лейкоза, методом иммуноферментного анализа («Способ получения антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота» - патент на изобретение РФ №2564007).

Впервые разработаны тест-системы на основе дот-блот анализа для обнаружения антител к ВЛКРС и микобактериям туберкулеза крупного рогатого скота. Доказана высокая информативность термообработки проб сыворотки крови как способ повышения чувствительности ИФА при выяснении эпизоотической ситуации хозяйств по лейкозу крупного рогатого скота.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Разработанная методика получения антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота из сыворотки крови больных лейкозом коров позволяет создать

иммунохимические тест-системы для прижизненной диагностики лейкоза крупного рогатого скота.

Изучение структуры антигена ВЛКРС, выделенного из крови больных лейкозом коров методом электрофореза и иммуноблот анализа, позволяет идентифицировать различные белковые фракции вируса, что дает возможность изменить подходы к разработке тест-систем для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота.

Разработанные тест-системы на основе дот-блот ИФА для обнаружения антител к микобактериям туберкулеза и вирусу лейкоза крупного рогатого скота позволяют проводить массовые скрининговые исследования животных на лейкоз и туберкулез крупного рогатого скота в полевых условиях для выяснения эпизоотической ситуации в хозяйствах по этим инфекциям.

Результаты научных исследований апробированы в хозяйствах различных районов РТ. На основе результатов исследований подготовлены методические рекомендации по выявлению противолейкозных антител методом иммуноферментного анализа и дот-блот иммуноферментного анализа с использованием антигена из местных штаммов возбудителя, утвержденные НТС ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ протокол № 8 от 18 октября 2017 г.

**Методология и методы исследования.** Методологические подходы основаны на актуальности, целях и задачах исследований, анализа данных отечественных и зарубежных публикаций по теме диссертации и результатов собственных исследований. В работе использованы биохимические, серологические и иммунологические методы исследований. Подробное описание методологии и методов проведения исследований отражено в главе «Материалы и методы исследований». Для исследования использовали пробы крови и сывороток крови крупного рогатого скота из благополучных и неблагополучных по лейкозу и туберкулезу хозяйств Республики Татарстан.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Иммуноферментный анализ (ИФА) - эффективный тест в диагностике лейкоза крупного рогатого скота;
2. Белковые фракции ВЛКРС из сыворотки крови больных лейкозом коров в иммунологических реакциях обеспечивают выявление специфических антител на разных стадиях болезни;
3. Тест-система дот-блот ИФА по чувствительности и специфичности не уступают классическим методам ИФА и пригодны для скрининговых исследований по выяснению эпизоотической ситуации в хозяйствах по туберкулезу и лейкозу крупного рогатого скота.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов исследований, основных положений и научных выводов диссертации подтверждена фактическими данными, полученными на большом количестве анализированных проб. Проведена статистическая обработка цифрового материала с использованием программы Microsoft Excel 2007, достоверность различий сравниваемых показателей оценивали по порогам вероятности. Основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на международных научно – практических конференциях: «Актуальные вопросы зоотехнии и ветеринарной медицины: опыт, проблемы и пути их решения», посвященной 85-летию зоотехнического образования в КГАВМ (Казань, 2015); «Фундаментальные и прикладные проблемы медицины и биологии» (ОАЭ Дубай, 2015); «Современные проблемы ветеринарной и аграрной науки и образования» посвященной 150-летию образования государственной ветеринарной службы России (Казань, 2016); «Инновационные решения в ветеринарной медицине, зоотехнии и биотехнологии в интересах развития агропромышленного комплекса» (Казань, 2017); «Наука в современном информационном обществе» (North Charleston, USA, 2017).

**Публикация материалов исследований.** По материалам диссертационной работы опубликованы 8 научных работ, в том числе 1 патент, 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

**Объём и структура диссертации.** Диссертация изложена на 112 страницах стандартного компьютерного текста, содержит 15 таблиц и 9 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, основного содержания работы, заключения, практических предложений, и приложения.

Библиографический список литературы включает 227 источников, в том числе 137 иностранных.

## 2 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 2.1 Материалы и методы исследований

Исследования по теме диссертации проводились в 2014-2017 годы на кафедре биологической и органической химии ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана» и в ГБУ «Республиканская ветеринарная лаборатория» РТ (г. Казань).

Таблица 1 - Объём проведенных исследований

Метод исследований	Количество проб
Иммуноферментный анализ (ИФА) для обнаружения антител к ВЛКРС в сыворотке крови крупного рогатого скота	2439
Реакция иммунодиффузии в агаровом геле (РИД) для обнаружения антител к ВЛКРС в сыворотке крови крупного рогатого скота	2307
Иммуноферментный анализ (ИФА) для выявления антител к ВЛКРС в сыворотке крови крупного рогатого скота	197
Проведение дот-блот ИФА для обнаружения антител к ВЛКРС в сыворотке крови крупного рогатого скота	220
Проведение дот-блот ИФА для выявления антител к M.bovis в сыворотке крови крупного рогатого скота	121
Иммуноблот анализа	40
<b>ВСЕГО ПРОБ</b>	<b>5324</b>

**Постановка ИФА.** Иммуноферментный анализ для выявления специфических антител к ВЛКРС и микобактериям туберкулеза использовали в непрямом варианте на полистироловых планшетах для иммуноферментных реакций (производства «Медполимер» (г.Санкт-Петербург)) по методу описанному Woller et al. (1976).

Изучение эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в хозяйствах разных районов РТ проводили методом ИФА с применением «Набора для выявления антител к ВЛКРС в сыворотке крови и молоке крупного рогатого скота», производства ФКП «Курская биофабрика». Учет результатов реакции проводили согласно инструкции диагностических наборов.

**Постановка РИД.** Реакцию иммунодиффузии в агарозном геле (РИД) для диагностики лейкоза крупного рогатого скота ставили согласно наставлению по применению «Набора для серодиагностики лейкоза крупного рогатого скота» производства ФКП «Курская биофабрика». Учет результатов проводили согласно инструкциям диагностических наборов.

**Получение антигена вируса лейкоза из сывороток крови больных лейкозом коров.** При выделении белковых фракции ВЛКРС из сывороток крови больных лейкозом коров исходили из того, что вирусные частицы в основном содержатся в составе циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). Методику разрабатывали с учетом необходимости диссоциации циркулирующих иммунных комплексов и освобождения от сывороточных антител и всех остальных белков. Для получения антигена ВЛКРС из сывороток крови больных лейкозом коров, условно выделили 3 основные стадии:

1. Выделение ЦИК. Иммунные комплексы из сыворотки крови выделяли методом преципитации в ПЭГ-6000 (полиэтиленгликоле). Для этого смешивали сыворотку крови с 6% раствором полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000) в 0,1М боратном буфере (рН-8,8) в соотношении 1:1, перемешивали и инкубировали 24 часа при +4°C. По истечении этого времени преципитат осаждали центрифугированием при

3000 об./мин. в течение 10 минут. Супернатант сливали, а осадок растворяли в 5-ти кратном объеме 3% раствора ПЭГ-6000 в боратном буфере и вновь центрифугировали в тех же условиях (промывка).

2. Диссоциация ЦИК и удаление глобулинов. Полученный осадок, содержащий ЦИК с компонентами вируса, растворяли в 3-х кратном объеме дистиллированной воды и выдерживали, периодически перемешивая, при 60<sup>0</sup>С в течение 1 часа. По истечении этого времени пробу смешивали равным объемом насыщенного раствора сульфата аммония, осторожно перемешивали в течение 2-3 минут при 60<sup>0</sup>С и центрифугировали при 3000 об./мин. в течение 10 минут.

3. Выделение и очищение антигенного препарата. Надосадочную жидкость осторожно отделяли и диализировали при комнатной температуре в течение 48 часов против дистиллированной воды. Диализат фильтровали через бумажный фильтр и концентрировали (не менее в 10 раз) против силикагеля L 100/250 для хроматографии.

Изучение антигенной структуры специфических антигенных компонентов ВЛКРС в полученном антигенном препарате проводили методом электрофореза.

**Электрофоретическое фракционирование антигена ВЛКРС.** Дискэлектрофорез белковых фракций ВЛКРС осуществляли по методике, описанной Laemli (1970) в пластинчатом полиакриламидном геле (ПААГ) с применением додецилсульфата натрия - как детергента и β меркаптоэтанола - как восстановителя разрыва по S-S связям.

**Постановка иммуноблотинга.** Перенос белков фракционированных в ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли по способу описанному Towbin et al (1989). Электроперенос проводили в течение 2,5 часа при напряжении 100 V и силе тока 100 mA на пластинку с охлаждением посредством хладагентов (CoolpackMC-3 laminarmedca).

Учет реакции проводили визуально и инструментально при помощи оптического сканирования и денситометрирования по интенсивности окрашивания с

использованием компьютерной программы Image master. Для изучения спектра противолейкозных антител в испытуемых пробах сывороток крови крупного рогатого скота применяли метод иммуноблот анализа на тест-системе «NEWLAVBLOT» фирмы BioRad (США).

## 2.2 Результаты собственных исследований

### 2.2.1 Иммуноферментный анализ в диагностике лейкоза крупного рогатого скота

Отличительным признаком ВЛКРС-инфекции является образование специфических антител, которые сохраняются в инфицированном организме до конца жизни. Следовательно, серологические методы являются основой для прижизненной диагностики лейкоза крупного рогатого скота.

В целях сравнительного изучения эффективности ИФА и РИД в диагностике лейкозе крупного рогатого скота исследовали 2073 проб сывороток крови, полученные из хозяйств разных районов РТ. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Результаты ИФА и РИД для выявления антител к ВЛКРС в сыворотках крови крупного рогатого скота

№ п/п	Район	Всего проб	РИД		ИФА	
			Полож.	%	Полож.	%
1.	Дрожжановский	18	6	33,3	8	44,4
2.	Рыбно-Слобод.	362	89	24,6	119	32,9
3.	Атнинский	546	1	0,2	16	3,0
4.	Тюлячинский	343	163	47,5	188	54,8
5.	Лаишевский	99	3	3,0	7	7,0
6.	Высокогорский	184	-	-	4	2,2
7.	Актанышский	230	54	23,5	102	44,3
8.	Менделеевский	174	2	1,1	18	10,3
9.	Кировский	14	-	-	-	-
10.	Сабинский	11	-	-	-	-
11.	Алькеевский	92	30	32,6	58	63,0
ВСЕГО		2073	348	16,8	520	25,1

По данным таблицы видно, что инфицированность крупного рогатого скота вирусом лейкоза в исследованных районах по результатам РИД и ИФА составляет 16,8% и 25,1% соответственно. Высокая инфицированность крупного рогатого скота ВЛКРС по результатам ИФА выявлена в хозяйствах Алькеевского района. В Кировском районе г. Казани и в Сабинском районе животных инфицированных ВЛКРС не обнаружены. Это возможно из-за того, что пробы сыворотки крови были получены только от коров частного сектора. В таких районах как Атнинский, Лаишевский, Высокогорский и Менделеевский, которые считались благополучными по лейкозу крупного рогатого скота, методом ИФА установлена инфицированность животных вирусом лейкоза до 10,3%. Результаты исследований подтвердили более высокую чувствительность иммуноферментного анализа. 172 пробы отрицательные в РИД, в ИФА показали положительные результаты.

При анализе полученных результатов по видам хозяйств и по физиологическим группам животных, установлено, что лейкоз широко распространен в агропромышленных предприятиях и более часто встречается у молочных коров и телят. Инфицированность животных в агропредприятиях по результатам РИД составляла 16,7%, а по ИФА - 25,1%. Инфицированность молочных коров и телят до 1-го года в РИД составляла 15,6 и 25,6%, в ИФА 24,8% и 27,6% соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о более высокой эффективности ИФА в выяснении эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в хозяйствах по сравнению с РИД.

### **2.2.2 Влияние термической обработки проб сыворотки крови на чувствительности ИФА при диагностике лейкоза крупного рогатого скота**

При хронических инфекциях, вызванных вирусами семейства Retroviridae, а также при персистентных инфекциях, в биологических жидкостях организма или на поверхности клеток появляются иммунные комплексы «антиген-антитело».

Согласно исследованиям, проведенным Митиным Ю.А. (1997), подобные иммунные комплексы выделенные из сыворотки крови, обладают низкой температурной устойчивостью и могут разрушаться в диапазоне от +38°C до +40°C (время инкубации от 30 минут до 2-х часов).

Циркулирующие иммунные комплексы выделяли из сыворотки крови инфицированных ВЛКРС коров, растворяли в физиологическом растворе и изучали их активность в ИФА. Комплексы разбивали с предварительной инкубацией проб при 60°C в течение 1 часа. Титры «связанных» анти-ВЛКРС антител в пробах достигали до 1:1024.

На следующем этапе наших исследований, пробы сывороток крови исследовали в ИФА до и после их инкубирования при 60°C в течение 1 часа. Всего исследовано 201 проба сывороток крови коров из неблагополучных по лейкозу хозяйств. Предварительно все пробы были анализированы в РИД. Результаты исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Результаты исследования температурного воздействия на титр антител в иммуноферментном анализе при лейкозе крупного рогатого скота

№ п/п	Хозяйства	Всего проб	РИД		ИФА без инкубации проб		ИФА с инкубацией проб	
			Полож.	Отр.	Полож.	Отр.	Полож.	Отр.
1.	Агрофирма «Кама Агро»	109	24	85	49	60	52	57
2.	ООО «Серп и Молот»	92	-	92	2	90	5	87

Из таблицы 3 видно, что количество положительных проб в ИФА до и после их инкубации по сравнению с РИД значительно увеличилось. Из 85 отрицательно реагирующих в РИД проб полученных от животных агрофирмы «Кама Агро», 28 реагировали положительно в ИФА (25 проб в ИФА без инкубации и еще 3 пробы в ИФА после инкубации). Из 92 отрицательно реагирующих в РИД проб полученных от коров и телок хозяйства ООО «Серп и Молот» -2 стали

положительными в ИФА до инкубации и дополнительно 3 реагировали положительно после инкубации при 60°C в течение 1-го часа.

В целях подтверждения полученных результатов были исследованы пробы сывороток крови коров с определением изменений оптической плотности (ОП) лунок в ИФА до и после инкубирования. Предварительно все пробы были проанализированы в РИД. Всего исследовано 33 пробы.

Результаты исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Изменение показателей оптической плотности (ОП) в ИФА

№ п/п	Хозяйства	РИД	ИФА без инкубации проб		ИФА с инкубацией проб	
			Рез-т	ОП	Рез-т	ОП
1.	ООО «Агрофирма им. В.П.Дементьева»	+	+	1,471±0,13	+	1,786±0.16
2.		-	-	0,163±0,02	-	0,163±0.01
3.		+	+	1,493±0,14	+	1,550±0.14
4.	ООО«Ак Барс Дрожанное»	+	+	1,105±0,09	+	1,380±0.13
5.		-	-	0,159±0,01	-	0,198±0.02
6.		+	+	1,287±0,11	+	1,689±0.16
7.		-	-	0,173±0,02	-	0,173±0.02
8.		-	-	0,151±0,01	-	0,151±0.01
9.		-	-	0,126±0,01	-	0,144±0.01
10.		+	+	1,106±0,09	+	1,407±0.13
11.		-	+	0,800±0,07	+	1,105±0.09
12.		+	+	1,353±0,12	+	1,705±0.16
13.		-	-	0,420±0,03	+	0,781±0.06
14.		-	-	0,400±0,03	+	0,987±0.01

15.	А/Ф Актаныш	+	+	1,854±0,17	+	1,957±0.17
16.		-	-	0,152±0,01	+	0,733±0.06
17.		-	+	0,579±0,05	+	2,082±0.18
18.		-	-	0,097±0.01	+	0,647±0.05
19.		-	-	0,067±0.01	+	1,237±0.11
20.		-	+	0,597±0.05	+	2,077±0.18
21.		-	+	0,550±0.04	+	2,207±0.19
22.		-	+	0,753±0,06	+	2,082±0.18
23.		-	-	0,354±0.03	+	1,618±0.15
24.		-	+	0,602±0.05	+	1,937±0.17
25.		-	+	0,563±0.04	+	2,128±0.18
26.	-	-	0,400±0.03	+	1,987±0.17	
27.	КФА «Низамов А.А»	+	+	0,954±0.08	+	0,981±0.08
28.		-	-	0,158±0.01	-	0,212±0.02
29.		-	-	0,122±0.01	-	0,123±0.01
30.		-	-	0,096±0.01	-	0,145±0.01
31.		-	+	0,943±0.08	+	0,965±0.08
32.		-	-	0,140±0.01	-	0,148±0.01
33.		-	-	0,094±0.01	-	0,100±0.01

$p < 0.001$

Из данных, представленных в таблице видно, что 8 проб сыворотки крови положительные, 25 -отрицательные в РИД. Из 25 отрицательных проб в РИД, 8 реагировали положительно в ИФА и еще 7 -после инкубирования при 60°C в течение 1 часа. В целом, результаты оптической плотности лунок в большинстве случаев увеличиваются. Однако следует отметить, что оптические плотности лунок у некоторых отрицательных проб в РИД и в ИФА, оставались неизменными. Показатели оптической плотности в результате температурного воздействия у некоторых проб увеличились на 1,5 пунктов и более.

Увеличение титров свободных антител после инкубирования объясняется диссоциацией иммунных комплексов, спецификой динамики образования антител и иммунных комплексов при лейкозе. Таким образом, ИФА с предварительной диссоциацией ЦИК в пробах путем нагревания при 60°C в течение 1 часа гораздо

чувствительнее и позволяет дополнительно выявлять инфицированных ВЛКРС животных.

### **2.2.3 Выделение и характеристика антигенных компонентов вируса лейкоза крупного рогатого скота**

Основным препятствием при разработке иммунохимических методов диагностики инфекционных болезней является качество используемого антигена. Существующие на сегодняшний день методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота не учитывают генетическое многообразие возбудителя болезни. Результаты научных исследований последних лет подтверждают необходимость комплексного подхода при определении, как антигенов вируса, так и антител к ним в серологической диагностике лейкоза крупного рогатого скота.

При выделении антигена ВЛКРС из сывороток крови больных лейкозом коров исходили из того, что вирусные частицы главным образом содержатся в составе ЦИК. Технологию разрабатывали с учетом необходимости диссоциации циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и избавления от сывороточных антител и всех остальных белков (см. Материалы и методы).

Проводили изучение электрофоретической подвижности полученных антигенных фракций в 12,5% полиакриламидном геле, а также проводили иммуноблот анализ полученных фракций с сывороткой крови инфицированных и больных лейкозом коров.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемый антиген является комплексным, содержащим различные белковые фракции вируса лейкоза. Как видно из электрофореграммы (рисунок 1) молекулярные массы фракций составляют от 14 до 160 кД. В зависимости от стадии инфекционного процесса против каждой из них образуются антитела, что доказывает иммуноблот анализ полученных фракций антигенов ВЛКРС с сывороткой крови инфицированных и больных лейкозом коров(рисунок 2)

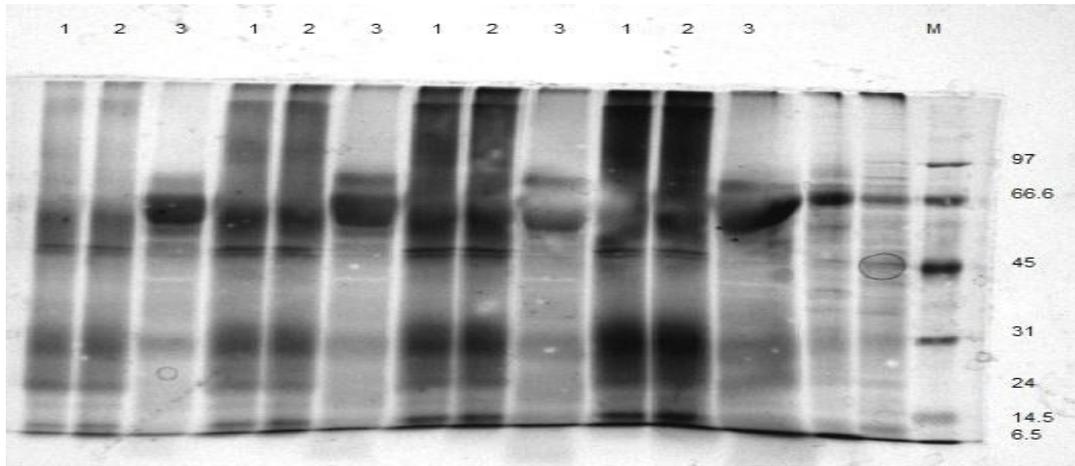


Рисунок 1- Электрофореграмма белковых компонентов ВЛКРС окрашенных азотнокислым серебром

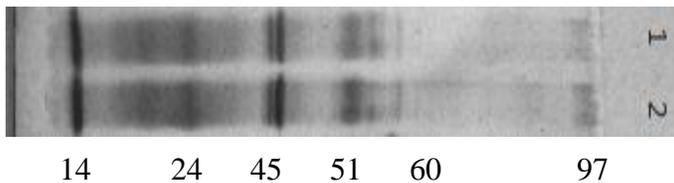


Рисунок 2 - Иммуноблотинг белковых компонентов ВЛКРС с сывороткой крови от гематологически больной лейкозом коровы

Методом иммуноблотинга был изучен спектр антител в пробах сывороток крови коров на различных стадиях инфицированности с ВЛКРС. На рисунке 3 представлены денситограммы иммуноблотаграмм сероактивных пептидов ВЛКРС с сыворотками крови коров на разной стадии инфекции.

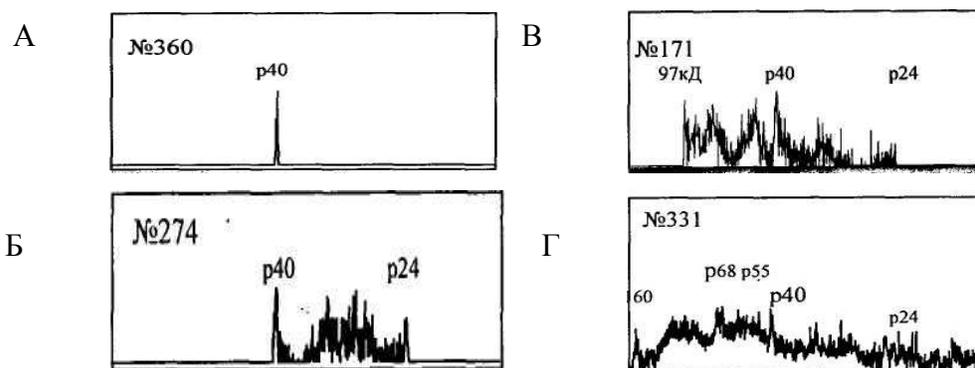


Рисунок 3 - Денситограммы иммуноблотаграмм сероактивных полипептидов ВЛКРС с сыворотками крови от инфицированных коров на разной стадии развития инфекции.

Обозначения:

А – сыворотка крови коровы в начальной стадии инфекции, впервые реагировавшей на РИД положительно;

Б и В – сыворотки крови коров на более поздних стадиях развития болезни;

Г – сыворотка крови гематологически больной коровы.

Судя по рисункам можно сказать, что спектр свободно циркулирующих в крови антител меняется с развитием инфекционного процесса. Полученный антиген позволяет более полно обнаруживать антитела к возбудителю и способствовать повышению эффективности диагностических мероприятий при лейкозе крупного рогатого скота.

#### **2.2.4 Сравнительное изучение полученного антигена с коммерческим антигеном в ИФА**

Антигенные свойства выделенных белковых фракций вирусных частиц изучали в ИФА с использованием сывороток крови инфицированных ВЛКРС и больных лейкозом коров. Всего исследовали более 100 проб сывороток крови. Сыворотки предварительно были анализированы в ИФА с использованием коммерческого набора.

Результаты ИФА с использованием исследуемого антигена и коммерческого набора в целом совпали. Из 100 исследованных проб сывороток крови, установлено различие в показателях двух проб, которые при ИФА с коммерческим набором показали отрицательные, а с исследуемым антигеном -положительные результаты.

Для более полной оценки полученных результатов, повторно исследовали 10 проб сывороток крови от инфицированных ВЛКРС коров сравнивая показатели ОП лунок в ИФА. Результаты исследований представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Показатели оптической плотности лунок в ИФА с использованием исследуемого антигена и коммерческого набора

№ п/п	Иммуноферментный анализ с использованием	
	Исследуемого антигена	Коммерч. набора
1.	1,923±0.12	1,927±0.12
2.	1,415±0.07	1.397±0.06
3.	2,323±0.13	1,927±0.12
4.	1,312±0.06	1.315±0.06
5.	1,514±0.08	1,522±0.08
6.	1,317±0.06	1,310±0.06
7.	2,172±0.13	1,835±0.11
8.	1.651±0.09	1,473±0.08
9.	1,427±0.07	1,432±0.07
10.	1,245±0.05	1,260±0.05
Положительный контр.	1,873±0.11	2,108±0.13
Отрицательный контр.	0,189±0.01	0,187±0.01

$p < 0.001$

Из приведенных в таблице данных особый интерес представляют результаты оптической плотности проб № 3, 7 и 8. У этих проб показатели ОП гораздо выше с исследуемым антигеном. Причем, показатели оптической плотности лунок с положительной контрольной сывороткой у данного антигена ниже чем у коммерческого набора. Объяснить данный факт можно только тем, что в тест-системах для диагностики лейкоза крупного рогатого скота в основном используются белки оболочки вируса – gp51. Положительные контрольные сыворотки, соответственно получены против только этого антигена.

### **2.3.1 Разработка и апробация дот-блот ИФА тест-системы для выявления антител к ВЛКРС**

В качестве антигенов применяли белковые фракции ВЛКРС полученные по способу описанному выше.

Для разработки дот-блот ИФА тест-системы в начале оптимизировали условия и время адсорбции антигена на полосках нитроцеллюлозной мембраны (НЦМ) и связывания антител с иммобилизованным на НЦМ антигеном, а также время инкубации НЦМ с конъюгатом и время ферментативной реакции с

субстратом. При этом основной задачей наших исследований было определение минимального временного интервала инкубации во всех случаях, не вызывающего понижения чувствительности тест-системы.

Полоски нитроцеллюлозной мембраны длиной 6 см и шириной 0,5 см маркировали карандашом на квадратики 5\*5 мм для удобства при проведении реакции (один квадратик - одна реакция). Раствор антигена в карбонатном буфере (рН – 9,6) наносили на каждый квадратик в объеме 2 мкл. Адсорбцию антигена на полосках мембраны проводили при комнатной температуре в течение 1-го часа. Для блокировки свободных после сорбции антигена мест на НЦМ использовали 0,1% раствор человеческого альбумина в дистиллированной воде. Оптимальное время инкубации НЦМ в растворе альбумина при комнатной температуре составило от двух часов и более. Полоски НЦМ промывали в твинфосфатном буфере и подсушивали. Иммобилизон – готов для дальнейшего использования.

Исследуемые сыворотки наносили на иммобилизон в рабочем разведении в ТФСБ (рН-7,3), определенных опытным путем. Инкубировали 40 минут при комнатной температуре, после чего полоски промывали не менее 5 раз с промывочным раствором. Конъюгат наносили на каждую точку полоски по 2 мкл и инкубировали 15 минут при комнатной температуре. Полоски промывали не менее 6 раз и подсушили. Субстратную смесь также наносили точечным методом и инкубировали на темном месте в течение 5-7 минут. Появление окрашенной в синий цвет точки на месте нанесения реактивов, которая становится желтой после нанесения стоп-раствора, свидетельствует о положительном результате.



Рисунок 4 - Визуализация результатов дот-блот иммуноанализа

Разработанную тест-систему апробировали для выявления антител к ВЛКРС в пробах сывороток крови коров из неблагополучных по лейкозу хозяйств. Всего исследовано 220 проб. В качестве сравнительного теста использовали ИФА в классическом варианте. 12 проб были отрицательные, остальные - положительные в иммуноферментном анализе.

Результаты ИФА и дот-иммуноанализа в целом совпали, кроме 10 проб, которые в ИФА были положительные, а в дот-блот анализе - отрицательные. Однако, нужно отметить, что и в ИФА 6 из этих 10 обладали низкими коэффициентами специфичности, т.е. титры специфических антител в этих пробах были низкими.

Проведенные исследования показали, что тест система дот-блот ИФА с использованием вирусных частиц выделенных из сывороток крови больных лейкозом коров, вполне пригодна для скрининговых исследований на лейкоз крупного рогатого скота. Она обладает меньшей чувствительностью, чем ИФА, однако гораздо проще и дешевле при постановке, не требуют специального оборудования.

### **2.3.2 Разработка и апробация дот-блот ИФА тест-системы для выявления антител к микобактериям туберкулеза**

При разработке тест-системы придерживались методики описанной выше. Использовали микобактериальные антигены (ДМСО-антигены), полученные по методике, разработанной на кафедре биологической и органической химии Казанской ГАВМ имени Н.Э.Баумана.

В целях апробации разработанной тест-системы, а также выяснения эпизоотической ситуации в хозяйстве по туберкулезу исследовали 121 пробу сывороток крови коров, полученные после проведения туберкулинизации. Контрольным тестом послужила ИФА в классическом варианте с использованием ДМСО-антигенов. Результаты ИФА и дот-блот анализа в целом оказались

одинаковыми. Результаты исследований 46 проб из реагирующих на ППД туберкулин животных представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Сравнительные результаты ИФА и дот-блот анализа

Районы	Всего	ИФА		Дот-блот ИФА	
		(+)	(-)	(+)	(-)
Балтасинский	13	2	11	2	11
Мензелинский	7	4	3	4	3
Камскоустинский	20	14	6	12	8
Пестречинский	6	1	5	1	5
ИТОГО	46	21	25	19	27

Как видно из данных представленных в таблице, результаты исследования проб сывороток крови на туберкулез крупного рогатого скота методом ИФА и дот-блот ИФА в целом совпадают, только в 2-х пробах положительных в ИФА не обнаружены противотуберкулезных антител в дот-блот варианте.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Диагностическая эффективность иммуноферментного анализа при лейкозе крупного рогатого скота гораздо выше, чем РИД, что выражается в увеличении выявляемости животных инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота животных до 30% в зависимости от эпизоотической ситуации в хозяйствах;

2. Предварительная термическая обработка исследуемых проб сывороток крови при температуре 60°C в течение 1 часа является важным способом повышения чувствительности иммуноферментного анализа при диагностике лейкоза крупного рогатого скота, позволяющим увеличивать выявляемость инфицированных животных дополнительно до 5,5%, что имеет важное значение в мониторинге эпизоотической ситуации по лейкозу в разных хозяйствах;

3. Вирусные частицы в основном содержатся в составе циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и технология, основанная на диссоциации ЦИК и

избавлении от сывороточных антител и других белков, позволяет получать антиген вируса лейкоза крупного рогатого скота, обеспечивающий индикацию противолейкозных антител в инфекционном процессе;

4. Полученный антиген является комплексным, содержащим различные белковые фракции вируса лейкоза с молекулярными массами фракций от 14 до 160 кД, против каждой из них образуются антитела, спектр которых меняется с развитием инфекционного процесса;

5. Полученный антиген позволяет более полное обнаружение антител к возбудителю и способствует повышению эффективности диагностических мероприятий при лейкозе крупного рогатого скота;

6. Микобактериальные ДМСО антигены и полученный антиген вируса лейкоза крупного рогатого скота позволяют разрабатывать иммунохимические диагностические тест-системы, которые по чувствительности не уступают классическим и пригодны для массовых исследований по определению эпизоотической ситуации в хозяйствах по туберкулезу и лейкозу крупного рогатого скота.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

1. В целях повышения эффективности диагностики лейкоза крупного рогатого скота предлагаем использовать методические рекомендации по выявлению антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота методом ИФА и дот-блот иммуноанализа с использованием антигена из местных штаммов возбудителя, утвержденные НТС ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ протокол № 8 от 18 октября 2017 г.

2. Для скрининговых исследований при диагностике лейкоза и туберкулеза крупного рогатого скота рекомендуются использовать тест-системы дот-блот ИФА.

3. Научные положения, выводы и рекомендации диссертационной работы предлагаются к использованию в учебном процессе высших учебных заведений биологического и ветеринарного профиля.

### **Список работ, опубликованных автором по теме диссертации**

1. Джакаит, Д.А. Способ получения антигена ВЛКРС из крови больных лейкозом коров и перспективы его использование в иммунохимии / Д.А. Джакаит, Т.Р. Якупов // Материалы международной научной конференции “Фундаментальные и прикладные проблемы медицины и биологии”. - Дубай. - 2015. - №11 (5). - С. 650-652.

2. Джакаит, Д.А. Разработка и апробация дот-блот ИФА тест-системы для выявления антител к ВЛКРС / Д.А. Джакаит, Т.Р. Якупов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. - Казань. - 2015. - Т.223. - С.64-67\*.

3. Якупов, Т.Р. Изучение антигенной структуры ВЛКРС / Т.Р. Якупов, Д.А. Джакаит, К.С. Хаертынов // Материалы международной научной конференции «Современные проблемы ветеринарной и аграрной науки и образования», посвященной 150-летию образования Государственной ветеринарной службы России, Казань. - 2016. - Т. 226. - С. 187-191.

4. Джакаит, Д.А. Эффективность РИД и ИФА в диагностике лейкоза крупного рогатого скота / Д.А. Джакаит // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2016. - №4. - С. 65-68. \*

5. Jakait, J.A. antigenic structure of bovine leukemia virus components and their importance in the diagnosis of bovine leucosis / J.A. Jakait, T.R.Yakupov, K.S.Khaertdinov // Материалы XII международной научно-практической конференции «Наука в современном информационном обществе». –North Charleston, USA. - 2017. – Т. 2. - С.19-16.

6. Джакаит, Д.А. Термическая обработка как способ повышения чувствительности ИФА в диагностике лейкоза коров / Д.А. Джакаит, Т.Р. Якупов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э.Баумана. - 2017. - Т.230 (II). - С.71-76. \*

7. Джакаит, Д.А. Дот-блот ИФА тест-система для выявления антител к микобактериям туберкулеза крупного рогатого скота / Д.А. Джакаит // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. - 2017. - Т.231 (III). - С.37-40. \*

\* издания, рекомендованные ВАК РФ.