

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
БРУЦЕЛЛЕЗА И ТУБЕРКУЛЕЗА ЖИВОТНЫХ»**

На правах рукописи

МОРОЗОВА Ольга Владимировна

**ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ Т-ЛИМФОЦИТОВ
В ОЦЕНКЕ СТАД КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПРИ ЛЕЙКОЗЕ**

06.02.02. – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель – доктор биологических наук,
доцент Власенко В.С.

Омск – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	15
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1. Лейкоз крупного рогатого скота и современные методы его диагностики.....	15
1.2. Особенности иммунобиологических реакций при лейкозной инфекции..	25
1.3. Действие левамизола на клетки иммунной системы.....	42
1.4. Заключение к обзору литературы	50
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	52
2.1. Эпизоотическая обстановка по лейкозу крупного рогатого скота в Кемеровской области.....	52
2.2. Разработка способа выявления повышенной чувствительности у крупного рогатого скота к инфекции ВЛКРС.....	58
2.2.1. Оценка чувствительности лимфоцитов в реакции спонтанного розеткообразования к разным концентрациям левамизола.....	59
2.2.2. Оценка иммунного статуса здорового, инфицированного ВЛКРС, и больного лейкозом крупного рогатого скота с помощью дискретно- динамического анализа.....	61
2.2.3. Изучение взаимосвязи между уровнем циркулирующих иммунных комплексов и функциональным состоянием лейкоцитов у крупного рогатого скота при лейкозе.....	72
2.2.4. Исследование чувствительности лимфоцитов к левамизолу у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу.....	75
2.3. Испытание способа выявления крупного рогатого скота с повышенной чувствительностью к лейкозной инфекции.....	79
2.3.1. Оценка чувствительности лимфоцитов к левамизолу <i>in vitro</i> у	

здорового крупного рогатого скота в возрастном аспекте.....	79
2.3.2. Оценка чувствительности лимфоцитов к левамизолу <i>in vitro</i> у крупного рогатого скота из неблагополучного по лейкозу стада в возрастном аспекте.....	81
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	84
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	98
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	99
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	127
ПРИЛОЖЕНИЯ	130

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Лейкоз крупного рогатого скота является серьезной проблемой для скотоводства нашей страны и ряда регионов мира, прочно занимая в структуре инфекционных патологий ведущее место (Гулюкин М.И. и др. Разработка эффективных мероприятий против лейкоза крупного рогатого скота. Ветеринария, 2002. №12. С. 3-8; Гулюкин М.И. и др. Аналитический обзор эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в Российской Федерации (1996-2010). М., 2011. 46 с.; Смирнов Ю.П. и др. Эпизоотология и профилактика лейкоза крупного рогатого скота. Вестник РАСХН, 2008. №1. С. 75-76; Trono K.G. et al. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet. Microbiol*, 2001. V. 83. №3. P. 235-248; Van Leeuwen J.A., Forsythe L., Tiwari A., Chartier R. Seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* in dairy cattle in Saskatchewan. *Can. Vet. J.*, 2005. V. 46. №1. P. 56-58; Van Leeuwen J.A., Tiwari A., Plaizier J.C., Whiting T.L. Seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in Manitoba. *Can. Vet. J.*, 2006. V. 47. №8. P. 783-786; Lavanya M. et al. Cell surface expression of the bovine leukemia virus-binding receptor on B and T lymphocytes is induced by receptor engagement. *J. Immunol.*, 2008. V. 181. P. 891-898; Murakami K. et al. The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. *Vet. Microbiol.*, 2011. V. 148. №1. P. 84-88). При этом огромный вред наносимый лейкозом животноводству складывается от преждевременной выбраковки коров, снижения качества продукции, полученной от больных животных, утраты племенной ценности животных из-за подавления функции иммунной системы инфекцией, снижения резистентности как к

инфекционным, так и к незаразным болезням, расходов на оздоровительные мероприятия (Смирнов П.Н. Болезнь века. Новосибирск, 2007. 302 с.).

За истекший период времени ветеринарной наукой и практикой достигнуты определенные успехи в изучении этиологии, выявлены пути передачи инфекции, установлены и раскрыты некоторые особенности развития инфекционного и эпизоотического процессов, определена роль ряда экологических факторов и наследственной предрасположенности к лейкозу, разработаны и внедряются различные способы ликвидации лейкоза у крупного рогатого скота (Кудрявцева Т.П. Лейкоз животных. М.: Россельхозиздат, 1974. 158 с.; Бурба Л.Г. Лейкозы и злокачественные опухоли. Под ред. В.П. Шишкова, Л.Г. Бурбы. М.: Агропромиздат, 1988. 400 с.; Смирнов П.Н. и др. Проблема лейкоза животных. Новосибирск: Советская Сибирь, 1992. 476 с.; Храмцов В.В. Распространение, патогенетическая характеристика лейкоза крупного рогатого скота и система противолейкозных мероприятий в Сибири: автореф. дисс. д. вет. н. Новосибирск, 1995. 28 с.; Петров Н.И. Эпизоотический процесс и система оздоровительных мероприятий при лейкозе крупного рогатого скота: дисс. д. вет. н.- СПб., 1999. 499 с.; Галеев Р.Ф. Теоретическое обоснование, экспериментальное подтверждение путей передачи вируса лейкоза крупного рогатого скота, усовершенствование методов диагностики и мер борьбы с ним: дисс. д. вет. н.- Уфа, 2000. 292 с.; Донник И.М., Смирнов П.Н. Экология и здоровье животных. Екатеринбург: Издательско-редакционное агентство УТК, 2001. 331 с.; Мальцева Н.А. Лейкоз крупного рогатого скота: разработка методов лабораторной диагностики и средств специфической профилактики: дисс. д. биол. н. Новочеркасск, 2002. 197 с.; Разумовская В.В. Совершенствование системы управления эпизоотическим процессом лейкоза и бруцеллеза крупного рогатого скота: автореф. дисс. ... д. вет. н. Барнаул, 2004. 40 с.; Логинов С.И. Системный эколого-эпизоотологический анализ совокупного риска развития лейкоза крупного рогатого скота: автореф. дисс. д. биол. н. Новосибирск, 2005. 45 с.; Апалькин В.А., Гулюкин М.И., Петров Н.И. Лейкоз крупного рогатого скота.

СПб.: Петролазер, 2005. 106 с.; Симонян Г.А., Гулюкин М.И. Вклад ученых ВНИИЭВ в изучение лейкоза крупного рогатого скота. Ветеринария, 2009. №3. С. 57-59; Амироков М.А. Комплексная оценка факторов, влияющих на особенности проявления и распространение лейкоза крупного рогатого скота, и совершенствование системы, обеспечивающей эпизоотическое благополучие: дисс. д. вет. н. Новосибирск, 2011. 291 с.).

Несмотря на определенные успехи в изучении этиологии и патогенеза лейкоза, разработке диагностики, а также системы эффективных и экономически целесообразных мероприятий, ситуация по лейкозу в стране продолжает оставаться напряженной.

Сложность решения проблемы лейкоза диктуется рядом обстоятельств: отсутствие полных данных о причинах и механизмах, вызывающих безудержную пролиферацию клеток лимфоидного ряда с нарушением их созревания. В эпизоотологии лейкоза пока необъяснимы причины и механизмы активации инфекционного процесса, когда между инфицированием и возможным заболеванием существует большой или пожизненный временной срок (Лебедев А.Ф. Вопросы эпизоотологии, иммунологии, разработки и совершенствования оздоровительных мероприятий при лейкозе крупного рогатого скота: автореф. дисс. ... канд. вет. н. Курск, 2004. 24 с.; Евглевский А.А., Лебедев А.Ф., Буткин Е.И., Стебловская С.Ю. Иммунологические аспекты развития лейкозного процесса у глубокостельных и растелившихся коров. Ветеринарная патология, 2010. №2. С. 18-21).

Все это определяет необходимость дальнейших исследований по оценке иммунологических показателей как инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), так и восприимчивых к вирусу.

Степень разработанности проблемы. Изучению иммунологических аспектов при инфекции ВЛКРС и лейкозе крупного рогатого скота посвящены многочисленные исследования, которые свидетельствуют о важной роли иммунных механизмов в развитии лейкозного процесса, особенно параметров

клеточной системы (Т-лимфоцитов). Нередко опубликованные данные носят противоречивый характер, к тому же остаются малоизученными многие патогенетические аспекты данного заболевания. В частности, недостаточно исследованы иммунологические механизмы, способствующие возникновению осложнений, не оценена их роль в прогрессировании лейкоза крупного рогатого скота. Все это предопределяет чрезвычайную актуальность дальнейшего изучения иммунопатогенеза лейкоза крупного рогатого скота.

Цель и задачи исследования. Цель исследований состояла в изучении особенностей функционального состояния Т-лимфоцитов у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу и испытание эффективности иммунологических методов в оценке стад при данной инфекции.

В соответствии с целью были определены следующие задачи:

- выяснить эпизоотическую ситуацию лейкоза крупного рогатого скота в Кемеровской области;
- определить концентрационную зависимость изменения уровня экспрессии рецепторов к эритроцитам барана на поверхности Т-лимфоцитов от содержания левамизола в инкубационной среде у носителей ВЛКРС и больных лейкозом животных;
- оценить информативность нагрузочного теста с левамизолом и выявить прогностически значимые интервалы сочетаний иммунологических параметров с помощью дискретно-динамического анализа у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу;
- установить связь между функциональным состоянием нейтрофилов и уровнем циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови крупного рогатого скота с различной степенью компрометации к лейкозу;
- изучить особенности экспрессии Е-рецепторов на Т-лимфоцитах периферической крови у крупного рогатого скота с повышенной чувствительностью к левамизолу;

- изучить чувствительность Т-лимфоцитов к левамизолу *in vitro* у крупного рогатого скота разного возраста из благополучного и неблагополучного по лейкозу стада.

Научная новизна работы. Изучена степень распространения лейкоза крупного рогатого скота в Кемеровской области. Показана динамика эпизоотической ситуации лейкоза крупного рогатого скота.

Впервые установлена концентрационная зависимость изменения уровня экспрессии рецепторов к эритроцитам барана на поверхности мембран Т-лимфоцитов крупного рогатого скота от содержания левамизола в инкубационной среде. Показано, что левамизол в конечной концентрации 0,5 мкг/мл оказывает иммунокорректирующее действие на экспрессию рецепторов к эритроцитам барана Т-клетками, проявляющееся в увеличении данного показателя у животных с нарушением Т-системы иммунитета.

Проведена сравнительная характеристика функционального состояния Т-лимфоцитов у коров и молодняка крупного рогатого скота различных периодов постнатального развития в благополучном и неблагополучном по лейкозу хозяйствах. Показано, что индекс сдвига, определяемый как отношение процента Е-РОК после инкубации с левамизолом к числу Е-РОК до обработки препаратом, у здорового крупного рогатого скота не превышает 0,95, а у животных с инфекционной патологией и с предрасположенностью к заболеванию лейкозом составляет $\geq 1,2$. Научная новизна исследований подтверждена патентом РФ № 2465588 «Способ диагностики лейкоза крупного рогатого скота» от 27.10.2012 г. (Приложения № 2, 3).

Теоретическая и практическая значимость работы. Научные положения диссертационной работы расширяют и углубляют современные представления об особенностях изменения функционального состояния Т-лимфоцитов у крупного рогатого скота, инфицированного ВЛКРС, и больного лейкозом.

Материалы диссертации использованы для разработки методического пособия по методам оценки функциональной активности лейкоцитов при туберкулезе и лейкозе животных (Приложения № 4, 5).

Методические приемы по оценке функционального состояния Т-лимфоцитов могут быть использованы при выполнении научно-исследовательских работ аналогичной направленности и апробированы в учебном процессе ВУЗов ветеринарного профиля (Приложение № 1).

Методология и методы исследования. Экспериментальная часть работы была выполнена в 2011-2014 гг. в лаборатории эпизоотологии и мер борьбы с туберкулезом, секторе иммунитета и специфической профилактики туберкулеза Всероссийского научно-исследовательского института бруцеллеза и туберкулеза животных и на базе ФГУ «Кемеровской МВЛ».

Диссертация выполнена в соответствии с тематическим планом НИР ВНИИБТЖ VII Ветеринарная медицина: 22.2. «Разработка новых и усовершенствование существующих средств и методов иммунопрофилактики, иммунотерапии, диагностики туберкулеза и лейкоза крупного рогатого скота, а также дифференциальной диагностики микобактериозов».

Эпизоотологический материал собран по данным ветеринарной отчетности Главного управления ветеринарии и документации районных ветеринарных лабораторий о распространении лейкоза крупного рогатого скота на территории Кемеровской области в 2007-2013 гг.

Объектом исследования являлся крупный рогатый скот (около 1500 голов) разного возраста и пола, периферическая кровь и сыворотка крови 350 голов молодняка крупного рогатого скота, нетелей и коров из благополучного и неблагополучного по лейкозу хозяйства.

Популяцию Т-лимфоцитов (Е-рок) определяли в реакции спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана, популяцию В-лимфоцитов (ЕАС-рок) определяли в реакции комлементарного розеткообразования с эритроцитами быка, образовавшими иммунные комплексы с гетерофильными антителами и

комплементом, и популяцию лимфоцитов-киллеров (ЕА-рок) в реакции непрямого глобулинового розеткообразования с эритроцитами быка, образовавшими иммунные комплексы лишь с гетерофильными антителами (Коромыслов Г.Ф., Солодовников В.Л. и др. Методические рекомендации по биохимическим и иммунохимическим методам исследования клеток, их компонентов и других биологических субстратов. ВАСХНИЛ. М., 1980. 39 с.). Концентрацию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови определяли методом осаждения полиэтиленгликолем (ПЭГ) с молекулярной массой 6000 (Гриневиц Ю.А., Алферов А.Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологически больных. Лабораторное дело, 1981. №8. С. 493-496). Функциональную активность нейтрофилов оценивали в тесте с нитросиним тетразолием (НСТ) в спонтанном (без нагрузки) варианте с последующей фиксацией реакции с помощью многоканального иммунохимического анализатора «Fluorofot STD Less-486-M». Оценку концентрации образовавшегося диформаза в нейтрофилах определяли по разнице экстинкций при длине волны 630 нм и 490 нм (Годков М.А., Зинкин В.Ю. Способ диагностики функционального состояния нейтрофилов человека. Описание изобретения к патенту РФ №2218567, МПК7 G 01 N 33/52. №2001132646/14; заявл. 05.12.01; опубл. 10.12.03.).

Для определения чувствительности Т-лимфоцитов крупного рогатого скота ставили нагрузочный пробирочный тест Е-розеткообразования с левамизолом (Казмирчук В.Е., Бычкова Н.Г., Андрущук А.А., Гюллинг Э.В., Кравчук Г.П. Способ определения чувствительности лимфоцитов к левамизолу. Описание изобретения к авторскому свидетельству СССР SU №1064952, МПК А61К 39/00. №3389688/28-13; заявл. 04.02.82; опубл. 07.01.84, Бюл. № 1.), модифицированный нами для выявления животных с повышенной чувствительностью к лейкозу. Постановка реакции включала выделение лимфоцитов, приготовление взвеси эритроцитов барана, обработку лимфоцитов левамизолом и постановку реакции спонтанного розеткообразования.

Выделение лимфоцитов. Лимфоциты выделяли центрифугированием в градиенте плотности урографина ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$). В пробирки Флоринского с помощью шприца с длинной иглой вносили по 2 мл 17 %-ного раствора урографина, на который наслаивали по 4 мл смеси равных объемов крови и раствора Версена, а затем центрифугировали по 20-30 минут при 420-600 g. После центрифугирования лимфоциты концентрируются в виде матового диска на границе двух жидкостей, а эритроциты оседают на дно пробирки. Под слоем фиколла на эритроцитах находится белая пленка гранулоцитов. Образовавшийся слой лимфоцитов извлекали шприцем с длинной иглой и отмывали от примесей центрифугированием в пробирках Флоринского по 5 минут при 210 g, используя дважды по 3 мл раствора Версена, а затем такое же количество раствора Хенкса, в 1 мл которого готовили взвеси выделенных клеток с концентрацией 2-3 тыс/мкл лимфоцитов для последующих постановок реакций розеткообразования. Для подсчета разведения лимфоцитов в 0,38 мл 3 %-ной уксусной кислоты вносили 0,02 мл взвеси лимфоцитов. Подсчитывали в камере Горяева в 5 больших квадратах, разделенных на 4, по диагонали.

Приготовление взвеси эритроцитов барана. С этой целью использовали свежеприготовленную или хранящуюся при температуре $+4^\circ\text{C}$ не более суток 0,4 %-ную взвесь эритроцитов барана или коз в растворе Хенкса. Перед постановкой реакции эритроциты отмывали физиологическим раствором, осаждая каждый раз центрифугированием при 400 g в течение 10 минут до тех пор, пока надосадочная жидкость не становилась бесцветной (обычно 2-3 раза). Для приготовления 0,4 %-ной взвеси, 0,04 мл отмытого плотного осадка эритроцитов смешивали с 10 мл раствора Хенкса.

Обработка лимфоцитов левамизолом. Лимфоциты опытной пробы обрабатывали левамизолом в концентрации 0,5 мкг/мл среды 199, содержащей 1×10^5 лимфоцитов и инкубировали 1 час при 37°C в термостате, центрифугировали 5 мин при 200g и с осадком ставили реакцию спонтанного розеткообразования.

Постановка реакции спонтанного розеткообразования. Реакцию ставили параллельно с двумя пробами лимфоцитов: чистой взвесью (контрольная) и с обработанными левамизолом (опытная). К 0,2 мл суспензии лимфоцитов прибавляли 0,2 мл 0,4 %-ной взвеси эритроцитов барана. Смесь центрифугировали 3-5 мин при 180g, выдерживали в термостате при 37 °С 30 мин и оставляли на ночь (на 18-20 ч) при +4 – +10°С. Фиксация 0,5 %-ным раствором глутарового альдегида 0,5 мл 20 минут при комнатной температуре. Прекращали фиксацию 4-5-кратными объемами дистиллированной воды. Центрифугировали 10 минут при 180 g. Надосадок убирали, оставляя 0,2 мл, тщательно ресуспендировали, делали мазок типа «высушенной капли», высушивали, фиксировали в этиловом спирте 20 минут, окрашивали по Романовскому.

В опытной и контрольных группах подсчет вели на 200 лимфоцитов, просматривая препараты с помощью светового микроскопа. Результат выражали в процентах. За розетку принимали лимфоцит, присоединивший не менее 3 эритроцитов.

Для оценки влияния препарата на функциональную активность Т-лимфоцитов животного определяли индекс сдвига (ИС) по формуле:

$$ИС = \frac{\% E - РОК \text{ после инкубации с левамизолом}}{\% E - РОК \text{ до инкубации с левамизолом}}$$

Для выявления серопозитивных животных – носителей вируса лейкоза крупного рогатого скота применяли реакцию иммунодиффузии (РИД), для выявления больных лейкозом животных применяли гематологический метод исследования. Лейкограмму выводили по результатам дифференцированного подсчета 100 клеток в окрашенных мазках крови под микроскопом с иммерсионной системой. Абсолютное количество лимфоидных элементов в 1 мкл крови определяли путем умножения количества лейкоцитов на общий процент лимфоцитов в лейкоцитарной формуле и деления полученного произведения на 100. Показатель абсолютного количества лимфоцитов оценивали по «лейкозному

ключу» (Методические указания по диагностике лейкоза крупного рогатого скота, М., 2000).

Биометрическую обработку цифрового материала экспериментальных исследований проводили с помощью дискретно-динамического анализа. Математическая обработка цифровых данных включала определение средней арифметической (M), ошибки средней арифметической (m). Для оценки существенности различий между двумя средними величинами M_x и M_y использовали t -критерий Стьюдента. Различие между контролем и опытом считалось статистически достоверным только для $P \leq 0,05$ (Урбах В.Ю. Биометрические методы (статистическая обработка опытных данных в биологии, сельском хозяйстве и медицине). М.: Наука, 1964. 416 с.; Усович А.П., Лебедев П.Т. Применение математических статистик при обработке экспериментальных данных в ветеринарии. Омск, 1970. 44 с.; Власенко В.С. и др. Оценка иммунного статуса у крупного рогатого скота при лейкозе. Методические рекомендации. Омск, 2010. 31 с.).

Положения, выносимые на защиту:

1. Эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в Кемеровской области;
2. Результаты сравнительных исследований по оценке функционального состояния Т-лимфоцитов у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу;
3. Результаты экспериментального исследования эффективности способа выявления повышенной чувствительности к инфекции ВЛКРС у крупного рогатого скота в хозяйствах с различной эпизоотической обстановкой по лейкозу.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов подтверждается большим объемом исследований, проведенных в лабораторных и производственных условиях в динамике с 2011 по 2014 г.г. с применением современных методов оценки иммунного статуса, математической обработки цифрового материала на персональном компьютере с использованием

стандартных программ, а также варианта регрессионного метода – дискретно-динамического анализа. Степень достоверности полученных показателей оценена путем сравнения величин вариационных рядов с помощью критерия Стьюдента.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на заседаниях Ученого совета Всероссийского научно-исследовательского института бруцеллеза и туберкулеза животных (Омск, 2011-2014), на Международных научно-практических конференциях: «Инфекционная патология животных» (Омск, 2011); «Научный поиск – животноводству России» (Ставрополь, 2013); «Обеспечение ветеринарного благополучия в животноводстве и птицеводстве» (Омск, 2013) и «Инновационные разработки молодых ученых – развитию агропромышленного комплекса» (Ставрополь, 2014).

Публикации результатов исследований. По материалам диссертационной работы опубликовано 8 научных работ, в том числе 2 в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для публикации материалов диссертационных работ («Ветеринарный врач», «Вестник ветеринарии»), методическое пособие и патент РФ на изобретение.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 135 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, заключения, списка литературы, списка иллюстративного материала и приложений. Работа иллюстрирована 13 таблицами и 11 рисунками. Список литературы включает 223 источника, из них 83 иностранных авторов.

Личный вклад соискателя. Работа выполнена соискателем самостоятельно, участие соавторов отражено в совместно изданных научных статьях. Автор приносит глубокую благодарность за оказание научно-методической помощи доктору ветеринарных наук, профессору М.А. Бажину и кандидату биологических наук Т.С. Дудоладовой.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Лейкоз крупного рогатого скота и современные методы его диагностики

Лейкоз крупного рогатого скота (энзоотический лейкоз) – хроническая инфекционная лимфопролиферативная болезнь с длительным латентным периодом. Возбудителем болезни является экзогенный ретровирус – вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), имеющий структурное и генетическое сходство с вирусом Т-клеточного лейкоза человека HTLV-1 и HTLV-2, что позволило международному комитету по таксономии вирусов в 1990 году отнести эти вирусы к одному роду – HTL-BLV семейства Retroviridae. ВЛКРС содержит фермент РНК-зависимую ДНК-полимеразу или транскриптазу, благодаря которой образуется ДНК-копия вирусной РНК, которая интегрирует в геном клетки (Орлянкин Б.Г. Современная классификация ретровирусов. Бюллетень ВИЭВ, 1996. Вып. 77. С. 36; Крикун В.А. Лейкоз крупного рогатого скота и иммунологическая толерантность. Ветеринария, 2002. №6. С. 7-9; Донник И.М., Джаилиди Г.А., Якубенко Е.В., Тихонов С.В. Эпизоотологические аспекты лейкоза крупного рогатого скота в Краснодарском крае. Ветеринария Кубани, 2014. №2. С. 15-18; Rola-Luszczak M., Olech M., Donnik I., Petropavlovskiy M. et al. The molecular characterization of leukaemia virus isolates from Eastern Europe and its impact on phylogeny. Plos one.- San Francisco, USA, March 2013. V. 8. Is. 8.).

Клетками мишенями для ВЛКРС служат В-лимфоциты (Aida Y., Onuma M., Ogawa Y., Mikami T., Izawa H. Tumor-associated antigens of bovine leukemia virus-induced bovine lymphosarcoma indentified by monoclonal antibodies. Cancer Res, 1985. V. 45. P. 174-180). Интегрированный в геном В-лимфоцитов ВЛКРС остается недоступным для воздействия специфических антител и персистирует в

организме на протяжении всей жизни животного (Burny A. et al. Charakterization of cellular sequences flanking an integrated bovine leukemia virus genome. J. Virol., 1984. V. 52. №3. P. 988-990).

У инфицированных животных вирус несвязанный с клеткой выявляют крайне редко, в самом начале инфекции (Miller J.M., Van der Maaten M.J. Bovine leukosis – its importance to the dairy industry in the United States. J. Dairy Sci., 1982. V. 65 (11). P. 2194-2203). Поэтому передача вируса лейкоза восприимчивому крупному рогатому скоту может осуществляться со всеми секретами и экскретами при попадании в них лимфоцитов, зараженных ВЛКРС. Установлено, что для экспериментального заражения телят достаточно ввести им подкожно 2500 лимфоцитов крови от зараженного животного (такое количество содержится примерно в 0,0005 мл цельной крови). Среди основных факторов, обуславливающих передачу вируса лейкоза, наибольшее значение имеет перенос возбудителя через кровь и препаратов из нее, при ветеринарных и зоотехнических обработках, т.е. ятрогенный способ передачи инфекции (Авилов В.М., Нахмансон В.М. Проблемы оздоровления крупного рогатого скота от лейкоза. Ветеринария, 1995. №11. С. 3-6; Гулюкин М.И. и др. Научные основы профилактики и борьбы с лейкозом крупного рогатого скота. Труды ВИЭВ, 1999. Т. 72. С. 38-47).

ВЛКРС может передаваться трансплацентарно с инфицированными лимфоцитами матери благодаря способности лимфоцитов мигрировать в межклеточном пространстве и таким образом преодолевать плацентарный барьер. Р.Ф. Галеев, Р.Ф. Хусаинов, 2009¹, В.М. Нахмансон с соавт., 1983², 1995³, П.Н. Смирнов с соавт., 1998⁴, А.Ф. Дмитриев, 2012⁵ считают, что через плаценту в пренатальный период инфицируется 3-20 % плодов, причем частота зависит от

¹ Галеев Р.Ф., Хусаинов Р.Ф. Лейкоз крупного рогатого скота. Уфа: Изд-во «Новый стиль», 2009. 220 с.

² Нахмансон В.М., Дун Е.А., Бурба Л.Г. Значение вертикального пути передачи БЛВ в эпизоотическом процессе онковирусной инфекции. Ветеринария, 1983. №2. С. 38-40.

³ Нахмансон В.М. и др. Использование коров, зараженных вирусом лейкоза крупного рогатого скота, в системе противолейкозных мероприятий. Ветеринария, 1995. №1. С. 8-11.

⁴ Смирнов П.Н., Храмцов В.В., Смирнова В.В. Практические аспекты лейкоза крупного рогатого скота. Ветеринария, 1998. №8. С. 6-8.

⁵ Дмитриев А.Ф. Внутриутробное инфицирование потомства у продуктивных животных. Ветеринарная патология, 2012. №2. С. 25-29.

уровня инфицированности коров-матерей, а более высокий процент пренатальной передачи отмечали у телят, родившихся от коров с клинико-гематологическим и опухолевым проявлением лейкоза.

В постнатальный период инфицированность 6-12-месячных телят составляет в среднем 8 %, животных в возрасте от 1 до 3 лет – 15 %, а от 3 до 10 лет – от 30 до 90 % (Гулюкин М.И. и др. Научные основы профилактики и борьбы с лейкозом крупного рогатого скота. Труды ВИЭВ, 1999. Т. 72. С. 38-47).

Инфекционный процесс лейкоза крупного рогатого скота характеризуется стадийностью. Различают несколько стадий или периодов в развитии инфекции: инкубационную, бессимптомного вирусоносительства, гематологическую, опухолевого проявления болезни, терминальную. Зараженное животное на всех стадиях является источником вируса.

Инкубационная стадия определяется как период с момента внедрения возбудителя в организм до появления первых иммунобиологических реакций. Стадия бессимптомного вирусоносительства характеризуется обнаружением в сыворотке крови специфических антител к антигену ВЛКРС. Как свидетельствуют данные литературы, в абсолютном большинстве случаев инфекционный процесс при лейкозе не выходит из стадии бессимптомного носительства возбудителя (Смирнов Ю.П., Суворова И.Л. Некоторые гематологические показатели у коров в бессимптомной стадии развития лейкозного процесса. Ветеринарная патология, 2009. №1. С. 26-29; Евглевский А.А. Лебедев А.Ф., Буткин Е.И., Стебловская С.Ю. Иммунологические аспекты развития лейкозного процесса у глубокостельных и растелившихся коров. Ветеринарная патология, №2. 2010. С. 18-21).

Гематологическая стадия лейкоза протекает на алейкемическом, суб- и лейкемическом уровнях. Алейкемическая картина крови проявляется без гематологических изменений, сублейкемическая характеризуется постепенным нарастанием общего количества лейкоцитов и лимфоцитов и лейкемическая фаза сопровождается гиперлейкоцитозом и повышенным содержанием

малодифференцированных клеток. Опухолевая стадия начинается на фоне предшествующей лейкемической фазы гематологической стадии лейкоза. Терминальная стадия характеризуется более значительным увеличением лимфатических узлов, часто селезенки, наличием экзофтальма, появлением разнообразных клинических симптомов и опухолевидных поражений многих внутренних органов (Симонян Г.А., Хисамутдинов Ф.Ф. Ветеринарная гематология . М.: Колос, 1995. 256 с.; Смирнов Ю.П., Суворова И.Л. Некоторые гематологические показатели у коров в бессимптомной стадии развития лейкозного процесса. Ветеринарная патология, 2009. №1. С. 26-29).

Для диагностики лейкоза применяют клинический, патологоанатомический, гистологический, серологический и молекулярно-биологический методы.

Многие годы динамику развития патологического процесса при данной болезни изучали с помощью методов клинко-гематологического и цитоморфологического исследования крови, кроветворных и других внутренних органов с последующим патоморфологическим анализом материала, на основании этих исследований Т.П. Кудрявцева (1967⁶, 1974⁷) впервые предложила классификацию гемобластозов крупного рогатого скота. По характеру и месту локализации опухолевых разрастаний, а также по морфологии и принадлежности к определенным росткам гемопоэза пролиферирующих клеток гемобласты разделили на две группы: лейкозы, сопровождающиеся системным поражением органов кроветворения и вовлечением в патологический процесс костного мозга (лимфоидная, недифференцированная, миелоидная и моноцитарная формы); гематосаркомы (лимфосаркома, лимфогрануломатоз) протекают с опухолевыми поражениями кроветворных и других органов (Симонян Г.А. Дифференциальная диагностика различных форм гемобластозов. Ветеринария, 2013. №9. С. 21-25). Однако, длительный инкубационный период, многообразие форм проявления

⁶ Кудрявцева Т.П. Классификация лейкозов крупного рогатого скота. В кн. Проблемы лейкозов. М.: Колос, 1967. С. 223-230.

⁷ Кудрявцева Т.П. Лейкоз животных. М.: Россельхозиздат, 1974. 158 с.

болезни, зачастую стертая симптоматика затрудняют постановку диагноза этими методами. Поэтому все большее значение и распространение приобретают серологические методы, основанные на выявлении антител к антигену ВЛКРС (Гулюкин М.И. и др. Научные основы профилактики и борьбы с лейкозом крупного рогатого скота. Труды ВИЭВ, 1999. Т. 72. С. 38-47).

Разработанная и широко применяемая в ветеринарных лабораториях страны реакция иммунодиффузии в геле агара (РИД) с использованием антигена ВЛ в настоящее время остается основным диагностическим методом, по результатам которого проводят оздоровительные и профилактические мероприятия в неблагополучных по лейкозу хозяйствах. В действующих в настоящее время «Правилах по профилактике и борьбе с лейкозом крупного рогатого скота» приоритет отдается именно серологическим исследованиям сыворотки крови. По их результатам судят об инфицированности животных вирусом лейкоза. В зависимости от этого определяют мероприятия по оздоровлению (Ковалюк Н.В., Сацук В.Ф., Мачульская Е.В. Современные методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота. Ветеринария Кубани, 2001. №1. С. 11-12).

К серологической диагностике лейкоза в нашей стране приступили с 1985 года. При этом ежегодно увеличивалось животных, подвергаемых серологической диагностике. Во многих предприятиях, даже с высоким уровнем инфицированности, этот метод хорошо себя зарекомендовал, а его использование позволило полностью оздоровить стада (Симонян Г.А. Разработка и совершенствование оздоровительных противолейкозных мероприятий. Ветеринария, 2007. №7. С. 3-7).

Однако, как и другой любой диагностический метод, РИД не лишен недостатков. Так, наличие у лейкоза латентной стадии, когда в крови отсутствуют антитела к вирусу, усложняет диагностику заболевания. По мнению ряда ученых Г.А. Симоняна, Н.С. Петраковой (1986)⁸, Р.С. Москалика (1989)⁹ и других,

⁸ Симонян Г.А., Петракова Н.С. Степень инфицирования ВЛКРС и заболевания лейкозом крупного рогатого скота в динамике исследований. Этиология, патогенез и вопросы эпизоотологии лейкоза крупного рогатого скота. Новосибирск, 1986. С. 31-37.

отрицательная серологическая фаза имеет место у 5-20 % инфицированных животных и может длиться от нескольких недель до 6-12 месяцев и более. При этом несвоевременная изоляция таких животных приводит к распространению инфекции и удлинению сроков проведения оздоровительных мероприятий.

Кроме того, в процессе оздоровления хозяйств от лейкоза с использованием РИД могут возникнуть трудности, связанные с так называемым выпадением реакции. У отдельных животных, давших положительную реакцию, в сыворотке крови в определенный период времени антитела с помощью реакции иммунной диффузии не выявляют. Это связано с тем, что антитела к антигенам ВЛКРС образуются волнообразно. У отдельных животных с малой иммунологической реактивностью в эти периоды уровни антител в сыворотке крови меньше уровня чувствительности РИД (Крикун В.А. Лейкоз крупного рогатого скота и иммунологическая толерантность. Ветеринария, 2002. №6. С. 7-9; Смирнов П.Н. Лейкоз крупного рогатого скота: проблемы и их решение на уровне субъекта Федерации. Ветеринария Кубани, 2007. №4. С. 4-6).

В некоторых случаях в неблагополучных по лейкозу стадах после удаления всех положительно реагирующих в РИД животных и трехкратного подтверждения отсутствия антителоносителей через несколько месяцев вновь выявляют инфицированных ВЛКРС животных. В.А. Крикун (2002)¹⁰ объясняет это обстоятельство явлением иммунологической толерантности, когда наблюдают вирусносительство без антителообразования. Основной причиной ее развития, по мнению автора, является внутриутробное заражение плода инфицированными лимфоцитами матери в период до проявления иммунной компетенции, т.е. в первые 3 месяца развития эмбриона.

Серопозитивное животное считают больным лейкозом при положительном результате гематологического исследования, которое заключается в подсчете

⁹ Москалик Р.С. Серонегативные фазы у зараженных ВЛКРС животных. Организация оздоровления племенного молочного стада от лейкоза. Новосибирск, 1989. С. 42-48.

¹⁰ Крикун В.А. Лейкоз крупного рогатого скота и иммунологическая толерантность. Ветеринария, 2002. №6. С. 7-9.

лейкоцитов в единице объема крови. При обнаружении повышенного их количества выводят лейкоцитарную формулу и оценивают статус животного по лейкозу согласно «лейкозному ключу» как здорового, подозрительного по заболеванию лейкозом или больного лейкозом.

Однако все «лейкозные ключи» выявляют больных животных только с повышенным количеством лейкоцитов. Вместе с тем, Х.С. Салимов (1986)¹¹, A. Talle et al. (1965)¹², E. Wiesner (1967)¹³ обращают внимание на то, что 15-20 % больных лейкозом животных имеют лейкемическую картину крови, у 5-10 % животных болезнь протекает алейкемически. На алейкемическое течение заболевания также указывают А.Ф. Валихов с соавт. (1980)¹⁴, Н.Р. Зорина, В.И. Околелов (2003)¹⁵, Г.А. Гаврилова, Ю.А. Макаров (2006)¹⁶ и многие другие. Кроме того, лейкозный процесс может протекать с периодической сменой рецидивов ремиссиями, что затрудняет своевременную постановку диагноза на лейкоз (Симонян Г.А. Динамика развития инфекционно-патологического процесса при лейкозе. Труды ВИЭВ, 1999. Т. 72. С. 26-32; Околелов В.И., Зорина Н.Р. Дифференциальная диагностика лейкемоидных реакций при различных патологических состояниях крупного рогатого скота. БИО, 2003. №9. С. 25-27; Донник И.М., Коритняк Б.М., Кадочников М.Ю., Беспамятных Е.Н. Повышение эффективности диагностики лейкоза крупного рогатого скота в техногенно загрязненных территориях. Аграрный вестник Урала, 2007. №3. 28-30).

Несмотря на то, что РИД остается одним из основных диагностических методов, именно иммуноферментный анализ (ИФА) широко используют в

¹¹ Салимов Х.С. Этиология, диагностика и меры профилактики лейкоза крупного рогатого скота. Ташкент: Мехнат, 1986. С. 56-59.

¹² Talle A., Jahnke H., Haase G. Zur diagnostic der rinderleukose und ihren bekampfung in sudniedersach – sischen. Zbl. Veterinarmed, 1965. Bd. 12. S. 435-443.

¹³ Wiesner E. Die leukose des rindes. Viena, 1967. 164 p.

¹⁴ Валихов А.Ф., Шишков В.П., Бурба Л.Г. Лейкоз крупного рогатого скота (вирусологические аспекты). М.: ВНИИТЭИСХ, 1980. 77 с.

¹⁵ Зорина Н.Р., Околелов В.И. Значение лейкемоидных реакций и морфофункциональных изменений лимфоцитов при диагностике лейкоза крупного рогатого скота. Эпизоотология, диагностика и профилактика хронических инфекционных болезней животных. Омск, 2003. С. 381-385.

¹⁶ Гаврилова Г.А., Макаров Ю.А. О роли скрытых форм лейкоза крупного рогатого скота. Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных. М.: Изограф, 2006. С. 186-188.

Национальных программах по борьбе с лейкозом крупного рогатого скота во многих странах Западной Европы и Америки. Практическая и диагностическая эффективность ИФА нашла широкое освещение в литературе (Гулюкин М.И., Дун Е.А., Баркова Н.В., Петров Н.И., Пау С.М. Эпизоотологическая оценка методов прижизненной диагностики лейкоза крупного рогатого скота. Вестник РАСХН, 2000. №3. С. 60-624; Верховский О.А., Цибезов В.В., Баландина М.В., Непоклонова И.В. Иммуноферментный анализ в диагностике лейкоза крупного рогатого скота. Ветеринария, 2002. №12. С. 8-10; Итэсь Ю.Р., Ткаченко М.Н. Применение «Мултискан Мультисофт» для иммуноферментного анализа инфекции вируса лейкоза крупного рогатого скота. Актуальные вопросы ветеринарной медицины. Новосибирск, 2005. С. 134; Якупов Т.Р., Алимов А.М., Хазипов Н.З. Иммуноферментный анализ в диагностике туберкулеза и лейкоза крупного рогатого скота. Казань, 2011. 148 с.; Nguyen V.K., Maes R.F. Evaluation of an enzyme-linked Immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine leukemia virus in serum and milk. J. Clin. Microbiol., 1993. 31 (4). P. 979-981; Simard C., Richardson S., Dixon P. Enzyme-linked Immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency. Can. J. Vet. Res., 2000. V. 64. P. 96-100; Van den Heuvel M. et al. Adaptation of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to determine the concentration of bovine leukemia virus p24 and optimal conditions for p24 expression in short-term cultures of peripheral blood mononuclear cell. J. Virol. Methods, 2003. V. 111 (1). P. 61-67).

Метод ИФА обладает значительно большей чувствительностью, по сравнению с РИД, позволяет автоматизировать процесс, тем самым уйти от субъективной оценки результатов реакции. Несмотря на очевидные достоинства, этот метод, как и РИД, не позволяет отличать колостральные антитела от активных антител, продуцирующихся при вирусной инфекции. В этом случае высокая чувствительность ИФА может затруднять оценку нормы продолжительности колострального иммунитета, так как позволяет выявлять материнские антитела в

более поздние сроки, чем РИД (Forschner E., Heiseke D. ELISA-Ablaufbestimmende Einflussparameter, deren Auswirkungen auf die Testsicherheit and praxisgerechte Prufmethoden. Tierarztl. Umschau., 1988. V. 43. P. 786-796; Klintevall K., Nasland K., Svedland G., Hajdu L., Linde N., Klingeborn B. Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum. J. Virol. Methods, 1991. V. 33. P. 319-333; Beier D., Blankenstein P., Fechner H. Possibilities and limitations for use of the polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of bovine leukemia virus (BLV). Dtsch. Tierarztl. Wochenschr, 1998. V. 105. P. 408-412).

В последние годы в систему диагностических мероприятий лейкоза крупного рогатого скота все больше внедряются методики связанные с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Мальцева Н.А. и др. ПЦР-диагностика лейкоза крупного рогатого скота. Ветеринарная патология, 2003. №1. С. 129-131; Rola M., Kuzmak J. The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR-ELISA. J. Virol. Methods, 2002. V. 99. P. 33-40).

Метод обладает максимальной чувствительностью и высокой специфичностью, позволяет более эффективно выявлять инфицированных ВЛКРС животных по сравнению с РИД и ИФА, а также отличить инфицированных телят от телят с колостральными антителами (Кузнецова Н.В., Кузнецов Н.В., Симонян Г.А. Использование полимеразной цепной реакции для выявления инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота. Ветеринария, 1997. №5. С. 12-15; Бусол В.А., Лиманская О.Ю., Лиманский А.П., Цымбал В.И. Тест-система для выявления ВЛКРС полимеразной цепной реакцией. Ветеринария, 1999. №6. С. 27-30; Апалькин В.А., Гулюкин М.И., Петров Н.И. Лейкоз крупного рогатого скота. СПб.: Петролазер, 2005. 106 с.; Косовский Г.Ю. и др. Диагностика лейкоза КРС с помощью праймеров к генам GAG и POL. Ветеринария, 2013. №8. С. 58-61; Eaves F.W., Molloy J.B., Dimmock C.K., Eaves L.E. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. Vet. Microbiol., 1994. V. 39. P. 313-321; Czarnik U., Kaminski S., Rulka J., Walawski K. Modified procedure for

PCR detection of proviral DNA of bovine leukaemia virus. Bull. Veter. Inst. in Pulawy, 2000. V. 44. №2. P. 143-146; Nagy D.W., Tyler J.W., Kleiboeker S.B., Stoker A. Use of a polymerase chain reaction assay to detect bovine leukosis virus in dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc., 2003. V. 222. №7. P. 983-985; Kuckleburg C.J., Chase C.C., Nelson E.A., Marras S.A., Dammen M.A., Christopher-Hennings J.J. Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time polymerase chain reactions. Vet. Diagn. Invest., 2003. V. 15. P. 72-76).

Широкое применение метода ПЦР в диагностике лейкоза, по мнению Н.В. Ковалюк с соавт. (2007)¹⁷ сдерживается следующими факторами: высокой стоимостью оборудования и реактивов для ПЦР, отсутствием сертифицированных диагностикумов и не до конца осознанным местом ПЦР-диагностики в системе противолейкозных мероприятий.

Ряд авторов С.В. Чичина с соавт. (2006)¹⁸; D. Beier et al. (1992)¹⁹; P. Blankenstein et al. (1998)²⁰; M. Licursi et al. (2002)²¹ сообщают, что довольно часто выявляется несоответствие результатов ПЦР и РИД. ПЦР-положительные особи выявляются среди РИД-отрицательных животных, а ПЦР-негативные, среди РИД-положительных. Это может свидетельствовать о низком уровне провирусной ДНК, находящейся ниже уровня чувствительности ПЦР, т.е. животные находятся либо в стойкой алимфатической стадии, либо в начальной стадии персистирующего лимфоцитоза, при котором уровень провирусной ДНК может быть низким.

Сравнительный анализ эффективности методов РИД, ИФА и ПЦР при диагностике ВЛКРС-инфекции, проведенный Н.Г. Двоглазовым (2009)²²,

¹⁷ Ковалюк Н.В., Сацук В.Ф., Мачульская Е.В. Современные методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота. Ветеринария Кубани, 2007. №1. С. 11-12.

¹⁸ Чичина С.В., Храпцов В.В. и др. Возможности и ограничения использования полимеразной цепной реакции в диагностике лейкоза крупного рогатого скота. Вестн. РАСХН, 2006. №6. С. 71-73.

¹⁹ Beier D., Blankenstein P., Fechner H. Possibilities and limitations for use of the polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of bovine leukemia virus (BLV) infection in cattle. Zentralbl. Veterinarmed. B., 1992. V. 39 (1). P. 69-77.

²⁰ Blankenstein P., Fechner H., Looman A., Beier A., Marguardt A., Ebner D. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of BLV proviruses a practical complement BLV diagnostics. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr., 1998. V. 111. P. 180-186.

²¹ Licursi M. et al. Genetic heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts. Virus Research, 2002. V. 86. №1/2. P. 101-110.

²² Двоглазов Н.Г. Оценка эффективности различных методов диагностики инфекции вируса лейкоза крупного рогатого скота: автореф. дисс. канд. вет. н. Новосибирск, 2009. 20 с.

показал, что ни один из них не позволяет выявить всех животных-вирусоносителей. Так, эффективность РИД составила 76,1%, ИФА – 83,3%, ПЦР – от 58,3 до 72,6%. Учитывая, что все существующие методы имеют недостатки, актуальными являются исследования по оптимизации регламента для каждого метода в системе оздоровительно-профилактических мероприятий при лейкозе.

По мнению Н.В. Ковалюк с соавт. (2007)²³, возможны, по крайней мере, три области успешного применения метода ПЦР в диагностике лейкоза: выявление носителей провирусной ДНК среди РИД и ИФА-отрицательных животных, исследование вновь завозимых в хозяйство животных и выявление зараженных телят в раннем возрасте.

1.2. Особенности иммунобиологических реакций при лейкозной инфекции

В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что нарушение функций иммунной системы является одним из патогенетических механизмов при возникновении лейкоза крупного рогатого скота. Так, в хозяйствах с высокой заболеваемостью лейкозом имеются значительные в процентном соотношении группы животных повышенного риска с иммунной недостаточностью, проявляющейся нарушением субпопуляций Т- и В- субпопуляций иммунокомпетентных клеток, а также повышенным содержанием недифференцированных лимфоцитов, неспособных выполнять иммунологические функции (Крикун В.А., Гулюкин М.И. Научно-практическое значение вирусо-иммуногенетической теории В.П. Шишкова в изучении лейкоза крупного рогатого скота (к 70-летию со дня рождения). Труды ВИЭВ, 1999. Т. 72. С. 12-15).

²³ Ковалюк Н.В., Сацук В.Ф., Мачульская Е.В. Современные методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота. Ветеринария Кубани, 2007. №1. С. 11-12.

По мнению П.Н. Смирнова (2007)²⁴ лейкозную инфекцию можно рассматривать в качестве, своего рода индикатора, выбирающего в стаде животных с врожденным (первичным) или приобретенным (вторичным) дефектом в одной или нескольких жизненно важных системах и, в первую очередь, иммунной. Кроме того, ВЛКРС сам по себе обладает иммунодепрессивными свойствами. Следовательно, отмечает автор, инфицированное вирусом лейкоза животное (с вторичным дефицитом, вызванным ВЛКРС) становится наиболее восприимчивой мишенью для многочисленных бактериальных и вирусных болезней.

В правомочности сказанного можно убедиться, проведя анализ по воспроизводству стада и частоте заболеваний, в том числе послеродовых, среди РИД-положительных и РИД-отрицательных коров. Так, Х.Б. Баймишев (2010)²⁵ отмечает, что инфицированность поголовья вирусом лейкоза существенно влияет на распространение акушерско-гинекологических заболеваний и патологии конечностей среди крупного рогатого скота. Иммунодефицитное состояние, вызванное жизнедеятельностью вируса лейкоза в организме, предрасполагает к широкому распространению незаразной патологии половых органов и заболеваний конечностей. По данным автора, наибольшее распространение среди зараженного лейкозом поголовья, получили маститы – 35,1 % и эндометриты – 29,3 %. В сравнении с РИД-негативными животными у РИД-позитивных маститы встречались в 3 раза чаще, а случаев эндометритов регистрировалось в 3,3 раза больше.

Зараженность коров вирусом лейкоза негативно сказалась на течении послеродовой стадии родов и способствовала ее удлинению, переходящему в задержание последа. Распространенность задержания последа у животных, инфицированных ВЛКРС возросла в 1,5 раза по сравнению со здоровыми

²⁴ Смирнов П.Н. Лейкоз крупного рогатого скота: проблемы и их решение на уровне субъекта Федерации. Ветеринария Кубани, 2007. №4. С. 4-6.

²⁵ Баймишев Х.Б. Незаразная патология у крупного рогатого скота в зависимости от инфицированности вирусом лейкоза. Матер. междунар. конф., посвящ. 80-летию Самарской НИВС Россельхозакадемии. Самара, 2010. С. 26-29.

(Баймишев Х.Б. Незаразная патология у крупного рогатого скота в зависимости от инфицированности вирусом лейкоза. Матер. междунар. конф., посвящ. 80-летию Самарской НИВС Россельхозакадемии. Самара, 2010. С. 26-29).

По данным ряда исследователей наиболее сильное угнетение иммунитета у больных лейкозом животных наблюдается в районах техногенного и радиоактивного загрязнения внешней среды (Храмцов В.В., Федоров В.С., Донник И.М. Экологическое неблагополучие отдельных территорий Уральского региона как фактор, повышающий риск заболевания крупного рогатого скота лейкозом. Труды Свердловской НИВС, 1995. Вып. 10. С. 58-61; Бударков В.А., Книзе А.В., Зарванская С.А. Изменения напряженности эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в Брянской области после аварии на Чернобыльской АЭС. Научные основы профилактики и лечения болезней животных. Екатеринбург, 2005. С. 17-22; Шкаева Н.А., Бударков В.А. Лейкоз крупного рогатого скота на радиоактивно загрязненной территории Челябинской области. Научные основы профилактики и лечения болезней животных. Екатеринбург, 2005. С. 183-189). Так, по данным И.М. Донник с соавт. (2005²⁶, 2007)²⁷ наиболее выраженная иммунная недостаточность была установлена у серонегативных коров неблагополучного по лейкозу стада техногенно загрязненной территории. Так, у данной группы животных наблюдалось снижение количества лейкоцитов, количества Т-, В-лимфоцитов и неспецифической резистентности, в среднем, на 15-35 % по сравнению с положительно реагирующими животными и в 1,2-1,5 раза по сравнению с коровами благополучного по лейкозу стада. В тоже время группа РИД-позитивных коров характеризовалась высоким содержанием лейкоцитов и лимфоцитов, повышенным значением показателей неспецифической

²⁶ Донник И.М., Шилова Е.Н., Шилов В.Б. Показатели иммунной системы инфицированного вирусом лейкоза крупного рогатого скота из территории промышленного загрязнения. Научные основы профилактики и лечения болезней животных. Екатеринбург: Уральское изд-во, 2005. С. 59-62.

²⁷ Донник И.М., Коритняк Б.М., Кадочников М.Ю., Беспмятных Е.Н. Повышение эффективности диагностики лейкоза крупного рогатого скота в техногенно загрязненных территориях. Аграрный вестник Урала, 2007. №3. 28-30.

резистентности. Авторы отмечают, что РИД-отрицательные коровы могут быть также инфицированы вирусом лейкоза, но не иметь специфических антител ввиду глубокой недостаточности иммунной системы, поэтому при проведении оздоровительных противолейкозных мероприятий, по их мнению, необходимо учитывать её состояние.

По мнению А.А. Евглевского с соавт. (2010)²⁸ в неблагополучных по лейкозу стадах есть все основания считать, что практически животные в той или иной степени инфицированы ВЛКРС. В абсолютном большинстве случаев инфекционный процесс при лейкозе не выходит из стадии бессимптомного носительства возбудителя. Это указывает на то, что организм животных проявляет устойчивость к ВЛКРС. Поэтому одним из важных элементов организации превентивных мер по управлению эпизоотическим процессом является раскрытие критических периодов в активации инфекционного процесса у инфицированных и потенциально инфицированных ВЛКРС животных, на основе методов оценки состояния иммунной системы.

Специфическая иммунная реакция на вирусы, как и на другие чужеродные антигены, в том числе и на антигены опухолей, осуществляются при комплексном взаимодействии лимфоидных Т- и В-клеток, а также макрофагов. Первые исследования изменений популяций лимфоидных клеток при энзоотическом лейкозе крупного рогатого скота были проведены в 1973 году De Lima и E. Mitscherlich²⁹. Авторами было отмечено высокое содержание В-клеток (56-67%), выявленных в реакции ЕАС-розеткообразования, у животных с сублейкемическим уровнем лейкоцитов, тогда как у здоровых количество В-клеток составило 17-29%. Затем появился еще ряд сообщений, свидетельствующих о преимущественном нарастании В-лимфоцитов при энзоотическом лейкозе крупного рогатого скота (Muscoplat C.C. et al.

²⁸ Евглевский А.А., Лебедев А.Ф., Буткин Е.И., Стебловская С.Ю. Иммунологические аспекты развития лейкозного процесса у глубокостельных и растелившихся коров. Ветеринарная патология, 2010. №2. С. 18-21.

²⁹ De Lima G., Mitscherlich E. Untersuchungen über die Zahl der B und T Lymphozyten von gesunden leukoseverdächtigen und leukosekranken kindern der Deutschen Schwarzbunten. Zentr. Bl. Vet. Med., 1973. Bd. 20. H. 3. S. 665-684.

Characteristics of lymphocyte response to phyto mitogenes comparison of responses of lymphocytes from normal and lymphocytotic cows. *Amer. J. Vet. Res.*, 1974. V. 35. №8. P. 1053-1055; Weiland E., Straub O.C. Frequency of surface immunoglobulin bearing blood lymphocytes in cattle affected with bovine leucosis. *Research Vet. Sci.*, 1975. V. 19. №1. P. 100-102; Takashima I., Olson C., Driscoll D.M., Baumgartener L.E. B-lymphocytes and T-lymphocytes in three types of bovine lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 1977. V. 59 (4). P. 1205-1209; Kajikawa O. et al. Use of alphanaphthyl acetate esterase staining to identify T lymphocytes in cattle. *Amer. J. Vet. Research*, 1983. V. 44. №8. P. 1549-1552; Esteban E.N., Thorn R.M., Ferrer J.F. Characterization of the blood lymphocyte population in cattle infected with the bovine leukemia virus. *Cancer Research*, 1985. V. 45. №7. P. 3225-3230). Все авторы отметили значительное увеличение количества В-клеток, типизируемых по наличию поверхностных иммуноглобулинов и по присутствию рецептора к третьему компоненту комплемента C₃ (11-28% В-клеток у здоровых животных, 59-70% у животных с персистентным лимфоцитозом). Также во всех работах отмечено, что развитие хронического лимфолейкоза сопровождается не только пролиферацией и увеличением количества В-лимфоцитов, но и уменьшением относительного содержания Т-лимфоцитов, что свидетельствует о подавлении клеточного иммунитета.

Исследования В.И. Ефимова с соавт. (1984)³⁰ показали, что у крупного рогатого скота, больного хроническим лимфолейкозом, изменяется соотношение популяций Т- и В-клеток: количество Т-лимфоцитов снижается до 30,7% в начальной и до 21,3% в терминальной стадиях, а количество В-лимфоцитов повышается до 38,7 и 52,7% соответственно на этих стадиях.

Есть сообщения, в которых приводятся данные о том, что у подавляющего большинства инфицированных ВЛКРС и больных лейкозом животных может отмечаться либо потеря, либо крайне низкая способность образовывать Е-розетки

³⁰ Ефимов В.И., Дрингляне А.А., Садаускас П.Б. Содержание разных популяций лимфоцитов и их функциональная активность в крови здоровых и больных хроническим лимфолейкозом животных. Иммунология и иммунотерапия лейкозов человека и животных. Ташкент, 1984. С. 77-78.

с эритроцитами барана (до 18% у одного животного), что, по мнению авторов, связано с блокадой рецепторов антителами к вирусу лейкоза и циркулирующими иммунными комплексами (Власенко В.С. Дудоладова Т.С., Бажин М.А., Новиков А.Н. Выявление животных с повышенным риском к заболеванию вирусом лейкоза крупного рогатого скота. Ветеринария и кормление, 2008. №4. С. 8-9; Дудоладова Т.С. Экспериментальное обоснование применения иммунологических методов в оценке предрасположенности к заболеванию крупного рогатого скота лейкозом: автореф. дисс. канд. биол. н. Новосибирск, 2012. 18 с.; Дудоладова Т.С. Иммунологические методы в оценке предрасположенности к лейкозу. Омск: «LAP LAMBERT», 2014. 109 с.). Эти результаты согласуются с данными В.Н. Шабалина и Л.Д. Серовой (1988)³¹, по мнению которых, лимфоциты большинства больных людей острым лимфобластным лейкозом не образуют Е-розетки.

Низкие показатели содержания Т-лимфоцитов также были отмечены другими исследователями (Смирнова О.В., Манчук В.Т., Савченко А.А. Состояние иммунного статуса и активность ферментов в лимфоцитах крови у больных на разных стадиях острого лимфобластного лейкоза. Медицинская иммунология, 2008. Т.10. №6. С. 543-550; Абакин С.С., Криворучко С.В., Пономаренко Д.Г., Борщев Е.А. Современный взгляд на особенности прижизненной диагностики и иммуногенез у телят в системе мать-потомство, при лейкозе крупного рогатого скота. Ветеринарная патология, 2010. №1. С. 6-9; Абакин С.С., Криворучко С.В., Дубравная Г.А. Коррекция иммунного статуса телят, инфицированных ВЛКРС. Сб. науч. тр. Ставропольского НИИ животноводства и кормопроизводства, 2012. Т.1. №5. С. 68-72). В то же время, по данным М.А. Староселова, Н.Ю. Басовой (2008)³² и М.П. Семененко с соавт. (2011)³³ у инфицированных ВЛКРС и больных лейкозом глубокостельных коров количество Т-лимфоцитов увеличивается.

³¹ Шабалин В.Н., Серова Л.Д. Клиническая иммуногематология. Л.: Медицина, 1988. 312 с.

³² Староселов М.А., Басова Н.Ю. Иммунобиологические показатели инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота и больных лейкозом коров в сравнении с интактными. Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского ГАУ, 2008. №40. С. 180-188.

А.А. Евглевский с соавт. (2010)³⁴ отмечают, что выраженные изменения в соотношении Т-хелперов и Т-супрессоров, в сторону увеличения последних свидетельствовало о явном снижении функционирования системы клеточного иммунитета. Таким критическим периодом в активации инфекционного процесса у инфицированных ВЛКРС и потенциально инфицированных животных, по мнению авторов, являлся ранний послеродовой период. Подтверждением этого предположения служил индекс соотношения Т-хелперов и Т-супрессоров. Если до родов он составлял у РИД (–) 2,9, то за 7 дней после родов снизился до 1,4. Еще более низкие показатели относительного содержания Т-лимфоцитов были выявлены у РИД (+) коров как до, так и после родов, при этом индекс до родов составлял 1,5, а на 7-й день после родов – 1,2.

О преобладании супрессорного типа иммунитета также сообщает в своей работе И.М. Донник с соавт. (2007)³⁵. Так, содержание Т-хелперов у РИД (+) коров было на 22,3% ниже, чем у РИД (–) неблагополучного стада и на 60,9% ниже, чем у коров благополучного стада. Соотношение Т-хелперов/Т-супрессоров у РИД (+) коров в 1,2 раза было ниже, чем у РИД (–) неблагополучного стада и в 2,5 раза ниже, чем у коров благополучного стада.

Важное значение при определении функционального состояния гуморального звена иммунной системы, по мнению В.Л. Тихонова (2005)³⁶, имеет определение видового и количественного состава иммуноглобулинов, их оценка у спонтанно инфицированного ВЛКРС и больного лейкозом крупного рогатого скота. При этом иммунопатогенетической особенностью для животных, контаминированных ВЛКРС без персистентного лимфоцитоза, является

³³ Семененко М.П., Басова Н.Ю., Кузьминова Е.В. Оценка биохимических, гематологических и иммунологических показателей у инфицированных вирусом лейкоза КРС, больных лейкозом и интактных коров. Ветеринария Кубани, 2011. №2. С. 22-23.

³⁴ Евглевский А.А., Лебедев А.Ф., Буткин Е.И., Стебловская С.Ю. Иммунологические аспекты развития лейкозного процесса у глубо костельных и растелившихся коров. Ветеринарная патология, 2010. №2. С. 18-21.

³⁵ Донник И.М., Коритняк Б.М., Кадочников М.Ю., Беспамятных Е.Н. Повышение эффективности диагностики лейкоза крупного рогатого скота в техногенно загрязненных территориях. Аграрный вестник Урала, 2007. №3. 28-30.

³⁶ Тихонов В.Л. Состояние сывороточных иммуноглобулинов при лейкозе крупного рогатого скота. Сиб. вестник сельскохозяйственной науки, 2005. №2. С. 102-109.

значительное повышение уровня антител IgM-класса при относительно невысоком колебании остальных изотипов, а для больных лейкозом – IgM иммунодефицит.

Аналогичную тенденцию наблюдали и другие исследователи. Так, R. Meiron et al. (1985)³⁷ установили снижение уровня IgM только у телят с проявляющимся лимфоцитозом, тогда как у животных с нормальным количеством лимфоцитов такой закономерности в изменении концентрации иммуноглобулинов не установлено. Также отмечено, что у телят, инфицированных ВЛКРС, уровень специфических антител класса IgM остается выше уровня специфических антител класса IgG. Z. Trainin et al. (1976)³⁸ выявили сниженный уровень или полное отсутствие IgM у 80% больных лейкозом коров, в то же время концентрация иммуноглобулинов других классов оставалась в пределах нормы. И наконец, R.M. Jacobs et al. (1980)³⁹ определили сниженную секрецию IgM лимфоцитами крови больных лейкозом или инфицированных ВЛКРС коров по сравнению с лимфоцитами от здоровых коров.

К. Ishihara et al. (1980)⁴⁰ при развитии лейкозного процесса у коров наблюдали постепенное повышение концентрации основного класса иммуноглобулинов (IgG), в то время как количество иммуноглобулинов класса IgM и IgA понижалось.

П.Н. Смирнов с соавт. (1992)⁴¹ отмечают, что гематологически больные-ВЛКРС-носители животные синтезируют, как правило, антитела, относящиеся к категории IgG, в то время как в случаях инфицирования крупного рогатого скота вирусом лейкоза чаще всего выявляются антитела группы IgM. Однако это не

³⁷ Meiron R. et al. Humoral and cellular responses in calves experimentally infected with bovine leukemia virus (BLV). *Vet. immunol. and immunopathol.*, 1985. V. 9. P. 105-114.

³⁸ Trainin Z. et al. IgG and IgM antibodies in normal and leukaemic cattle. *J. Comp. Pathol.*, 1976. V. 86. №4. P. 571-580.

³⁹ Jacobs R.M., Valli V.E.O., Wilkie B.N. Inhibition of lymphocyte blastogenesis by sera from cows with lymphosarcoma. *Am. J. Vet. Res.*, 1980. №41. P. 372-376.

⁴⁰ Ishihara K., Ohtani T., Kitagawa H. Clinical studies on bovine leukemia in Japanese black cattle IV. Serum immunoglobulin concentrations in leukemia cattle and those with negative and positive serum antibodies to bovine leukemia virus. *Ypn. J. Vet. Sci.*, 1980. V. 42 (4).

⁴¹ Смирнов П.Н., Незавитин А.Г., Смирнова В.В. и др. Проблема лейкоза животных. Новосибирск: Советская Сибирь, 1992. 476 с.

является безусловным, поскольку в процессе развития лейкозной патологии могут иметь место периоды переключения продукции антител с IgG на IgM и обратно.

Оценивая состояние естественной резистентности инфицированных новорожденных телят и телят 4-6-месячного возраста С.С. Абакиным и С.В. Криворучко (2013)⁴² установлено уменьшение концентрации IgA и M.

Молекулы иммуноглобулинов, в частности IgG, не только играют важную роль в процессах связывания и инактивации антигенов, но и обуславливают зависимость от антител К-клеточную цитотоксическую активность лимфоцитов. Специфическая цитотоксическая активность лимфоцитов играет важную роль в клеточном, в том числе и в противолейкемическом иммунитете.

Установлено, что связывание IgG лимфоцитами обусловлено наличием на их поверхности рецепторов для Fc-фрагмента молекулы (Fc-рецептор), которые были выявлены на поверхности В-лимфоцитов, части Т-лимфоцитов, К-клеток, макрофагов, некоторых полинуклеаров и клеток, инфицированных вирусом герпеса (Thoenes J., Stein H. Properties of an Fc gamma-binding protein isolated from human leukemic B cells. *J. exp. Med.*, 1979. V. 150. P. 1049-1066). Эти рецепторы были обнаружены на поверхности лимфоидных клеток крупного рогатого скота (Reeves J.H., Renshow H.W. Surface membrane markers on bovine peripheral blood lymphocytes. *Am. J. Vet. Res.*, 1977. V. 39 (6). P. 917-923; Surovas V.M., Pieskus J., Tamosiunas V.I., Sadauskas P. T μ and T γ cell subsets in normal and leukemic cattle. *Thymus*, 1982. V. 4. P. 31-43).

Функциональное значение этих рецепторов при развитии лейкемического процесса было изучено в работах некоторых авторов. Так, В.И. Тамошюнас с соавт. (1983)⁴³ установил, что в крови больных лейкозом коров выявляется в 3 раза больше лимфоцитов с рецепторами для Fc-фрагмента, чем в крови здоровых коров, причем лейкемические лимфоциты связывают в 17 раз большее количество

⁴² Абакин С.С., Криворучко С.В. Новые подходы в диагностике и оздоровлении стад от вирусов лейкоза и иммунодефицита крупного рогатого скота. *Ветеринарная патология*, 2013. №1. С. 36-39.

⁴³ Тамошюнас В.И., Милюкене В.В., Дикинене Н.П. Определение и исследование связывающей способности рецепторов для Fc-фрагмента IgG лимфоидных клеток крови крупного рогатого скота в норме и при лейкозе. *Иммунология*, 1983. №5. С. 34-37.

молекул IgG₂, чем IgG₁. Другими исследованиями (Тамошюнас В.И. Иммунологическая характеристика Т- и В-лимфоцитов крупного рогатого скота при лимфолейкозе: автореф. дисс. д. биол. н. М., 1985. 34 с.; Суровас В.М., Тамошюнас В.И. Иммунологическое изучение Т- и В-лимфоцитов у коров в норме и при хроническом лимфолейкозе. Цитология, 1986. Т. 28. №4. С. 438-442; Surovas V.M., Tamoshiunas V.I. Immunological study of the T- and B-lymphocytes in normal cows and in chronic lympholeukemia. Tsitologija, 1986. V. 28 (4). P. 437-442) установлено, что у больных по сравнению со здоровыми животными наблюдается изменение соотношения субпопуляций Т-лимфоцитов, имеющих рецептор к Fc-фрагментам IgM (Т_μ-клетки, обладающие хелперными свойствами) и IgG (Т_γ-клетки, супрессоры), за счет увеличения Т_γ-клеток.

Образование иммунных комплексов в циркуляции – физиологически защитное явление, цель которого – удаление из организма антигенов, образующихся в организме, а также постоянно проникающих в организм через желудочно-кишечный тракт, дыхательные пути. В норме эти комплексы обычно быстро подвергаются фагоцитозу и разрушению. Патологический их характер проявляется в тех случаях, когда оказывается недостаточным фагоцитоз или вследствие первичного ослабления фагоцитирующей способности клеток, или в результате избыточного образования иммунных комплексов (Ляшенко В.А., Дроженников В.А., Молотковская И.М. Механизмы активации иммунокомпетентных клеток. М.: Медицина, 1988. 240 с.). При образовании чрезмерного количества они могут циркулировать в крови длительное время, откладываясь в органах и тканях, вызывая угнетение иммунитета к опухолям (Воронин Е.С., Петров А.М., Серых М.М., Дервишов Д.А. Иммунология. М.: Колос-Пресс, 2002. 408 с.).

Имеющиеся немногочисленные данные, касающиеся исследований циркулирующих иммунных комплексов у животных при лейкозе, носят противоречивый характер. С одной стороны, резкой разницы между содержанием циркулирующих иммунных комплексов у больных лейкозом и здоровых коров не

установлено (Пешкус Ю.К. Жилайтис В.И., Тамошюнас В.И. Иммунные комплексы сыворотки крови крупного рогатого скота при лейкозе. Проблемы ветеринарной иммунологии. М.: Агропромиздат, 1985. С. 67-70; Гаврилова Г.А., Бахметьева С.В. Неспецифическая резистентность коров, инфицированных ВЛКРС и больных лейкозом. Сиб. вестник сельскохозяйственной науки, 2005. №1. С. 118-121), однако Р.Т. Маннапова с соавт. (2005)⁴⁴, В.С. Власенко и М.А. Бажин (2009)⁴⁵ приводят данные, свидетельствующие о том, что концентрация циркулирующих иммунных комплексов у больных лейкозом животных значительно повышена. По мнению С.И. Логинова (2003⁴⁶, 2005⁴⁷), концентрация иммунных комплексов в крови животных увеличивается в зависимости от стадии лейкоза, однако при значительном лимфоцитозе ($25,0 \times 10^9/\text{л}$ и более) может снижаться.

И.С. Пономарева с соавт. (2009)⁴⁸ отмечают, что в максимальном количестве циркулирующие иммунные комплексы содержатся в пробах сыворотки крови, полученных от взрослых коров, имеющих резко положительную реакцию при исследовании методом ИФА. При этом авторы приходят к выводу о том, что инфицирование ВЛКРС приводит к увеличению уровня ЦИК за счет накопления значительного количества иммуноглобулинов в сыворотке крови. Однако Я.В. Кисера, Р.И. Кравцов (2008)⁴⁹ наблюдали повышение ЦИК с 4-го месяца после экспериментального инфицирования, тогда как уровень IgG_1 , IgG_2 и IgM снижался.

⁴⁴ Маннапова Р.Т., Якупов Т.Р., Рашитов А.В. Реакция ЦИК и иммуноглобулинов в организме больных лейкозом коров. Повышение эффективности и устойчивости развития агропромышленного комплекса: материалы Всерос. науч.- практ. конф. Ч. III. Уфа, 2005. С. 219-220.

⁴⁵ Власенко В.С., Бажин М.А. Оценка иммунного статуса крупного рогатого скота при лейкозе. Сиб. вестник сельскохозяйственной науки, 2009. №9. С. 64-69.

⁴⁶ Логинов С.И. Иммунные комплексы при лейкозе крупного рогатого скота. Ветеринарная патология, 2003. №1. С. 85-87.

⁴⁷ Логинов С.И. Системный эколого-эпизоотологический анализ совокупного риска развития лейкоза крупного рогатого скота: автореф. дис. ... д. биол. н. Новосибирск, 2005. 45 с.

⁴⁸ Пономарева И.С., Сычева М.В., Поляков М.А. Эпизоотологический мониторинг, сравнительная диагностика и иммунологический тест при оценке статуса коров в условиях неблагополучия по лейкозу в Оренбуржье. Известия Оренбургского ГАУ, 2009. Т. 3. №23-1. С. 82-83.

⁴⁹ Кисера Я.В., Кравцов Р.И. Особенности показателей физиологического статуса у инфицированного вирусом лейкоза крупного рогатого скота. Современные проблемы диагностики, лечения и профилактики инфекционных болезней животных и птиц. Екатеринбург: Уральское изд-во, 2008. С. 219-222.

В некоторых работах также отмечено повышение циркулирующих иммунных комплексов в организме телят, полученных от РИД (–) и особенно от РИД (+) коров-матерей (Власенко В.С. и др. Иммунный статус у здорового и родившегося от матерей, инфицированных вирусом лейкоза, молодняка крупного рогатого скота. Патология продуктивных и непродуктивных животных, рыб и птиц. Омск, 2009. С. 23-29; Галеев Р.Ф., Мотавина Л.И. Иммунобиологический статус потомства коров, инфицированных вирусом лейкоза. Матер. Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 10-летию факультета пищевых технологий. Уфа: ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ, 2011. С. 60-67). Помимо этого, С.С. Абакиным с соавт. (2010)⁵⁰ установлено увеличение уровня ЦИК у внутриутробно инфицированных телят от рождения до 3-х месячного возраста.

Среди интегральных показателей иммунобиологической защиты наиболее адекватным параметром является фагоцитарная активность нейтрофилов крови, которая детерминирована генетически и необычайно жестко поддерживается механизмами гомеостатической регуляции. Системой фагоцитоза фиксируются многочисленные изменения внутренней среды организма. Являясь мощными эффекторами, фагоциты превращаются в некий узел связи, своего рода стратегическую мишень, через которую трансформируются все реакции. Особенно показательны в этом отношении нейтрофилы. Обмениваясь в циркуляции каждые 4-5 часов, они как бы фотографируют сдвиги, которые происходят в течение этого периода, являясь своеобразным зеркалом гомеостаза (Адо А.Д., Маянский А.Н. Современное состояние учения о фагоцитозе. Иммунология, 1983. №1. С. 20-26; Сабанчиева Ж.Х. Состояние фагоцитарной системы крови в НСТ-тесте у больных ВИЧ-инфекцией. Успехи современного естествознания, 2006. №3. С. 44-45).

⁵⁰ Абакин С.С. и др. Современный взгляд на особенности прижизненной диагностики и иммуногенез у телят в системе мать-потомство, при лейкозе крупного рогатого скота. Ветеринарная патология, 2010. №1. С. 6-9.

Г.А. Симонян с соавт. (2009)⁵¹ отмечают, что у инфицированных коров показатели фагоцитарной активности составили 72,7 %, у интактных в отношении лейкозной инфекции 81,3 %; фагоцитарного числа соответственно 11,0 и 13,6 м.т. и фагоцитарного индекса – 8,1 и 11,1 м.т., т.е. были достоверно ниже, чем соответствующие значения у здоровых. Аналогичная тенденция в траектории показателей фагоцитарной активности выявлена другими исследователями (Смирнов П.Н., Храмцов В.В., Джупина С.И. и др. Проблемы адаптации сельскохозяйственных животных в Сибири. Новосибирск, 1995. 257 с.; Будулов Н.Р. Респираторные болезни крупного рогатого скота в Дагестане: автореф. дисс. д. вет. н. Краснодар, 2009. 37 с.).

Результаты иммунологических исследований коров, инфицированных ВЛКРС и больных лейкозом, свидетельствуют об изменении активности поглощения фагоцитами периферической крови антигенных компонентов, на что указывают возросшие фагоцитарное число и фагоцитарный индекс. У больных животных достоверно снижаются показатели, характеризующие активность микробицидной системы фагоцитов, но увеличивается их поглотительная способность, при этом фагоцитарная активность остаётся без каких либо существенных изменений (Семененко М.П., Басова Н.Ю., Кузьминова Е.В. Оценка биохимических, гематологических и иммунологических показателей у инфицированных вирусом лейкоза КРС, больных лейкозом и интактных коров. Ветеринария Кубани, 2011. №2. С. 22-23; Мотавина Л.И., Иванов А.И. Иммунобиологический статус коров-матерей, больных лейкозом и телят инфицированных ВЛКРС, внутриутробно и спонтанно. Научное обеспечение устойчивого развития АПК. Уфа: ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ, 2011. С. 147-149).

⁵¹ Симонян Г.А., Паршина О.Н., Магер С.Н., Иванов О.П. Иммунитет и естественная резистентность у крупного рогатого скота при инфекции ВЛКРС и лейкозе. Труды ВИЭВ, 2009. Т. 75. С. 571-575.

По данным И.М. Донник с соавт. (2006)⁵² у серонегативных коров неблагополучного по лейкозу стада наблюдалось снижение фагоцитарной активности и фагоцитарного числа, когда как группа РИД (+) коров характеризовалась повышенным значением показателей неспецифической резистентности. О наиболее активной способности поглощения микробных клеток нейтрофилами периферической крови коров, инфицированных вирусом лейкоза, также сообщает Т.А. Агаркова (2001)⁵³, однако, по основному, по мнению автора, показателю – фагоцитарному числу разницы между коровами изучаемых групп не выявлено.

Некоторые авторы отмечают, что фагоцитарная активность нейтрофилов свободных от ВЛКРС и инфицированных вирусом лейкоза животных не имела существенных отличий (как и фагоцитарный индекс и фагоцитарное число). Однако было выявлено достоверное увеличение элиминирующей способности крови у коров, реагирующих в высоких титрах, что свидетельствовало о высокой функциональной нагрузке на микрофаги (Гаврилова Г.А., Бахметьева С.В. Неспецифическая резистентность коров, инфицированных ВЛКРС и больных лейкозом. Сиб. вестник сельскохозяйственной науки, 2005. №1. С. 118-121).

Важным показателем естественной неспецифической резистентности организма является функциональное состояние нейтрофильных гранулоцитов, ответственных за процесс фагоцитоза и внутриклеточное переваривание инфекционных агентов. Одним из ранних проявлений реактивности нейтрофилов служит активация кислородзависимого метаболизма – респираторный взрыв, который возникает в процессе фагоцитоза. Наиболее информативным методом исследования кислородзависимого метаболизма нейтрофильных гранулоцитов является реакция восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест).

⁵² Донник И.М., Шилова Е.Н., Шилов В.Б. Повышение эффективности диагностики лейкоза крупного рогатого скота в техногенно загрязненных территориях. Вестник Алтайского ГАУ, 2006. №5 (25). С. 37-39.

⁵³ Агаркова Т.А. Сравнительная оценка показателей опсоно-фагоцитарной реакции у коров в зависимости от сезона года и в связи с лейкозной инфекцией. Инфекционная патология животных. Омск, 2001. С. 273-274.

Так, А.А. Орлов (2004)⁵⁴ отмечает, что по мере прогрессирования лейкоза у крупного рогатого скота (стадия гематологических изменений) в составе нейтрофилов начинают преобладать клетки с пониженной функциональной активностью, хотя в целом наблюдается повышение уровня кислородзависимого метаболизма полиморфноядерных нейтрофилов по НСТ-тесту и активности в миелопероксидазной реакции, что свойственно оксидативному стрессу.

О изменениях спонтанного НСТ-теста, свидетельствующих о повышении функционально-метаболической активности нейтрофилов и напряженности неспецифической резистентности организма у животных, инфицированных ВЛКРС, а также серонегативных коров неблагополучного стада указывают А.И. Иванов и В.С. Власенко (2014⁵⁵, 2015⁵⁶). При этом у отдельных коров, находящихся в гематологической стадии заболевания, число гранулоцитов, способных восстанавливать НСТ, резко снижено, что, по мнению авторов, может быть следствием угнетения гранулопоэза лейкозным процессом.

Также установлено, что у больных острым лейкозом людей без признаков инфекционных осложнений число гранулоцитов, способных восстанавливать нитросиний тетразолий (НСТ) снижено, тогда как при развитии у таких больных инфекционно-воспалительных осложнений, содержание НСТ-положительных нейтрофилов резко возрастает, значительно превышая нормальные величины (Логинский В.Е., Короткий В.В. Тест восстановления нитросинего тетразолия у здоровых людей и больных острым лейкозом. Лабораторное дело, 1977. №1. С. 3-5).

О нарушении первичных физико-химических процессов в организме, в том числе об изменении содержания активных свободных радикалов могут

⁵⁴ Орлов А.А. Механизмы лейкозного процесса у крупного рогатого скота в условиях Нижегородской области: Клинико-экспериментальное исследование: автореф. дисс. канд. вет. н. Саранск, 2004. 19 с.

⁵⁵ Иванов А.И., Власенко В.С. Изменение активности спонтанного НСТ-теста у крупного рогатого скота при лейкозе. Аграрная наука – сельскохозяйственному производству Сибири, Монголии, Казахстана и Болгарии. Новосибирск, 2014. Ч. 2. С. 105-106.

⁵⁶ Иванов А.И., Власенко В.С. Применение теста с нитросиним тетразолием для выявления животных с повышенной чувствительностью к лейкозной инфекции. Достижения науки и техники АПК, 2015. Т. 29. № 4. С. 61-62.

свидетельствовать изменения интенсивности сверхслабого свечения. Так, Д.Д. Лаптевой с соавт. (2010)⁵⁷ получены данные о том, что отрицательные в РИД сыворотки крови имеют низкие показатели биохемилюминесценции. Положительные в РИД сыворотки показали более высокие уровни биохемилюминесценции.

Значительное место в интенсивности фагоцитоза как в норме, так и при патологии занимает лизоцим, выполняющий в организме важные биологические функции и, в первую очередь, стимулирующее действие на фагоцитоз. Поэтому выявление количественных изменений лизоцима (лизоцимной активности) сыворотки крови животных может служить информативным показателем.

Так, лизирующие свойства лизоцима в сыворотке крови у коров, инфицированных ВЛКРС, составили 9,37 %, в то время как у интактных животных показатель лизоцимной активности был достоверно выше. В то же время средний показатель бактерицидной активности сыворотки крови серонегативных коров был на 5,17% выше, чем у животных серопозитивной группы, и на 5,42% чем у гематологически больных животных (Симонян Г.А., Паршина О.Н., Магер С.Н., Иванов О.П. Иммуитет и естественная резистентность у крупного рогатого скота при инфекции ВЛКРС и лейкозе. Труды ВИЭВ, 2009. Т. 75. С. 571-575).

Также отмечается, что организме телят, полученных от РИД (-) и РИД (+) коров-матерей развиваются первичные иммунодефициты, характеризующиеся понижением лизоцимной и бактерицидной активности сыворотки крови (Мотавина Л.И. Эпизоотология, иммунобиологический статус коров-матерей и телят, инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота: автореф. дисс. канд. биол. н. Уфа, 2012. 24 с.).

⁵⁷ Лаптева Д.Д., Закотеев Ю.А., Адамушкин В.Е. Корреляция спонтанной биохемилюминесценции в сыворотке крови и результатов РИД у коров при диагностике лейкоза. Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана, 2010. Т.201. С. 62-65.

Кроме того, снижение лизоцимной активности у инфицированных ВЛКРС и больных лейкозом животных наблюдали В.Л. Никифорова (1999)⁵⁸, П.Н. Смирнов (1995)⁵⁹, а также Г.А. Гаврилова и С.В. Бахметьева (2005)⁶⁰.

М.П. Семененко с соавт. (2011)⁶¹ отмечают, что лизоцимная активность сыворотки крови интактных глубокостельных коров ниже на 32,8 % по сравнению с инфицированными и на 31,7% - больными лейкозом коровами. В то же время бактерицидная активность сыворотки крови интактных животных на 38,8% ниже, чем у инфицированных и на 20,6% выше, чем у больных.

При оценке естественной резистентности экспериментально инфицированных ВЛКРС животных не удалось выявить каких-либо различий между показателями бактерицидных свойств сыворотки крови у инфицированных ВЛКРС и интактных на протяжении всего периода наблюдения. В то же время лизоцимная активность сыворотки крови, наоборот, была повышена (Ерова Л.М. Функциональная активность иммунокомпетентной системы крупного рогатого скота при ассоциативном развитии инфекций лейкоза и туберкулеза: автореф. дисс. канд. вет. н. Новосибирск, 1996. 22 с.).

Для более полного представления происходящих процессов в организме инфицированных животных рядом ученых дана биохимическая оценка обмена веществ.

В оценке биохимических показателей большая роль отводится индикаторным ферментам (АлАТ – аланинаминотрансфераза и АсАТ – аспаргатаминотрансфераза). Так, И.А. Гизатуллин и Ф.Г. Гизатуллин (2011)⁶² установили снижение активности этих ферментов у серопозитивных

⁵⁸ Никифорова В.Л. Показатели естественной резистентности организма крупного рогатого скота инфицированного вирусом лейкоза. Труды ВИЭВ, 1999. Т. 72. С. 103-108.

⁵⁹ Смирнов П.Н., Храмцов В.В., Джупина С.И. и др. Проблемы адаптации сельскохозяйственных животных в Сибири. Новосибирск, 1995. 257 с.

⁶⁰ Гаврилова Г.А., Бахметьева С.В. Неспецифическая резистентность коров, инфицированных ВЛКРС и больных лейкозом. Сиб. вестник сельскохозяйственной науки, 2005. №1. С. 118-121.

⁶¹ Семененко М.П., Басова Н.Ю., Кузьминова Е.В. Оценка биохимических, гематологических и иммунологических показателей у инфицированных вирусом лейкоза КРС, больных лейкозом и интактных коров / М.П. Семененко, // Ветеринария Кубани.- 2011.- №2.- С. 22-23.

⁶² Гизатуллин И.А., Гизатуллина Ф.Г. Изменения некоторых биохимических показателей крови и молока коров, инфицированных ВЛКРС. Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана, 2011. Т. 217. С. 137-142.

коров. В то же время Г.А. Симонян с соавт. (2009)⁶³ отмечают о повышении активности АсАТ с развитием лейкозного процесса.

Кроме того, инфицирование вирусом лейкоза крупного рогатого скота характеризуется изменениями белкового и аминокислотного обмена организма животных (Магер С.Н. Биологическая характеристика потомства здоровых и больных лейкозом коров, и ассоциативное развитие лейкоза и туберкулеза у животных: автореф. дисс. д. биол. н. Новосибирск, 2006. 40 с.; Гизатуллин И.А., Гизатуллина Ф.Г. Изменения некоторых биохимических показателей крови и молока коров, инфицированных ВЛКРС. Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана, 2011. Т. 217. С. 137-142).

Таким образом, литературные данные результатов разных исследователей приводят к убеждению, что вирус лейкоза в целом угнетает иммунокомпетентную систему, внося диссонанс в ее функционирование, нарушая последовательность протекания иммунологических реакций. Снижение факторов естественной резистентности является, по-видимому, одной из причин, вызывающих ухудшение состояния организма, причем чаще бессимптомно, приводящего в дальнейшем к прогрессированию процесса.

1.3. Действие левамизола на клетки иммунной системы

Левамизол представляет собой довольно простое химическое соединение, которое вначале применяли как противоглистное средство, однако в процессе испытания его как противонематодного препарата был отмечен ряд дополнительных эффектов, в частности влияние его на механизмы иммунологической защиты. Это действие левамизола впоследствии было изучено в экспериментах на животных и при заболеваниях у человека (Асквит П.

⁶³ Симонян Г.А., Паршина О.Н., Магер С.Н., Иванов О.П. Иммуитет и естественная резистентность у крупного рогатого скота при инфекции ВЛКРС и лейкозе. Труды ВИЭВ, 2009. Т. 75. С. 571-575.

Клиническое применение левамизола: критический обзор. В кн.: Последние достижения в клинической иммунологии / Под ред. Р.А. Томпсона. М.: Медицина, 1983. С. 465-472).

Данные относительно действия левамизола на иммунные функции неоднозначны, однако большинство исследователей приходят к выводу, что основное действие левамизола проявляется в восстановлении функций лимфоцитов и фагоцитов в случае их повреждения; на выработку антител и содержание иммуноглобулинов в сыворотке левамизол практически не влияет (Renoux G., Renoux M., Morant P.H., Dartigues P. Action immunostimulante du levamisole sur les personnes agexes. Rev. Med. Tours, 1973. P. 797-801; Flannery G.R., Rolland J.M., Nairn R.C. Levamisole. Lancet, 1975. V. 1. P. 750-751; Fischer G.W., Ball M.W., Crumrine M.H., Bass J.W. Immunopotential and antiviral chemotherapy in a st kling rat model of hepes virus encephalitis. Journal of infectious diseases, 1976. V. 153. P. 217-220; Di Perri T. Auteri A., Pasini F.L., Mattioli M. A weekly oral dose of levamisole in the treatment of rheumatoid arthritis associated with E-rosette lymphocyte reduction. European Journal of Rheumatology, 1978. V. 1. P. 155-164). Имея в своем составе имидазольное кольцо, левамизол может влиять на уровень циклических нуклеотидов в лимфоцитах, тем самым оказывать действие на функции этих клеток. Благодаря способности воздействовать на белки он может образовать гаптенное соединение (Turk J.L., Parker D. The immunostimulating effect of levamisole related to its sensitizing ability. Unpublished observations, 1978).

G. Versijp et al., (1975)⁶⁴ отмечают, что этот препарат повышает фагоцитарную активность полиморфноядерных лейкоцитов и макрофагов, если она нарушена (Verhaegen H., De Cock W., De Cree J. In vitro phagocytosis of candida albicans by peripheral polymorpho-nuclear neutrophils of patients with recuren infections. Case reports of serum-dependent abnormalities. Biomedicine, 1976. V. 24. P. 164-170), в тоже время некоторые авторы (Renoux G., Renoux M., Aycardi D.

⁶⁴ Versijp G., Van Zwet T.L., Van Furth R. Levamisole and functions of peritoneal macrophages. Lancet, 1975. i. P. 798.

Levamisole promotes the killing of *Listeria monocytogenes* by macrophages. Federation Proceedings (Abstr.), 1976. V. 35. P. 336; Schmidt M.E., Douglas S.D. Effect of levamisole on human monocyte function and immunoprotein receptors. Clinical Immunology and Immunopathology, 1976. V. 6. P. 299-305) приводят данные о том, что левамизол практически не оказывает влияния на нормальные лейкоциты. Стимулирующее действие левамизола распространяется как на индуцированный антигеном фагоцитоз со стороны макрофагов (Schulze H.J., Raettig H.J. Steigerung der Activitat von Peritoneal-macrophages der maus durch levamisole. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft fur Innere Medizin, 1973. V. 79. P. 622-623), так и на фагоцитоз частиц, сенсibilизированных антителами, а также на способность фагоцитов к прилипанию и активность рецепторов для антител и комплемента (Olivera Lima A., Javierre M.Q., Siasda Silva W., Setle D. Camara Immunological phagocytosis – effect of drugs on phosphodiesterase activity. Experientia, 1974. V. 30. P. 945-946; Schreiber A.D., Parsons J., Cooper R.A. Effect of levamisole on the human monocyte IgE receptor. Blood, 1975 (Abstr.). V. 46. P. 1018; Schmidt M.E., Douglas S.D. Effect of levamisole on human monocyte function and immunoprotein receptors. Clinical Immunology and Immunopathology, 1976. V. 6. P. 299-305). При действии левамизолом на лейкоциты периферической крови больных ревматоидным артритом отмечается усиление способности полиморфноядерных клеток к фагоцитозу частиц латекса (Wynne K.M., Dieppe P.A., Husrisson E.C. Levamisole and phagocytosis in rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis., 1980, in press).

Установлено, что действием левамизола усиливается миграция полиморфноядерных клеток, причем как донорских, так и клеток больных (Anderson R., Glover A., Koornhof H.J., Robson A.R. In vitro stimulation of neutrophil motility by levamisole – maintenance of GMP levels in chemo-tectically stimulated levamisole-treated neutrophils. Immunology, 1976. V. 117. P. 428-432; Olson J.A., Nelms D.C., Silverman S., Splitter L.F. Levamisole – an new treatment for recurrent aphthous stomatis. Oral Surgery, 1976. V. 41. P. 588-600), однако в некоторых

случаях этого не наблюдалось (Mowat A.G. Levamisole and cellular immunity in rheumatoid arthritis – a review. *Journal of Rheumatology*, 1978. V. 5 (suppl. 4). P. 55-61).

По мнению V.J. Stecher et al., (1976)⁶⁵ хемотаксис лейкоцитов может подвергаться ингибции, тогда как другие – отмечают стимулирующее влияние левамизола (Gallin J.I., Wolff S.M. Leucocyte chemotaxis – physiological consideration and abnormalities. *Clinics in Haematology*, 1975. V. 4. P. 567-607; Hill H.R., Quie P.G. Defective neutrophil chemotaxis associated with hyperimmunoglobulinemia E. In: *The phagocytic cell in host resistance* (J.A. Bellanti, D.H. Dayton, eds.). New York: Raven Press, 1975. 249 p.). Если препарат применять у здоровых доноров в больших дозах, то можно вызвать даже супранормальный хемотаксис (Schmidt M.E., Douglas S.D. Effect of levamisole on human monocyte function and immunoprotein receptors. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1976. V. 6. P. 299-305). С другой стороны, при изучении хемотаксиса в строго стандартизованной системе, где обнаруживается четкая зависимость доза – ответ, применение очень высоких доз препарата вызывает ингибцию хемотаксиса (Mowat A.G. Neutrophil chemotaxis in rheumatoid arthritis. Effect of D-penicillamine, gold salts and levamisole. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1978b. V. 37. P. 1-8), чем по-видимому, можно объяснить противоречивость данных о действии левамизола на хемотаксис.

Также весьма разнообразные результаты были получены при изучении стимуляции лимфоцитов периферической крови, селезенки и тимуса здоровых лиц и животных под действием митогенов и антигенов, в том числе аллогенных клеток. В частности было установлено, что левамизол восстанавливает депрессированные функции лимфоцитов до нормы при исследовании клеток, пораженных заболеваниями или лечащихся иммунодепрессантами лиц (Hadden J.W., Coffey R.G., Hadden E.M., Lopez-Corrales E., Sunshine G.H. Effects of

⁶⁵ Stecher V.J., Liauw L., China G. Effect of levamisole on adherence and chemotaxis of leucocytes. *Federal Proceedings*, 1976 (Abstr.). V. 35. P. 531.

levamisole and imidazole on lymphocyte proliferation and cyclic nucleotide levels. *Cellular Immunology*, 1975. V. 20. P. 98-103; Merluzzi V.J., Kaiser C.W., Cooperband S.R. Differential effects of levamisole on immune lymphoid tissues. *Federation Proceedings*, 1976 (Abstr.). V. 35. P. 334; Renoux G., Renoux M., Palat A. Influences of levamisole on T-cell reactivity and on survival of intractable cancer patients. In: *Modulation of host immune resistance in the prevention and treatment of induced neoplasia*, 1977. Fogarty International Centre Proceedings №28, US Government printing Office, Washington, DC, USA, P. 77-79; Scheinberg M.A., Santos L., Mendes N.F., Musatti C. Decreased lymphocyte response to PHA, Con-A and calcium ionophore (A23187) in patients with RA and SLE and reversed with levamisole in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 1978. V. 21. P. 326-329), усиливает цитотоксическое действие лимфоцитов на аллогенные клетки (Persico F.J., Potter W.A. The effect of levamisole on an in vitro model of cellular immunity. Presented at the first international conference on modulation of host immune resistance in the prevention or treatment of induced neoplasias. Nethesda, Maryland, USA, December, 1974), а также специфическую лимфоцитотоксичность против клеток меланомы (Shibata H.R., Jery L.M., Lewis M.G., Mansell P.W., Capen A., Marquis G. Immunotherapy of human malignant melanoma with irradiated tumor cells, oral bacillus calmette-guerin and levamisole. *Annals of New York Academy of Science*, 1976. V. 277. P. 355-366). В то же время имеются сообщения о снижении цитотоксического потенциала лимфоцитов против аллогенных опухолевых клеток после воздействия левамизолом (Mantovani A., Spreafico F. Allogeneic tumour enhancement by levamisole, new immunostimulatory compound – studies on cell-mediated immunity and humoral antibody response. *European Journal of Cancer*, 1975. V. 11. P. 537-544).

Левамизол действует на Т-лимфоциты, вызывая восстановление их содержания в крови у больных с исходным дефицитом розеткообразующих Т-клеток (Levo Y., Rotter V., Ramot B. Restoration of cellular immune response by levamisole in patients with Hodgkin's disease. *Biomedicine*, 1975. V. 23. P. 198-200;

Ramot B., Beniaminov M., Shoham C.H., Rosenthal E. Effect of levamisole on E-rosette-forming cells in vivo and in vitro in Hofgkin's disease. *New England Journal of Medicine*, 1976. V. 294. P. 809-811; Verhaegen H., De Cree J., De Cock W., Verbruggen F. Restoration by levamisole of low E-rosette forming cells in patients suffering from various diseases. *Clinical and Experimental Immunology*, 1977. V. 27. P. 313-318). Если же содержание Т-лимфоцитов близко к норме, то левамизол не оказывает на них никакого влияния (Rosenthal M., Trabert U., Miller W. Immunotherapy with levamisole in rheumatic diseases. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 1976. V. 5. P. 216-220). Т. Di Perri et al. (1978)⁶⁶ установлено, что доза левамизола имела решающее значение: 150 мг являются минимальной эффективной дозой, вызывающей заметные изменения в розеткообразующей способности лимфоцитов больных ревматоидным артритом.

При обработке лимфоцитов крови больных лимфогранулематозом левамизолом *in vitro* увеличивается их способность формировать розетки с эритроцитами барана (Пантелеева Е.С., Ярилин А.А., Неприна Г.С., Байсоголов Г.Д. О причинах дефицита Т-лимфоцитов периферической крови у больных лимфогранулематозом. *Иммунология*, 1981. №1. С. 70-74; Beniaminov M., Ramot B. Letter: In vitro restoration by levamisole of thymus derived lymphocyte function in Hodgkin's disease. *Lancet*, 1975. V. 1 (7904). P. 464). Такое явление, по мнению авторов, связано с устранением модификации мембраны Т-клеток, вызванной действием блокирующих субстанций, накапливающихся в крови при данном заболевании (Kaplan H.S. Hodgkin's disease and other human malignant lymphomas: advances and prospects. G.H.A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.*, 1976. V. 36. P. 3863-3878; Goodwin J.S., Messner R.P., Bankhurst A.D., Peake G.T., Saiki J.H., Williams R.C. Prostaglandin – producing suppressor cells in Hodgkin's disease. *New Engl. J. Med.*, 1977. V. 297 (18). P. 963-968). Так, модификацию Т-клеток при лимфогранулематозе объясняли действием ферритина, аутоантител, белков

⁶⁶ Di Perri T., Auteri A., Pasini F.L., Mattioli M. A weekly oral dose of levamisole in the treatment of rheumatoid arthritis associated with E-rosette lymphocyte reduction. *European Journal of Rheumatology*, 1978. V. 1. P. 155-164.

острой фазы (Longmire R.L. et al. In vitro splenic IgG synthesis in Hodgkin's disease. *New Engl. J. Med.*, 1973. V. 289. P. 763-771; Bieber M.M., Fuks Z., Kaplan H.S. E-rosette inhibiting substance in Hodgkin's disease spleen extracts. *Clin. Exp. Immunol.*, 1975. V. 29. P. 369-375; Moroz C., Lahat N., Beniaminov M., Ramot B. Ferritin on the surface of lymphocytes in Hodgkin's disease patients. A possible blocking substance removed by levamisole. *Clin. Exp. Immunol.*, 1977. V. 29. P. 30-35), однако наиболее важными среди факторов, вызывающих подобный эффект при лимфогранулематозе, являются простагландины, синтез которых прилипающими клетками существенно усиливается при данном заболевании (Goodwin J.S., Messner R.P., Bankhurst A.D., Peake G.T., Saiki J.H., Williams R.C. Prostaglandin – producing suppressor cells in Hodgkin's disease. *New Engl. J. Med.*, 1977. V. 297 (18). P. 963-968).

Блокирующие субстанции реализуют свое действие, повышая уровень внутриклеточного цАМФ, т.е. их эффект аналогичен действию теофиллина *in vitro*, используемому в известном тесте (Limatibul S., Shore A., Dosch H.M., Gelfand E.W. Theophylline modulation of E-rosette formation: an indicator of T-cell maturation. *Clin. Exp. Immunol.*, 1978. V. 33. P. 503-513). Именно поэтому при лимфогранулематозе снижается число выявляемых теофиллинчувствительных E-розеткообразующих клеток (Неприна Г.С., Ярилин А.А., Пантелеева Е.С., Савина Н.П. Динамика теофиллинчувствительных Т-лимфоцитов у больных лимфогранулематозом. *Иммунология*, 1980. №6. С. 59-64), причем степень снижения соответствует выраженности реактивирующего эффекта левамизола (Неприна Г.С., Пантелеева Е.С., Ярилин А.А., Филатов П.П. Модификация E-рецепторов циркулирующих Т-лимфоцитов в норме и при онкологических заболеваниях. *Иммунология*, 1986. №6. С. 62-65), который оказывает на систему циклических нуклеотидов противоположное действие.

Усиление экспрессии маркерных рецепторов лимфоцитов в прединкубированных с иммуномодуляторами пробах может быть обусловлено не только с глубокой модификацией E-рецептора, связанной с изменением уровня

внутриклеточного цАМФ, но и с индукцией дифференцировочных процессов. Так, В.С. Кожевников с соавт. (1985)⁶⁷ отмечают, что свойство Т-лимфоцитов человека взаимодействовать с эритроцитами барана в тесте розеткообразования, обеспечивается наличием поверхностной гликопротеиновой структуры, обозначаемой как Е-рецептор, основные свойства которой также отражают дифференцировку Т-лимфоцитов. Индукция дифференцировки Т-лимфоцитов иммуномодулирующими агентами в условиях *in vitro* сопровождается изменениями Е-рецепторных характеристик, которые заключаются в приобретении предшественниками Т-клеток способности образовывать розетки, что приводит к увеличению числа Е-РОК, а при воздействии на более зрелые клетки – в накоплении Т-лимфоцитов, образующих «активные» розетки.

Вопрос о том, какой из механизмов является определяющим в обеспечении действия исследуемых иммуномодуляторов, остается открытым и является предметом дальнейших исследований (Запорожец Т.С., Лихобабин В.Я., Беседнова Н.Н., Ермоленко М.В. и др. Влияние иммуномодуляторов различной природы на экспрессию маркеров лимфоцитов у больных меланомой. Антибиотики и химиотерапия, 1999. №4. С. 13-16).

Модификация рецепторов к эритроцитам барана на Т-лимфоцитах больных установлена также при других патологических состояниях, таких как онкологические заболевания (Неприна Г.С., Пантелеева Е.С., Ярилин А.А., Филатов П.П. Модификация Е-рецепторов циркулирующих Т-лимфоцитов в норме и при онкологических заболеваниях. Иммунология, 1986. №6. С. 62-65; Akaza J., Yokoyama H., Umeda T., Niijima T. Restoration by levamisole of E rosette formation and its abrogation by autochthonous serum from patients with bladder cancer. Cancer, 1979. V. 1. P. 97-100), уремия (Modai D., Weissgarten J., Peller S., Shaked U., Kaufman S. The effect of levamisole on E-rosette formation in the uremic state. Thymus, 1982. V. 4. P. 309-311; Modai D., Peller S., Natan Cohen, Shaked U.,

⁶⁷ Кожевников В.С., Коненков В.И., Санина И.В., Кротова С.Б. и др. Индукция дифференцировки Т-лимфоцитов человека тимическим фактором АФТ-6 (Т-активин). Иммунология, 1985. №4. С. 34-37.

Kaufman S. In vitro effect of levamisole on E-rosette formation by T-lymphocytes of uremic patients. Israel J. of medical sciences, 1983. V. 19 (3). P. 289-291). Сывороточные факторы, блокирующие рецепторы к эритроцитам барана или снижающие их экспрессию, установлены при ряде заболеваний инфекционной природы: вирусных гепатитах (Chisari F.V., Edgington T.S. Lymphocyte E rosette inhibitory factor: a regulatory serum lipoprotein. J. exp. Med., 1975. V. 142. P. 1092-1107), малярии (Wyler D.J. Peripheral lymphocyte subpopulations in human falciparum malaria. Clin. Exp. Immun., 1976. V. 23. P. 471-476) и роже (Крифукс О.И., Цой И.Г. Особенности модификации E-рецепторов на Т-лимфоцитах периферической крови больных рожей. Иммунология, 1988. №2. С. 76-79). Достаточно хорошо изучена модификация рецепторов к эритроцитам барана при вирусных гепатитах: установлена блокада E-рецепторов и функции Т-хелперов (Sanders G.E., Perrillo R.P. Suppression of T helper function an immunoregulatory effect of rosette inhibitory factor in hepatitis B virus infection. Hepatology, 1985. V. 5 (3). P. 392-396).

Таким образом, несмотря на противоречивость данных научной литературы относительно потенциальной возможности влияния левамизола на иммунологические процессы, можно прийти к выводу, что он усиливает активность фагоцитов и Т-лимфоцитов в иммунологически дефектном организме, но не у здоровых.

1.4. Заключение к обзору литературы

Имеющийся на вооружении ветеринарной службы арсенал средств, методов, не позволяет быстро и эффективно оздоравливать стада от лейкоза в силу некоторых особенностей данной нозологии. Одним из недостатков является низкий предел чувствительности диагностического теста – РИД, отсутствие надежных методов диагностики, позволяющих обеспечить гарантированный контроль качества оздоровительных мероприятий. Не меньшую трудность

создают в оздоравливаемом стаде животные с иммунологической супрессией, инициированной воздействием негативных факторов внешней среды, паразитами, сопутствующими инфекциями, многочисленными вакцинными нагрузками.

Из представленных литературных данных видно, что огромное значение в развитии лейкозного процесса имеет естественная резистентность организма и иммунологическая реактивность, особенно параметры клеточной системы. Снижение активности неспецифических гуморальных и клеточных факторов резистентности многие авторы рассматривают как одну из причин повышения частоты опухолевых заболеваний и, в частности, лейкозов.

Как свидетельствуют данные литературы, иммунный статус носителей ВЛКРС и больных лейкозом крупного рогатого скота характеризуется снижением содержания Т-лимфоцитов. В свою очередь, развитие Т-клеточного дефицита, как известно, чревато повышенной восприимчивостью организма животных к инфекционным заболеваниям, особенно вирусной этиологии.

Анализ доступной нам научной литературы показал, что способностью восстанавливать содержание Т-розеткообразующих лимфоцитов в крови у больных с исходным дефицитом обладает левамизол. Вместе с тем, литературные данные относительно действия левамизола на иммунные функции неоднозначны, однако большинство исследователей приходят к выводу, что основное его действие проявляется в восстановлении функций лимфоцитов в случае их повреждения.

Исходя из изложенного, была определена цель собственных исследований – изучить особенности функционального состояния Т-лимфоцитов у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу и испытать эффективность иммунологических методов в оценке стад при данной инфекции.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Эпизоотическая обстановка по лейкозу крупного рогатого скота в Кемеровской области

С целью изучения степени распространения инфекции и эффективности проводимых профилактических мероприятий мы провели изучение эпизоотических особенностей лейкоза крупного рогатого скота в Кемеровской области. Эпизоотологический ретроспективный анализ по лейкозу крупного рогатого скота в Кемеровской области за период 2007-2013 гг. был проведен на основании данных ветеринарной отчетности Главного управления ветеринарии и документации районных ветеринарных лабораторий.

Из таблицы 1, в которой представлены некоторые эпизоотологические показатели по лейкозу крупного рогатого скота по Кемеровской области за 7 лет, видно, что с помощью проведенных диагностических исследований на лейкоз (РИД) было выявлено свыше 143 тысяч животных-вирусоносителей, что составило 7,7 % от общего числа. Наибольший процент носителей ВЛКРС выявлен среди телок перед случкой (14,31 %), наименьший – среди телок 6-12-месячного возраста (9,7 %).

Таблица 1.- Эпизоотологические показатели по лейкозу крупного рогатого скота по Кемеровской области (средние значения за 7 лет, 2007-2013 гг.)

Показатели	Средние значения, М±m
1	2
Суммарное количество исследованных в РИД за 7 лет, голов	1842502
Суммарное количество инфицированных животных за 7 лет, голов	143180
Инфицированность коров, %	11,35±2,65

1	2
Инфицированность телок перед случкой, %	14,31±0,97
Инфицированность телок 6-12-месячного возраста, %	9,70±0,51
Инфицированность быков-производителей, %	12,22±2,84
Суммарное количество исследованных гематологически за 7 лет, голов	297377
Суммарное количество больных лейкозом животных за 7 лет, голов	4625
Процент больных лейкозом животных из исследованных	1,76±0,30

Кроме того, за этот период было проведено 297377 гематологических исследований, в результате чего было выявлено 4625 животных, находящихся в гематологической стадии заболевания, что составило в среднем $1,76 \pm 0,30$ % от числа исследований.

Инфицированность вирусом лейкоза крупного рогатого скота в Кемеровской области за 2007-2013 годы равномерно снижается (рис. 1). Так, наибольшее число животных-вирусоносителей установлено в 2007 году (9,9 %), наименьшее – в 2013 году (5,6 %). В тоже время по данным гематологических исследований (рис. 2) в Кемеровской области наблюдался рост количества больных животных с 2007 по 2011 год (от 1,5 % до 3,2 %) со значительным уменьшением их числа в 2012 и 2013 годах (соответственно: 1,0 и 1,4 %).

Несмотря на позитивные сдвиги, анализ эпизоотических данных по разным зонам Кемеровской области в ретроспективе показывает, что в регионе нет ни одного района, где бы ни выявлялись животные носители ВЛКРС.

В таблице 2 представлены показатели степени инфицированности крупного рогатого скота в различных районах Кемеровской области.



Рисунок 1.- Динамика инфицированности крупного рогатого скота лейкозом в Кемеровской области за 7 лет (2007-2013), в процентах

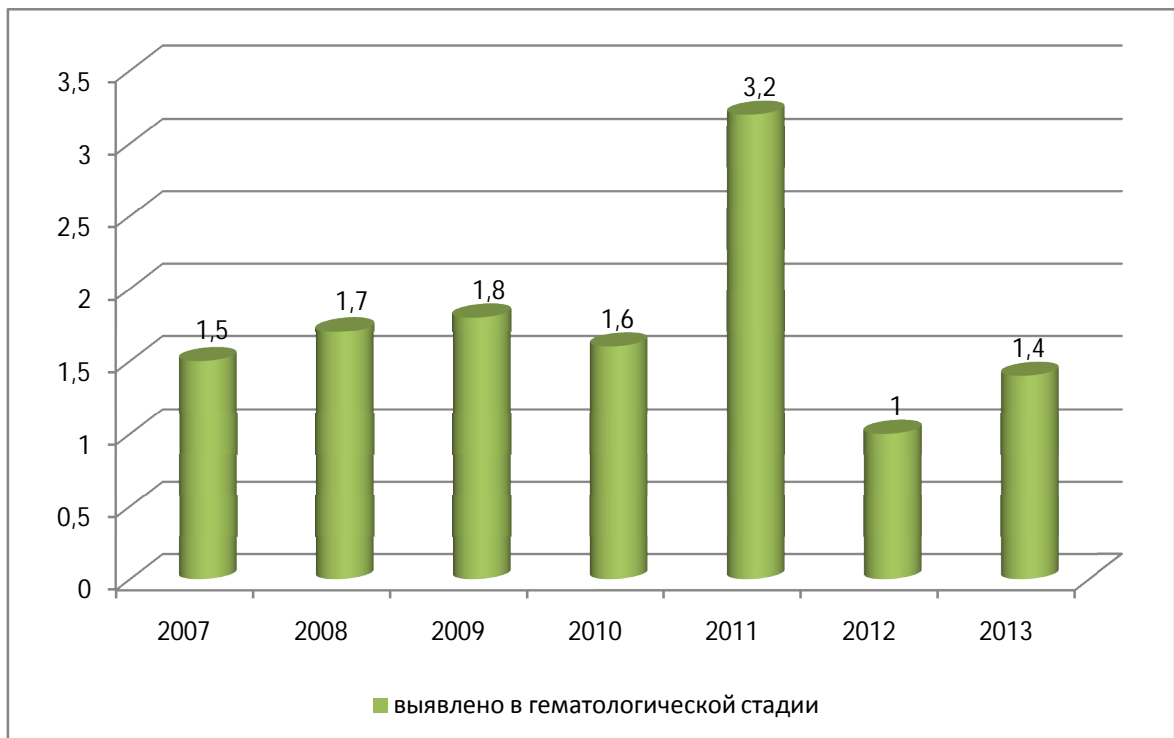


Рисунок 2.- Динамика выявления больных лейкозом коров в Кемеровской области за 7 лет (2007-2013), в процентах

Из таблицы 2 видно, что наибольшее выделение животных-вирусоносителей было отмечено в 2007 году в 4-х из 12-ти районов: Тяжинском (25,4 %), Мариинском, Ижморском (по 20 %) и Юргинском районах (16 %), в то же время меньше всего носителей ВЛКРС было выявлено в Яшкинском (1,2 %), Беловском (2,4 %), Новокузнецком (2,9 %) и Ленинск-Кузнецком районах (5,2 %).

Таблица 2.- Степень инфицированности крупного рогатого скота за период 2007-2013 гг. в различных районах Кемеровской области

Район	выявлено носителей ВЛКРС, %							Средний процент
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	
Прокопьевский	8,0	8,1	7,5	4,8	6,8	5,0	4,8	6,4
Новокузнецкий	2,9	2,7	3,6	1,6	1,0	1,0	0,9	1,95
Беловский	2,4	4,3	1,6	3,6	2,7	2,7	2,0	2,75
Промышленновский	7,9	11,9	8,1	6,9	6,8	6,7	6,3	7,8
Крапивинский	16,0	12,2	10,4	7,4	9,4	8,8	7,2	10,2
Ленинск-Кузнецкий	5,2	4,4	2,1	2,0	1,3	1,2	1,0	2,45
Юргинский	16,0	18,0	10,7	8,4	10,5	9,9	9,4	11,8
Мариинский	20,0	14,3	18,1	16,8	11,3	11,1	10,2	14,5
Яшкинский	1,2	0,5	8,2	3,1	3,3	2,9	2,9	3,15
Тяжинский	25,4	18,8	23,1	27,4	35,8	29,0	23,0	26,0
Ижморский	20	18,7	11,2	7,3	7,4	6,3	6,0	11,0
Кемеровская МВЛ	9,2	5,8	2,2	5,1	0,2	0,5	3,2	3,74

В 2008 году, как и годом ранее, наиболее напряженная эпизоотическая ситуация сохранилась в Тяжинском, Ижморском, Юргинском и Мариинском районах (от 14,3 до 18,8 %). Помимо этого, более 10 % носителей ВЛКРС зарегистрировано в Промышленновском и Крапивинском районах. Менее 5 % инфицированных ВЛКРС было выявлено в Новокузнецком, Яшкинском, Ленинск-Кузнецком и Беловском районах.

Показатель инфицированности крупного рогатого скота, превышающий 10 %, в 2009 г. был зарегистрирован в Тяжинском, Мариинском, Ижморском, Юргинском и Крапивинском районах. Меньше всего носителей ВЛКРС в этот период отмечено в Беловском и Ленинск-Кузнецком районах, а также Кемеровской МВЛ.

Анализ степени инфицированности в 2010 году показал, что только в двух районах (Мариинский и Тяжинский) этот показатель был выше 10 %, а в остальных варьировал от 1,6 до 8,4 %.

В 2011 году в Тяжинском районе инфицированность крупного рогатого скота превысила отметку 30 %, а в Юргинском и Мариинском районах – 10%. Во всех остальных районах носителей ВЛКРС было выявлено менее 10 %.

Наиболее неблагоприятная ситуация в 2012-2013 гг. была отмечена в Тяжинском и Мариинском районах, где уровень инфицированности превысил 10%.

Степень инфицированности в среднем за 7 лет превышала 10 % в Крапивинском, Ижморском, Юргинском, Мариинском и Тяжинском районах. В Новокузнецком, Беловском, Ленинск-Кузнецком и Яшкинском районах, а также по результатам исследований Кемеровской МВЛ суммарный показатель вирусоносительства у крупного рогатого скота за эти годы составил менее 5 %. Самый высокий уровень был в Ижморском районе и достигал 26 %, а самый низкий – 1,95 % в Новокузнецком районе.

В таблице 3 представлены процентные показатели животных, выявленных в гематологической стадии в различных районах Кемеровской области.

На протяжении 2007-2011 гг. самый высокий процент выявленных гембольных животных отмечен в Юргинском (от 3,5 до 4,7 %), Беловском (от 3,6 до 6,7 %) и Ленинск-Кузнецком районах (от 3,2 до 5,7 %), а самый низкий – в Ижморском (от 0,03 до 0,3 %) и в Мариинском (от 0,07 до 0,3 %) районах.

В 2012-2013 гг. наибольший процент больных лейкозом отмечен в Ленинск-Кузнецком районе. Минимальные значения этого показателя были зафиксированы

в Мариинском, Яшкинском, Прокопьевском, Промышленновском, Ижморском, Юргинском и Тяжинском районах. Необходимо отметить, что Кемеровской МВЛ в 2011-2013, а также в Мариинском и Яшкинском районах в 2013 году больных лейкозом не обнаружено.

Таблица 3.- Процент больных лейкозом крупного рогатого скота в различных районах Кемеровской области

Район	выявлено гематологически больных							Средний процент
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	
Прокопьевский	0,2	1,6	0,4	0,4	0,8	0,4	0,2	0,57
Новокузнецкий	0,9	1,1	3,0	2,1	0,5	1,2	2,8	1,65
Беловский	3,6	4,8	5,1	3,8	6,7	1,3	1,3	3,8
Промышленновский	0,8	1,1	1,5	1,5	1,2	0,7	0,7	1,07
Крапивинский	3,1	1,2	1,8	4,5	2,0	2,2	1,8	2,37
Ленинск-Кузнецкий	3,2	3,6	4,4	4,2	5,7	4,4	4,2	4,24
Юргинский	4,7	3,9	3,5	4,6	4,5	1,1	0,8	3,3
Мариинский	0,07	0,3	0,2	0,09	0,1	0,04	0	0,11
Яшкинский	0,9	0,9	4,1	1,7	1,6	0,4	0	1,37
Тяжинский	0,6	3,5	1,5	1,5	1,2	1,1	0,9	1,47
Ижморский	0,03	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,27
Кемеровская МВЛ	5,5	5,3	6,4	3,1	0	0	0	2,9

Средний процент выявленных в гематологической стадии заболевания за 7 лет оказался самым высоким в Ленинск-Кузнецком (4,24 %), Беловском (3,8 %) и Юргинском (3,3 %), самым низким в Мариинском (0,11 %), Ижморском (0,27 %) и Прокопьевском (0,57 %) районах.

Несмотря на то, что Мариинский и Ижморский районы входили в число самых неблагополучных по степени инфицированности ВЛКРС в целом за 7 лет, в них был зарегистрирован самый низкий процент гематологически больных животных.

Тяжинский район, в котором было выделено больше всего носителей ВЛКРС (26 %), также имел невысокий процент (1,47 %) животных, находящихся в гематологической стадии.

Обратная закономерность отмечена в Ленинск-Кузнецком и Беловском районах, в которых, несмотря на низкие показатели степени инфицированности (менее 5 %), был зафиксирован, как отмечено выше, самый высокий процент гематологически больных животных.

Таким образом, анализ результатов серологических и гематологических исследований, проведенных в Кемеровской области с 2007 по 2013 гг., показал, что несмотря на снижение числа выделенных животных-вирусоносителей, эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в регионе остается достаточно напряженной.

Огромное значение в развитии лейкозного процесса имеет естественная резистентность организма и иммунологическая реактивность. Поэтому одним из важных моментов в общем комплексе профилактических мер при лейкозе крупного рогатого скота необходимость проведения иммунологического контроля по выявлению животных не только с явной инфекционной патологией, но и предрасположенностью к данному заболеванию.

2.2. Разработка способа выявления повышенной чувствительности у крупного рогатого скота к инфекции ВЛКРС

Известно, что развитие Т-клеточного иммунодефицита чревато повышенной восприимчивостью организма животных к инфекционным заболеваниям, особенно вирусной этиологии. Восстановить содержание в крови у больных различными заболеваниями с исходным дефицитом розеткообразующих Т-клеток, по мнению некоторых авторов, возможно с помощью левамизола. При этом этот

препарат, как отмечают исследователи, усиливает активность Т-лимфоцитов в иммунологически дефектном организме, но не у здоровых.

В связи с вышесказанным мы поставили задачу подобрать оптимальную концентрацию левамизола для оценки чувствительности лимфоцитов в реакции спонтанного розеткообразования (Е-РОК) у инфицированного ВЛКРС и больного лейкозом крупного рогатого скота. Затем на следующем этапе с помощью дискретно-динамического анализа оценить информативность метода и выявить интервалы значений, характерные для здоровых животных, и провести сравнительное исследование крови крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу путем постановки Е-РОК с чистой взвесью лимфоцитов и с лимфоцитами, обработанными левамизолом, с последующим вычислением индекса сдвига.

2.2.1. Оценка чувствительности лимфоцитов в реакции спонтанного розеткообразования к разным концентрациям левамизола

С целью выбора оптимальной концентрации для изучения действия левамизола *in vitro* на Т-лимфоциты провели опыт по следующей схеме. В неблагополучном по лейкозу хозяйстве исследовали 20 коров, из которых сформировали 3 группы: 1 группа – 6 коров вирусоносителей (РИД-положительные); 2 группа – 4 больные коровы, положительно реагирующие в РИД и подтвержденные гематологическим методом исследования, и 3 группа – 10 здоровых (не реагирующих в РИД) коров. В периферической крови определили число Т-лимфоцитов с помощью спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана (Е-РОК) при постановке реакции со средой №199 (контроль), а также количество Е-РОК при воздействии левамизола *in vitro*, используя различные его концентрации: 50 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 0,01 мкг/мл.

Результаты оценки влияния различных концентраций левамизола в реакции спонтанного розеткообразования на лимфоциты у животных с разной степенью компрометации к лейкозу представлены в таблице 4.

При определении чувствительности *in vitro* Е-РОК к левамизолу в концентрации 50 мкг/мл отмечено подавление розеткообразования у животных всех групп, наиболее выраженное при повышенном уровне этих клеток в периферической крови ($30,0 \pm 2,30$, $10,7 \pm 1,50$ %; $P < 0,001$) (Таблица 4).

Таблица 4. – Изучение действия различных концентраций левамизола в реакции Е-РОК на лимфоциты *in vitro* у инфицированного ВЛКРС и больного лейкозом крупного рогатого скота

Группа животных	Символы статистики	Е-РОК, %			
		Контроль (без левамизола)	с левамизолом, мкг/мл		
			50	0,5	0,01
Носители ВЛКРС	M±m P	$20,16 \pm 1,08$	$12,66 \pm 1,3$ <0,001	$32,83 \pm 3,34$ <0,01	$21,16 \pm 2,36$ >0,05
Гембольные	M±m P	$19,5 \pm 2,06$	$15,0 \pm 1,15$ >0,05	$32,0 \pm 1,22$ <0,01	$21,25 \pm 2,53$ >0,05
Здоровые (РИД-)	M±m P	$30,0 \pm 2,30$	$10,7 \pm 1,50$ <0,001	$22,8 \pm 2,84$ >0,05	$19,8 \pm 1,92$ <0,01

При воздействии левамизола на Т-лимфоциты *in vitro* в концентрации 0,5 мкг/мл у вирусоносителей и больных лейкозом животных наблюдается достоверное повышение Т-розеткообразования (соответственно: $20,16 \pm 1,08$, $32,83 \pm 3,34$ % и $19,5 \pm 2,06$, $32,0 \pm 1,22$ %; $P < 0,01$), тогда как у РИД-отрицательных их количество оказалось сниженным.

Концентрация левамизола 0,01 мкг/мл существенно не повышала количества Е-РОК у вирусоносителей и больных лейкозом коров, в то же время подавляла розеткообразование у РИД-отрицательных животных ($30,0 \pm 2,30$, $19,8 \pm 1,92$ %; $P < 0,01$).

Затем для оценки влияния препарата на функциональную активность Т-лимфоцитов животного определили индекс сдвига (ИС) по формуле:

$$ИС = \frac{\% E - РОК \text{ после инкубации с левамизолом}}{\% E - РОК \text{ до инкубации с левамизолом}}$$

Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5.- Индексы сдвига у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу, $M \pm m$

Изучаемая величина	Здоровые	Вирусоносители	Р	Больные	Р
Индекс сдвига	0,56±0,07	2,45±0,33	<0,001	2,12±0,22	<0,001

Из таблицы 5 видно, что ИС у носителей ВЛКРС и больных лейкозом по сравнению со здоровыми животными с высокой степенью достоверности увеличивается ($P < 0,001$).

Таким образом, для изучения чувствительности *in vitro* Е-РОК к левамизолу у носителей вируса лейкоза и больных лейкозом животных предпочтительно применение препарата в количестве 0,5 мкг/мл, что и послужило основанием к использованию этой концентрации в дальнейшей работе.

2.2.2. Оценка иммунного статуса здорового, инфицированного ВЛКРС и больного лейкозом крупного рогатого скота с помощью дискретно-динамического анализа

Для выяснения информативности нагрузочного теста с левамизолом (Елев-РОК) и индекса сдвига (ИС) в отношении выявления животных с повышенной чувствительностью к лейкозной инфекции, а также тех интервалов значений параметров в сочетаниях, где они имеют резкие различия у здоровых животных и

у индивидуумов с функциональным напряжением иммунной системы, мы применили дискретно-динамический анализ. Для установления более объективной картины в различии взаимосвязей между иммунологическими параметрами, помимо указанных методов у экспериментальных животных в периферической крови, мы определили процентное содержание иммунокомпетентных клеток (ЕА-РОК и ЕАС-РОК), функциональную активность нейтрофилов в НСТ-тесте (спонтанный вариант) (у. е. оп. пл.) и концентрацию ЦИК в сыворотке крови (у. е.).

С этой целью в опыт было отобрано 30 голов крупного рогатого скота, в том числе 10 больных лейкозом коров (гематологическая стадия), 10 носителей ВЛКРС и 10 здоровых животных (Таблица 6).

По условию дискретно-динамического анализа всех животных по значениям одного из параметров, принятого в качестве базисного, разделили на 3 приблизительно равные по величине подгруппы: 1 – с минимальными значениями базисного параметра, 2 – с максимальными значениями и 3 – со средними (в дальнейшем не учитывалась). В 1 и 2 группах рассчитали средние значения остальных (вариабельных) параметров и с помощью вариационной статистики изучили достоверность их различий.

В случаях, когда средние значения вариабельного параметра в группах с минимальными и максимальными значениями базисного параметра достоверно ($P < 0,05$) различаются, констатировали наличие взаимосвязей между ними. Взаимосвязь положительна, если при увеличении базисного параметра уровень вариабельного также увеличивается; отрицательна, если при увеличении базисного параметра уровень вариабельного снижается. При этом каждый из изучаемых параметров брали в качестве базисного, в которых вели подобный анализ с помощью вариационной статистики.

В таблице 7 представлены средние значения иммунологических параметров у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу

Таблица 6.- Иммунологические параметры крупного рогатого скота

№ п/п	лейко- циты, тыс./мкл	лимфо- циты, %	Розеткообразующие клетки, %				Индекс Елев- РОК/Е- РОК	НСТ- тест, у.е.	ЦИК, у.е.
			Е-РОК	Елев- РОК	ЕА- РОК	ЕАС- РОК			
Здоровые									
1	8,5	46	20	18	32	30	0,90	47	76
2	6,5	71	22	4	19	20	0,18	35	77
3	5,3	44	19	6	16	22	0,31	47	71
4	7,5	65	17	4	22	12	0,23	53	66
5	5,3	77	23	8	16	38	0,35	48	71
6	4,4	54	18	9	21	22	0,50	57	69
7	8,3	46	20	18	30	29	0,90	27	51
8	4,8	65	16	5	17	14	0,31	53	33
9	7,0	55	19	18	22	25	0,95	32	73
10	5,1	68	16	10	30	18	0,62	24	88
Носители ВЛКРС									
11	7,5	55	19	36	47	39	1,89	288	102
12	7,0	79	17	37	36	49	2,70	223	138
13	5,0	66	32	54	38	51	1,68	277	96
14	9,0	73	18	18	34	55	1,00	275	62
15	9,3	72	14	44	50	48	3,14	283	103
16	7,3	41	8	23	21	54	2,87	310	77
17	8,8	57	20	23	24	59	1,15	234	104
18	9,5	75	19	28	58	64	1,47	288	55
19	7,3	61	15	29	60	58	1,93	316	108
20	5,3	66	12	30	67	50	2,50	137	93
Больные									
21	10,1	90	10	17	50	44	1,70	9	77
22	10,0	87	6	18	39	85	3,00	20	189
23	12,7	92	30	47	53	81	1,56	8	92
24	15,5	92	17	27	85	53	1,59	9	82
25	11,2	92	12	26	45	45	2,16	179	209
26	10,5	92	17	35	61	76	2,06	159	137
27	19,0	82	20	22	57	57	1,10	11	184
28	16,6	87	6	24	65	62	4,00	171	205
29	11,2	81	19	36	33	73	1,89	201	72
30	10,7	83	10	30	41	45	3,00	189	111

Таблица 7.- Средние значения иммунологических параметров у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу

Группа животных	Символы статистики	Лейкоциты, тыс/мкл	Лимфоциты, %	Иммунокомпетентные клетки, %				Индекс сдвига	НСТ, у. е. оп. пл.	ЦИК, у. е.
				Е-РОК	Елев-РОК	ЕА-РОК	ЕАС-РОК			
Здоровые (контроль)	М	6,27	59,5	19,00	10,0	22,5	23,00	0,52	42,3	67,5
	m±	0,47	3,85	0,74	1,85	1,92	2,47	0,09	3,72	4,83
Носители ВЛКРС	М	7,60	64,8	16,40	32,2	43,5	52,7	2,03	263,1	93,8
	m±	0,50	37,4	2,00	3,42	4,89	0,92	0,23	16,77	7,61
	P	>0,05	>0,05	>0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Больные	М	12,75	87,8	14,7	28,2	52,9	62,1	2,20	95,6	135,8
	m±	1,00	1,41	2,34	2,90	4,78	4,96	0,27	28,3	17,72
	P	<0,001	<0,001	>0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	>0,05	<0,001

Из таблицы 7 видно, что у носителей ВЛКРС и больных животных наблюдается значительное увеличение В-клеток, типизируемых по присутствию рецептора к третьему компоненту комплемента C_3 ($P < 0,001$). Так, если у здоровых животных их установлено $23,0 \pm 2,47$ %, то у носителей ВЛКРС и больных лейкозом от $52,7 \pm 0,92$ %, т.е. в 2,3 раза больше. Аналогичной тенденции в изменении показателей подвержено содержание лимфоцитов-киллеров, несущих рецептор к Fc-фрагменту IgG (EA-РОК).

Также наблюдается снижение количества Т-лимфоцитов, несущих рецептор к эритроцитам барана, которое сопровождается увеличением числа левамизолчувствительных клеток (в 2,8-3 раза) у носителей ВЛКРС и больных лейкозом животных и, как следствие, повышением индекса сдвига. Так, если средние значения ИС у здоровых животных составили $0,52 \pm 0,09$, то у носителей ВЛКРС и больных лейкозом – $2,03 \pm 0,23$ и $2,20 \pm 0,27$ соответственно.

Помимо этого, у носителей ВЛКРС и больных лейкозом коров отмечено увеличение концентрации ЦИК в сыворотке крови, особенно у животных, находящихся в гематологической стадии заболевания ($135,8 \pm 17,72$, $67,5 \pm 4,83$ у.е.; $P < 0,001$).

Функциональная активность нейтрофилов в НСТ-тесте также сопровождается усилением у больных лейкозом и инфицированных ВЛКРС, однако достоверной разницы она достигает только у последних.

Дальнейшее исследование иммунологических параметров с помощью дискретно-динамического анализа показало, что наиболее значимыми являются 26 из 42 возможных сочетаний показателей. Изучение доли участия каждого определяемого показателя с другими позволило установить, что наибольшим их количеством обладают Елев-РОК/Е-РОК (6 раз в качестве базисного и 5 раз в качестве переменного параметров), наименьшим – Е-РОК (1 раз в качестве базисного и 2 раза в качестве переменного параметров). Помимо индекса сдвига важными оказались Елев-РОК (9), ЕАС-РОК (9), ЕА-РОК (8) и ЦИК (8).

На основании выявленных достоверно различающихся ($P \leq 0,05$) сочетаний параметров с помощью компьютерной программы составили дифференциально-прогностическую таблицу (Таблица 8) в результате чего были определены интервалы значений параметров в их сочетаниях, характерные для здоровых животных.

Таблица 8.- Интервалы значений параметров в их сочетаниях, характерные для крупного рогатого скота, имеющего повышенную устойчивость к лейкозной инфекции

№ п/п	Сочетание: базис (вариабельный параметр)	Интервалы значений параметров сочетания
1	2	3
1	Елев-РОК/Е-РОК (ЕАС-РОК)	$\leq 0,95$ ($\leq 38,0$)
2	Елев-РОК/Е-РОК (Елев-РОК)	$\leq 0,95$ ($\leq 18,0$)
3	Елев-РОК/Е-РОК (НСТ)	$\leq 0,95$ ($\leq 32,0$)
4	ЕАС-РОК (Елев-РОК)	$\leq 38,0$ ($\leq 8,0$)
5	ЕАС-РОК (ЕА-РОК)	$\leq 38,0$ ($\geq 16,0$)
6	Елев-РОК/Е-РОК (ЕА-РОК)	$\leq 0,95$ ($\leq 22,0$)
7	Елев-РОК/Е-РОК (Е-РОК)	$\leq 0,95$ ($\geq 15,0$)
8	ЦИК (Елев-РОК/Е-РОК)	$\leq 73,0$ ($\leq 0,95$)
9	ЕА-РОК (Елев-РОК)	$\leq 30,0$ ($\leq 18,0$)
10	ЕА-РОК (ЕАС-РОК)	$\leq 30,0$ ($\leq 29,0$)
11	ЕАС-РОК (Елев-РОК/Е-РОК)	$\leq 38,0$ ($\leq 0,95$)
12	Елев-РОК/Е-РОК (ЦИК)	$\leq 0,95$ ($\leq 73,0$)
13	Елев-РОК (ЕА-РОК)	$\leq 18,0$ ($\leq 39,0$)
14	Елев-РОК (Елев-РОК/Е-РОК)	$\leq 18,0$ ($\leq 1,19$)
15	Елев-РОК (НСТ)	$\leq 18,0$ ($\leq 47,0$)
16	ЦИК (ЕА-РОК)	$\leq 73,0$ ($\leq 22,0$)
17	ЕА-РОК (Елев-РОК/Е-РОК)	$\leq 30,0$ ($\leq 0,95$)

1	2	3
18	Е-РОК (Елев-РОК/Е-РОК)	$\geq 19,0$ ($\leq 0,95$)
19	ЕАС-РОК (НСТ)	$\leq 38,0$ ($\leq 48,0$)
20	ЦИК (Елев-РОК)	$\leq 73,0$ ($\leq 18,0$)
21	ЦИК (Е-РОК)	$\leq 73,0$ ($\geq 14,0$)
22	ЕАС-РОК (ЦИК)	$\leq 38,0$ ($\leq 71,0$)
23	ЦИК (ЕАС-РОК)	$\leq 73,0$ ($\leq 25,0$)
24	Елев-РОК (ЕАС-РОК)	$\leq 18,0$ ($\leq 38,0$)
25	ЕА-РОК (ЦИК)	$\leq 30,0$ ($\leq 51,0$)
26	НСТ (Елев-РОК)	$\leq 47,0$ ($\leq 18,0$)

Информацию дифференциально-прогностической таблицы можно представить в виде графика (Рисунок 3-7). Например, рассмотрим взаимосвязь параметров Елев-РОК/Е-РОК – индекс сдвига и ЕАС-РОК – процент розеток лимфоцитов, несущих рецепторы к СЗ (Рисунок 3). В координатах (Е-РОК, Елев-РОК/Е-РОК) построим все точки, соответствующие значениям этих параметров у опытных животных (Таблица 6). Весь график разбит вертикальными и горизонтальными линиями на 4 прямоугольника: граница базиса и переменного показателя минимальная (GB min, GP min); граница базиса и переменного показателя максимальная (GB max, GP max); граница базиса максимальная, граница переменного показателя минимальная (GB max, GP min); граница базиса минимальная, граница переменного показателя максимальная (GB min, GP max). В каждом из прямоугольников подсчитывали число точек в соответствующей группе и вычисляли относительную частоту. Так, в прямоугольник GB min, GP min попало 10 точек, задаваемые неравенствами $EAC \leq 38,0$, $Elev-ROK/E-ROK \leq 0,95$, причем все точки (100%) соответствовали группе здоровых животных.

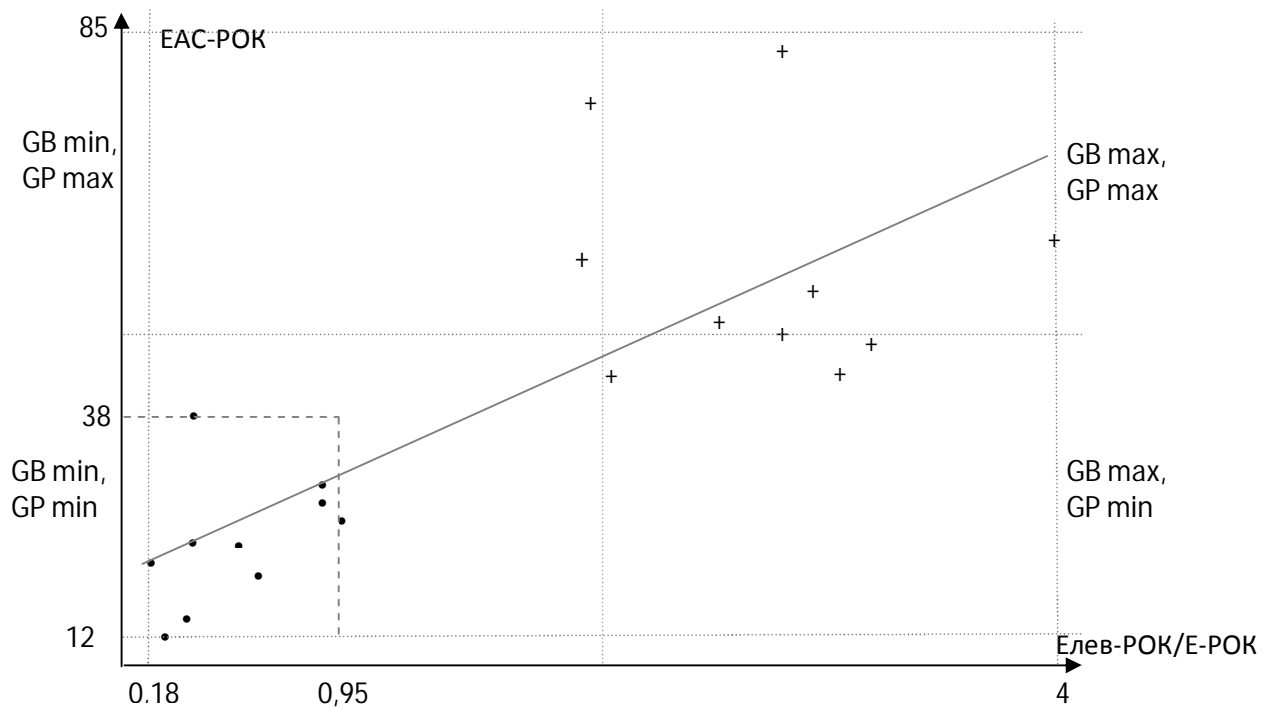


Рисунок 3. – Зависимость содержания В-лимфоцитов (ЕАС-РОК) от индекса сдвига у здоровых (•), носителей ВЛКРС и больных лейкозом животных (+).

Анализ дифференциально-прогностической таблицы показал, что наиболее информативными являются рассмотренное соотношение и следующие: Елев-РОК/Е-РОК в качестве базисного параметра с переменными Елев-РОК и Е-РОК и в качестве переменного с базисными параметрами ЕАС-РОК (Рисунок 7) и Елев-РОК, а также базисный Елев-РОК с переменным ЕА-РОК. Интервалы значений параметров этих сочетаний соответствовали 100 % здоровых животных.

В остальных случаях, за редким исключением, интервалы значений параметров соответствовали 50-90% здоровым животным. Например, на рисунке 4 показана зависимость индекса сдвига от уровня концентрации ЦИК в сыворотке крови. Из этого рисунка видно, в прямоугольник GB min, GP min, задаваемом неравенством $\text{ЦИК} \leq 73$, $\text{Елев-РОК/Е-РОК} \leq 0,95$, попало 7 точек, соответствующих здоровым животным.

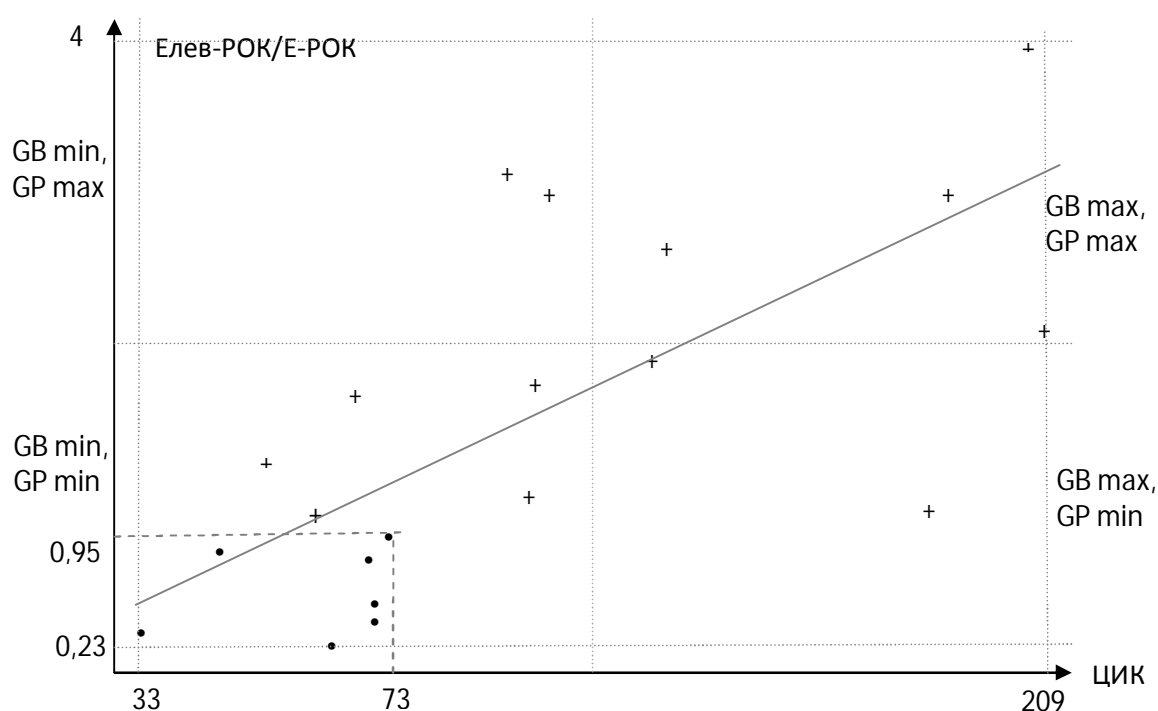


Рисунок 4. – Зависимость индекса сдвига (Елев-РОК/Е-РОК) от уровня концентрации ЦИК в сыворотке крови у здоровых (•), носителей ВЛКРС и больных лейкозом животных (+).

Следует отметить, что при некоторых сочетаниях, указанных в дифференциально-прогностической таблице, встречаются носители ВЛКРС и больные лейкозом животные, у которых интервалы соответствующих пар параметров совпадают с таковыми у здоровых животных. Особенно это касается пар, в которых присутствуют ЦИК и НСТ. В качестве такого примера на рисунке 5 представлена зависимость содержания левамизолстимулированных Т-лимфоцитов (Елев-РОК) от уровня ЦИК в сыворотке крови, где в прямоугольник GB min, GP min, задаваемом неравенством $\text{Елев-РОК} \leq 18$, $\text{ЦИК} \leq 73$ попало 8 точек, из них 7 соответствующих здоровым животным и 1 – носителю ВЛКРС.

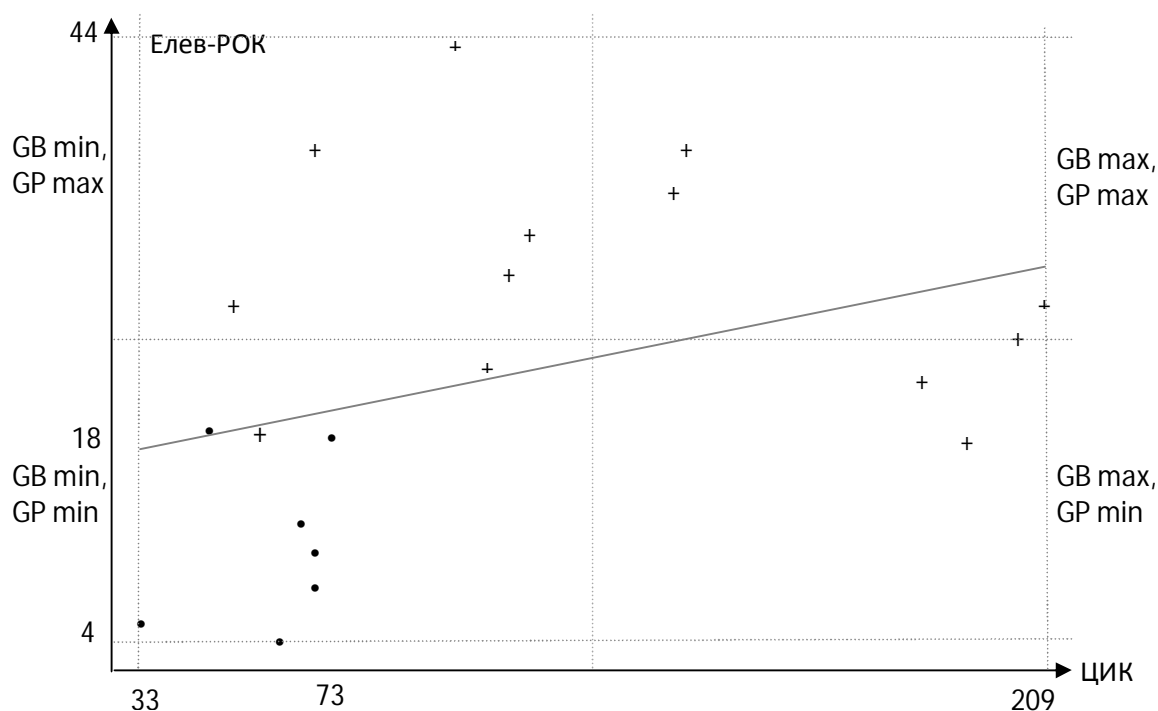


Рисунок 5. – Зависимость содержания левамизолстимулированных Т-лимфоцитов (Елев-РОК) от уровня ЦИК в сыворотке крови у здоровых (•), носителей ВЛКРС и больных лейкозом животных (+).

Еще на одном графике (Рисунок 6), где изображена зависимость функциональной активности лейкоцитов (НСТ) от содержания левамизолстимулированных Т-лимфоцитов (Елев-РОК) также отмечается, что интервалы соответствующих пар параметров 2-х больных лейкозом животных совпадают с таковыми у здоровых животных. Такая ситуация возникает по причине того, что у некоторых больных, находящихся в гематологической стадии, число гранулоцитов, способных восстанавливать НСТ было резко снижено, возможно, за счет угнетения гранулопоэза лейкозным процессом, тогда как у носителей ВЛКРС и основной части больных животных отмечено повышение функционально-метаболической активности нейтрофилов. Учитывая тот факт, что разрушению образующихся иммунных комплексов в циркуляции способствует фагоцитарная активность нейтрофилов, то очевидна взаимосвязь этих двух показателей, для изучения механизма которой необходимо провести дополнительные исследования.

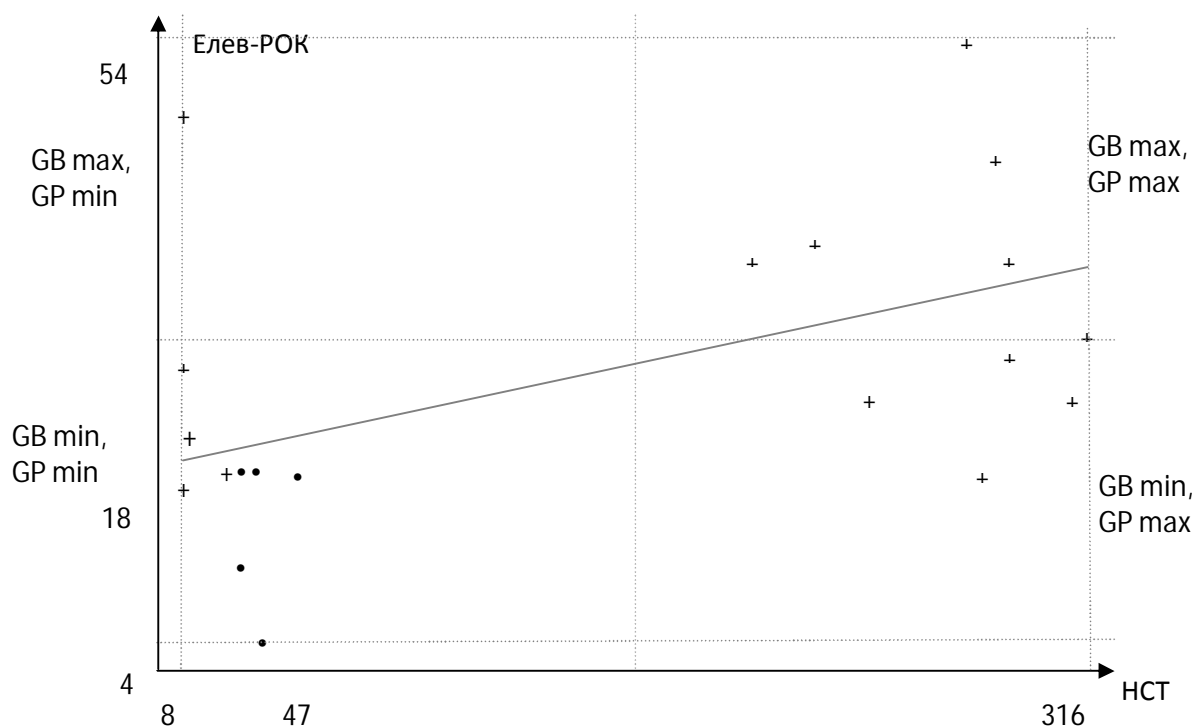


Рисунок 6. – Зависимость функциональной активности лейкоцитов (НСТ) от содержания левамизолстимулированных Т-лимфоцитов (Елев-РОК) у здоровых (•), носителей ВЛКРС и больных лейкозом животных (+).

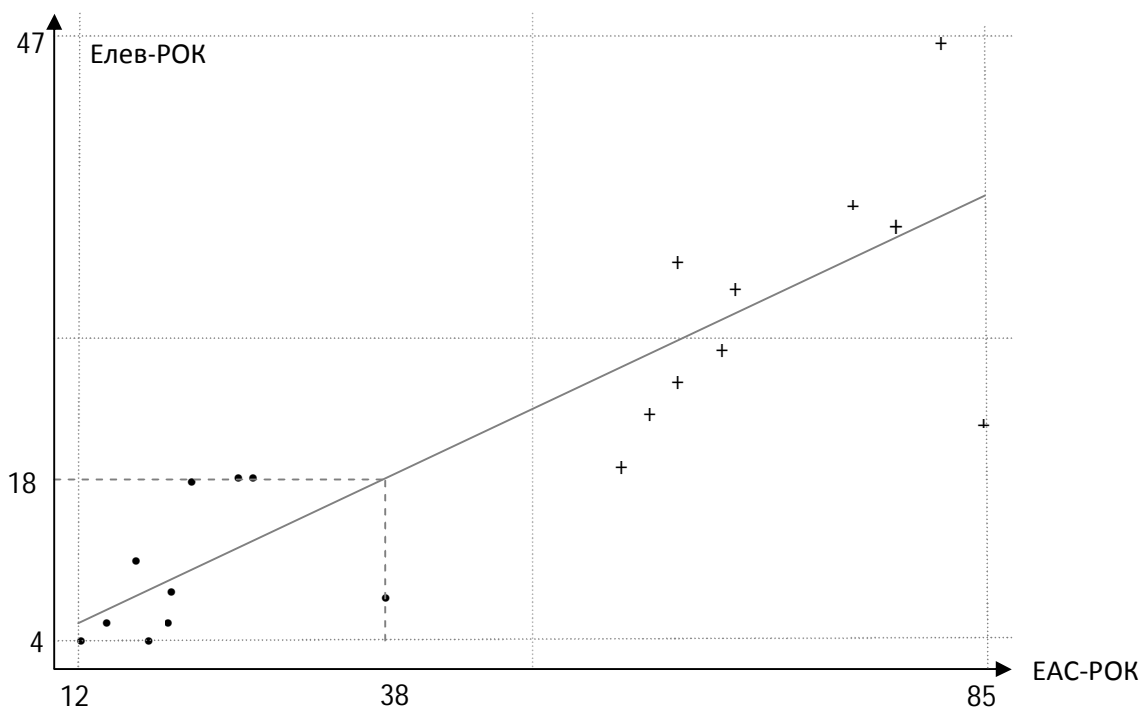


Рисунок 7. – Зависимость содержания левамизолстимулированных Т-лимфоцитов (Елев-РОК) от содержания В-лимфоцитов (ЕАС-РОК) у здоровых (•), носителей ВЛКРС и больных лейкозом животных (+).

Таким образом, результаты анализа сочетаний взаимосвязей в системе иммунитета свидетельствует о важной роли в определении показателей функционального состояния Т-лимфоцитов в оценке предрасположенности к заболеванию крупного рогатого скота лейкозом. С помощью дифференциально-прогностической таблицы, построенной на основании дискретно-динамического анализа, выявлены интервалы значений сочетаний параметров, которые существенно различались в группе здоровых и больных животных.

2.2.3. Изучение взаимосвязи между уровнем циркулирующих иммунных комплексов и функциональным состоянием лейкоцитов у крупного рогатого скота при лейкозе

Оценка иммунного статуса с помощью дискретно-динамического анализа показала, что у животных с предрасположенностью к лейкозной инфекции интервалы пар сочетаний с участием ЦИК и функциональной активностью нейтрофилов в НСТ-тесте соответствовали животным с повышенной устойчивостью к лейкозной инфекции. Поэтому мы с целью изучения взаимосвязи между этими показателями отобрали 40 голов крупного рогатого скота, которых разделили на 3 группы: 1-ю группу составили 16 коров, положительно реагирующих в РИД с гликопротеидным антигеном вируса лейкоза крупного рогатого скота (носители ВЛКРС); 2-ю группу – 9 положительно реагирующих в РИД с гликопротеидным антигеном ВЛКРС, больных, по результатам гематологических исследований, согласно «лейкозному ключу» - лейкоцитоз, лимфоцитоз; 3-ю – 15 отрицательно реагирующих в РИД с гликопротеидным антигеном ВЛКРС (интактные). В периферической крови определили функциональную активность нейтрофилов в тесте с нитросиним тетразолием (НСТ-тест) в спонтанном варианте в единицах оптической плотности

(ед. оп. пл.) и в сыворотке крови количество циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в условных единицах (у.е.).

Анализируя полученные данные, установлено, что у носителей ВЛКРС по сравнению с интактными животными наблюдается увеличение концентрации ЦИК в сыворотке крови ($84,93 \pm 9,40$, $98,25 \pm 9,61$ у.е.; $P > 0,05$), а также усиление функциональной активности нейтрофилов ($0,52 \pm 0,01$, $0,54 \pm 0,009$ ед. оп. пл.; $P > 0,05$). Аналогичную тенденцию отмечали и у больных лейкозом животных (Таблица 9).

Таблица 9.- Средние значения ЦИК в сыворотке крови и НСТ у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу, $M \pm m$

Показатели, ед. измерения	РИД-отрицательные	Носители ВЛКРС	Больные
ЦИК, у.е.	$84,93 \pm 9,40$	$98,25 \pm 9,61$ $P > 0,05$	$108,87 \pm 25,33$ $P > 0,05$
НСТ-тест, ед. оп. пл.	$0,52 \pm 0,01$	$0,54 \pm 0,009$ $P > 0,05$	$0,54 \pm 0,02$ $P > 0,05$

Затем мы провели анализ показателей ЦИК и НСТ-теста у носителей ВЛКРС и больных животных в сравнении со средними значениями интактных животных.

Результаты анализа представлены на рисунках 8 и 9.

В результате было установлено, что у 31,25 % носителей ВЛКРС повышению уровня ЦИК в сыворотке крови соответствует повышение показателей НСТ-теста. Еще в 37,5 % случаев нормальное содержание ЦИК сопровождается повышенной функциональной активностью нейтрофилов (Рисунок 8).

У больных лейкозом в гематологической стадии у 44,44 % накопление концентрации ЦИК в сыворотке крови также сопровождается усилением функциональной активности нейтрофилов в НСТ-тесте, в тоже время у 33,33 % – угнетением (Рисунок 9).

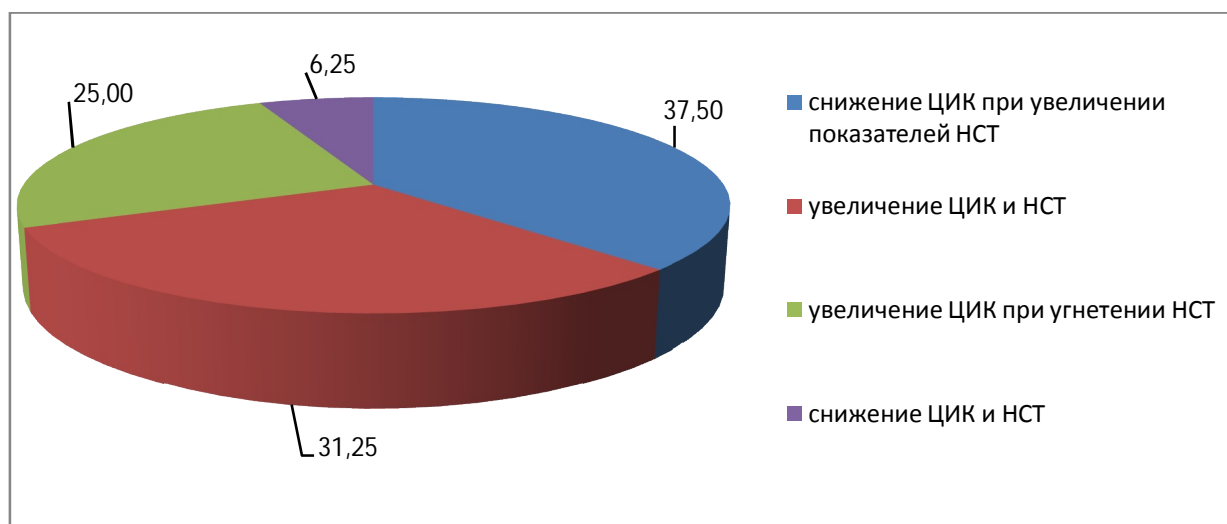


Рисунок 8.- Взаимосвязь уровня ЦИК и функционального состояния лейкоцитов в НСТ-тесте у носителей ВЛКРС

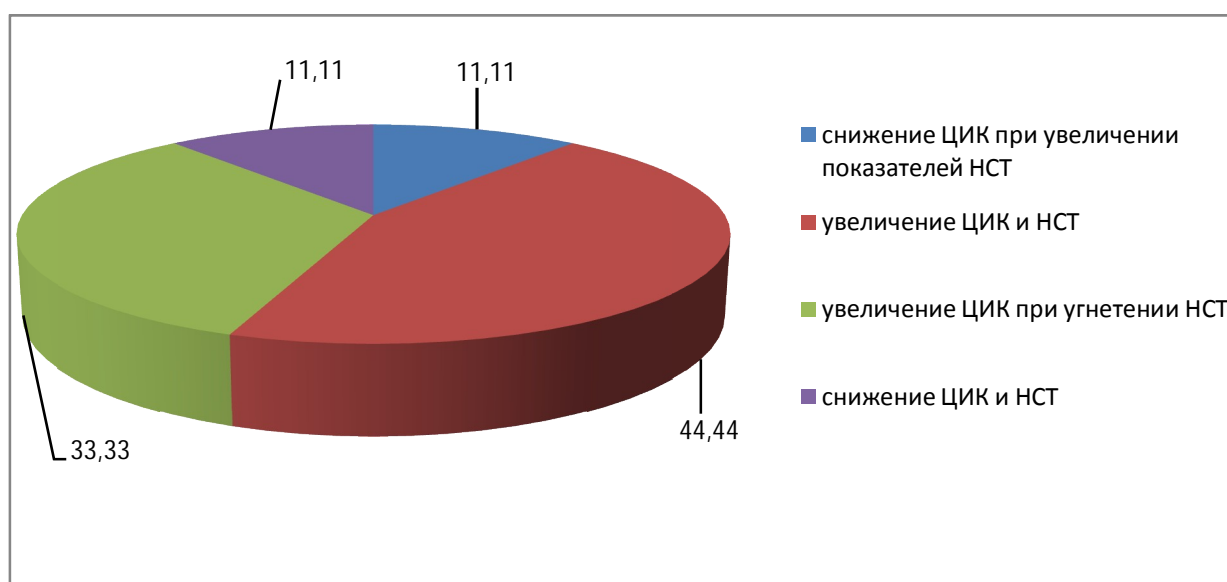


Рисунок 9.- Взаимосвязь уровня ЦИК и функционального состояния лейкоцитов в НСТ-тесте у больных лейкозом животных

Таким образом, повышенный уровень ЦИК сочетается с усиленной функциональной активностью лейкоцитов в НСТ-тесте у 31,25 % носителей ВЛКРС и 44,44 % больных лейкозом животных. Снижение числа гранулоцитов, способных восстанавливать НСТ, у третьей части больных животных при одновременном увеличении ЦИК, возможно, за счет угнетения гранулопоэза лейкозным процессом.

Случаи повышенной функциональной активности нейтрофилов у носителей ВЛКРС и больных лейкозом с нормальным содержанием ЦИК указывают на роль и других механизмов, участвующих в активации нейтрофилов.

2.2.4. Исследование чувствительности лимфоцитов к левамизолу у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу

С целью сравнительного исследования крови крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу путем постановки реакции спонтанного розеткообразования с чистой взвесью лимфоцитов и с лимфоцитами, обработанными левамизолом, с последующим вычислением индекса сдвига было использовано 50 коров. По результатам серологических (РИД) и гематологических исследований выявлен 21 носитель вируса лейкоза крупного рогатого скота, 4 больные лейкозом коровы и 25 здоровых, не реагирующих в РИД животных. Затем исследовали кровь путем постановки реакции розеткообразования параллельно с двумя пробами лимфоцитов: чистой взвесью (контрольная) и после экспозиции с левамизолом (опытная). Лимфоциты опытной пробы обработали левамизолом в концентрации 0,5 мкг/мл среды 199, содержащей 1×10^5 лимфоцитов, и инкубировали 1 час при 37°C. Затем вычисляли индекс сдвига (ИС).

По результатам исследования с помощью дискретно-динамического анализа, проведенного в предыдущем эксперименте, оказалось, что прогностически важным интервалом значений индекса сдвига в качестве базисного параметра является $\leq 0,95$, а в качестве вариабельного - $\leq 1,19$ для животных, имеющих устойчивость к лейкозной инфекции (табл. 8). Поэтому по результатам вычисления индекса сдвига всех исследуемых животных разделили на 3 группы. В 1-ю группу были включены коровы с низкой чувствительностью Т-лимфоцитов к левамизолу ($ИС \leq 0,95$); во 2-ю – с ИС от 0,96 до 1,19 и 3-ю - с высокой

чувствительностью ($ИС \geq 1,20$). Полученные данные были сопоставлены с результатами диагностических исследований на лейкоз. Результаты представлены в таблице 10.

Из таблицы 10 видно, что процесс изменений экспрессии Е-рецепторов лимфоцитов осуществляется как у РИД-отрицательных, так и инфицированных ВЛКРС. Однако при наличии вируса повышенная чувствительность к левамизолу ($ИС \geq 1,20$) встречается в 2 раза чаще (у 23-х из 25-и носителей ВЛКРС (92 %) и у 12-и из 25-и РИД-отрицательных (46 %)). Необходимо отметить, что все 12 РИД-отрицательных животных 3-й группы имели исходно сниженное содержание Т-лимфоцитов, несущих рецептор к эритроцитам барана.

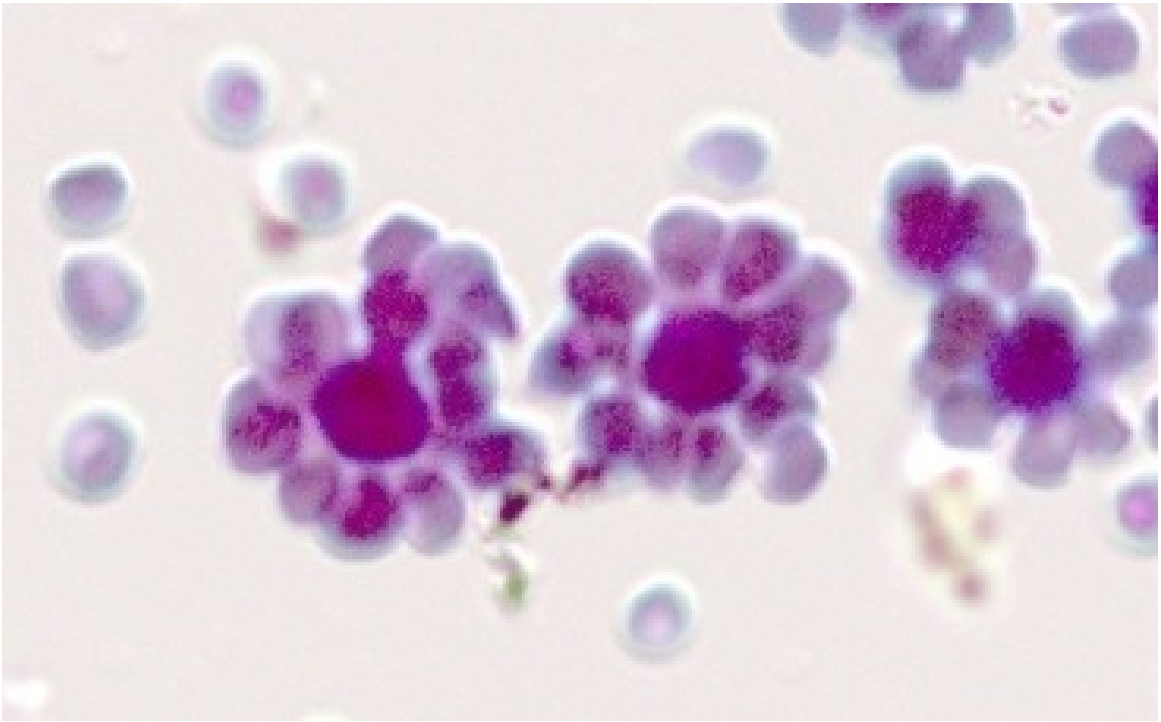
Таблица 10.- Показатели чувствительности Т-клеток к левамизолу *in vitro* у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу

Группа животных	РИД (-)	Носители ВЛКРС	
		всего	в т.ч. гембольные
1-я группа ($ИС \leq 0,95$)	12	-	-
2-я группа (от 0,96 до 1,19)	1	2	-
3-я группа ($ИС \geq 1,20$)	12	23	4

Другой особенностью характера реакции Е-рецепторов на Т-клетках с повышенной чувствительностью к левамизолу является повышение доли Е-РОК в виде морул, несущих на поверхности от 7 и выше эритроцитов, тогда как у животных, имеющих низкую чувствительность лимфоцитов к этому препарату, преимущественно наблюдали клетки, присоединившие от 3 до 5 эритроцитов.

На рисунках 10 (а, б) и 11 представлены Т-лимфоциты, образующие розетки с эритроцитами барана, от животных с высокой и низкой чувствительностью к препарату.

а



б

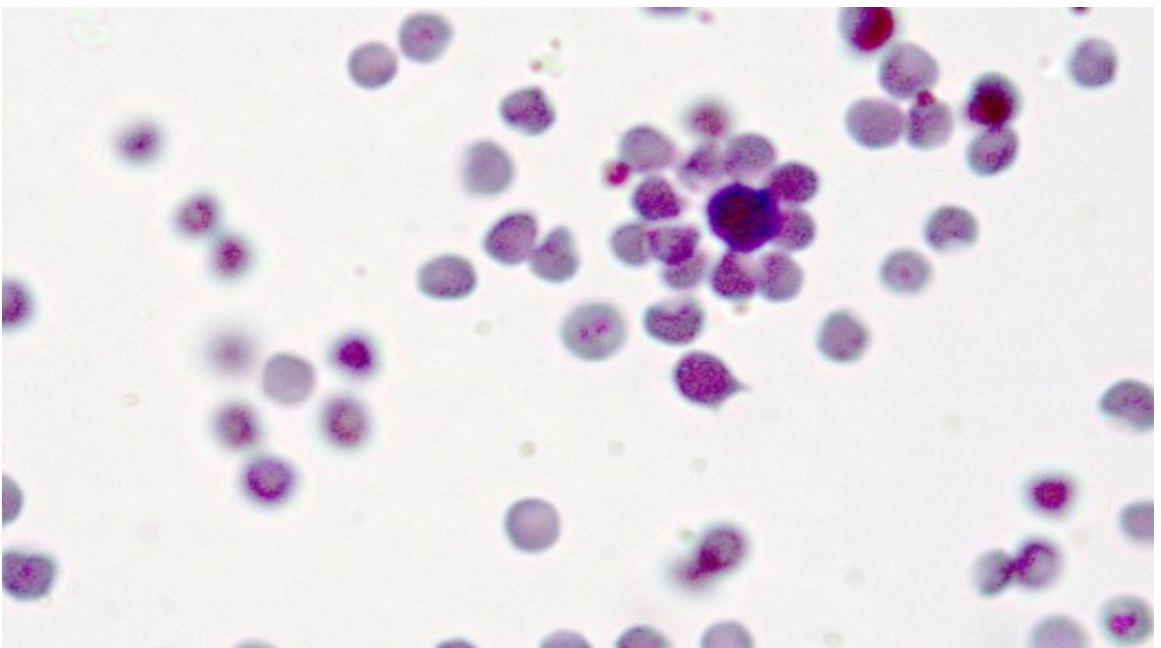


Рисунок 10 (а, б).- Т-лимфоциты, образующие розетки с эритроцитами барана в виде морул после инкубации лимфоцитов *in vitro* в среде с левамизолом (окраска по Романовскому, увеличение x 100).

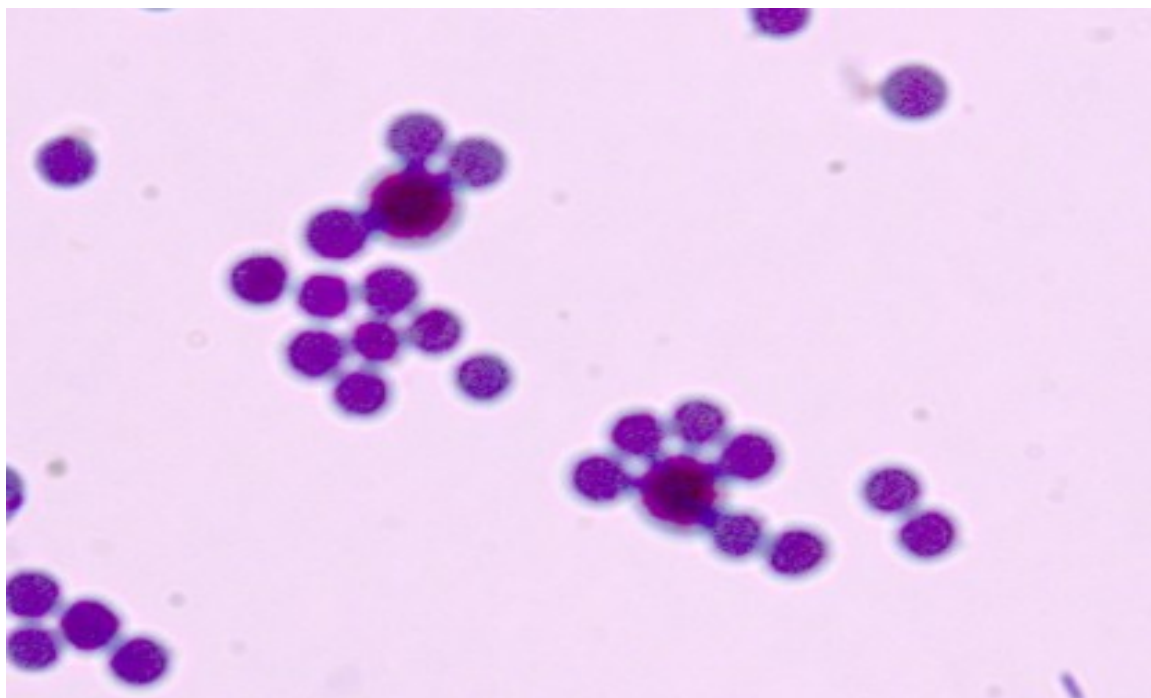


Рисунок 11.- Т-лимфоциты, образующие розетки с эритроцитами барана после инкубации лимфоцитов *in vitro* в среде с левамизолом у крупного рогатого скота с низкой чувствительностью к препарату (окраска по Романовскому, увеличение $\times 100$).

Следовательно, наши исследования подтвердили данные ряда авторов о том, что после экспозиции лимфоцитов *in vitro* в среде с левамизолом у индивидуумов с нарушением Т-системы иммунитета отмечается повышение уровня Т-клеток и нормализация их количества.

Результаты исследования позволяют предполагать, что определение чувствительности Т-клеток к левамизолу *in vitro* может служить одним из критериев иммунологического контроля по выявлению животных не только с явной инфекционной патологией, но и предрасположенностью к лейкозу крупного рогатого скота.

Таким образом, на основании проведенных исследований разработан способ выявления повышенной чувствительности у крупного рогатого скота к инфекции ВЛКРС. Критерием, способствующим выделению животных с

предрасположенностью к данному заболеванию, является индекс сдвига, который у здорового крупного рогатого скота составляет $\leq 0,95$, а у животных группы риска $\geq 1,2$.

2.3. Испытание способа выявления крупного рогатого скота с повышенной чувствительностью к лейкозной инфекции

С целью испытания способа выявления крупного рогатого скота с предрасположенностью к заболеванию лейкозом, основанного на оценке функционального состояния Т-лимфоцитов, мы поставили перед собой задачу провести экспериментальные исследования на коровах и молодняке различного периода постнатального развития из хозяйств с различной эпизоотической обстановкой по данной инфекции.

2.3.1. Оценка чувствительности лимфоцитов к левамизолу *in vitro* у здорового крупного рогатого скота в возрастном аспекте

Для оценки чувствительности лимфоцитов к левамизолу в периферической крови 100 голов крупного рогатого скота из благополучного по лейкозу хозяйства в разные возрастные периоды (у 20-и животных в возрасте до 2-х мес, у 20-и животных в возрасте 5-6 мес, у 20-и в возрасте 12 мес, у 20-и в возрасте 17-18 мес и у 20-и коров) определили количество Т-лимфоцитов, несущих рецептор к эритроцитам барана (Е-РОК), затем их количество после экспозиции с левамизолом *in vitro* (Елев-РОК).

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 11.

Таблица 11.- Количество Е-РОК до и после обработки левамизолом лимфоцитов периферической крови здорового крупного рогатого скота разного возраста, $M \pm m$

Возрастная группа	Количество животных	Е-РОК, %	Елев-РОК, %	ИС
до 2-х мес	20	34,26±2,78	16,79±1,35	0,56±0,05
5-6 мес	20	31,21±3,77	14,10±0,75	0,55±0,06
12 мес	20	19,20±0,91*	9,86±0,92*	0,52±0,03
17-18 мес	20	18,60±1,75*	12,73±1,59	0,71±0,07
Коровы	20	18,10±1,34*	12,36±1,27*	0,67±0,06

Примечание: * $P < 0,01$

Из таблицы 11 видно, что наибольшее число Т-лимфоцитов содержится в крови молодняка крупного рогатого скота в возрасте до 2-х месяцев и сохраняется на этом уровне до 5-6-месячного возраста. Достоверное снижение числа Е-РОК наблюдается с 12-месячного возраста (соответственно: 34,26±2,78%, 19,20±0,91%, $P < 0,01$), достигая минимального значения у коров. При определении числа Т-лимфоцитов, идентифицированных в нагрузочном тесте с левамизолом, отмечается аналогичная тенденция в траектории показателей, однако разница в том, что наиболее низкий уровень левамизолстимулированных лимфоцитов выявлен у животных в возрасте 12 мес (16,79±1,35 %, 9,86±0,92 %, $P < 0,01$).

Индекс сдвига, определяемый как отношение Елев-РОК к Е-РОК, у молодняка крупного рогатого скота до 12-месячного возраста находился в одинаковых пределах и только к 17-18-месячному возрасту его значения увеличивались, однако не достигали достоверной разницы. Повышенная чувствительность к левамизолу ($ИС \geq 1,2$) была выявлена только у одного животного в возрасте 17-18 месяцев и у одной коровы.

Таким образом, при оценке функционального состояния Т-лимфоцитов у здорового крупного рогатого скота разного возраста дефицит Т-клеток,

обусловленный блокадой поверхностных маркеров, выявлен у 5 % коров и 5 % молодняка 17-18-месячного возраста.

2.3.2. Оценка чувствительности лимфоцитов к левамизолу *in vitro* у крупного рогатого скота из неблагополучного по лейкозу стада в возрастном аспекте

В периферической крови 110-и голов крупного рогатого скота разного возраста (до 2-х мес, 5-6 мес, 12 мес, 17-18 мес и коровы) определили количество Т-лимфоцитов, несущих рецептор к эритроцитам барана (Е-РОК), затем их количество после экспозиции с левамизолом *in vitro* (Елев-РОК). Результаты проведенных исследований представлены в таблице 12.

Таблица 12. – Количество Е-РОК до и после обработки левамизолом лимфоцитов периферической крови у крупного рогатого скота разного возраста, $M \pm m$

Возрастная группа	Количество животных	Е-РОК, %	Елев-РОК, %
до 2-х мес	15	22,2±0,95	12,53±1,22
5-6 мес	15	18,46±1,01*	12,26±1,34
12 мес	20	16,0±0,92*	10,79±0,92*
17-18 мес	30	16,95±0,55*	18,52±1,97*
Коровы	30	13,05±1,22*	20,84±0,92*

* изменения достигают достоверной разницы ($P < 0,05$)

Из таблицы 12 видно, что наибольшее количество Т-лимфоцитов содержится в крови молодняка крупного рогатого скота в возрасте до 2-х месяцев. У животных с 5-6-месячного возраста по сравнению с телятами младшего возраста наблюдается достоверное снижение числа Т-лимфоцитов, которое

достигает минимума у коров (соответственно: $22,2 \pm 0,95$; $13,05 \pm 1,22$ %, $P < 0,001$). В тоже время число Т-лимфоцитов, идентифицированных в нагрузочном тесте с левамизолом, напротив, с высокой степенью достоверности увеличивается с 17-18-месячного возраста, достигая максимального уровня у коров (соответственно: $12,53 \pm 1,22$; $20,84 \pm 0,92$ %, $12,53 \pm 1,22$).

В дальнейшем, по результатам диагностического исследования на лейкоз в реакции иммунной диффузии (РИД), крупный рогатый скот всех возрастных категорий разделили на 2 группы: 1-ю составили РИД-отрицательные; 2-ю – носители ВЛКРС. У всех животных был подсчитан индекс сдвига. Результаты исследований представлены в таблице 13.

Таблица 13.- Результаты оценки чувствительности лимфоцитов к левамизолу в реакции спонтанного розеткообразования у РИД-отрицательных и инфицированных ВЛКРС животных разного возраста

Группа	возраст								
	12 мес			17-18 мес			коровы		
	n	ИС \geq 1,2	%	n	ИС \geq 1,2	%	n	ИС \geq 1,2	%
РИД-отрицательные	19	2	10,5	22	8	36,4	17	7	41,2
Носители ВЛКРС	1	-	-	8	8	100,0	13	11	84,6

Из таблицы 13 видно, что признаки блокады Е-рецепторов обнаружены у РИД-отрицательных животных с 12-месячного возраста (10,5 %) и более резко выражены у крупного рогатого скота старшего возраста (у 36,4 % в возрасте 17-18 мес и у 41,2 % коров).

Обработка левамизолом лимфоцитов крови носителей ВЛКРС в возрасте 17-18 мес привела к ликвидации дефицита Т-клеток у 100 %, тогда как среди коров – у 84,6 %. Также отмечено, что блокада Т-клеток не проявлялась у одного носителя ВЛКРС в возрасте 12 месяцев.

Таким образом, признаки блокады поверхностных маркеров Т-клеток отмечаются как у РИД-отрицательных животных неблагополучного по лейкозу стада, так и носителей ВЛКРС, преимущественно у молодняка с 17-18-месячного возраста (соответственно: 36,4 % среди РИД (-) и 100 % среди РИД (+)) и взрослого поголовья (41,2 и 84,6 %).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лейкоз крупного рогатого скота в настоящее время распространен во многих субъектах Российской Федерации и составляет в структуре инфекционных заболеваний до 60-63 %, не является исключением и Кемеровская область, в которой нами была прослежена эпизоотическая ситуация.

Анализ результатов серологических и гематологических исследований, проведенных в Кемеровской области с 2007 по 2013 гг., показал, что несмотря на снижение числа выделенных животных-вирусоносителей, эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в регионе остается достаточно напряженной. Несмотря на то, что на начало 2014 года на территории Кемеровской области неблагополучные пункты отсутствовали, в регионе практически повсеместно устанавливались случаи заболевания по результатам серологических, а также и гематологических исследований, но, тем не менее, неблагополучие не объявлялось. Аналогичные сведения были представлены в аналитическом обзоре эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в РФ (1996-2010), где указывается ряд регионов, в том числе Кемеровская область, в которых числятся «подозрительные» по лейкозу пункты (Гулюкин М.И., Симонян Г.А. и др. Аналитический обзор эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в Российской Федерации (1996-2010). М., 2011. 46 с.).

Одним из важных моментов в общем комплексе профилактических мер при лейкозе крупного рогатого скота, по нашему мнению и по мнению других ученых, является необходимость проведения иммунологического контроля по выявлению животных не только с явной инфекционной патологией, но и предрасположенностью к данному заболеванию.

Проводя анализ зарубежной и отечественной литературы, посвященной иммунологическим аспектам механизма развития лейкозов и других гемобластозов крупного рогатого скота, мы отметили, что в подавляющем

большинстве работ сообщается об изменении количественного соотношения Т- и В-лимфоцитов в периферической крови (тенденции снижения Т-клеток и повышения в отдельные периоды относительного содержания В-клеток). Как известно, развитие Т-клеточного дефицита чревато повышенной восприимчивостью организма животных к инфекционным заболеваниям, особенно вирусной этиологии.

Для изучения поверхностных рецепторов лимфоцитов используют методы, основанные на феномене розеткообразования. Этот метод заключается во взаимодействии мембранных рецепторов лимфоцитов с индикаторными клетками-эритроцитами, чаще всего барана. С помощью интактных эритроцитов барана выявляют спонтанные розетки, или Е-розеткообразующие клетки (Е-РОК), к которым относятся Т-лимфоциты (Уманский Ю.А., Пинчук В.Г. Лимфоциты и опухолевый рост. Киев: Наукова думка, 1982. 256 с.). Некоторые авторы приводят в своих публикациях данные, свидетельствующие о низкой способности лимфоцитов к образованию Е-розеток с эритроцитами барана. По их мнению, не исключена полная утрата Е-розеткообразования у некоторых инфицированных ВЛКРС и больных лейкозом животных, а также у больных людей острым лимфобластным лейкозом (Шабалин В.Н., Серова Л.Д. Клиническая иммуногематология. Л.: Медицина, 1988. 312 с.; Власенко В.С. и др. Выявление животных с повышенным риском к заболеванию вирусом лейкоза крупного рогатого скота. Ветеринария и кормление, 2008. №4. С. 8-9; Дудолодова Т.С. Экспериментальное обоснование применения иммунологических методов в оценке предрасположенности к заболеванию крупного рогатого скота лейкозом: автореф. дисс. канд. биол. н. Новосибирск, 2012. 18 с.).

В этой связи существенный интерес представляют сведения относительно влияния левамизола на иммунологические процессы при заболеваниях, где нарушения со стороны иммунитета, в частности депрессия клеточного иммунитета, играют существенную роль в патогенезе. Оказалось, что левамизол способен действовать на Т-лимфоциты, вызывая восстановление их содержания в

крови у больных с исходным дефицитом розеткообразующих Т-клеток при различных заболеваниях человека, в том числе при лимфогранулематозах. При этом отмечается, что левамизол не оказывал никакого влияния на Т-лимфоциты, если их содержание было в норме (Чернина Л.М., Шкворова В.В., Культепина О.С., Лебедев К.А., Большакова Н.В. Чувствительность к левамизолу иммунокомпетентных клеток у детей раннего возраста, часто болеющих инфекционно-воспалительными заболеваниями. Иммунология, 1981. №1. С. 74-77; Rosenthal M., Trabert U., Miller W. Immunotherapy with levamisole in rheumatic diseases. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 1976. V. 5. P. 216-220; Ramot B., Beniaminov M., Shoham C.H., Rosenthal E. Effect of levamisole on E-rosette-forming cells in vivo and in vitro in Hofgkin's disease. *New England Journal of Medicine*, 1976. V. 294. P. 809-811; Verhaegen H., De Cree J., De Cock W., Verbruggen F. Restoration by levamisole of low E-rosette forming cells in patients suffering from various diseases. *Clinical and Experimental Immunology*, 1977. V. 27. P. 313-318).

В связи с изложенным цель наших исследований состояла в изучении особенностей функционального состояния Т-лимфоцитов у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу и испытание эффективности иммунологических методов в оценке стад при данной инфекции.

С этой целью на первом этапе исследований мы провели подбор оптимальной концентрации левамизола для оценки чувствительности лимфоцитов в реакции спонтанного розеткообразования (Е-РОК) у носителей вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) и больного лейкозом крупного рогатого скота. Для этого были использованы различные концентрации препарата: 50 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 0,01 мкг/мл. Выбор указанного диапазона концентраций был обусловлен тем, что для изучения действия левамизола *in vitro* на Т-клетки людей, в том числе у больных лимфогранулематозом, многие исследователи использовали препарат в концентрации 50 мкг/мл (Пантелеева Е.С. с соавт. О причинах дефицита Т-лимфоцитов периферической крови у больных лимфогранулематозом.

Иммунология, 1981. №1. С. 70-74; Неприна Г.С. с соавт. Модификация Е-рецепторов циркулирующих Т-лимфоцитов в норме и при онкологических заболеваниях. Иммунология, 1986. №6. С. 62-65 и другие). В тоже время В.Е. Казмирчук с соавт. (1984)⁶⁸ утверждают, что наиболее оптимальной концентрацией левамизола при исследовании чувствительности к нему лимфоцитов (*in vitro*) является 0,01 мг/мл.

В результате проведенных исследований нами была установлена концентрационная зависимость изменения уровня экспрессии рецепторов к эритроцитам барана на поверхности мембран Т-лимфоцитов крупного рогатого скота от содержания левамизола в инкубационной среде. При этом нами было отмечено, что предпочтительно применение левамизола в конечной концентрации 0,5 мкг/мл. При использовании именно этой концентрации препарата было выражено стимулирующее действие на Т-лимфоциты носителей ВЛКРС и больных лейкозом, в то же время существенного влияния на лимфоциты здоровых животных не выявлено. Также необходимо отметить, что индекс сдвига, определяемый как отношение Елев-РОК к Е-РОК, у вирусоносителей и больных лейкозом животных достоверно увеличивался ($P < 0,001$).

На следующем этапе исследований с целью анализа пригодности метода оценки функционального состояния Т-лимфоцитов (нагрузочный тест розеткообразования с левамизолом и индекса сдвига) для определения клеточного иммунитета, мы применили дискретно-динамический анализ. Помимо этого для установления более полной и объективной картины в различии взаимосвязей между иммунологическими параметрами у экспериментальных животных в периферической крови были дополнительно определены другие иммунологические показатели. Учитывая, что картина между иммунными компонентами очень сложна и зависит от большого количества

⁶⁸ Казмирчук В.Е., Бычкова Н.Г., Андрушук А.А., Гюллинг Э.В., Кравчук Г.П. Способ определения чувствительности лимфоцитов к левамизолу. Описание изобретения к авторскому свидетельству СССР SU №1064952, МПК А61К 39/00. №3389688/28-13; заявл. 04.02.82; опубл. 07.01.84, Бюл. № 1.

разнонаправленных влияний так, что охарактеризовать всю сеть взаимодействий практически невозможно (Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунная недостаточность (выявление и лечение). М: Медицинская книга, Н. Новгород: Издательство НГМА, 2003. 443 с.), мы отобрали наиболее информативные методы, позволяющие оценить состояние иммунной системы, затем интерпретировать иммунологические показатели в норме и при функциональном напряжении. Эти методы включали: уровень Т-, В-лимфоцитов и лимфоцитов-киллеров периферической крови, уровень функциональной активности нейтрофилов в НСТ-тесте, а также уровень циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови.

Из научной литературы известно, что с помощью дискретно-динамического анализа можно описать иммунный статус животных на основе взаимосвязей параметров, состояние дисбаланса и моделировать систему иммунитета у интактных и больных животных. Авторам удалось охарактеризовать иммунный статус у интактных и вакцинированных противотуберкулезными вакцинами животных, у крупного рогатого скота, инфицированного атипичными микобактериями, а также у здорового и родившегося от матерей, инфицированных вирусом лейкоза, молодняка крупного рогатого скота (Власенко В.С., Бажин М.А. Взаимосвязи в системе иммунитета у интактных и привитых вакциной БЦЖ телят. Инфекционная патология животных: Сб. науч. тр. ВНИИБТЖ. Омск, 2001. С. 198-202; Куварин А.С., Власенко В.С., Новиков А.Н., Кошечев Н.Н. Оценка иммунного статуса у крупного рогатого скота, инфицированного атипичными микобактериями. Эпизоотология, диагностика и профилактика хронических инфекционных болезней животных: Сб. науч. тр. ВНИИБТЖ. Омск, 2003. С. 131-138; Бажин М.А. с соавт. Иммунопрофилактика в комплексе противотуберкулезных мероприятий [Текст]. Ветеринарная патология, № 1-2. 2004. С. 139-142; Власенко В.С. Оптимизация методов контроля и коррекции иммунного статуса при туберкулезе и лейкозе крупного рогатого скота: автореф. дисс. д. биол. н. Казань, 2011. 43 с.). Иммунологический

дисбаланс был выявлен при различных формах псориаза (Петрова И.В., Амирова И.В. Иммунологический дисбаланс при различных формах псориаза. Иммунология, 1984. № 6. С. 74-76), при бруцеллезе у тёлочек (Бажин М.А., Финько Н.И., Обосня Р.Б. Взаимосвязь иммунологических параметров у молодняка крупного рогатого скота при бруцеллезе. Совершенствование систем и методов в борьбе с бруцеллезом и туберкулезом животных: сб. науч. тр. Новосибирск, 1987. С. 42-51), при лейкозе крупного рогатого скота (Власенко В.С. Иммунологические изменения у инфицированного вирусом лейкоза и больного лейкозом крупного рогатого скота. Актуальные проблемы инфекционных и незаразных патологий животных: Матер. X Междунар. науч.-практ. конф. Омск, 2010. С. 209-212) и других патологических состояниях.

Подвергнув иммунологические параметры математической обработке с помощью дискретно-динамического анализа мы установили, что из большого количества возможных сочетаний прогностически значимыми оказались именно те, которые характеризовали функциональное состояние Т-лимфоцитов: индекс сдвига (ИС) и нагрузочный тест Е-розеткообразования с левамизолом (Елев-РОК). Все это свидетельствовало о важной роли этих показателей в развитии противолейкозного иммунитета.

На основании выявления значимых сочетаний параметров с различными взаимосвязями нами была составлена дифференциально-прогностическая таблица, которая позволила нам оптимизировать процесс интерпретации иммунологических показателей в норме и при функциональном напряжении иммунной системы. Были выявлены интервалы значений параметров в их сочетаниях, характерные для крупного рогатого скота с повышенной устойчивостью к лейкозной инфекции. При этом показано, что наиболее информативные соотношения, при которых интервалы значений параметров соответствовали только иммунологическим показателям здоровых животных, были установлены с участием ИС и нагрузочного теста с левамизолом. Оказалось, что прогностически важным интервалом значений индекса сдвига в качестве

базисного параметра является $\leq 0,95$, а в качестве переменного - $\leq 1,19$ для животных, имеющих устойчивость к лейкозной инфекции.

Также нам удалось установить, что при некоторых соотношениях, в основном с участием ЦИК и НСТ-теста, были выявлены инфицированные ВЛКРС и больные лейкозом, у которых интервалы соответствующих пар сочетаний соответствовали животным с повышенной устойчивостью к лейкозной инфекции. Такая ситуация возникает в результате подавления метаболической активности нейтрофилов у некоторых животных с функциональным напряжением иммунной системы, тогда как у основной части таких животных она усиливается.

Учитывая, что основная роль в элиминации формирующихся в организме ЦИК принадлежит полинуклеарам, а также циркулирующим или тканевым макрофагам (Виноградова Т.В., Капелько М.А., Вельтищев Ю.Е., Стефани Д.В. Взаимосвязь между уровнем циркулирующих иммунных комплексов и функциональным состоянием фагоцитирующей системы. Иммунология, 1986. №5. С. 63-65; Жукова Е.Н., Афанасьева С.Н. Циркулирующие иммунные комплексы и полинуклеары в механизмах обострения хронического панкреатита. Вопросы клинической иммунологии: Матер. науч. конф. Омск: Омский мед. институт, 1989. С. 19-20), очевидно, что патологический характер ЦИК проявляется в тех случаях, когда оказывается недостаточным фагоцитоз или вследствие первичного ослабления фагоцитирующей способности клеток, или в результате избыточного образования иммунных комплексов. Поэтому мы поставили перед собой задачу изучить взаимосвязь между уровнем циркулирующих иммунных комплексов и функциональным состоянием лейкоцитов у крупного рогатого скота при лейкозе.

В результате таких исследований было установлено участие циркулирующих иммунных комплексов в механизмах прогрессирования лейкоза крупного рогатого скота, на что указывало угнетение функциональной активности нейтрофилов, сопровождающееся увеличением ЦИК, у третьей части больных лейкозом коров. В то же время нами не исключалась роль других механизмов,

участвующих в активации нейтрофилов, так как были выявлены случаи повышения показателей НСТ-теста сопутствующие нормальному содержанию ЦИК у 37,5 % животных, инфицированных ВЛКРС.

Результаты исследования иммунного статуса с помощью дискретно-динамического анализа послужили для нас основанием к разделению животных по ИС на 3 группы при проведении последующего эксперимента по изучению влияния левамизола на количество Т-лимфоцитов и состояние Е-рецепторов Т-клеток *in vitro* у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу. В 1-ю группу были включены коровы с $ИС \leq 0,95$, во 2-ю – с ИС от 0,96 до 1,19 и в 3-ю группу с $ИС \geq 1,20$. Разделив 50 экспериментальных животных на такие группы и сопоставив с результатами диагностических исследований в РИД нами были отмечены 2 основные особенности экспрессии Е-рецепторов на Т-лимфоцитах коров. Первой особенностью являлось то, что процесс изменений экспрессии Е-рецепторов осуществлялся и у РИД-отрицательных (у 46%) и у инфицированных ВЛКРС (у 92%), но при исходно сниженном содержании Т-лимфоцитов, т.е. у всех этих животных индекс сдвига был $\geq 1,20$. Второй особенностью являлось повышение доли Е-РОК в виде морул. Таким образом, наши исследования подтвердили данные ряда авторов (Beniaminov M., Ramot B. Letter: In vitro restoration by levamisole of thymus derived lymphocyte function in Hodgkin's disease. Lancet, 1975. V. 1 (7904). P. 464; Rosenthal M., Trabert U., Miller W. Immunotherapy with levamisole in rheumatic diseases. Scandinavian Journal of Rheumatology, 1976. V. 5. P. 216-220; Ramot B., Beniaminov M., Shoham C.H., Rosenthal E. Effect of levamisole on E-rosette-forming cells in vivo and in vitro in Hofgkin's disease. New England Journal of Medicine, 1976. V. 294. P. 809-811; Чернина Л.М., Шкворова В.В., Культепина О.С., Лебедев К.А., Большакова Н.В. Чувствительность к левамизолу иммунокомпетентных клеток у детей раннего возраста, часто болеющих инфекционно-воспалительными заболеваниями. Иммунология, 1981. №1. С. 74-77; Крифукс О.И., Цой И.Г. Особенности модификации Е-рецепторов на Т-лимфоцитах периферической

крови больных рожей. Иммунология, 1988. №2. С. 76-79) о том, что после экспозиции лимфоцитов *in vitro* в среде с левамизолом у индивидуумов с нарушением Т-системы иммунитета отмечается повышение уровня Т-клеток и нормализация их количества.

На основании этих результатов мы пришли к выводу, что определение этого индекса может служить критерием иммунологического контроля по выявлению животных не только с явной инфекционной патологией, но и с предрасположенностью к лейкозу крупного рогатого скота. Поэтому на следующем этапе нашей работы мы поставили перед собой задачу испытания эффективности этого иммунологического метода в оценке стад из благополучного и неблагополучного по лейкозу хозяйства.

При определении индекса сдвига у крупного рогатого скота разных возрастных групп из благополучного по лейкозу хозяйства мы установили, что он, как правило, не превышал отметки 0,95, и только у одной головы 17-18-месячного возраста и одной коровы был выше 1,2. Что касается животных из неблагополучного хозяйства, то повышенная чувствительность к левамизолу ($ИС \geq 1,20$) наблюдалась у 100 % молодняка 17-18-месячного возраста и 84,6 % коров, имеющих при диагностическом исследовании на лейкоз положительную реакцию. Отсутствие повышенной чувствительности к левамизолу у двух коров (15,4 %), по-видимому, объясняется тем, что у этих животных отмечено гематологическое проявление лейкозного процесса, при котором развивается истинный дефицит Т-клеток, сопряженный не только с блокадой поверхностных маркеров, но и со снижением их количества вследствие ослабления лимфопоэза и подавления рециркуляции. Эти данные согласуются с исследованиями, проведенными Е.С. Пантелеевой с соавт. (1981)⁶⁹, которой было установлено, что после обработки лимфоцитов левамизолом *in vitro* от больных людей,

⁶⁹ Пантелеева Е.С. с соавт. О причинах дефицита Т-лимфоцитов периферической крови у больных лимфогранулематозом. Иммунология, 1981. №1. С. 70-74

находящихся на IV стадии лимфогранулематоза, количество Е-РОК существенно ниже, чем при II и III стадиях.

Этими же авторами отмечается, что на ранней стадии заболевания при отсутствии дефицита Т-клеток блокада Е-рецепторов отсутствует и левамизол в таких случаях никакого влияния не оказывает. Нами также выявлен один носитель ВЛКРС в возрасте 12 месяцев, у которого не проявлялась блокада Т-клеток и на основании факта, указанного в научной литературе, мы сделали предположение о том, что отсутствие повышенной чувствительности у этого животного к левамизолу могло быть связано с начальным периодом инфицирования.

Признаки блокады также были нами выявлены у РИД-отрицательных животных неблагополучного стада, начиная с молодняка в возрасте 12 месяцев (с 10,5 % у молодняка до 41,2 % у коров).

Некоторые авторы, проводившие исследования чувствительности к левамизолу иммунокомпетентных клеток, также отмечают, что *in vitro* левамизол оказывает действие, близкое к его действию при лечении данным препаратом больных, имеющих низкие показатели Е-РОК в периферической крови. Поэтому, по их мнению, целесообразно проводить лечение этим препаратом для нормализации показателей иммунитета (Чернина Л.М., Шкворова В.В., Культепина О.С., Лебедев К.А., Большакова Н.В. Чувствительность к левамизолу иммунокомпетентных клеток у детей раннего возраста, часто болеющих инфекционно-воспалительными заболеваниями. Иммунология, 1981. №1. С. 74-77; Пантелеева Е.С. с соавт. О причинах дефицита Т-лимфоцитов периферической крови у больных лимфогранулематозом. Иммунология, 1981. №1. С. 70-74).

В связи с вышесказанным, на наш взгляд, этот метод оценки функциональной активности Т-лимфоцитов можно было бы успешно использовать для подбора иммунокорректора и прогнозирования эффективности препаратов повышающих иммунологическую резистентность организма и устойчивость животных к

заражению ВЛКРС. Тем более, что в настоящее время одной из актуальных проблем является изыскание и внедрение в систему мер борьбы с лейкозом эффективных и доступных биологически активных веществ, повышающих иммунологическую резистентность и продуктивные качества (Смирнов Ю.П., Суворова И.Л. Оценка влияния лигфола на развитие лейкоза у инфицированного вирусом лейкоза крупного рогатого скота. Актуальные вопросы ветеринарной медицины: Матер. II Сибирского ветеринарного конгресса. Новосибирск, 2010. С. 365-366; И Александров И.Д. Иммуномодуляторы при лейкозе крупного рогатого скота. Эффективные и безопасные лекарственные средства: Матер. I Междунар. конгресса ветеринарных фармакологов. СПб., 2008. С. 60-61; Александров И.Д. Фармакокоррекция при лейкозе крупного рогатого скота. Международный вестник ветеринарии, 2009. №2. С. 50-54; Александров И.Д. Основа в борьбе с лейкозом крупного рогатого скота. Ветеринарная патология, 2012. №2. С. 126-128; Ерзутов А.И., Смирнов Ю.П., Суворова И.Л. Поиск методов защиты молодняка от заражения вирусом лейкоза крупного рогатого скота. Актуальные проблемы животноводства и ветеринарии: Матер. науч.-практ. конф. Н. Новгород, 2013. С. 105-109).

Некоторые исследователи отмечают, что в современных условиях только за счет приобретенного иммунодефицита у 30-50 % животных снижен синтез антител в 2-4 раза по отношению к животным с нормальным иммунным статусом (Александров И.Д., Воронин Е.С. Способ профилактики лейкоза крупного рогатого скота. Описание изобретения к патенту. №2188655 РФ. №2000104287/13; заявл. 24.02.00; опубл. 10.09.02; Бюл. №13; Смирнов Ю.П., Суворова И.Л. Оценка влияния лигфола на развитие лейкоза у инфицированного вирусом лейкоза крупного рогатого скота. Актуальные вопросы ветеринарной медицины: Матер. II Сибирского ветеринарного конгресса. Новосибирск, 2010. С. 365-366). По нашему мнению, введение этого дополнительного метода оценки функциональной активности Т-лимфоцитов позволит проводить более эффективную диагностику лейкоза, особенно в тех случаях, когда ввиду глубокой недостаточности

иммунной системы возможно снижение синтеза антител к вирусу лейкоза и не выявление таких животных в РИД из-за порога его чувствительности.

Таким образом, разработан метод выявления крупного рогатого скота с высокой чувствительностью к инфекционным заболеваниям, в том числе к лейкозной инфекции, основанный на оценке функционального состояния Т-лимфоцитов в нагрузочном тесте Е-розеткообразования с левамизолом.

Выводы:

1. Лейкоз крупного рогатого скота имеет широкую и неодинаковую тенденцию к распространению во всех районах Кемеровской области со средними показателями инфицированности от 1,95 до 26% и выявления гематологически больных от 0,11 до 4,24% за период 2007-2013 гг.

2. Исследование чувствительности лимфоцитов в реакции спонтанного розеткообразования к левамизолу показало, что применение препарата в конечной концентрации 0,5 мкг/мл в инкубационной среде оказывает иммунокорректирующее действие на экспрессию рецепторов к эритроцитам барана Т-клетками у носителей ВЛКРС и больных лейкозом животных. Этот эффект при использовании иммуностимулятора в других концентрациях (0,01 и 50 мкг/мл) не наблюдается.

3. С помощью дифференциально-прогностической таблицы, составленной на основе дискретно-динамического анализа установлено, что индекс сдвига (ИС) является наиболее важным показателем, при этом прогностически значимыми интервалами значений ИС, характерными для крупного рогатого скота, имеющего повышенную устойчивость к лейкозной инфекции является $\leq 0,95$ в качестве базисного и $\leq 1,19$ в качестве варибельного параметров.

4. Установлено, что повышенный уровень ЦИК сочетается с усиленной функциональной активностью лейкоцитов в НСТ-тесте у 31,25 % носителей ВЛКРС и 44,44 % больных лейкозом животных. Снижение числа гранулоцитов, способных восстанавливать НСТ, у 33% больных животных при одновременном

увеличении ЦИК указывает на участие иммунных комплексов в механизме прогрессирования заболевания.

5. Индекс сдвига, определяемый как отношение процента Е-РОК после инкубации с левамизолом к числу Е-РОК до обработки препаратом является критерием, способствующим выделению животных с дефицитом Т-клеток, обусловленного блокадой поверхностных маркеров Т-клеток, который у здорового крупного рогатого скота составляет $\leq 0,95$, а у особей с предрасположенностью к заболеванию лейкозом от 1,2 и выше.

6. Содержание Т-лимфоцитов в периферической крови телят в возрасте до 2 месяцев из благополучного по лейкозу хозяйства составило $34,26 \pm 2,78$ %, у молодняка с 12-месячного возраста их число существенно уменьшается ($19,20 \pm 0,91$ %, $P < 0,01$) и сохраняется на этом уровне в последующие сроки исследования. Количество Т-лимфоцитов, чувствительных к левамизолу, также с возрастом подвержено снижению, особенно у животных в возрасте 12 мес. Повышенная чувствительность к левамизолу была выявлена у 5 % молодняка 17-18-месячного возраста и коров.

7. Снижение в крови Т-лимфоцитов у молодняка крупного рогатого скота с 5-6-месячного возраста неблагополучного по лейкозу стада сопровождается увеличением числа левамизолчувствительных лимфоцитов с максимальной выраженностью при наиболее значительном дефиците Т-клеток. Признаки блокады ($ИС \geq 1,2$) выявлены у 100 % молодняка 17-18-месячного возраста и у 84,6 % коров, имеющих положительную реакцию в РИД, а также у 36,4-41,2 % РИД-отрицательных животных этих же возрастных групп.

Практические предложения:

1. Методическое пособие «Методы оценки функциональной активности лейкоцитов при туберкулезе и лейкозе животных», утверждено Ученым советом ГНУ ВНИИБТЖ Россельхозакадемии (протокол № 3 от 5 мая 2014 г.) и на заседании подсекции «Инфекционная патология животных в регионе Сибири и

Дальнего Востока» отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии (протокол №3 от 19 ноября 2014 г.). Предназначено для специалистов ветеринарных научно-исследовательских институтов, ВУЗов и лабораторий, проводящих исследования в области разработки новых методов и средств иммунологической защиты животных.

2. Патент РФ на изобретение №2465588 «Способ диагностики лейкоза крупного рогатого скота».

3. Теоретические и экспериментальные материалы по оценке функционального состояния Т-лимфоцитов целесообразно использовать при выполнении научно-исследовательских работ аналогичной направленности, а также в учебном процессе ВУЗов ветеринарного профиля.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВЛКРС – вирус лейкоза крупного рогатого скота

BLV – вирус лейкоза крупного рогатого скота

HTLV – вирус Т-клеточного лейкоза человека

РИД – реакция иммунной диффузии

ИФА – иммуноферментный анализ

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Ig – иммуноглобулин

ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы

цАМФ – циклический аденозин-3', 5'-монофосфат

Е-РОК – реакция спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана

Елев-РОК – нагрузочный тест Е-роzetкообразования с левамизолом

ИС или **ЕлевРОК/Е-РОК** – индекс сдвига

ЕА-РОК – реакция непрямого глобулинового розеткообразования с эритроцитами быка (для идентификации лимфоцитов-киллеров, несущих рецептор к Fc-фрагменту IgG)

ЕАС-РОК – реакция комплементарного розеткообразования с эритроцитами быка (для идентификации В-лимфоцитов, несущих рецептор к третьему компоненту комплемента (C3))

НСТ-тест – тест с нитросиним тетразолием

ПЭГ - полиэтиленгликоль

у. е. – условные единицы

ед. оп. пл. – единицы оптической плотности

GB min, GB max – граница базиса минимальная, максимальная

GP min, GP max – граница переменного показателя минимальная, максимальная

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абакин, С.С. Современный взгляд на особенности прижизненной диагностики и иммуногенез у телят в системе мать-потомство, при лейкозе крупного рогатого скота [Текст] / С.С. Абакин, С.В. Криворучко, Д.Г. Пономаренко, Е.А. Борщев // Ветеринарная патология.- №1.- 2010.- С. 6-9.
2. Абакин, С.С. Коррекция иммунного статуса телят, инфицированных ВЛКРС [Текст] / С.С. Абакин, С.В. Криворучко, Г.А. Дубравная // Сб. науч. тр. Ставропольского НИИ животноводства и кормопроизводства.- 2012.- Т.1.- №5.- С. 68-72.
3. Абакин, С.С. Новые подходы в диагностике и оздоровлении стад от вирусов лейкоза и иммунодефицита крупного рогатого скота [Текст] / С.С. Абакин, С.В. Криворучко // Ветеринарная патология.- №1.- 2013.- С. 36-39.
4. Авилов, В.М. Проблемы оздоровления крупного рогатого скота от лейкоза [Текст] / В.М. Авилов, В.М. Нахмансон // Ветеринария.- 1995.- №11.- С. 3-6.
5. Агаркова, Т.А. Сравнительная оценка показателей опсонофагоцитарной реакции у коров в зависимости от сезона года и в связи с лейкозной инфекцией [Текст] /Т.А. Агаркова // Инфекционная патология животных: Сб. науч. тр. ВНИИБТЖ.- Омск, 2001.- С. 273-274.
6. Адо, А.Д. Современное состояние учения о фагоцитозе [Текст] / А.Д. Адо, А.Н. Маянский // Иммунология.- 1983.- №1.- С. 20-26.
7. Александров, И.Д. Способ профилактики лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / И.Д. Александров, Е.С. Воронин // Описание изобретения к патенту. №2188655 РФ.- №2000104287/13; заявл. 24.02.00; опубл. 10.09.02; Бюл. №13.
8. Александров, И.Д. Иммуномодуляторы при лейкозе крупного рогатого скота [Текст] / И.Д.Александров // Эффективные и безопасные

лекарственные средства: Матер. I Междунар. конгресса ветеринарных фармакологов.- СПб., 2008.- С. 60-61.

9. Александров, И.Д Фармакокоррекция при лейкозе крупного рогатого скота [Текст] / И.Д.Александров // Международный вестник ветеринарии. Тематический выпуск: Эффективные и безопасные ветеринарные лекарственные средства.- СПб., 2009.- №2.- С. 50-54.

10. Александров, И.Д. Основа в борьбе с лейкозом крупного рогатого скота [Текст] / И.Д. Александров // Ветеринарная патология.- 2012.- №2.- С. 126-128.

11. Амироков, М.А. Комплексная оценка факторов, влияющих на особенности проявления и распространение лейкоза крупного рогатого скота, и совершенствование системы, обеспечивающей эпизоотическое благополучие [Текст]: дис. ...д-ра ветеринар. наук: 06.02.02 / Амироков Мухамед Абубекирович.- Новосибирск, 2011.- 291 с.

12. Апалькин, В.А. Лейкоз крупного рогатого скота [Текст] / В.А. Апалькин, М.И. Гулюкин, Н.И. Петров.- Спб.: Петролазер, 2005.- 106 с.

13. Асквит, П. Клиническое применение левамизола: критический обзор [Текст].- В кн.: Последние достижения в клинической иммунологии / Под ред. Р.А. Томпсона.- М.: Медицина, 1983.- С. 465-472.

14. Бажин, М.А. Взаимосвязь иммунологических параметров у молодняка крупного рогатого скота при бруцеллезе [Текст] / М.А. Бажин, Н.И. Финько, Р.Б. Обосния // Совершенствование систем и методов в борьбе с бруцеллезом и туберкулезом животных: сб. науч. тр. / ВАСХНИЛ. Сиб. отд-ние.- Новосибирск, 1987.- С. 42-51.

15. Бажин, М.А. Иммунопрофилактика в комплексе противотуберкулезных мероприятий [Текст] / М.А. Бажин, Ю.И. Смолянинов, В.Г. Ощепков, Н.Н. Кощев и др. // Ветеринарная патология.- № 1-2.- 2004.- С. 139-142.

16. Баймишев, Х.Б. Незаразная патология у крупного рогатого скота в зависимости от инфицированности вирусом лейкоза [Текст] / Х.Б. Баймишев // Матер. междунар. конф., посвящ. 80-летию Самарской НИВС Россельхозакадемии.- Самара, 2010.- С. 26-29.
17. Бударков, В.А. Изменения напряженности эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в Брянской области после аварии на Чернобыльской АЭС [Текст] / В.А. Бударков, А.В. Книзе, С.А. Зарванская // Научные основы профилактики и лечения болезней животных: Сб. науч. тр. ведущих ученых России, СНГ и др. стран.- Екатеринбург, 2005.- С. 17-22.
18. Будулов, Н.Р. Респираторные болезни крупного рогатого скота в Дагестане [Текст]: автореф. дис. ... д-ра ветеринар. наук: 16.00.03, 16.00.01 / Будулов Нурдин Рагимханович.- Краснодар, 2009.- 37 с.
19. Бурба, Л.Г. Лейкозы и злокачественные опухоли [Текст] / Под ред. В.П. Шишкова, Л.Г. Бурбы.- М.: Агропромиздат, 1988.- 400 с.
20. Бусол, В.А. Тест-система для выявления ВЛКРС полимеразной цепной реакцией [Текст] / В.А. Бусол, О.Ю. Лиманская, А.П. Лиманский, В.И. Цымбал // Ветеринария.- 1999.- №6.- С. 27-30.
21. Валихов, А.Ф. Лейкоз крупного рогатого скота (вирусологические аспекты) [Текст] / А.Ф. Валихов, В.П. Шишков, Л.Г. Бурба.- М.: ВНИИТЭИСХ.- 1980.- 77 с.
22. Верховский, О.А. Иммуноферментный анализ в диагностике лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / О.А. Верховский, В.В. Цибезов, М.В. Баландина, И.В. Непоклонова // Ветеринария.- 2002.- №12.- С. 8-10.
23. Виноградова, Т.В. Взаимосвязь между уровнем циркулирующих иммунных комплексов и функциональным состоянием фагоцитирующей системы [Текст] / Т.В. Виноградова, М.А. Капелько, Ю.Е. Вельтищев, Д.В. Стефани // Иммунология.- 1986.- №5.- С. 63-65.
24. Власенко, В.С. Взаимосвязи в системе иммунитета у интактных и привитых вакциной БЦЖ телят [Текст] / В.С. Власенко, М.А. Бажин //

Инфекционная патология животных: Сб. науч. тр. ВНИИБТЖ. – Омск, 2001.- С. 198-202.

25. Власенко, В.С. Выявление животных с повышенным риском к заболеванию вирусом лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / В.С. Власенко, Т.С. Дудолодова, М.А. Бажин, А.Н. Новиков // Ветеринария и кормление.- 2008.- №4.- С. 8-9.

26. Власенко, В.С. Иммуный статус инфицированного вирусом лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / Т.С. Дудолодова, М.А. Бажин, А.Н. Новиков, В.А. Мироненко // Развитие АПК Азиатских территорий: Тр. XI-й Междунар. науч.-практ. конф. (Новосибирск, 25-27 июня 2008 г.) / Россельхозакадемия. Сиб. отд-ние.- Новосибирск, 2008.- Т. II.- С. 48-51.

27. Власенко, В.С. Оценка иммунного статуса крупного рогатого скота при лейкозе [Текст] / В.С. Власенко, М.А. Бажин // Сиб. вестник сельскохозяйственной науки.- 2009.- №9.- С. 64-69.

28. Власенко, В.С. Иммуный статус у здорового и родившегося от матерей, инфицированных вирусом лейкоза, молодняка крупного рогатого скота [Текст] / В.С. Власенко, Т.С. Дудолодова, М.А. Бажин, А.Н. Новиков, В.А. Мироненко // Патология продуктивных и непродуктивных животных, рыб и птиц: Матер. 8-й межрег. науч.-практ. конф.- Омск, 2009.- С. 23-29.

29. Власенко, В.С. Иммунологические изменения у инфицированного вирусом лейкоза и больного лейкозом крупного рогатого скота [Текст] // Актуальные проблемы инфекционных и незаразных патологий животных: Матер. X Междунар. науч.-практ. конф. (Омск, 21-22 сентября 2010 г.)- Омск, 2010.- С. 209-212.

30. Власенко, В.С. Оценка иммунного статуса у крупного рогатого скота при лейкозе [Текст] / В.С. Власенко, М.А. Бажин, Т.С. Дудолодова, В.А. Мироненко, А.Н. Новиков // Методические рекомендации. / ГНУ ВНИИБТЖ Россельхозакадемии; ГНУ СО Россельхозакадемии.- Омск, 2010.- 31 с.

31. Власенко, В.С. Оптимизация методов контроля и коррекции иммунного статуса при туберкулезе и лейкозе крупного рогатого скота [Текст]: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 06.02.02 / Власенко Василий Сергеевич.- Казань, 2011.- 43 с.
32. Воронин, Е.С. Иммунология [Текст] / Е.С. Воронин, А.М. Петров, М.М. Серых, Д.А. Дервишов.- М.: Колос-Пресс, 2002.- 408 с.
33. Гаврилова, Г.А. Неспецифическая резистентность коров, инфицированных ВЛКРС и больных лейкозом [Текст] / Г.А. Гаврилова, С.В. Бахметьева // Сиб. вестник сельскохозяйственной науки.- 2005.- №1.- С. 118-121.
34. Гаврилова, Г.А. О роли скрытых форм лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / Г.А. Гаврилова, Ю.А. Макаров // Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных: Матер. междунар. науч.-практ. конф. (Москва, 16-17 мая 2006 г.).- М.: Изографъ, 2006.- С. 186-188.
35. Галеев, Р.Ф. Теоретическое обоснование, экспериментальное подтверждение путей передачи вируса лейкоза крупного рогатого скота, усовершенствование методов диагностики и мер борьбы с ним [Текст]: дис. ... д-ра ветеринар. наук: 16.00.03 / Галеев Рафаил Фаррахович.- Уфа, 2000.- 292 с.
36. Галеев, Р.Ф. Лейкоз крупного рогатого скота [Текст] / Р.Ф. Галеев, Р.Ф. Хусаинов.- Уфа: Изд-во «Новый стиль», 2009.- 220 с.
37. Галеев, Р.Ф. Иммунобиологический статус потомства коров, инфицированных вирусом лейкоза [Текст] / Р.Ф. Галеев, Л.И. Мотавина // Матер. Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 10-летию факультета пищевых технологий.- Уфа: ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ, 2011.- С. 60-67.
38. Гизатуллин, И.А. Изменения некоторых биохимических показателей крови и молока коров, инфицированных ВЛКРС [Текст] / И.А. Гизатуллин, Ф.Г. Гизатуллина // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана.- 2011.- Т. 217.- С. 137-142.
39. Годков, М.А. Способ диагностики функционального состояния нейтрофилов человека [Текст] / М.А. Годков, В.Ю. Зинкин // Описание

изобретения к патенту РФ №2218567, МПК7 G 01 N 33/52.– №2001132646/14; заявл. 05.12.01; опубл. 10.12.03. .

40. Гриневич, Ю.А. Определение иммунных комплексов в крови онкологически больных [Текст] / Ю.А. Гриневич, А.Н. Алферов // Лаб. дело.- 1981.- №8.- С. 493-496.

41. Гулюкин, М.И. Научные основы профилактики и борьбы с лейкозом крупного рогатого скота [Текст] / М.И. Гулюкин, Г.А. Симонян, Н.В. Замираева, Л.А. Макарова [и др.] // Тр. ВИЭВ.- М., 1999.- Т. 72.- С. 38-47.

42. Гулюкин, М.И. Эпизоотологическая оценка методов прижизненной диагностики лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / М.И. Гулюкин, Е.А. Дун, Н.В. Баркова, Н.И. Петров, С.М. Пау // Вестник РАСХН.- 2000.- №3.- С. 60-62.

43. Гулюкин, М.И. Разработка эффективных мероприятий против лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / М.И. Гулюкин, Л.А. Иванова и др. // Ветеринария.- 2002.- №12.- С. 3-8.

44. Гулюкин, М.И. Аналитический обзор эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в Российской Федерации (1996-2010) [Текст] / М.И. Гулюкин, Г.А. Симонян и др.- М., 2011.- 46 с.

45. Двоеглазов, Н.Г. Оценка эффективности различных методов диагностики инфекции вируса лейкоза крупного рогатого скота [Текст]: автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук: 16.00.03 / Двоеглазов Николай Геннадьевич.- Новосибирск, 2009.- 20 с.

46. Дмитриев, А.Ф. Внутриутробное инфицирование потомства у продуктивных животных [Текст] / А.Ф. Дмитриев // Ветеринарная патология.- 2012.- №2.- С. 25-29.

47. Донник, И.М. Экология и здоровье животных [Текст] / И.М. Донник, П.Н. Смирнов.- Екатеринбург: Издательско-редакционное агентство УТК, 2001.- 331 с.

48. Донник, И.М. Показатели иммунной системы инфицированного вирусом лейкоза крупного рогатого скота из территории промышленного

загрязнения [Текст] / И.М. Донник, Е.Н. Шилова, В.Б. Шилов // Научные основы профилактики и лечения болезней животных: Сб. науч. тр. ведущих ученых России, СНГ и др. стран.- Екатеринбург: Уральское изд-во, 2005.- С. 59-62.

49. Донник, И.М. Повышение эффективности диагностики лейкоза крупного рогатого скота в техногенно загрязненных территориях [Текст] / И.М. Донник, Е.Н. Шилова, В.Б. Шилов // Вестник Алтайского ГАУ.- 2006.- №5 (25).- С. 37-39.

50. Донник, И.М. Повышение эффективности диагностики лейкоза крупного рогатого скота в техногенно загрязненных территориях [Текст] / И.М. Донник, Б.М. Коритняк, М.Ю. Кадочников, Е.Н. Беспмятных // Аграрный вестник Урала.- 2007.- №3.- 28-30.

51. Донник, И.М. Эпизоотологические аспекты лейкоза крупного рогатого скота в Краснодарском крае [Текст] / И.М. Донник, Г.А. Джаилиди, Е.В. Якубенко, С.В. Тихонов // Ветеринария Кубани.- 2014.- №2.- С. 15-18.

52. Дудоладова, Т.С. Экспериментальное обоснование применения иммунологических методов в оценке предрасположенности к заболеванию крупного рогатого скота лейкозом [Текст]: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 06.02.02 / Дудоладова Татьяна Сергеевна.- Новосибирск, 2012.- 18 с.

53. Дудоладова, Т.С. Иммунологические методы в оценке предрасположенности к лейкозу [Текст] / Т.С. Дудоладова.- Омск: изд-во «LAP LAMBERT», 2014.- 109 с.

54. Евглевский, А.А. Иммунологические аспекты развития лейкозного процесса у глубокостельных и растелившихся коров [Текст] / А.А. Евглевский, А.Ф. Лебедев, Е.И. Буткин, С.Ю. Стебловская // Ветеринарная патология.- №2.- 2010.- С. 18-21.

55. Ерзутов, А.И. Поиск методов защиты молодняка от заражения вирусом лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / А.И. Ерзутов, Ю.П. Смирнов, И.Л. Суворова // Актуальные проблемы животноводства и ветеринарии: Матер.

науч.-практ. конф. (Нижний Новгород 19 июля 2013 г).- Н. Новгород, 2013.- С. 105-109.

56. Ерова, Л.М. Функциональная активность иммунокомпетентной системы крупного рогатого скота при ассоциативном развитии инфекций лейкоза и туберкулеза [Текст]: автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук: 16.00.03 / Ерова Лариса Михайловна.- Новосибирск, 1996.- 22 с.

57. Ефимов, В.И. Содержание разных популяций лимфоцитов и их функциональная активность в крови здоровых и больных хроническим лимфолейкозом животных [Текст] / В.И. Ефимов, А.А. Дрингляне, П.Б. Садаускас // Иммунология и иммунотерапия лейкозов человека и животных: тез. докл. Всесоюзн. конф. / Самарканд, 9-11 октября, 1984.- Ташкент, 1984.- С. 77-78.

58. Жукова, Е.Н. Циркулирующие иммунные комплексы и полинуклеары в механизмах обострения хронического панкреатита [Текст] / Е.Н. Жукова, С.Н. Афанасьева // Вопросы клинической иммунологии: Матер. науч. конф.- Омск: Омский мед. институт, 1989.- С. 19-20.

59. Запорожец, Т.С. Влияние иммуномодуляторов различной природы на экспрессию маркеров лимфоцитов у больных меланомой [Текст] / Т.С. Запорожец, В.Я. Лихобабин, Н.Н. Беседнова, М.В. Ермоленко [и др.] // Антибиотики и химиотерапия.- 1999.- №4.- С. 13-16.

60. Зорина, Н.Р. Значение лейкомоидных реакций и морфофункциональных изменений лимфоцитов при диагностике лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / Н.Р. Зорина, В.И. Околелов // Эпизоотология, диагностика и профилактика хронических инфекционных болезней животных: Матер. междунар. науч. конф., посвященной 175-летию аграрной науки Сибири.- Омск, 2003.- С. 381-385.

61. Иванов, А.И. Изменение активности спонтанного НСТ-теста у крупного рогатого скота при лейкозе [Текст] / А.И. Иванов, В.С. Власенко // Аграрная наука – сельскохозяйственному производству Сибири, Монголии,

Казахстана и Болгарии: Матер. XVII Междунар. науч.-практ. конф. (г. Новосибирск, 13 ноября 2014 г.). - Новосибирск, 2014.- Часть 2.- С. 105-106.

62. Иванов, А.И. Применение теста с нитросиним тетразолием для выявления животных с повышенной чувствительностью к лейкозной инфекции [Текст] / А.И. Иванов, В.С. Власенко // Достижения науки и техники АПК.- 2015.- Т. 29.- № 4.- С. 61-62.

63. Итэсь, Ю.Р. Применение «Мултискан Мультисофт» для иммуноферментного анализа инфекции вируса лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / Ю.Р. Итэсь, М.Н. Ткаченко // Актуальные вопросы ветеринарной медицины: Матер. междунар. вет. конгресса.- Новосибирск, 2005.- С. 134.

64. Казмирчук, В.Е. Способ определения чувствительности лимфоцитов к левамизолу [Текст] / В.Е. Казмирчук, Н.Г. Бычкова, А.А. Андрущук, Э.В. Гюллинг, Г.П. Кравчук // Описание изобретения к авторскому свидетельству СССР SU №1064952, МПК А61К 39/00.- №3389688/28-13; заявл. 04.02.82; опубл. 07.01.84, Бюл. № 1.

65. Кисера, Я.В. Особенности показателей физиологического статуса у инфицированного вирусом лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / Я.В. Кисера, Р.И. Кравцов // Современные проблемы диагностики, лечения и профилактики инфекционных болезней животных и птиц: Сб. науч. тр. ведущих ученых России, СНГ и др. стран.- Екатеринбург: Уральское изд-во, 2008.- С. 219-222.

66. Ковалюк, Н.В. Современные методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / Н.В. Ковалюк, В.Ф. Сацук, Е.В. Мачульская // Ветеринария Кубани.- 2007.- №1.- С. 11-12.

67. Кожевников, В.С. Индукция дифференцировки Т-лимфоцитов человека тимическим фактором АФТ-6 (Т-активином) [Текст] / В.С. Кожевников, В.И. Коненков, И.В. Санина, С.Б. Кротова [и др.] // Иммунология.- 1985.- №4.- С. 34-37.

68. Коромыслов, Г.Ф. Методические рекомендации по биохимическим и иммунохимическим методам исследования клеток, их компонентов и других

биологических субстратов [Текст] / Г.Ф. Коромыслов, В.Л. Солодовников и др.- ВАСХНИЛ.- М., 1980.- 39 с.

69. Косовский, Г.Ю. Диагностика лейкоза КРС с помощью праймеров к генам GAG и POL [Текст] / Г.Ю. Косовский, Е.А. Сотникова, Н.Н. Мудрик [и др.] // Ветеринария.- 2013.- №8.- С. 58-61.

70. Крикун, В.А. Научно-практическое значение вирусо-иммуногенетической теории В.П. Шишкова в изучении лейкоза крупного рогатого скота (к 70-летию со дня рождения) [Текст] / В.А. Крикун, М.И. Гулюкин // Тр. ВИЭВ.- М., 1999.- Т. 72.- С. 12-15.

71. Крикун, В.А. Лейкоз крупного рогатого скота и иммунологическая толерантность [Текст] / В.А. Крикун // Ветеринария.- 2002.- №6.- С. 7-9.

72. Крифукс, О.И. Особенности модификации E-рецепторов на T-лимфоцитах периферической крови больных рожей [Текст] / О.И. Крифукс, И.Г. Цой // Иммунология.- 1988.- №2.- С. 76-79.

73. Куварин, А.С. Оценка иммунного статуса у крупного рогатого скота, инфицированного атипичными микобактериями [Текст] / А.С. Куварин, В.С. Власенко, А.Н. Новиков, Н.Н. Кощев // Эпизоотология, диагностика и профилактика хронических инфекционных болезней животных: Матер. Междунар. науч. конф. посвященной 175-летию аграрной науки Сибири (Омск, 24-26 июня 2003 г.): Сб. науч. тр. ВНИИБТЖ.- Омск, 2003.- С. 131-138.

74. Кудрявцева, Т.П. Классификация лейкозов крупного рогатого скота [Текст] / Т.П. Кудрявцева.- В кн. Проблемы лейкозов.- М.: Колос, 1967.- С. 223-230.

75. Кудрявцева, Т.П. Лейкоз животных [Текст] / Т.П. Кудрявцева.- М.: Россельхозиздат, 1974.- 158 с.

76. Кузнецова, Н.В. Использование полимеразной цепной реакции для выявления инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / Н.В. Кузнецова, Н.В. Кузнецов, Г.А. Симонян // Ветеринария.- 1997.- №5.- С. 12-15.

77. Лаптева, Д.Д. Корреляция спонтанной биохемилюминесценции в сыворотке крови и результатов РИД у коров при диагностике лейкоза [Текст] / Д.Д. Лаптева, Ю.А. Закотеев, В.Е. Адамушкин // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана.- 2010.- Т.201.- С. 62-65.

78. Лебедев, А.Ф. Вопросы эпизоотологии, иммунологии, разработки и совершенствования оздоровительных мероприятий при лейкозе крупного рогатого скота [Текст]: автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук: 16.00.03 / Лебедев Алексей Федорович.- Курск, 2004.- 24 с.

79. Лебедев, К.А. Иммунная недостаточность (выявление и лечение) [Текст] / К.А. Лебедев, И.Д. Понякина.- М: Медицинская книга, Н. Новгород: Издательство НГМА, 2003.- 443 с.

80. Логинов, С.И. Иммунные комплексы при лейкозе крупного рогатого скота [Текст] / С.И. Логинов // Ветеринарная патология.- 2003.- №1.- С . 85-87.

81. Логинов, С.И. Системный эколого-эпизоотологический анализ совокупного риска развития лейкоза крупного рогатого скота [Текст]: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 16.00.03, 03.00.16 / Логинов Сергей Игоревич.- Новосибирск, 2005.- 45 с.

82. Логинский, В.Е. Тест восстановления нитросинего тетразолия у здоровых людей и больных острым лейкозом [Текст] / В.Е. Логинский, В.В. Короткий // Лаб. дело.- 1977.- №1.- С. 3-5.

83. Ляшенко, В.А., Механизмы активации иммунокомпетентных клеток [Текст] / В.А. Ляшенко, В.А. Дрожеников, И.М. Молотковская.- М.: Медицина, 1988.- 240 с.

84. Магер, С.Н. Биологическая характеристика потомства здоровых и больных лейкозом коров, и ассоциативное развитие лейкоза и туберкулеза у животных [Текст]: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 16.00.03 / Магер Сергей Николаевич.- Новосибирск, 2006.- 40 с.

85. Мальцева, Н.А. Лейкоз крупного рогатого скота: разработка методов лабораторной диагностики и средств специфической профилактики [Текст]: дис.

...д-ра биол. наук: 03.00.06 / Мальцева Надежда Анатольевна.- Новочеркасск, 2002.- 197 с.

86. Мальцева, Н.А. ПЦР-диагностика лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / Н.А. Мальцева, Г.О. Шайхаев, А.Г. Ирский, С.Г. Постовой [и др.] // Ветеринарная патология.- 2003.- №1.- С. 129-131.

87. Маннапова, Р.Т. Реакция ЦИК и иммуноглобулинов в организме больных лейкозом коров [Текст] / Р.Т. Маннапова, Т.Р. Якупов, А.В. Рашитов // Повышение эффективности и устойчивости развития агропромышленного комплекса: материалы Всерос. науч.- практ. конф.- Часть III.- Уфа, 2005.- С. 219-220.

88. Методические указания по диагностике лейкоза крупного скота / Департамент ветеринарии, Минсельхоз России. 2000. №13-7-2/2130.

89. Москалик, Р.С. Серонегативные фазы у зараженных ВЛКРС животных [Текст] / Р.С. Москалик // Организация оздоровления племенного молочного стада от лейкоза.- Новосибирск, 1989.- С. 42-48.

90. Мотавина, Л.И. Иммунобиологический статус коров-матерей, больных лейкозом и телят инфицированных ВЛКРС, внутриутробно и спонтанно [Текст] /Л.И. Мотавина, А.И. Иванов // Научное обеспечение устойчивого развития АПК: Матер. Всерос. науч.-практ. конф. (13-15 декабря 2011 г.).- Уфа: ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ, 2011.- С. 147-149.

91. Мотавина, Л.И. Эпизоотология, иммунобиологический статус коров-матерей и телят, инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота [Текст]: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 06.02.02 / Мотавина Людмила Ивановна.- Уфа, 2012.- 24 с.

92. Нахмансон, В.М. Значение вертикального пути передачи БЛВ в эпизоотическом процессе онковирусной инфекции [Текст] / В.М. Нахмансон, Е.А. Дун, Л.Г. Бурба // Ветеринария.- 1983.- №2.- С. 38-40.

93. Нахмансон, В.М. Использование коров, зараженных вирусом лейкоза крупного рогатого скота, в системе противолейкозных мероприятий [Текст] / В.М. Нахмансон, Е.А. Дун, Л.Г. Бурба и др. // Ветеринария.- 1995.- №1.- С. 8-11.
94. Неприна, Г.С. Динамика теофиллинчувствительных Т-лимфоцитов у больных лимфогранулематозом [Текст] / Г.С. Неприна, А.А. Ярилин, Е.С. Пантелеева, Н.П. Савина // Иммунология.- 1980.- №6.- С. 59-64.
95. Неприна, Г.С. Модификация Е-рецепторов циркулирующих Т-лимфоцитов в норме и при онкологических заболеваниях [Текст] / Г.С. Неприна, Е.С. Пантелеева, А.А. Ярилин, П.П. Филатов // Иммунология.- 1986.- №6.- С. 62-65.
96. Никифорова, В.Л. Показатели естественной резистентности организма крупного рогатого скота инфицированного вирусом лейкоза [Текст] / В.Л. Никифорова // Тр. ВИЭВ.- М., 1999.- Т. 72.- С. 103-108.
97. Околелов, В.И. Дифференциальная диагностика лейкемоидных реакций при различных патологических состояниях крупного рогатого скота [Текст] / В.И. Околелов, Н.Р. Зорина // БИО.- 2003.- №9.- С. 25-27.
98. Орлов, А.А. Механизмы лейкозного процесса у крупного рогатого скота в условиях Нижегородской области: Клинико-экспериментальное исследование [Текст]: автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук: 16.00.02 / Орлов Александр Александрович.- Саранск, 2004.- 19 с.
99. Орлянкин, Б.Г. Современная классификация ретровирусов [Текст] / Б.Г. Орлянкин // Бюл. Всерос. НИИ эксперим. ветеринарии.- 1996.- Вып. 77.- С. 36.
100. Пантелеева, Е.С. О причинах дефицита Т-лимфоцитов периферической крови у больных лимфогранулематозом [Текст] / Е.С. Пантелеева, А.А. Ярилин, Г.С. Неприна, Г.Д. Байсоголов // Иммунология.- 1981.- №1.- С. 70-74.

101. Петров, Н.И. Эпизоотический процесс и система оздоровительных мероприятий при лейкозе крупного рогатого скота [Текст]: дис. ...д-ра ветеринар. наук: 16.00.03 / Петров Николай Иванович.- СПб., 1999.- 499 с.

102. Петрова, И.В. Иммунологический дисбаланс при различных формах псориаза [Текст] / И.В. Петрова, И.В. Амирова // Иммунология.- 1984.- № 6.- С. 74-76.

103. Пешкус, Ю.К. Иммунные комплексы сыворотки крови крупного рогатого скота при лейкозе [Текст] / Ю.К. Пешкус, В.И. Жилайтис, В.И. Тамошюнас // Проблемы ветеринарной иммунологии.- М.: Агропромиздат, 1985.- С. 67-70.

104. Пономарева, И.С. Эпизоотологический мониторинг, сравнительная диагностика и иммунологический тест при оценке статуса коров в условиях неблагополучия по лейкозу в Оренбуржье [Текст] / И.С. Пономарева, М.В. Сычева, М.А. Поляков // Известия Оренбургского ГАУ.- 2009.- Т. 3.- №23-1.- С. 82-83.

105. Разумовская, В.В. Совершенствование системы управления эпизоотическим процессом лейкоза и бруцеллеза крупного рогатого скота [Текст]: автореф. дис. ... д-ра ветеринар. наук: 16.00.03 / Разумовская Валентина Владимировна.- Барнаул, 2004.- 40 с.

106. Сабанчиева, Ж.Х. Состояние фагоцитарной системы крови в НСТ-тесте у больных ВИЧ-инфекцией [Текст] / Ж.Х. Сабанчиева // Успехи современного естествознания.- 2006.- №3.- С. 44-45.

107. Салимов, Х.С. Этиология, диагностика и меры профилактики лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / Х.С. Салимов.- Ташкент: Мехнат, 1986.- С. 56-59.

108. Семененко, М.П. Оценка биохимических, гематологических и иммунологических показателей у инфицированных вирусом лейкоза КРС, больных лейкозом и интактных коров [Текст] / М.П. Семененко, Н.Ю. Басова, Е.В. Кузьмина // Ветеринария Кубани.- 2011.- №2.- С. 22-23.

109. Симонян, Г.А. Степень инфицирования ВЛКРС и заболевания лейкозом крупного рогатого скота в динамике исследований [Текст] / Г.А. Симонян, Н.С. Петракова // Этиология, патогенез и вопросы эпизоотологии лейкоза крупного рогатого скота.- Новосибирск, 1986.- С. 31-37.
110. Симонян, Г.А. Ветеринарная гематология [Текст] / Г.А. Симонян, Ф.Ф. Хисамутдинов.- М.: Колос, 1995.- 256 с.
111. Симонян, Г.А. Динамика развития инфекционно-патологического процесса при лейкозе [Текст] / Г.А. Симонян // Тр. ВИЭВ.- 1999.- Т. 72.- С. 26-32.
112. Симонян, Г.А. Разработка и совершенствование оздоровительных противолейкозных мероприятий [Текст] / Г.А. Симонян // Ветеринария.- 2007.- №7.- С. 3-7.
113. Симонян, Г.А. Вклад ученых ВНИИЭВ в изучение лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / Г.А. Симонян, М.И. Гулюкин // Ветеринария.- 2009.- №3.- С. 57-59.
114. Симонян, Г.А. Иммуитет и естественная резистентность у крупного рогатого скота при инфекции ВЛКРС и лейкозе [Текст] / Г.А. Симонян, О.Н. Паршина, С.Н. Магер, О.П. Иванов // Труды ВИЭВ.- Т. 75.- 2009.- С. 571-575.
115. Симонян, Г.А. Дифференциальная диагностика различных форм гемобластозов [Текст] / Г.А. Симонян // Ветеринария.- 2013.- №9.- С. 21-25.
116. Смирнов, П.Н. Проблема лейкоза животных [Текст] / П.Н. Смирнов, А.Г. Незавитин, В.В. Смирнова и др.- Новосибирск: Советская Сибирь, 1992.- 476 с.
117. Смирнов, П.Н. Проблемы адаптации сельскохозяйственных животных в Сибири [Текст] / П.Н. Смирнов, В.В. Храмцов, С.И. Джупина и др.- Новосибирск, 1995.- 257 с.
118. Смирнов, П.Н. Практические аспекты лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / П.Н. Смирнов, В.В. Храмцов, Смирнова В.В. // Ветеринария.- 1998.- №8.- С. 6-8.

119. Смирнов, П.Н. Особенности патогенеза гемобластозов крупного рогатого скота и перспективы научных исследований в области вирусного лейкоза [Текст] / П.Н. Смирнов, В.А. Белявская, Е.В. Дробот // Научные основы профилактики и лечения болезней животных: Сб. науч. тр. ведущих ученых России, СНГ и др. стран.- Екатеринбург: Уральское изд-во, 2005.- С. 198-204.

120. Смирнов, П.Н. Болезнь века [Текст] / П.Н. Смирнов.- Новосибирск, 2007.- 302 с.

121. Смирнов, П.Н. Лейкоз крупного рогатого скота: проблемы и их решение на уровне субъекта Федерации [Текст] / П.Н. Смирнов // Ветеринария Кубани.- 2007.- №4.- С. 4-6.

122. Смирнов, Ю.П. Эпизоотология и профилактика лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / Ю.П. Смирнов, А.В. Жаркова, А.И. Ерзутов, Н.В. Горельникова, С.В. Беляев // Вестник РАСХН.- 2008.- №1.- С. 75-76.

123. Смирнов, Ю.П. Некоторые гематологические показатели у коров в бессимптомной стадии развития лейкозного процесса [Текст] / Ю.П. Смирнов, И.Л. Суворова // Ветеринарная патология.- 2009.- №1.- С. 26-29.

124. Смирнов, Ю.П. Оценка влияния лигфола на развитие лейкоза у инфицированного вирусом лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / Ю.П. Смирнов, И.Л. Суворова // Актуальные вопросы ветеринарной медицины: Матер. II Сибирского ветеринарного конгресса / Новосибирский ГАУ.- Новосибирск, 2010.- С. 365-366.

125. Смирнова, О.В. Состояние иммунного статуса и активность ферментов в лимфоцитах крови у больных на разных стадиях острого лимфобластного лейкоза [Текст] / О.В. Смирнова, В.Т. Манчук, А.А. Савченко // Медицинская иммунология.- 2008.- Т.10.- №6.- С. 543-550.

126. Староселов, М.А. Иммунобиологические показатели инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота и больных лейкозом коров в сравнении с интактными [Текст] / М.А. Староселов, Н.Ю. Басова // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского ГАУ.- 2008.- №40.- С. 180-188.

127. Суrowас, В.М. Иммунологическое изучение Т- и В-лимфоцитов у коров в норме и при хроническом лимфолейкозе [Текст] / В.М. Суrowас, В.И. Тамошюнас // Цитология.- 1986.- Т. 28.- №4.- С. 438-442.

128. Тамошюнас, В.И. Определение и исследование связывающей способности рецепторов для Fc-фрагмента IgG лимфоидных клеток крови крупного рогатого скота в норме и при лейкозе [Текст] / В.И. Тамошюнас, В.В. Милюкене, Н.П. Дикинене // Иммунология.- 1983.- №5.- С. 34-37.

129. Тамошюнас, В.И. Иммунологическая характеристика Т- и В-лимфоцитов крупного рогатого скота при лимфолейкозе [Текст]: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.17 / Тамошюнас В.И.- М., 1985.- 34 с.

130. Тихонов, В.Л. Состояние сывороточных иммуноглобулинов при лейкозе крупного рогатого скота [Текст] / В.Л. Тихонов // Сиб. вестник сельскохозяйственной науки.- 2005.- №2.- С. 102-109.

131. Уманский, Ю.А. Лимфоциты и опухолевый рост [Текст] / Ю.А. Уманский, В.Г. Пинчук.- Киев: Наукова думка, 1982.- 256 с.

132. Урбах, В.Ю. Биометрические методы (статистическая обработка опытных данных в биологии, сельском хозяйстве и медицине) [Текст] / В.Ю. Урбах.- М.: Наука, 1964.- 416 с.

133. Усович, А.П. Применение математических статистик при обработке экспериментальных данных в ветеринарии [Текст] / А.Т. Усович, П.Т. Лебедев.- Омск, 1970.- 44 с.

134. Храмов, В.В. Экологическое неблагополучие отдельных территорий Уральского региона как фактор, повышающий риск заболевания крупного рогатого скота лейкозом [Текст] / В.В. Храмов, В.С. Федоров, И.М. Донник // Тр. Свердл. НИВС.- 1995.- Вып. 10.- С. 58-61.

135. Храмов, В.В. Распространение, патогенетическая характеристика лейкоза крупного рогатого скота и система противолейкозных мероприятий в Сибири [Текст]: автореф. дис. ... д-ра ветеринар. наук: 16.00.03 / Храмов Виктор Викторович.- Новосибирск, 1995.- 28 с.

136. Чернина, Л.М. Чувствительность к левамизолу иммунокомпетентных клеток у детей раннего возраста, часто болеющих инфекционно-воспалительными заболеваниями [Текст] / Л.М. Чернина, В.В. Шкворова, О.С. Культепина, К.А. Лебедев, Н.В. Большакова // Иммунология.- 1981.- №1.- С. 74-77.

137. Чичина, С.В. Возможности и ограничения использования полимеразной цепной реакции в диагностике лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / С.В. Чичина, В.В. Храмцов, Е.А. Дурыманова и др. // Вестник РАСХН.- 2006.- №6.- С. 71-73.

138. Шабалин, В.Н. Клиническая иммуногематология [Текст] / В.Н. Шабалин, Л.Д. Серова.- Л.: Медицина, 1988.- 312 с.

139. Шкаева, Н.А. Лейкоз крупного рогатого скота на радиактивно загрязненной территории Челябинской области [Текст] / Н.А. Шкаева, В.А. Бударков // Научные основы профилактики и лечения болезней животных: Сб. науч. тр. ведущих ученых России, СНГ и др. стран.- Екатеринбург, 2005.- С. 183-189.

140. Якупов, Т.Р. Иммуноферментный анализ в диагностике туберкулеза и лейкоза крупного рогатого скота [Text] / Т.Р. Якупов, А.М. Алимов, Н.З. Хазипов.- Казань, 2011.- 148 с.

141. Aida, Y. Tumor-associated antigens of bovine leukemia virus-induced bovine lymphosarcoma indentified by monoclonal antibodies [Text] / Y. Aida, M. Onuma, Y. Ogawa, T. Mikami, H. Izawa // Cancer Res.- 1985.- V. 45.- P. 174-180.

142. Akaza, J. Restoration by levamisole of E rosette formation and its abrogation by autochthonous serum from patients with bladder cancer [Text] / J. Akaza, H. Yokoyama, T. Umeda, T. Niijima // Cancer.- 1979.- V. 1.- P. 97-100.

143. Anderson, R. In vitro stimulation of neutrophil motility by levamisole – maintenance of GMP levels in chemo-tectically stimulated levamisole-treated neutrophils [Text] / R. Anderson, A. Glover, H.J. Koornhof, A.R. Robson // Immunology.- 1976.- V. 117.- P. 428-432.

144. Beier, D. Possibilities and limitations for use of the polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of bovine leukemia virus (BLV) infection in cattle [Text] / D. Beier, P. Blankenstein, H. Fechner // Zentralbl. Veterinarmed. B. – 1992. – Vol. 39 (1). – P. 69-77.

145. Beier, D. Possibilities and limitations for use of the polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of bovine leukemia virus (BLV) [Text] / D. Beier, P. Blankenstein, H. Fechner // Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.- 1998.- Vol. 105.- P. 408-412.

146. Beniaminov, M. Letter: In vitro resotration by levamisole of thymus derived lymphocyte function in Hodgkin's disease [Text] / M. Beniaminov, B. Ramot // Lancet.- 1975.- V. 1 (7904).- P. 464.

147. Bieber, M.M. E-rosette inhibiting substance in Hodgkin's disease spleen extracts [Text] / M.M. Bieber, Z. Fuks, H.S. Kaplan // Clin. Exp. Immunol.- 1975.- V. 29.- P. 369-375.

148. Blankenstein, P. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of BLV proviruses a practical complement BLV diagnostics [Text] / P. Blankenstein, H. Fechner, A. Looman, A. Beier, A. Marguardt, D. Ebner // Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.- 1998.- V. 111.- P. 180-186.

149. Burny, A. Charakterization of cellular seqvences flanking an integrated bovine leukemia virus genome [Text] / A. Berny et al. // J. Virol.- 1984.- V. 52.- №3.- P. 988-990.

150. Chisari, F.V. Lymphocyte E rosette inhibitory factor: a regulatory serum lipoprotein [Text] / F.V. Chisari, T.S. Edgington // J. exp. Med.- 1975.- V. 142.- P. 1092-1107.

151. Czarnik, U. Modified procedure for PCR detection of proviral DNA of bovine leukaemia virus [Text] / U. Czarnik, S. Kaminski, J. Rulka, K. Walawski // Bull. Veter. Inst. in Pulawy.- 2000.- V. 44.- №2.- P. 143-146.

152. De Lima, G. Untersuchungen über die Zahl der B und T Lymphozyten von gesunden leukoseverdächtigen und leukosekranken kindern der Deutschen

Schwarzbunten [Text] / G. De Lima, E. Mitscherlich // Zentr.-Bl. Vet. Med.- 1973.- Bd. 20.- H. 3.- S. 665-684.

153. Di Perri, T. A weekly oral dose of levamisole in the treatment of rheumatoid arthritis associated with E-rosette lymphocyte reduction [Text] / T. Di Perri, A. Auteri, F.L. Pasini, M. Mattioli // European Journal of Rheumatology.- 1978.- V. 1.- P. 155-164.

154. Eaves, F.W. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle [Text] / F.W. Eaves, J.B. Molloy, C.K. Dimmock, L.E. Eaves // Vet. Microbiol.- 1994.- V. 39.- P. 313-321.

155. Esteban, E. N. Characterization of the blood lymphocyte population in cattle infected with the bovine leukemia virus [Text] / E.N. Esteban, R.M. Thorn, J.F. Ferrer // Cancer Research.- 1985.- Vol. 45.- №7.- P. 3225-3230.

156. Fischer, G.W. Immunopotential and antiviral chemotherapy in a stinking rat model of herpes virus encephalitis [Text] / G.W. Fischer, M.W. Ball, M.H. Crumrine, J.W. Bass // Journal of infectious diseases.- 1976.- V. 153.- P. 217-220.

157. Flannery, G.R. Levamisole [Text] / G.R. Flannery, J.M. Rolland, R.C. Nairn // Lancet.- 1975.- V. 1.- P. 750-751.

158. Forschner, E. ELISA-Ablaufbestimmende Einflussparameter, deren Auswirkungen auf die Testsicherheit und praxisgerechte Prüfmethoden [Text] / E. Forschner, D. Heiseke // Tierarztl. Umschau. 1988.- V. 43.- P. 786-796.

159. Gallin, J.I. Leucocyte chemotaxis – physiological consideration and abnormalities [Text] / J.I. Gallin, S.M. Wolff // Clinics in Haematology.- 1975.- V. 4.- P. 567-607.

160. Goodwin, J.S. Prostaglandin – producing suppressor cells in Hodgkin's disease [Text] / J.S. Goodwin, R.P. Messner, A.D. Bankhurst, G.T. Peake, J.H. Saiki, R.C. Williams // New Engl. J. Med.- 1977.- V. 297 (18).- P. 963-968.

161. Hadden, J.W. Effects of levamisole and imidazole on lymphocyte proliferation and cyclic nucleotide levels [Text] / J.W. Hadden, R.G. Coffey, E.M.

Hadden, E. Lopez-Corrales, G.H. Sunshine // Cellular Immunology.- 1975.- V. 20.- P. 98-103.

162. Hill, H.R. Defective neutrophil chemotaxis associated with hyperimmunoglobulinemia E [Text] / H.R. Hill, P.G. Quie.- In: The phagocytic cell in host resistance (J.A. Bellanti, D.H. Dayton, eds.).- New York: Raven Press, 1975.- 249 p.

163. Ishihara, K. Clinical studies on bovine leukemia in Japanese black cattle IV. Serum immunoglobulin concentrations in leukemic cattle and those with negative and positive serum antibodies to bovine leukemia virus [Text] / K. Ishihara, T. Ohtani, H. Kitagawa // Ypn. J. Vet. Sci.- 1980.- V. 42 (4).

164. Jacobs, R.M. Inhibition of lymphocyte blastogenesis by sera from cows with lymphosarcoma [Text] / R.M. Jacobs, V.E.O. Valli, B.N. Wilkie // Am. J. Vet. Res.- 1980.- №41.- P. 372-376.

165. Kajikawa, O. Use of alphanaphthyl acetate esterase staining to identify T lymphocytes in cattle [Text] / O. Kajikawa, H. Koyama, T. Yoshikana et al. // Amer. J. Vet. Research.- 1983.- Vol. 44.- №8.- P. 1549-1552.

166. Kaplan, H.S. Hodgkin's disease and other human malignant lymphomas: advances and prospects [Text] / H.S. Kaplan.- G.H.A. Clowes Memorial Lecture.- Cancer Res.- 1976.- V. 36.- P. 3863-3878.

167. Klintevall, K. Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum [Text] / K. Klintevall, K. Nasland, G. Svedland, L. Hajdu, N. Linde, B. Klingeborn // J. Virol. Methods.- 1991.- V. 33.- P. 319-333.

168. Kuckleburg, C.J. Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time polymerase chain reactions [Text] / C.J. Kuckleburg, C.C. Chase, E.A. Nelson, S.A. Marras, M.A. Dammen, J.J. Christopher-Hennings // Vet. Diagn. Invest. 2003.- V. 15.- P. 72-76.

169. Lavanya, M. Cell surface expression of the bovine leukemia virus-binding receptor on B and T lymphocytes is induced by receptor engagement [Text] / M. Lavanya, A. Kinet, A. Montel-Hagen et al. // *J. Immunol.*- 2008.- V. 181.- P. 891-898.
170. Levo, Y. Restoration of cellular immune response by levamisole in patients with Hodgkin's disease [Text] / Y. Levo, V. Rotter, B. Ramot // *Biomedicine.*- 1975.- V. 23.- P. 198-200.
171. Licursi, M. Genetic heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts [Text] / M. Licursi et al. // *Virus Research.*- 2002.- V. 86.- №1/2- P. 101-110.
172. Limatibul, S. Theophylline modulation of E-rosette formation: an indicator of T-cell maturation [Text] / S. Limatibul, A. Shore, H.M. Dosch, E.W. Gelfand // *Clin. Exp. Immunol.*- 1978.- V. 33.- P. 503-513.
173. Longmire, R.L. In vitro splenic IgG synthesis in Hodgkin's disease [Text] / R.L. Longmire, R. McMillan, R. Velenosky et al. // *New Engl. J. Med.*- 1973.- V. 289.- P. 763-771.
174. Mantovani, A. Allogeneic tumour enhancement by levamisole, new immunostimulatory compound – studies on cell-mediated immunity and humoral antibody response [Text] / A. Mantovani, F. Spreafico // *European Journal of Cancer.*- 1975.- V. 11.- P. 537-544.
175. Meiron, R. Humoral and cellular responses in calves experimentally infected with bovine leukemia virus (BLV) [Text] / R. Meiron, J. Brenner, A. Gluckman et al. // *Vet. immunol. and immunopathol.* – 1985. – Vol. 9. – P. 105-114.
176. Merluzzi, V.J. Differential effects of levamisole on immune lymphoid tissues [Text] / V.J. Merluzzi, C.W. Kaiser, S.R. Cooperband // *Federation Proceedings.*- 1976 (Abstr.).- V. 35.- P. 334.
177. Miller, J.M. Bovine leukosis – its importance to the dairy industry in the United States [Text] / J.M. Miller, M.J. Van der Maaten // *J. Dairy Sci.*- 1982.- V. 65 (11).- P. 2194-2203.

178. Modai, D. The effect of levamisole on E-rosette formation in the uremic state [Text] / D. Modai, J. Weissgarten, S. Peller, U. Shaked, S. Kaufman // *Thymus*.- 1982.- V. 4.- P. 309-311.
179. Modai, D. In vitro effect of levamisole on E-rosette formation by T-lymphocytes of uremic patients [Text] / D. Modai, S. Peller, Natan Cohen, U. Shaked, S. Kaufman // *Israel J. of medical sciences*.- 1983.- V. 19 (3).- P. 289-291.
180. Moroz, C. Ferritin on the surface of lymphocytes in Hodgkin's disease patients. A possible blocking substance removed by levamisole [Text] / C. Moroz, N. Lahat, M. Beniaminov, B. Ramot // *Clin. Exp. Immunol.*- 1977.- V. 29.- P. 30-35.
181. Mowat, A.G. Levamisole and cellular immunity in rheumatoid arthritis – a review [Text] / A.G. Mowat // *Journal of Rheumatology*.- 1978.- V. 5 (suppl. 4).- P. 55-61.
182. Mowat, A.G. Neutrophil chemotaxis in rheumatoid arthritis. Effect of D-penicillamine, gold salts and levamisole [Text] / A.G. Mowat // *Annals of the Rheumatic Diseases*.- 1978b.- V. 37.- P. 1-8.
183. Murakami, K. The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle [Text] / K. Murakami, S. Kobayashi, M. Konishi et al. // *Vet. Microbiol.*- 2011.- V. 148.- №1.- P. 84-88.
184. Muscoplat, C.C. Characteristics of lymphocyte response to phytoimitogens comparison of responses of lymphocytes from normal and lymphocytotic cows [Text] / C.C. Muscoplat, J. Alhajl, D.W. Johnson et al. // *Amer. J. Vet. Res.*- 1974.- Vol. 35.- №8.- P. 1053-1055.
185. Nagy, D.W. Use of a polymerase chain reaction assay to detect bovine leukosis virus in dairy cattle [Text] / D.W. Nagy, J.W. Tyler, S.B. Kleiboeker, A. Stoker // *J. Am. Vet. Med. Assoc.*-2003.- V. 222.- №7.- P. 983-985.
186. Nguyen, V.K. Evaluation of an enzyme-linked Immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine leukemia virus in serum and milk [Text] / V.K. Nguyen, R.F. Maes // *J. Clin. Microbiol.*- 1993.- 31 (4).- P. 979-981.

187. Olivera Lima, A. Immunological phagocytosis – effect of drugs on phosphodiesterase activity [Text] / A. Olivera Lima, M.Q. Javierre, W. Siasda Silva, D. Setle Camara // *Experientia*.- 1974.- V. 30.- P. 945-946.
188. Olson, J.A. Levamisole – an new treatment for recurrent aphthous stomatis [Text] / J.A. Olson, D.C. Nelms, S. Silverman, L.F. Splitter // *Oral Surgery*.- 1976.- V. 41.- P. 588-600.
189. Persico, F.J. The effect of levamisole on an in vitro model of cellular immunity. Presented at the first international conference on modulation of host immune resistance in the prevention or treatment of induced neoplasias [Text] / F.J. Persico, W.A. Potter .- Nethesda, Maryland, USA, December, 1974.
190. Ramot, B. Effect of levamisole on E-rosette-forming cells in vivo and in vitro in Hofgkin's disease [Text] / B. Ramot, M. Beniaminov, C.H. Shoham, E. Rosenthal // *New England Journal of Medicine*.- 1976.- V. 294.- P. 809-811.
191. Reeves, J.H. Surface membrane markers on bovine peripheral blood lymphocytes [Text] / J.H. Reeves, H.W. Renshow // *Am. J. Vet. Res.*- 1977.- V. 39 (6).- P. 917-923.
192. Renoux, G. Action immunostimulante du levamisole sur les personnes agexes [Text] / G. Renoux, M. Renoux, P.H. Morant, P. Dartigues // *Rev. Med. Tours*.- 1973.- P. 797-801.
193. Renoux, G. Levamisole prometes the killing of *Listeria monocytogenes* by macrophages [Text] / G. Renoux, M. Renoux, D. Aycardi // *Federation Proceedings (Abstr.)*.- 1976.- V. 35.- P. 336.
194. Renoux, G. Influences of levamisole on T-cell reactivity and on survival of intractable cancer patients [Text] / G. Renoux, M. Renoux, A. Palat.- In: *Modulation of host immune resistance in the prevention and treatment of induced neoplasias* (M.A. Chirigos, ed.).- 1977, Fogarty International Centre Proceedings №28, US Government printing Office, Washington, DC, USA, P. 77-79.
195. Rola, M. The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR-ELISA [Text] / M. Rola, J. Kuzmak // *J. Virol. Methods*.- 2002.- V. 99.- P. 33-40.

196. Rola-Luszczak M. The molecular characterization of leukaemia virus isolates from Eastern Europe and its impact on phylogeny [Text] / M. Rola-Luszczak, A. Pluta, M. Olech, I. Donnik, M. Petropavlovskiy, A. Gerilovych, I. Vinogradova, B. Choudhury, J. Kuzmak // Plos one.- San Francisco, United States of America.- March 2013.- V. 8.- Is. 8.
197. Rosenthal, M. Immunotherapy with levamisole in rheumatic diseases [Text] / M. Rosenthal, U. Trabert, W. Miller // Scandinavian Journal of Rheumatology.- 1976.- V. 5.- P. 216-220.
198. Sanders, G.E. Suppression of T helper function an immunoregulatory effect of rosette inhibitory factor in hepatitis B virus infection [Text] / G.E. Sanders, R.P. Perrillo // Hepatology.- 1985.- V. 5 (3).- P. 392-396.
199. Scheinberg, M.A. Decreased lymphocyte response to PHA, Con-A and calcium ionophore (A23187) in patients with RA and SLE and reversed with levamisole in rheumatoid arthritis [Text] / M.A. Scheinberg, L. Santos, N.F. Mendes, C. Musatti // Arthritis and Rheumatism.- 1978.- V. 21.- P. 326-329.
200. Schmidt, M.E. Effect of levamisole on human monocyte function and immunoprotein receptors [Text] / M.E. Schmidt, S.D. Douglas // Clinical Immunology and Immunopathology.- 1976.- V. 6.- P. 299-305.
201. Schreiber, A.D. Effect of levamisole on the human monocyte IgE receptor [Text] / A.D. Schreiber, J. Parsons, R.A. Cooper // Blood.- 1975 (Abstr.).- V. 46.- P. 1018.
202. Schulze, H.J. Steigerung der Activitat von Peritoneal-macrophages der maus durch levamisole [Text] / H.J. Schulze, H.J. Raettig // Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft fur Innere Medizin.- 1973.- V. 79.- P. 622-623.
203. Shibata, H.R. Immunotherapy of human malignant melanoma with irradiated tumor cells, oral bacillus calmette-guerin and levamisole [Text] / H.R. Shibata, L.M. Jery, M.G. Lewis, P.W. Mansell, A. Caper, G. Marquis // Annals of New York Academy of Science.- 1976.- V. 277.- P. 355-366.

204. Simard, C. Enzyme-linked Immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency [Text] / C. Simard, S. Richardson, P. Dixon // *Can. J. Vet. Res.*- 2000.- V. 64.- P. 96-100.
205. Stecher, V.J. Effect of levamisole on adherence and chemotaxis of leucocytes [Text] / V.J. Stecher, L. Liauw, G. China // *Federal Proceedings.*- 1976 (Abstr.)- V. 35.- P. 531.
206. Surovas, V.M. T μ and T γ cell subsets in normal and leukemic cattle [Text] / V.M. Surovas, J. Pieskus, V.I. Tamosiunas, P. Sadauskas // *Thymus.*- 1982.- V. 4.- P. 31-43.
207. Surovas, V.M. Immunological study of the T- and B-lymphocytes in normal cows and in chronic lympholeukemia [Text] / V.M. Surovas, V.I. Tamoshiunas // *Tsitologija.*- 1986.- V. 28 (4).- P. 437-442.
208. Takashima, I. B-lymphocytes and T-lymphocytes in three types of bovine lymphosarcoma [Text] / I. Takashima, C. Olson, D.M. Driscoll, L.E. Baumgartener // *J. Natl. Cancer. Inst.*- 1977.- V. 59 (4).- P. 1205-1209.
209. Talle, A. Zur diagnostic der rinderleukose und ihren bekampfung in sudniedersach – sischen [Text] / A. Talle, H. Jahnke, G. Haase // *Zbl. Veterinarmed.*- 1965.- Bd. 12.- S. 435-443.
210. Thoenes, J. Properties of an Fc gamma-binding protein isolated from human leukemic B cells [Text] / J. Thoenes, H. Stein // *J. exp. Med.*- 1979.- V. 150.- P. 1049-1066.
211. Trainin, Z. IgG and IgM antibodies in normal and leukaemic cattle [Text] / Z. Trainin et al. // *J. Comp. Pathol.*- 1976.- Vol. 86.- №4.- P. 571-580.
212. Trono, K.G. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods [Text] / K.G. Trono, D.M. Perez-Filgueria, S. Duffy et al. // *Vet. Microbiol.*- 2001.- V. 83.- №3.- P. 235-248.

213. Turk, J.L. The immunostimulating effect of levamisole related to its sensitizing ability [Text] / J.L. Turk, D. Parker // Unpublished observations, 1978.
214. Van den Heuvel, M. Adaptation of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to determine the concentration of bovine leukemia virus p24 and optimal conditions for p24 expression in short-term cultures of peripheral blood mononuclear cell [Text] / M. Van den Heuvel, D. Portetelle, B. Jefferson et al. // J. Virol. Methods.- 2003.- V. 111 (1).- P. 61-67.
215. Van Leeuwen, J.A. Seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum in dairy cattle in Saskatchewan [Text] / J.A. Van Leeuwen, L. Forsythe, A. Tiwari, R. Chartier // Can. Vet. J.- 2005.- V. 46.- №1.- P. 56-58.
216. Van Leeuwen, J.A. Seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum in beef and dairy cattle in Manitoba [Text] / J.A. Van Leeuwen, A. Tiwari, J.C. Plaizier, T.L. Whiting // Can. Vet. J.- 2006.- V. 47.- №8.- P. 783-786.
217. Verhaegen, H. In vitro phagocytosis of candida albicans by peripheral polymorpho-nuclear neutrophils of patients with recurrent infections.- Case reports of serum-dependent abnormalities [Text] / H. Verhaegen, W. De Cock, J. De Cree // Biomedicine.- 1976.- V. 24.- P. 164-170.
218. Verhaegen, H. Restoration by levamisole of low E-rosette forming cells in patients suffering from various diseases [Text] / H. Verhaegen, J. De Cree, W. De Cock, F. Verbruggen // Clinical and Experimental Immunology.- 1977.- V. 27.- P. 313-318.
219. Versijp, G. Levamisole and functions of peritoneal macrophages [Text] / G. Versijp, Van Zwet T.L., R. Van Furth // Lancet.- 1975, i, P. 798.
220. Weiland, E. Frequency of surface immunoglobulin bearing blood lymphocytes in cattle affected with bovine leucosis [Text] / E. Weiland, O.C. Straub // Research Vet. Sci.- 1975.- Vol. 19.- №1.- P. 100-102.
221. Wiesner, E. Die leukose des rindes [Text] / E. Wiesner.- Viena, 1967.- 164 p.

222. Wyler, D.J. Peripheral lymphocyte subpopulations in human falciparum malaria [Text] / D.J. Wyler // Clin. Exp. Immun.- 1976.- V. 23.- P. 471-476.
223. Wynne, K.M. Levamisole and phagocytosis in rheumatoid arthritis [Text] / K.M. Wynne, P.A. Dieppe, E.C. Husrisson // Ann. Rheum. Dis.- 1980, in press.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Таблица 1. Эпизоотологические показатели по лейкозу крупного рогатого скота по Кемеровской области (средние значения за 7 лет, 2007-2013 гг.) ...	52
Рисунок 1. Динамика инфицированности крупного рогатого скота лейкозом в Кемеровской области за 7 лет (2007-2013), в процентах	54
Рисунок 2. Динамика выявления больных лейкозом коров в Кемеровской области за 7 лет (2007-2013), в процентах	54
Таблица 2. Степень инфицированности крупного рогатого скота за период 2007-2013 гг. в различных районах Кемеровской области	55
Таблица 3. Процент больных лейкозом крупного рогатого скота в различных районах Кемеровской области	57
Таблица 4. Изучение действия различных концентраций левамизола в реакции Е-РОК на лимфоциты <i>in vitro</i> у инфицированного ВЛКРС и больного лейкозом крупного рогатого скота	60
Таблица 5. Индексы сдвига у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу, $M \pm m$	61
Таблица 6. Иммунологические параметры крупного рогатого скота	63
Таблица 7. Средние значения иммунологических параметров у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу	64
Таблица 8. Интервалы значений параметров в их сочетаниях, характерные для крупного рогатого скота, имеющего повышенную устойчивость к лейкозной инфекции	66
Рисунок 3. Зависимость содержания В-лимфоцитов (ЕАС-РОК) от индекса сдвига у здоровых (•), носителей ВЛКРС и больных лейкозом животных (+).....	68
Рисунок 4. Зависимость индекса сдвига (Елев-РОК/Е-РОК) от уровня концентрации ЦИК в сыворотке крови у здоровых (•), носителей ВЛКРС и больных лейкозом животных (+).....	69

Рисунок 5. Зависимость содержания левамизолстимулированных Т-лимфоцитов (Елев-РОК) от уровня ЦИК в сыворотке крови у здоровых (•), носителей ВЛКРС и больных лейкозом животных (+).....	70
Рисунок 6. Зависимость функциональной активности лейкоцитов (НСТ) от содержания левамизолстимулированных Т-лимфоцитов (Елев-РОК) у здоровых (•), носителей ВЛКРС и больных лейкозом животных (+).....	71
Рисунок 7. Зависимость содержания левамизолстимулированных Т-лимфоцитов (Елев-РОК) от содержания В-лимфоцитов (ЕАС-РОК) у здоровых (•), носителей ВЛКРС и больных лейкозом животных (+).....	71
Таблица 9. Средние значения ЦИК в сыворотке крови и НСТ у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу, $M \pm m$	73
Рисунок 8. Взаимосвязь уровня ЦИК и функционального состояния лейкоцитов в НСТ-тесте у носителей ВЛКРС	74
Рисунок 9. Взаимосвязь уровня ЦИК и функционального состояния лейкоцитов в НСТ-тесте у больных лейкозом животных	74
Таблица 10. Показатели чувствительности Т-клеток к левамизолу <i>in vitro</i> у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу	76
Рисунок 10 (а, б). Т-лимфоциты, образующие розетки с эритроцитами барана в виде морул после инкубации лимфоцитов <i>in vitro</i> в среде с левамизолом (окраска по Романовскому, увеличение x 100)	77
Рисунок 11. Т-лимфоциты, образующие розетки с эритроцитами барана после инкубации лимфоцитов <i>in vitro</i> в среде с левамизолом у крупного рогатого скота с низкой чувствительностью к препарату (окраска по Романовскому, увеличение x 100)	78
Таблица 11. Количество Е-РОК до и после обработки левамизолом лимфоцитов периферической крови здорового крупного рогатого скота разного возраста, $M \pm m$	80

Таблица 12. Количество Е-РОК до и после обработки левамизолом лимфоцитов периферической крови у крупного рогатого скота разного возраста, $M \pm m$	81
Таблица 13. Результаты оценки чувствительности лимфоцитов к левамизолу в реакции спонтанного розеткообразования у РИД-отрицательных и инфицированных ВЛКРС животных разного возраста	82

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение №1



КАРТА ОБРАТНОЙ СВЯЗИ

Данные информационного письма о работе Морозовой Ольги Владимировны на тему: «Функциональное состояние Т-лимфоцитов в оценке стад крупного рогатого скота при лейкозе» рассмотрены на заседании кафедры ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней ФГБОУ ВПО ОмГАУ им. П.А. Столыпина (протокол № 5 от 12.01.2015) и приняты к использованию в учебном процессе в НИР и нашем ВУЗе.

Доктор ветеринарных наук, профессор,
заведующая кафедрой ветеринарной
микробиологии, инфекционных и
инвазионных болезней

В.И. Пешакова

Приложение №2



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(19) **RU** (11) **2 465 588** (13) **C1**(51) МПК
G01N 3348 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011116025/15, 22.04.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.04.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.04.2011

(45) Опубликовано: 27.10.2012 Бюл. № 30

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2379683 C1, 20.01.2010. SU 1064952 A1,
07.01.1984. RU 2303781 C1, 27.07.2007. RU
2282854 C1, 27.08.2006.

Адрес для переписки:

644001, г.Омск, ул. Лермонтова, 93,
Государственное научное учреждение ВНИИ
бруцеллеза и туберкулеза животных
Российской академии сельскохозяйственных
наук (ГНУ ВНИИБТЖ Россельхозакадемии),
патентный отдел

(72) Автор(ы):

Власенко Василий Сергеевич (RU),
Морозова Ольга Владимировна (RU),
Бажин Михаил Аристоклеич (RU),
Новиков Артем Николаевич (RU),
Дудолодова Татьяна Сергеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский
институт бруцеллеза и туберкулеза
животных Российской академии
сельскохозяйственных наук (ГНУ
ВНИИБТЖ Россельхозакадемии) (RU)

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к ветеринарии. Способ диагностики лейкоза крупного рогатого скота, выявление положительно реагирующих в реакции иммунодиффузии животных, гематологический метод исследования, определение процентного содержания Т-лимфоцитов методом спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана (%Е-РОК). Дополнительно в крови определяют процентное содержание Т-лимфоцитов после инкубации с левамизолом в конечной концентрации 0,5 мкг/мл с помощью спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана. Затем вычисляют индекс

сдвига (ИС) по формуле:

$$ИС = \frac{\%Е - РОК \text{ после инкубации с левамизолом}}{\%Е - РОК \text{ до инкубации с левамизолом}}$$

%Е - РОК до инкубации с левамизолом при ИС, равном 1, 2 и более, животное считают больным лейкозом крупного рогатого скота и выводят из стада. Изобретение обеспечивает повышение точности и достоверности диагностики лейкоза крупного рогатого скота. Способ диагностики выявляет на 11,8% больше животных, больных лейкозом крупного рогатого скота, является более точным и повышает достоверность. Способ может быть использован для диагностики лейкоза у животных, которым были введены иммуностимулирующие средства. 4 табл., 3 пр.

RU 2 4 6 5 5 8 8 C 1

RU 2 4 6 5 5 8 8 C 1

Приложение №4

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
 ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
 ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
 БРУЦЕЛЛЕЗА И ТУБЕРКУЛЕЗА ЖИВОТНЫХ
 (ГНУ ВНИИБТЖ Россельхозакадемии)

Тел. 56-32-60, 644001, г. Омск, ул. Лермонтова, 93

Факс: (381-2) 56-32-60

E-mail: vniibtg@rambler.ru

№ 153-04
 от 05 05 2014 г.

Выписка из протокола № 3
 заседания ученого совета

ГНУ Всероссийского научно-исследовательского института бруцеллеза и
 туберкулеза животных Россельхозакадемии

г. Омск

05 мая 2014 г.

Всего членов ученого совета - 17

На заседании присутствует 12 членов ученого совета.

ПОВЕСТКА ДНЯ:

Рассмотрение методического пособия «Методы оценки функциональной активности лейкоцитов при туберкулезе и лейкозе животных» авторы В.С. Власенко, Ю.И. Пацула, М.А. Бажин, А.И. Иванов, О.В. Морозова, Т.С. Дудолодова

ПОСТАНОВИЛИ:

По результатам голосования (за – 12, против – нет) методическое пособие «Методы оценки функциональной активности лейкоцитов при туберкулезе и лейкозе животных» утвердить и представить для рассмотрения на подсекцию «Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока»

Председатель ученого совета
 с.н.с., к.в.н.

Л.Н. Гордиенко

Ученый секретарь



Е.Ю. Секин

«Верно»

Ученый секретарь

Е.Ю. Секин

Приложение №5

ВЫПИСКА

*из протокола № 3 от 19 ноября 2014 г.
заседания подсекции «Инфекционная патология животных в регионе
Сибири и Дальнего Востока»
отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии*

ПОВЕСТКА:

Рассмотрение методического пособия «Методы оценки функциональной активности лейкоцитов при туберкулезе и лейкозе животных».

Авторы: Власенко В.С., Пацула Ю.И., Бажин М.А., Иванов А.И., Морозова О.В., Дудолодова Т.С. (ГНУ ВНИИБТЖ Россельхозакадемии).

Рецензент: д-р ветеринар. наук, проф. Храмцов В.В.

ПОСТАНОВИЛИ:

Рассматриваемое методическое пособие «Методы оценки функциональной активности лейкоцитов при туберкулезе и лейкозе животных» (авторы: Власенко В.С., Пацула Ю.И., Бажин М.А., Иванов А.И., Морозова О.В., Дудолодова Т.С.) утвердить и рекомендовать к изданию в печати.

Председатель подсекции,
академик РАСХН



А.С. ДОНЧЕНКО

Секретарь подсекции,
канд. ветеринар. наук, доц.

Г.М. СТЕБЛЕВА