

Утверждаю
Руководитель Департамента
ветеринарии Министерства
сельского хозяйства
Российской Федерации
М.В.КРАВЧУК

23 августа 2000 г. N 13-7-2/2130

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ДИАГНОСТИКЕ ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

1. Общие положения

1.1. Лейкоз крупного рогатого скота - хроническая инфекционная болезнь, вызываемая вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС). Лейкозом болеет крупный рогатый скот всех возрастов. Клинически болезнь проявляется чаще у животных в возрасте старше 4 лет.

Болезнь протекает вначале бессимптомно, затем проявляется персистентным лимфоцитозом и (или) образованием опухолевидных разрастаний в кроветворных и других органах и тканях.

После установления опухолевой природы лейкоза болезнь как у животных, так и у человека получила название гемобластозы, то есть опухолевые заболевания крови. По характеру и месту локализации опухолевых разрастаний, а также по морфологии и принадлежности пролиферирующих клеток к определенным росткам гемопоэза гемобластозы разделены на две группы:

лейкозы - системные поражения органов кроветворения, включающие лимфоидную, миелоидную, моноцитарную и недифференцированную формы;

гематосаркомы - сопровождающиеся опухолевым ростом. К ним относятся лимфосаркома, ретикулосаркома, лимфогрануломатоз и миеломная болезнь.

Возбудителем лейкоза крупного рогатого скота является опухолеродный РНК-содержащий вирус из семейства Retroviridae.

Источник возбудителя инфекции - животное, зараженное ВЛКРС.

Факторами передачи являются кровь, молоко и другие секреты и экскреты, содержащие лимфоидные клетки, инфицированные ВЛКРС.

Заражение может происходить при совместном содержании здоровых и инфицированных ВЛКРС животных.

1.2. Диагностические исследования на лейкоз проводят серологическими, молекулярно-биологическим, гематологическим, клиническим, патоморфологическим методами, методом биопробы.

1.3. Основу диагностики лейкоза крупного рогатого скота составляет серологический метод исследования - реакция диффузионной преципитации (РДП), иначе называемая реакцией иммунодиффузии в геле агара (РИД).

Из числа положительно реагирующих в РИД животных (инфицированных ВЛКРС) с помощью гематологического метода выявляют больных лейкозом.

2. Серологические методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота

2.1. Реакция иммунодиффузии (РИД).

2.1.1. Сущность метода.

Метод основан на обнаружении в сыворотке крови животных специфических преципитирующих антител к антигенам вируса лейкоза крупного рогатого скота. Специфические антитела появляются в крови через 2 - 8 недель после заражения животного ВЛКРС и сохраняются в организме пожизненно.

2.1.2. Серологическому исследованию на лейкоз подвергают

животных в возрасте 6 месяцев и старше. Пробы крови для исследований берут не ранее чем через 30 суток после введения животным вакцин и аллергенов, у стельных животных – за 30 суток до отела или через 30 суток после него.

2.1.3. Получение сыворотки. Сыворотки для исследования получают из крови испытуемого животного в количестве 2 – 3 мл и направляют в лабораторию с сопроводительным документом, в котором указывают название хозяйства, номер (кличку), возраст, пол, породу животного.

Кровь (для получения сыворотки) берут в бактериологические пробирки, выдерживают 1 – 2 ч в теплом месте (не выше 40 °С). Для лучшего отделения сыворотки образовавшийся сгусток обводят в пробирке профломбированной после каждой пробы стальной спицей (проволокой). После этого пробирки выдерживают в течение 20 – 24 ч при 4 – 10 °С. Полученные пробы сыворотки сливают в пробирки Флоринского (достаточно 2 – 3 мл) и маркируют.

При невозможности быстрого исследования подготовленные сыворотки хранят в замороженном состоянии.

2.1.4. Для постановки РИД используют набор для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота (ТУ 10-19-442-87), в состав которого входят: сухой специфический антиген вируса лейкоза крупного рогатого скота, состоящий из гликопротеидного gp-51 и полипептидного р-24 антигенов, разбавитель антигена, специфическая преципитирующая сыворотка (СПС) к вирусу лейкоза, солевая смесь агара (ССА) и разбавитель ССА, контрольные сыворотки: отрицательная, положительная, слабоположительная и положительная с антителами к р-24 антигену ВЛКРС.

Оборудование и реактивы:

- чашки Петри диаметром 100 мм;
- стандартный штамп-пробойник для просечения лунок в агаре;
- пипетки пастеровские или автоматические со сменными наконечниками;
- рН-метр;
- осветитель;
- хлорид натрия (х.ч.);
- дистиллированная вода.

2.1.5. Постановка РИД.

Подготовку компонентов реакции к работе осуществляют в соответствии с "Наставлением по применению набора для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота". Антиген растворяют в 5 куб. см разбавителя. Растворенный антиген хранят при температуре 4 °С не более двух недель.

Разбавитель ССА и солевую смесь агара переносят в колбу и приливают дистиллированную воду до объема 200 куб. см, затем колбу помещают в водяную баню и выдерживают до полного расплавления гранул агара. Расплавленный агаровый гель, имеющий температуру 50 – 70 °С, разливают слоем 2 – 3 мм (12 – 15 мл) в обезжиренные чашки Петри и оставляют их приоткрытыми при комнатной температуре в течение 1 ч. После застывания агара специальным штампом-пробойником делают лунки в геле, не допуская образования трещин между ними и отслоения агара от дна чашки. В каждой чашке делают по четыре фигуры, каждая из которых состоит из семи лунок: одна в центре, остальные по периферии. Диаметр каждой лунки составляет 7 мм, расстояние между центральной и периферическими лунками – 3 мм. Образовавшиеся диски геля удаляют из лунок канюлей, соединенных с вакуумным насосом.

Антиген, контрольные и испытуемые сыворотки вносят в лунки каждой фигуры пастеровскими или автоматическими пипетками со сменными наконечниками.

Антиген (А) вносят в центральную лунку, две диаметрально противоположные лунки заполняют контрольной сывороткой (КС).

Оставшиеся в фигуре 4 периферические лунки (1, 2, 3, 4) заполняют испытуемыми сыворотками. Лунки заполняют доверху, не допуская переливания жидкости через край. После заполнения всех лунок чашки Петри закрывают крышками и инкубируют во влажной камере при температуре 22 - 27 °С.

2.1.6. Учет и оценка результатов реакции.

2.1.6.1. Реакцию учитывают не ранее чем через 48 ч и не позднее чем через 96 ч. Чашки просматривают на темном фоне, направляя сфокусированный луч осветителя на дно чашки под углом 30 - 45°. Специфичность реакции оценивают по контрольной линии преципитата. Если она отсутствует или слабо выражена, то реакцию следует повторить.

Специфическая линия преципитации, формируемая преципитирующей контрольной сывороткой и антигеном, должна быть четкой, иметь форму прямой, располагаться на одинаковом расстоянии от лунок с антигеном и контрольной сывороткой.

Неспецифической считают линию преципитации, которая образуется между лунками с испытуемой сывороткой и антигеном, но не сливается с контрольной линией преципитации, а пересекает ее или упирается в нее, образуя угол.

2.1.6.2. Оценка результатов.

В зависимости от наличия специфических антител против антигенов ВЛКРС в испытуемой сыворотке реакцию оценивают как положительную или отрицательную.

Положительной считают реакцию, если между лунками с антигеном и испытуемой сывороткой образуется полоса преципитации, которая соединяется с полосой преципитации контрольной сыворотки, образуя непрерывную линию, то есть идентична ей (рис. 1 - не приводится, поз. 1):

- если линия преципитации между лунками с испытуемой сывороткой и антигеном отсутствует, но контрольная линия преципитирующей сыворотки образует вблизи лунки с испытуемой линией изгиб, направленный в сторону лунки с антигеном (рис. 1, поз. 2), - слабopоложительная сыворотка;

- если контрольная линия значительно укорочена со стороны лунки с испытуемой сывороткой и имеет размытый изгиб к лунке с антигеном или образует линию преципитации, расположенную очень близко от лунки с антигеном (рис. 1, поз. 2), - резко положительная сыворотка.

Положительно реагирующая сыворотка может образовывать вторую линию преципитации, которая располагается ближе к лунке с испытуемой сывороткой. Эта линия указывает на наличие в сыворотке преципитирующих антител против второго антигена (р-24) ВЛКРС (рис. 1, поз. 3).

При образовании толстой, короткой, без загибов контрольной линии преципитации, не доходящей до лунки с испытуемой сывороткой, необходимо провести раститровку этой испытуемой сыворотки физраствором до получения результата, который можно будет оценить как отрицательный, положительный или неспецифический. Для этого необходимо физиологический раствор в объеме 100 - 500 мкл разлить в пробирки или в лунки стандартных пластиковых плат для постановки серологических реакций (количество пробирок или лунок соответствует числу необходимых разведений). В первую пробирку или лунку с физраствором внести такой же объем сыворотки, тщательно перемешать и перенести той же пипеткой в том же объеме в следующую пробирку или лунку, затем после перемешивания - в следующую и т.д. В результате в первой пробирке или лунке испытуемая сыворотка разведена в 2 раза, во второй - в 4 раза, в третьей - в 8 раз и т.д.

Реакцию считают отрицательной, если контрольная линия продолжается до лунки с испытуемой сывороткой без загиба (рис. 1,

поз. 4).

В случаях, когда линия преципитации плохо просматривается или имеется зона опалесценции вокруг лунок, реакцию следует переставить.

Сдвиг контрольной линии преципитации в сторону лунки с антигеном или с контрольной сывороткой указывает на нарушение соотношения антигена и антител в тест-системе. В этом случае необходимо использовать другую серию диагностического набора.

2.1.7. Животных, сыворотки крови которых дали положительный результат в РИД, признают зараженными вирусом лейкоза и их необходимо исследовать гематологическим методом.

2.2. Метод иммуноферментного анализа (ИФА).

2.2.1. Сущность метода. Иммуноферментный анализ основан на иммунохимической реакции взаимодействия антиген-антитело и использовании в качестве индикатора этой реакции маркированных ферментами антител или антигенов.

Существует две модификации иммуноферментного анализа: непрямой и конкурентный.

Метод непрямого иммуноферментного анализа основан на связывании специфических к вирусу лейкоза антител с антигеном ВЛКРС, адсорбированным на стенках лунок планшета для микротитрования. Связавшиеся антитела выявляют с помощью видоспецифических антител, меченых ферментом (пероксидазой), с последующим ферментативным превращением бесцветного субстрата пероксидазой в окрашенный продукт. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию антител к ВЛКРС в сыворотке крови.

В основе конкурентного иммуноферментного анализа лежит способность антител к ВЛКРС, содержащихся в испытуемой сыворотке, блокировать связывание антигена ВЛКРС с антителами к ВЛКРС, иммобилизованными (адсорбированными) на стенках лунок планшетов для микротитрования (МТП). Антиген ВЛКРС, связавшийся с иммобилизованными антителами, выявляют с помощью антител к ВЛКРС, меченных пероксидазой (конъюгатом антител с пероксидазой) и последующего ферментативного превращения бесцветного субстрата пероксидазы в окрашенный продукт. В том случае, если испытуемый материал не содержал антител к ВЛКРС, интенсивность окрашивания максимальна. Антитела к ВЛКРС в испытуемом материале снижают интенсивность окрашивания прямо пропорционально их содержанию.

2.2.2. Материалы и оборудование.

2.2.2.1. Материалом для исследования методом иммуноферментного анализа может служить сыворотка крови, секрет вымени сухостойных коров, молозиво и молоко.

При исследовании сывороток крови их получают, как изложено в п. 2.1.3. Сыворотки пригодны для использования в течение 10 дней при температуре хранения +4 -С. Срок годности сыворотки, хранящейся при температуре -20 -С и ниже, не ограничен.

Бактериально загрязненные, разложившиеся или сильно гемолизированные сыворотки непригодны для исследования.

2.2.2.2. При постановке реакции используют стандартные коммерческие диагностические наборы согласно прилагаемому к ним наставлению по применению.

Для проведения исследования применяют:

- микропипетки одноканальные автоматические;
- микропипетки 8- или 12-канальные автоматические;
- фотометр одно- или многоканальный с автоматической регистрацией результатов. Рекомендуется использовать анализатор иммуноферментный фотоэлектрический АИФ-Ц-01С;
- микротитровальные пластмассовые (полистироловые) планшеты с 96 лунками;
- автоматическое или полуавтоматическое оборудование для промывания пластин;

- термостат, обеспечивающий температуру 37 +/- 0,5 -С;
- стаканы химические;
- колбы мерные;
- колбы Эрленмейера;
- пробирки;
- пипетки градуированные вместимостью 1 и 10 куб. см.

2.2.3. Непрямой иммуноферментный анализ для выявления антител к вирусу лейкоза.

2.2.3.1. В состав диагностического набора входят:

- антиген вируса лейкоза лиофилизированный и разбавитель антигена;
- конъюгат антител против иммуноглобулинов крупного рогатого скота с пероксидазой или другим ферментом, жидкий или лиофилизированный, и разбавитель конъюгата;
- сыворотки контрольные - отрицательная и положительная (слабоположительная), лиофилизированные или жидкие;
- разбавитель для сывороток и промывающий раствор, содержащий детергент и инертный белок;
- субстрат ферментативной реакции;
- микротитровальные полистироловые планшеты с 96 лунками.

2.2.3.2. Проведение исследования.

Иммунизация антигена ВЛКРС. Содержимое флакона с антигеном растворяют в разбавителе для антигена и вносят по 0,1 мл в лунки микротитровального планшета, закрывают планшет крышкой и инкубируют в течение 18 ч при 4 -С. В состав некоторых коммерческих наборов для выявления антител к вирусу лейкоза входят планшеты с иммобилизованным антигеном, готовым к употреблению. Планшет трижды промывают промывающим раствором, полностью заполняя лунки, и выдерживают раствор 1,5 - 2 мин. Тщательно удаляют раствор из лунок.

Готовят исходные разведения испытуемых сывороток. С этой целью в пробирки наливают по 3,9 мл разбавителя для сывороток и конъюгата, вносят по 0,1 мл испытуемой сыворотки и перемешивают. Для каждой пробы используют отдельный наконечник к автоматической пипетке.

Испытуемый материал в исходном разведении вносят по 0,1 мл в две соседние лунки микротитровальной пластины. Таким же способом вносят контрольные положительную, слабоположительную и отрицательную сыворотки. На каждом планшете оставляют лунки, заполненные только разбавителем без сыворотки (холостая проба). Их расположение зависит от конструкции фотометра и служит для установки "нуля" прибора. Планшет закрывают крышкой и инкубируют при температуре 18 - 37 -С во влажной камере в течение 1 - 2 часов. Планшет трижды промывают промывающим раствором.

В лунки вносят по 0,1 мл раствора антивидового конъюгата, планшет закрывают крышкой и инкубируют при температуре 20 - 37 -С в течение 1 - 2 часов. Планшет трижды промывают промывающим раствором.

В каждую лунку вносят по 0,1 мл раствора субстрата и инкубируют 0,5 - 1 час при комнатной температуре.

2.2.3.3. Оценка результатов реакции.

Возможна визуальная и инструментальная оценка результатов.

При визуальной оценке результатов следует обратить внимание на цвет окраски. Он зависит от того, какое вещество служит хромогеном в данном диагностическом наборе. Например, если в состав субстратной смеси входит 5-аминосалициловая кислота, окраска должна быть фиолетово-коричневой, если орто-фенилендиамин - оранжево-красной и т.д. Появление окрашивания, не свойственного данному веществу, обычно свидетельствует о плохом качестве воды, применяемой для растворения компонентов реакции, и отрицательно сказывается на чувствительности и специфичности реакции.

Интенсивность окрашивания одной и той же пробы в обеих лунках должна быть одинаковой. Допускается незначительное фоновое окрашивание холостой пробы. Интенсивность окрашивания отрицательного контроля должна незначительно превышать интенсивность окрашивания холостой пробы. Интенсивность окрашивания слабopоложительного контроля должна быть существенно выше, чем в отрицательном контроле. Положительный контроль должен быть окрашен наиболее интенсивно. Испытуемую пробу считают положительной, если интенсивность ее окрашивания больше или равна интенсивности окрашивания слабopоложительного контроля. Если интенсивность окрашивания для двух параллельных исследований одной пробы различается настолько, что затрудняет постановку диагноза, то эту пробу исследуют повторно.

При инструментальной оценке результатов реакции после визуальной оценки цвета и правильности реагирования контрольных образцов оптическую плотность продуктов реакции измеряют на фотометре при длине волны, указанной в наставлении по применению данного диагностического набора. Результаты оценивают по относительной величине (ОВ), которую рассчитывают по формуле:

$$ОВ = \frac{\frac{ОП_{исп}}{к} - ОП_{фсб}}{ОП_{к} - ОП_{фсб}},$$

где:

ОП_{исп} – средняя оптическая плотность испытуемой пробы;

ОП_к – средняя оптическая плотность отрицательного контроля;

ОП_{фсб} – средняя оптическая плотность холостой пробы.

При установке "нуля прибора" по холостой пробе формула упрощается:

$$ОВ = \frac{ОП_{исп}}{ОП_{к}}.$$

Положительным считается испытуемый материал, ОВ которого больше или равна 2,0.

Отрицательным считается испытуемый материал, ОВ которого не превышает 1,49.

Испытуемый материал с ОВ от 1,5 до 1,9 включительно считают сомнительным. Повторное исследование сыворотки крови или пробы молока от этого животного проводят через три месяца.

2.2.4. Конкурентный иммуноферментный анализ для выявления антител к вирусу лейкоза.

2.2.4.1. В состав диагностического набора входят:

- антитела к ВЛКРС, адсорбированные в лунках МТП;
- антиген вируса лейкоза;
- конъюгат антител к ВЛКРС с пероксидазой или другим ферментом;
- сыворотки контрольные – положительная, слабopоложительная и отрицательная;
- разбавитель для сывороток и промывающий раствор, содержащий детергент и инертный белок, предотвращающий неспецифическое связывание;
- субстрат ферментативной реакции;

- микротитровальные полистироловые планшеты с 96 лунками.

2.2.4.2. Проведение исследования.

Иммобилизация антител к ВЛКРС. Содержимое флакона с антителами растворяют в разбавителе для антител и вносят по 0,2 мл в лунки МТП, закрывают планшет крышкой и инкубируют в течение 18 часов при температуре 4 -С. В состав некоторых коммерческих наборов для выявления антител к ВЛКРС могут входить планшеты, готовые к употреблению. Планшет трижды промывают промывающим раствором, полностью заполняя лунки и оставляя в них раствор на 1,5 - 2 мин., тщательно удаляют раствор из лунок.

Испытуемый материал (сыворотки крови или секрет молочной железы) вносят по 0,05 мл в лунки МТП. Контрольные образцы вносят в двух повторностях. Затем во все лунки вносят по 0,15 мл растворенного в разбавителе антигена, перемешивают содержимое лунок, слегка постукивая по краю МТП, закрывают МТП крышками и инкубируют во влажной камере 1,5 - 2 часа при температуре от 18 -С до 37 -С. Следует строго соблюдать указанный порядок внесения испытуемого материала и антигена в лунки. Планшет трижды промывают промывающим раствором.

В лунки вносят по 0,2 мл конъюгата, закрывают крышками и инкубируют при температуре 18 -С - 37 -С в течение 1,5 - 2 часов во влажной камере. Планшет трижды промывают промывающим раствором.

В каждую лунку вносят по 0,2 мл раствора субстрата ферментативной реакции, инкубируют 0,5 - 1 час при комнатной температуре, в случае необходимости останавливают реакцию добавлением специального раствора и измеряют оптическую плотность в каждой лунке на фотометре при длине волны, характерной для данного субстрата.

2.2.4.3. Оценка результатов реакции.

Возможна визуальная и инструментальная оценка результатов.

Визуальная оценка результатов включает:

- оценку соответствия цвета продуктов ферментативной реакции характеристике, приведенной в наставлении по применению данного диагностического набора;

- оценку окрашивания контрольных проб, на основании которого определяется специфичность и активность диагностического набора. Интенсивность окрашивания положительного контроля должна быть минимальной или полностью отсутствовать; окрашивание отрицательного контроля должно быть интенсивным; окрашивание слабоположительного контроля должно быть значительно менее интенсивным, чем окрашивание отрицательного контроля.

Положительной считают испытуемую пробу, если интенсивность ее окрашивания не превышает интенсивности окрашивания слабоположительного контроля.

Инструментальную оценку результатов анализа проводят после предварительной визуальной оценки цвета продуктов ферментативной реакции и правильности реагирования контрольных проб.

Измеряют оптическую плотность продуктов реакции на фотометре при длине волны, указанной в наставлении по применению данного диагностического набора. Результат оценивают по величине процента конкуренции, которую рассчитывают по формуле:

$$K = \frac{\frac{ОП_{к} - ОП_{исп}}{ОП_{к} - ОП_{+}}}{\frac{ОП_{к} - ОП_{+}}{ОП_{к} - ОП_{+}}} \times 100\%,$$

где:

K - конкуренция испытуемого материала (%);

$$\frac{ОП_{+к} - ОП_{-к}}{ОП_{исп}}$$
 ОП₊ – оптическая плотность положительного контроля;
 ОП₋ – оптическая плотность отрицательного контроля;
 ОП_{исп} – оптическая плотность испытуемой пробы.

Результат считают положительным при К не ниже 50%.

2.3. Серологические исследования молока, молозива и секрета вымени сухостойных коров с помощью РИД и ИФА.

2.3.1. Пробы молока, молозива и секрета вымени сухостойных коров получают из любой доли вымени. Освобождают пробы от жира одним из следующих способов: центрифугируют пробы при 3000 об./мин. или оставляют пробы молока на 18 – 24 часа при 4 –С. После разделения пробы молока на верхний (жировой) и нижний слой осторожно прокалывают верхний слой и отбирают около 1 мл жидкого нижнего слоя в отдельную пробирку. Можно использовать для анализа сыворотку молока, но для ее получения нельзя добавлять кислоты или ферментные препараты.

2.3.2. Пробы сборного молока исследуют аналогичным способом и определяют неблагополучие стада, фермы по инфекции, вызываемой ВЛКРС.

2.3.3. Постановка РИД или ИФА.

Реакцию иммунодиффузии ставят так, как изложено в пункте 2.1.5.

При проведении непрямого ИФА пробы обезжиренного молока разводят разбавителем для сывороток: к 0,5 мл молока добавляют 0,5 мл разбавителя. Далее соблюдают последовательность постановки реакции, как изложено в пункте 2.2.3.2. Конкурентный ИФА с молоком проводят так же, как и с сывороткой крови.

2.3.4. Обнаружение в молоке, молозиве и секрете вымени сухостойных коров антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота позволяет сделать заключение об инфицированности животных этим вирусом.

3. Выявление инфицированных животных методом биопробы

3.1. Метод основан на восприимчивости животных гетерологичных видов к ВЛКРС. При введении овцам или кроликам лейкоцитов крупного рогатого скота, инфицированного вирусом лейкоза, у них развивается инфекция, которая сопровождается появлением в крови специфических преципитирующих антител, выявляемых с помощью реакции иммунодиффузии через 14 – 30 дней после заражения.

3.2. Подготовка к исследованию.

Овец в возрасте старше 6 месяцев или кроликов любого возраста, пола, породы перед постановкой на них биопробы исследуют в РИД дважды с интервалом 2 месяца на наличие антител к гликопротеидному антигену вируса лейкоза. В опыт берут животных с двукратным отрицательным результатом серологического исследования на лейкоз.

3.3. У исследуемого животного берут стерильно 5 – 10 куб. см крови из яремной вены в пробирку с антикоагулянтом. Период от момента взятия крови у испытуемого животного до постановки биопробы должен составлять не более 24 часов при температуре хранения 18 – 25 –С.

3.4. Для получения лейкоконцентрата пробу крови испытуемого животного центрифугируют в режиме 3000 об./мин. в течение 20 мин. После центрифугирования пастеровской или автоматической пипеткой осторожно собирают лейкоцитарную пленку из пробирок в один объем и перемешивают.

3.5. Подопытной овце вводят внутрибрюшинно или внутривенно

30 x 10 лейкоцитов; кроликам (не менее 2-х животных на 1 пробу) инокулируют 2 куб. см лейкоконцентрата в краевую вену ушной раковины.

3.6. Возможна постановка биопробы на наличие ВЛКРС-инфекции сборной пробы крови от 100 – 200 животных стада. Индивидуальные пробы крови, взятые от каждого животного согласно пункту 2.1.3, объединяют в стерильные флаконы вместимостью 1000 – 2000 куб. см, тщательно перемешивают и по 3 куб. см крови вводят внутрибрюшинно двум овцам.

3.7. Через 14 – 30 дней после введения крови или лейкоконцентрата у овец из яремной вены, у кроликов из венулы или артериолы ушной раковины берут 1 – 2 куб. см крови и проводят исследование сыворотки в РИД согласно разделу 2.1 настоящих Методических указаний.

3.8. Оценка результатов. Пробу исследуемой крови считают положительной, если у овцы или кролика после введения крови или лейкоконцентрата испытуемого животного обнаруживают в сыворотке крови антитела к вирусу лейкоза.

3.9. Положительная сборная проба крови показывает, что, по крайней мере, одно животное в стаде инфицировано вирусом лейкоза.

4. Выявление вируса лейкоза крупного рогатого скота с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)

4.1. Сущность метода.

Вирус лейкоза крупного рогатого скота присутствует в организме в виде ДНК-копий (провируса), встраиваясь в геном клетки-хозяина. Это делает возможным выявление ВЛКРС с помощью современных молекулярно-биологических методов, в частности методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для обнаружения провируса с помощью ПЦР используется геномная ДНК, выделенная из крови животных. В результате ПЦР определенный вирусоспецифический фрагмент выделенной ДНК амплифицируется (умножается) до количества, достаточного для его визуального определения.

ПЦР представляет собой серию циклов, в течение которых происходит ферментативный синтез специфического участка нуклеиновой кислоты. Каждый цикл включает три этапа: при нагревании до 94 – 95 –С происходит разделение молекулы геномной ДНК на две комплементарные цепи (денатурация); при охлаждении до 48 – 65 –С с цепями ДНК соединяются специфические олигонуклеотидные праймеры (отжиг); при нагревании до 72 –С термостабильная ДНК-полимераза достраивает цепи ДНК, ограниченные парой праймеров (синтез и элонгация). В результате реакции за один цикл количество специфического фрагмента ДНК увеличивается вдвое, и, в зависимости от количества циклов, можно получить более миллиона его копий.

Как диагностический метод ПЦР характеризуется высокой специфичностью, которая обусловлена выбором праймеров, и чувствительностью. С помощью ПЦР удается обнаруживать даже деградированную нуклеиновую кислоту, присутствующую в следовых количествах. Для проведения ПЦР-анализа достаточно 50 мкл крови, и результат может быть получен в течение рабочего дня. Метод ПЦР может использоваться для диагностики лейкоза крупного рогатого скота наряду с серологическими методами, а также в качестве подтверждающего теста.

4.2. Оборудование, расходные материалы и реактивы.

4.2.1. Оборудование:

- ДНК-амплификатор;
- УФ-трансиллюминатор;
- комплект приборов для горизонтального гель-электрофореза;

- микроцентрифуга (12000 g);
- термостат;
- холодильник;
- автоматические варипипетки (на 20, 200 и 1000 мкл).

4.2.2. Расходные материалы и посуда:

- пластиковые пробирки (0,5 мл и 1,5 мл);
- наконечники для пипеток;
- пенициллиновые флаконы или стеклянные пробирки.

Вся стеклянная посуда для ПЦР должна быть стерильна, а пластиковая - одноразового применения.

4.2.3. Реактивы и ферменты:

- фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (24:24:1, по объему);
- хлороформ:изоамиловый спирт (24:1, по объему);
- агароза;
- Taq-ДНК-полимераза;
- специфические праймеры;
- этанол перегнанный 96% и 70%;
- минеральное масло;
- дистиллированная деионизированная автоклавированная вода.

4.2.4. Растворы и буферные смеси:

- цитратный буфер: 0,48% лимонная кислота; 1,32% цитрат натрия; 1,47% глюкоза;

- лизирующий буфер: 10 mM трис-HCl, pH 8,0; 10 mM этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), pH 8,0; 50 mM NaCl; 2% додецилсульфат натрия (SDS); протеиназа К в концентрации 300 мкг/мл;

- буфер для ПЦР (10x): 50 mM KCl; 100 mM трис HCl; pH 9,0; 1% тритон X-100;

- буфер для электрофореза (10x): 121,1 г трис; 51,35 г борная кислота; 3,72 г ЭДТА - довести водой до 1 л;

- буфер для нанесения проб (6x): 0,25% бромфеноловый синий; 0,25% ксиленианол; 40% сахарозы в воде;

- 10 mM dNTP (смесь всех четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов по 10 mM каждого);

- бромистый этидий, 10 мкг/мл;

- 25 mM MgCl₂;

- 2,5 ацетат натрия, pH 5,2.

4.3. Этапы работы.

4.3.1. Отбор и хранение образцов крови.

Кровь для ПЦР-анализа берут из яремной вены крупного рогатого скота стерильной иглой с соблюдением правил асептики и антисептики. Для каждого животного пользуются отдельной иглой.

Образцы крови от животных отбирают в стерильные стеклянные пробирки или пенициллиновые флаконы, содержащие цитратный буферный раствор (1 часть раствора на 6 частей крови). В качестве антикоагулянта может быть также использован раствор ЭДТА или гепарина. После взятия крови пробирки закрывают пробками и осторожно перемешивают. Каждая пробирка или флакон должны иметь маркировку, соответствующую номеру животного, от которого получена проба. Образцы крови до исследования хранят при 4 - 8 -С не более 24 часов. Для более длительного хранения пробы должны быть заморожены при -20 -С.

4.3.2. Выделение геномной ДНК.

В микроцентрифужную пробирку помещают 50 мкл крови и 250 мкл лизирующего буфера. Смесь инкубируют 1 час при 56 -С. Дважды экстрагируют равным объемом смеси фенол:хлороформ, третью экстракцию проводят равным объемом хлороформа. Центрифугируют 10 мин. при 12000 g. Отбирают супернатант, добавляют к нему 2,5 М ацетат натрия, pH 5,2, до концентрации 0,25 М и два объема охлажденного 96% этанола. Раствор выдерживают 30 - 40 мин. при -20 0Q. Центрифугируют 10 мин. при комнатной температуре. Осадок

промывают 600 мкл 70% этанола, центрифугируют 10 мин. при 12000 g, подсушивают 10 - 15 мин. и растворяют в стерильной деионизированной воде в объеме, равном половине первоначального объема крови.

Выделение геномной ДНК можно проводить любым другим методом, позволяющим получить нуклеиновую кислоту, пригодную для амплификации в ПЦР.

4.3.3. Полимеразная цепная реакция.

Выделенную ДНК амплифицируют в 25 мкл реакционной смеси следующего состава:

- р-р ДНК	2 - 4 мкл
- 10x буфер ПЦР	2,5 мкл
- 2,5 mM MgCl ₂	5 мкл
- 10 mM dNTP	0,75 мкл
- праймеры	по 1 мкл каждого
- вода	до 25 мкл
- Taq-полимераза	1 ед. акт.

Смесь набирают непосредственно перед амплификацией, прогревают 5 мин. при 95 -С, добавляют Taq-полимеразу и наслаивают 20 мкл минерального масла для предотвращения испарения.

Проводят 25 - 30 циклов амплификации в режиме:

- денатурация 30 с при 94 -С;
- отжиг - 30 с при 48 - 65 -С (температура подбирается опытным путем для каждой пары праймеров);
- синтез 90 с при 72 -С.

Если после 25 - 30 циклов реакции в пробе не обнаруживается специфический фрагмент (анализ электрофорезом в агаровом геле), то отбирают аликвоту 2 - 4 мкл и переносят в новую пробирку, содержащую реакционную смесь с внутренними праймерами (так называемая "nested"-ПЦР), и проводят еще 25 - 30 циклов амплификации в том же режиме. Такая реамплификация позволяет увеличить как чувствительность, так и специфичность реакции.

4.3.4. Электрофорез в геле агарозы.

Анализ продуктов реакции проводят методом электрофореза в 2% агарозном геле. Рассчитанное количество порошка агарозы и отмеренный объем 50 mM буфера для электрофореза нагревают до полного растворения агарозы, остужают до 50 - 55 -С, добавляют бромистый этидий до концентрации 0,5 мкг/мл и заливают гель, в который немедленно вставляют гребенку для получения в геле лунок для нанесения проб. Через 20 - 30 мин. после того, как застыла агароза, гель помещают в камеру для электрофореза, наливают 50 mM буфер для электрофореза, наносят аликвоты реакционной смеси продуктов ПЦР, смешанные с буфером для нанесения проб, и проводят электрофорез при напряжении 100 В, пока бромфеноловый синий не пройдет 1,5 - 2 см от старта.

4.3.5. Учет результатов реакции.

Для идентификации специфического фрагмента используют стандартные маркеры - наборы фрагментов ДНК известной длины. При просмотре геля в ультрафиолете присутствие фрагмента определенного размера свидетельствует о наличии в пробе провирусной ДНК.

5. Гематологический метод исследования

5.1. Метод заключается в подсчете количества лейкоцитов в единице объема крови (1 мкл) и качественной оценке лимфоидных элементов - лимфоцитов.

Гематологическому исследованию подвергают животных, в сыворотке крови которых серологическим методом (РИД, ИФА) обнаружены специфические антитела к ВЛКРС.

Объектом гематологического исследования являются периферическая кровь, пунктаты костного мозга, селезенки, лимфоузлов.

Гематологические исследования позволяют выявлять больных животных, а также проводить дифференциальную диагностику форм и стадий болезни.

5.2. Кровь для гематологических исследований берут из яремной вены в пробирки с антикоагулянтами. В качестве антикоагулянтов используют трилон Б (ЭДТА - динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты) из расчета 0,1 мл 10%-ного раствора на 1 мл крови, гепарин (5 ед. на 1 мл крови) или 6%-ный раствор лимоннокислого натрия (0,1 мл на 1 мл крови).

Для предотвращения свертывания крови содержимое пробирки сразу же тщательно перемешивают. Стабилизированную кровь до исследования хранят в холодильнике при температуре 2 - 4 °С и исследуют не позднее чем через 36 час. с момента взятия.

5.3. Определение количества лейкоцитов.

5.3.1. Подсчет количества лейкоцитов при помощи электронного счетчика частиц типа "Целлоскоп", "Культер", "Пикоскел" выполняют в соответствии с наставлением (инструкцией) по их эксплуатации.

Наряду с указанными счетчиками в настоящее время выпускаются модели полуавтоматических счетчиков клеток крови, автоматические анализаторы, позволяющие определять от 4 до 20 параметров, то есть проводить развернутый анализ крови, включая полную дифференцировку лейкоцитов (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты и лимфоциты), расчетные показатели красной крови и тромбоцитов и т.д.

5.3.2. Подсчет лейкоцитов в счетной камере с сеткой Горяева.

В пробирки Флоринского или в лунки полистироловых пластин разливают по 0,4 мл жидкости Тюрка (ледяная уксусная кислота - 1,3 мл; 1%-ный водный раствор метиленового синего или генциан-виолета - 1 мл; дистиллированная вода до 100 мл). Автоматической пипеткой или стеклянным капилляром набирают 0,02 мл предварительно перемешанной крови. Марлевой салфеткой протирают наружную поверхность наконечника пипетки или капилляра от крови и переносят содержимое на дно пробирки (лунки) с жидкостью Тюрка.

В подготовленную для работы камеру Горяева при помощи пипетки вносят разведенные в жидкости Тюрка (предварительно пропипетировав) пробы крови от двух животных. Для удобства учета проб в верхнюю половину вносят нечетные, а в нижнюю - четные пробы. Если в камере будут обнаружены пузырьки воздуха, то ее перезаряжают вновь. Выждав 1 - 2 мин., пока клетки осядут, их подсчитывают под микроскопом при увеличении 10 x 10 или 10 x 20.

В каждом малом или большом квадрате считают клетки, находящиеся внутри них, а также лежащие на левых и нижних линиях и в левых углах квадрата. Клетки, которые не входят частично в квадрат со стороны верхней и правой линий, а также в правых углах, досчитывают в следующем, рядом лежащем квадрате. Подсчитывают обычно клетки в 100 больших квадратах.

Для подсчета лейкоцитов применяют следующую формулу:

$$X = \frac{M \times 4000 \times Y}{1600} = 12800,$$

где:

X - количество лейкоцитов в 1 мкл крови;

M - количество клеток, подсчитанных в 100 больших квадратах;

Y - степень разведения;

4000 - объем малого квадрата;

1600 - число малых квадратов в 100 подсчитанных больших квадратах.

Пример: В 100 квадратах подсчитано 256 клеток. Степень

разведения крови 1:20. Лейкоцитов в 1 мкл будет:

$$X = \frac{256 \times 4000 \times 20}{1600},$$

то есть число клеток в 100 квадратах следует умножить на 50, получается общее количество лейкоцитов в 1 мкл крови $256 \times 50 = 12800$.

При массовых гематологических исследованиях можно ограничиться подсчетом клеток в 25 квадратах. С левого верхнего угла сетки (по 4 квадрата в каждом ряду) по диагонали вниз направо подсчитывают количество клеток в 20 квадратах. Затем по правой границе сетки поднимаются вверх и подсчитывают клетки в 4 квадратах в верхнем правом и в одном левом нижнем углах сетки. Число клеток в 25 квадратах следует умножить на 200.

При достаточном навыке врач-гематолог может определять пробы заведомо нормальной крови, исходя из общей картины распределения клеток в поле зрения микроскопа, оцененной визуально (без поклеточного подсчета) при однократном и достаточно быстром перемещении в вертикальном направлении всей сетки камеры Горяева. В этом случае в ведомости вместо количества лейкоцитов ставится индекс "N" (норма).

Пробы, вызвавшие даже самое малое подозрение на лейкоцитоз, подлежат подсчету в 100 или 25 квадратах камеры, как указано выше.

При подсчете лейкоцитов необходимо обращать внимание на точность взятия определенного объема крови и разбавления ее, зарядки камеры и подсчета клеток.

Для подсчета лимфоцитов крови можно использовать фазово-контрастное устройство.

5.4. Дифференцированный подсчет лейкоцитов (выведение лейкоцитарной формулы) проводят при обнаружении повышенного количества их. Для этой цели готовят мазки крови.

5.4.1. Приготовление мазков крови. Мазки готовят на чистых обезжиренных предметных стеклах с ровной, гладкой поверхностью, без царапин и шероховатостей. Новые стекла моют в теплой мыльной воде, затем в проточной, протирают чистой сухой хлопчатобумажной тканью и помещают на 1 - 2 суток в банку со смесью спирта и эфира в равных частях. После этого стекла вынимают из банки, насухо вытирают чистым полотенцем и по 10 - 20 штук завертывают в пергаментную бумагу.

5.4.2. Мазки готовят из нативной или стабилизированной крови на обезжиренных предметных стеклах. Для приготовления мазка стекло берут в левую руку между большим и указательным пальцами за короткие грани. Каплю крови наносят на правый конец стекла. Она должна быть такого размера, чтобы конец мазка, приготовленного из нее, не доходил на 1 см до края стекла. Шлифованное стекло ставят впереди капли крови, надвигают до прикосновения с ней и равномерным движением делают мазок.

Хорошо приготовленный мазок должен быть тонким, ровным и при просмотре на свет отливать цветами радуги.

После высушивания на воздухе мазки маркируют простым карандашом или иглой, указывая номер экспертизы, инвентарный номер или кличку животного, дату приготовления мазка, и фиксируют в метиловом спирте 3 - 5 мин., этиловом спирте - 20 - 30 мин., жидкости Никифорова (смесь равных частей этилового спирта и эфира) - 15 - 20 мин. или ацетоне - 5 мин.

5.4.3. Окраска мазков крови по Романовскому-Гимза. Окрашивают мазки в течение 20 - 30 мин. краской Романовского-Гимза в специальных ваннах (можно в чашках Петри). Затем краску многократно смывают дистиллированной водой и мазки высушивают на

воздухе. Качество окраски контролируют под микроскопом. В правильно окрашенном мазке ядра клеток приобретают красно-фиолетовый цвет, цитоплазма лимфоцитов – голубой, а цитоплазма нейтрофилов – розовый.

5.4.4. Окраска по Паппенгейму. Для ее проведения применяют две краски. Вначале нефиксированный мазок обрабатывают краской Май-Грюнвальда в течение 3 мин., а затем к красящему объему добавляют равное количество дистиллированной воды и выдерживают 2 – 3 мин., после чего мазок промывают и докрашивают по Романовскому-Гимза при экспозиции 10 – 15 мин. В препаратах крови, окрашенных этим методом, цветовые оттенки ядер и цитоплазмы, характерные для отдельных видов клеток, получаются отчетливее, чем при окраске по Романовскому-Гимза.

5.4.5. Лейкоцитарную формулу (лейкограмму) выводят по результатам дифференцированного подсчета 100 клеток в окрашенных мазках крови под микроскопом с иммерсионной системой. При подсчете предметное стекло продвигают по зигзагообразной линии в направлении к концу мазка. Для счета дифференцированных клеток используют клавишный счетчик. Количество отдельных элементов крови в лейкоцитарной формуле выражают в процентах.

5.4.6. Абсолютное количество лимфоидных элементов в 1 мкл крови определяют путем умножения количества лейкоцитов на общий процент лимфоцитов и молодых клеток в лейкоцитарной формуле и деления полученного произведения на 100. Показатель абсолютного количества лимфоцитов оценивают затем по "лейкозному ключу", указанному в таблице.

Количество лейкоцитов и лимфоцитов в 1 мкл крови у здорового, подозрительного по заболеванию и больного лейкозом крупного рогатого скота дает основание, согласно "лейкозному ключу", указанному в таблице, оценивать статус животного по лейкозу.

Если количество лейкоцитов в пробе крови у животного, с учетом возраста, будет меньше числа, указанного во 2-й графе таблицы, то результат исследования на лейкоз считают отрицательным (-).

Таблица

КОЛИЧЕСТВО ЛЕЙКОЦИТОВ И ЛИМФОЦИТОВ
В 1 МКЛ КРОВИ ЗДОРОВОГО, ПОДОЗРИТЕЛЬНОГО ПО ЗАБОЛЕВАНИЮ
И БОЛЬНОГО ЛЕЙКОЗОМ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
("ЛЕЙКОЗНЫЙ КЛЮЧ")

Возраст животного	Здоровые животные		Подозрительные по заболеванию животные		Больные лейкозом животные
	кол-во лейкоци- тов в 1 мкл	процент лимфоци- тов	(абсолютное кол-во лимфоцитов в 1 мкл)	(абсолютное кол-во лимфоцитов в 1 мкл)	
1 – 2 года	до 12000	до 75	9000 – 11000	свыше 11000	
2 – 4 года	до 11000	до 70	8000 – 10000	свыше 10000	
4 – 6 лет	до 10000	до 65	6500 – 9000	свыше 9000	
старше 6 лет	до 9000	до 60	5500 – 8000	свыше 8000	

Если количество лейкоцитов в пробе крови животного будет больше числа, указанного во 2-й графе таблицы, а показатель абсолютного количества лимфоцитов будет в пределах чисел, указанных в графе 3 таблицы, то такое животное оценивают как подозрительное по

заболеванию лейкозом (+/-) и через 1 - 2 месяца подвергают дополнительному гематологическому исследованию. При повторном подтверждении диагноза их считают больными.

При выявлении в пробе крови животного количества лейкоцитов и лимфоцитов выше чисел, указанных в графах 2, 3 и 4 таблицы, такое животное оценивают как больное лейкозом (+).

5.4.7. Дифференцированный подсчет количества лейкоцитов можно проводить с помощью фазово-контрастного микрофотографирования крови в камере Горяева. Для этого пробы с повышенным содержанием лейкоцитов микрофотографируют с использованием фазово-контрастного устройства (отечественные марки КФ-4, КФ-5) при увеличении

x x

объектива 20 или 40 .

5.4.7.1. Состав фазово-контрастного устройства. Основные части устройства - фазовые объективы и фазовый конденсор.

Объективы для наблюдения методом фазового контраста отличаются от обычных ахроматических только тем, что в плоскости выходного зрачка объектива нанесено фазовое кольцо, а на корпусе выгравирована буква "Ф".

Фазовый конденсор отличается от обычного наличием кольцевых диафрагм, помещенных в фокальной плоскости конденсора; диафрагмы вставляются в револьверный диск и применяются в соответствии с выбранным объективом. Конденсор может быть использован для наблюдения обычным способом; для этого в диске револьвера, кроме кольцевых диафрагм, имеется свободное отверстие для пропускания всего пучка света.

Фазовый конденсор вставляется в кольцо кронштейна конденсоров микроскопа и зажимается винтом обычным способом.

Кольцевые диафрагмы, в зависимости от применяемого объектива, сменяют поворотом револьверного диска за накатанную часть до фиксации, причем в окне кожуха конденсора должна появиться цифра, соответствующая увеличению применяемого объектива, или буква "О", соответствующая свободному отверстию.

Два винта служат для центрировки кольцевой диафрагмы относительно фазового кольца объектива.

Вспомогательный микроскоп (МИР-4) применяют при центрировке изображения кольцевой диафрагмы конденсора относительно фазового кольца объектива. Вспомогательный микроскоп вставляют в тубус микроскопа вместо окуляра и после выполнения центрировки снова заменяют окуляром.

5.4.7.2. Порядок работы.

Вставить в револьвер микроскопа фазово-контрастные объективы.

Установить в кольцо кронштейна конденсоров фазовый конденсор; при этом в окне кожуха конденсора должна быть буква "О".

Поместить на предметный столик препарат (заряженную камеру Горяева) и сфокусировать микроскоп на сетку камеры.

Настроить осветитель по правилам нормального освещения.

Открыть полностью ирисовую диафрагму конденсора.

Вставить вместо окуляра вспомогательный микроскоп и, перемещая его окуляр боковым винтом, сфокусировать на фазовое кольцо объектива.

Включить вращением револьверного диска конденсора требуемую кольцевую диафрагму; при этом в окне кожуха конденсора должна появиться цифра, соответствующая увеличению выбранного объектива, а во вспомогательном микроскопе, помимо фазового кольца, видно светлое кольцо диафрагмы.

Совместить с помощью центрировочных винтов светлое кольцо с темным кольцом. Если светлое кольцо остается шире темного, передвигая конденсор по высоте следует добиться, чтобы оно полностью вписывалось в темное кольцо.

Снять вспомогательный микроскоп и заменить его обычным

окулярном.

Для достижения большей контрастности рекомендуется пользоваться цветным светофильтром. После смены объектива необходимо заново проверить центрировку изображения кольцевой диафрагмы относительно фазового кольца.

Фазово-контрастное микроскопирование проб крови при увеличении объектива $\times 20$ или $\times 40$ позволяет достаточно надежно дифференцировать лимфоциты от остальных лейкоцитов.

Фазово-контрастное микроскопирование проб крови в камере Горяева позволяет достаточно надежно дифференцировать лимфоциты от остальных лейкоцитов. Ядра лимфоцитов правильной округлой формы, неблестящие, структура хроматина выглядит мелкосетчатой, более плотная к центру. Ядра нейтрофилов – неправильной формы, блестящие. Другие лейкоциты (эозинофилы, моноциты и др.) также достаточно четко отличаются от лимфоцитов.

Проводят дифференцированный подсчет лимфоцитов и отдельно – всех остальных лейкоцитов в 25 больших квадратах камеры Горяева. При этом можно пользоваться клавишным счетчиком лейкоцитов: на каждую пробу отводят по две клавиши (одну для лимфоцитов, другую для всех остальных клеток – нелимфоцитов). Общее число клеток (лимфоциты + нелимфоциты), а также число только лимфоцитов, подсчитанных в 25 квадратах, умножают на 200 и получают соответственно показатель абсолютного содержания лейкоцитов и лимфоцитов в 1 мкл крови. Эти значения затем оценивают по "лейкозному ключу" (см. таблицу в п. 5.4.6).

Иногда могут возникать затруднения в дифференцированном подсчете лимфоцитов (что случается достаточно редко и, как правило, связано со значительным омоложением клеток лимфоидного ряда). По морфологии большая часть таких клеток значительно отличается от лимфоцитов и нейтрофилов. Ядра полиморфные, в той или иной степени увеличенные, но блестящие. Хроматин выглядит грубодисперсным. В таких случаях подсчитывают общее количество лейкоцитов и готовят мазки крови, по которым выводят лейкоцитарную формулу по методике, описанной в п. 5.4.5.

Животных относят к категории больных по результатам однократного гематологического исследования.

Животных, подозрительных по заболеванию лейкозом, подвергают через 1 – 2 месяца дополнительному гематологическому исследованию. При повторном подтверждении диагноза их считают больными.

6. Клиническая диагностика

6.1. Клинические признаки лейкоза чаще проявляются у животных в возрасте 4 – 7 лет и обусловлены той или иной локализацией опухолевого процесса и вызванным им нарушением функции соответствующего органа. Чаще отмечают нарушения репродуктивной и пищеварительной функций (нарушение половых циклов, гипотония преджелудков), ослабление деятельности сердечно-сосудистой системы (отеки в области шеи, подгрудка, подчелюстного пространства, живота).

6.2. При пальпации иногда обнаруживается увеличение лимфатических узлов – подчелюстных, околоушных, поверхностных шейных, надвымянных, коленной складки. Иногда в области шеи или голодных ямок могут быть увеличены подкожные лимфатические узлы.

При ректальном исследовании самок на стельность следует обращать внимание на возможное увеличение тазовых лимфатических узлов, утолщение стенок матки. Последнее имеет место при вовлечении органа в лейкозный процесс.

Иногда отмечают экзофтальмию (пучеглазие) – одно- или двустороннюю.

В зависимости от стадии и формы лейкоза наблюдаются локальные или генерализованные опухолевые поражения лимфоузлов, селезенки и других органов. Внутренние лимфоузлы поражаются чаще, чем наружные. Лейкозы, как и другие заболевания, могут иметь острое, подострое и хроническое течение.

6.3. Болезнь протекает волнообразно (циклически): фазы обострения сменяются частичными клинико-гематологическими ремиссиями различной длительности. Смена этих фаз может сопровождаться кратковременными (от нескольких часов до двух-трех суток) кризисными явлениями, клинически отмечающимися потерей тактильной чувствительности, отказом от корма, обильной саливацией, диареей (иногда с примесью крови), судорожными явлениями, жвачкой без пищевого кома, понижением температуры тела на 1 - 2 °С. По прошествии кризисного периода в случае благоприятного исхода состояние животного полностью нормализуется. Кризис, возникший на фоне значительного омоложения лимфоидных клеток периферической крови, завершается смертью животного.

6.4. В последний период жизни у коров, больных лейкозом, резко снижается молокоотдача, часто, но не всегда, наблюдается прогрессирующее исхудание, локальное (на голове и холке) выпадение шерстного покрова.

6.5. Следует клинически дифференцировать лейкоз от болезней нелейкозной природы, сопровождающихся сходными синдромами.

7. Патоморфологический метод исследования

7.1. При вскрытии трупов или послеубойном осмотре туш и органов животных обращают внимание на величину органов, распространенность опухолевых разрастаний, их связь с лимфатическими узлами или другими органами и тканями.

7.2. Все формы лейкоза характеризуются увеличением, в различной степени, лимфатических узлов.

При формах лейкоза с системным поражением кроветворных органов (лимфоидный, недифференцированный и миелоидный лейкоз) они увеличены равномерно, не сращены с окружающими тканями. Капсула снимается легко, на разрезе лимфоузлы серо-белого цвета, сочные и саловидные.

При формах лейкоза типа гематосарком - лимфосаркоме, гистиоцитарной саркоме и лимфогранулематозе, характеризующихся системным поражением органов кроветворения, и гистиоцитарном лейкозе лимфатические узлы бугристые, их капсула сращена с паренхимой; на разрезе часто обнаруживают кровоизлияния и некрозы. В органах брюшной, тазовой полостей, на серозных оболочках при этих формах болезни отмечают диффузные или узловатые опухолевые разрастания серо-белого или желто-серого цвета, сочные, саловидные на разрезе.

Селезенка при лимфоидном, недифференцированном, гистиоцитарном и миелоидном лейкозах увеличена.

При миелоидной форме лейкоза пульпа селезенки красно-малинового цвета, фолликулы плохо заметны, а в отдельных участках неразличимы, ткань органа рыхлой консистенции с кровоизлияниями. При остальных формах системных лейкозов селезенка буро-красного цвета с четко выраженной красной и белой пульпой за счет гиперплазии фолликулов. В более поздней стадии болезни граница между белой и красной пульпой стерта.

При опухолевых формах типа гематосарком селезенка бывает увеличенной только при лимфогранулематозе примерно у 50% животных, пораженных этой формой болезни.

При всех формах лейкоза отмечают очаговые или диффузные разрастания серо-белого или серо-розового цвета в печени, почках, в сердечной мышце, органах пищеварения, матке, скелетной

мускулатуре и других органах в случае их поражения.

7.3. Гистологический метод исследования

7.3.1. Сущность метода заключается в обнаружении у больных лейкозом животных диффузных или очаговых разрастаний (пролифератов) из размножающихся, преимущественно нарушивших нормальное созревание и дифференцировку кроветворных клеток как в органах кроветворения (костный мозг, селезенка, лимфатические узлы), так и в соединительной ткани других органов.

7.3.2. Для исследования вырезают кусочки селезенки, лимфатических узлов, грудной кости, печени, почки, легких, сердца, органов пищеварения, в случае их поражения, матки и скелетных мышц толщиной 0,5 – 1 см, площадью 3 – 4 кв. см. Вырезают кусочки так, чтобы рядом с измененной тканью были участки нормальной ткани.

Отобранные пробы органов и тканей фиксируют в 10%-ном водном растворе нейтрального формалина. Раствор для фиксации готовят из коммерческого формалина, который представляет собой 40%-ный водный раствор формальдегида, путем смешивания 1 части его с 9 частями водопроводной воды. Патологический материал помещают в стеклянную или пластиковую банку с широким горлом и плотно закрывающейся крышкой. Вместе с отобранным патологическим материалом помещается этикетка из плотной бумаги, на которой графитным карандашом указывают дату и инвентарный номер животного. Материал от нескольких животных можно фиксировать в одном сосуде, используя индивидуальные марлевые мешочки для каждого животного.

Объем фиксирующего раствора должен в 10 раз превышать объем патологического материала; фиксирующий раствор через 24 часа заменяют свежим.

7.3.3. Отобранные пробы органов фиксируют в растворе формалина 48 часов и промывают в течение 10 – 24 часов в проточной воде. Затем из кусочков органов вырезают пластинки толщиной 0,3 см, площадью 1,5 – 2,0 кв. см, которые последовательно выдерживают в 70%, 80%, 96% этиловом спирте в течение 24 часов для каждой концентрации при температуре 15 – 20 °С и в этаноле с серным эфиром в соотношении 1:1 в течение 24 часов.

7.3.4. Для приготовления и окраски целлоидиновых срезов обезвоженные кусочки патологического материала заключают в целлоидин. Вынутые из раствора целлоидина кусочки органов наклеивают на деревянные или из другого материала блоки, подсушивают и помещают в банку с 70% спиртом. Из кусочков органов, наклеенных на блоки, готовят целлоидиновые срезы толщиной 5 – 10 мкм и окрашивают их гематоксилин-эозином или другими красителями, заключают в бальзам и покрывают покровным стеклом.

7.3.5. Вместо целлоидиновых можно готовить парафиновые срезы. Для приготовления и окраски парафиновых срезов кусочки органов, обезвоженные согласно пункту 6.3.3, заливают в парафин. Из парафиновых блоков готовят срезы толщиной 3 – 5 мкм, которые для расплавления необходимо поместить в теплую воду. Затем срезы переносят на предметные стекла, сушат в термостате при температуре 37 – 40 °С и окрашивают гематоксилин-эозином или другими красителями.

7.3.6. Проведение исследования. Приготовленные срезы просматривают под световым микроскопом при естественном или искусственном освещении. При окуляре с увеличением 10^x и объективе с увеличением 10^x

определяют общую структуру исследуемых органов с учетом изменения ткани в отдельных ее участках в результате пролиферации клеток (состояние фолликулов, межфолликулярных зон в селезенке и лимфатических узлах, присутствие клеток в просвете и вокруг сосудов, паренхиме, интерстиции органов и пр.).

x

x

При окуляре с увеличением 20 и объективе с увеличением 40 выявляют детали изменений, обращая внимание на характер клеток пролиферата (тип, степень дифференцировки, зрелость) и интенсивность (выраженность) патоморфологических изменений. Одновременно определяют наличие сопутствующих заболеваний нелейкозного характера с целью проведения дифференциальной диагностики или признаков, отягощающих основное заболевание (отеки, воспаления, дистрофии, некрозы, кровоизлияния и пр. В скелетной мускулатуре, сердце, печени, почках и других органах).

7.3.7. Оценка результатов гистологического исследования. При лимфоидном лейкозе в селезенке и лимфатических узлах наблюдают стирание рисунка за счет диффузных пролифератов из новообразованных клеток лимфоидного ряда в паракортикальной пульпе и синусах лимфоузлов и межфолликулярных пространствах селезенки.

В костном мозге строма сохранена, выявляют значительное истончение и рассасывание балок, скопление клеток лимфоидного ряда, располагающихся в виде очагов или диффузно, заполняя все костномозговое пространство (лимфоидная метаплазия).

В почках, печени, сердце, сычуге и других органах новообразованные клетки лимфоидного ряда образуют очаговые скопления или располагаются диффузно между клетками паренхимы органов. Скопление таких клеток выявляют в просветах капилляров и отмечают инфильтрацию ими интерстициальной ткани органов. В зависимости от степени зрелости клеток лимфоидного ряда, составляющих пролифераты и инфильтраты, различают лимфоцитарный, пролимфоцитарный и лимфобластный варианты лимфоидного лейкоза.

При недифференцированной форме лейкоза (гемоцитобластоз), в костном мозге, селезенке, лимфатических узлах и других органах наблюдают очаговые и диффузные пролифераты, клеточный состав которых в основном представлен клетками типа гемоцитобласта, отмечают также клетки лимфоидного ряда различной степени зрелости.

При гистиоцитарном лейкозе (недифференцированный лейкоз, системный ретикулез) размножение новообразованных клеток происходит в паракортикальной пульпе и синусах лимфоузлов, в селезенке – красной пульпе (в межфолликулярных пространствах). В других органах и тканях эти клетки обнаруживают в виде очаговых скоплений или диффузно расположенными между клетками паренхимы. Клеточный состав таких пролифератов и скоплений представлен полиморфными клетками, входящими в систему мононуклеарных макрофагов, гистиоцитами, клетками лимфоидного ряда.

При миелоидном лейкозе (встречается крайне редко) в селезенке обнаруживают клетки гранулоцитарного ряда, мегакарициты и клетки типа гемоцитобластов, выявляют распад и фрагментацию аргирофильных волокон. В костном мозге – скопление клеток гранулоцитарного ряда различной степени зрелости; в лимфатических узлах, печени, почках, легких и других органах наблюдают очаговые и диффузные скопления клеток миелоидного ряда.

При лимфосаркоме в лимфатических узлах, органах пищеварения, воспроизведения, сердечной и скелетной мускулатуре, других органах и тканях отмечают диффузные и очаговые пролифераты клеток лимфоидного ряда. В зависимости от преобладания определенного типа клеток различают лимфоцитарный, пролимфоцитарный, лимфобластный и плазмоцитарный варианты лимфосаркомы. При лимфосаркоме в селезенке и костном мозге изменений опухолевого характера не обнаруживают. Гистиоцитарная саркома отличается от лимфосаркомы по морфологической картине клеточного состава пролифератов, которые состоят в основном из гистиоцитов и других мононуклеарных макрофагов, отмечают также значительное количество атипичных многоядерных форм этих клеток. В костном мозге и селезенке изменений опухолевого характера не отмечают.

При лимфогранулематозе выявляют изменения опухолевого и

воспалительного характера. Обнаруживают лимфоидноклеточные и полиморфноклеточные пролифераты, склеротические изменения, некрозы в лимфатических узлах, селезенке, печени и других органах. Костный мозг почти всегда остается интактным. Клеточный состав пролифератов при лимфогранулематозе представлен лимфоидными клетками различной степени зрелости, плазматическими клетками, эозинофилами, нейтрофилами, фибробластами и патогномичными для этой формы лейкоза многоядерными гигантскими клетками Березовского-Штернберга.

8. Оценка результатов исследований

8.1. Серопозитивное животное считают больным лейкозом при обнаружении у него одного из следующих показателей:

- положительных результатов гематологических исследований на лейкоз;
- клинических признаков болезни;
- патологоанатомических изменений, характерных для лейкоза;
- положительного результата гистологического исследования патологического материала на лейкоз у павшего или убитого животного.

8.2. Животное в возрасте 6 месяцев, сыворотка крови которого дала положительную реакцию в РИД или ИФА, но не имеющее клинико-гематологических изменений, характерных для лейкоза, оценивают как животное с бессимптомной ВЛКРС-инфекцией.

Такое животное рассматривают как источник вируса лейкоза крупного рогатого скота и учитывают при организации противолейкозных мероприятий.

С утверждением настоящих Методических указаний утрачивают силу "Методические указания по диагностике лейкоза крупного рогатого скота", утвержденные Главным управлением ветеринарии Минсельхоза СССР в 1989 году.