

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ  
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

імені В.Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет

кафедра молекулярної біології та біотехнології

**ДІАГНОСТИКА / ДОСЛІДЖЕННЯ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ  
ХУДОБИ НА ПРИКЛАДІ ПОЛТАВСЬКОЇ ОБЛАСТІ**

Допущено до захисту

«\_\_»\_\_\_\_\_2025 р.

Завідуючий

кафедрою \_\_\_\_\_

Оцінка «\_\_\_\_\_»

Голова ЕК

\_\_\_\_\_

«\_\_»\_\_\_\_\_2025 р.

Кваліфікаційна робота бакалавра

студентки кафедри молекулярної

біології та біотехнології

Канівець Юлії Валеріївни

Науковий керівник:

Катеринич Олег Олександрович,

доктор сільськогосподарських наук,

професор кафедри молекулярної

біології та біотехнології

Консультант:

Скляр Яна Дмитрівна

Лікар ветеринарної медицини 1-ї

категорії

Харків 2025

## АНОТАЦІЯ

**Актуальність роботи:** лейкоз великої рогатої худоби, спричинена вірусом BLV, залишається однією з найактуальніших проблем у ветеринарній медицині та тваринництві, зокрема через значний вплив на продуктивність тварин, зниження імунітету та економічні втрати для господарств і фермерів. Незважаючи на наявність діагностичних тест-систем, таких як реакція імунодифузії (РІД) та імуноферментний аналіз (ІФА), рівень поширення захворювання в окремих регіонах України, зокрема в Полтавській області, все ще наявне.

**Об'єктом дослідження** є хвороба лейкоз великою рогатої худоби, спричинена вірусом BLV, за використанням тест-систем таких як РІД та ІФА, та отримання необхідних даних, їх статистична обробка і надання оцінки щодо епідеміологічного стану та поширення лейкозу у Полтавській області.

**Мета роботи:** аналіз сучасних даних щодо епізоотології, патогенезу, діагностики та профілактики лейкозу великої рогатої худоби, з акцентом на епідеміологічні особливості поширення вірусу та оцінка ефективності методів боротьби з ним. Провести аналіз статистики отриманої у ході роботи, а також економічні розрахунки втрат, спричиненні хворобою лейкозу великої рогатої худоби. У роботі представлено аналіз сучасних методів діагностики лейкозу великої рогатої худоби, наведено основні патогенетичні механізми інфекції BLV,. Дано оцінку сучасних методів профілактики та оздоровлення поголів'я великої рогатої худоби, з урахуванням світового досвіду боротьби з BLV. Наведено статистичні дані, щодо поширення лейкозу великої рогатої худоби на території Полтавської області та зроблено їх аналіз. Також, проведено економічні розрахунки збитків.

*Ключові слова:* лейкоз, BLV, велика рогата худоба, ВРХ, ІФА

## ABSTRACT

Relevance of the work: bovine leukemia caused by the BLV virus remains one of the most pressing problems in veterinary medicine and animal husbandry, in particular due to the significant impact on animal productivity, reduced immunity and economic losses for farms and farmers. available diagnostic test systems, such as immunodiffusion reaction (IDR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the level of the disease in some regions of Ukraine, in particular in the Poltava region, is still present.

The object of the study is bovine leukemia disease caused by the BLV virus, using test systems such as IDR and ELISA, and obtaining final data, their statistical processing and providing an assessment of the epidemiological status and development of leukemia in the Poltava region.

Purpose of the work: analysis of current data on epizootology, pathogenesis, diagnosis and prevention of bovine leukemia, with an emphasis on the epidemiological features of the spread of the virus and assessment of the effectiveness of methods to combat it. To analyze the statistics obtained in the course of the work, as well as economic calculations of losses caused by bovine leukemia. The work presents an analysis of modern methods of diagnosing bovine leukemia, the main pathogenetic mechanisms of BLV infection are presented. An assessment of modern methods of prevention and rehabilitation of cattle is given, taking into account world experience in combating BLV. Statistical data on the spread of bovine leukemia in the Poltava region are presented and their analysis is made. Also, economic calculations of losses are carried out.

*Keywords: leukemia, BLV, cattle, ELISA*

## ЗМІСТ

|   |    |
|---|----|
| 1. Анотація.....  | 2  |
| 2. Abstract.....  | 3  |
| 3. Зміст.....   | 4  |
| 4. Перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів.. | 6  |
| 5. Вступ.....   | 7  |
| 6. Розділ 1 Огляд літератури.....                                       | 8  |
| 1.1 Лейкоз хвороба.....   | 8  |
| 1.2 Вірус BLV.....  | 9  |
| 1.3. Історична довідка.....   | 11 |
| 1.4 Епізоотологія хвороби.....  | 12 |
| 1.4.1 Сприйнятливість і шляхи передачі BLV.....                         | 12 |
| 1.5 Патогенез.....  | 13 |
| 1.6 Характеристика та біологічна природа ретровірусів.....              | 15 |
| 1.7 Діагностування лейкозу.....   | 16 |
| 1.7.1 Реакція імунодифузії (РІД).....                                   | 17 |
| 1.7.2 Імуноферментний аналіз (ІФА, ELISA).....                          | 19 |
| 1.7.2.1 Моноклональні антитіла в тесті ІФА (ELISA).....                 | 19 |
| 1.7.3 Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).....                          | 20 |
| 1.7.4 Диференційна діагностика.....                                     | 20 |
| 1.8 Способи боротьби з лейкозом.....                                    | 22 |
| 1.8.1 Оздоровчі заходи із застосуванням РІД та ІФА.....                 | 26 |
| 1.9 Епідеміологічне поширення BLV у світі.....                          | 26 |
| 7. Розділ 2 Власні дослідження.....                                     | 28 |

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 2.1 | Матеріали та методи досліджень.....  | 28 |
| 2.2 | Постановка РІД.....  | 31 |
| 2.3 | Постановка імуноферментного аналізу (ІФА).....                               | 34 |
| 2.4 | Місце виконання роботи та його характеристика.....                           | 40 |
| 2.5 | Результати досліджень.....   | 41 |
| 8.  | Розділ 3 Економічні наслідки BLV для молочного та м'ясного господарства..... | 53 |
| 9.  | ВИСНОВОК.....  | 56 |
| 10. | ДЖЕРЕЛА.....   | 58 |
| 11. | ДОДАТКИ.....   | 64 |

## **Перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів**

BLV – Bovine Leukosis Virus, Вірус лейкозу великої рогатої худоби

HTLV – Human T-lymphotropic virus, Людський Т-лімфотропний вірус

РІД – Реакція імцно-дифузії

ІФА – Імуноферментний аналіз

РНК – Рибонуклеїнова кислота

ДНК – Дезоксирибонуклеїнова кислотаа

CD – Cluster of differentiation, Кластер диференціювання

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses, Міжнародний комітет з таксономії вірусів

ERV – Endogenous Retrovirus, Ендогенні ретровіруси

ВЛ ВРХ – Вірус лейкозу великої рогатої худоби

AGID – Agar Gel Immunodiffusion, Агар-гель імунодифузія

ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, Імуноферментний аналіз

Автодозатор – Автоматичний дозатор

ВРХ – Велика рогата худоба

ПЛР – Полімеразна ланцюгова реакція

ГМО – Генетично модифікований продукт

ТМБ – 3,3' ,5,5' - тетраметилбензидин

## ВСТУП

Вірус лейкозу великої рогатої худоби (BLV) є дельтаретровірусом, який тісно пов'язаний з вірусом Т-клітинного лейкозу людини типів 1 і 2 (HTLV-1 і -2). Інфікування BLV, протікає безсимптомно, що посилює надзвичайно високі показники виділення вірусу в багатьох популяціях великої рогатої худоби. Приблизно у 30% з них виявляється стійкий лімфоцитоз, який має різні клінічні наслідки; лише невелика частина тварин (менше 5%) демонструє ознаки ензоотичного лейкозу. BLV завдає великих економічних збитків худобі на промислових фермах, особливо на молочних фермах [1].

В Україні заходи профілактики та боротьби з лейкозом великої рогатої худоби регулювалися відповідним законодавством, положеннями та інструкціями, розробленими у 1960–1992 рр. Нині використовується інструкція з профілактики та оздоровлення великої рогатої худоби (затверджена у 2007 р.). Відповідно до нього ідентифікацію інфікованих тварин проводять з 6-місячного віку серологічними (РІД чи ІФА) та геномними (ПЛР) методами [2].

Мета роботи: аналіз сучасних наукових даних щодо епізоотології, патогенезу, діагностики та профілактики лейкозу великої рогатої худоби (BLV), з акцентом на епідеміологічні особливості поширення вірусу та оцінку ефективності методів боротьби з ним, економічні втрати спричинені лейкозом великої рогатої худоби.

## РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Лейкоз хвороба

Лейкоз (Leucosis) — хронічна інфекційна хвороба великої рогатої худоби, інших ссавців та різних видів птахів, що характеризується порушенням процесу дозрівання клітинних елементів крові, злякисним розростанням кровотворної та лімфоїдної тканин, утворенням у різних органах пухлин. На лейкоз хворіє людина [3].

Вірус лейкозу великої рогатої худоби (BLV) відноситься до сімейства *Retroviridae* і роду *Deltraretrovirus* і є збудником ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби. Будучи ретровірусом, РНК-вірус BLV зворотно транскрибується в провірус ДНК, який інтегрується в геном хазяїна, що призводить до стійкої інфекції протягом усього життя. Основною мішенню BLV є В-лімфоцити господаря, хоча він також був виявлений в інших клітинах, таких як Т-лімфоцити та епітелій молочної залози. [4].

Клінічний лейкоз розвивається менш ніж у 5% інфікованої великої рогатої худоби, однак BLV-інфіковані лімфоцити також виявляються в крові та молоці субклінічно інфікованих корів. BLV-інфіковані стада великої рогатої худоби зустрічаються по всьому світу. У США приблизно 38% стад яловичини, 84% усіх молочних стад і 100% великомасштабних молочних стад інфіковані. В Аргентині, яка має велику галузь виробництва коров'ячого молока та яловичини, більшість стад заражені BLV. На противагу цьому, завдяки вибракуванню інфікованої великої рогатої худоби, BLV інфекції були практично ліквідовані в австралійських і європейських корів. Однак практично всі австралійці з дитинства регулярно споживали коров'яче молоко або молочні продукти, такі як морозиво та сир, і багато хто з них контактував з молоком, інфікованим BLV. Цілком можливо, що будь-який онкогенний вплив BLV може зайняти десятиліття, щоб перерости в рак молочної залози, і,

відповідно, не можна очікувати зниження поширеності раку молочної залози протягом багатьох років [5].

## 1.2 Вірус BLV

BLV є одноланцюговим ретровірусом вірусом, якому притама сферична або паличкоподібна морфологія, розміром приблизно від 60 до 125 нанометрів у діаметрі. Він огорнутий двошаровою структурою мембрани, а його нуклеокапсид демонструє ікосаедричну симетрію. Він містить диплоїдний одноланцюговий генوم РНК. Вірусний генوم BLV складається з диплоїдної одноланцюгової молекули РНК, що охоплює загалом 8714 нуклеотидів. Цей генوم охоплює гени структурних білків, гени, що кодують ферменти, ділянку рХ і дві ідентичні довгі кінцеві послідовності повторів, розташовані на обох кінцях геному [6].

Геномна РНК ретровірусів складається з 4 основних генів (5–3) gag-pro-pol-env, що кодують відповідно внутрішні віріонні білки, протеазу, зворотню транскриптазу і глікопротеїни зовнішньої оболонки віріонів. Рід ретровірусів включає вірус лейкозу ВРХ, вірус Т-клітинного лейкозу людини типу 1 і 2, і вірус клітинного лейкозу мавп. Ретровірусний генوم складається із:

1. R-короткого прямого кінцевого повтору (20-80 нуклеотидних залишків), необхідного для реплікації збудника;
2. Us-унікальної послідовності нуклеотидів між R і PBS ділянками;
3. PBS- ділянки комплементарної РНК, які слугують затравкою при синтезі мінус-ланцюгової ДНК ретровірусу, область компліментарності цієї ділянки складає 11-24 нуклеотидних залишків;
4. L-ведуча ділянка вірусного геному, що включає сигнальну послідовність для сплайсингу;
5. Ген gag, що кодує внутрішні структурні білки віріону;

6. Ген *pol*, що кодує поліпептиди, з ревертазною, специфічною РНК-азною і ДНК-ендонуклеазною активністю;
7. Ген *env*, що кодує поверхневі білки віріону;
8. РРТ- ділянку збагачену пуриновими основами, відповідальною за ініціацію синтезу плюс-ланцюга ДНК вірусу;
9. U3- унікальної ділянки розташованої між РРТ і R послідовностями реплікації, що вміщує ділянки ініціації і термінації транскрипції.

Гени *gag*, *pol*, *env* необхідні для реплікації вірусу і називаються реплікативними. Ретровіруси часто зумовлюють розвиток різних неопластичних захворювань та швидко поширюються серед сприйнятливих тварин. Вони характеризуються відповідною морфологією, структурою РНК-геному і наявністю РНК-залежної ДНК-полімерази. Віріони включають 7 поліпептидів, при цьому поверхневі глікопротеїни (*env*) містять типоспецифічні епітопи, а внутрішні білки (*gag*) несуть перехресно-реактивні епітопи, що має важливе значення для моделювання біотехнологічних конструкцій. Геном вірусу лейкозу ВРХ містить структурні та регуляторні гени. Відомо, що в організмі інфікованих тварин індукується синтез антитіл до р24 і р15 білків збудника, які є продуктами гена *gag* [7].

Вірус лейкозу проявляє тропізм до лімфоцитів, аглютинуює еритроцити мишей. Репродукується в лейкоцитах, відрізняється від інших ретровірусів за антигенними властивостями, морфогенезом, здатністю утворювати синцитій у моношарових культурах. Виявляється в клітинах молозива й молока спонтанно хворих тварин. Вірус лейкозу корів не вдається виділити із слини, носового слизу, сечі, сперми. Експериментально чи спонтанно заражена вірусом лейкозу велика рогата худоба залишається інфікованою на все життя, незважаючи на наявність в її організмі специфічних антитіл. Нездатність організму елімінувати вірус лейкозу корів зумовлюється перебуванням його в непродуктивному стані в інфікованих лімфоцитах. Репродукція вірусу лейкозу

корів не є необхідною умовою поширення його в популяції тварин, оскільки лімфоїдні клітини можуть передавати вірусний генетичний матеріал потомству під час розмноження клітин, а також за допомогою механізму *Cellular Kissing* (клітинного поцілунку). Встановлено, що розвиток персистентного лімфоцитозу та пухлинної стадії лейкозу у відповідь на інфекцію вірусом лейкозу генетично детерміновані. Чутливість великої рогатої худоби до вірусу лейкозу також перебуває під генетичним контролем [1].

Вірус лейкозу не стійкий у зовнішньому середовищі, швидко руйнується при кип'ятінні, при 56 °C — через 15 хв. При пастеризації молока (76 °C) вірус інактивується через кілька секунд і втрачає свою заразливість щодо ягнят. Під час зберігання молока при 1 °C залишається життєздатним упродовж 72 год, однак при 10 °C гине через 48 год, при 14,5 °C — через 24 год. Ефективними дезінфекційними засобами, що швидко знешкоджують збудник лейкозу в зовнішньому середовищі, є 2 %-й розчин їдкого натру, 3 %-й розчин формальдегіду, розчин хлорного вапна, що містить 2 % активного хлору [1].

### **1.3. Історична довідка**

Захворювання вперше описав під назвою «лейкемія» Р. Вірхов у 1845 р. у людини. Перші свідчення про лейкоз коней опублікував Лейзерінг у 1858 р., про лейкоз свиней — у 1865 [3].

Перший зареєстрований випадок лейкозу великої рогатої худоби був описаний у 1871 році в районі Клайпеди, Литва, і згадував корову з гіпертрофією поверхневих лімфатичних вузлів і спленомегалією [7]. Після того, як було повідомлено про поширення інших випадків захворювання, вказуючи на захід, і врешті-решт воно досягло США. У 1917 році Кеннет показав, що хвороба була опосередкована інфекційним агентом [7].

Відомості про виділення вірусу від хворих на лейкоз корів з'явилися у середині 60-х років (Датчер, 1964). У 1969 році Міллер та інші виявили, що лімфоцити корів із стійким лімфоцитозом виробляють вірусні частинки, які

можна побачити за допомогою електронної мікроскопії після культивування *in vitro* [7]. У 1921 р. В. Елерман замінив термін «лейкемія» на «лейкоз», що точніше відповідає суті хвороби, яка іноді проходить без кількісних змін лейкоцитів у периферичній крові. У 1972 р. Міллер зі співробітниками виявили в сироватках хворих на лейкоз корів специфічні до бичачого лейкозного вірусу (BLV) антитіла. У 1976 році Kettmann та інші показали, що частинки BLV є РНК-екзогенними вірусами та несуть РНК-комплекс зворотної транскриптази; це відкриття дозволило класифікувати BLV серед онкогенних ретровірусів [7].

#### **1.4 Епізоотологія хвороби**

У природних умовах до вірусу лейкозу сприйнятливі велика рогата худоба, коні, свині, вівці, кози, кролики, усі види птахів, особливо кури. У корів захворювання спостерігається переважно у 4 – 9-річному віці, однак іноді хворіють тварини до 3-річного віку.

Джерелом збудника хвороби є заражені вірусом лейкозу тварини, які виділяють вірус з кров'ю, молоком, різними секретами та екскретами, що містять інфіковані лейкоцити. Тварини заражаються як парентерально, так і ентерально. Вважають, що зараження може відбутися також трансплацентарно в останні 6 міс вагітності і контактно від хворої тварини здоровій. Однак механізм контактного передавання збудника лейкозу до кінця не з'ясований, тим паче, що не встановлено наявності вірусу у фекаліях, сечі та слині інфікованих тварин. Доведено можливість передавання вірусу лейкозу через молозиво інфікованої матері. Не виключається можливість передавання вірусу через шприци, голки та інші інструменти під час масових обробок тварин [3].

##### **1.4.1 Сприйнятливість і шляхи передачі BLV**

BLV переважно міститься в лімфоцитах периферичної крові інфікованих тварин, а також може бути виявлений у різних рідинах організму

BLV-позитивної великої рогатої худоби, включаючи кров, молоко, слину, сперму та носові виділення [9, 10]. Основні шляхи передачі BLV є горизонтальними, які включають (1) ятрогенну передачу, таку як повторне використання медичних пристроїв, заражених BLV (наприклад, шприців, рукавичок, інструментів для видалення рогів, інструментів для кастрації, інструментів для забору крові та інструментів для ректального дослідження), під час ін'єкційного введення препарату або вакцини [10,11]; (2) передача через прямий контакт із зараженою худобою та її виділеннями, такими як слизові оболонки, або випадкове проковтування слини, сперми, сечі, калу та молока [11, 12]; і (3) передача через укуси комарів, включаючи комарів *Stegomyia*, *Aedes vexans* і *Aedes albopictus* [13, 14]. BLV також може передаватися вертикально від BLV-позитивних корів до їхніх плодів [15].

Крім того, BLV може безпосередньо передаватися плоду через споживання молозива та молока, що містять вільні вірусні частинки. Цей тип передачі зазвичай відбувається у молочних корів з високим провірусним навантаженням (PVL) [16]. Дослідження показали, що клітини в молоці молочних корів з високим вмістом PVL можуть переносити BLV і передавати його опосередковано через міжклітинний контакт [9]. Використання BLV-позитивних племінних биків на фермах потенційно може призвести до вертикальної передачі BLV. Хоча ризик передачі через сперму або ембріони вважається незначним, природне спарювання з інфікованими биками може призвести до передачі через інтенсивний прямий контакт під час спарювання [17,18]. Тому вкрай важливо проводити скринінг племінних биків, які використовуються для природного спарювання або штучного осіменіння, щоб мінімізувати ризик передачі BLV [19].

## 1.5 Патогенез

BLV викликає стійку та хронічну інфекцію, яка вражає переважно популяцію В-лімфоцитів. Інфекція може передаватися клітинними компонентами інфікованої бичачої крові, інфікованими культивованими

клітинами або вільними вірусними частинками, виробленими в культурі клітин. Віремію можна виявити лише протягом перших 2 тижнів інфекції. Після цього експресію вірусних антигенів важко виявити, але іноді її можна виявити у внутрішньофолікулярних і крайових зонах лімфатичних вузлів за допомогою імуноцитохімічного методу [8].

Велика рогата худоба розвиває серологічну відповідь на капсид і білки оболонки через 2-8 тижнів після інокуляції. Ці антитіла є довічними та мають значні варіації рівня, які, ймовірно, пов'язані з фізіологічним та імунним статусом тварини. Антитіла до вірусних регуляторних білків (білків *Tax* і *Rex*) також можна виявити приблизно у 20% інфікованої великої рогатої худоби. У наступні роки після інфікування у 70% інфікованих тварин спостерігалось збільшення співвідношення В/Т-лімфоцитів у крові, при здавалося б нормальному загальному числі лімфоцитів (4000–10000/мм<sup>3</sup>). Серед цих тварин у половини розвивається стійкий лімфоцитоз, що відповідає стабільному збільшенню кількості циркулюючих лімфоцитів, іноді досягає 100 000/мм. Інтеграція генома BLV виявляється в 30% циркулюючих лімфоцитів і стосується багатьох клонів лімфоцитів. Розширення популяції лімфоцитів є результатом поліклональної проліферації зрілих В-лімфоцитів, які є цитологічно та каріотипово нормальними. Більшість цих лімфоцитів несуть маркери CDS, CD11b і CD11c. Схоже, що у мишей CD5 +В-клітини становлять популяцію лімфоцитів іншої лінії, ніж CD5-В-клітини, які можуть брати участь у синтезі аутоантитіл. Цей тип лімфоцитів також зустрічається при хронічному лімфоїдному лейкозі людини. Використовуючи активоване флуоресценцією сортування клітин, виявляється BLV в CD8 +Т-лімфоцитах, моноцитах, гранулоцитах і переважно в В-лімфоцитах, без переваги для популяції CD5 +В-клітин. Параметри, пов'язані з чутливістю CD5 + В-лімфоцитів до лімфопроліферативного потенціалу BLV, ще належить визначити [8].

Остаточним і рідкісним проявом інфекції BLV є поява мультицентричної лімфосаркоми, яка виникає через 1-8 років після інфікування приблизно у 1-5% тварин. У 2/3 тварин з пухлинами був стійкий лімфоцитоз. Пухлини можуть вражати один або декілька поверхневих і/або глибоких лімфовузлів. В одній тварині пухлини здебільшого моноклональні для інтеграції BLV, і, здається, вірус не демонструє пріоритетних місць інтеграції серед пухлин від різних тварин. На думку одних авторів, пухлинні клітини є пре-лімфоцитами, які характеризуються відсутністю експресії легкого ланцюга імуноглобуліну, для інших вони є зрілими В-лімфоцитами, що демонструють ізотипову комутацію в гені імуноглобуліну. Найчастіше маркер CD5 експресується на пухлинних клітинах [8].

## 1.6 Характеристика та біологічна природа ретровірусів

Ретровіруси складають велике та різноманітне сімейство РНК-вірусів з оболонкою, визначених загальними таксономічними знаменниками, які включають структуру, склад і реплікативні властивості. Діаметр віріонів становить 80–100 нм, а їхня зовнішня ліпідна оболонка включає та демонструє вірусні глікопротеїни. Форма і розташування внутрішнього білкового ядра характерні для різних родів сімейства. РНК віріону має розмір 7–12 кб, вона лінійна, одноланцюгова, несеgmentована та має позитивну полярність. Відмінною рисою сімейства є його реплікативна стратегія, яка включає в якості основних етапів зворотну транскрипцію РНК віріону в лінійну дволанцюгову ДНК і подальшу інтеграцію цієї ДНК в геном клітини [20].

Структура провірусу вірусу лейкозу великої рогатої худоби (BLV) складається з сайтів розщеплення *SacI* і *HindIII*. *SacI* може генерувати два основних фрагменти (6,8 і 1,3 кб), тоді як *HindIII* може генерувати два фрагменти довжиною понад 4,0 кб на інтегровану копію повного провірусу BLV [9].

Відповідно до останнього випуску Міжнародного комітету з таксономії вірусів (ICTV), родина *Retroviridae* поділяється на дві підродини, а саме *Orthoretrovirinae* та *Spumaretrovirinae*. Підродина *Orthoretrovirinae* включає шість родів (*Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus* і *Lentivirus*), а підродина *Spumaretrovirinae* (також відома як пінисті віруси) включає п'ять родів (*Bovispumavirus*, *Equispumavirus*, *Felispumavirus*, *Prosimiispumavirus*, *Simiispumavirus*) [8, 9, 22].

Однак класифікація ICTV враховує лише екзогенні ретровіруси. ERV традиційно класифікують на три класи на основі їх подібності та філогенетичного зв'язку з екзогенними ретровірусами. ERV класу I групуються з гаммаретровірусом і епсилонретровірусом, ERV класу II кластеруються з альфаретровірусом, бетаретровірусом, дельтаретровірусом і лентивірусом, а ERV класу III складаються з пінистих вірусів і ERV-L [22].

### **1.7 Діагностування лейкозу**

Включає гематологічні, цитологічні, гістологічні та серологічні дослідження. Гематологічні дослідження полягають у виявленні в периферичній крові підвищеної кількості лімфоїдних лейкоцитів, низькодиференційованих клітин (попередників, пролімфоцитів, лімфобластів) і поліморфних атипичних клітин кровотворення. Результати розрахунків оцінюють за так званим «лейкозним ключем». Спеціальні цитологічні дослідження пунктату кісткового мозку і поверхневих лімфовузлів дозволяють визначити форму лейкозу. Зустрічається при лімфоїдному лейкозі [3, 7].

Візуальні маркери лейкозу: схуднення, випинання ока, збільшення поверхневих лімфатичних вузлів, пальповані новоутворення в черевній порожнині. При аускультації органів грудної порожнини можуть спостерігатися тахікардія, порушення серцевого ритму, гіперпноє та тахіпноє. Загальні локалізації новоутворень включають серце, особливо в правому

передсерді, матку, сичуг, спинний мозок, нирки, рубець/сітку та ретробульбарний простір. Збільшені поверхневі вузли, особливо стеговні, передлопаткові та молочні лімфатичні вузли. Кал виділяється кашкоподібним, мізерним або навіть водянистим, що відображає наявність уражень у шлунково-кишковому тракті. Мелена також може бути виявлена у великої рогатої худоби з виразкою сичуга та інфільтрацією неопластичних клітин у стінці сичуга. Ректальне дослідження може бути корисним у випадках захворювання без екзофтальму або збільшення периферичних вузлів. Множинні неопластичні утворення зазвичай виявляються в черевній порожнині, і їх розміри коливаються від невеликих вузлів до важких уражень діаметром п'ятдесят сантиметрів [21].

Результати цитологічного дослідження на лейкоз вважаються позитивними, якщо в мазках крові виявлено більше 3% і більше 10% прогеніторних низькодиференційованих клітин (пролімфоцитів, лімфобластів, мізобластів) або пухлинних клітин з нормальними показниками абсолютної кількості лімфоцитів-гемограм. знайдені. виявляються в мазках крові, низькодиференційована форма лейкозу – коли в гемограмах і цитограмах органів кровотворення виявляється підвищений відсоток низькодиференційованих клітин-попередників.

Серологічний метод ґрунтується на постановці різних імунологічних реакцій і зокрема – реакції імунодифузії (РІД) в агаровому гелі з метою виявлення протилейкозних антитіл сироватки крові тварин із використанням відомого стандартного антигену ВЛ ВРХ, ІФА (імуноферментний аналіз).

### **1.7.1 Реакція імунодифузії (РІД)**

Тест імунодифузії в агаровому гелі (AGID) замінив ключ Бендіксена незабаром після розробки серологічного тесту в середині 1970-х років. Тест РІД простий і легкий у виконанні [10]. Реакція імунодифузії (РІД) – серологічний метод діагностики лейкозу ВРХ, що базується на виявленні в

сироватці крові тварин антитіл до одного із двох структурних білків BLV (gp24 та p51). Специфічні антитіла виявляються в РІД вже через 3–16 тижнів після інфікування тварин ВЛВРХ, тобто значно раніше ніж гематологічні зміни, і зберігаються пожиттєво. РІД-позитивних тварин вважають інфікованими BLV [23].

В основі реакції РІД використовується реакція дифузної преципітації. Преципітація – осадження колоїдних розчинів антигену при дії на нього імунної сироватки, у якій знаходяться специфічні антитіла. Реакцію преципітації використовують для визначення видової належності антигену, для серологічної діагностики деяких інфекційних захворювань і для виявлення специфічних антитіл у дослідній сироватці [24].

Для постановки РІД необхідно мати предметні скельця або чашки Петрі, стандартний штамп для прорізання лунок в агарі, пастерівські піпетки, автоматизовані піпеткидозатори, рН-метр, освітлювач, агарову суміш, трисбуфер з рН 7,2, хлорид натрію, дистильовану воду, соляну кислоту, вакуумний насос [24, 25]. Постановку реакції проводять у лабораторних умовах, застосовуючи діагностичний набір, який виготовляють у науково-дослідних інститутах або біофабриках. До складу набору входять: антиген (рідкий або ліофілізований), преципітувальна (позитивна) та нормальна (негативна) сироватки, агаросольова суміш. Агар готують згідно настанови, яка додається до кожної серії діагностичного набору. Розплавлений агар розливають на знежирені предметні скельця або чашки Петрі, які розміщують на горизонтальній поверхні столу і витримують годину при кімнатній температурі. На затверділому агарі за допомогою штампа прорізують лунки, з яких видаляють агар за допомогою канюлі, приєднаної до вакуумнасосу. Антиген, специфічну преципітувальну сироватку та сироватку для досліджень вносять у лунки пастерівськими піпетками. Для кожного компоненту реакції використовують окрему піпетку, при цьому піпетки для сироваток, які досліджують, необхідно промивати в дистильованій воді після кожної проби.

Антиген та контрольну сироватку вносять у центральні лунки, а сироватки для діагностики – у лунки периферійних рядів. Після чого предметні скельця, або чашки Петрі розміщують у герметичній камері (великий стерилізатор або ексікатор), куди попередньо на дно наливають води. Вода забезпечує необхідну відносну вологість. Облік результатів реакції проводять через 24, 48, 72 годин. Для цього скельце або чашку Петрі з реагентами продивляються у променях освітлювача [24, 25].

### **1.7.2 Імуноферментний аналіз (ІФА, ELISA)**

Імуноферментний аналіз (ELISA) — це імунологічний метод, який використовується для виявлення та вимірювання антитіл або антигенів у біологічних зразках, таких як кров, плазма, сеча або інші рідини тіла. Він застосовується в діагностиці інфекційних захворювань та інших медичних дослідженнях. [26].

Сендвіч-ELISA є найпоширенішим методом для швидкого та точного виявлення антигенів. Він демонструє більшу чутливість порівняно з непрямим ІФА та може бути використаний для визначення абсолютної концентрації антигену в невідомих зразках за умови наявності очищених стандартів антигену, хоча він вимагає використання двох різних антитіл.

Лунки покривають антиген-специфічними захоплюючими антитілами, а потім інкубують зі зразками, що містять невідомий антиген. Промивання видаляє незв'язаний антиген та екзогенний білок зразка перед інкубацією з другим антиген-специфічним детекційним антитілом, яке є міченим, промиванням та повторною інкубацією з субстратом. Гідроліз вимірюють спектрофотометрично. Інтенсивність сигналу прямо пропорційна концентрації антигену в тестованому зразку [26].

#### **1.7.2.1 Моноклональні антитіла в тесті ІФА (ELISA)**

Моноклональні антитіла — це антитіла, які виробляються ідентичними імунними клітинами, які клоновані з однієї клітини-попередника (В-

лімфоцита), які специфічні до одного антигену. Моноклональні антитіла можуть вироблятися проти будь-якого природного антигену (Найчастіше це білки, полісахариди, білкова оболонка вірусу, пухлинні або пошкоджені клітини, токсини), який можуть зв'язувати дані антитіла. Моноклональні антитіла можуть використовуватись як для виявлення специфічного антигену в організмі, так і для його зв'язування та його знешкодження. Найбільш широко моноклональні антитіла застосовуються в медицині для діагностики [27, 28].

Переваги моноклональних антитіл призвели до застосування гібридомної технології для багатьох основних і практичних проблем. У тваринництві моноклональні антитіла все частіше знаходять застосування в областях діагностики, пасивної імунізації та фундаментальних досліджень [29, 30].

### **1.7.3 Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)**

Молекулярно-генетичний – полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Суть її полягає у виділенні в досліджуваній пробі провірусної ДНК і наступна ампліфікація специфічної ділянки ДНК вірусу лейкозу великої рогатої худоби з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів і синтезу комплементарних ланцюгів ДНК за допомогою ферменту Таq-полімерази.

Метод високочутливий, але наявні певні обмеження у використанні, які пов'язані з дороговизною обладнання і діагностичних наборів та дотриманням особливих умов проведення діагностичної процедури [31].

### **1.7.4 Диференційна діагностика**

Лейкоз великої рогатої худоби потрібно диференціювати від актиномікозу (ураження лімфовузлів голови і ділянки грудей), туберкульозу (ураження підщелепових, залоткових, шийних, передлопаткових, надвимв'яних та інших лімфовузлів, регіонарних різних органам), а також паратуберкульозу (збільшення брижових та іліоцекальних лімфовузлів з

наявними у них білуватих або сіруватожовтих ділянок) і бруцельозу, за якого, окрім лімфаденіту, можуть виявлятися некротичний гепатит і мастит [25].

Гематологічні дані повинні аналізуватися в зв'язку з клінікогематологічним синдромом, оскільки гематологічні дані в диференційній діагностиці відіграють роль факторів, тісно пов'язаних з іншими ланками діагностичного ланцюга. Значення гематологічних досліджень у диференційнодіагностичному аспекті зростає при проведенні їх у динаміці, особливо при аналізі лейкоцитарних формул. Разом з тим, при постановці діагнозу необхідно враховувати не лише стан крові, але й інші симптоми. Це тим більше важливо, якщо врахувати той факт, що кровотворна система відрізняється винятковою чутливістю до будь-яких подразників. Більшість гострих і хронічних захворювань, а також запальні процеси в органах і тканинах супроводжуються гематологічними порушеннями. Однак, у таких випадках встановлюють зміни крові, які мають захисний і тимчасовий характер. При лейкозі зміни у вигляді лейкоцитозів і лімфоцитозів є незворотним процесом. Нормалізацію, або лише часткові зміни цих показників у великої рогатої худоби, визначають у зв'язку зі спонтанними ремісіями [25].

Лейкоз необхідно диференціювати від хвороб з лейкемоїдними реакціями. Під лейкемоїдними реакціями розуміють патологічний стан крові, який подібний з картиною крові, яку спостерігають при лейкозі, але вони мають інше походження. Такі реакції часто спостерігають при маститі, бронхопневмонії та інших хворобах, що значно утруднює постановку діагнозу в ранній період захворювання лейкозом. Встановлено, що у хворих маститом або бронхопневмонією тварин патоморфологічні зміни, які характерні для лейкемоїдних реакцій, проявляються лише в регіонарних лімфатичних вузлах і, на відміну від лейкозів, характеризуються відсутністю гіперпластичних процесів лімфоїдної тканини в органах лімфопоезу, поліморфноклітинною (гістіоцитами, нейтрофілами, ретикулярними і плазматичними клітинами)

інфільтрацією останніх. За поєднання початкової стадії хронічного лімфоїдного лейкозу з маститом або бронхопневмонією, зміни, які властиві лейкомоїдним реакціям, більш виражені в регіонарних лімфатичних вузлах, а характерні для лейкозів зміни чітко проявляються в нерегіонарних лімфатичних вузлах, розміщених в ділянці голови та шиї [25].

### **1.8 Способи боротьби з лейкозом**

Боротьба з лейкозом великої рогатої худоби – це складний ветеринарнозоотехнічний і організаційногосподарський процес, який може ускладнюватись наступними чинниками: недостатнім вивченням особливостей інфекційного та епізоотичного процесів; різноманіттям патогенетичних і морфологічних проявів хвороби; відсутністю методів виявлення в тварин генетично обумовленої стійкості до захворювання; відсутністю радикальних специфічних засобів профілактики лейкозу; кількістю часу, тривалістю оздоровлення господарства, неблагополучного з лейкозу великої рогатої худоби [25].

У дослідженнях було визначено різні стратегії контролю та запобігання BLV інфекції. Ці стратегії включають впровадження суворих процедур управління, тестування та вибракування або відокремлення інфікованих тварин, скринінг генетичних ознак та вакцинацію [6].

Першою стратегією є “тестування та елімінація” великої рогатої худоби, інфікованої BLV. Методика “тестування та елімінація” один з перших методів, який був введений у боротьбі проти лейкозу великої рогатої худоби. Цей підхід вимагає ідентифікації BLV-позитивних тварин за допомогою гематологічних, геномних або серологічних методів, негайного видалення позитивних випадків із стада та, нарешті, негайного забою. Ця методологія відіграла важливу роль у досягненні статусу вільного від BLV у стадному та регіональному масштабах за відносно короткий період часу порівняно з іншими альтернативами [6]. Дослідження повідомляють, що при використанні

цієї стратегії, зниження поширюваності вірусу серед стада становила до 50% [32, 33]

Хоча цей підхід був ефективним, його здійсненність стикається з деякими важливими обмеженнями. Основним обмеженням є те, що початковий рівень поширеності інфекції не повинен бути високим через дуже високу економічну вартість. За дослідженнями, кожен рік економічна втрата становить декілька мільйонів доларів [34, 35]. Отже, ця стратегія може бути особливо виправданою для племінних порід з високим генетичним потенціалом, а також для експорту в країни, вільні від BLV. Тим не менш, навіть коли рівень зараження низький, підхід “тестування та елімінація” є обтяжливою стратегією через діагностику, передчасне вибракування та заміну реакторів. Слід також враховувати втрату генетичного та репродуктивного потенціалу. Фактично, щоб ця стратегія була успішною, потрібна урядова політика економічної компенсації. Якщо місцева влада не вживає офіційних дій щодо субсидування, витрати на впровадження такої стратегії швидко перевищують потенційні вигоди. Такі країни, як США, Канада, Аргентина та Японія, які не мають політики фінансової компенсації, зазвичай не можуть отримати прихильність для участі в цих програмах.

Методика “виявлення та відмежовування” відіграла важливу роль у досягненні статусу вільного від BLV у стадному та регіональному масштабах за відносно короткий період часу порівняно з іншими альтернативами. Доказом ефективності цієї стратегії є успішне викорінення хвороби в кількох країнах Західної Європи. Ця стратегія полягає в тому, що стадо тестують на вірус лейкозу, і позитивних корів відмежовують від здорових.

Було запропоновано, щоб мінімальна відстань у 200 метрів розділяла два стада, щоб уникнути передачі. Альтернативним варіантом є утримання тварин в одній фермі та утримання їх окремо. Для отримання оптимальних результатів з будь-яким із цих варіантів слід застосовувати окреме обладнання або принаймні ретельну дезінфекцію та гігієну одноразового обладнання.

Основна перевага такого підходу – зменшення коштовних втрат через примусову передчасну вибраковку та заміну BLV-позитивних тварин. Незважаючи на те, що цей тип програми є досить вимогливим, він був корисним для зменшення поширеності або навіть досягнення викорінення захворювання. Недолік полягає в тому, що існує постійний ризик повторного заселення інфікованих тварин, і тому це може бути повільніше, ніж варіант “тестування та елімінація”.

Цей підхід спрямований на обмеження передачі BLV-інфікованих клітин, присутніх у крові, молоці, виділеннях, шприцах або хірургічних інструментах.

Серед різноманітних заходів контролю, які можуть бути реалізовані в плані попереджувального або коригувального контролю управління, наступне є основними практиками:

1. Використання індивідуальних одноразових голок і шприців під час вакцинації або терапевтичних протоколів;
2. (Використання індивідуальних одноразових акушерських рукавів (або принаймні заміна між дослідженнями BLV-реакторів і неінфікованих тварин);
3. Використання одноразового обладнання (або принаймні очищення, дезінфекція чи стерилізація матеріалів багаторазового використання та хірургічних інструментів) у таких процедурах, як видалення рогів, татування, імплантація, припікання, кастрація чи бірка на вухах;
4. Використання електричних або газових спалювальних пристроїв замість обладнання для додання під час видалення рогів;
5. Годування телят молозивом або незбираним молоком від неінфікованих маток, пастеризованим молозивом від BLV-інфікованих корів або заміником молока;

6. Знищення комах, особливо в густонаселених фермах (майданчики для доїння, вільні стійла, амбари) з метою мінімізації потенційної передачі між тваринами через членистоногих переносників;

7. Природне та/або штучне запліднення та перенесення ембріонів матками та биками, вільними від BLV.

Порівняно зі стратегіями тестування та елімінація/відмежовування, підхід «коригувального управління та ветеринарних практик» є очевидно більш економічно ефективним. Не потрібні ні інвестиції в приміщення, ні вилучення інфікованої худоби, ні постійний нагляд за серологічним статусом стада. Недоліки коригуючого підходу до управління полягають у тому, що практика є дуже трудомісткою та вразливою до факторів навколишнього середовища та людини. У зв'язку з цим слід розглянути ретельну оцінку зусиль, необхідних перед зарахуванням до плану коригувального контролю. Суворе дотримання строгих заходів має бути забезпечене, і необхідна довгострокова участь у програмі, доки не будуть спостерігатися плідні переваги цієї стратегії. Крім того, можна розглянути адекватне навчання персоналу та працівників ферм щодо запобігання BLV та методів біозахисту. Ефективність стратегії «коригувального управління та ветеринарної практики», заснованої виключно на суворих санітарних заходах, досі залишається суперечливою [6, 34].

Вакцинація ВРХ тільки нещодавно стала можливою. У деяких вакцинах використовується специфічний штам, який допомагає тваринам виробити імунітет то вірусу лейкозу. Слід зазначити, що BLV має обмежену різноманітністю послідовностей, тому вакцина ефективна та може використовуватись у різних країнах світу. Основна проблема цього підходу полягає в тому, що вакцина була отримана шляхом зворотної генетики і, таким чином, є генетично модифікованим організмом (ГМО) [36].

Насправді, вакцинація проти BLV повинна знизити зараження в молоці, тим самим зменшуючи передачу вірусу людині. Крім того, зниження поширеності BLV у всьому світі також обмежило б ризик, особливо в регіонах, де споживають сире молоко. Окрім цієї потенційної проблеми зі здоров'ям, вакцина забезпечує захист від інфекції BLV дикого типу стада, яке характеризується високою поширеністю. Таким чином, цей економічно ефективний інструмент може зменшити поширеність BLV незалежно від дорогих підходів, які потребують регулярного тестування в поєднанні з вибракуванням або сегрегацією інфікованих тварин [3, 36].

### **1.8.1 Оздоровчі заходи із застосуванням РІД та ІФА**

Проводять дослідження тварин старше 6-місячного віку в РІД. Після ізоляції РІД позитивних тварин - у термін до 10 діб, РІД негативних тварин досліджують в ІФА.

Хворих тварин у всіх господарствах незалежно від форм власності та підпорядкування, як виняток, утримують і експлуатують в окремому приміщенні, стаді, фермі не довше двох років. Молодняк, отриманий від таких тварин, можна використовувати для ремонту стада за умови негативного двократного результату з інтервалом 30-45 діб [37].

### **1.9 Епідеміологічне поширення BLV у світі**

Недавні опитування в більшості країн за межами Європи повідомили про постійне зростання поширеності BLV як у м'ясної, так і в молочній худобі. Поширеність, як правило, вища серед молочної худоби, при цьому США, Японія, Канада, Бразилія, Китай та Аргентина повідомляють, що більшість стад інфіковані та наближаються до ситуації, коли майже у половини молочної худоби виявляють серологічні ознаки інфекції. Наступні країни та регіони світу повідомляють про помірне зростання BLV: Китай, Колумбія, Коста-Ріка, Іран, Японія, Монголія, Філіппіни, Південна Африка, Туреччина та Західна

Африка. Інші країни повідомляють про більший приріст: Аргентина, Канада та США. У результаті зростання поширеності багато регіонів запровадили програми контролю BLV, які включають посилені торговельні обмеження для захисту своїх стад [38, 39].

У США дуже високий рівень поширеності BLV, який становить 40%. У 2015 році 78% із 315 молочних стад у Канаді показали антитіла BLV. Повідомлялося, що в Аргентині 84% молочних стад є носіями антитіл, у Туреччині — 2,28%, а в Мексиці — від 11% до 66%. У Китаї було проведено дослідження мета-аналізу для вимірювання поширеності BLV протягом періоду між 1983 і 2019 роками. Воно зафіксувало 10% сукупний рівень поширеності BLV (4701 серопозитивна тварина з 34 954 тварин). BLV також був зареєстрований у деяких країнах Близького Сходу. У Єгипті BLV було зареєстровано серологічно у єгипетської молочної худоби у 15,83% та у 20,8%, 9% та 0% у великої рогатої худоби, буйволів та верблюдів відповідно.

Кілька європейських регіонів почали контролювати вірус на початку 1960-х років; у результаті Англія, Франція, Німеччина, Іспанія, Бельгія, Данія, Швеція, Швейцарія, Польща та багато інших офіційно вільні від BLV. Інші країни, такі як Італія та Португалія, повідомляють про великі BLV-негативні локалізації, і інфекція обмежена невеликими територіями. В Австралії вірус було знищено з молочних стад, але м'ясна худоба залишається інфікованою з дуже низькими рівнями поширеності. Понад 21 країна стверджує, що викорінила BLV, головним чином шляхом елімінації або відмежовування всієї великої рогатої худоби, яка показала позитивний результат тестів ELISA [6, 38, 39].

## РОЗДІЛ 2 ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1 Матеріали та методи досліджень

Робота виконувалась на базі імунологічного відділу Регіональної державної лабораторії Держпродспоживслужби в Полтавській області.

Об'єктами досліджень були тваринницькі господарства та поголів'я великої рогатою худоби, що досліджувались у Полтавській області. Було проведено збір даних лабораторних досліджень імунологічного відділу Регіональної державної лабораторії Держпродспоживслужби в Полтавській області за останні 7 років. Для отримання цих даних проводилась постановка серологічних реакцій (РІД), яка виявляє наявність антитіл до BLV у великої рогатої худоби, та – імуноферментного аналізу (ІФА).

Валідність постановки реакції залежить від відбору зразків та їх підготовки до дослідження. Для одержання коректних результатів дуже важливою складовою є якість сироваток крові. Чим вона вища, тим точніші результати реакцій.

Сироватку крові направляють в лабораторію на серологічний аналіз на наявність лейкозу. Правила відбору зразків затвердженні у наступних нормативних документах: «Рекомендації комісіям етики, які проводять медико-біологічні експертизи» (ВООЗ, 2000), наказ АМН України № 50 від 07.06.2001 "Про створення комісій медичної етики" в наукових установах Академії наук України" та "Загальні етичні принципи експериментів на тваринах" (I Національний конгрес з біоетики, Київ, 2001 р.). Відбір крові для серологічних досліджень:

- Проводити всі маніпуляції зі тваринами з дотриманням правил особистої гігієни та техніки безпеки;
- Необхідно запобігати надмірному стресу і випадковому травмуванню тварин, застосовуючи, за необхідності, механічні обмеження або

знеболуючі засоби відповідно до інструкцій щодо їх застосування;

- Під час маніпуляцій з біологічним матеріалом слід враховувати ризик наявності збудників зональних захворювань (усі лабораторні маніпуляції з потенційно інфікованими матеріалами необхідно проводити з дотриманням усіх правил роботи зі збудниками відповідного рівня). Патогенність та робота в лабораторії відповідного рівня біобезпеки).

- При відборі проб необхідно забезпечити необхідні заходи безпеки для запобігання їх контамінації та потрапляння біологічного матеріалу в навколишнє середовище (не допускати контакту біологічного матеріалу з комахами або іншими переносниками інфекцій).

- Забір крові та отримання зразків сироватки здійснюється наступним чином: кров для серологічних досліджень великої рогатої худоби беруть із яремної вени (*v. jugularis*), хвостової (*v. caudalis mediana*) або молочної вени. Рідше беруть кров з вен молочної залози через необхідність додаткової механічної фіксації і, як наслідок, надмірний стрес для тварин.

- Зразки сироватки крові досліджують після осідання еритроцитів. Відділення сироватки крові від еритроцитів проводять згідно з діючими правилами взяття проб.

- У коней, великої рогатої худоби, верблюдів, оленів, вівць і кіз кров беруть з яремної вени у верхній третині шиї в стерильні пробірки по 5—7 мл. Кров повинна вільно стікати по стінках пробірки. Не допускається потрапляння крові на підлогу, ґрунт. Голки перед взяттям крові стерилізують кип'ятінням.

- Волосяний покрив на місці проколу вистригають, шкіру дезінфікують спиртом або 3%-вим розчином карболової кислоти.

- Проби крові витримують протягом години при температурі 20 – 30°C для зсідання. Потім згусток крові відокремлюють від стінок пробірки металеву спицею (дротиком), яку пропалюють над полум'ям пальника при температурі 4 – 10°C. Через 18 – 24 години відстояну сироватку (2 – 3 мл)

переливають у сухі стерильні пробірки (краще Флоринського) і етикетують так само, як і пробірки з кров'ю. Далі матеріал направляють у лабораторію в свіжому або консервованому вигляді.

Пробірки з сироваткою закривають стерильними гумовими корками і ставлять у вертикальному положенні для пересилання (пробірки Флоринського — в одноіменних штативах).

1. Зразки сироваток досліджують після осадження еритроцитів (центрифугування). Відокремлення сироватки від еритроцитів здійснюють таким чином: пробірку із зразком крові поміщають у термостат на 30 – 60 хв при температурі 37 °С для швидкого формування фібринового згустку (фібриноген, який не перетворився у згусток, може стати джерелом хибно-позитивних реакцій);
2. обводять згусток від стінок пробірки / ллякоти і на 1 год поміщають в холодильник за температури +4...+8 °С;
3. центрифугують 10 хв при 2–3 тис. об/хв.

Слід дотримуватися наступних правил:

1. Досліджувати тільки свіжі сироватки крові, неякісні вибраковувати.
2. Якісна сироватка має солом'яно-жовтий або блідо-червонуватий колір. Вона не повинна мати вираженої перепліччяної (хільозу), бактеріемії. Не допускається постановка реакції з пробами, що містять згустки згустку – підвищена фонова реакція у окремих лунках планшета, а також з сироватками, до яких додано ацид натрію (інгібітор пероксидази) – знижена фонова реакція у окремих лунках планшета.
3. Легкий гемоліз не впливає на результати реакцій.
4. Сироватки повинні зберігатися за температури +2...+8°С протягом 3 – 5 діб або за –20°С протягом 1 року.
5. Після відтавання проби необхідно перемішати.

6. Не допускається повторне замороження – відтавання.

Сироватки крові можуть зберігатись за температури 4 – 8°C до 7 діб або за –20°C необмежений період часу (до відтавання). Після відтавання проби необхідно ретельно перемішати та дослідити впродовж 3 – 4 діб (протягом цього часу проби необхідно зберігати за температури 4 – 8°C).

У випадку дослідження пулів сироваток крові, зразки змішують в лабораторному приміщенні безпосередньо перед проведенням досліджень у рівних об'ємах. ВООЗ рекомендує проводити дослідження методом ІФА для виявлення специфічних антитіл проти збудників бруцельозу чи лейкозу в пулах, що нараховують до 10 зразків сироваток крові від ВРХ.

## 2.2 Постановка РІД

Матеріали:

- чашки Петрі діаметром 90 мм – згідно з чинним нормативним документом
- стандартний штамп-пробійник для утворення лунок в агарі – згідно з чинним нормативним документом
- автоматичні або пастерівські піпетки
- освітлювач пристрій
- волога камера з температурою (22-27) °C
- хлорид натрію
- вода дистильована
- набір застандартизованих сироваток крові специфічних до вірусу лейкозу
- комерційний набір для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в РІД, що містять антиген
  - специфічну сироватку та агаросольову суміш.

Для дослідження РІД використовують комерційний набір для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби, до складу якого входять:

- сухий (або рідкий стабілізований) специфічний антиген вірусу лейкозу великої рогатої худоби,
- розчинник антигену (для ліофілізованого антигену),
- контрольна специфічна преципітувальна сироватка крові до вірусу лейкозу великої рогатої худоби,
- сольова суміш агару.

Контролюють специфічну активність антигену вірусу лейкозу великої рогатої худоби згідно з національним стандартом щодо лейкозних сироваток, до складу якого входять:

- сироватка слабопозитивна до BLV ліофілізована;
- сироватка негативна до BLV ліофілізована.

Розчинений антиген зберігають за температури (2 - 8)°С не більше двох тижнів. Наважку сольова суміш агару переносять у колбу і додають дистильовану воду в об'ємі, вказаному в настанові щодо застосування набору, потім колбу поміщають на водяну баню або ставлять у мікрохвильову піч, де витримують до повного розплавлення гранул агару. Розплавлений агаровий гель, за температури (50-70) °С, розливають шаром (2-3) мм по (12-15) см у знежирені чашки Петрі й залишають їх напівнакритими за кімнатної температури протягом 1 год. Після застигання агару спеціальним штампом-пробійником роблять лунки в гелі, не допускаючи утворення тріщин між ними і відшаровування агару від дна чашки (Рис. А1, Рис. А2). У кожній чашці роблять по чотири фігури, кожна з яких складається з семи лунок: одна в центрі, інші по периферії. Діаметр кожної лунки становить 5,6 мм, відстань між центральною і периферичними лунками - 3 мм. Диски гелю, що утворилися, видаляють із лунок канюлею за допомогою вакуумного насоса за від'ємного тиску (0,4-0,6) атм.

Постановка реакції відбувається наступним чином: до лунок кожної фігури вносять пастерівськими чи автоматичними піпетками контрольні та досліджувальні зразки. Антиген вносять в центральну лунку та дві діаметрально протилежні заповнюють специфічною преципітувальною сироваткою крові, а зразки для дослідження у лунки, що по периферії. Матеріал дослідження та контролі не повинні витікати назовні лунки.

Коли внесли всі зразки, чашки Петрі закривають кришками і залишають інкубуватись у вологій камері при температурі (22 – 27) °С. Проводити облік результатів можна через 48 або 72 години (Рис. А3, Рис. А4). Результати переглядають на темному фоні, направляючи сфокусований промінь освітлювача на дно чашки під кутом (30 – 45)°С. На різних стадіях розвитку реакції, преципітація початково відбувається на обмеженій ділянці агарозної пластини, найближче від лунок антигену з антитілами. Внаслідок вступу в реакцію нових порцій реагентів лінія преципітації починає видовжуватись до осі, яка з'єднує центри лунок. При достатній концентрації реагентів лінія преципітації досягає сусіднього сектора агарозної пластини, у якій аналогічно утворюється смуга преципітації за участю іншої антигенної системи.

Зразок вважається позитивним, якщо він утворював криву преципітації, специфічну для вірусного антигену, і якщо ця крива утворювала лінію ідентичності з контрольною сироваткою. Зразок вважається негативним, якщо він не утворював специфічну лінію з антигеном і не згинав лінію контрольної сироватки. Ступінь позитивності визначали за наступними критеріями:

- 1) Слабкопозитивний – кінець (кінці) контрольної лінії (ліній) вигнутий у бік лунки з антигеном, але не утворював повної лінії між лункою для антигену та досліджуваної сироватки;
- 2) Проміжно позитивний – кінець (кінці) контрольної лінії (ліній) вигнутий у бік лунки з антигеном і утворив повну лінію між лункою для антигену та

досліджуваної сироватки. Ця лінія просто добре торкалася тестової сироватки або була розташована дуже близько до неї;

3) Сильно позитивний – кінець (кінці) контрольної лінії (ліній) вигнутий у бік лунки з антигеном і утворює повну лінію між лункою для антигену та тест-сироватки. Ця лінія була розташована на або приблизно посередині між лункою для антигену та досліджуваної сироватки. Лінія опадів була такою ж різкою та яскравою, як контрольна лінія;

4) Дуже сильно позитивний – кінець (кінці) контрольної лінії (ліній) вигнутий у бік лунки з антигеном і утворює повну лінію між лункою для антигену та тестовою сироваткою. Ця лінія була ближче до лунки з антигеном, ніж лунка для досліджуваної сироватки.

Реакції, які не були ні чітко негативними, ні явно позитивними, будуть оголошені сумнівними.

### **2.3. Постановка імуноферментного аналізу (ІФА)**

Для виявлення антитіл до вірусу лейкозу ВРХ відбувалось тестування сироватки крові ВРХ, використовуючи тест-систему ID Screen BLV Competition. Дослідження проводили згідно з інструкцією та звикористанням відповідного обладнання. ID Screen BLV Competition – конкурентний набір імуноферментний аналіз (ELISA, ІФА) для виявлення білку оболонки gP51 BLV великої рогатої худоби окремих зразків або пулів (пули складаються з 10 зразків) (Рис А5, Рис. А6).

Конкурентний ІФА перевіряє наявність антитіл, специфічних до антигенів, у тестовій сироватці. Цей тип ІФА використовує два специфічних антитіла: антитіло, кон'юговане з ферментом, та інше антитіло, присутнє в тестовій сироватці (якщо сироватка позитивна). Об'єднання двох антитіл у лунках дозволить конкурувати за зв'язування з антигенами. Наявність зміни кольору означає, що тест негативний, оскільки антитіло, кон'юговане з ферментом, зв'язувалося з антигенами (а не з антитілами тестової сироватки).

Відсутність кольору вказує на позитивний тест та наявність антитіл у тестовій сироватці. Переваги полягають у тому, що потрібно менше очищення зразка, він може вимірювати широкий спектр антигенів у даному зразку, його можна використовувати для малих антигенів, і він має низьку варіабельність.

Актуальним для діагностичних лабораторій є вибір тест-набору ІФА для серологічного дослідження на лейкоз ВРХ. Наразі, на ринку України присутня продукція кількох виробників таких тест наборів, зокрема IDEXX Laboratories (США), INDICAL SVANOVA (Швеція), VMRD (США), INGENASA (Іспанія), ID VET (Франція) — всі вони призначені для серологічного дослідження на лейкоз ВРХ і дозволяють виявити антитіла до збудника інфекції в сироватці крові тварин. Всі згадані тест-системи базуються на принципі зв'язування антигену та антитіла і використовують в якості антигену специфічний білок вірусу лейкозу gP51 (білок gP51 – глікопротеїн, який експресується на поверхні вірусу лейкозу ВРХ). Він є імуногенним, тобто здатний викликати імунну відповідь у тварин, інфікованих вірусом лейкозу, і появу в сироватці крові специфічних до нього антитіл. Тест-системи мають високу чутливість і специфічність (у межах 98–100%), відносно швидкі у постановці реакції, дозволяють досліджувати велику кількість зразків упродовж відносно короткого періоду часу. Кожна з вищеназваних тест-систем має певні специфічні особливості при постановці реакції, може бути вимоглива до обладнання, має різну тривалість часового діапазону постановки реакції, визначену протоколом виконання дослідження. Відповідно до отриманих даних, відносна чутливість тест-систем склала 100%, специфічність – 100%. Окрім того, слід відмітити зручність використання наборів: упаковка тест-системи компактна, набір укомплектований усіма необхідними для проведення аналізу компонентами. Планшет розбірний, що дозволяє відділити необхідну кількість лунок, розміщений у пакеті з зручною застібкою. Реагенти розлиті у ємкості зі кришечками різного забарвлення. Також забезпечена

можливість відстеження внесення реагентів та зразків на кожному етапі аналізу, що значно зменшує вірогідність помилки при виконання аналізу.

Необхідні реактиви для постановки ІФА:

- Набір діагностичної імуноферментної тест-системи
- Дистильована або деіонізована вода
- Розчин етилового спирту (70%)
- Гігроскопічна вата
- Фільтрувальний папір
- Одно/восьми каналні дозатори з перемінним об'ємом на 1-20 мкл, 50-300 мкл
- Накінечники 200 мкл та 500 мкл
- Мірні стакани/циліндри
- Ванночки для реагентів
- Термостат
- Холодильник
- Вошер на 96-лунковий планшет (не обов'язково) (Рис. 7)
- 96-луночний електрофотометр (імуноферментний аналізатор) з довжиною хвилі 450-620 нм;
- Лабораторний таймер
- Ємність для збирання твердих відходів
- Ємність для збиранні рідких відходів

Підготовка до постановки: треба підготувати робоче місце, де буде відбуватись постановка реакції ІФА, дістати набір з холодильної камери, окремі реагенти набору можуть кристалізуватися при зберіганні у холодильнику – це концентрат розчину для промивання, буфер для розведення кон'югату та, у меншій мірі, субстрат-хромоген. При цьому кристалізація може бути як з утворенням макро кристалів, які видно неозброєним оком, так і мікро. І навіть при утворенні мікрокристалів змінюються фізичні (зокрема

pH) та хімічні показники буферів, що значно впливає на їхню роботу. При внесенні охолоджених розчинів у лунки планшету змінюється експозиція інкубації, що особливо стосується тест-систем, які інкубуються при кімнатній температурі. Так, наприклад, при інкубації пляшки при 25°C впродовж 30 хв, реагенти будуть у пляшці нагріватися 10–15 хв і експозиція, в результаті, не буде витримана.

Також, під час нагрівання реагентів потрібно: витягнути ванночки для реагентів, ємність для зливання рідких відходів, підготувати ємність для знезаражування для ванночок, ємність для твердих відходів (у подальшому туди будуть скирдуватись наконечники), фільтраційний папір для осушування планшетів, захисні рукавички. Також, невід'ємною частинною є роздрукований бланк зі схемою 96-лункового планшету (Рис. Б1), на якому позначено два позитивних контролю, два негативних контролю та досліджувані зразки.

Коли вже реагенти нагріті та робоче місце підготовлене до роботи та постановки реакції можна її починати.

Далі буде викладений протокол постановки реакції. Зазначаю: температура інкубації, час інкубації, кількість інкубацій, внесенні реагенти, методи очищення планшету може відрізнитись, та залежить від набору.

Перший етап: внесення у планшет буферний розчин, використовуючи восьмиканальний автодозатор з змінними наконечниками, по 80 мкл у кожен лунку (Рис. Б2). Після одноканальним дозатором внести у лунки з буфером 20 мкл позитивних та негативних контрольних зразків, та досліджувальних зразків, не забуваючи змінювати наконечник після внесення кожного зразку (Рис. Б3, Рис. Б4, Рис. Б5). Аби правильно внести усі зразки – потрібно користуватись надрукованим бланком планшету і вносити зразки відповідно йому. Поставити планшет у термостат розігрітий до 21-25°C та інкубувати 45 хв (Рис. Б6). Скиньте брудні наконечники до відповідної ємності та замініть на нові.

Між першим та другим етапами доцільно виготовити розчин для промивання планшету (промиваючий розчин) та розчин кон'югату. Щоб приготувати розчин для промивання планшету потрібно відміряти потрібну кількість миючого розчину для миття та розвести дистильованою або деіонізованою водою у співвідношенні 1:20 (на один стріп потрібно взяти, наприклад, 1 мл розчину для промивання та 19 мл дистильовану або деіонізовану воду). Для отримання розчину кон'югату потрібно взяти кон'югат та розвести необхідну кількість буферним розчином 1:10 (на один стріп потрібно взяти, наприклад, 100 мкл концентрату кон'югату та 900 мкл буферного розчину). Розчин для промивання потрібно внести у вошер, та звімкнути його. Скиньте брудні наконечники до відповідної ємності та замініть на нові.

Другий етап: після кінця інкубації планшет потрібно витягти з термостата, та покласти на панель вошера, опісля вибрати оптимальний протокол (наприклад, внесення 300 мкл розчину для промивання та промити 3 рази). Якщо вошер не наявний у лабораторії, то можна промивати планшети вручну використовуючи 8-канальний дозатор з відповідними накінечниками. Опісля треба осушити планшети легкими вибиваючими рухами об фільтраційний папір. Внести розчин кон'югату по 100 мкл у кожен лунку і знов інкубувати у термостаті протягом 30 хв (Рис. Б7, Рис. Б8, Рис. Б9). Скиньте брудні наконечники до відповідної ємності та замініть на нові.

Третій етап: Промити ще раз планшет у вошері використовуючи відповідний протокол, після внести розчин ТМБ (який вже наявний у наборі) 100 мкл у кожен лунку та інкубувати у темному місці, інкубувати 15 хв (Рис. Б10, Рис. Б11). Скиньте брудні наконечники до відповідної ємності та замініть на нові.

Четвертий етап: дістати планшет і, не очищаючи лунки, внесіть 100 мкл СТОП-розчин для переривання реакції (Рис. Б12, Рис. Б13). Тепер можна

читати результати реакції (Рис. Б14). Скиньте брудні наконечники до відповідної ємності та замініть на нові.

Для читки реакції використовують апарат рідер, у нього вставляють планшет та читають реакцію при 450 нм

Він видає результат таблицею, схожу з бланком внесення проб (Рис. Б15)

Валідація результатів:

Результати теста вважаються достовірними, якщо: середнє значення оптичної щільності негативного контролю (ОЩ<sub>к-</sub>) більше 0,7:

$$\text{ОЩ}_{\text{к-}} > 0.7$$

Відношення між середніми значеннями ОД позитивного контролю (ОЩ<sub>к+</sub>) і негативного контролю (ОЩ<sub>к-</sub>) менше ніж 0,3:

$$\text{ОЩ}_{\text{к+}} / \text{ОЩ}_{\text{к-}} < 0.33$$

Інтерпретація результатів

Для кожного зразка розраховується значення S/N:

$$\frac{S}{N} \% = \frac{\text{ОЩ}_{\text{зразку}}}{\text{ОЩ}_{\text{к-}}} * 100\%$$

Для індивідуальних зразків сироватки крові, а також пулу з 10 зразків сироватки крові (нічній і денній інкубації):

| Значення S/N               | Імунний статус |
|----------------------------|----------------|
| $S/N \% \leq 50\%$         | Позитивний     |
| $50 \% < S/N \% \leq 60\%$ | Сумнівний      |
| $S/N \% \geq 60\%$         | Негативний     |

## 2.4 Місце виконання роботи та його характеристика

Ця робота була виконана на базі Регіональної державної лабораторії Держпродспоживслужби в Полтавській області знаходиться за адресою вул. Миру, 2, с. Горбанівка Полтавського району, Полтавської області.

Регіональна державна лабораторія Держпродспоживслужби в Полтавській області (далі - Лабораторія) є державною установою ветеринарної медицини, яка створена відповідно до Законів України "Про ветеринарну медицину", "Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів", підпорядковується Головному управлінню Держпродспоживслужби в Полтавській області (далі - Головне управління) та належить до сфери управління Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів (далі - Держпродспоживслужба) [40].

Лабораторія у своїй діяльності керується Конституцією України, законами України, актами Кабінету Міністрів України, Верховної Ради України, Президента України, наказами Міністерства аграрної політики та продовольства України, Держпродспоживслужби, Головного управління та цим Положенням і має бути акредитована національним органом України з акредитації та/або іноземним органом з акредитації, який є повним членом ІЛАС – міжнародної організації зі співробітництва в галузі акредитації лабораторій, відповідно до стандартів ISO/IEC 17025, ДСТУ ISO 17025 або інших стандартів, якими їх замінено.

Основними завданнями лабораторії є:

- Проведення лабораторних досліджень (випробувань) щодо діагностики хвороб тварин, безпечності та окремих показників харчових продуктів та інших об'єктів санітарних заходів, побічних продуктів тваринного походження, кормових добавок, преміксів, кормів, репродуктивного матеріалу, біологічних продуктів та продуктів біотехнології, ґрунту,

води питної та води для тварин, засобів захисту рослин, факторів середовища життєдіяльності людини, що мають шкідливий вплив на здоров'я населення, якості та незалежної експертизи товарів, якості насіння і садивного матеріалу, а також інших досліджень (випробувань) шляхом проведення повного комплексу досліджень;

- Профілактика і діагностика інфекційних, інвазійних та незаразних хвороб тварин;
- Забезпечення організації та проведення планових і непланових діагностичних досліджень;

Спектр випробувань лабораторії є відбір зразків, органолептичні, мікробіологічні, молекулярно-генетичні, імуноферментні, мікологічні, хіміко-токсикологічні, фізико-хімічні, радіологічні, паразитологічні, мікроскопічні випробування зразків харчової продукції, сировини тваринного, рослинного, біотехнологічного походження, кормів, води та біохімічні, паразитологічні, бактеріологічні, імунологічні, біологічні, вірусологічні, патологоанатомічні, гістологічні біологічного матеріалу на інфекційні хвороби тварин.

## 2.5 Результати досліджень

Завдання цієї роботи було дослідження стану лейкозу великої рогатої худоби на прикладі полтавської області та формування таблиць для аналізу статистики. Для отримання даних сироватку крові, яка надходила, досліджували методом ІФА або РІД. Подальші данні використовувались для провадження системи оздоровлення та профілактики лейкозу великої рогатої худоби у Полтавській області.

Таблиця 2.1

Результати досліджень у Полтавській області методом РІД за 2018

| Район | Всього досліджено проб | Позитивно реагуючі | Відсоток позитивно |
|-------|------------------------|--------------------|--------------------|
|-------|------------------------|--------------------|--------------------|

|                    |       |     | реагуючих проб (%) |
|--------------------|-------|-----|--------------------|
| Гадяцький          | 22093 | 431 | 1,95%              |
| Чорнухівський      | 2968  | 39  | 1,31%              |
| Глобинський        | 12410 | 96  | 0,77%              |
| Зіньківський       | 11784 | 22  | 0,19%              |
| Новосанжарський    | 3654  | 79  | 2,16%              |
| Диканський         | 4039  | 17  | 0,42%              |
| Великобагачанський | 10372 | 36  | 0,35%              |
| Гребінківський     | 3053  | 2   | 0,07%              |
| Лохвицький         | 7477  | 7   | 0,09%              |
| Всього             | 77850 | 729 | 0,94%              |

З отриманих даних можна спостерігати: найбільшим поголів'ям є гадяцьке, а також у ньому було виявлено найбільше число позитивно реагуючих голів – 413, а це складає 1,95% від загальної кількості досліджуваної худоби, а саме 22093. На противагу, гребінківське не є найменшим, але у ньому було виявлене найменша кількість позитивно реагуючих голів – 2 позитивні з 3053, що становить 0,07% від загальної кількості досліджуваної худоби.

Таблиця 2.2

Результати досліджень у Полтавській області методом РІД за 2019

| Район              | Всього досліджено проб | Позитивно реагуючі | Відсоток позитивно реагуючих проб (%) |
|--------------------|------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| Гадяцький          | 5779                   | 174                | 3,01%                                 |
| Чорнухівський      | 2104                   | 46                 | 2,19%                                 |
| Глобинський        | 2517                   | 61                 | 2,42%                                 |
| Зіньківський       | 3644                   | 15                 | 0,41%                                 |
| Новосанжарський    | 2742                   | 51                 | 1,86%                                 |
| Диканський         | 904                    | 8                  | 0,88%                                 |
| Великобагачанський | 1500                   | 42                 | 2,80%                                 |
| Гребінківський     | 605                    | 0                  | 0,00%                                 |
| Лохвицький         | 2190                   | 15                 | 0,68%                                 |
| Всього             | 21985                  | 412                | 1,87%                                 |

Найбільшим поголів'ям є гадяцьке, а також у ньому було виявлено найбільше число позитивно реагуючих голів – 174, а це складає 3,01% від загальної кількості досліджуваної худоби, а саме 5779. На противагу, у гребінківському районі було виявлене найменша кількість позитивно реагуючих голів – 0 позитивні з 605, що становить 0% від загальної кількості досліджуваної худоби.

Таблиця 2.3

Результати досліджень у Полтавській області методом РІД за 2020

| Район              | Всього досліджено проб | Позитивно реагуючі | Відсоток позитивно реагуючих проб (%) |
|--------------------|------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| Гадяцький          | 2790                   | 10                 | 0,36%                                 |
| Чорнухівський      | 1651                   | 48                 | 2,91%                                 |
| Глобинський        | 2318                   | 5                  | 0,22%                                 |
| Зіньківський       | 2008                   | 5                  | 0,25%                                 |
| Новосанжарський    | 1499                   | 18                 | 1,20%                                 |
| Диканський         | 650                    | 10                 | 1,54%                                 |
| Великобагачанський | 1207                   | 20                 | 1,66%                                 |
| Гребінківський     | 461                    | 0                  | 0,00%                                 |
| Лохвицький         | 2164                   | 4                  | 0,18%                                 |
| Всього             | 14748                  | 120                | 0,81%                                 |

У чорнухівському поголів'ї було виявлено найбільше число позитивно реагуючих голів – 48, а це складає 2,91% від загальної кількості досліджуваної худоби, а саме 1651. На противагу, у гребінківському районі було виявлене найменша кількість позитивно реагуючих голів – 0 позитивні з 461, що становить 0% від загальної кількості досліджуваної худоби.

Таблиця 2.4

Результати досліджень у Полтавській області методом РІД за 2021

| Район              | Всього досліджено проб | Позитивно реагуючі | Відсоток позитивно реагуючих проб (%) |
|--------------------|------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| Гадяцький          | 2224                   | 6                  | 0,27%                                 |
| Чорнухівський      | 968                    | 16                 | 1,65%                                 |
| Глобинський        | 1527                   | 21                 | 1,38%                                 |
| Зіньківський       | 1646                   | 4                  | 0,24%                                 |
| Новосанжарський    | 1000                   | 15                 | 1,50%                                 |
| Диканський         | 524                    | 0                  | 0,00%                                 |
| Великобагачанський | 881                    | 0                  | 0,00%                                 |
| Гребінківський     | 353                    | 0                  | 0,00%                                 |
| Лохвицький         | 1566                   | 0                  | 0,00%                                 |
| Всього             | 10689                  | 62                 | 0,58%                                 |

У глобинському поголів'ї було виявлено найбільше число позитивно реагуючих голів – 21 з 1527 досліджувальних, а це складає 1,38% від загальної кількості досліджуваної худоби. На противагу, у гребінківському, диканському, великобагачанському, лохвицькому районі було виявлене найменша кількість позитивно реагуючих голів, що становить 0.

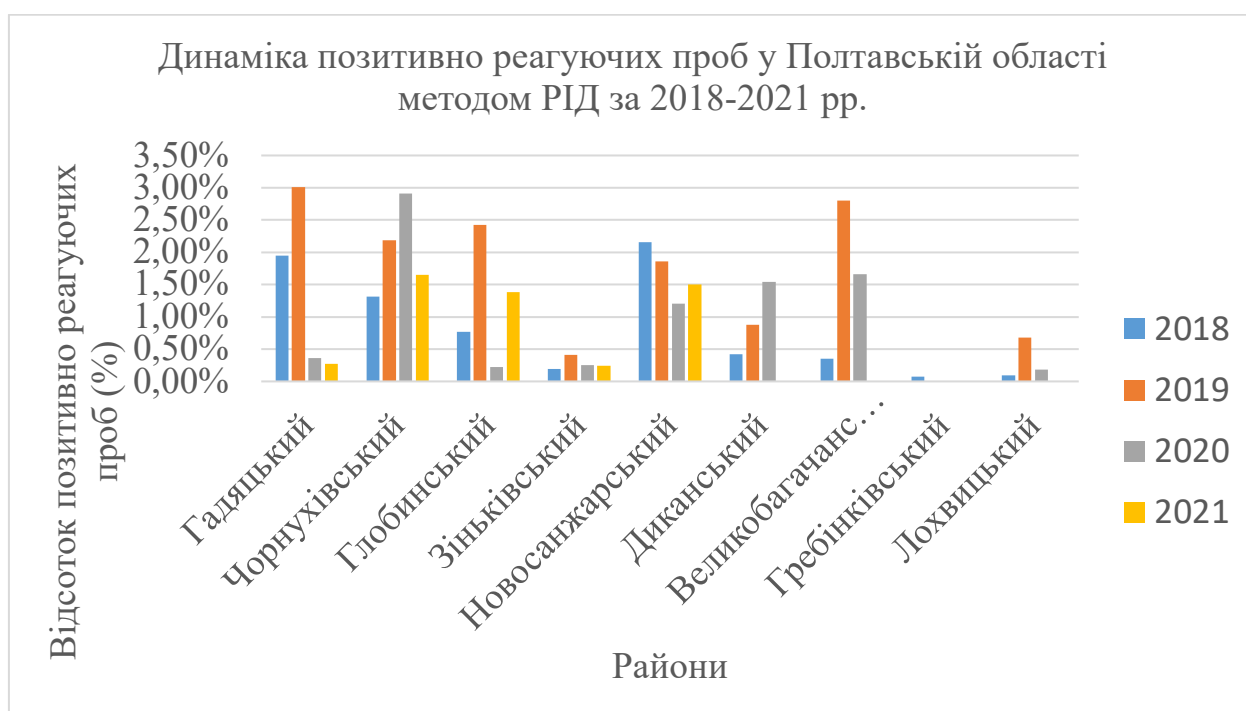


Рис. 2.1. Гістограма динаміки позитивно реагуючих проб у Полтавській області методом РІД за 2018-2021 рр.

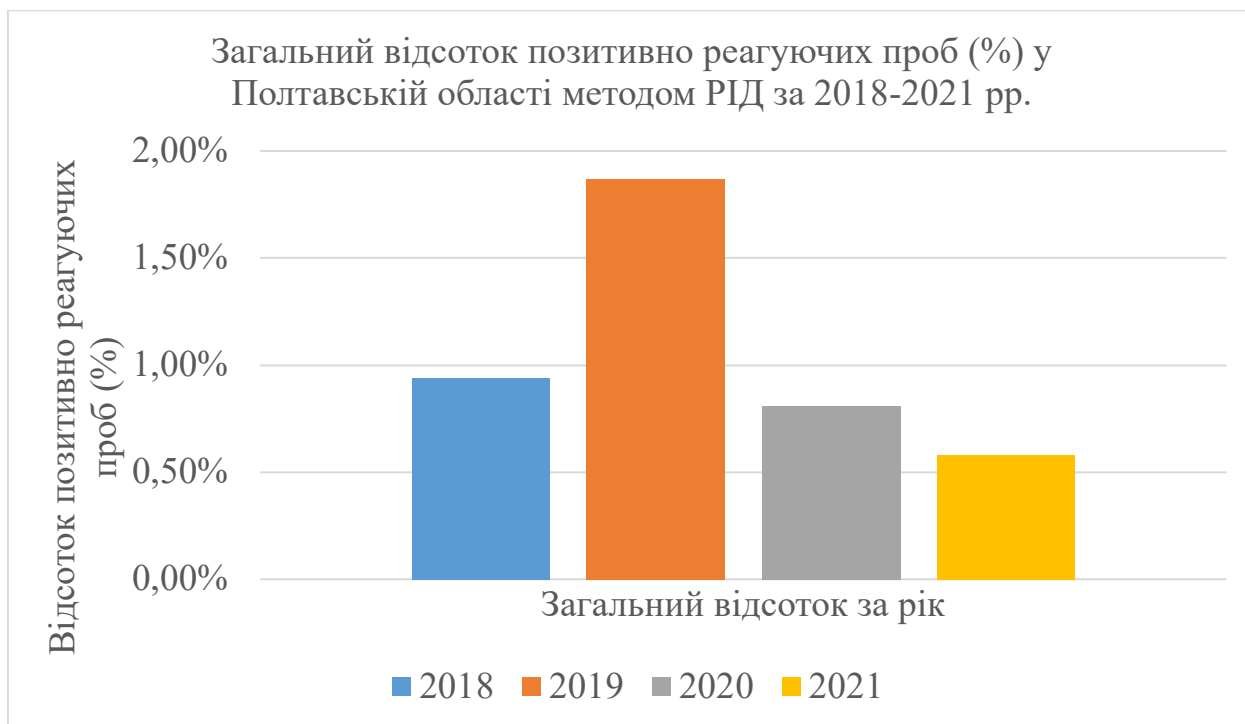


Рис 2.2. Гістограма загального відсотка позитивно реагуючих проб (%) у Полтавській області методом РІД за 2018-2021 рр.

Аналізуючи загальні данні, можна зробити такі висновки: у 2019 році відсоток позитивно реагуючих корів різко зріс, якщо порівнювати з 2018 роком, але вже у 2020 він зменшився на поливну. 2021 рік мав найменший відсоток позитивно реагуючих голів у порівнянні з попередніми представленими роками.

Наступна статистика буде відноситись до результат досліджень у Полтавській області методом ІФА. У наступних таблицях будуть включенні усі райони полтавської області.

Таблиця 2.5

Результати досліджень у Полтавській області методом ІФА за 2022

| Райони         | Всього досліджено проб | Позитивно реагуючі | Відсоток позитивно реагуючих проб (%) |
|----------------|------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| В.Багачанський | 4075                   | 0                  | 0,00%                                 |
| Гадяцький      | 5994                   | 0                  | 0,00%                                 |

|                  |       |     |       |
|------------------|-------|-----|-------|
| Глобинський      | 5480  | 42  | 0,77% |
| Гребінківський   | 2494  | 13  | 0,52% |
| Диканський       | 2736  | 0   | 0,00% |
| Зіньківський     | 5577  | 20  | 0,36% |
| Карлівський      | 2917  | 223 | 7,64% |
| Кобеляцький      | 1902  | 0   | 0,00% |
| Козельщинський   | 1207  | 0   | 0,00% |
| Котелевський     | 8859  | 0   | 0,00% |
| Кременчуцький    | 1325  | 0   | 0,00% |
| Лохвицький       | 2846  | 0   | 0,00% |
| Лубенський       | 2520  | 0   | 0,00% |
| Машівський       | 75    | 0   | 0,00% |
| Миргородський    | 4536  | 0   | 0,00% |
| Н.Санжарський    | 450   | 0   | 0,00% |
| Оржицький        | 8599  | 35  | 0,41% |
| Пирятинський     | 3379  | 0   | 0,00% |
| Полтавський      | 2891  | 0   | 0,00% |
| Решетилівський   | 911   | 3   | 0,33% |
| Семенівський     | 670   | 0   | 0,00% |
| Хорольський      | 10524 | 1   | 0,01% |
| Чорнухинський    | 2173  | 0   | 0,00% |
| Чутівський       | 500   | 0   | 0,00% |
| Шишацький        | 16655 | 3   | 0,02% |
| м.Кременчук      | 0     | 0   | 0,00% |
| м.Горішні Плавні | 215   | 0   | 0,00% |
| м. Миргород      | 0     | 0   | 0,00% |
| м. Полтава       | 0     | 0   | 0,00% |
| м. Лубни         | 0     | 0   | 0,00% |
| Всього           | 99510 | 340 | 0,34% |

Таблиця 2.6

Результати досліджень у Полтавській області методом ІФА за 2023

| Райони         | Всього досліджено проб | Позитивно реагуючі | Відсоток позитивно реагуючих проб (%) |
|----------------|------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| В.Багачанський | 4226                   | 0                  | 0,00%                                 |
| Гадяцький      | 5635                   | 3                  | 0,05%                                 |
| Глобинський    | 3215                   | 13                 | 0,40%                                 |
| Гребінківський | 2481                   | 21                 | 0,85%                                 |

|                  |       |     |       |
|------------------|-------|-----|-------|
| Диканський       | 2626  | 0   | 0,00% |
| Зіньківський     | 3592  | 3   | 0,08% |
| Карлівський      | 2604  | 0   | 0,00% |
| Кобеляцький      | 1950  | 0   | 0,00% |
| Козельщинський   | 1560  | 4   | 0,26% |
| Котелевський     | 3763  | 0   | 0,00% |
| Кременчуцький    | 1304  | 0   | 0,00% |
| Лохвицький       | 3693  | 20  | 0,54% |
| Лубенський       | 2496  | 0   | 0,00% |
| Машівський       | 90    | 0   | 0,00% |
| Миргородський    | 4703  | 2   | 0,04% |
| Н.Санжарський    | 700   | 0   | 0,00% |
| Оржицький        | 11342 | 38  | 0,34% |
| Пирятинський     | 2319  | 0   | 0,00% |
| Полтавський      | 3052  | 0   | 0,00% |
| Решетилівський   | 420   | 0   | 0,00% |
| Семенівський     | 330   | 0   | 0,00% |
| Хорольський      | 9557  | 0   | 0,00% |
| Чорнухинський    | 1874  | 0   | 0,00% |
| Чутівський       | 500   | 0   | 0,00% |
| Шишацький        | 13833 | 0   | 0,00% |
| м.Кременчук      | 0     | 0   | 0,00% |
| м.Горішні Плавні | 213   | 0   | 0,00% |
| м. Миргород      | 0     | 0   | 0,00% |
| м. Полтава       | 0     | 0   | 0,00% |
| м. Лубни         | 0     | 0   | 0,00% |
| Всього           | 88078 | 104 | 0,12% |

Таблиця 2.7

Результати досліджень у Полтавській області методом ІФА за 2024

| Райони       | Всього досліджено проб | Позитивно реагуючі | Відсоток позитивно реагуючих проб (%) |
|--------------|------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| Диканський   | 2211                   | 0                  | 0,00%                                 |
| Зіньківський | 6202                   | 8                  | 0,13%                                 |
| Карлівський  | 2452                   | 0                  | 0,00%                                 |
| Кобеляцький  | 1916                   | 0                  | 0,00%                                 |
| Котелевський | 8617                   | 0                  | 0,00%                                 |
| Машівський   | 90                     | 0                  | 0,00%                                 |

|                   |               |            |              |
|-------------------|---------------|------------|--------------|
| Н.Санжарський     | 774           | 0          | 0,00%        |
| Полтавський       | 3968          | 0          | 0,00%        |
| Решетилівський    | 780           | 0          | 0,00%        |
| Чутівський        | 512           | 0          | 0,00%        |
| м. Полтава        | 0             | 0          | 0,00%        |
| Глобинський       | 6733          | 5          | 0,07%        |
| Козельщинський    | 1999          | 2          | 0,10%        |
| Кременчуцький     | 2040          | 0          | 0,00%        |
| Семенівський      | 620           | 0          | 0,00%        |
| м. Горішні плавні | 221           | 0          | 0,00%        |
| Гребінківський    | 2675          | 80         | 2,99%        |
| Лубенський        | 3204          | 0          | 0,00%        |
| Оржицький         | 9915          | 2          | 0,02%        |
| Пирятинський      | 3823          | 0          | 0,00%        |
| Хорольський       | 11403         | 0          | 0,00%        |
| Чорнухинський     | 1855          | 0          | 0,00%        |
| В.Багачанський    | 9309          | 0          | 0,00%        |
| Гадяцький         | 5380          | 1          | 0,02%        |
| Лохвицький        | 3464          | 21         | 0,61%        |
| Шишацький         | 18230         | 0          | 0,00%        |
| Миргородський     | 6676          | 1          | 0,01%        |
| <b>Всього</b>     | <b>115069</b> | <b>120</b> | <b>0,10%</b> |

Уже аналізуючи результати досліджень з 2022 року можемо побачити, що відсоток загальної кількості інфікованих голів зменшується з кожним роком. Наприклад: у 2022 році карлівське поголів'я мало найбільше позитивних випадків – 223, а вже наступного року позитивних випадків не було виявлено. Глобинське поголів'я у 2022 мало 43 позитивно реагуючих голови, а на момент 2024 ця кількість скоротилась до 5. Якщо аналізувати загальний відсоток позитивних голів від всього досліджених проб, то спостерігаємо, що кількість позитивів з кожним роком зменшується, і в 2024 кількість позитивних голів становила 0,10% від загальної кількості досліджених проб. Навіть попри ці безперечно позитивні результати в оздоровленні худоби, у деяких поголів'ях ще наявний великий відсоток позитивно реагуючих голів, наприклад, гребінківське поголів'я. за минулий рік було виявлено 80 позитивів.

Результати досліджень у Полтавській області методом ІФА за 2025

Таблиця 2.8

| Райони            | Всього досліджено проб | Позитивно реагуючі | Відсоток позитивно реагуючих проб (%) |
|-------------------|------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| Диканський        | 2313                   | 3                  | 0,13%                                 |
| Зіньківський      | 46                     | 0                  | 0,00%                                 |
| Карлівський       | 2000                   | 0                  | 0,00%                                 |
| Кобеляцький       | 292                    | 11                 | 3,77%                                 |
| Котелевський      | 2082                   | 0                  | 0,00%                                 |
| Машівський        | 79                     | 0                  | 0,00%                                 |
| Н.Санжарський     | 1050                   | 17                 | 1,62%                                 |
| Полтавський       | 832                    | 4                  | 0,48%                                 |
| Решетилівський    | 729                    | 2                  | 0,27%                                 |
| Чутівський        | 822                    | 0                  | 0,00%                                 |
| м. Полтава        | 0                      | 0                  | 0,00%                                 |
| Глобинський       | 4270                   | 23                 | 0,54%                                 |
| Козельщинський    | 2175                   | 4                  | 0,18%                                 |
| Кременчуцький     | 220                    | 0                  | 0,00%                                 |
| Семенівський      | 1175                   | 24                 | 2,04%                                 |
| м. Горішні плавні | 0                      | 0                  | 0,00%                                 |
| Гребінківський    | 328                    | 0                  | 0,00%                                 |
| Лубенський        | 2816                   | 20                 | 0,71%                                 |
| Оржицький         | 4006                   | 57                 | 1,42%                                 |
| Пирятинський      | 388                    | 3                  | 0,77%                                 |
| Хорольський       | 4610                   | 1                  | 0,02%                                 |
| Чорнухинський     | 203                    | 30                 | 14,78%                                |
| В.Багачанський    | 1199                   | 18                 | 1,50%                                 |
| Гадяцький         | 2062                   | 0                  | 0,00%                                 |
| Лохвицький        | 743                    | 0                  | 0,00%                                 |
| Шишацький         | 579                    | 0                  | 0,00%                                 |
| Миргородський     | 2364                   | 1                  | 0,04%                                 |
| Всього            | 37383                  | 218                | 0,58%                                 |



Рис 2.3. Гістограма динаміки позитивно реагуючих проб у Полтавській області методом ІФА за 2022-2025 рр.



Рис 2.4. Гістограма динаміки позитивно реагуючих проб у Полтавській області методом ІФА за 2022-2025 рр.



Рис 2.5. Гістограма динаміки позитивно реагуючих проб у Полтавській області методом ІФА за 2022-2025 рр.



Рис 2.6. Гістограма загального відсотка позитивно реагуючих проб (%) у Полтавській області методом ІФА за 2022-2025 рр.

На даний момент 2025 відсоток позитивів від загальної кількості зразків – 0,058%, що є жахливими результатом, бо це свідчить про збільшення поширення лейкозу. Тому, очевидним висновком є – посилення заходів оздоровлення худоби та продовжувати подальші дії з оздоровлення поголів'я.

Аналізуючи поданні вище таблиці можна стверджувати: РІД є менш ефективним та точним методом діагностики лейкозу великої рогатої худоби, ніж ІФА. ІФА є більш чутливим, тому може виявити більше позитивно реагуючих голів. Як наслідок, процеси оздоровлення та профілактики лейкозу відбуваються швидше та ефективніше.

Також, можна зробити висновок позитивної кореляції досліджуваних проб та відсотку позитивно реагуючих проб. З кожним роком відсоток стає меншим, і на даний момент 2024 року складає всього 0,10%. Відсоток позитивно реагуючих проб у 2022 році складав 0,34%, за 3 роки відсоток позитивних корів скоротився на 0,24%. Такі результати можуть свідчити: ІФА є ефективною системою для діагностики лейкозу ВРХ та процеси оздоровлення та профілактики лейкозу ефективно працюють.

Але незважаючи на ці результати, на даний момент лейкоз ВРХ залишається розповсюдженою хворобою, з якої не можна переставати боротись.

### РОЗДІЛ 3 ЕКОНОМІЧНІ НАСЛІДКИ ВЛВ ДЛЯ МОЛОЧНОГО ТА М'ЯСНОГО ГОСПОДАРСТВА

Економічні збитки визначались різними дослідниками за різними методиками протягом тривалого часу. Не всі вони відображали дійсну картину повних економічних збитків, спричинюваних лейкозом. Однак, найбільшу загрозу і небезпеку дане захворювання становить для племінних господарств, де економічні збитки за його виникнення є значними.

Економічна ефективність заходів з боротьби з лейкозом великої рогатої худоби складається з витрат на відшкодування економічних збитків і прибутку від продажу племінної худоби, а також різниці у реалізації молока від інфікованих вірусом лейкозу тварин і неінфікованих, якщо така є. Розміри економічних збитків, які спричинює лейкоз великої рогатої худоби, за повідомленням, важко піддаються визначенню. Вони складаються із недоодержання продукції та приплоду, втрат від зниження якості продукції, передчасного вибракування та вимушеного забою тварин, загибелі, утилізації лейкозних туш, втрати племінної цінності тощо [25].

Ця хвороба завдає величезних економічних збитків у всьому світі як через прямі, так і через непрямі витрати: безпосередньо через зниження виробництва молока, хвороба має надзвичайний вплив на репродукцію, і деяких корів доводиться передчасно забирати; та опосередковано через обмеження імпорту тварин із районів, заражених вірусом лейшманіозу комірчастого лімфатизму (ВЛВ). З цих причин Всесвітня організація охорони здоров'я тварин (МЕБ) внесла ВЛВ до списку хвороб, які можуть мати значний вплив на міжнародну торгівлю. Наприклад, ВЛВ вражає понад 40% поголів'я великої рогатої худоби у Сполучених Штатах, а щорічні економічні втрати оцінюються в 525 мільйонів доларів США лише через втрату молока. [38].

Якщо розраховувати економічну втрату в Україні на одну корову, яка є молочною породою можна отримати наступні розрахунки:

Розрахунки стосуються молочної породи корів:

Середня вартість корови молочної породи середньої вгодованості 32000 грн., віднімаємо 25% її вартості, та отримуємо 24000 грн. за один день корова у середньому дає 30 л молока, ціна закупівлі молока (закупівельні ціни на молоко незбиране II гатунку) 9,87 грн/л. середньо статистичний надій корови за рік становить 10000 л. Середньо статистичний (чистий) заробіток з корови за рік становить 98700 грн, з витратами заробіток за один рік 71200 грн, витрати на один рік на одну корову становлять 27500 грн. Збитки з хворої корови будуть становити  $98700 \text{ грн} + 27500 \text{ грн} + 24000 \text{ грн} = 150200 \text{ грн}$ .



Рис 3.1. Гістограма збитків, яких зазнає господарство/фермер, коли втрачається корова, від загальної суми (150200 грн) втрати.

Щоб відбити ці збитки можна здати корову на забій. корови середньої вгодованості ціна на м'ясо 48,9 грн/кг. Вага корови середньої вгодованості 510 кг. М'ясна продуктивність від молочних порід 47,50%. М'ясо отримане від забою корови молочної породи 267,75 кг. Прибуток від забитої корови 13093 грн.

Тому загальні збитки, з урахування продажу м'яса, становлять 150200 грн - 13093 грн = 137107 грн. Якщо розрахувати можливий заробіток за п'ять років надою корови, які втратили, бо корова виявилась інфікованою, то сума буде становити 71200 грн \* 5 років = 356000 грн.

## ВИСНОВОК

### 1. Актуальність

дипломної роботи полягає у аналізі хвороби лейкозу великої рогатої хвороби та вірусу BLV. Ця проблематика все ще залишається болючим питанням для світового масштабу, бо кожен рік фермери та господарства зазнають збитки у розмірі мільярдів доларів.

2. За результатами досліджень представлено опис основних патогенетичних механізмів інфекції BLV, які включають стійку та хронічну інфекцію, яка вражає переважно популяцію В-лімфоцитів. Велика рогата худоба розвиває серологічну відповідь на капсид і білки оболонки через 2-8 тижнів після інокуляції. Серед цих тварин у половини розвивається стійкий лімфоцитоз, що відповідає стабільному збільшенню кількості циркулюючих лімфоцитів. Остаточним і рідкісним проявом інфекції BLV є поява мультицентричної лімфосаркоми, яка виникає через 1-8 років після інфікування приблизно у 1-5% тварин. У 2/3 тварин з пухлинами був стійкий лімфоцитоз. Пухлини можуть вражати один або декілька поверхневих і/або глибоких лімфовузлів.

3. Поширеність лейкозу ВРХ, як правило, вища серед молочної худоби, при цьому США, Японія, Канада, Бразилія, Китай та Аргентина повідомляють, що більшість стад інфіковані. Кілька європейських регіонів почали контролювати вірус на початку 1960-х років; у результаті понад 21 країна стверджує, що викорінила BLV. Основні шляхи передачі BLV є горизонтальними, які включають (1) ятрогенну передачу, таку як повторне використання медичних пристроїв, заражених BLV, (2) передача через прямий контакт із зараженою худобою та її виділеннями, такими як слизові оболонки, або випадкове проковтування слини, сперми, сечі, калу та молока, (3) передача через укуси комарів.

4. Проведено аналіз сучасних методів профілактики та оздоровлення поголів'я ВРХ, з урахуванням світового досвіду боротьби з BLV, встановлено, що

найбільш ефективними є методика “тестування та елімінація” й “виявлення та відмежування”. “Тестування та елімінація” один з перших методів, який був введений у боротьбі проти лейкозу великої рогатої худоби. Цей підхід вимагає ідентифікації BLV-позитивних тварин, негайного видалення позитивних випадків із стада та, нарешті, негайного забою. Методика “виявлення та відмежування” полягає у стадо тестують на вірус лейкозу, і позитивних корів відмежовують від здорових.

5. Вивчено основні діагностичні методи (РІД, ІФА, ПЛР) для виявлення інфікованих тварин. Реакція імунодифузії (РІД) – серологічний метод діагностики лейкозу ВРХ, що базується на виявленні в сироватці крові тварин антитіл до одного із двох структурних білків BLV (gp24 та p51). Імуноферментний аналіз (ELISA) — це імунологічний метод, який використовується для виявлення та вимірювання антитіл або антигенів у біологічних зразках, таких як кров, плазма, сеча або інші рідини тіла. Молекулярно-генетичний – полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Суть її полягає у виділенні в досліджуваній пробі провірусної ДНК і наступна ампліфікація специфічної ділянки ДНК вірусу лейкозу великої рогатої худоби з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів і синтезу комплементарних ланцюгів ДНК за допомогою ферменту Taq-полімерази.

6. Були освоєні методики постановки РІД та ІФА, а також освоєні методи проб підготовки

7. Досліджено динаміку розповсюдження лейкозу великої рогатої худоби в Полтавській області за останні 7 років. Встановлено: у 2018 році найбільше поголів'я та кількість позитивно реагуючих тварин було в Гадяцькому районі – 413 з 22093 (1,95%). Найменше – у Гребінківському: 2 з 3053 (0,07%). У 2019 році Гадяцький район знову лідирує – 174 з 5779 (3,01%), тоді як у Гребінківському не виявлено жодного позитивного випадку (0 з 605, 0%). У 2020 році найбільша кількість позитивних результатів була в Чорнухівському районі – 48 з 1651 (2,91%), найменше – знову ж таки в Гребінківському (0 з

461, 0%). У 2021 році найбільше позитивних випадків було у Глобинському районі — 21 з 1527 (1,38%), найменше — у Гребінківському, Диканському, Великобагачанському та Лохвицькому районах (0%).

8. Аналізуючи отриманні таблиці та гістограми, ми можемо зробити наступні висновки: у загальному аналізуючи отриманні гістограми можна зробити такі висновки: аналізуючи статистику стосовну РІД можна зробити наступні висновки: у 2019 було підвищення відсотку позитивно реагуючих голів, але воно у наступному році зменшилось на половину і після цього не підвищувалось. Аналізуючи наявну статистику стосовно ІФА спостерігається повільне зменшення відсотку позитивно реагуючих корів, але у 2025 році відбулось велике збільшення відсотку позитивно реагуючих голів.

9. Проведено економічний розрахунок збитків, які спричинено лейкозом великої рогатої худоби. Встановлено, що збитки з хворої корови будуть становити 98700 грн (маржовий дохід) + 27500 грн (витрати на утримування корови) + 24000 грн (вартість корови) = 150200 грн. З урахування продажу м'яса, становлять 150200 грн - 13093 грн = 137107 грн.

## ДЖЕРЕЛА

### ВИКОРИСТАНІ ДЖЕРЕЛА

1. Sabrina M. Rodríguez et al. / Preventive and Therapeutic Strategies for Bovine Leukemia Virus: Lessons for HTLV / *Viruses*. 2011. С. 1210–1248.
2. Korniienko L. Y., et al. Retrospective analysis of the epizootic situation of enzootic bovine leukosis in Ukraine in 1994–2019. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2020. С. 372–377.
3. Каришева А.Ф. Лейкоз. *Спеціальна епізоотологія* / Каришева А.Ф. Київ : "Вища освіта", 2002. С. 132–142.
4. Holden C. Hutchinson, et al. Diagnostic Measures of Disease Progression in Cattle Following Natural Infection with Bovine Leukemia Virus. *Pathogens*. 2021. С. 1–15.
5. Lawson J.S., et al. Oncogenic Viruses and Breast Cancer: Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV), Bovine Leukemia Virus (BLV), Human Papilloma Virus (HPV), and Epstein–Barr Virus (EBV). *Front. Oncol.* 2018. С. 1–18.
6. Guanxin Lv, et al. The Global Epidemiology of Bovine Leukemia Virus: Current Trends and Future Implications. *Animals*. 2024. С. 1–27.
7. Н. В. Беседа. Методи серологічної діагностики лейкозу ВРХ (Огляд літератури). *ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА*. 2016. С. 62–64.
8. I. Schwartz, D. Lévy. Pathobiology of bovine leukemia virus. *Vet Res*. 1994. С. 523.
9. Visualizing bovine leukemia virus (BLV)-infected cells and measuring BLV proviral loads in the milk of BLV seropositive dams / Sonoko Watanuki та ін. *Veterinary Research*. 2019. С. 1–12.
10. The role of neighboring infected cattle in bovine leukemia virus transmission risk / Sota Kobayashi та ін. *NOTE Virology*. 2015. С. 1–3.
11. Takeshi Haga. Enzootic Bovine Leukosis: how to prevent the disease and control the spread of BLV infection. *Atlantis Press*. 2018. С. 13–14.
12. Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukaemia virus / Hirohisa Mekata та ін. *Paper*. 2014. С. 1–4.

13. Junko Kohara, et al. Vector control efficacy of fly nets on preventing bovine leukemia virus transmission. *NOTE Virology*. 2018. C. 1–4.
14. Abdelfattah Selim, Abdel-Fattah Ali. Seroprevalence and risk factors for *C. Burentii* infection in camels in Egypt. *ELSEVIER*. 2020. C. 1–4.
15. Hirohisa Mekata, Mari Yamamoto, Takumi Hayashi. Cattle with a low bovine leukemia virus proviral load are rarely an infectious source. *Japanese Journal of Veterinary Research*. 2018. C. 3–9.
16. Misako Konishi, et al. The effectiveness of colostral antibodies for preventing bovine leukemia virus (BLV) infection in vitro. *BMC Veterinary Research*. 2018. C. 1–8.
17. Visualizing bovine leukemia virus (BLV)-infected cells and measuring BLV proviral loads in the milk of BLV seropositive dams / Sonoko Watanuki та ін. *Veterinary Research*. 2019. C. 1–12.
18. Herd-level determinants of bovine leukaemia virus prevalence in dairy farms / Ronald J Erskine та ін. *Journal of Dairy Research*. 2012. C. 1–6.
19. Breeding bulls as a potential source of bovine leukemia virus transmission in beef herds / Oscar J. Benitez та ін. *JAVMA*. 2019. C. 1–5.
20. John M Coffin, Stephen H Hughes, Harold E Varmus. The Place of Retroviruses in Biology. *Retroviruses* / John M Coffin, Stephen H Hughes, Harold E Varmus. New-York : Cold Spring Harbor, 1997. C. 23–26.
21. Mohamed Tharwat, Mohamed Marzok, Abdulrahman A Alkheraif. Bovine Leukosis: Classification, Clinical Findings, Clinical Pathology, Diagnosis, Necropsy and Control Measures. *International Journal of Agriculture and Biosciences*. 2024. C. 553–559.
22. Jialu Zheng, Yutong Wei, Guan-Zhu Han. The diversity and evolution of retroviruses: Perspectives from viral “fossils”. *Virologica Sinica*. 2022. C. 11–18.
23. Agar gel immunodiffusion test for the detection of bovine leukemia virus antibodies: lack of trans-Atlantic standardization / Carole Simard та ін. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 2000. C. 1–5.

24. В. М. Іванченко, П. І. Сидоричук, та ін. Імунологічні методи досліджень у лабораторіях ветеринарної медицини // Методичні рекомендації для лікарів – імунологів лабораторії ветеринарної медицини. Біла Церква : Білоцерківський державний аграрний університет, 1997. 9–11 с.
25. Лейкоз великої рогатої худоби / О. Б. Домбровський та ін. Біла Церква : ББК, 2003. 53–66 с.
26. Thomas O. Kohl, Carl A. Ascoli. Immunometric Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Cold Spring Harbor Laboratory Press. Protocols*. 05.06.2017. URL: <https://cshprotocols.cshlp.org/>.
27. Thomas A. Waldmann. Monoclonal Antibodies in Diagnosis and Therapy. *Science*. 1991. С. 1667–1669.
28. María Sofía Castelli, Paul McGonigle, Pamela J. Hornby. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Pharmacology Research & Perspectives*. 2019. С. 1–3.
29. Wayne M. Yokoyama, et al. Production of Monoclonal Antibodies. *Current Protocols in Immunology*. 2013. С. 23–28.
30. Jonathan D. Kaunitz. Development of Monoclonal Antibodies: The Dawn of mAb Rule. *Springer Science+Business Media*. 2017. С. 1.
31. Using PCR for early diagnosis of bovine leukemia virus infection in some native cattle / M.R. Mohammadabadi та ін. *Genetic and Molecular Research*. 2011. С. 2658–2661.
32. V. J. Ruggiero, B. Norby, et al. Controlling bovine leukemia virus in dairy herds by identifying and removing cows with the highest proviral load and lymphocyte counts. *J. Dairy Sci*. 2019. С. 9169–9173.
33. Sulav Shrestha, Karin Orsel, et al. Removing bovine leukemia virus–infected animals with high proviral load leads to lower within-herd prevalence and new case reduction. *J. Dairy Sci.*. 2023. С. 6015–6021.
34. Kevin D. Pelz. ECONOMICS OF BOVINE LEUKEMIA VIRUS INFECTION. *FOOD ANIMAL RETROVIRUS*. 1997. С. 7.

35. S. Nakada, Y. Fujimoto, et al. Economic losses associated with mastitis due to bovine leukemia virus infection. *J. Dairy Sci.*. 2023. С. 582–586.
36. Guillermo Sua´rez Archilla, et al. A safe and effective vaccine against bovine leukemia virus. *the journal Frontiers in Immunology*. 2022. С. 1–8.
37. Про затвердження Інструкції з профілактики та оздоровлення великої рогатої худоби від лейкозу : Наказ // ДЕРЖАВНИЙ КОМІТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ УКРАЇНИ від 21.12.2007, № 21 : станом на 21.01.2008. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0012-08#Text> . 2007. 21 груд.
38. Marawan A. Marawan, et al. Bovine Leukaemia Virus: Current Epidemiological Circumstance and Future Prospective. *Viruses*. 2021. С. 1–15.
39. Paul C. Bartlett, et al. Current Developments in the Epidemiology and Control of Enzootic Bovine Leukosis as Caused by Bovine Leukemia Virus. *Pathogens*. 2019. С. 1–8.
40. ПОЛОЖЕННЯ ПРО РЕГІОНАЛЬНУ ДЕРЖАВНУ ЛАБОРАТОРІЮ ДЕРЖПРОДСПОЖИВСЛУЖБИ В ПОЛТАВСЬКІЙ ОБЛАСТІ : Наказ // ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ від 09.06.2023, № 405 : станом на 09.06.2023.

## ДОДАТКИ

### Додаток А

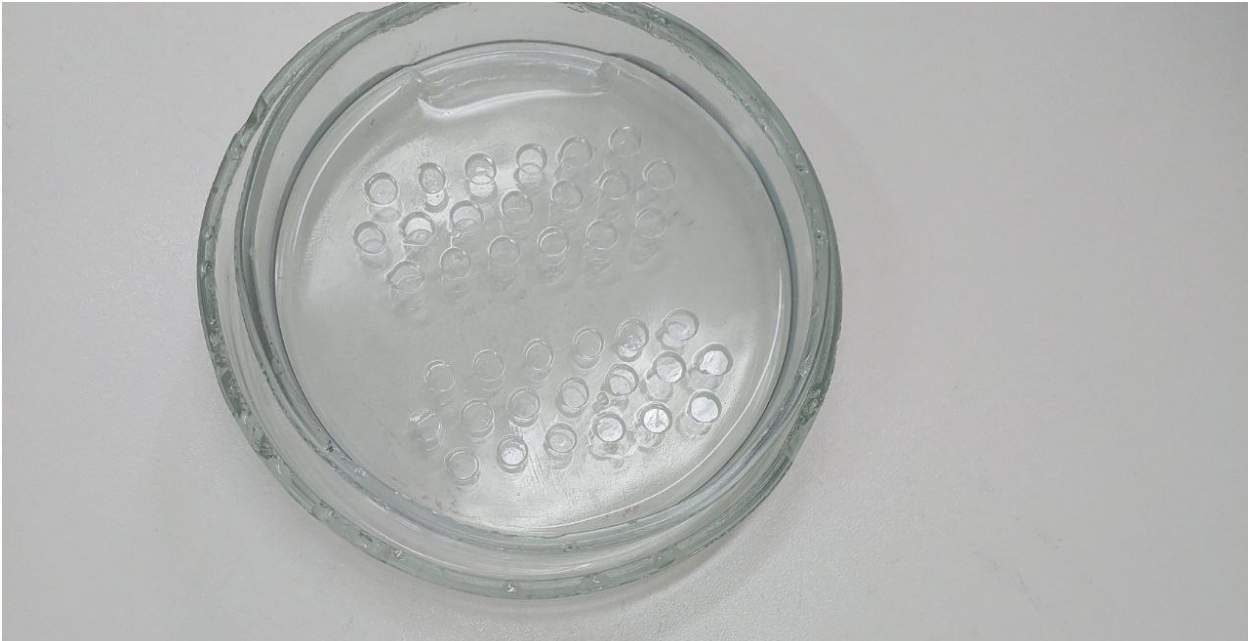


Рис. А1. Чашка Петрі у якої вирізали лунки та видалили агар.

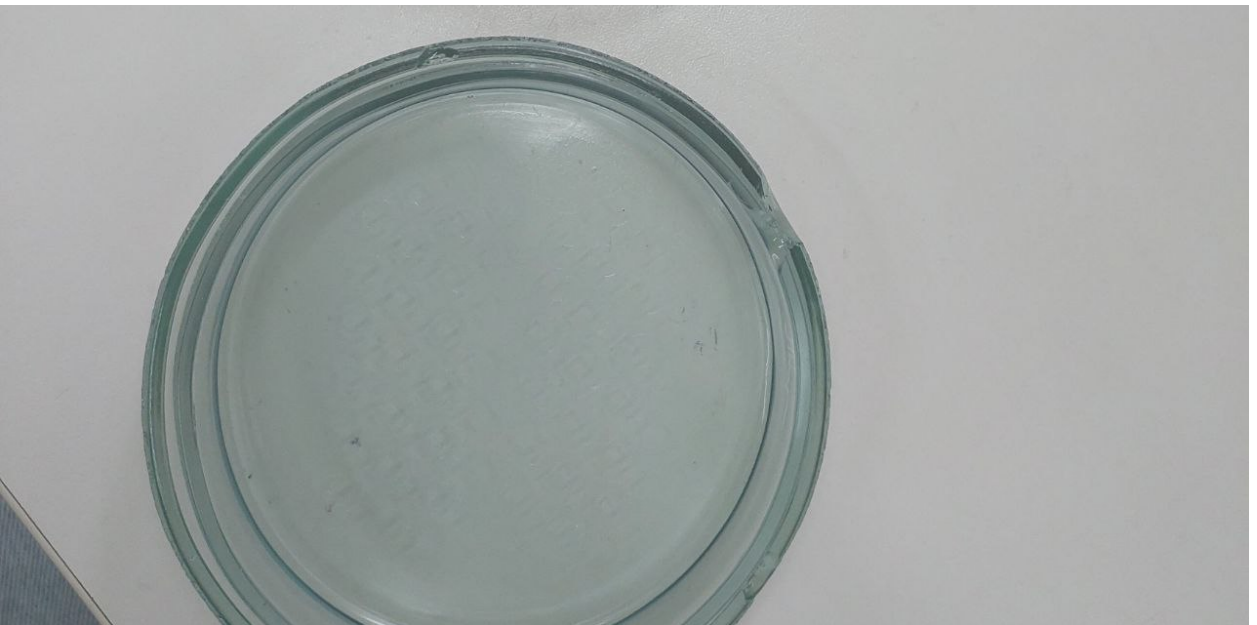


Рис. А2. Чашка Петрі у якої вирізали лунки, але не видалили агар.

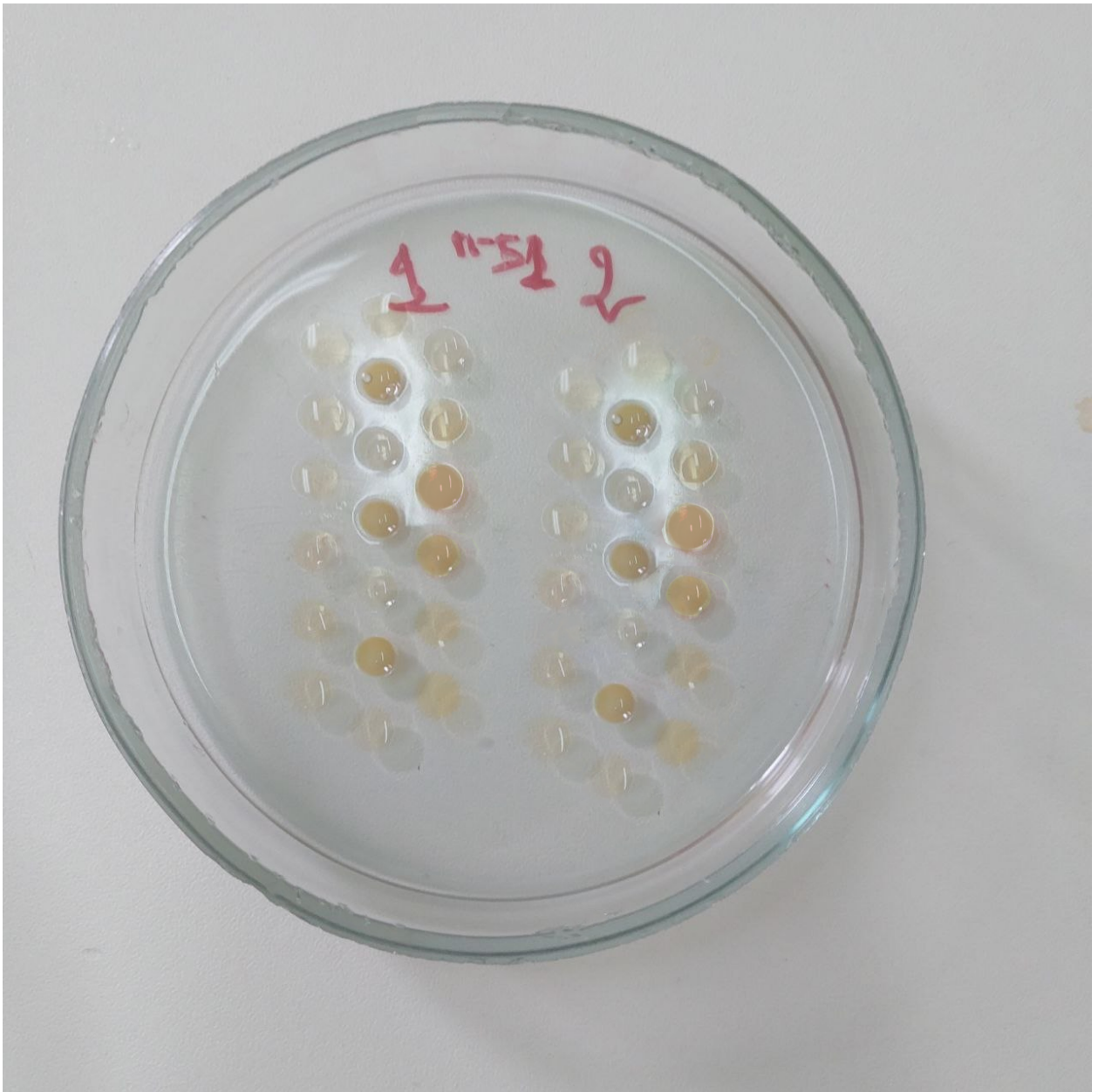


Рис. А3. Вигляд реакції, яка ставиться у чашці Петрі.

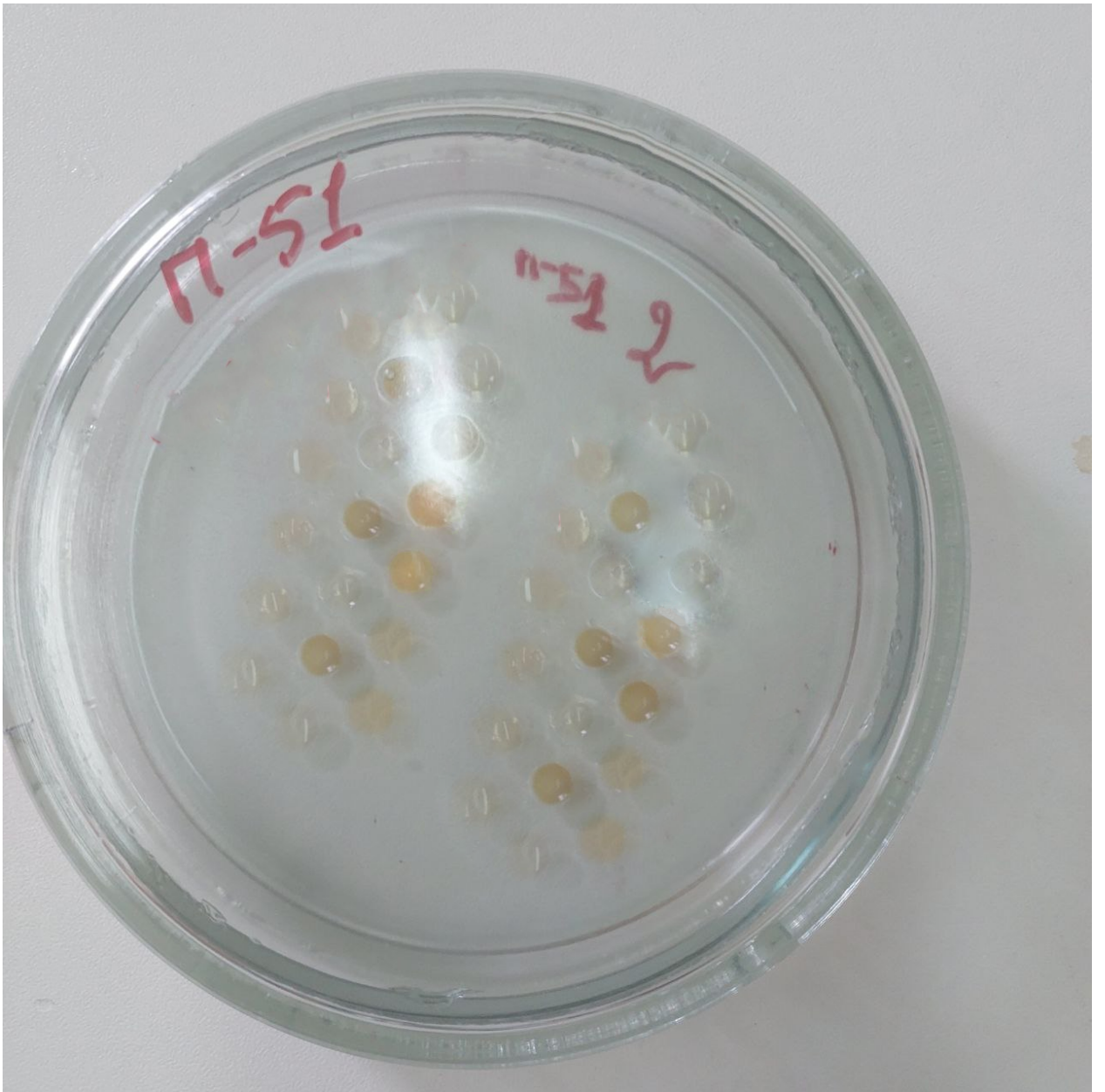


Рис. А4. Вигляд реакції, яка ставиться у чашці Петрі, чашка накрита.



Рис. А5. Набір тест-системи ІФА, запечатаний

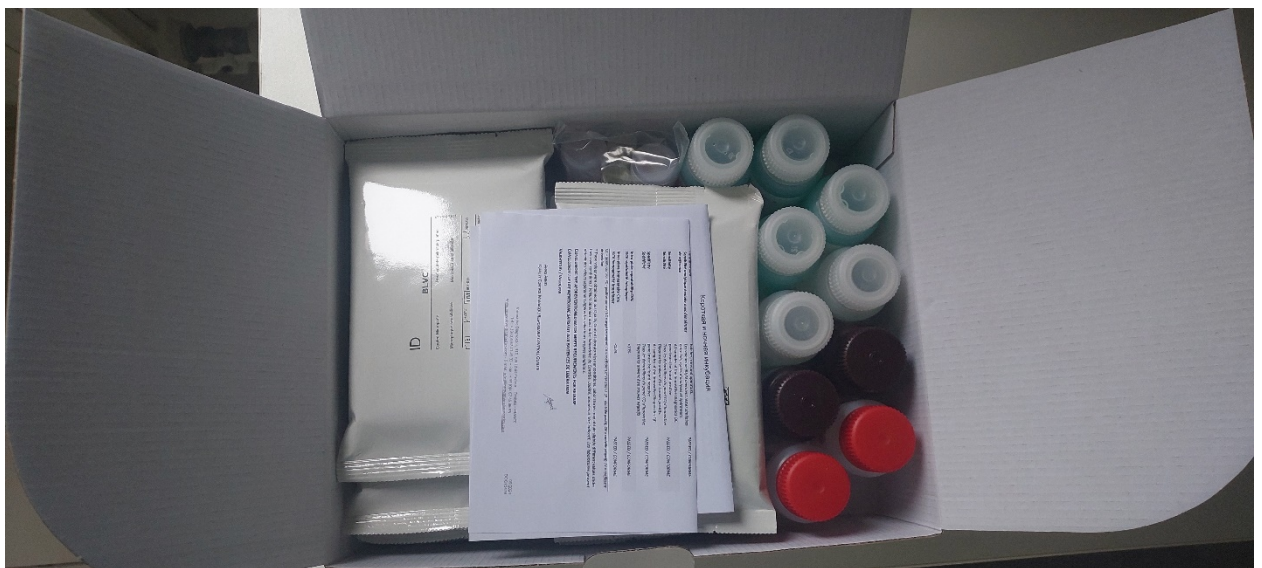


Рис. А6. Набір тест-системи ІФА, розпечатаний



Рис. А7. Вошер (зліва) та рідер (справа)

## Додаток Б

РДЛДНСС в Полтавській області

РОЗПОДІЛ ЗРАЗКІВ НА РОБОЧІЙ ПЛАНШІ

Види: Імунологічний


Дата: 13.05.25

Показник: Лейкоз ВРХ

Ідентифікаційний № №: 001301,

Виконавець: \_\_\_\_\_  
(П.І.Б. П'явас)

|   | 1                    | 2  | 3  | 4 | 5  | 6  | 7  | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|----------------------|----|----|---|----|----|----|---|---|----|----|----|
| A | P                    | 5  | 13 | / | 9  | 17 | 25 |   |   |    |    |    |
| B | P                    | 6  | 14 | 2 | 10 | 18 | 26 |   |   |    |    |    |
| C | N                    | 7  | 15 | 3 | 11 | 19 | 27 |   |   |    |    |    |
| D | N                    | 8  | 16 | 4 | 12 | 20 | 28 |   |   |    |    |    |
| E | <del>1301/1301</del> | 9  | 17 | 5 | 13 | 21 | 29 |   |   |    |    |    |
| F | 2                    | 10 | 18 | 6 | 14 | 22 | 30 |   |   |    |    |    |
| G | 3                    | 11 | 19 | 7 | 15 | 23 | 31 |   |   |    |    |    |
| H | 4                    | 12 | 20 | 8 | 16 | 24 | 32 |   |   |    |    |    |



Регіональна державна лабораторія Держпродспоживслужби в Полтавській області  
СИСТЕМА МЕНЕДЖМЕНТУ  
Ф-11-08 (Редакція 01)

Сторінка  
1 з 1

**Рис Б1. Роздрукований бланк зі схемою 96-лункового планшету**



Рис. Б2. Внесення буферу у планшет.



Рис. Б3. Внесения позитивного контролю.



Рис. Б4. Внесения негативного контролю.

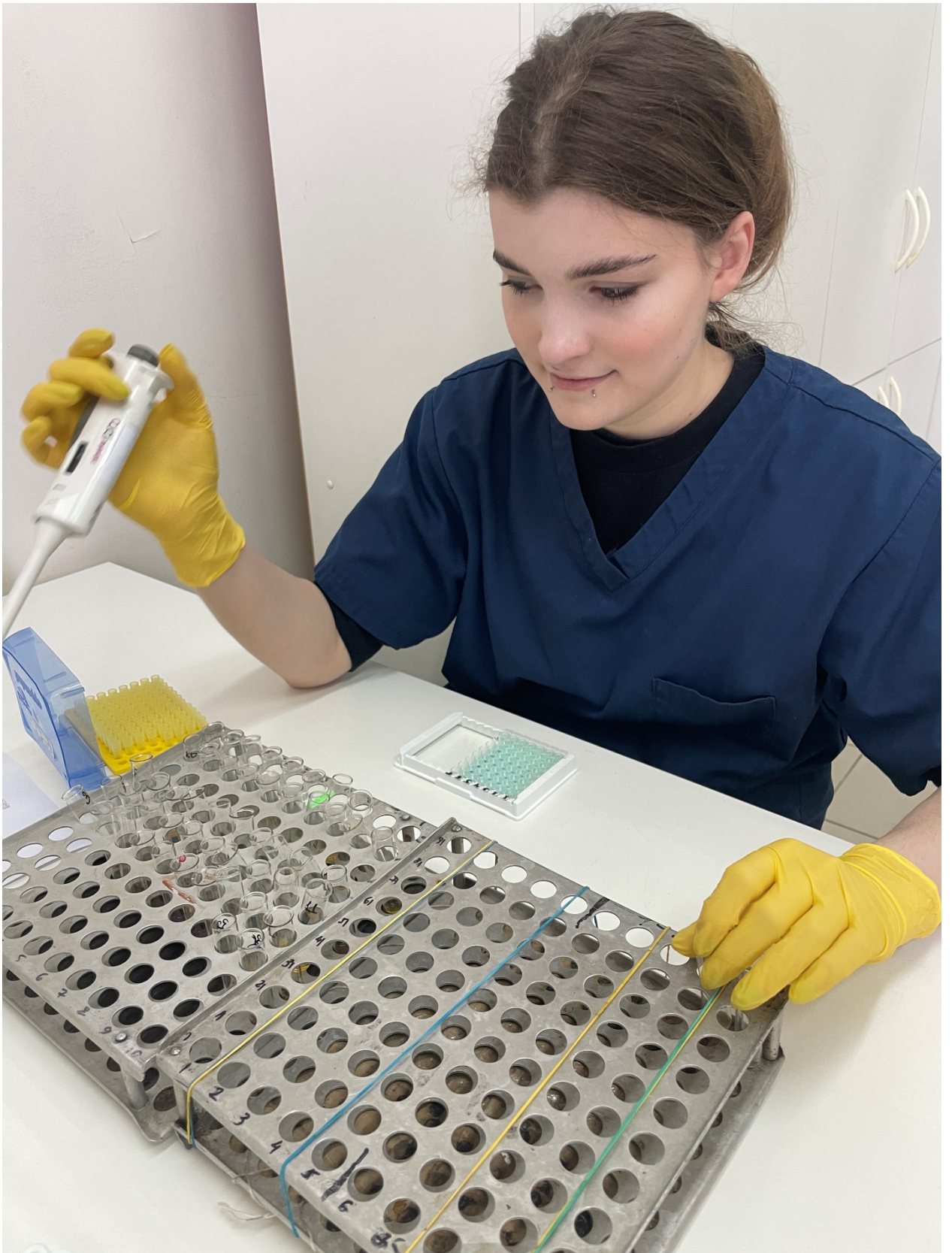


Рис. Б5. Внесення зразків.

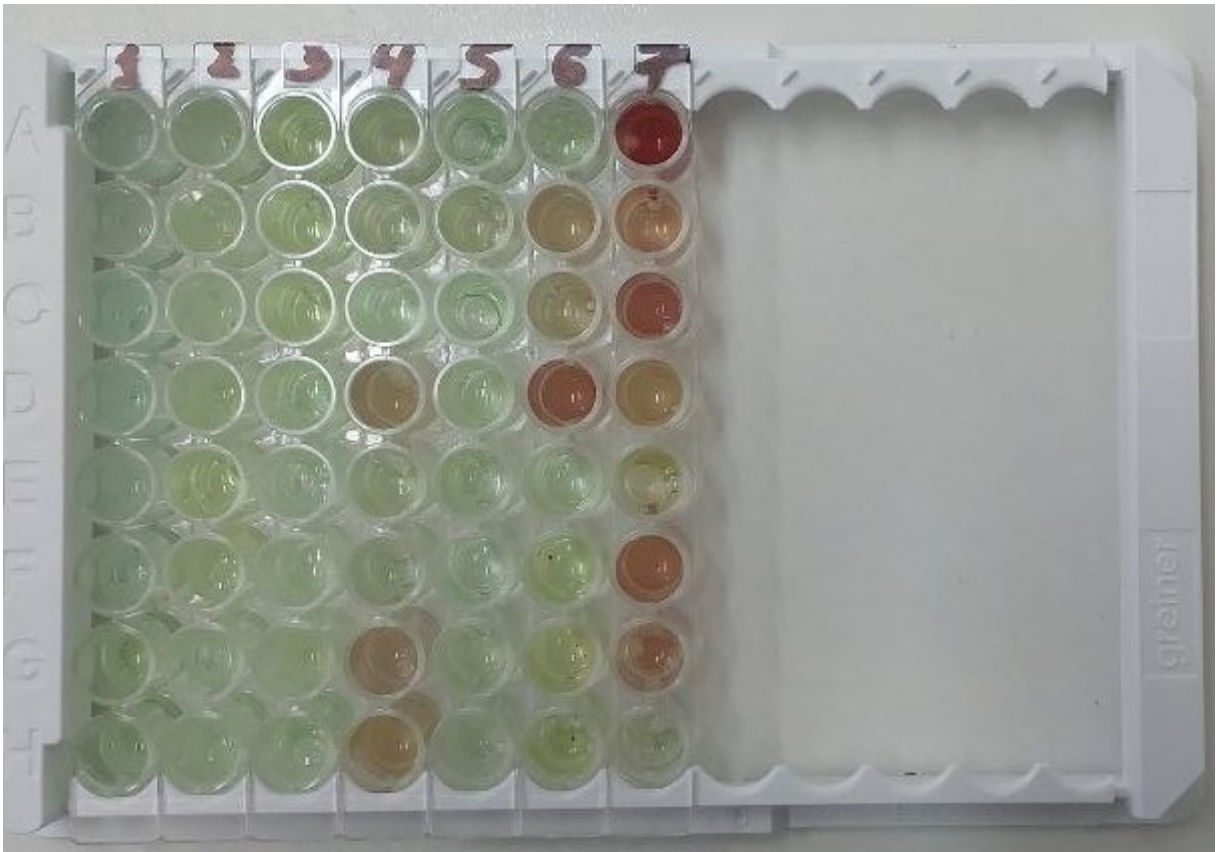


Рис. Б6. Планшет з внесеними зразками та контролями.



Рис. Б7. Промивання планшетів промиваючим розчином



Рис. Б8. Внесення розчину кон'югату до планшету

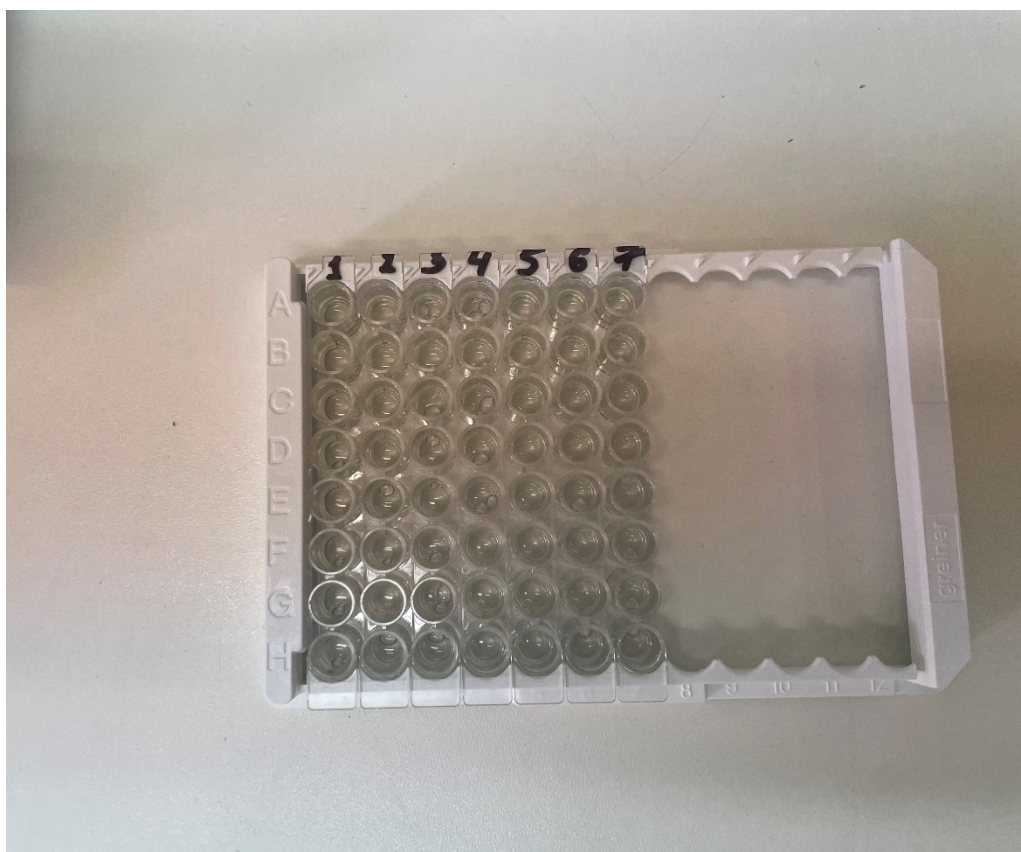


Рис. Б9. Внесенний розчин кон'югату до планшету



Рис. Б10. Внесення субстратного розчину (ТМБ) до планшету.

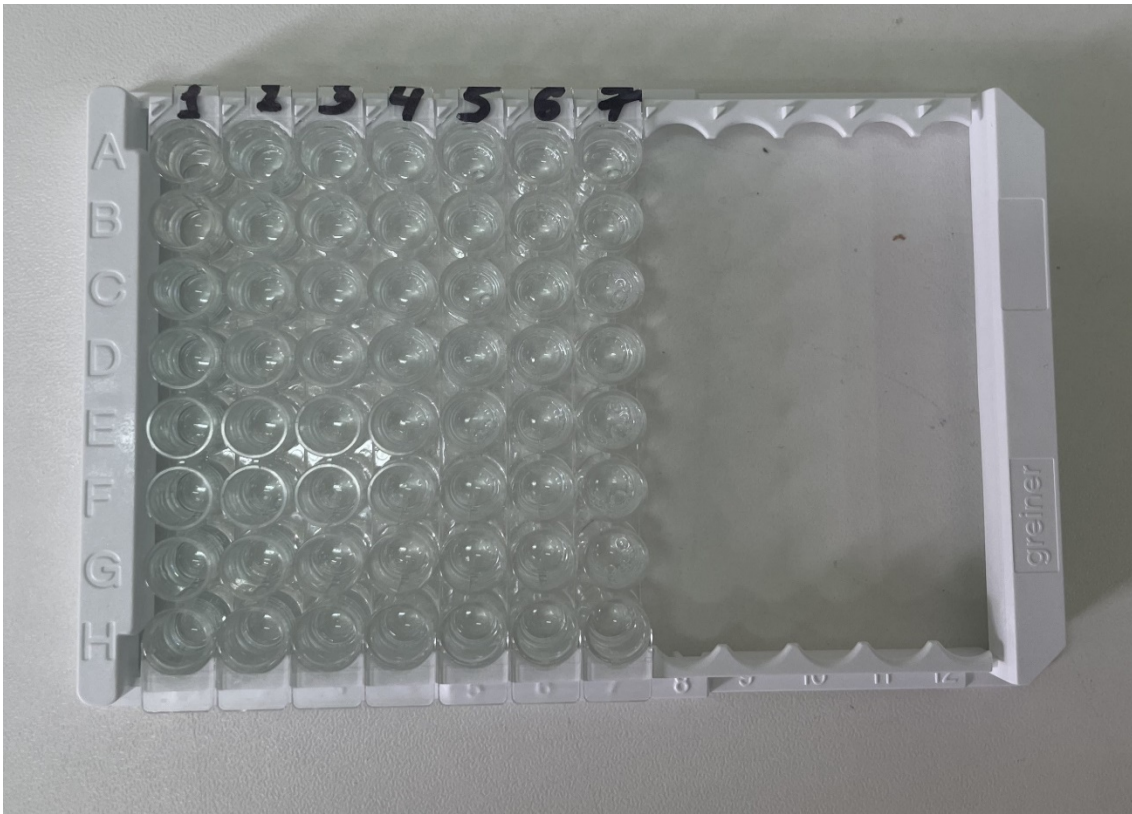


Рис. Б11. Внесений субстратний розчини (ТМБ) до планшету.

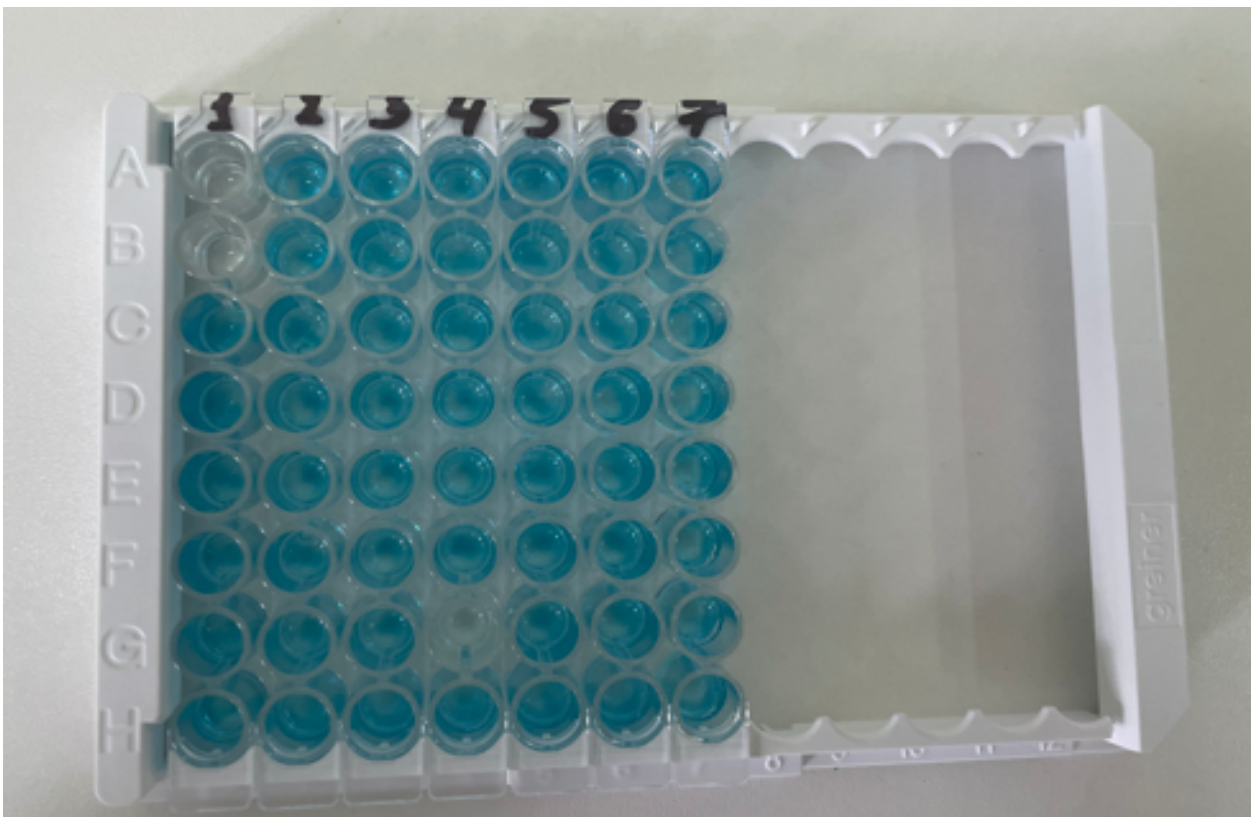


Рис. Б12. Планшет з проявленням (ТМБ).



Рис. Б13. Внесення СТОП-розчину.

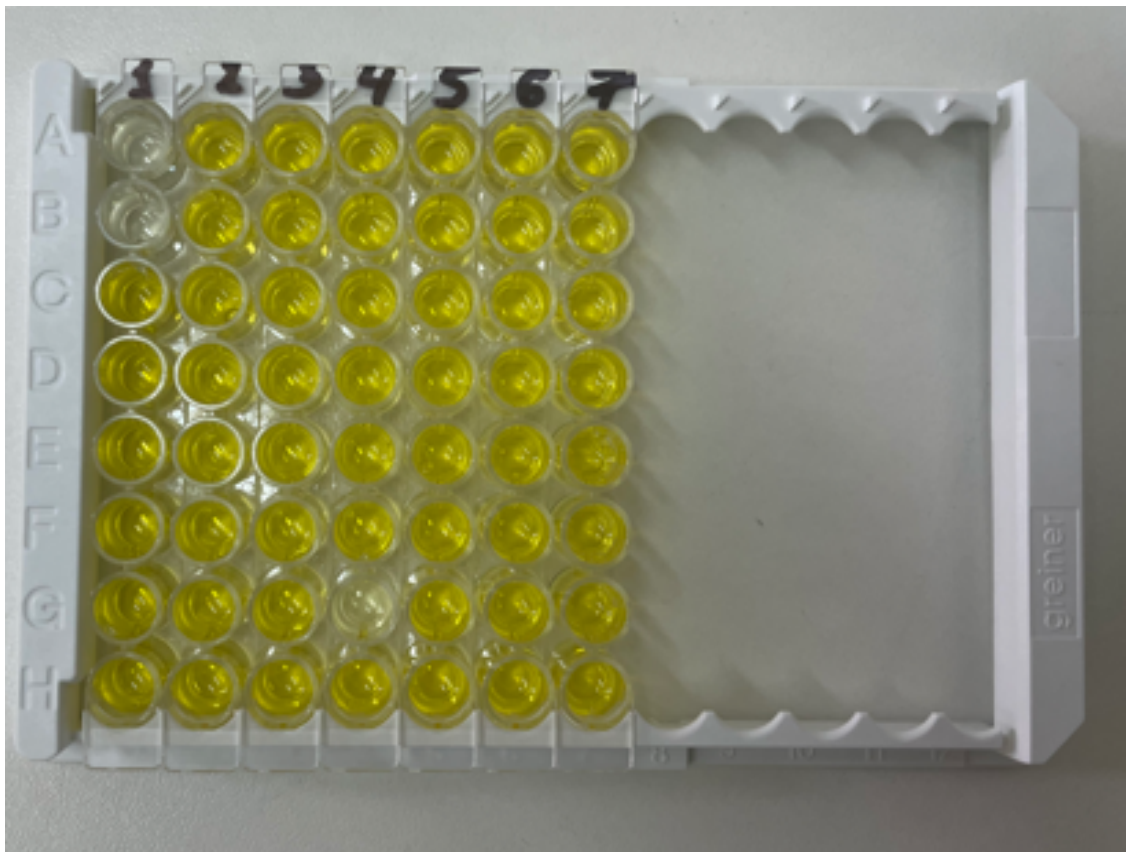


Рис. Б14. Планшет з завершеною реакцією, який готовий для читання.

| Measurement results  |       |       |       |       |       |       |       |   |   |    |    |    |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|---|----|----|----|
| ІФА ЛЕЙКОЗ (16).skax |       |       |       |       |       |       |       |   |   |    |    |    |
| 13.05.2025 12:13:10  |       |       |       |       |       |       |       |   |   |    |    |    |
| Absorbance 1         |       |       |       |       |       |       |       |   |   |    |    |    |
| Wavelength: 450 nm   |       |       |       |       |       |       |       |   |   |    |    |    |
| Plate 1              |       |       |       |       |       |       |       |   |   |    |    |    |
| Abs                  | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A                    | 0,086 | 1,337 | 1,360 | 1,240 | 1,251 | 1,338 | 1,397 |   |   |    |    |    |
| B                    | 0,084 | 1,297 | 1,257 | 1,166 | 1,280 | 1,286 | 1,339 |   |   |    |    |    |
| C                    | 1,560 | 1,335 | 1,212 | 1,315 | 1,236 | 1,290 | 1,373 |   |   |    |    |    |
| D                    | 1,483 | 1,222 | 1,225 | 1,275 | 1,221 | 1,273 | 1,331 |   |   |    |    |    |
| E                    | 1,339 | 1,219 | 1,231 | 1,158 | 1,278 | 1,252 | 1,346 |   |   |    |    |    |
| F                    | 1,288 | 1,207 | 1,084 | 1,248 | 1,309 | 1,247 | 1,248 |   |   |    |    |    |
| G                    | 1,301 | 1,152 | 1,164 | 0,200 | 1,233 | 1,189 | 1,235 |   |   |    |    |    |
| H                    | 1,302 | 1,270 | 1,320 | 1,276 | 1,322 | 1,256 | 1,358 |   |   |    |    |    |

Рис. Б15. Таблиця обліку результатів.