

ВЕКТОР



Точная диагностика — эффективное лечение!

ПЦР в диагностике вируса лейкоза КРС: Что? Где? Когда?



Лейкоз КРС –

хронически протекающая инфекционная болезнь крупного рогатого скота. Поражает кровеносную систему (лимфоциты, органы кроветворения).

Возбудитель – вирус лейкоза КРС (**bovine leukemia virus**) – РНК-содержащий онкогенный вирус.

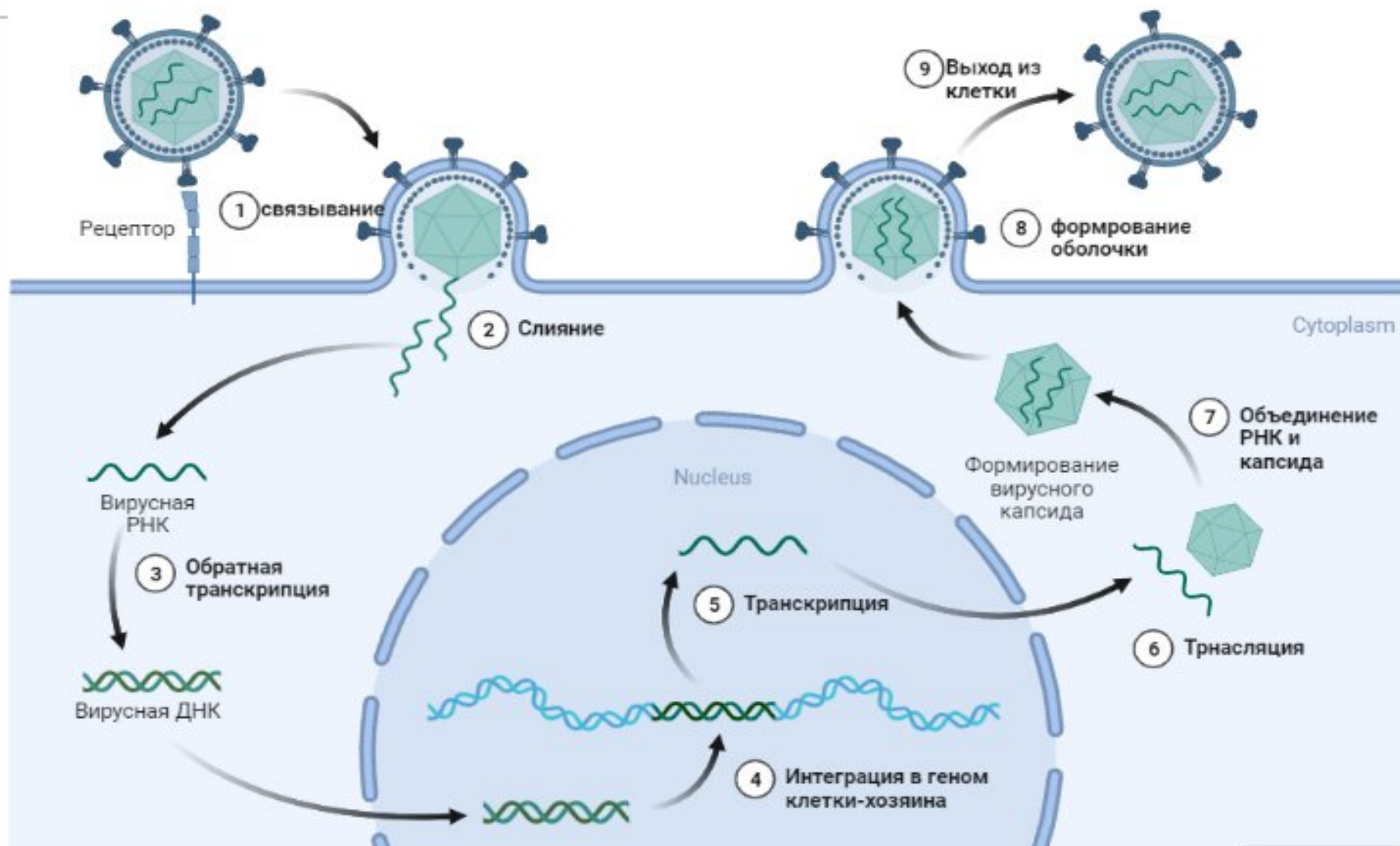
Источник инфекции – больное животное.

Локализация вируса – лимфоидная ткань, В-лимфоциты в крови;

Пути передачи – вертикальный (от матери к плоду) , горизонтальный (кровь, молоко, молозиво), ветеринарно-зоотехнические мероприятия с нарушением правил асептики (отбор крови, массовые вакцинации, обработка копыт, осеменение, доение и пр.), инфицированные быки-производители, общие родильные отделения.



Жизненный цикл вируса Лейкоза КРС (с. *Retroviridae*, р. *Deltaretrovirus*)



Стадии лейкоза КРС и Диагностика

Инкубационная

Бессимптомная
(Инфекционная)

Гематологическая
(Патологическая)

Клиническая
(Опухолевая)

С заражения до момента появления АТ (2-8 недель)

Лимфоциты в норме;
Животное уже заразно!
(до 6-7 лет)

Лимфоцитоз в периферической крови

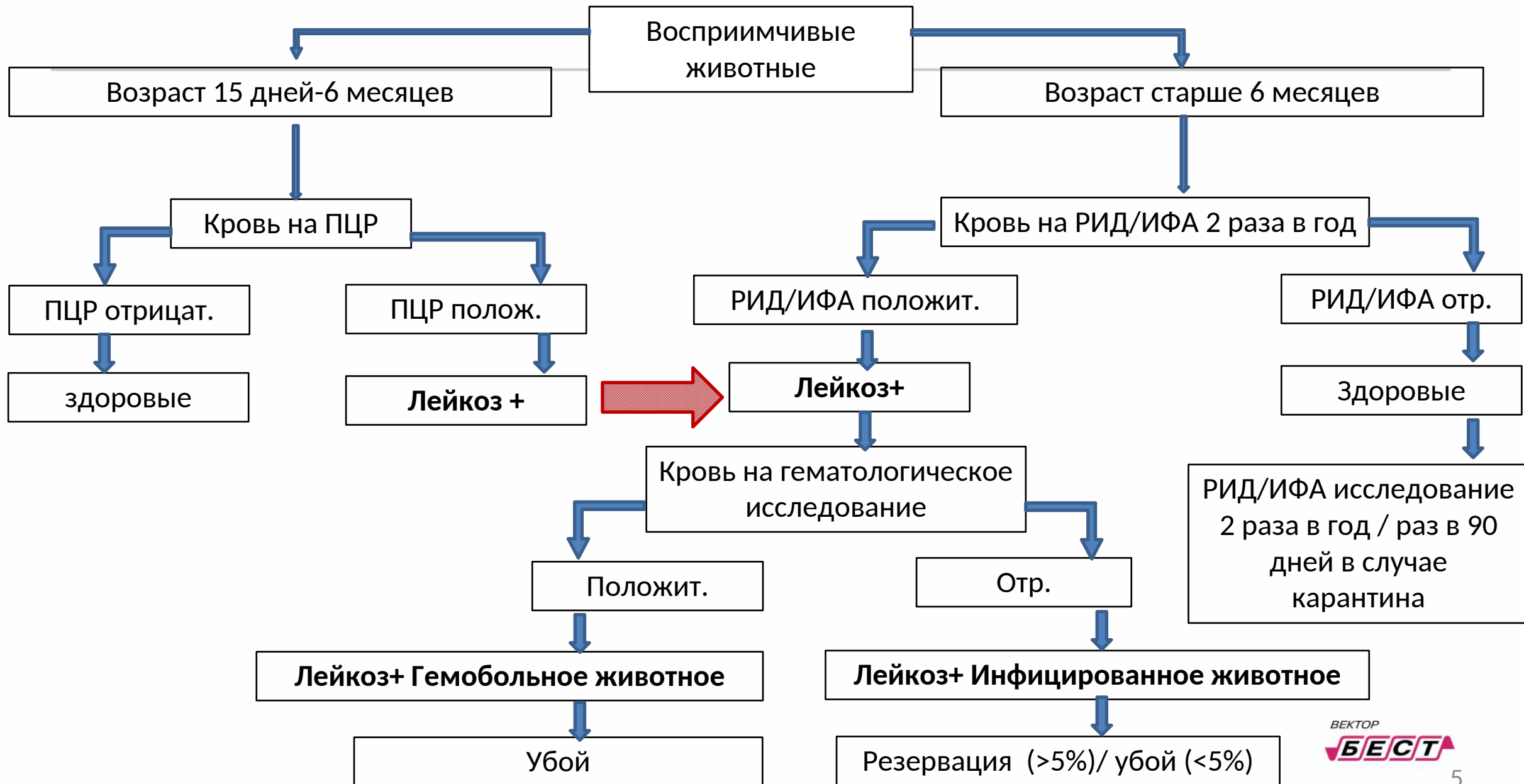
- Увеличение лимфатических узлов;
- Опухолевых новообразований;
- Нарушение половых циклов,
- Гипотония преджелудков,
- Отеки
- Пучеглазие;
- Исхудание,
- Снижение молокоотдачи,
- Яловость, аборты

↑
В ПЦР - ДНК

В ИФА, РИД - **нет АТ**

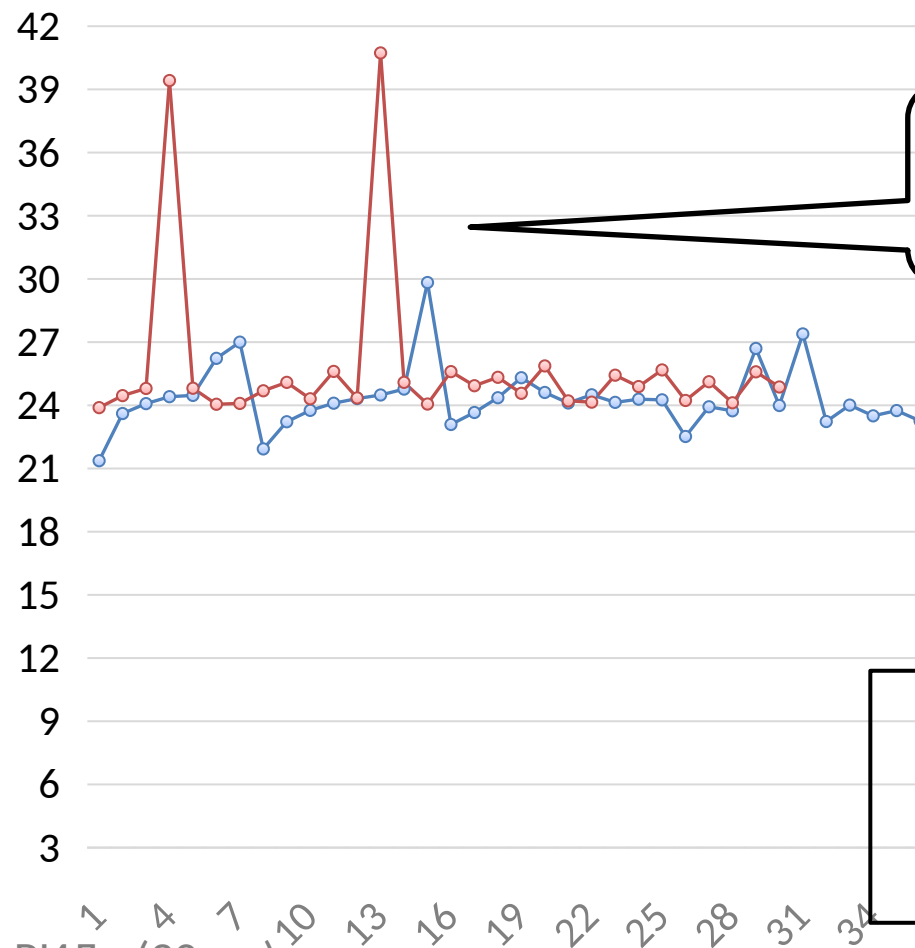
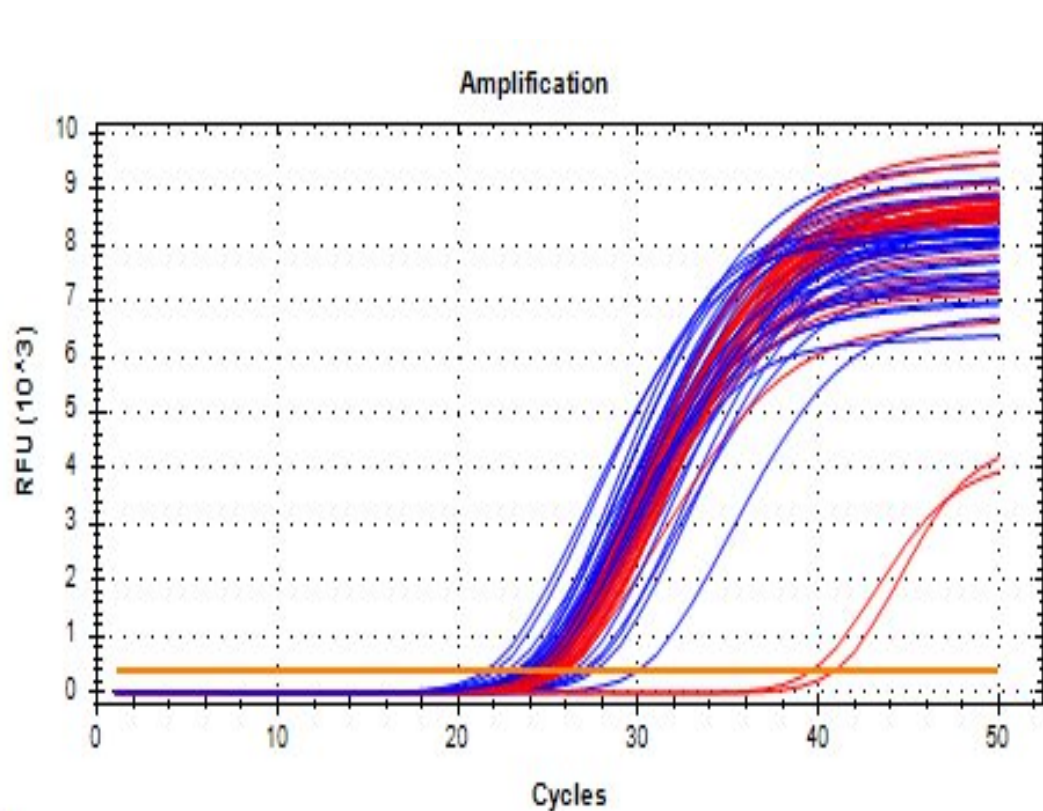
В ПЦР - ДНК
В ИФА, РИД - АТ

Приказ от 24 марта 2021 г. №156. Раздел V. Диагностические мероприятия.



Количество ДНК ВЛКРС одинаково у гемобольных и РИД+ животных

Циклы ПЦР для ДНК ВЛКРС в крови гемобольных и РИД+ животных



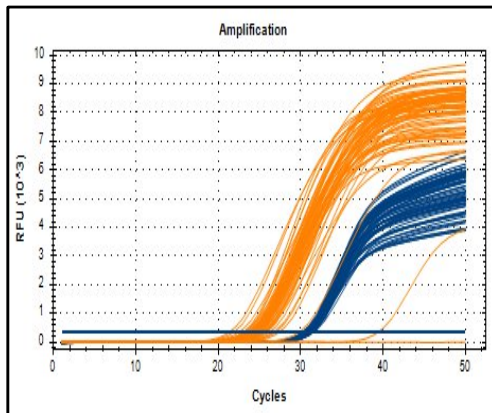
10⁶-10⁷ копий
вируса в 1 мл
крови

Для заражения
достаточно 2500
копий вируса
(0,5-1 мкл крови)

—●— гемобольные (36 шт) —●— РИД+ (30 шт)

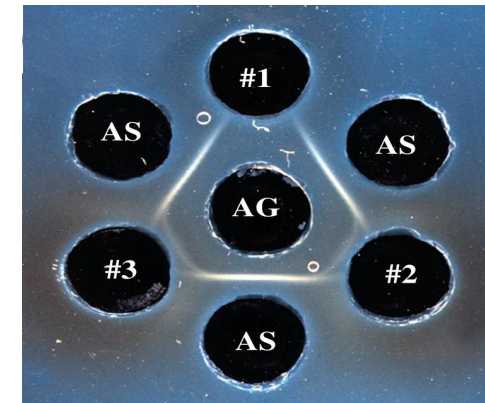
Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

- Прямой метод диагностики;
- Материал – кровь с ЭДТА, сухие пятна крови;
- Время анализа – 2-3 часа;
- Одновременное исследование до 96 образцов;
- Программная оценка результатов;
- Высокая чувствительность;
- Единственный способ достоверной диагностики ВЛКРС у телят до 6 месяцев;

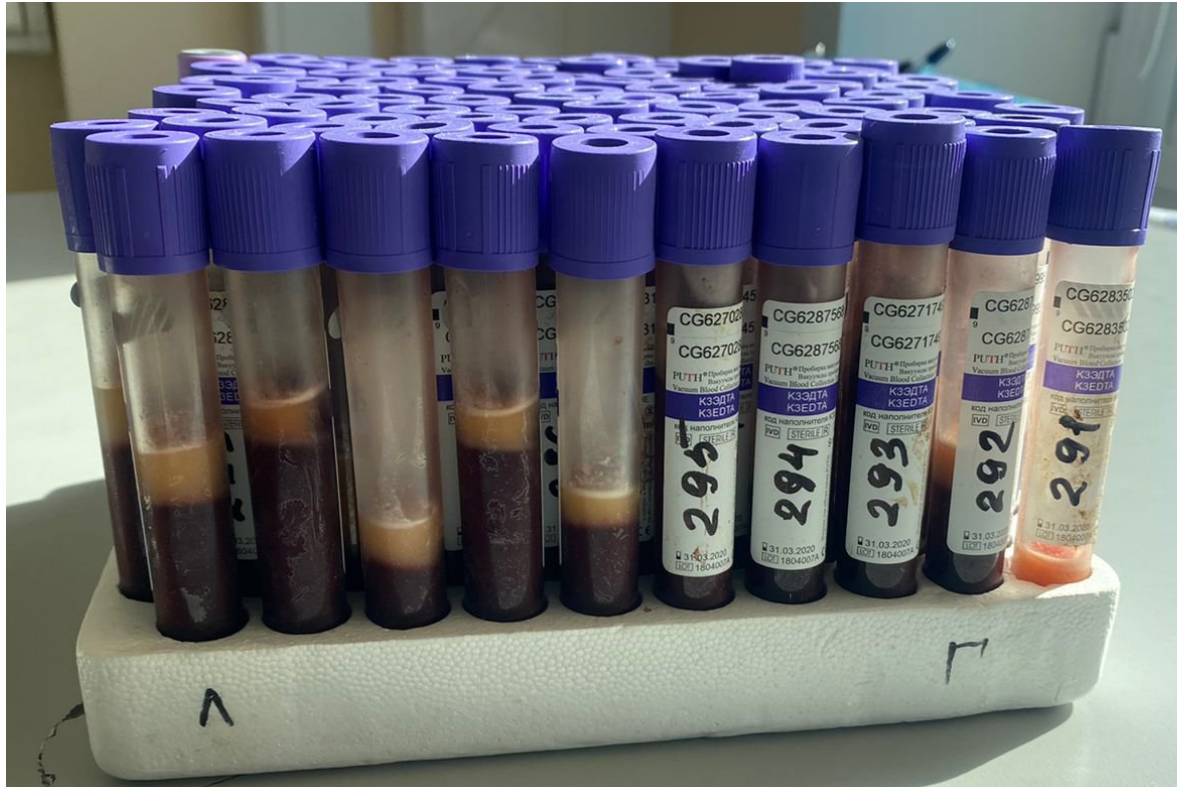


Реакция иммунодиффузии (РИД)

- Непрямой метод диагностики;
- Материал – сыворотка крови;
- Время реакции – 48-96 часов;
- Одновременное исследование 3-4 образцов на чашке;
- Субъективная оценка результатов;
- Низкая чувствительность;
- Возраст исследования старше 6 мес.;
- Низкая стоимость исследования;



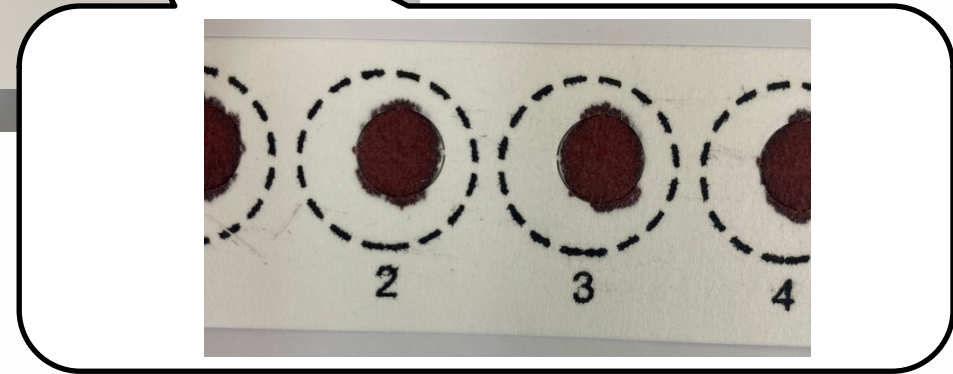
Цельная кровь – стандартизованный материал для ПЦР-диагностики ДНК вируса ВЛКРС



	Кровь
Количество лимфоцитов, кл/мл	$10^6 - 10^7$
В реакцию попадает, клеток	$10^3 - 10^4$
Цикл Ct в ПЦР, геном КРС	25-28
Время жизни лимфоцитов	от нескольких недель до нескольких лет
Хранение и транспортировка	от + 4 оС до -20 оС

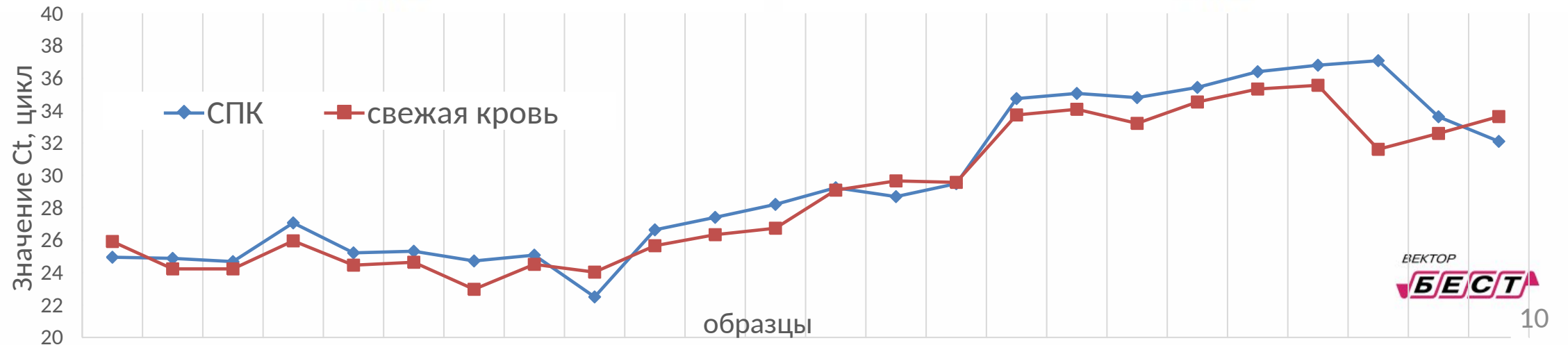
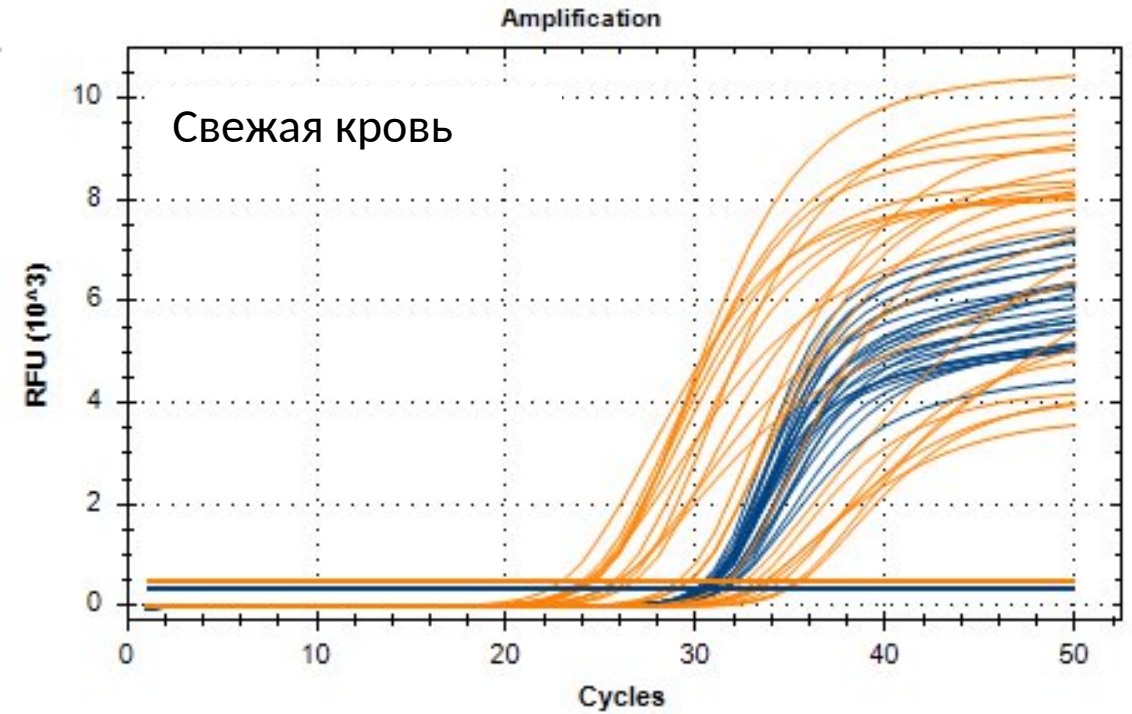
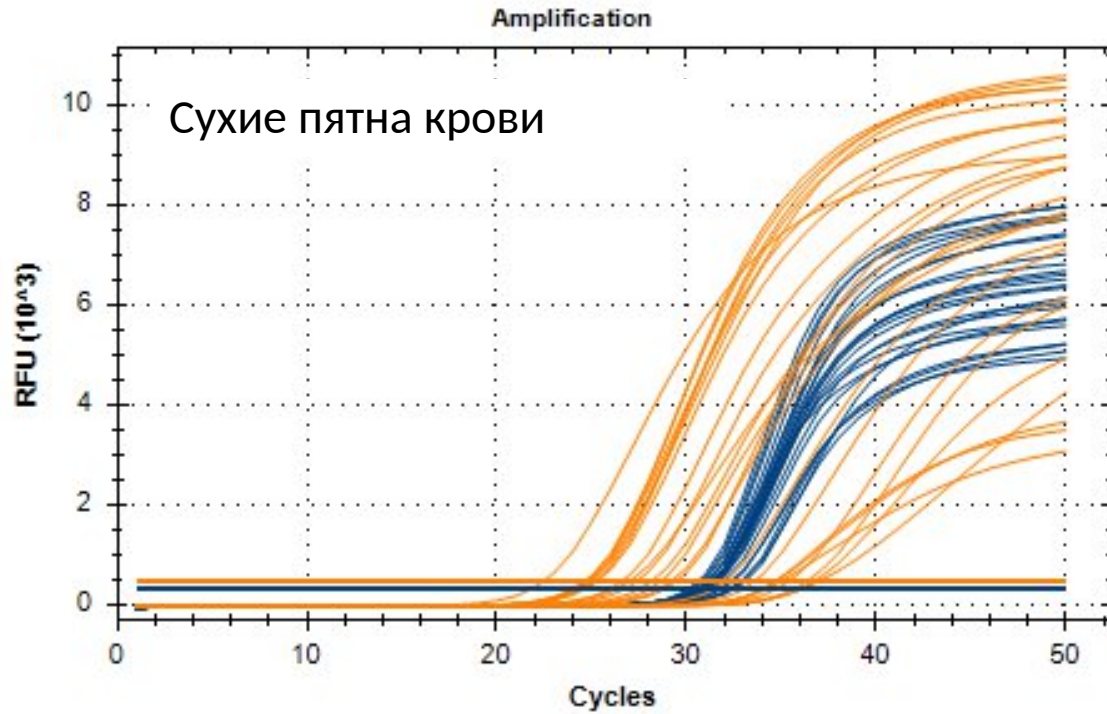
- Венозная или капиллярная кровь
- Пробирки КЗ ЭДТА (сиреневая крышка);

Сухие пятна крови – удобны при сборе материала для ПЦР в «полевых» условиях



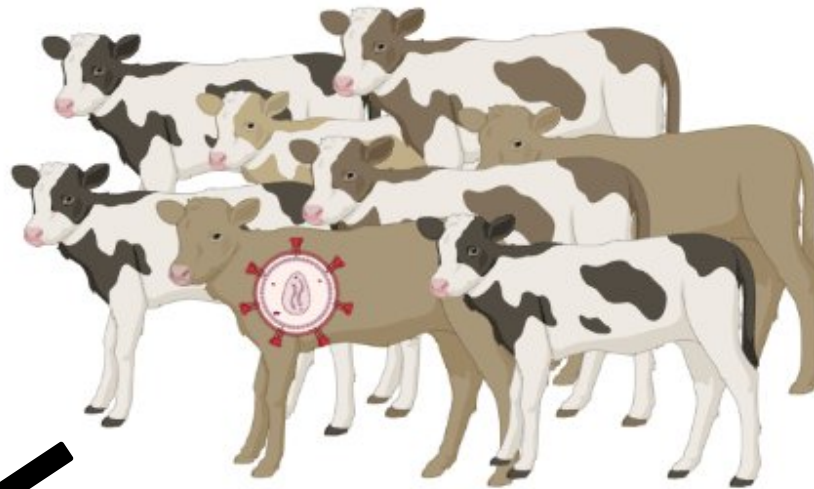
- Капиллярная кровь из прокола (2-3 капли);
- Венозная кровь из пробирки «КЗ ЭДТА» (50 мкл);
- Высушить 1 час на воздухе в сухом месте, без прямого солнечного света;
- Хранить и транспортировать при комнатной температуре;
- Компактность и удобство хранения и транспортировки;
- Удобно забирать образцы в «полях»;

ДНК ВЛКРС выделяется одинаково эффективно из свежей крови и сухих пятен (50 мкл)



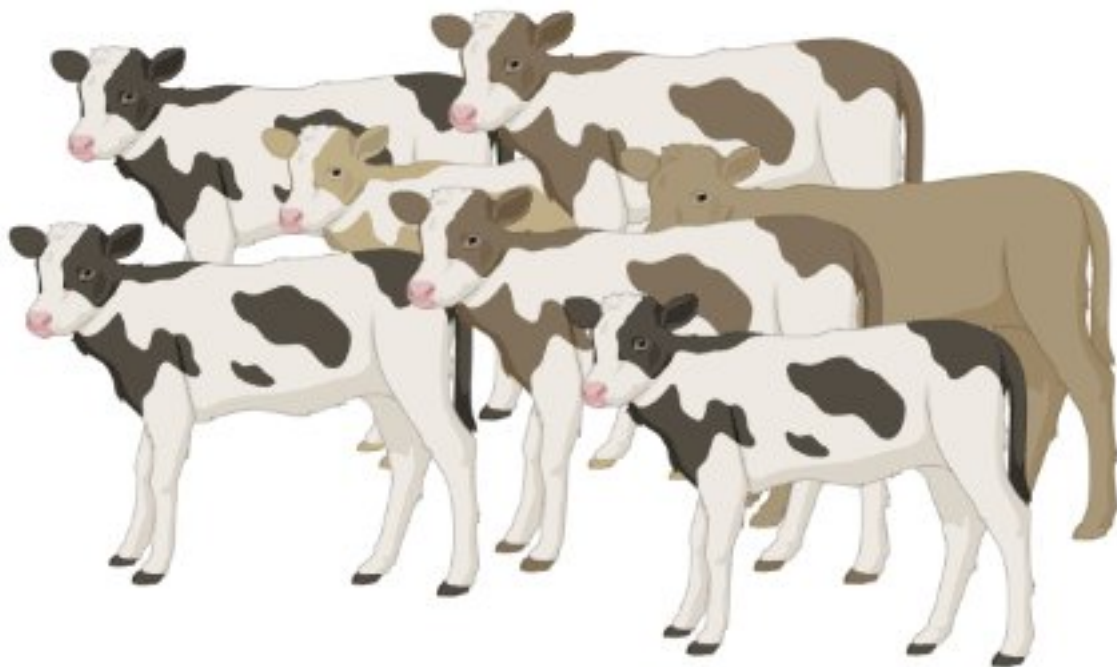
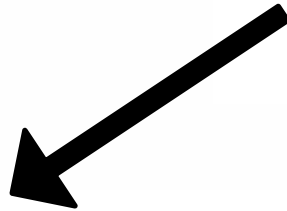
**ПЦР – единственный способ ранней диагностики лейкоза КРС
у телят до 6 месяцев!**

**РИД и ИФА неинформативны из-за присутствия
колостральных АТ**



Телята до 6 месяцев

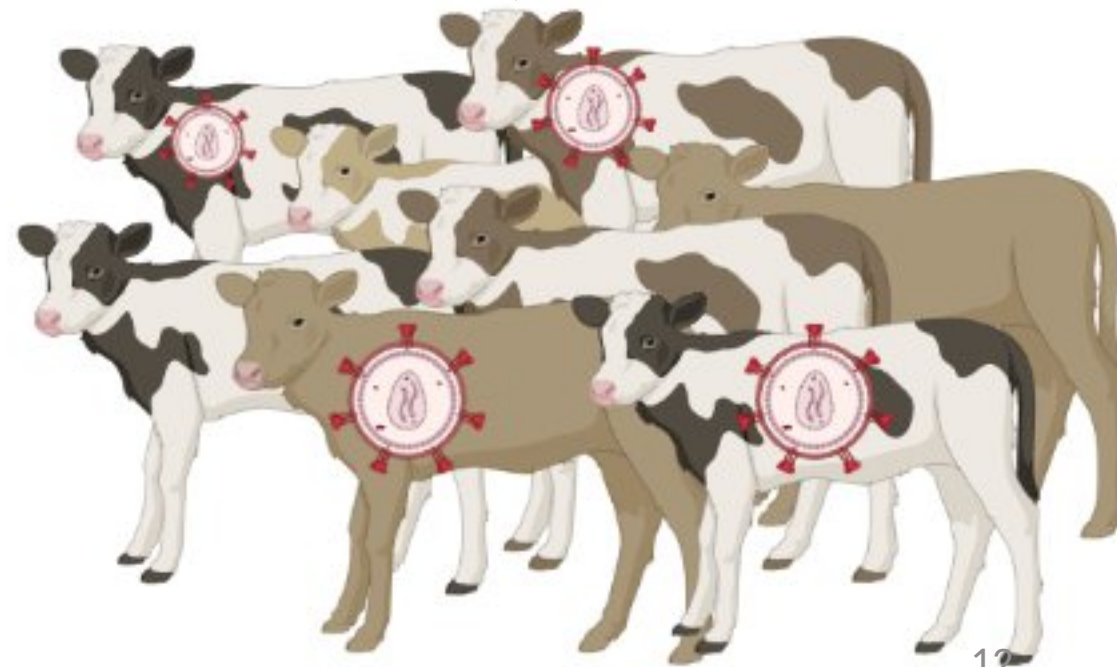
Выведение «ПЦР ВЛКРС+» телят из стада в 1-й месяц



Телята после 6 месяцев

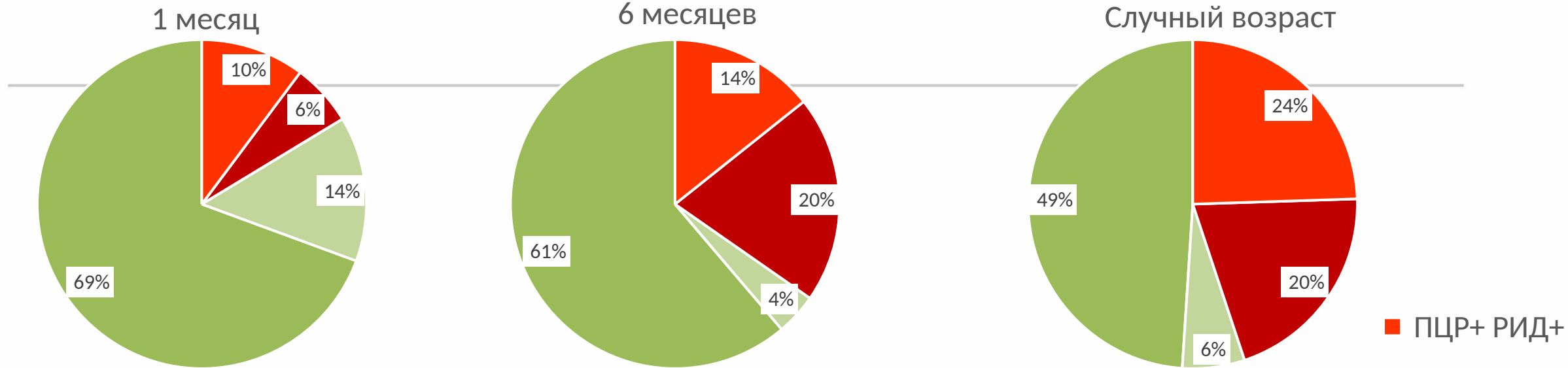


Ждем 1-й РИД в 6 месяцев

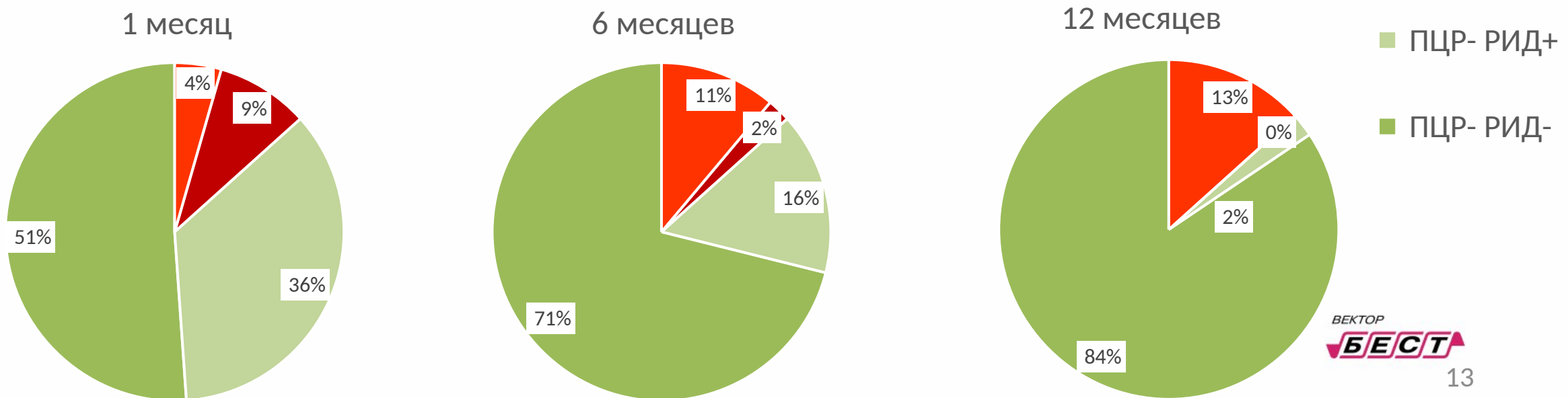


Телята после 6 месяцев

Хозяйство №1. Не изолировали ПЦР+ телят после 1 месяца

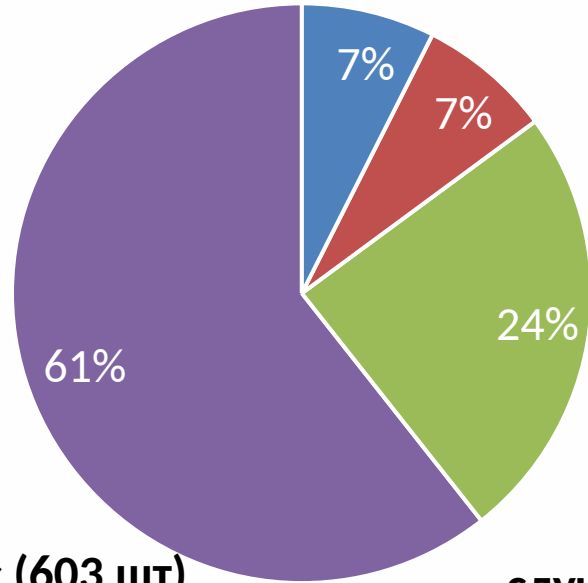


Хозяйство №2. Изолировали ПЦР+ телят после 1 месяца

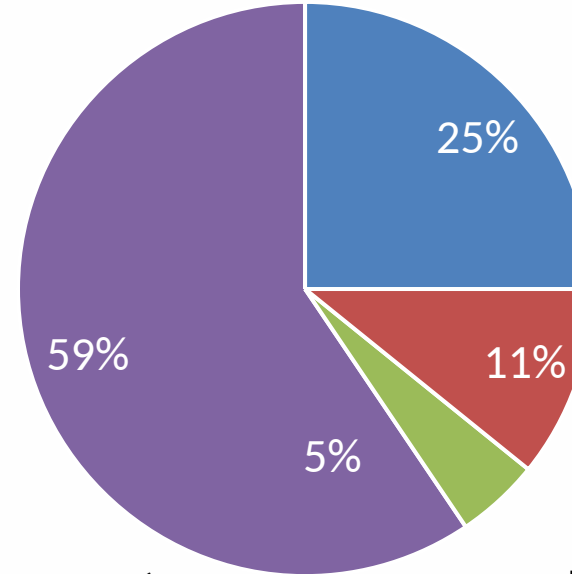


Сравнение результатов РИД и ПЦР в разном возрасте

1-1,5 мес (94 шт)

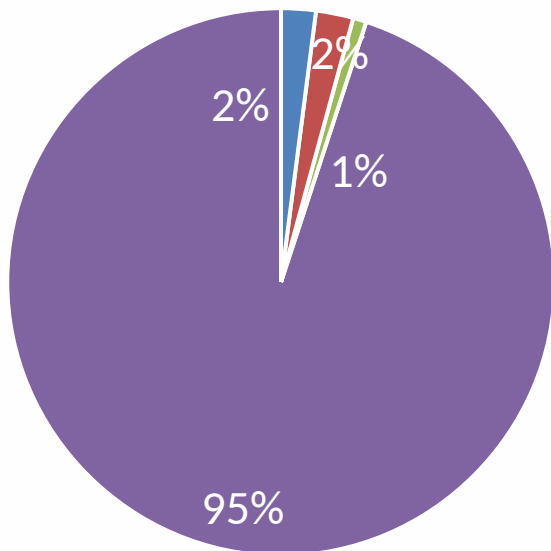


3-5 мес (148шт)

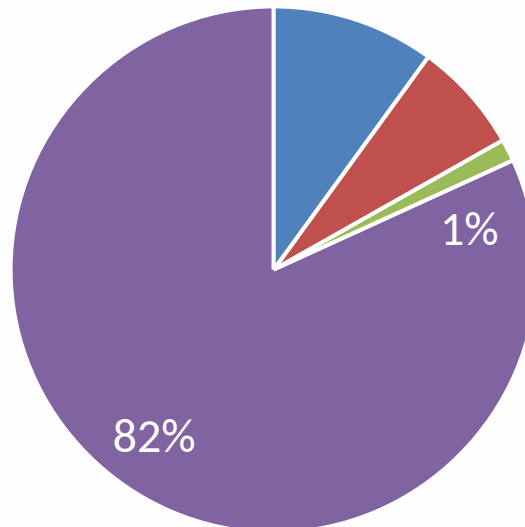


- ПЦР+РИД+
- ПЦР+РИД-
- ПЦР-РИД+
- ПЦР-РИД-

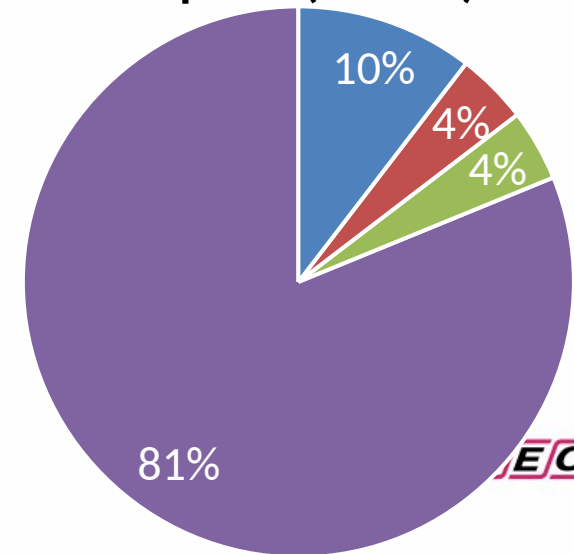
6-12 мес (603 шт)



случный возраст (440 шт)



Коровы (691 шт)



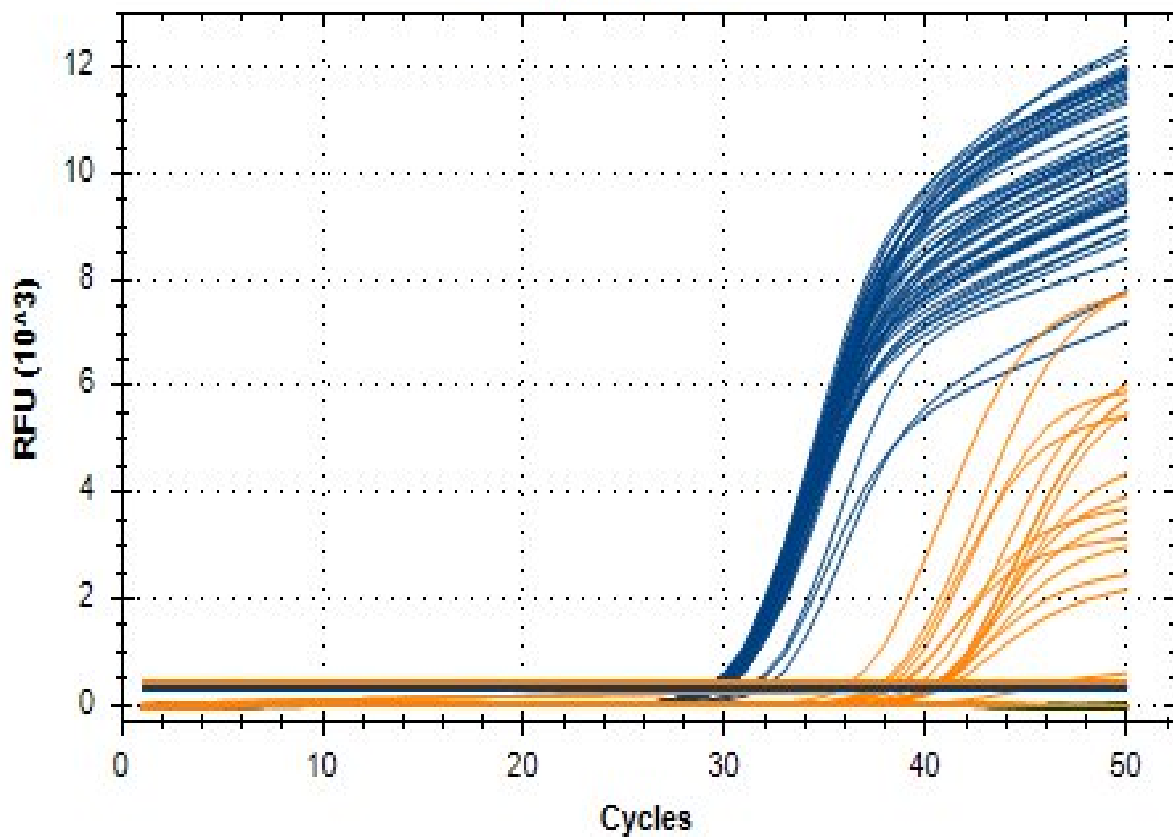
Молоко – нестандартизованный материал для диагностики ВЛКРС методом ПЦР

- Возраст, жизненный цикл, здоровье вымени, интенсивность дойки; 
 - Разное количество соматических клеток; короткое время жизни лимфоцитов; 
 - Сшелушенный эпителий в молоке;
 - Разная плотность и состав молока; 
 - На выделение берут 100 мкл молока (~1000 лейкоцитов) может быть слишком мало тех, которые несут вирус. 
- Меняется количество соматических клеток в молоке на 2-3 порядка;
 - Невозможно использовать геном коровы для нормировки количества копий вируса;
 - Невозможно нормировать результаты ПЦР на исследуемый объем.
 - Возможен ложно-отрицательный результат.

Разное количество ДНК ВЛКРС в крови и молоке у РИД+ и гемобольных коров (выделение из 100 мкл)

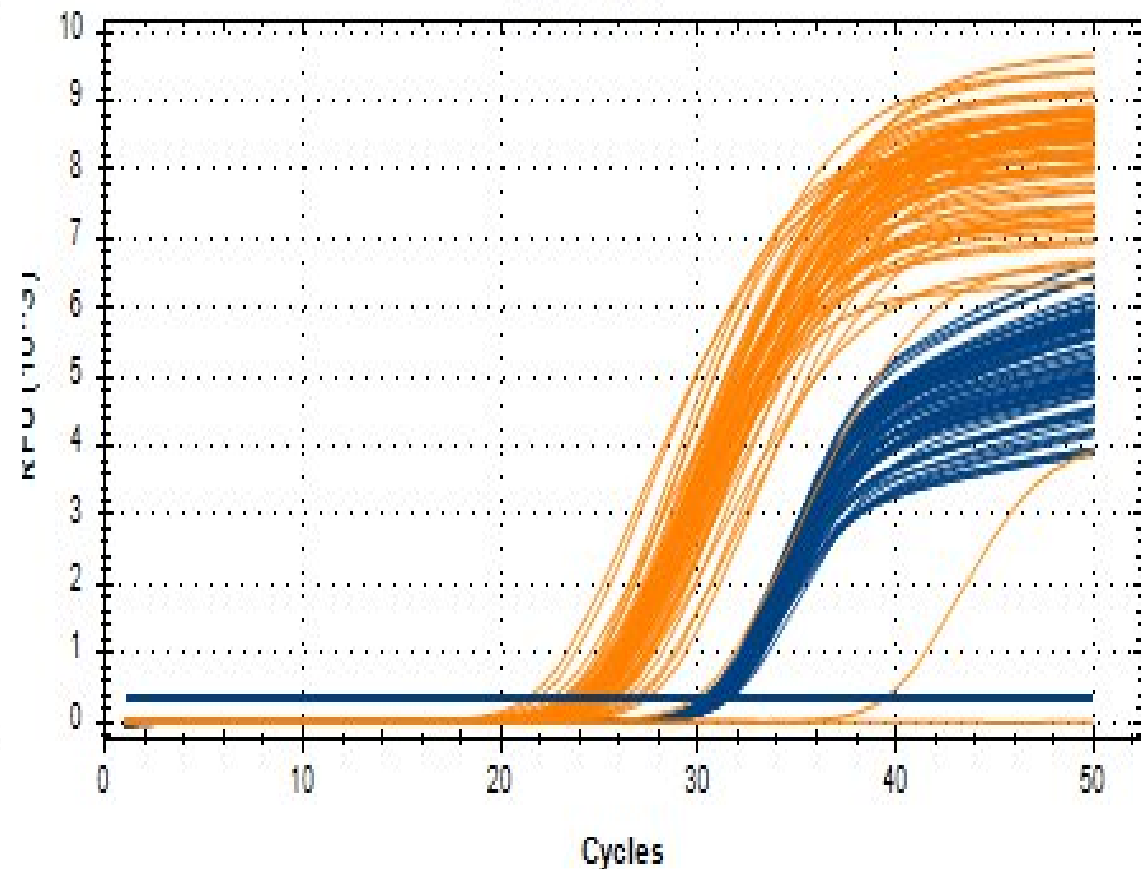
молоко

Amplification

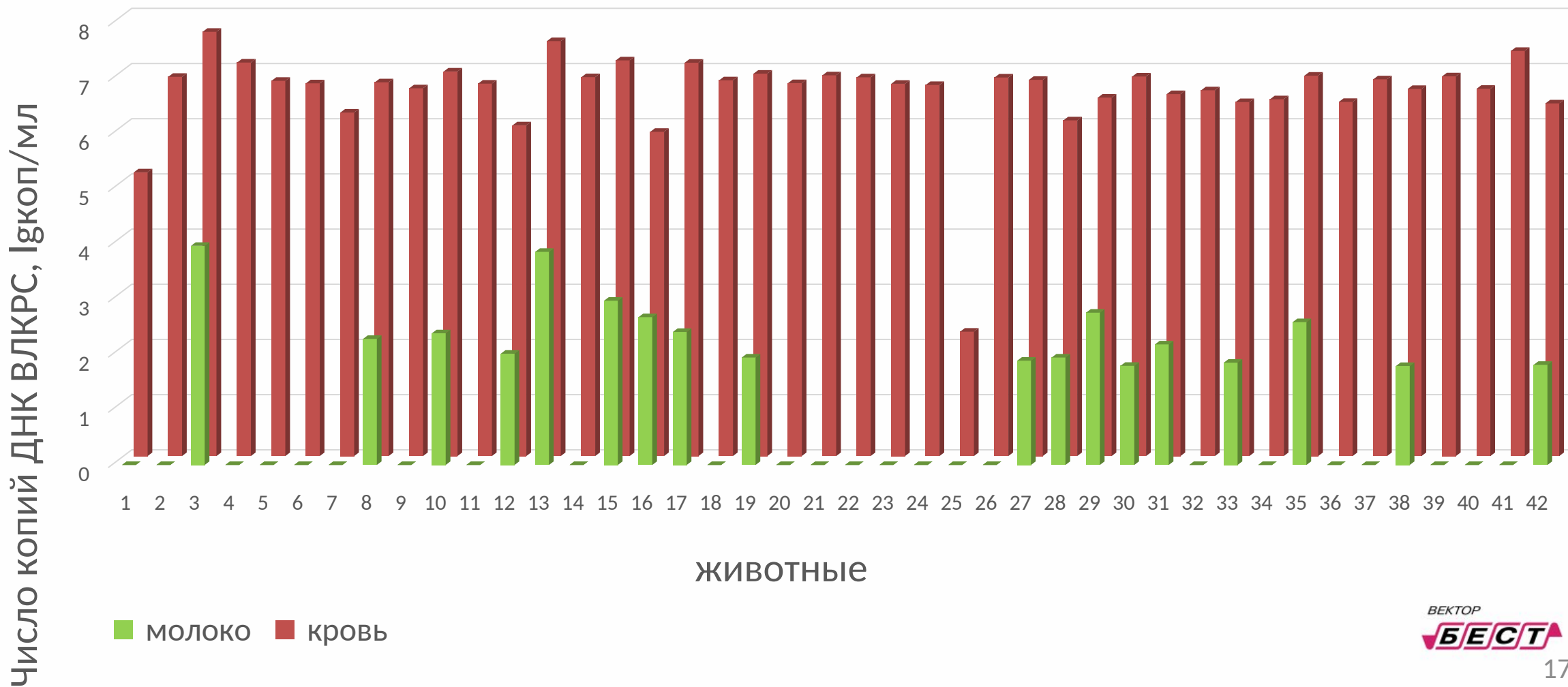


кровь

Amplification



Разное количество ДНК ВЛКРС в крови и молоке РИД+ и гембольных коров (пересчет на 1 мл образца)



Заключение:

- Вирус лейкоза остается у инфицированного животного на всю жизнь;
- ПЦР – прямой и надежный метод диагностики вируса лейкоза КРС;
- Для ПЦР диагностики ДНК вируса лейкоза КРС необходимо использовать цельную кровь или сухие пятна крови (не молоко, не сыворотку).
- **ПЦР - единственный метод для достоверного определения ДНК ВЛКРС в крови телят до 6 месяцев;**
- Своевременная изоляция ПЦР+ телят в возрасте до 6 месяцев способствует быстрому и экономичному оздоровлению стада и оправдывает затраты на диагностику.

Подходит ли сперма в качестве материала для исследования вируса лейкоза?



- Ищем сперму от инфицированных и гембольных животных.
- Предлагаем поучаствовать в исследовании - пожалуйста, обращайтесь.

ВЕКТОР



Точная диагностика — эффективное лечение!

Благодарю за внимание!

Маценко Наталья Юрьевна

Научный сотрудник

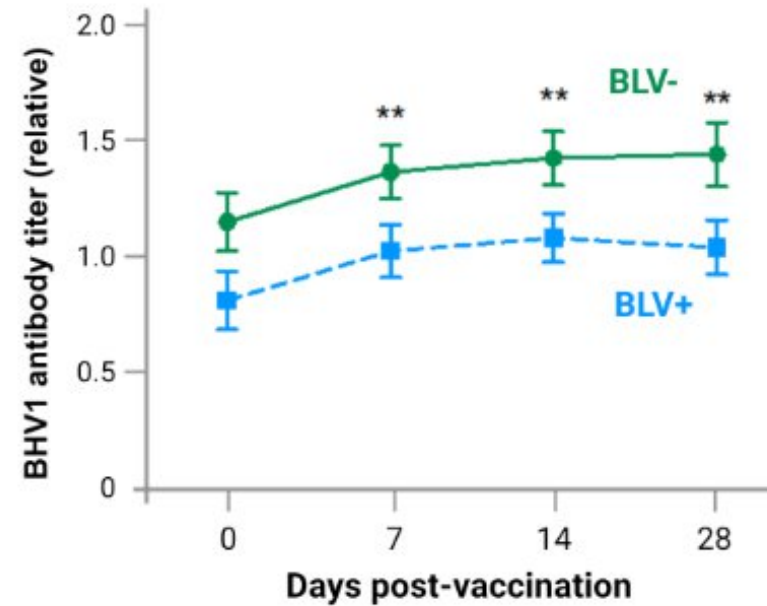
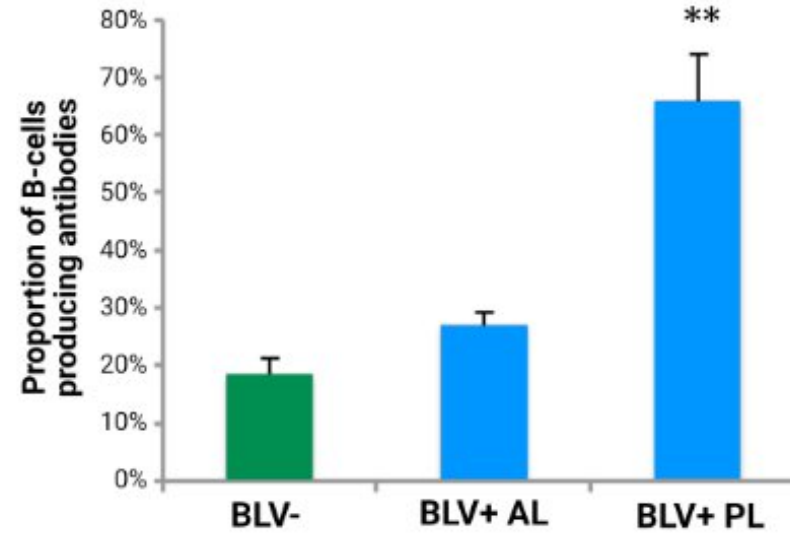
Лаборатория ПЦР АО «Вектор-Бест»

Тел.: +7-913-987-0361

E-mail: Matsenko@vector-best.ru



ВЛКРС снижает эффективность вакцинации



Изолировать или не изолировать ПЦР ВЛКРС+ телят?

	Хозяйство №1 НСО			Хозяйство №2 НСО		
		Не изолировали ПЦР+ телят после 1 месяца			Изолировали ПЦР+ телят после 1 месяца	
	1,5 месяц	6 месяцев	Случный возраст	1 месяц	6 месяцев	12 месяцев
ПЦР+ РИД+	5	7	12	2	5	6
ПЦР+ РИД-	3	10	10	4	1	0
ПЦР- РИД+	7	2	3	16	7	1
ПЦР- РИД-	34	30	24	23	32	38
Всего	49	49	49	45	45	45

Кровь – стандартизованный материал для исследования вируса лейкоза КРС

- В крови КРС количество лейкоцитов $4-12 \cdot 10^9$ коп/л или 10^6-10^7 кл/мл.
- Количество лимфоцитов в $\sim 57,5\%$ (40-75% по Кудряшову), т.е. в среднем 10^5-10^6 кл/мл.
- В реакцию попадает 10^3-10^4 клеток. Ct =25-29 цикл.
- Геном лимфоцита может содержать несколько копий встроенного генома ВЛКРС.
- Чем дольше животное заражено вирусом, тем больше число его копий встраивается в новые лимфоциты. Значение Ct может варьировать от 15-40.

Разница между количеством и качеством лимфоцитов крови и молока

	Кровь	Молоко
Количество лимфоцитов, кл/мл	$10^6 - 10^7$	$10^4 - 10^6$
В реакцию попадает, клеток	$10^3 - 10^4$	$10^2 - 10^4$
Цикл Ct в ПЦР, геном КРС	25-29	25-35
Время жизни лимфоцитов	от нескольких недель до нескольких лет	Несколько дней