

2. За ініціативою управління ветеринарної медицини та участю адміністрації районних, обласних рівнів розробляти та впроваджувати регіональні програми по пільговому забезпеченню присадибних господарств здоровими тваринами взамін підданої для санітарного забою інфікованої вірусом лейкозу худоби.

Список літератури

1. List of countries by disease situation [Electronic resource]. – Access mode : http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statuslist. – Title from the screen.
2. Кузин, А.И. Продуктивность и качество молока у коров при лейкозе [Текст] / А.И. Кузин, Е.Н. Закрепина // Тр. ВНИИЗВ. – М., 1999. – Т. 72. – С. 215–217.
3. Влияние крупномасштабных оздоровительных мероприятий на уровень пораженности поголовья крупного рогатого скота вирусом лейкоза в СССР [Текст] / В.А. Бусол [и др.] // Вет. медицина : эконом., социальные и эколог. пробл. : тез. докл. респ. конф., 20–22 нояб. 1990 г., г. Харьков. – Х., 1990. – С. 87.
4. Мандигра, Н.С. Епізоотологічний моніторинг лейкозу великої рогатої худоби в Україні та заходи боротьби з ним [Текст] : автореф. дис. ... д-ра вет. наук / Н.С. Мандигра. – Х., 2000. – 44 с.
5. Інструкція по профілактиці та оздоровленню великої рогатої худоби від лейкозу [Текст] : затв. Наказом Міністерства сільського господарства і продовольства України, Головним управлінням ветеринарної медицини з державною ветеринарною інспекцією № 15-15/220, від 28.09.92 // Законодавство України про вет. медицину. – К. : Урожай, 1999. – С. 289–296.
6. Інструкція з профілактики та оздоровлення ВРХ від лейкозу [Електронний ресурс] : затв. Наказом Державного Комітету ветеринарної медицини України № 21, від 21.12.2007. – Режим доступу : http://vet.in.ua/menu/legislation.php?id_article=13. – Заголовок з екрану.
7. Горбатенко, С.К. До перспективи викоринення лейкозу великої рогатої худоби [Текст] / С.К. Горбатенко // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2006. – Вип. 87. – С. 103–105.
8. Стратегія протилейкозних оздоровчих заходів у господарствах з різною епізоотологічною ситуацією [Текст] / Б. Стегній [та ін.] // Вет. медицина України. – 2002. – № 7. – С. 15–16.

ACTUAL EPIZOOTIC SITUATION AS THE FINAL STAGE OF BOVINE LEUKEMIA ERADICATION IN UKRAINE

Gorzheyev V.M.

State Veterinary and Phytosanitary Service of Ukraine, Kyiv

The information on the current epizootic situation for enzootic bovine leukosis in Europe and some parts of the world, antileukemic improving measures efficiency and ways to ensure the eradication of the disease in Ukraine livestock are described.

УДК 619:616.155.392:636.2(477)

ДО ВИВЧЕННЯ ЕПІЗОТИЧНОЇ СИТУАЦІЇ З ЛЕЙКОЗУ ВРХ ТА ГЕНЕТИЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ЗБУДНИКА В РІЗНИХ ГЕОГРАФІЧНИХ ЗОНАХ УКРАЇНИ

Горбатенко С.К., Герілович А.П., Шаповалова О.В., Корнейков О.М.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Сулімова Г.Ю.

Інститут загальної генетики ім. М.І. Вавилова РАН, м. Москва, Російська Федерація

У сучасних умовах лейкози людини, тварин, птахів є найактуальнішою біологічною та соціальною проблемою. Завдяки ускладненню екологічних умов захворювання набувають поширення практично в кожній країні світу. Відкриття збудника лейкозу великої рогатої худоби як етіологічного фактора хвороби, розробка серологічних методів контролю інфікованості тварин, широкомасштабні діагностичні та епізоотологічні дослідження дали можливість обґрунтовано сформулювати визначення хвороби. Ензоотичний лейкоз великої рогатої худоби – інфекційне захворювання пухлинної природи, яке характеризується поширеною проліферацією кровотворної тканини з порушенням диференціації клітин. Збудник – вірус лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ). Вірус вражає лімфотропну тканину, тобто є лімфотропним. Ступінь порушення диференціації та характер пухлинної трансформації клітин визначає розвиток різних варіантів лейкозів. Особливістю вірусу лейкозу ВРХ, представника родини ретровірусів, є присутність в організмі у вигляді провірусу, інтегрованого в клітинний геном, що перешкоджає його взаємодії із захисними імунними механізмами хазяїна. До групи ретровірусів віднесено і Т-лімфотропні віруси людини, встановлена гомологія послідовностей між р24 ВЛВРХ та головним білком р24 вірусу Т-клітинного лейкозу людини HTLV-1 [1, 2].

Слід зауважити, що сьогодні не виявлені природні резервуари ВЛ ВРХ. Разом з цим в експерименті відтворюється інфекція ВЛ ВРХ у овець, кіз, свиней, кролів, мавп. Діагностика лейкозу великої рогатої худоби базується на серологічній диспансеризації поголів'я з використанням реакції імунодифузії (РІД) та імуноферментного аналізу (ІФА). При цьому в межах України в практиці лабораторної діагностики вживаються діагностичні набори трьох виробників – постачальником переважної більшості препарату є ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина» (м. Харків), незначний відсоток – Інститут епізоотології НААН (м. Рівне) та ТОВ «Лейконад» (м. Полтава). Продуктом вірусного матеріалу для виготовлення діагностичних наборів у кожному випадку є перещеплювана культура клітин FLK-BLV, тому за складом, специфічністю та активністю вищезазначених препаратів є аналогами.

У науковій літературі накопичено матеріал про генетичну неоднорідність ВЛ ВРХ, що перситує в межах окремих країн, континентів [3, 4]. Наявність генетичної неоднорідності збудника може обумовлювати, у свою чергу, необхідність використання діагностичних засобів, які відповідають особливостям вірусу – це може значно підвищити ефективність як оздоровчих, так і профілактичних протилейкозних заходів.

Саме з метою визначення генетичних характеристик збудника лейкозу великої рогатої худоби, що провокує випадки захворювання тварин у господарствах України, проведені дослідження проб крові від інфікованих вірусом лейкозу тварин з різних географічних регіонів України.

Матеріал та методи. На підставі матеріалів статистичної звітності Головного управління ветеринарної та фітосанітарної служби України за останні 14 років і багаторічних власних досліджень піддано епізоотологічному аналізу стан благополуччя тваринництва України з лейкозу великої рогатої худоби. З метою вивчення генетичних особливостей збудника лейкозу великої рогатої худоби, що циркулює в різних географічних зонах України: сходу (Харківська, Донецька області), центру (Кіровоградська, Житомирська області), заходу (Рівненська область), півдня (АР Крим, Запорізька область), півночі (Сумська область) відібрано та піддано дослідженню 90 проб крові та 43 проби молока від корів неблагополучного щодо лейкозу стада. У кожному випадку відбирали 10–15 проб крові від інфікованих вірусом лейкозу тварин, останні стабілізували 3,8 % розчином лимоннокислого натрію. Протягом послідовних 8–10 годин проводили ізоляцію лейкоцитів методом гематологічного шоку. Лейкоцитарну фракцію осаджували центрифугуванням у режимі 2500 обертів за хвилину протягом 25–30 хвилин.

Для встановлення походження та генотипової належності ізолятів ВЛ ВРХ зразки ДНК виділяли методом афінної сорбції з наступною ампліфікацією фрагментів гена *env* різної довжини – 747 та 444 п.н. Визначення первинної структури фрагментів ДНК ВЛ ВРХ шляхом секвенування проводили за ABI-технологією на базі Національного ветеринарного дослідного інституту (м. Пулава, Польща). Аналіз отриманих нуклеотидних послідовностей був проведений з використанням програм множинного вирівнювання BioEdit та філогенетичних порівнянь MEGA 5.

Результати досліджень. Тваринництво України стаціонарно неблагополучне щодо лейкозу великої рогатої худоби. Перші випадки захворювання зафіксовано в шістдесяті роки минулого сторіччя. На початку 1998 року чисельність неблагополучних пунктів, а це колективні господарства, складала 4011 одиниць. Зусиллями фахівців ветеринарної медицини за підтримки керівництва адміністративних і підприємницьких підрозділів, тваринників в останні 14 років спостерігається тенденція до постійного зниження напруженості епізоотичного стану стосовно вищезазначеного захворювання (рисунок 1).

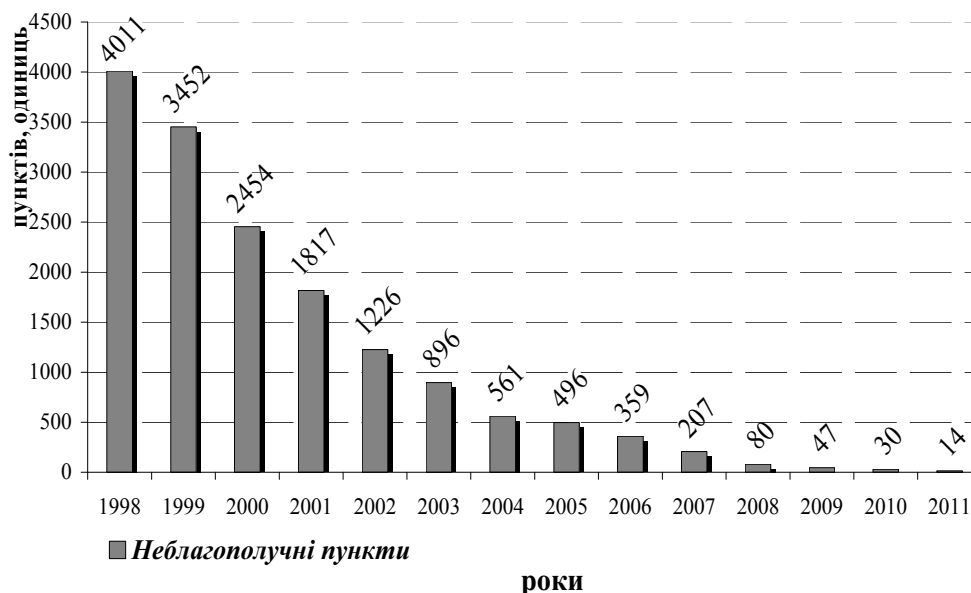


Рис. 1. Кількість неблагополучних пунктів в Україні в 1998–2011 рр.

У кінці 2012 року реєструється лише 4 неблагополучних пунктів в окремих областях – Донецькій (1), Рівненській (2) та Харківській (1). У найближчі терміни часу захворювання великої рогатої худоби на лейкоз, якщо брати до уваги статистичну звітність, буде в тваринництві України ліквідовано, принаймні на рівні колективних господарств/

Проведений нами аналіз свідчить, що окрім юридично фіксованих колективних господарств (неблагополучні пункти) захворювання на лейкоз на рівні 5–10 % інфікування спостерігається в інших господарствах. Упродовж кожного календарного року скомпрометовані на лейкоз тварини ізолюються за межі господарства (забій), тому в якості неблагополучних пунктів такі господарства не реєструються. У наступні ж роки в цих та інших благополучних щодо лейкозу господарствах знову виявляються інфіковані вірусом лейкозу тварини і знову, як і в попередні роки, такі господарства як неблагополучні пункти не реєструються. Все це не наносить збитків статистичній звітності на кінець календарного року, але, як наслідок, у повному обсязі проти лейкозних заходи, що передбачені законодавчими вимогами, в таких господарствах не проводяться. Це відіграло неабияку роль у системі розповсюдження та укорінення лейкозу великої рогатої худоби в тваринницьких господарствах України, давало можливість тваринницьким господарствам з низьким рівнем інфікованості «дозрівати» до рівня, коли неблагополучний пункт вже треба реєструвати. Динаміку чисельності господарств не реєстрованих в якості неблагополучних пунктів з наявністю інфікованих тварин на рівні 5–10 % наведено в рисунку 2.

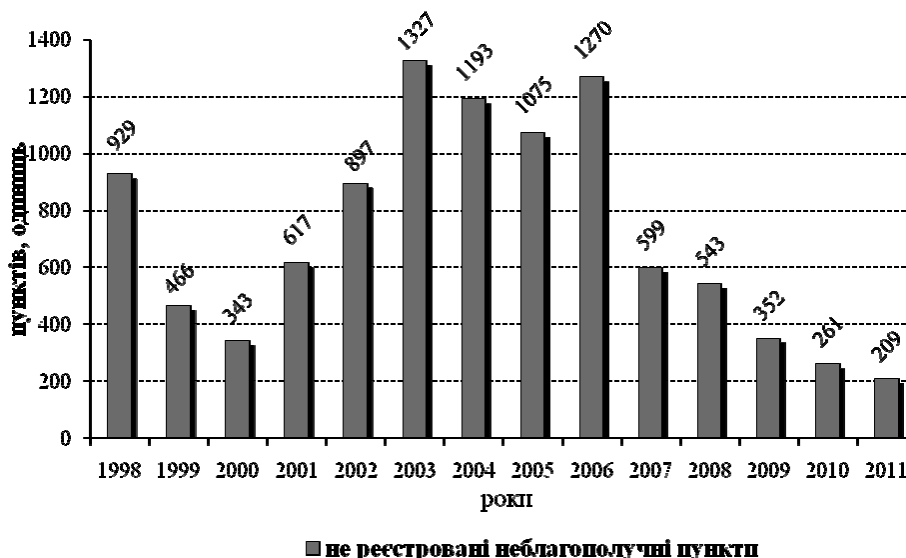


Рис. 2. Кількість господарств не реєстрованих в якості неблагополучних пунктів в Україні в 1998–2011 рр.

Як бачимо, навіть у період критичного зниження чисельності неблагополучних пунктів в останні два роки (30 та 14 одиниць) чисельність тваринницьких господарств, де, хай і поодинокі, але фіксується виявлення інфікованих вірусом лейкозу тварин, складає 261 та 209. Слід відмітити, що без достатньо поглиблених заходів по обмеженню розповсюдження захворювання в таких господарствах, останні становлять серйозну загрозу в плані рецидивів епізоотичних вогнищ. Варто зауважити, що впродовж останніх років спостерігається виявлення інфікованих вірусом лейкозу тварин приватного користування практично в кожній адміністративній зоні. У зв'язку з неузгодженістю питань компенсації збитків від санітарного забою скомпрометованих щодо лейкозу тварин приватного користування, останні в значній більшості продовжують утримуватись у господарствах власників худоби що, у свою чергу, становить загрозу рецидивів епізоотії лейкозу великої рогатої худоби в раніше оздоровлених регіонах.

Метою молекулярно-генетичних досліджень зразків вірусу лейкозу ВРХ з різних географічних зон було визначення генетичних особливостей, вірусу, що циркулює серед тварин різних регіонів України.

Встановлено, що в усіх випадках позитивні результати індикації провірусної ДНК ВЛ ВРХ корелювали з наявністю антитіл до збудника лейкозу в сироватці проб крові. При дослідженні 10 проб крові та молока корів умовноблагополучного щодо лейкозу ВРХ стада (АК «Слобожанський» Харківська область) усіх випадках антитіла до gp51 антигену ВЛ ВРХ не виявлені, хоч провірусна ДНК ВЛ ВРХ ізолювана в 9 випадках з лімфоцитів проб молока та в 7 випадках з клітин лімфоцитарної фракції проб крові. Причому, у двох випадках наявність провірусної ДНК встановлена в лімфоцитах двох проб молока РІД-негативних корів, у яких вірусоносійство не підтвердилось дослідженням лімфоцитарної фракції проб крові.

Таким чином, проведеними дослідженнями встановлена пряма кореляція між виділенням збудника лейкозу з крові та молока інфікованих вірусом лейкозу тварин і наявністю діагностичних антитіл у сироватці крові. Однак окремих випадках індикація вірусу з молочної залози не підтверджується наявністю провірусної ДНК у лімфоцитах крові РІД-негативних особин.

Для визначення можливої дивергенції та пов'язаної з нею генетичної мінливості вірусу лейкозу ВРХ було проведено секвенування та множинне вирівнювання, а також наступне порівняння послідовностей гена *env* ВЛ ВРХ, що циркулює в різних географічних зонах України. Для цього із міжнародної бази даних GenBank було обрано три повністю секвенованих послідовностей гена *env* ВЛ ВРХ з Бельгії (AF503581), США (AY078387) та Бразилії (AF399704) довжиною 1548 п.н., а також частково секвенований фрагмент гена *env* ВЛ ВРХ довжиною 960 п.н. з Польщі (AF111171). Виділено нуклеотиди, які для відповідної послідовності гена *env* ВЛ ВРХ не збігаються в даній позиції з нуклеотидами інших обраних послідовностей.

Визначено, що порівняно з послідовністю фрагмента гена *env* ВЛ ВРХ українських ізолятів відповідні фрагменти гена *env* усіх обраних для проведення комп'ютерного аналізу послідовностей мають не співпадаючі нуклеотиди. Встановлено наявність нуклеотидної заміни $T \rightarrow C$ у позиціях 88, 234 та 240 фрагмента гена *env* українських ізолятів порівняно з європейськими ізолятами ВЛ ВРХ (Польща, Бельгія), а також наявність нуклеотидних замін $C \rightarrow T$ у позиції 21, $G \rightarrow A$ у позиціях 61, 120 та 223, $A \rightarrow G$ у позиції 107, $T \rightarrow C$ у позиціях 171, 234 та 240 порівняно з ізолятами ВЛ ВРХ, який циркулює у країнах західної півкулі (Бразилія, США). Таким чином, показано, що обрані послідовності характеризуються певною дивергенцією. При цьому найменша дивергенція та, отже, найбільший ступінь гомології спостерігається для фрагментів гена *env* європейських ізолятів вірусу лейкозу ВРХ. Однак

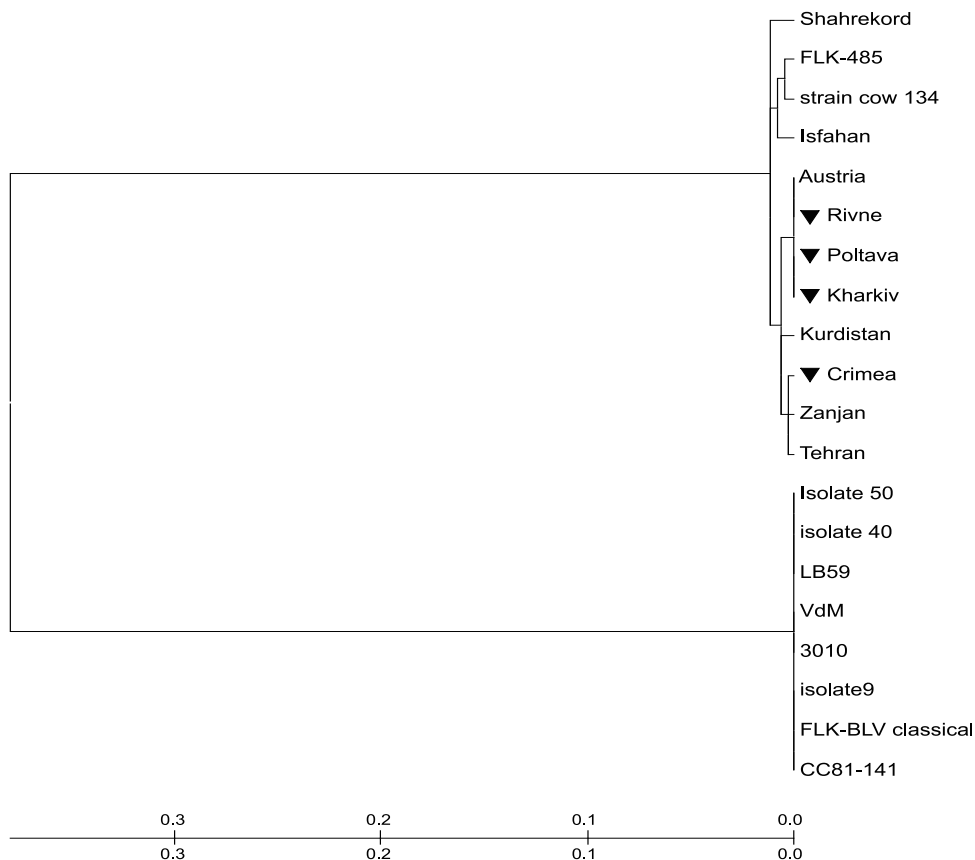


Рис. 3. Дендрограма, побудована на основі фрагментів гена *env* провірусної ДНК ізолятів вірусу лейкозу великої рогатої худоби з різних географічних регіонів світу

значенням дивергенції відносно фрагмента гена *env* українських ізолатів ВЛ ВРХ характеризуються відповідні послідовності провірусної ДНК ВЛ ВРХ, який циркулює у країнах західної півкулі. При цьому рівень дивергенції обраного фрагмента послідовностей гена *env* ВЛ ВРХ для ізолатів AF399704 та AY078387 сягає 1,65 %, перевищуючи цей показник для європейських ізолатів майже у два рази, що свідчить про більш високий рівень гомології відповідних послідовностей. Але в цілому отримані результати підтверджують дані про те, що ген *env* ВЛ ВРХ є високо консервативним, його первинна структура не перетерплює в залежності від ареалу розповсюдження збудника значимих змін.

Для встановлення первинної структури фрагментів геномного матеріалу ВЛ ВРХ шляхом секвенування до Національного ветеринарного дослідного інституту (м. Пулава, Польща) були передані зразки провірусної ДНК, екстрагованої з периферичної крові ВРХ, ізолатів вірусу лейкозу великої рогатої худоби, що циркулює в господарствах різних географічних регіонів України. Було проведено секвенування фрагментів гена *env* різної довжини – 747 та 444 п.н., отриманих шляхом ампліфікації з різними наборами праймерів для десяти ізолатів ВЛ ВРХ.

Наступне множинне вирівнювання секвенованих послідовностей та їх порівняння продемонстрували повну гомологію отриманих фрагментів гена *env* провірусної ДНК ВЛ ВРХ, екстрагованої з периферичної крові тварин з господарств різних географічних регіонів України, за винятком ізолату вірусу ВРХ, що циркулював у господарствах АР Крим. У послідовності гена *env* провірусної ДНК збудника лейкозу цього регіону спостерігалася мутація G→T у позиціях 43 та 488, рівень дивергенції становив лише 0,27 %. Згідно з концепцією «молекулярного годинника» білки мають характерну та постійну швидкість еволюції, яка відрізняється для різних біологічних видів та визначається мутаціями, що відбуваються у відповідних кодуючих генах та накопичуються від початку дивергенції. Мутації, які були виявлені для гена *env* провірусної ДНК ВЛ ВРХ, що циркулював у господарствах АР Крим, не є значущими для структурно-функціональної організації відповідного білка (рис. 3).

Висновки. 1. Тваринництво України на завершальному етапі оздоровлення від лейкозу великої рогатої худоби, проте наявність поодиноких випадків виявлення інфікованих вірусом лейкозу тварин в обмеженій чисельності господарств різного підпорядкування без належного проведення в останніх протиепізоотичних заходів становить реальну загрозу рецидиву епізоотії захворювання в раніше оздоровлених зонах.

2. Аналіз отриманих результатів свідчить про те, що первинна структура гена *env* ВЛ ВРХ не демонструє значних змін у залежності від географічного регіону та дозволяє припустити, що ізоляти ВЛ ВРХ, які циркулюють в Україні, належать до одного кластера при топологічному розподілі відповідних ізолатів, отриманих у різних країнах, проявляючи на дендрограмі філогенетичну однорідність.

Список літератури

1. Научные основы профилактики и борьбы с лейкозом крупного рогатого скота [Текст] / М.И. Гулюкин [и др.] // Тр.ВНИИЭВ им. Я.П. Коваленко. – М., 1999. – Т.72. – С.38–47. 2. О распространении лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / М.И. Гулюкин [и др.] // Ветеринария с.-х. животных. – 2006. – № 7. – С. 8–9. 3. Идентификация и классификация изолятов вируса лейкоза крупного рогатого скота России и Украины на основе анализа изменчивости вирусного гена *pol* [Текст] / М.Н. Рузина [и др.] // Генетика. – 2012. – Т. 48, № 7. – С. 855–862. 4. Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades [Text] / S.M. Rodriguez [et. al.] // J. Gen.Virol. – 2009. – Vol. 90. – P. 2788–2797.

STUDY OF EPIZOOTIC SITUATION ON BOVINE LEUKOSIS AND GENETIC VARIATIONS OF THE PATHOGEN IN DIFFERENT GEOGRAPHIC ZONES OF UKRAINE

Gorbatenko S.K., Gerilovich A.P., Shapovalova O.V., Korneykov A.N.

National Scientific Centre «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

Sulimova G.E.

Vavilov Institute of General Genetics, RA of Sciences, Moscow, Russia

The analysis of the epidemiological situation of bovine leukosis in Ukraine over the last 14 years has been conducted. The sequences of the leukemia virus env gene circulating in different geographic zones of Ukraine has been examined. There was shown sporadic detection of leukemia virus-infected animals in a limited number of farms at final stage of leucosis eradication are observed. The primary structure of the BLV env gene does not differ significantly depending on the geographical region.

УДК 616.98:578.828.11-616-084

ЛЕЙКОЗ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ. ЗДОБУТКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ

Горбатенко С.К., Шаповалова О.В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Провідна наукова установа – Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» відмічає 90-річний ювілей. Це привід для узагальнення значних позитивних зрушень у розвитку різноманітних напрямків ветеринарної науки, що культивовані в стінах вищезначеної установи. Лабораторія вивчення лейкозу з моменту започаткування (1968 рік) займає за терміном свого існування, як самостійний науковий підрозділ, вдвічі коротший від ювілейної дати період, хоч внесок науковців лабораторії у вивчення питань лейкозології, розробки та впровадження засобів ірадикації захворювання в тваринництві України досить вагомий. В Україні лейкоз великої рогатої худоби вперше діагностовано ще у 1955 році саме в тваринницьких господарствах Харківської області. Пізніше захворювання набуло поширення та реєструвалось практично в кожному регіоні. Основу діагностичних досліджень складала на той час методологія патологоанатомічного та гістологічного напрямку. Саме тому провідну роль у вивченні захворювання на перших етапах займали наукові дослідження фахівців з патоморфології УНДІЕВ Краснікова Г.А., Язикової К.М., Журавльова В.М..